

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (I) Χημικών Επιστημών



Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πράσινων διεργασιών
εγκλεισμού του φυσικού αλκαλοειδούς καφεΐνη σε
βιοσυμβατά λιποσωμικά συστήματα με χρήση
φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών

Διπλωματική εργασία

Σπηλιώτη Μαρίνα

Επιβλέπουσα

Αναστασία Δέτση

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2021

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε.Μ.Π, Δρ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Αυτή η εργασία σηματοδοτεί το τέλος ενός πενταετούς κύκλου σπουδών και επιστημονικής κατάρτισης στη σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Αισθάνομαι ευγνώμων για την ευκαιρία που μου δόθηκε να διευρύνω το γνωστικό μου πεδίο και να αναπτύξω τις δεξιότητές μου. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους οι οποίοι στάθηκαν αρωγοί σ' αυτήν μου την πορεία και ακαδημαϊκή ανέλιξη.

Αρχικά οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. κα. Αναστασία Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον θέμα, για το επίπεδο ελευθερίας και ευελιξίας που μου επέτρεψε πάνω σε αυτό, δείχνοντας μου απεριόριστη εμπιστοσύνη καθώς και για την άριστη συνεργασία μας καθ' όλη την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας.

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

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς, την Ιωάννα Πιττερού, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π, για την απεριόριστη στήριξη της σε όλη μου αυτή την προσπάθεια. Η κατάρτιση της, το επιστημονικό της υπόβαθρο και η επιστημονική της εμπειρία συντέλεσαν στη δημιουργία ενός άψογου κλίματος συνεργασίας για μια ευοδωτική έρευνα. Η ιδιαίτερη υπομονή της να μου εξηγεί όλες μου τις απορίες, οι ατέρμονες μας συζητήσεις γύρω από τους ασταμάτητους προβληματισμούς μου, καθώς και η τεράστια προθυμία της να με βοηθήσει με οποιοδήποτε πρόβλημα ανέκυπτε, αποτελούσαν έρεισμα αυτής της εργασίας καθ' όλη τη διεξαγωγή της.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα. Ζαμπία Κατσανεβάκη για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε στο εργαστηριακό κομμάτι της εργασίας μου.

Οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π, τους διδάκτορες, τους υποψήφιους διδάκτορες, καθώς και τους υπόλοιπους συμφοιτητές μου, οι οποίοι δημιούργησαν ένα υπέροχο κλίμα συνεργασίας, στήριξης και συμπαράστασης.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για όλη την αγάπη και στήριξη που μου έδειξε όλα τα χρόνια της εξελικτικής μου πορείας, για τις αρχές και αξίες, τις οποίες μου εμφύσησε και για όλη της την βοήθεια στη διαμόρφωση της ιδιοπροσωπίας και χαρακτήρα μου. Ο κύκλος αυτός φτάνει στο τέλος του, αφιερώνοντας τη διπλωματική μου εργασία στην αγαπημένη μου γιαγιά, η οποία με έμαθε να διαβάζω, να αναρωτιέμαι και διαρκώς να εξελίσσομαι.

Περίληψη

Η καφεΐνη, ή αλλιώς η 1,3,7-τριμέθυλο ξανθίνη, ανήκει στην οικογένεια των ξανθινών και εντοπίζεται στους καρπούς, στα φύλλα του καφεόδενδρου και στο ρόφημα του τσαγιού. Η καφεΐνη αποτελεί ψυχοδραστική ουσία καθώς δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα του ανθρώπου, διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και σε κατάλληλες ποσότητες έχει αποδειχθεί ωφέλιμη για την ανθρώπινη υγεία. Το μόριο της καφεΐνης χάρη στην εξαιρετική του διαλυτότητα τόσο στο νερό όσο και στα λίπη διαθέτει την ικανότητα να διέρχεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο εγκλεισμός της καφεΐνης σε λιποσωμικούς φορείς. Αυτοί οι φορείς είναι βιοσυμβατοί και παρέχουν σταδιακή και ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας.

Σκοπό της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πράσινων διεργασιών εγκλεισμού του φυσικού αλκαλοειδούς καφεΐνη σε βιοσυμβατά λιποσωμικά συστήματα με χρήση φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών.

Λιποσωμικοί φορείς, όπως λιποσώματα και νιοσώματα, τα οποία έχουν διαστάσεις στην νανοκλίμακα, παρέχουν προστασία του φαρμάκου από την αποδόμηση και στοχευμένη αποδέσμευση, ενώ μη ιοντικά επιφανειοδραστικά κυστίδια (νιοσώματα), μελετήθηκαν ως προς τις βελτιωμένες τους ιδιότητες. Τα κυστίδια αυτά παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας μη ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες και όχι φωσφολιπίδια, με πλεονέκτημα στη χημική τους σταθερότητα. Στη συγκεκριμένη μελέτη τα λιποσώματα αποτελούνται από χοληστερόλη, φωσφατιδυλοχολίνη και Polysorbate 80 (Tween 80), ενώ τα νιοσώματα αποτελούνται από χοληστερόλη και Sorbitan Monostearate (Span 60). Και τα δύο νανοσυστήματα επικαλύπτονται με χιτοζάνη, με τη μέθοδο της δημιουργίας λεπτού υμενίου.

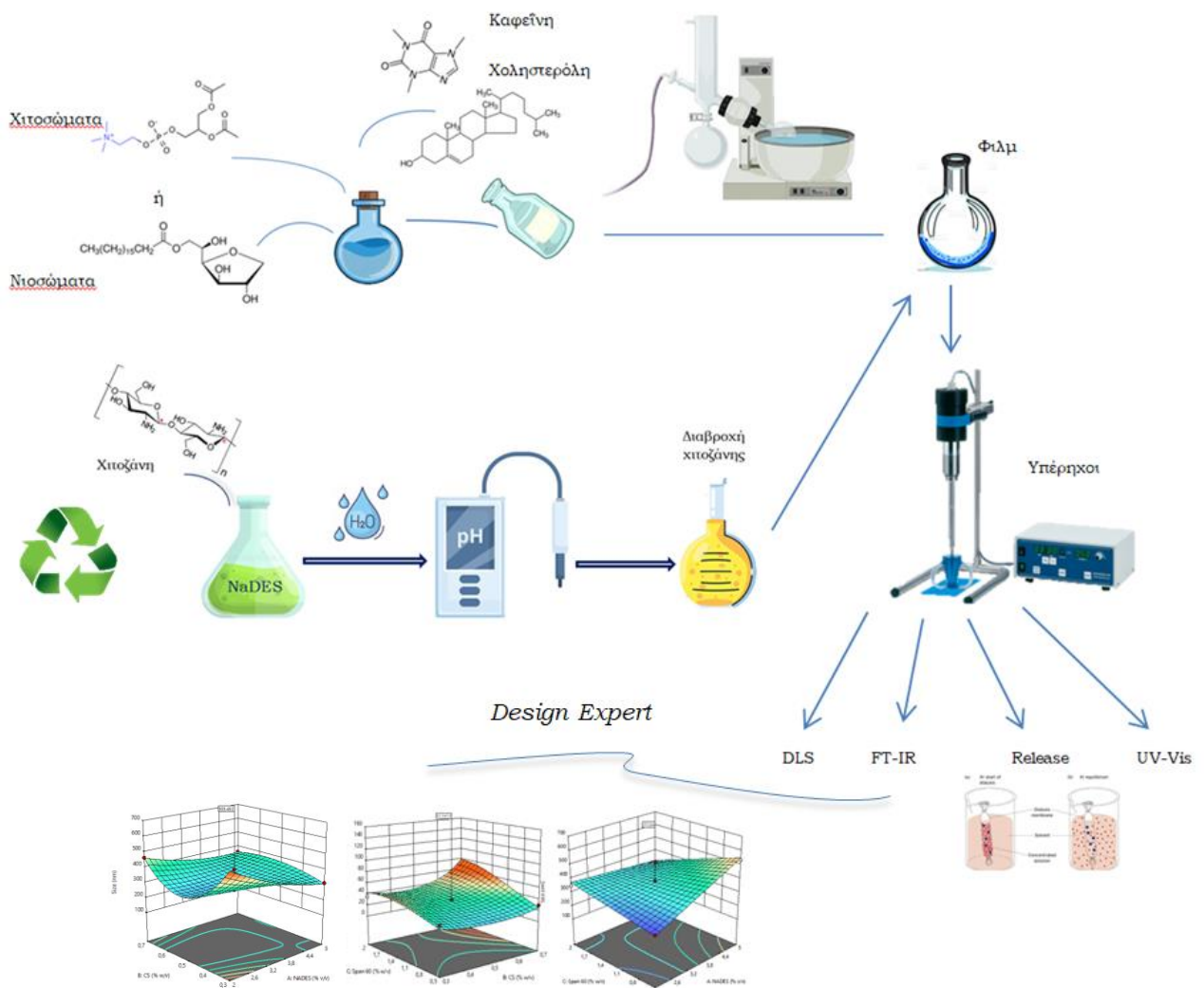
Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικό πολυμερές το οποίο παρουσιάζει υψηλή βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα και βλεννοκολλητικές ιδιότητες, ενώ παράλληλα προσδίδει στα σωματίδια περισσότερη στήριξη και αυξάνει τον θεραπευτικό τους δείκτη. Η διαλυτοποίηση πραγματοποιείται με χρήση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NADES), με συστατικά βεταΐνη (Bet) και το γαλακτικό οξύ (LA).

Οι βέλτιστες αναλογίες για τις παραμέτρους του κάθε νανοσυστήματος, υπολογίστηκαν μέσω του προγράμματος Box-Behnken για τριπλό επίπεδο εξάρτησης. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές οι οποίες επιλέχθηκαν ήταν: η περιεκτικότητα του NADES (% v/v), η περιεκτικότητα της χιτοζάνης (CS) (% w/v) και η περιεκτικότητα του επιφανειοδραστικού tween 80 (% w/v), όσον αφορά τα χιτοσώματα ή του Span 60 (% w/v) ,για τα νιοσώματα. Οι αποκρίσεις οι οποίες μελετήθηκαν (εξαρτημένες μεταβλητές) ήταν: το μέγεθος των σωματιδίων, ο δείκτης πολυδιασποράς PDI καθώς και η απόδοση εγκλεισμού.

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν, χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους (DLS, FT-IR, UV-Vis), ενώ παράλληλα μελετήθηκαν για το προφίλ αποδέσμευσης και την κινητική απελευθέρωσης της καφεΐνης. Τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη νιοσώματα αποδείχθηκε πως σχηματίζονται ευκολότερα καθώς και να παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα με βάση το ζ-δυναμικό. Τα χιτοσώματα, δηλαδή τα λιποσώματα τα οποία διέθεταν περίβλημα χιτοζάνης παρουσίασαν μεγαλύτερες αποδόσεις εγκλεισμού, EE=78%, έναντι των νιοσωμάτων 60%. Τα σχηματιζόμενα σωματίδια και στις δύο περιπτώσεις είχαν παρόμοια μεγέθη, με τα λιποσώματα επικαλυμμένα με χιτοζάνη να παρουσιάζονται ελαφρώς μικρότερα.

Επιστημονική περιοχή: Πράσινη Χημεία, Φαρμακευτική Χημεία, Νανοτεχνολογία

Λέξεις κλειδιά: καφεΐνη, λιποσώματα, χιτοζάνη, χιτοσώματα, νιοσώματα, εγκλεισμός, απελευθέρωση, κινητική μοντελοποίηση, φυσικοί βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες



Εικόνα 1. Γραφική περίληψη

Abstract

Caffeine (1,3,7-Trimethylxanthine) is a substance of the methylxanthine class, which naturally occurs in seeds and leaves of several plants and is found especially in coffee. Caffeine acts as a central nervous system stimulant, has also antioxidant properties and in proper quantities has proven to be beneficial for human's health. This molecule has the ability of crossing the brain's blood barrier due to its' great solubility to both water and fat.

Due to caffeine's water and fat solubility, the molecule's encapsulation is favoured in liposome carriers. These carriers are biocompatible and also provide slow and controlled release of the compound.

The aim of this study is the development and optimization of green processes regarding the encapsulation of the natural alkaloid caffeine in biocompatible nanosystems using natural deep eutectic solvents.

Lipid carriers, such as liposomes and niosomes have nanoscale dimensions and provide the drug with protection against degradation and targeted delivery, while non-ionic surfactant vesicles (niosomes) are also studied due to their improved properties. These vesicles are prepared using non-ionic surfactants and not phospholipids, with an advantage in their chemical stability. In this context, liposomes consist of cholesterol, phosphatidylcholines and Polysorbate 80 (Tween80), while niosomes consist of cholesterol and Sorbitan Monostearate (Span 60). Both of the nanoparticle systems are coated with chitosan and are formed with the thin film hydration method.

Chitosan is a natural occurring polymer with high biocompatibility, biodegradability and mucosal properties, while also providing the particles with more stability and improving their therapeutic index. The hydration is formed using a Natural Deep Eutectic Solvent (NADES), consisting of betaine and lactic acid.

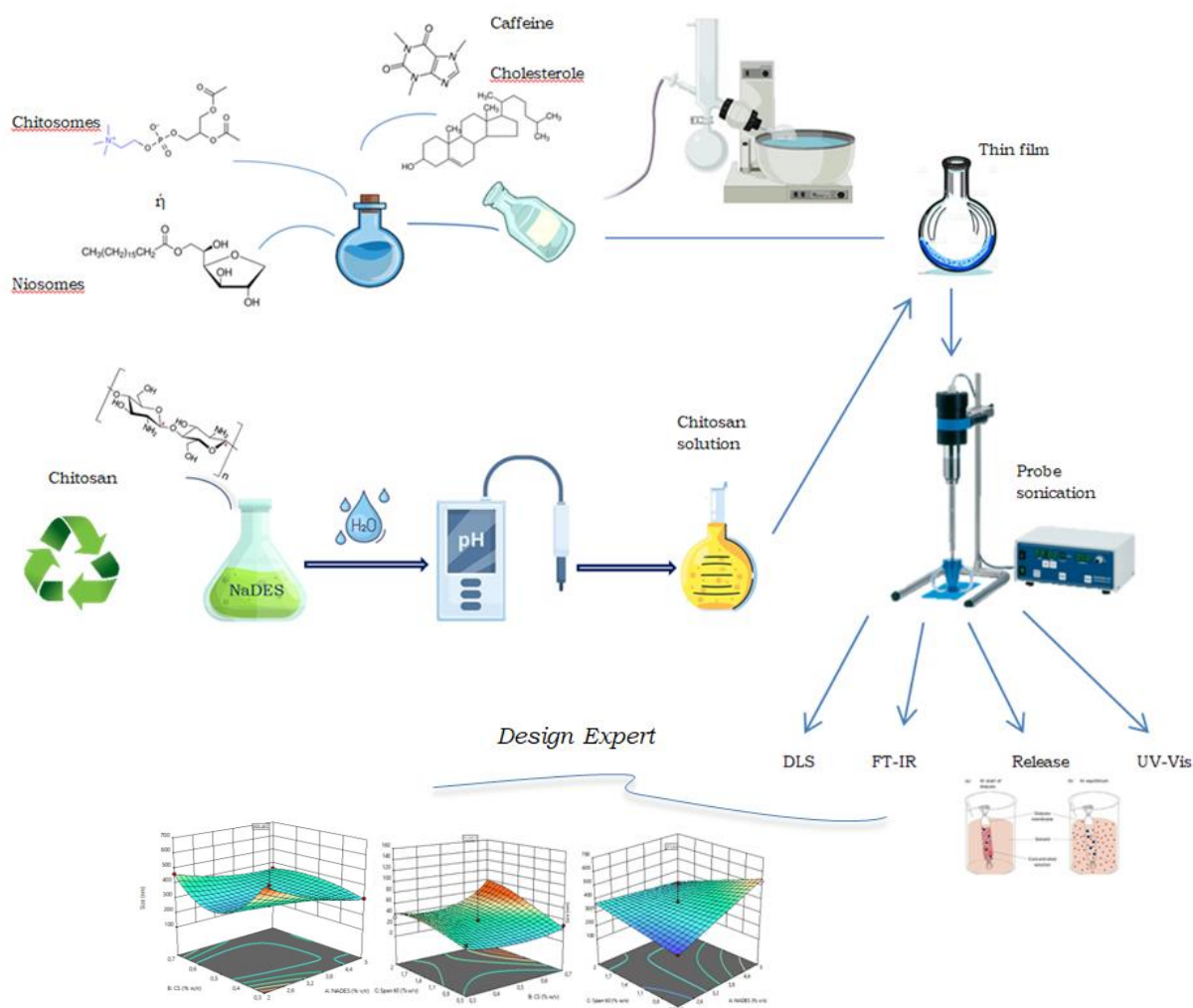
The optimal proportions and parameters of each nanosystem were calculated through three-level Box-Behnken experimental designs. The independent variables selected were: NADES content (% v/v), chitosan content (% w/v), and Tween 80 content (% w/v), regarding the chitosomes or Span 60 content (% w/v), regarding the niosomes. As for the responses, the dependent variables studied were: particle size, PDI index and encapsulation efficiency.

Thereafter, the nanoparticles were evaluated for their physical characteristics using several techniques (DLS, FT-IR, UV-Vis), and also studied for their release profile and kinetic modeling. Niosomes have been proven to be formed easier and are more stable (according to their zeta potential), but chitosan coated liposomes (chitosomes) are proven to have greater encapsulation efficiency, EE=78% while the encapsulation efficiency in niosomes was

60%. The particles formed in both scenarios had similar sizes, with the chitosomes being slightly smaller.

Scientific Area: Pharmaceutical Chemistry, Green Chemistry Pharmaceutical Nanotechnology,

Key words: caffeine, liposomes, chitosan, chitosomes, niosomes, release, kinetic modeling, natural deep eutectic solvents (NADES)



Εικόνα 2. Graphical abstract

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος	2
Περίληψη.....	3
Abstract.....	5
Ευρετήριο εικόνων.....	9
Ευρετήριο διαγραμμάτων	10
Ευρετήριο πινάκων.....	13
Ευρετήριο σχημάτων	14
Θεωρητικό μέρος.....	16
Καφεΐνη	16
Ιστορία του καφέ	16
Η ένωση της καφεΐνης	18
Σύνθεση της καφεΐνης	18
Απομόνωση καφεΐνης	19
Οικογένεια των ξανθινών	20
Περιεκτικότητα καφεΐνης.....	21
Δράση καφεΐνης	22
Καφεόδενδρο και ποικιλίες καφέ	24
Οφέλη και παρενέργειες της καφεΐνης.....	26
Λιποσώματα	28
Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα λιποσωμικών φορέων.....	30
Μέγεθος σωματιδίων	31
Μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων.....	32
Μέθοδοι ομογενοποίησης μεγεθών	34
Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	35
Z-δυναμικό	37
Φασματομετρία Υπερύθρου FT-IR.....	38
Χιτοζάνη	39
Ιδιότητες χιτοζάνης	40
Χιτοζάνη και δέρμα	41
Χιτοσώματα	41
Χιτοσώματα και καφεΐνη.....	43
Νιοσώματα	44
Πλεονεκτήματα νιοσωμάτων.....	45
Προνιοσώματα.....	46

Μέθοδοι σχηματισμού νιοσωμάτων.....	46
Πράσινη Χημεία	47
Πράσινοι διαλύτες (DES, NaDES, THEDES).....	48
Μελέτη απελευθέρωσης (In Vitro Release Study).....	52
Πειραματικό μέρος.....	57
Σκοπός	57
Όργανα και αντιδραστήρια.....	57
Παρασκευή σωματιδίων	59
Σύνθεση λιποσωμάτων	59
Συνθετική πορεία NaDES Bet:LA.....	61
Σύνθεση χιτοσωμάτων.....	63
Σύνθεση νιοσωμάτων	66
Αποτελέσματα-Συζήτηση	68
Μέγεθος, PDI και EE% χιτοσωμάτων.....	68
Μέγεθος χιτοσωμάτων.....	73
Δείκτης πολυδιασποράς PDI των χιτοσωμάτων	79
Απόδοση εγκλεισμού EE% των χιτοσωμάτων.....	85
Βελτιστοποίηση χιτοσωμάτων	91
Επιβεβαίωση του μοντέλου (confirmation)	92
Σύγκριση εναλλακτικών διαλυτών	93
Μέγεθος, PDI και EE% νιοσωμάτων.....	94
Μέγεθος νιοσωμάτων	97
Δείκτης πολυδιασποράς PDI των νιοσωμάτων.....	103
Απόδοση εγκλεισμού EE% των νιοσωμάτων	109
Βελτιστοποίηση νιοσωμάτων.....	115
Σύγκριση εναλλακτικών διαλυτών	116
Μελέτη απελευθέρωσης (In Vitro Release Study).....	118
Μελέτη δομής μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).....	124
Συμπεράσματα	129
Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	132
Συμμετοχή σε διεθνή συνέδρια.....	133
Βιβλιογραφία	134
Παράρτημα διαγραμμάτων.....	142

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1. Γραφική περίληψη.....	4
Εικόνα 2. Graphical abstract	6
Εικόνα 3. Ανταγωνιστική πρόσδεση της καφεΐνης με υποδοχέα αδενosίνης....	23
Εικόνα 4. Χάρτης ζώνης καφέ	24
Εικόνα 5. Καρπός καφέ	24
Εικόνα 6. Κόκκοι καφέ διαφορετικών ποικιλιών	26
Εικόνα 7. Δομικά στοιχεία λιποσώματος	28
Εικόνα 8. Δομή φωσφολιπιδίου	29
Εικόνα 9. Μεγέθη και είδη λιποσωμάτων ^[33]	31
Εικόνα 10. Probe sonication	34
Εικόνα 11. Αρχή λειτουργίας της δυναμικής σκέδασης φωτός	36
Εικόνα 12. Z-δυναμικό.....	37
Εικόνα 13. Αρχή λειτουργίας οργάνου FT-IR	38
Εικόνα 14. Καθοριστικοί παράγοντες των ιδιοτήτων της χιτοζάνης.....	40
Εικόνα 15. Δομή χιτοσωμάτων	43
Εικόνα 16. Δομή νιοσωμάτων	45
Εικόνα 17. Χρονολογική πορεία ανακάλυψης (φυσικών) βαθέων ευτηκτικών διαλυτών ^[72]	50
Εικόνα 18. Μηχανισμοί απελευθέρωσης με: A) διάχυση μέσω πόρων, B) διάχυση μέσω μήτρας, C) ωσμωτική άντληση, D) διάβρωση ^[60]	52
Εικόνα 19. Μέθοδος μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης	56
Εικόνα 20. Χιτοσώματα σε διασπορά	57
Εικόνα 21. Λυοφιλωμένα λιποσώματα	60
Εικόνα 22. Εργαστηριακή σύνθεση NaDES	63
Εικόνα 23. Εργαστηριακή σύνθεση χιτοσωμάτων	64
Εικόνα 25. Λυοφιλωμένα νιοσώματα και χιτοσώματα	67
Εικόνα 26. Λυοφιλωμένα χιτοσώματα με βάση τις αναλογίες του πειραματικού σχεδιασμού	69
Εικόνα 27. Λυοφιλωμένα νιοσώματα με βάση τις αναλογίες του πειραματικού σχεδιασμού	95
Εικόνα 28. Λυοφιλωμένα σωματίδια (54: χιτοσώματα με διαλύτη γαλακτικό οξύ, 56: χιτοσώματα με διαλύτη φυσικό μείγμα, 49: νιοσώματα με διαλύτη γαλακτικό οξύ, 48: νιοσώματα (blank), 52: χιτοσώματα, 47: νιοσώματα)	117
Εικόνα 30. Μεμβράνη διάλυσης-διάχυσης	118
Εικόνα 31. Έπικίνδυνες ουσίες'	128

Ευρετήριο διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Σχηματισμός ευτηκτικού σημείου	49
Διάγραμμα 2. Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6)	62
Διάγραμμα 3. Καμπύλη συσχέτισης και απορρόφησης καφεΐνης συγκέντρωσης	72
Διάγραμμα 4. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με το μέγεθος των σωματιδίων	74
Διάγραμμα 5. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης με το μέγεθος των σωματιδίων.....	75
Διάγραμμα 6. Συσχέτιση περιεκτικότητας Tween 80 με το μέγεθος των σωματιδίων.....	75
Διάγραμμα 7. Πραγματικές τιμές μεγέθους σωματιδίων και προβλεπόμενες από το μοντέλο.....	77
Διάγραμμα 8. Επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο μέγεθος των σωματιδίων.....	77
Διάγραμμα 9. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και χιτοζάνης ως προς το μέγεθος των σωματιδίων	78
Διάγραμμα 10. Συσχέτιση μεγέθους σωματιδίων και περιεκτικότητας NaDES, CS	78
Διάγραμμα 11. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES,CS, Tween 80 με το μέγεθος των σωματιδίων.	79
Διάγραμμα 12. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων.....	80
Διάγραμμα 13. Συσχέτιση περιεκτικότητας CS με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων	80
Διάγραμμα 14. Συσχέτιση περιεκτικότητας Tween 80 με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων.....	81
Διάγραμμα 15. Πραγματικές τιμές δείκτη πολυδιασποράς και προβλεπόμενες από το μοντέλο.....	82
Διάγραμμα 16. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και Tween 80 ως προς το δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων.....	83
Διάγραμμα 17. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης και Tween 80 ως προς το δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων.....	83
Διάγραμμα 18. Συσχέτιση δείκτη πολυδιασποράς και περιεκτικότητας NaDES, CS	84
Διάγραμμα 19. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES, CS, Tween 80 δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων.	85
Διάγραμμα 20. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με την απόδοση εγκλεισμού	86
Διάγραμμα 21. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης με την απόδοση εγκλεισμού.....	86
Διάγραμμα 22. Συσχέτιση περιεκτικότητας Tween 80 με την απόδοση εγκλεισμού.....	87
Διάγραμμα 23. Πραγματικές τιμές απόδοσης εγκλεισμού και προβλεπόμενες από το μοντέλο.....	88

Διάγραμμα 24. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και Tween 80 ως προς την απόδοση εγκλεισμού.....	88
Διάγραμμα 25. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης και Tween 80 ως προς την απόδοση εγκλεισμού.....	89
Διάγραμμα 26. Συσχέτιση απόδοσης εγκλεισμού και περιεκτικότητας CS και Tween 80.....	89
Διάγραμμα 27. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES, CS, Tween 80 με την απόδοση εγκλεισμού ΕΕ%.	90
Διάγραμμα 28. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με το μέγεθος των σωματιδίων.....	98
Διάγραμμα 29. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης με το μέγεθος των σωματιδίων.....	98
Διάγραμμα 30. Συσχέτιση περιεκτικότητας Span 60 με το μέγεθος των σωματιδίων.....	99
Διάγραμμα 31. Πραγματικές τιμές μεγέθους σωματιδίων και προβλεπόμενες από το μοντέλο	100
Διάγραμμα 32. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και χιτοζάνης ως προς το μέγεθος των σωματιδίων	101
Διάγραμμα 33. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και Span 60 ως προς το μέγεθος των σωματιδίων	101
Διάγραμμα 34. Συσχέτιση μεγέθους σωματιδίων και περιεκτικότητας NaDES, Span 60.....	102
Διάγραμμα 35. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES, CS, Span 60 με το μέγεθος των σωματιδίων.....	103
Διάγραμμα 36. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων	104
Διάγραμμα 37. Συσχέτιση περιεκτικότητας CS με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων	104
Διάγραμμα 38. Συσχέτιση περιεκτικότητας Span 60 με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων	105
Διάγραμμα 39. Πραγματικές τιμές δείκτη πολυδιασποράς και προβλεπόμενες από το μοντέλο	106
Διάγραμμα 40. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και χιτοζάνης ως προς το δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων	106
Διάγραμμα 41. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και Span 60 ως προς το δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων	107
Διάγραμμα 42. Συσχέτιση δείκτη πολυδιασποράς και περιεκτικότητας CS, Span 60.....	107
Διάγραμμα 43. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES, CS, Span 60 δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων.	108
Διάγραμμα 44. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με την απόδοση εγκλεισμού	109
Διάγραμμα 45. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης με την απόδοση εγκλεισμού.....	110
Διάγραμμα 46. Συσχέτιση περιεκτικότητας Span 60 με την απόδοση εγκλεισμού.....	110

Διάγραμμα 47 . Πραγματικές τιμές απόδοσης εγκλεισμού και προβλεπόμενες από το μοντέλο	112
Διάγραμμα 48. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και χιτοζάνης ως προς την απόδοση εγκλεισμού.....	112
Διάγραμμα 49. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και Span 60 ως προς την απόδοση εγκλεισμού.....	113
Διάγραμμα 50. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης και Span 60 ως προς την απόδοση εγκλεισμού.....	113
Διάγραμμα 51. Συσχέτιση απόδοσης εγκλεισμού και περιεκτικότητας CS και Span 60.....	114
Διάγραμμα 52. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES, CS, Span 60 με την απόδοση εγκλεισμού EE%.	115
Διάγραμμα 53. Αποδέσμευση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα συναρτήσει του χρόνου.....	119
Διάγραμμα 54. Μοντέλο μηδενικής τάξης για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα	119
Διάγραμμα 55. Μοντέλο πρώτης τάξης για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα	120
Διάγραμμα 56. Μοντέλο Higuchi για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα	120
Διάγραμμα 57. Μοντέλο Korsmeyer-Peppas για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα.....	121
Διάγραμμα 58. Αποδέσμευση της καφεΐνης από τα νιοσώματα συναρτήσει του χρόνου.....	121
Διάγραμμα 59. Μοντέλο μηδενικής τάξης για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα νιοσώματα.....	122
Διάγραμμα 60. Μοντέλο πρώτης τάξης για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα νιοσώματα.....	122
Διάγραμμα 61. Μοντέλο Higuchi για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα νιοσώματα	123
Διάγραμμα 62. Μοντέλο Korsmeyer-Peppas για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα νιοσώματα	123
Διάγραμμα 63. Φάσμα FT-IR του NaDES Bet:LA.....	124
Διάγραμμα 64. Φάσμα FT-IR της καφεΐνης.....	125
Διάγραμμα 65. Φάσμα FT-IR του τυφλού δείγματος των χιτοσωμάτων.....	125
Διάγραμμα 66. Φάσμα FT-IR των χιτοσωμάτων	126
Διάγραμμα 67. Φάσμα FT-IR του τυφλού δείγματος νιοσωμάτων	127
Διάγραμμα 68. Φάσμα FT-IR των νιοσωμάτων.....	127
Διάγραμμα 69. DLS λιποσωμάτων	142
Διάγραμμα 70. DLS λιποσωμάτων	142
Διάγραμμα 71. DLS νιοσωμάτων	143
Διάγραμμα 72. DLS νιοσωμάτων	143
Διάγραμμα 73. DLS χιτοσωμάτων.....	144
Διάγραμμα 74. DLS χιτοσωμάτων.....	144
Διάγραμμα 75. DLS για βέλτιστες αναλογίες χιτοσωμάτων	145
Διάγραμμα 76. DLS για βέλτιστες αναλογίες χιτοσωμάτων	145
Διάγραμμα 77. DLS για βέλτιστες αναλογίες νιοσωμάτων.....	146

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1. Συντομογραφίες	15
Πίνακας 2. Ιδιότητες της καφεΐνης	18
Πίνακας 3. Περιεκτικότητα σε καφεΐνη ανάλογα με τον τύπο καφέ	21
Πίνακας 4. Ποσότητα καφεΐνης σε δημοφιλή ροφήματα	22
Πίνακας 5. Μέθοδοι σχηματισμού λιποσωμάτων	33
Πίνακας 6. Μέθοδοι ελάττωσης μεγεθών σωματιδίων	35
Πίνακας 7. Τύποι βαθέων ευτηκτικών διαλυτών, DES	49
Πίνακας 8. Όργανα και συσκευές.....	58
Πίνακας 9. Αντιδραστήρια.....	58
Πίνακας 10. Παράμετροι υπό μελέτη προς βελτιστοποίηση συγκεκριμένων αποκρίσεων των χιτοσωμάτων	68
Πίνακας 11. Οριοθέτηση παραμέτρων χιτοσωμάτων	68
Πίνακας 12. Προβλεπόμενα πειράματα για τη σύνθεση των χιτοσωμάτων.....	68
Πίνακας 13. Συγκεντρώσεις και αντίστοιχες απορροφήσεις διαλυμάτων καφεΐνης.....	71
Πίνακας 14. Παράγοντες μελέτης χιτοσωμάτων και αντίστοιχες αποκρίσεις....	72
Πίνακας 15. Παράμετροι για σύνθεση βέλτιστων χιτοσωμάτων	91
Πίνακας 16. Μέγεθος, PDI, EE% για τις βέλτιστες αναλογίες των χιτοσωμάτων	91
Πίνακας 17. Σύγκριση πειραματικών και προβλεπόμενων αποκρίσεων των χιτοσωμάτων.....	92
Πίνακας 18. Τιμές αποκρίσεων για τα ‘βέλτιστα’ χιτοσώματα.....	92
Πίνακας 19. Επιβεβαίωση εγκυρότητας των αποκρίσεων των χιτοσωμάτων	92
Πίνακας 20. Σύγκριση μεγέθους, PDI, EE% για διαφορετικούς διαλύτες.....	93
Πίνακας 21. Παράμετροι υπό μελέτη προς βελτιστοποίηση συγκεκριμένων αποκρίσεων των νιοσωμάτων.....	94
Πίνακας 22. Οριοθέτηση παραμέτρων νιοσωμάτων.....	94
Πίνακας 23. Προβλεπόμενα πειράματα για τη σύνθεση των νιοσωμάτων	95
Πίνακας 24. Παράγοντες μελέτης νιοσωμάτων και αντίστοιχες αποκρίσεις.....	97
Πίνακας 25. Προτεινόμενα μοντέλα συσχέτισης απόδοσης εγκλεισμού EE% με τις ανεξάρτητες μεταβλητές (NaDES, CS, Span 60)	111
Πίνακας 26. Παράμετροι για σύνθεση βέλτιστων νιοσώματα.....	116
Πίνακας 27. Μέγεθος, PDI, EE% για τις βέλτιστες αναλογίες των νιοσώματα	116
Πίνακας 28. Σύγκριση πειραματικών και προβλεπόμενων αποκρίσεων των νιοσώματα	116
Πίνακας 29. Σύγκριση μεγέθους, PDI, EE% για διαφορετικούς διαλύτες.....	117
Πίνακας 30. ‘Βέλτιστες’ αναλογίες χιτοσωμάτων	130
Πίνακας 31. ‘Βέλτιστες’ αναλογίες νιοσωμάτων.....	130
Πίνακας 32. Σύγκριση των αποκρίσεων χιτοσωμάτων και νιοσωμάτων, τα οποί παρασκευάστηκαν με τις ‘βέλτιστες’ αναλογίες.....	130

Ευρετήριο σχημάτων

Σχήμα 1. Χρονολογική πορεία εξαίπλωσης του καφέ.....	17
Σχήμα 2. Μοριακή απεικόνιση του μορίου της καφεΐνης.....	18
Σχήμα 3. Σύνθεση καφεΐνης από συμπύκνωση της 1,3 διμεθυλουρίας με κυανοξικό αιθυλεστέρα	19
Σχήμα 4. Σύνθεση καφεΐνης από θεοβρωμίνη.....	19
Σχήμα 5. Καφεΐνη και άλλες ξανθίνες.....	21
Σχήμα 6. Δομή καφεΐνης και αδενοσίνης.....	23
Σχήμα 7. Ποσοστά παραγωγής ποικιλιών καφέ	25
Σχήμα 8. Συνθετική πορεία λιποσωμάτων με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού φιλμ.....	33
Σχήμα 9. Δομή της χιτοζάνης.....	39
Σχήμα 10. Δημιουργία προνισωμάτων	46
Σχήμα 11. Σχηματισμός νισωμάτων με τη μέθοδο TFH	46
Σχήμα 12. Οι 12 αρχές της πράσινης χημείας.....	48
Σχήμα 13. Διάφοροι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες	51
Σχήμα 14. Διφασική απελευθέρωση δραστικής ουσίας σε σύγκριση με μηδενικής τάξης.[60]	53
Σχήμα 15. Παρασκευή φιλμ λιπιδίων.....	60
Σχήμα 16. Ενυδάτωση λεπτού φιλμ και χρήση υπερήχων	60
Σχήμα 17. Σύνθεση βαθέως ευτηκτικού διαλύτη.....	61
Σχήμα 18. Ενυδάτωση λεπτού φιλμ με διάλυμα χιτοζάνης με χρήση βαθέως ευτηκτικού διαλύτη	63
Σχήμα 19. Σύνθεση χιτοσωμάτων	65
Σχήμα 20. Σύνθεση νισωμάτων.....	67
Σχήμα 21. Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών σύνθεσης χιτοσωμάτων και αναμενόμενες αποκρίσεις	91
Σχήμα 22. Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών σύνθεσης νισωμάτων και αναμενόμενες αποκρίσεις	115

Παρατίθενται πίνακας με τις συντομογραφίες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Πίνακας 1.Συντομογραφίες

Συντομογραφίες	
Bet	βεταΐνη
CH	χοληστερόλη
CS	χιτοζάνη
DCM	δικλωρομεθανίο
DLS	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
DNA	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EE	απόδοση εγκλεισμού
FT-IR	φασματοσκοπία υπερύθρου
GRAS	γενικά αναγνωρισμένη ως ασφαλής
GUV	μονοστρωματικά γιγαντιαία κυστίδια
LA	γαλακτικό οξύ
LUV	μονοστρωματικά μεγάλα κυστίδια
MeOH	μεθανόλη
MLV	πολυστρωματικά κυστίδια
MMV	πολλαπλά εγκλεισμένα κυστίδια
NaDES	φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης
PDI	δείκτης πολυδιασποράς
PC	φωσφατυδιλοχολίνη
rpm	στροφές ανά λεπτό
Span 60	μονοστεατική σορβιτάνη
SPF	βαθμός προστασίας από τον ήλιο
SUV	μονοστρωματικά μικρά κυστίδια
THF	ενυδάτωση λεπτού φιλμ
Tween 80	πολυσορβικό 80
UV-Vis	φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού

Θεωρητικό μέρος

Καφεΐνη

Ιστορία του καφέ

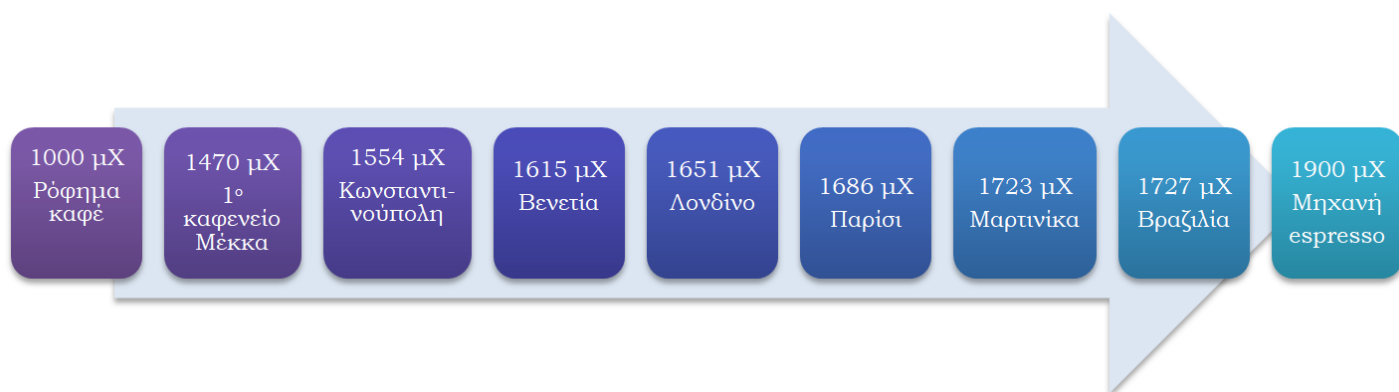
Καφές ή kaffee ή café, όπως και να τον αποκαλέσει κανείς, αποτελεί το δεύτερο πιο δημοφιλές ρόφημα παγκοσμίως, με την πρώτη θέση να αποδίδεται στο νερό. Κάθε μέρα εκατομμύρια άνθρωποι βασίζονται στον καφέ για να ξυπνήσουν, με τη μέση παγκόσμια ημερήσια κατανάλωση να ανέρχεται στις 2,25 δισεκατομμύρια κούπες καφέ. Η ονομασία καφές προέρχεται από την λέξη Kaffa, πόλη λιμάνι της Αιθιοπίας, όπου και πρωτοανακαλύφθηκε καθώς και από τη λέξη qahweh, η οποία σημαίνει κρασί στα αραβικά. ^{[1],[2],[3],[4],[5]}

Ο καφές αποτελεί το ρόφημα ψημένων/καβουρδισμένων κόκκων του καρπού του φυτού καφέας ή αλλιώς του καφεόδενδρου και η εμφάνιση του αποδίδεται στον Kaldi, έναν Αιθίοπα βοσκό στην περιοχή της Κάφας (Kaffa), ο οποίος παρατήρησε τις κασίκες του να ανακτούν τη ζωηράδα τους μετά από κατανάλωση των καρπών του καφεόδενδρου. Αφού δοκίμασε και ο ίδιος και διαπίστωσε αυτή την έντονη ενεργητικότητα, εντυπωσιασμένος με τις ιδιότητες αυτού του «μαγικού» καρπού πηγαίνει σε ένα μοναστήρι, όπου και τους προσφέρει στον ιερέα. Ο ιερέας προσβεβλημένος από αυτή την χειρονομία, ρίχνει τους σπόρους στη φωτιά, από όπου και εκλύθηκε ένα φοβερό άρωμα. Οι κόκκοι καβουρδίστηκαν και έτσι το αποξηραμένο φυτό διαλύθηκε σε νερό, όπου και αποτέλεσε τον πρώτο καφέ, ένα ρόφημα εθιστικό και διεγερτικό. ^{[4],[5],[6],[7]}

Αρχικά ο καφές καταναλωνόταν ως τροφή, η οποία αναμιγνυόταν με λίπος και αποτελούσε σνακ στα ταξίδια. Γύρω στο 1000 μ.Χ. άρχισε να χρησιμοποιείται ως ρόφημα όπου και έβραζε μαζί με νερό. Ο καφές αποτελούσε είδος πολυτελείας και το μονοπώλιο κατείχαν οι Άραβες, όπου και καλλιεργούσαν τα δέντρα. Οι εξαγωγές απαγορεύονταν, μέχρι τη λαθραία εξαγωγή του φυτού του καφέα στην Ινδία το 17^ο αιώνα. Το 15^ο αιώνα, ο καφές χρησιμοποιείται στην Υεμένη από μοναχούς για θρησκευτικούς σκοπούς, καθώς τους βοηθούσε να μείνουν ξάγρυπνοι στις ολονυκτίες. Το 1470 ο καφές καταφθάνει στη Μέκκα, από όπου και πήρε τη σημερινή του ονομασία καφές μόκα. Στη Μέκκα άνοιξαν τα πρώτα καφενεία (qahveh khaneh), τα οποία αποτελούσαν πολιτιστικά κέντρα, όπου ο κόσμος άκουγε μουσική, έπαιζε παιχνίδια και διεξήγαγε πολιτικές συζητήσεις. Το 1554 ο καφές καταφθάνει στην Κωνσταντινούπολη, όπου και αποτελούσε το πιο δημοφιλές ρόφημα. Από εκεί διαδίδεται στη Βενετία το 1615, ενώ το 1720 ανοίγει το *caffè alla Venezia*, το πρώτο τυπικό καφέ με τη σημερινή έννοια. Λόγω των ισλαμικών ριζών του, ο καφές αντιμετωπίζεται από τους καθολικούς με καχυποψία, ως το ποτό των μαγισσών και των απίστων. Πριν απορριφθεί οριστικά ο πάπας Κλήμης ο VIII, μετά από δοκιμή, 'αγιάζει' το ρόφημα και μπορεί να αποκαλείται πλέον χριστιανικό. Το 1651 ανοίγει το πρώτο μαγαζί καφέ (coffee house) στο Λονδίνο, στην Oxford Street, ενώ το 1686 ανοίγει το πρώτο καφέ στο Παρίσι, το *café Procope Paris*,

το οποίο είναι ανοικτό μέχρι και σήμερα. Τα μαγαζιά αυτά είχαν ως στόχο την κοινωνικοποίηση και συγκέντρωναν όλες τις κάστες ανθρώπων, από τραπεζίτες και εμπόρους μέχρι διανοούμενους. Οι Άγγλοι και οι Γάλλοι απαγόρευαν στο γυναικείο πληθυσμό να παρευρεθεί στις καφετέριες, σε αντίθεση με τους Γερμανούς, όπου συνόδευαν τις γυναίκες τους και εκτύλισαν πολιτικές συζητήσεις. Μόλις το 18^ο αιώνα ο καφές άρχισε να αποτελεί το ρόφημα του λαού. Το 1723 ο καφές μεταφέρεται στη Μαρτινίκα από τους Γάλλους και το 1727 καταφθάνει ο βλαστός του καφεόδεντρου στη Βραζιλία, όπου και θα αποτελέσει τη μεγαλύτερη καφεπαραγωγό χώρα του κόσμου. Το 1900 κατασκευάζεται από τους Ιταλούς η πρώτη μηχανή espresso, ενώ ο Satori Kato παρασκευάζει τον πρώτο στιγμιαίο καφέ, του οποίου η παραγωγή κλιμακώνεται κατά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο από το Βέλγο George Washington. Σημαντική ανακάλυψη αποτέλεσε το φίλτρο για τον καφέ φίλτρου, ο οποίος μέχρι τότε περιείχε κόκκους και κατακάθια, από τη Melitta Benz, το 1908. Κατά τη διάρκεια του δευτέρου παγκοσμίου πολέμου δημιουργείται η ανάγκη για ένα νέο είδος καφέ. Αμερικάνοι στρατιώτες συρρέουν στις ιταλικές καφετέριες, όπου ο πικρός και παχύρρευστος espresso δεν θυμίζει σε τίποτα τον ανάλαφρο καφέ φίλτρου που είχαν συνηθίσει. Έτσι οι Ιταλοί πωλούν τον espresso τους μαζί με ένα ποτήρι ζεστό νερό, όπου και αραιώναν οι Αμερικάνοι τον καφέ τους, εξ' ου και Americano. Το 1952 καθιερώνεται ο όρος coffee break, ενώ το 1971 ανοίγει η παγκοσμίου φήμης αλυσίδα καφέ, Starbuck's.

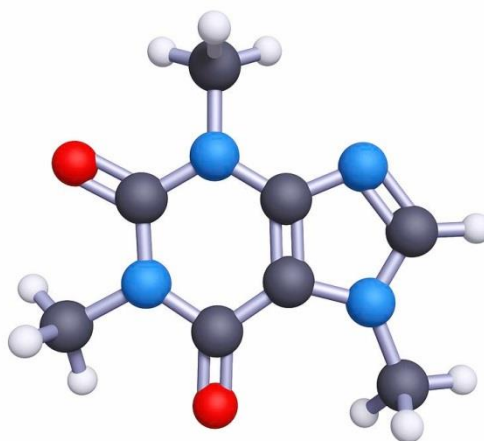
[1],[2],[4],[5],[6],[7],[8],[9],[10]



Σχήμα 1. Χρονολογική πορεία εξάπλωσης του καφέ

Η ένωση της καφεΐνης

Η ένωση της καφεΐνης, ή αλλιώς η 1,3,7-τριμέθυλο ξανθίνη, έχει χημικό τύπο $C_8H_{10}N_4O_2$, ανακαλύφθηκε από το χημικό Ferdinand Runge το 1819 και συναντάται σε άοσμους λευκούς βελονοειδείς κρυστάλλους.^{[6],[11],[12]}



Σχήμα 2. Μοριακή απεικόνιση του μορίου της καφεΐνης

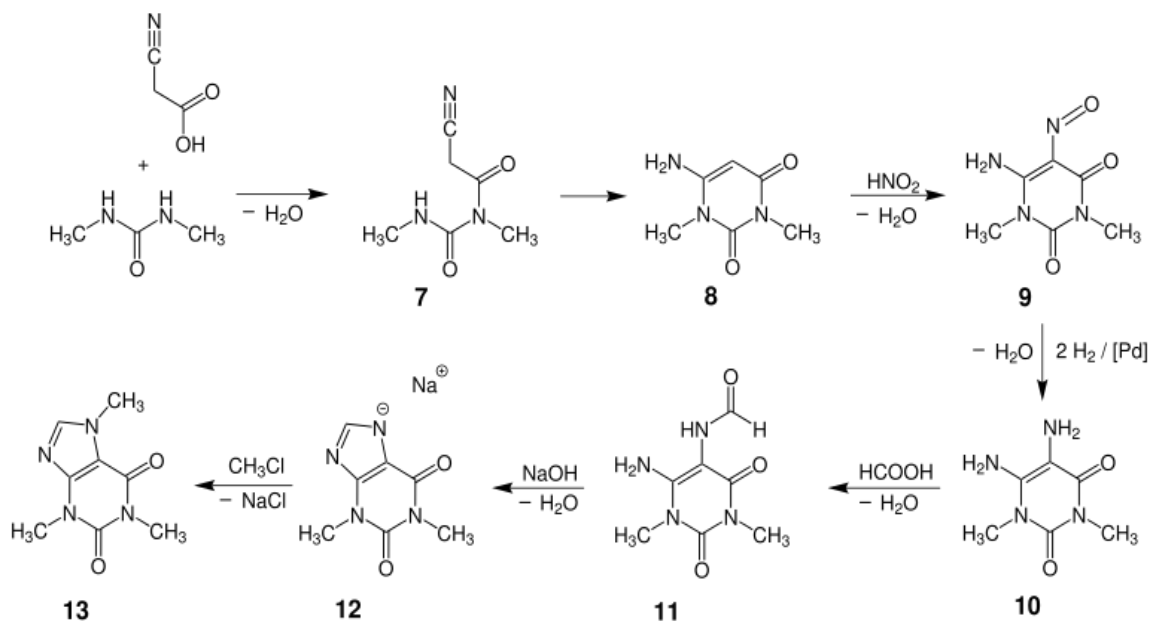
Μερικές από τις βασικές της ιδιότητες συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 2. Ιδιότητες της καφεΐνης

Ιδιότητες καφεΐνης	
Μοριακό βάρος	194.19 g/mol
Σημείο τήξης (άνυδρη)	227-228
Σημείο τήξης (μονοένυδρη)	234-235
Σημείο βρασμού	178
Πυκνότητα	1.23 g/cm ³
Διαλυτότητα στο νερό (25°C)	22 mg/ml
Διαλυτότητα στο νερό (80°C)	180 mg/ml
Διαλυτότητα στο νερό (100°C)	670 mg/ml
Διαλυτότητα στην αιθανόλη	15 mg/ml

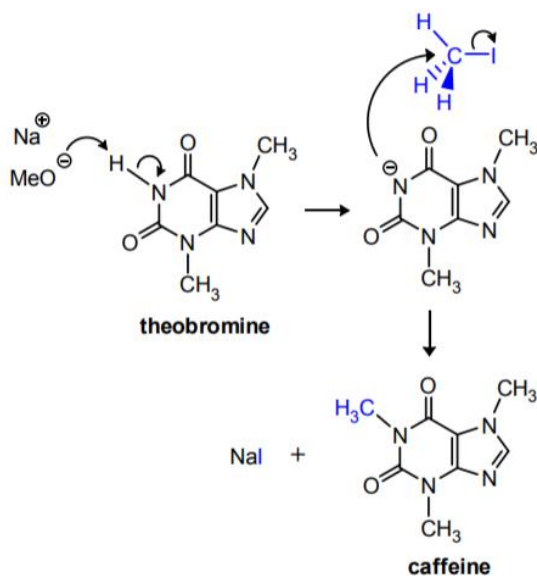
Σύνθεση της καφεΐνης

Η καφεΐνη παρασκευάστηκε για πρώτη φορά εργαστηριακά από τον Emil Fischer το 1895, ο οποίος και τιμήθηκε με βραβείο Nobel. Η σύνθεση της προέρχεται από τη συμπύκνωση της 1,3 διμεθυλουρίας με μηλονικό οξύ. Μια απλούστερη διαδικασία σύνθεσης προτάθηκε από τον Traube το 1900. Η σύνθεση της καφεΐνης βασίζεται στη γενικότερη μέθοδο σύνθεσης των πουρινών, με αρχικό αντιδραστήριο πάλι την 1,3 διμεθυλουρία, η οποία συμπυκνώνεται με κυανοξικό αιθυλεστέρα παρουσία νατραμιδίου προς 4-αμινο-1,3-διμεθυλο-ουρακίλη. Ενδεικτικά ακολουθεί σχήμα, όπου παρουσιάζονται τα στάδια σύνθεσης.



Σχήμα 3. Σύνθεση καφεΐνης από συμπύκνωση της 1,3 διμεθυλουρίας με κυανοξικό αιθυλεστέρα

Εναλλακτικά ένας απλούστερος τρόπος σύνθεσης αποτελεί η N-μεθυλίωση της θεοβρωμίνης (ένωση η οποία συναντάται στο κακάο). Ο συγκεκριμένος τρόπος σύνθεσης είναι ιδιαίτερα γρήγορος και αποτελεσματικός ενώ δύναται να καταλυθεί με CH_3I παρουσία $NaOH$.^{[6],[13]}



Σχήμα 4. Σύνθεση καφεΐνης από θεοβρωμίνη

Απομόνωση καφεΐνης

Η απομόνωση της καφεΐνης παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς απομονώνεται με τη μέθοδο της εκκύλισης από κόκκους καφέ ή φυλών τσαγιού και ως παραπροϊόν της διεργασίας προκύπτει αποκαφεϊνομένος καφές (decaf). Η αποκαφεϊνοποίηση αποτελεί φυσική μέθοδο και δεν επηρεάζει την

περιεκτικότητα των αντιοξειδωτικών του καφέ (χλωρογενικό οξύ, καφεϊνικό οξύ, θεοφυλλίνη, θεοβρωμίνη).

Η αποκαφεϊνοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ποικίλες μεθόδους. Παλαιότερα ως διαλύτες στην εκχύλιση χρησιμοποιείτο το χλωροφόρμιο, το βενζένιο και το δικλωρομεθάνιο, οι οποίοι ενέχουν κινδύνους για την υγεία. Σήμερα χρησιμοποιούνται οι εξής μέθοδοι:

- I. Εκχύλιση με νερό: Οι πράσινοι κόκκοι καφέ βυθίζονται και αποστάζονται με νερό για αρκετό χρόνο. Το νερό περιέχει την καφεΐνη και τα αρώματα του καφέ και διέρχεται από φίλτρο άνθρακα, όπου και κατακρατείται η καφεΐνη. Το υπόλοιπο διάλυμα εξατμίζεται και παραλαμβάνονται οι αποκαφεϊνομένοι κόκκοι καφέ.
- II. Εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO_2 : Χρησιμοποιείται διοξείδιο του άνθρακα σε υπερκρίσιμη κατάσταση ($T = 31,1^\circ C, P = 73 atm$), όπου και διαλύει το 97-99% της καφεΐνης. Το διάλυμα αυτό φιλτράρεται και απομένει ο αποκαφεϊνομένος καφές.
- III. Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες: Παρόμοια διαδικασία με την εκχύλιση με νερό, μόνο που χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες. ^{[6],[13]}

Οικογένεια των ξανθινών

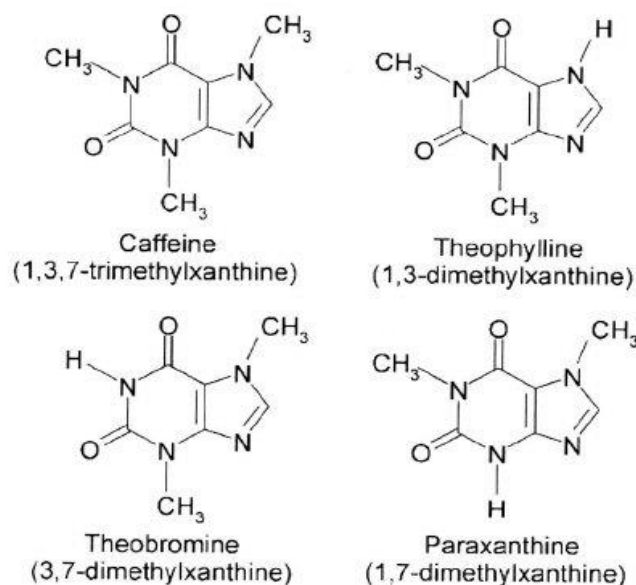
Παρόμοιες ενώσεις με την καφεΐνη, οι οποίες ανήκουν και αυτές στην ίδια οικογένεια των ξανθινών, με ανάλογες ιδιότητες είναι οι ακόλουθες:

- ο Τεΐνη (theine), η οποία περιέχεται στο τσάι.
- ο Γουαρανίνη (guaranine), η οποία περιέχεται στο φυτό guarana.

Και οι δύο αποτελούν ενώσεις της καφεΐνης με προσμίξεις άλλων παραγώγων της ξανθίνης.

- ο Θεοφυλλίνη, η οποία αποτελεί μεθυλιωμένο παράγωγο και διαθέτει μυοχαλαρωτική δράση, γι' αυτό και χρησιμοποιείται κυρίως ως βρογχοδιασταλτικό φάρμακο (σπρέι άσθματος).
- ο Θεοβρωμίνη (theobromine), η οποία ετυμολογικά σημαίνει τροφή των θεών [$<theo$ (θεός), $broma$ (τροφή)] και συναντάται στο κακάο.
- ο Παραξανθίνη (1,7-διμεθυλο-ξανθίνη), η οποία αποτελεί προϊόν μεταβολισμού της καφεΐνης και εντοπίζεται στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ η παρουσία της αυξάνει τη δραστικότητα αναλγητικών φαρμάκων.^[6]

Ακολουθώς διαφαίνονται οι δομές των προαναφερθέντων ενώσεων.



Σχήμα 5. Καφεΐνη και άλλες ξανθίνες

Περιεκτικότητα καφεΐνης

Η καφεΐνη συναντάται κατά κύριο λόγο στον καφέ, καθώς και σε άλλα ροφήματα, όπως τσάι, αναψυκτικά και ενεργειακά ποτά. Ανάλογα με το είδος του καφέ (ποικιλία), οι οποίες θα αναλυθούν εκτενέστερα στη συνέχεια, μεταβάλλεται η περιεκτικότητα σε καφεΐνη, ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρείται στο φυτό guarana. Ενδεικτικά οι περιεκτικότητες με βάση το είδος του καφέ και τις υπόλοιπες ενώσεις της οικογένειας των ξανθινών συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 3. Περιεκτικότητα σε καφεΐνη ανάλογα με τον τύπο καφέ

	% καφεΐνης
arabica	1.1
robusta	2.2
guarana	>4
τσάι	3.5
κακάο	0.03

Η ποσότητα της καφεΐνης, η οποία περιέχεται σε τύπους ροφημάτων καφέ καθώς και δημοφιλή ποτά, διαφαίνεται ακολούθως.^{[6],[11],[12],[15],[16]}

Πίνακας 4. Ποσότητα καφεΐνης σε δημοφιλή ροφήματα

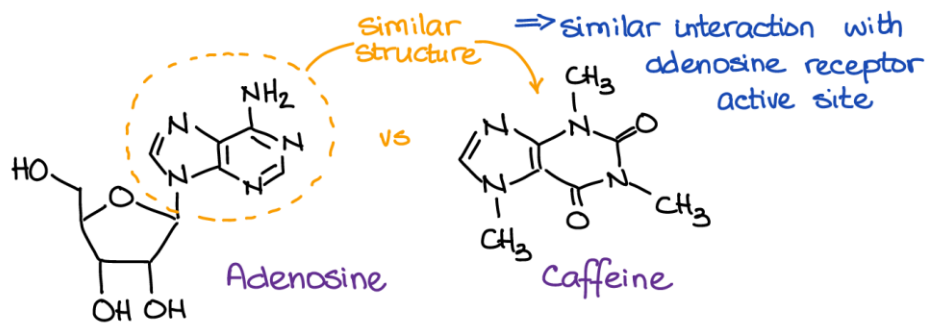
Ρόφημα	καφεΐνη (mg)
ελληνικός καφές	50
φίλτρου	145
espresso	154
ντεκαφεϊνέ	1,5
nescafe instant	50
coca cola	60
monster	150
red bull	80
μαύρο τσάι	42
πράσινο τσάι	18
λευκό τσάι	28
κίτρινο τσάι	63
τσάι matcha	64
ρόφημα κακάο	15

Η περιεκτικότητα σε καφεΐνη των ροφημάτων αναφέρεται στην ποσότητα η οποία αντιστοιχεί σε μία κούπα, μία δόση (shot) ή ένα κουτάκι αναψυκτικού.

Δράση καφεΐνης

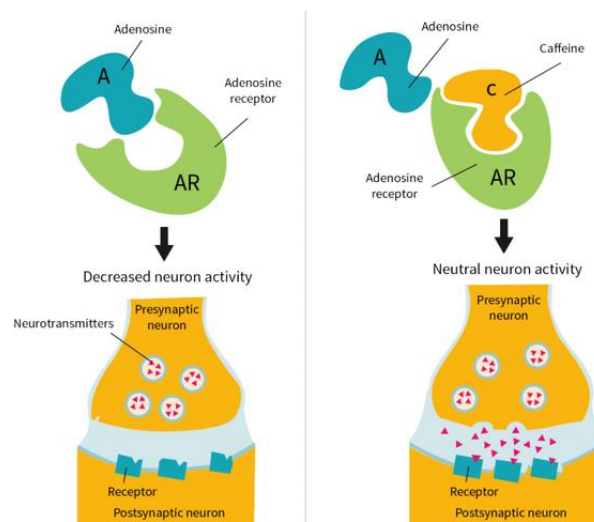
Η καφεΐνη θεωρείται η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ψυχότροπος ουσία καθώς διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η καφεΐνη εισέρχεται στον οργανισμό είτε με τοπική, δια του στόματος χορήγηση, είτε ενέσιμα. Η απορρόφηση είναι ταχύτερη και πλήρης, χρειάζονται μόλις 45 λεπτά για να απορροφηθεί το 99%. Η απορρόφηση πραγματοποιείται κυρίως στο λεπτό έντερο αλλά και κατά ένα 20% στο στομάχι. Η μέγιστη βιοδιαθεσιμότητα παρατηρείται μεταξύ 15 λεπτών και 2 ωρών αφότου έχει καταναλωθεί, ενώ παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος σε περίπου 29 λεπτά, ανάλογα το άτομο. Ο μεταβολισμός της καφεΐνης επιταχύνεται με το κάπνισμα, ενώ επιβραδύνεται με την κύηση (γι' αυτό και η συνιστώμενη ημερήσια κατανάλωση καφέ είναι μικρότερη για τις εγκύους). Η απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα της καφεΐνης είναι παρόμοια στον άνθρωπο, τα τρωκτικά, τους σκύλους και τα κουνέλια.

Η δράση της καφεΐνης κατανοήθηκε περίπου το 1970. Η ένωση της καφεΐνης είναι παρόμοια με την αδενosίνη, ενός νευροδιαβιβαστή και ρυθμιστή του κύκλου ύπνου-αφύπνισης και καρδιακού παλμού.



Σχήμα 6. Δομή καφεΐνης και αδενοσίνης

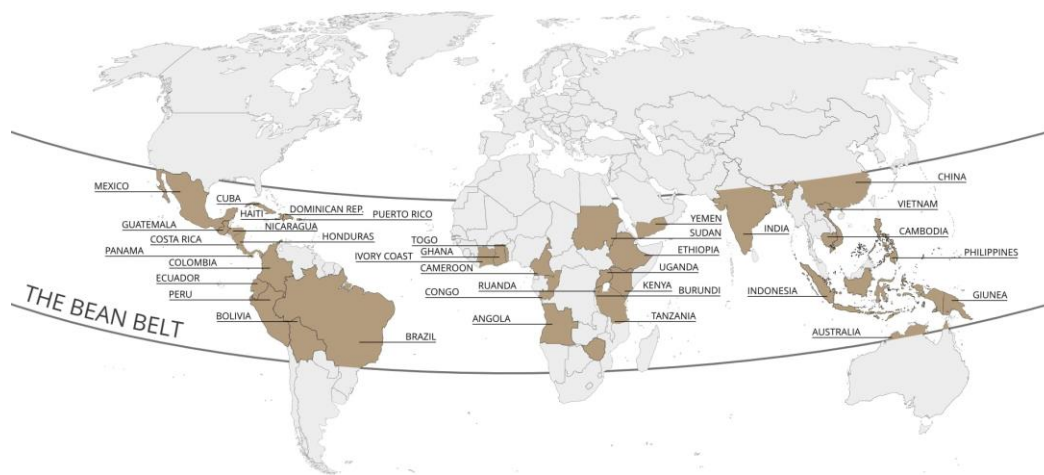
Η δράση της καφεΐνης είναι ανταγωνιστική της αδενοσίνης, πρακτικά για συγκεντρώσεις 2-50 mM, οι οποίες επιτυγχάνονται με 1 κούπα καφέ, η καφεΐνη δεσμεύει τους υποδοχείς αδενοσίνης και έτσι περιορίζει τη δραστηριότητά τους. Ειδικότερα η καφεΐνη προσδένεται και μπλοκάρει τους A1Rs και A2AR υποδοχείς, ανακουφίζοντας από τον ανασταλτικό τόνο της ενδογενούς αδενοσίνης, ενισχύοντας παράλληλα την ντοπαμινεργική δραστηριότητα. Άτομα τα οποία φέρουν τροποποιημένους υποδοχείς, αδυνατούν να δεσμεύσουν την καφεΐνη, με αποτέλεσμα να είναι ανεκτικού σε αυτή.^{[7],[17],[18],[19]}



Εικόνα 3. Ανταγωνιστική πρόσδεση της καφεΐνης με υποδοχέα αδενοσίνης

Καφεόδενδρο και ποικιλίες καφέ

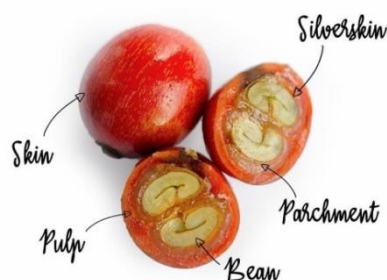
Η καφεΐνη βρίσκεται στους κόκκους, στα φύλλα και στους καρπούς του καφεόδενδρου. Η καλλιέργεια του καφεόδενδρου, ή αλλιώς του φυτού καφέα (*coffea*), ξεκίνησε από τον 6^ο αιώνα στην Αφρική όπου και εξαπλώθηκε στην Ασία. Το φυτό καφέας δεν μπορεί να φυτευθεί οπουδήποτε αλλά απεναντίας ευδοκίμει στη ζώνη του καφέ, γύρω από τον Ισημερινό (τροπικό κλίμα), μεταξύ του τροπικού του Καρκίνου και του Αιγόκερω, και ειδικότερα εντός του εύρους γεωγραφικών πλατών 23^ο νότια και 29^ο βόρεια. Στη ζώνη αυτή περιλαμβάνονται περίπου 90 χώρες της κεντρικής και νότιας Αμερικής, της Αφρικής και της Ασίας.



Εικόνα 4. Χάρτης ζώνης καφέ

Το καφεόδενδρο είναι ένα δικοτυλήδονο αειθαλές φυτό, το οποίο έχει ύψος 1,2-1,5 μέτρα. Έχει διάρκεια ζωής 20-40 έτη και ανήκει στην οικογένεια των ρουβιδιών, η οποία περιλαμβάνει πάνω από 4.500 ποικιλίες, εκ των οποίων οι 60 ανήκουν στον καφέ, οι 25 από αυτές έχουν εμπορική σημασία και μόλις οι 4 να συνιστούν την παγκόσμια παραγωγή καφέ. Οι πιο διαδεδομένες ποικιλίες είναι οι : *arabica*, *robusta*, *liberica* και *excelsa*.

Ο καφέας παράγει καρπό πράσινου χρώματος, ο οποίος ωριμάζει για 9-11 μήνες και αποκτά πλέον κόκκινο χρώμα. Κάθε καρπός του καφέ έχει δύο πυρήνες, οι οποίοι αντιστοιχούν σε δύο κόκκους καφέ.

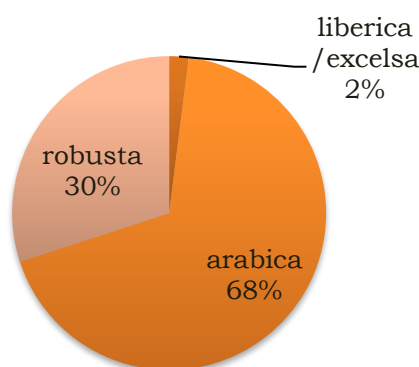


Εικόνα 5. Καρπός καφέ

Οι κόκκοι αυτοί διαθέτουν λευκοπράσινο χρώμα, οι οποίοι με το καβούρδισμα (roasting), αποκτούν οσμή και γεύση, εν συνεχεία με τη διαδικασία του αλέσματος, παίρνουν τη μορφή σκόνης.

Ένα καφεόδενδρο παράγει περίπου 2,5 κιλά καρπών το χρόνο, το οποίο αντιστοιχεί σε 500 γραμμάρια κόκκων καφέ και ειδικότερα σε 400 γραμμάρια καβουρδισμένου καφέ.

Οι δύο βασικές ποικιλίες καφέ, οι οποίες συνιστούν σχεδόν το 98% της παγκόσμιας παραγωγής, είναι η Arabica και η robusta. Οι δύο αυτές ποικιλίες δένδρων παράγουν συνολικά 7 εκατομμύρια τόνους καφέ ετησίως, εκ των οποίων περίπου το 70% ανήκει στην ποικιλία arabica.



Σχήμα 7. Ποσοστά παραγωγής ποικιλιών καφέ

Η συγκεκριμένη ποικιλία ευδοκimei σε υψόμετρο 1000-2000 μέτρων και σε θερμοκρασίες από 15-24°C και ευνοείται από βροχοπτώσεις. Παράγει υψηλής ποιότητα καφέ και δεν αναμιγνύεται με άλλες ποικιλίες. Το άρωμα της είναι φρουτώδες και απαλό, ενώ περιέχει λιγότερη καφεΐνη από την robusta. Η εν λόγω ποικιλία ευδοκimei σε χαμηλότερα υψόμετρα (<700 μέτρων) και υψηλότερες θερμοκρασίες, ενώ παράλληλα είναι αρκετά πιο ανθεκτική σε ασθένειες.

Η ντελικάτη όμως γεύση της ποικιλίας Arabica την καθιστά πιο αγαπητή στο κοινό, ενώ η ευαισθησία του φυτού καθώς η καθυστερημένη καρποφορία (7 χρόνια για να βγάλει καρπό), επιφέρει και μεγαλύτερο κόστος. Η ποσότητα της καφεΐνης η οποία περιέχεται σε διάφορες ποικιλίες κυμαίνεται από 0,4-2,4%. Η υψηλότερη περιεκτικότητα παρατηρείται στην ποικιλία robusta, ενώ ιδιαίτερα χαμηλές παρατηρούνται στα είδη mascarocoffea και coffea eugenioides.

Η ποικιλία Arabica, η οποία λόγω της γλυκιάς και φρουτώδους γεύσης αποτελεί και την πιο νόστιμη και δημοφιλή, ευδοκimei στην Αραβία (σημερινή Υεμένη), εξ' ου και το όνομα. Πρώτη σε καλλιέργεια είναι η Αιθιοπία καθώς και μεγάλες ποσότητες παράγονται στη Λατινική Αμερική, ιδίως στη Βραζιλία και μικρότερες καφεπαραγωγοί χώρες αποτελούν: το Κονγκό, η Μοζαμβίκη και η Μαδαγασκάρη.

Η δεύτερη πιο δημοφιλή ποικιλία, η Robusta, η οποία έχει και τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε καφεΐνη, γεγονός που την καθιστά ιδανική για espresso, προέρχεται από περιοχές κάτω από τη Σαχάρα και καλλιεργείται επίσης στην Ινδονησία, στο Βιετνάμ, στο Μιανμάρ, στη Σιέρα Λεόνε, στην Ινδία και στην Ουγκάντα.

Υπάρχουν όμως και χώρες οι οποίες παράγουν και τις δύο ποικιλίες καφέ, όπως η Γουατεμάλα, η Κολομβία, η Βενεζουέλα και η Ζάμπια.

Όσον αφορά τις άλλες δύο πιο άσημες ποικιλίες, η liberica ευδοκίμει στην κεντρική και δυτική Αφρική και το δέντρο της είναι αρκετά πιο μεγάλο από αυτά των ποικιλιών arabica και robusta, φτάνοντας μάλιστα το ύψος των 6-9 μέτρων. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στη ζέση και την υγρασία. Η ποικιλία excelsa ανήκει στην ίδια κατηγορία με τη liberica και συναντάται στη νότια Ασία, συγκεκριμένα στην Ινδονησία, στη Μαλαισία και στις Φιλιππίνες. Οι δύο αυτές ποικιλίες αποτελούν μόνο το 2% της παγκόσμιας παραγωγής, ενώ η Βραζιλία κατέχει την πρώτη θέση στην συνολική παραγωγή.^{[1],[5],[6],[7],[8],[9],[11],[20],[21]}



Εικόνα 6. Κόκκοι καφέ διαφορετικών ποικιλιών

Οφέλη και παρενέργειες της καφεΐνης

Η καφεΐνη αν και δεν έχει θρεπτική αξία (0 kcal), παρουσιάζει ποικίλα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία, όταν καταναλώνεται σε λογικές ποσότητες (μέχρι 400 mg την ημέρα).

Η πιο γνωστή ωφέλεια της καφεΐνης είναι η διεγερτική της δράση, εξασφαλίζοντας περισσότερη ενέργεια, αντισταθμίζοντας την κούραση. Η αύξηση του μεταβολικού ρυθμού και συνεπώς της παραγωγής ενέργειας, την καθιστά ιδανικό ενεργητικό βοήθημα για αθλητές, βελτιώνοντας έως και 12% τις αποδόσεις τους.

Ακόμη για κατανάλωση περίπου 200 mg ημερησίως διεγείρει τον εγκέφαλο και ενισχύει τη μακροπρόθεσμη μνήμη. Η δράση της στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ελαττώνει την πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών του εγκεφάλου, όπως νόσος Alzheimer και άνοιας κατά 45%.

Μετά το ψήσιμο του καφέ αναπτύσσονται ποικίλες ουσίες, όπως: βιταμίνη B3 (νιασίνη), πολυφαινόλες (χλωρογενικό οξύ, λιγνάνες), αλκαλοειδή και μελανοειδίνες, που μειώνουν το οξειδωτικό στρες ενώ παράλληλα βελτιώνουν το εντερικό μικροβίωμα καθώς ρυθμίζουν το μεταβολισμό των γλυκολιπιδίων.

Ειδικότερα η καφεΐνη αυξάνει τη συγκέντρωση του cAMP, αναστέλλοντας τα ένζυμα της φωσφοδιεστεράσης στους σκελετικούς και λιπώδεις ιστούς, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η ορμόνη λιπάση και να προάγεται η λιπόλυση.

Η καφεΐνη σύμφωνα με έρευνα του 2019, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ήπατος και αυτό καθώς η ανταγωνιστική της δράση με την αδενίνη οδηγεί στην αναδιαμόρφωση του οργάνου και ινωδογένεσης, προλαμβάνοντας έτσι την ίνωση και κίρρωση.

Όσον αφορά το συνδυασμό με φάρμακα, ενισχύει τη δράση των παυσιπόνων, όπως ασπιρίνη και άλλων φαρμάκων για αλλεργίες. Ορισμένα βέβαια αντιβιοτικά αυξάνουν ή μειώνουν το ρυθμό μεταβολισμού της καφεΐνης, με αποτέλεσμα να αυξάνει ορισμένες παρενέργειες, όπως πονοκέφαλος και ταχυπαλμία. Ιδιαίτερη προσοχή συνίσταται σε άτομα τα οποία λαμβάνουν αντιπηκτικά, καθώς η καφεΐνη επιβραδύνει την πήξη του αίματος και αυξάνει την πιθανή αιμορραγία. Ακόμη η αυξημένη συγκέντρωση οιστρογόνων ή αλκοόλης στο αίμα μειώνει το ρυθμό μεταβολισμού της καφεΐνης και δύναται να προκαλέσει ζαλάδα.

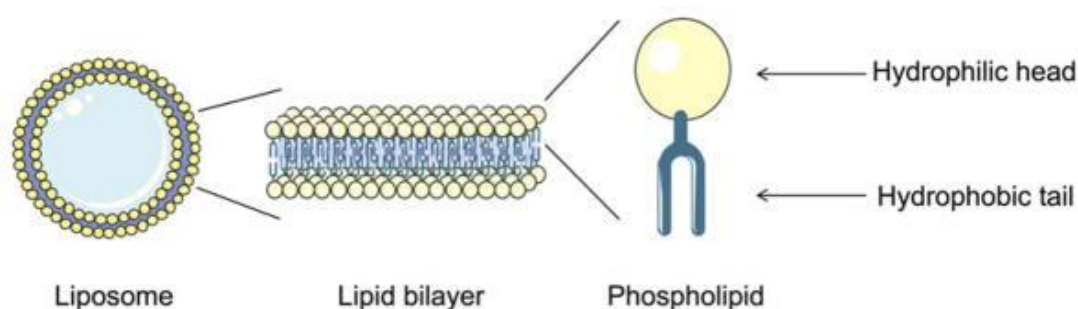
Επιπλέον κατά την κυοφορία, η συνιστώμενη ημερήσια δόση είναι μειωμένη, καθώς η καφεΐνη διαπερνά τον πλακούντα προκαλώντας αγγειοσυστολή της μήτρας και πιθανή υποξία του εμβρύου.

Για ημερήσιες προσλαμβάνουσες ποσότητες μεγαλύτερες των 400 mg, μπορεί να προκληθεί πονοκέφαλος, ταχυπαλμία, τρέμουλο, εφίδρωση, αναταραχές στο στομάχι, αυπνία και ναυτία.

Σημαντική είναι επίσης η αύξηση της LDL χοληστερόλης λόγω της καφεζόλης, η οποία ανιχνεύεται στον espresso και στο βραστό καφέ, ενώ αποφεύγεται με τη χρήση φίλτρου (δίηθηση).^{[10],[17],[18],[22],[23],[24]}

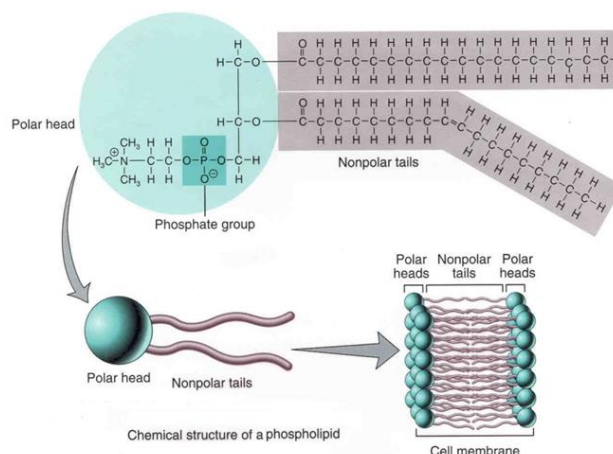
Λιποσώματα

Η αναπόδραστη ανάγκη για μεταφορά φαρμάκων σε συγκεκριμένους ιστούς έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νανοφορέων, οι οποίοι μπορεί να είναι νανοκρύσταλλοι, νανοσωλήνες, νανοςύρματα, υδρογέλες, δενδριμερή και νανοσωματίδια λιπιδίων. Στην κατηγορία των νανοσωματιδίων λιπιδίων ανήκουν τα λιποσώματα, τα νιοσώματα και τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (solid lipid nanoparticles). Στα λιπίδια περιλαμβάνονται τα γλυκερίδια, τριγλυκερίδια, λιπαρά οξέα, στεροειδή, φωσφολιπίδια και σφιγγολιπίδια, εκ των οποίων τα περισσότερα είναι εγκεκριμένα ως ασφαλή GRAS (generally recognised as safe).^{[30],[33],[40]}



Εικόνα 7. Δομικά στοιχεία λιποσώματος

Τα λιποσώματα ανακαλύφθηκαν από τον Alec D. Bangham το 1965 και είναι τεχνητά κυστίδια τα οποία αποτελούνται από ένα ή περισσότερα στρώματα διπλοστιβάδων λιπιδίων, τα οποία περικλείουν υδατικό πυρήνα. Τα λιποσώματα είναι τα μικρότερα σφαιρικά κυστίδια, ανήκουν στην κλίμακα του νάνο (10^{-9} m) και μπορούν να σχηματιστούν από φυσικά λιπίδια και χοληστερόλη. Σχηματίζονται αυθόρμητα όταν γίνει διασπορά σε υδατικό μέσο. Συνήθως αποτελούνται από φωσφολιπίδια, των οποίων η μητρική ένωση το φωσφατιδικό οξύ, όπως και άλλωστε των υπολοίπων γλυκεροφωσφολιπιδίων, το οποίο αποτελεί συστατικό όμοιο των κυτταρικών μεμβρανών του ανθρώπινου σώματος. Το πιο γνωστό και ευρέως χρησιμοποιούμενο φωσφολιπίδιο είναι η φωσφατυδιλοχολίνη. Τα φωσφολιπίδια περιλαμβάνουν ένα πολικό και ένα μη πολικό τμήμα, (υδρόφιλη κεφαλή και υδρόφοβη ουρά) αποτελούμενο από λιπαρές ακυλομάδες, οι οποίες συνδέονται με μια ομάδα γλυκερόλης ή σφιγγοσίνης και μια νιτρο-ομάδα στον κλάδο της κεφαλής. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες κεφαλών: κατιονικές, ανιονικές και ουδέτερες. Η κατιονική κεφαλή βοηθάει στην προσέλκυση του λιποσώματος από τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες. Η ανιονική κεφαλή περιέχει φωσφατιδυλοσερίνη, ενώ η ουδέτερη, χοληστερόλη, η οποία βελτιώνει τη φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων.



Εικόνα 8. Δομή φωσφολιπιδίου

Η χοληστερόλη οδηγεί σε αύξηση της τάξης της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη μείωση της ευκαμψίας της και επομένως στην αύξηση της σταθερότητας των σωματιδίων. Όσον αφορά την ουρά, αποτελείται από δύο είδη λιπαρών υδρογονανθρακικών αλυσίδων και χοληστερόλη, ενώ επηρεάζει τον όγκο της υδρόφοβης κοιλότητας και συνεπώς τη δομή των λιποσωμάτων. Τα λιπίδια συγκρατούνται μέσω εστερικών δεσμών, μεταξύ του υδρόφιλου-υδρόφοβου άκρου. Υπάρχουν και περιπτώσεις αιθερικών δεσμών, όπου τα λιποσώματα έχουν αυξημένη απόδοση επιμόλυνσης, ενώ η αυξημένη σταθερότητα τους οδηγεί και σε αύξηση της κυτταροτοξικότητάς τους. Στον αντίποδα λιποσώματα τα οποία συγκρατούνται μέσω αμιδικών ή εστερικών δεσμών παρουσιάζουν μειωμένη κυτταροτοξικότητα. Η προσθήκη βοηθητικών λιπιδίων δρα συνεργιστικά στη σταθεροποίηση των μεμβρανών. Αποσταθεροποίηση και αποικοδόμηση μπορεί να συμβεί με οξειδωση λιποσωμικών συστατικών ή με υδρόλυση εστερικών δεσμών, οι οποίοι συγκρατούν τα λιπίδια. Ο περιορισμός της σταθερότητας οδηγεί σε μειωμένη διάρκεια ζωής, η οποία έχει αποδειχθεί ότι παρατείνεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (4°C), σύμφωνα με τον Du Plessis (1996), καθώς μειώνεται η θερμική κίνηση Brown και επομένως ο αριθμός των συγκρούσεων και των συσσωματώσεων.^{[25],[26],[28],[30],[39],[42]}

Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται ως φορείς ουσιών, φαρμακευτικών και μη συγκρατώντας ενεργά τα μόρια και τα μεταφέροντας τα σε κύτταρα στόχους. Ειδικότερα μπορούν να ενθυλακώσουν αρκετές κατηγορίες φαρμάκων όπως : αντικαρκινικά φάρμακα, αντιρετροϊκά, αντιπαρκισονισμικά, αντιψυχωτικά, αντιρευματοειδή καθώς και αντιβιοτικά. Ακόμη βρίσκουν εφαρμογή και στον κλάδο των καλλυντικών, καθώς διεισδύουν στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος, παρατείνοντας έτσι το χρόνο δράσης, καθώς και βελτιώνοντας την υγρασία του. Τα λιποσώματα αποτελούν ιδιαίτερα καινοτόμο φορέα και αυτό καθώς παρουσιάζουν πολλές και μοναδικές ιδιότητες. Αρχικά λόγω της ομοιότητας τους με τις κυτταρικές μεμβράνες είναι βιοσυμβατά,

βιοδιασπώμενα, μη τοξικά και μη ανοσογόνα και επομένως δεν οδηγούν σε ανοσοβιολογική απόκριση. Αυτό τους επιτρέπει να αυξάνουν το χρόνο παραμονής και κυκλοφορίας τους στο σώμα απελευθερώνοντας τα ενθυλακωμένα συστατικά προοδευτικά. Η μεταφορά επομένως βιοδραστικών συστατικών καθίστανται ασφαλής από ένζυμα, υγρασία και μεταβολές του pH, ενώ παράλληλα η αποδέσμευση είναι πιο ελεγχόμενη και στοχευμένη, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η βιοδιαθεσιμότητα της δραστικής ουσίας, να μειώνεται η απαιτούμενη δόση και συνεπώς να αυξάνεται ο θεραπευτικός δείκτης.^{[26],[27],[28],[32],[36],[40]}

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα λιποσωμικών φορέων

Τα λιποσώματα παρουσιάζουν ποικίλα πλεονεκτήματα έναντι άλλων φορέων και λίγα μειονεκτήματα. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα συνοψίζονται ακολούθως.

Πλεονεκτήματα

- ✓ Μπορούν να εγκλείουν τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες ενώσεις, τις μεν στο υδατικό εσωτερικό της ενώ τις υδρόφοβες στη λιπιδική μεμβράνη.
- ✓ Παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα μετά τον εγκλεισμό ουσιών.
- ✓ Μειώνουν την τοξικότητα της εγκλεισμένης ουσίας.
- ✓ Αυξάνουν τη διαλυτότητα υδρόφοβων μορίων.
- ✓ Μειώνουν την πρόσληψη φαρμάκων από τους φυσιολογικούς ιστούς.
- ✓ Προφυλάσσουν τις εγκλεισμένες ενώσεις από την αποικοδόμηση και οξείδωση.
- ✓ Όταν προστεθούν μόρια προσδέτες (τα οποία μπορεί να είναι γλυκοπρωτεΐνες) συμβάλλουν στην ενεργητική στόχευση και αύξηση της εκλεκτικότητας, ιδιαίτερα χρήσιμο στην περίπτωση αντιφλεγμονώδων και αντικαρκινικών φαρμάκων.
- ✓ Τροποποιημένα λιποσώματα με γλυκολιπίδια μιμούνται την κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα τον αυξημένο χρόνο κυκλοφορίας τους στο σώμα.
- ✓ Λόγω του μικρού τους μεγέθους διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Μειονεκτήματα

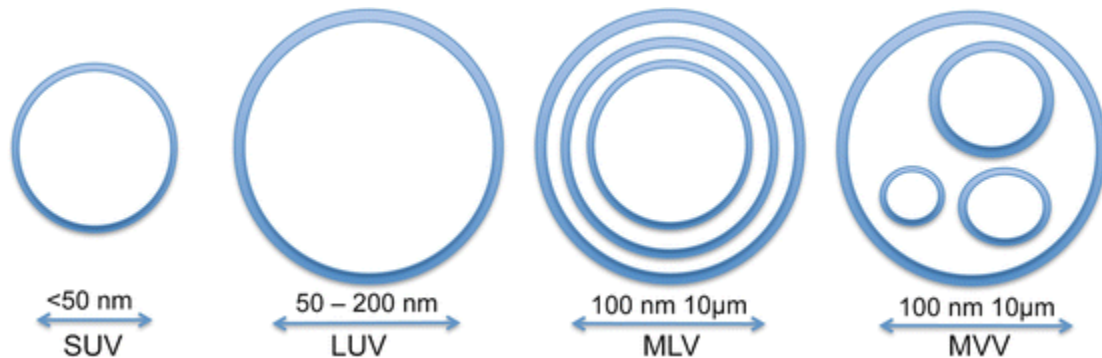
- ✓ Έχουν μικρό χρόνο ημιζωής.
- ✓ Παρουσιάζουν μειωμένη διαλυτότητα.
- ✓ Όχι ιδιαίτερα καλή σταθερότητα
- ✓ Διαθέτουν υψηλό κόστος παραγωγής^{[28],[29],[32],[39],[41]}

Μέγεθος σωματιδίων

Τα λιπосώματα ανάλογα με τον τρόπο σχηματισμού τους, το είδος του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και μερικές διαδικασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα μετά το σχηματισμό τους αποκτούν ποικίλα μεγέθη καθώς και διαφορετικές κατανομές και ομοιομορφία. Συνήθως σχηματίζονται κυστίδια με διάμετρο 25-500 nm και πάχος περίπου 5 nm. Με βάση τη μέση υδροδυναμική τους διάμετρο αλλά και με βάση τις σιβάδες τα λιπосώματα κατατάσσονται ως εξής:

- Μονοστρωματικά μικρά κυστίδια SUV, <50 nm.
- Μονοστρωματικά μεγάλα κυστίδια LUV, 50-200 nm.
- Μονοστρωματικά γιγαντιαία κυστίδια GUV>1000 nm
- Πολυστρωματικά κυστίδια MLV
- Πολλαπλά εγκλεισμένα κυστίδια MMV.

Τα μικρού μεγέθους σωματίδια SUV, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιογένεια.



Εικόνα 9. Μεγέθη και είδη λιπосωμάτων^[33]

Οι παράμετροι που επηρεάζουν το μέγεθος συνοψίζονται ακολούθως:

- Το είδος των επιμέρους λιπιδίων
- Ο οργανικός διαλύτης
- Το επιφανειοδραστικό
- Η μέθοδος παρασκευής
- Ο χρόνος ομογενοποίησης
- Ο χρόνος υπερήχων
- Η θερμοκρασία ομογενοποίησης
- Η πίεση ομογενοποίησης

Η αύξηση του μεγέθους και της θερμοκρασίας οδηγεί σε πιο ασταθή σωματίδια. Η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την κίνηση Brown των σωματιδίων με αποτέλεσμα την αύξηση των μεταξύ τους συγκρούσεων και των συσσωματώσεων τους, γεγονός που έπεται τη μείωση της συνολικής επιφάνειας και αφετέρου της ελεύθερης ενέργειας, καθιστώντας το σύστημα θερμοδυναμικά πιο ασταθές. Τα λιπίδια όμως τα οποία επιλέγονται ως βάση δεν θα πρέπει να είναι πολύ μικρά καθώς έρευνες ^[42] έχουν δείξει πως η αύξηση του μήκους της αλυσίδας

συνεπάγεται υψηλότερες θερμοκρασίας μετάβασης T_c και επομένως καλύτερη σταθερότητα στις θερμοκρασίες όπου λαμβάνουν χώρα οι διεργασίες (4 – 40°C). Όσο προσεγγίζεται η θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων, τα λιποσώματα τείνουν να αποκτούν πιο ρευστή μεμβράνη και όχι τόσο ζελατινώδη, με αποτέλεσμα τη διαρροή δραστικών ουσιών.^{[30][31][32][33][41][42]}

Όσον αφορά τη μορφολογία τους στο χώρο, καθοριστικός παράγοντας είναι ο συντελεστής διάχυσης D . Συμπεριφορά φάσης είναι η ιδιότητα των μεμβρανικών λιπιδίων να προσαρμόζουν τη ρευστότητα της λιπιδικής διπλοστιβάδας σε διαφορετική κατάσταση. Οι πιθανές μορφές/καταστάσεις οι οποίες σχηματίζονται είναι οι ακόλουθες:

- I. Στιβαδωτή υγρή/κρυσταλλική ή υγρή αποδιοργανωμένη φάση για συντελεστή διάχυσης $D \sim 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.
- II. Στιβαδωτή κρυσταλλική φάση πήγματος, $D < 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$.
- III. Υγρή οργανωμένη φάση, $D \sim 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, για οργανωμένες διπλοστιβάδες.
- IV. Εξαγωνική φάση I με πολικά άκρα προς τα έξω
- V. Εξαγωνική φάση II με πολικά άκρα προς τα μέσα

Το λιπίδιο της φωσφατιδυλοχολίνης, το οποίο χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία έχει στιβαδωτή δομή και κυλινδρικό σχήμα.^[27]

Μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα συνήθως δημιουργούνται με τις εξής μεθόδους:

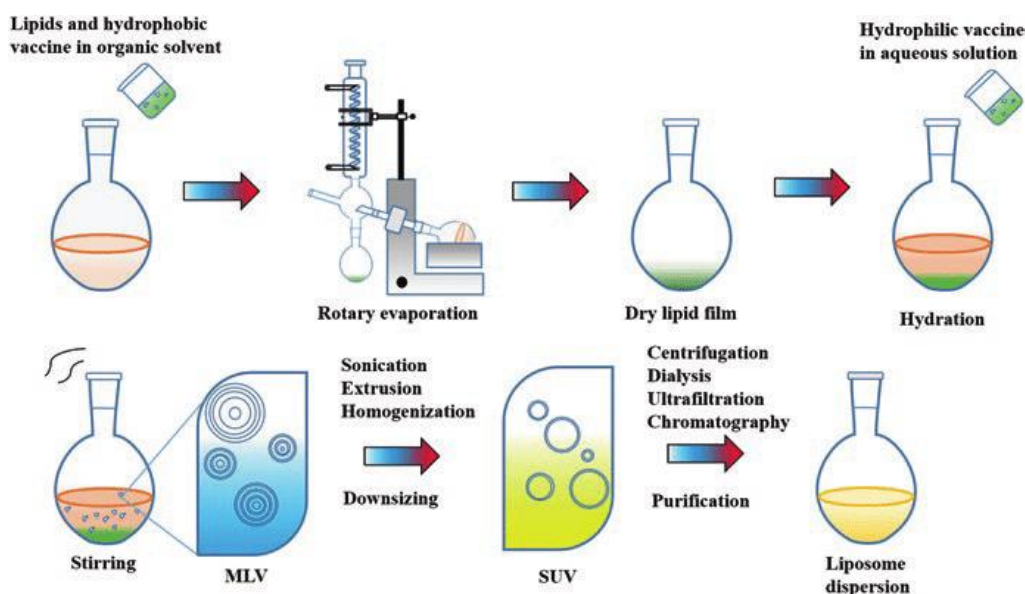
- I. Ένεση διαλύτη (Solvent injection)
- II. Ενυδάτωση λεπτής μεμβράνης (Thin film hydration)
- III. Εξάτμιση αντίστροφης φάσης (Reverse phase evaporation)
- IV. Εξώθηση μεμβράνης (Membrane extrusion)
- V. Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης: η οποία πραγματοποιείται είτε εν θερμώ είτε εν ψυχρώ

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος, στην οποία και βασίζεται η παρούσα εργασία, είναι η ενυδάτωση λεπτού υμενίου, γνωστή και ως Thin film hydration, η οποία αναπτύχθηκε από τον Bargham και περιλαμβάνει τα εξής βασικά στάδια:

- Διάλυση λιπιδίων σε οργανικό διαλύτη
- Εξάτμιση του διαλύτη
- Σχηματισμός μεμβράνης λιπιδίων σε σφαιρική φιάλη
- Πλήρης απομάκρυνση του υπολειπόμενου διαλύτη με ξήρανση
- Επανενυδάτωση νανοσωματιδίων

Η ενυδάτωση των λιπιδίων επιτυγχάνεται με ανάμιξη με πηκτικό διαλύτη, ο οποίος με την εξάτμιση αφήνει συσσωματωμένα και οργανωμένα λιπίδια. Η πιο απλή δομή είναι η μονοστιβάδα, είδος υμενίου (φιλμ). Για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις διαλύτη, δύναται να σχηματιστούν μικύλλια (απορρυπαντικά) ή κυστιδία.

Εξάτμιση του οργανικού διαλύτη από το σύστημα λιπιδίου-διαλύτη. Αρχικά διάλυση των συστατικών των λιποσωμάτων σε οργανικό διαλύτη και εν συνεχεία εξάτμιση της οργανικής φάσης σε αντλία κενού ή χαμηλής πίεσης.



Σχήμα 8. Συνθετική πορεία λιποσωμάτων με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού φιλμ

Στον ακόλουθο πίνακα συνοψίζονται οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι, τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αυτών, καθώς και το μέγεθος των σωματιδίων που προκύπτουν. [28],[29],[33],[38],[41]

Πίνακας 5. Μέθοδοι σχηματισμού λιποσωμάτων

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Μέγεθος
Εξάτμιση αντίστροφης φάσης	απλή μέθοδος	χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικού διαλύτη	MLV, LUV
Εξώθηση μεμβράνης	απλή και γρήγορη μέθοδος	χωρίς δυνατότητα scale-up	MLV
Ένεση διαλύτη	απλή μέθοδος	δύσκολη απομάκρυνση οργανικού διαλύτη	MLV
Ενυδάτωση λεπτής μεμβράνης	απλή μέθοδος	χαμηλή EE%, χωρίς δυνατότητα scale-up	MLV
Κατεργασία εν θερμώ	απλή και γρήγορη μέθοδος	υψηλές θερμοκρασίες	MLV

Μέθοδοι ομογενοποίησης μεγεθών

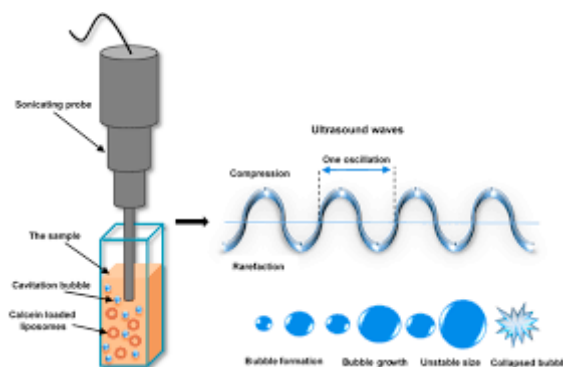
Τα σωματίδια τα οποία σχηματίζονται με τις παραπάνω μεθόδους είναι συνήθως μεσαίου ή μεγάλου μεγέθους (LUV,MLV) και γι' αυτό χρειάζονται περαιτέρω επεξεργασία μέσω μηχανικών δυνάμεων, οι οποίες οδηγούν σε σπάσιμο σε μικρότερα σωματίδια (SUV) και συνεπώς μεγαλύτερη ομοιομορφία της διασποράς. Ενδεικτικά αναφέρονται οι κύριες μέθοδοι ομογενοποίησης:

- ✓ Υπέρηχοι (sonication)
- ✓ Εξώθηση (French pressure cell)
- ✓ Απόψυξη (freeze thawed liposomes)
- ✓ Ενυδάτωση λιπιδικών μεμβρανών με κατάψυξη (lipid film hydration by freeze drying)
- ✓ Μικρογαλακτοματοποίηση (micro-emulsification)
- ✓ Εξώθηση μεμβράνης (membrane extrusion)

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι οι υπέρηχοι. Τα λιπίδια υποβάλλονται σε υπερήχους είτε σε λουτρό (bath type sonicator) είτε σε υπερηχητικό αισθητήρα (probe sonicator) και έτσι εξαλείφονται τα μεγαλύτερα μέρη και επιτυγχάνεται ομοιομορφία.

Στην περίπτωση του υπερηχητικού αισθητήρα, η άκρη βυθίζεται στη διασπορά των λιποσωμάτων, με αποτέλεσμα την εισροή υψηλής ενέργειας και την τοπική αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός το οποίο εγκυμονεί τον κίνδυνο της υποβάθμισης του προϊόντος. Το συγκεκριμένο φαινόμενο δύναται να αποφευχθεί με τη βύθιση της διασποράς των σωματιδίων σε λουτρό νερού/πάγου.

Οι υπέρηχοι μειώνουν περαιτέρω το μέγεθος των σωματιδίων καθώς διασπούν τα μεγαλύτερα σωματίδια, επιτυγχάνοντας παράλληλα μεγαλύτερη ομοιομορφία και πιο στενή κατανομή. (μείωση του δείκτη πολυδιασποράς).



Εικόνα 10. Probe sonication

Επιπλέον η μείωση του μεγέθους των λιποσωμάτων μπορεί να επιτευχθεί και με χρήση επιφανειοδραστικού καθώς κατά αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η συσσωμάτωση και επομένως η δημιουργία μεγαλύτερων σωματιδίων. Η μεγάλη όμως συγκέντρωση επιφανειοδραστικού έχει τα αντίθετα αποτελέσματα καθώς αυξάνουν τη διάμετρο των σωματιδίων και επομένως και του δείκτη

πολυδιασποράς, ενώ παράλληλα αυξάνουν τη διαλυτότητα της δραστικής ουσίας, η οποία εγκλείεται στην εξωτερική φάση, προκαλώντας αφενός τη διάχυση της στην υδατική φάση και αφετέρου τη μείωση της απόδοσης εγκλεισμού (EE%). Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των βασικών μεθόδων συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.^{[29],[34],[39]}

Πίνακας 6. Μέθοδοι ελάττωσης μεγεθών σωματιδίων

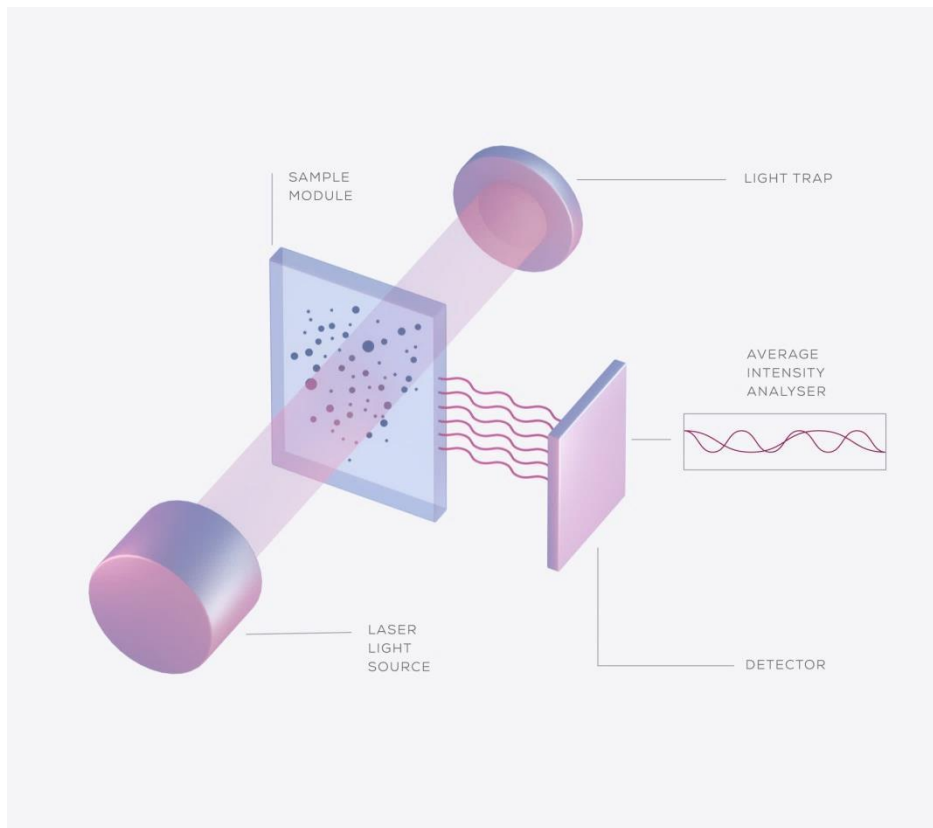
Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ομογενοποίηση	μεγάλη κλίμακα	ευρεία κατανομή
Υπέρηχοι	SUV	πιθανές βλάβες λόγω υψηλής T
Εξώθηση	στενή κατανομή	πιθανό μπλοκάρισμα πόρων της μεμβράνης

Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Η φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων, photon correlation spectroscopy (PLS), γνωστή και ως δυναμική σκέδαση φωτός, dynamic light scattering (DLS), είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό μεγέθους των νανοσωματιδίων σε διασπορά. Αποτελεί αρκετά προτιμητέα μέθοδο καθώς:

- ✓ Απαιτείται ιδιαίτερα μικρή ποσότητα δείγματος
- ✓ Χρειάζεται πολύ μικρή προετοιμασία
- ✓ Είναι γρήγορη
- ✓ Αποτελεί μη καταστρεπτική μέθοδο
- ✓ Έχει μεγάλο εύρος μεγεθών σωματιδίων (3-3000 nm)

Η συγκεκριμένη μέθοδος αναλύει την τυχαία θερμική κίνηση ή αλλιώς γνωστή και ως κίνηση Brown. Αρχικά με δέσμη λέιζερ το DLS μετρά τις στατιστικές διακυμάνσεις έντασης του φωτός από τις συγκρούσεις των σωματιδίων σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα μικρότερα σωματίδια, τα οποία διαθέτουν υψηλό συντελεστή διάχυσης, προκαλούν διακυμάνσεις μεγαλύτερης έντασης ενώ τα μεγαλύτερα σωματίδια, λόγω της αργής τους κίνησης παρουσιάζουν μικρότερες διακυμάνσεις. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται συνάρτηση συσχέτισης του χρόνου σκέδασης με το μέγεθος και την κατανομή των σωματιδίων, με σκοπό τον προσδιορισμό της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου και του δείκτη πολυδιασποράς PDI (polydispersity index). Στην ακόλουθη εικόνα περιγράφεται συνοπτικά η μέθοδος.



Εικόνα 11. Αρχή λειτουργίας της δυναμικής σκέδασης φωτός

Ο συγκεκριμένος δείκτης είναι αρκετά σημαντικός για το χαρακτηρισμό των σωματιδίων καθώς οι μεγάλες τιμές PDI υποδηλώνουν ανομοιόμορφη διασπορά ενώ οι χαμηλές τιμές PDI, μονοδιασκορπισμένη ομοιόμορφη διασπορά. Ιδανικά ο δείκτης λαμβάνει τιμή μικρότερη του 0,3, ενώ μέχρι 0,5 θεωρείται αποδεκτή.

Η μέση υδροδυναμική διάμετρος d υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d}$$

Όπου k η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, η το ιξώδες και D ο συντελεστής διάχυσης.

Η συγκεκριμένη σχέση δεν έχει ακρίβεια στις ανομοιόμορφες κατανομές και για την ελάττωση αυτού του σφάλματος στους υπολογισμούς, πραγματοποιείται αραιώση του δείγματος.

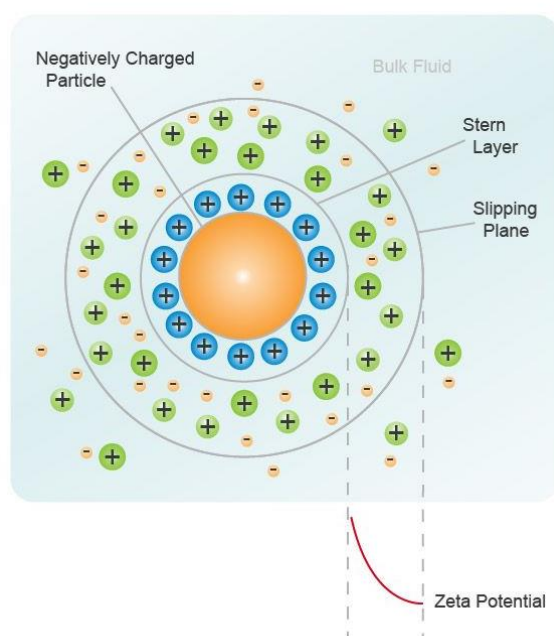
Εναλλακτικά ή και συνδυαστικά με τη μέθοδο του DLS χρησιμοποιείται και η περίθλαση ακτίνων λέιζερ LD (laser diffraction) για τον προσδιορισμό ευμεγέθων σωματιδίων με διαστάσεις οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 20 nm και 2000 μm . Πριν από τις μετρήσεις με LD, πραγματοποιείται διαχωρισμός των σωματιδίων με τη μέθοδο FFF (field-flow fraction), λαμβάνοντας υπόψιν το μέγεθος, με βάση τις διαφορετικές ακτίνες Stokes.^[33]

Z-δυναμικό

Τα σωματίδια ιόντων έχουν επιφανειακό φορτίο, το οποίο προσδιορίζεται απευθείας με ογκομέτρηση αν είναι συγκεκριμένες επιφανειακές ομάδες ή να εκτιμηθεί αν τα σωματίδια είναι προσροφημένα. Τότε από το επιφανειακό φορτίο προκύπτει το επιφανειακό δυναμικό, το οποίο όμως δεν μπορεί να μετρηθεί άμεσα. Το δυναμικό όμως το οποίο σχετίζεται με την απόσταση στενής προσέγγισης κατά τη διάρκεια αλληλεπιδράσεων, είναι μετρήσιμο και καλείται ζ-δυναμικό (zeta potential). Το ζ-δυναμικό καθορίζεται με βάση την αρχή μετατόπισης Doppler. Το φως το οποίο διαχέεται λόγω της κίνησης των σωματιδίων προκαλεί μετατόπιση συχνότητας, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας μ . Το μ δίνεται από τη σχέση Helmholtz-Smoluchowski:

$$\mu = \frac{\varepsilon \zeta}{n}$$

Όπου n το ιξώδες του μέσου διασποράς και ε η διαπερατότητα.



Εικόνα 12. Z-δυναμικό

Η εξίσωση χρησιμοποιείται κανονικά για μεγάλου μεγέθους σωματίδια, υψηλής ιοντικής ισχύος. Επομένως στην κλίμακα του νάνο δημιουργούνται αρκετά σφάλματα και γι' αυτό το ζ-δυναμικό χρησιμοποιείται κυρίως ποιοτικά και όχι ποσοτικά. Το ζ-δυναμικό επηρεάζεται από :

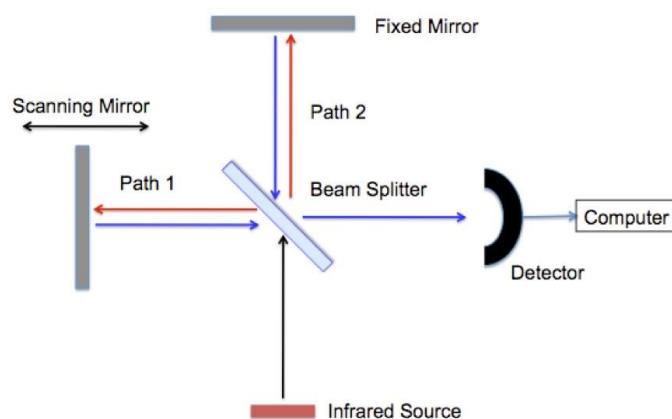
- I. Την ιοντική ισχύ
- II. Τους τύπους των ιόντων στο μέσο διασποράς (γι' αυτό και χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό με χαμηλή αγωγιμότητα)
- III. Το pH

Συνήθως το φορτίο των λιποσωμάτων είναι αρνητικό λόγω του επιφανειοδραστικού. Στην περίπτωση του tween 80, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως επιφανειοδραστικό και αποτελεί και αντικείμενο μελέτης όμως παρούσας εργασίας, είναι ένα μη ιονικό επιφανειοδραστικό, το οποίο όμως μπορεί να υδρολυθεί μερικώς σε όξινες ή βασικές συνθήκες, μετατρέποντας την επιφάνεια του λιποσώματος σε αρνητική. Το αρνητικό φορτίο των λιποσωμάτων μειώνει την έλξη μεταξύ των σωματιδίων λόγω δημιουργίας απωστικών δυνάμεων, σταθεροποιώντας έτσι το λιπόσωμα και εμποδίζοντας τη συσσωμάτωση.

Για τη σταθερότητα των σωματιδίων η τιμή $|ζ|$ αποτελεί κριτήριο. Για $|ζ| > 60 mV$, τα σωματίδια παρουσιάζουν εξαιρετική σταθερότητα, για $|ζ| > 30 mV$, τα σωματίδια είναι ηλεκτροστατικά σταθερά και παρουσιάζουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Για $5 mV < |ζ| < 30 mV$, παρουσιάζεται βραχυπρόθεσμη σταθερότητα, ενώ για $|ζ| < 5 mV$ υπάρχει κίνδυνος κροκκίδωσης. [33],[39],[41]

Φασματομετρία Υπερύθρου FT-IR

Η υπέρυθη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) είναι τεχνική που χρησιμοποιείται για τη λήψη υπέρυθρου φάσματος απορρόφησης, εκπομπής και φωτοαγωγιμότητας στερεών, υγρών και αερίων υλικών. Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται δομικός χαρακτηρισμός οργανικών, ανόργανων και πολυμερικών ενώσεων. Ένα κλασικό FT-IR φασματοφωτόμετρο περιλαμβάνει πηγή ακτινοβολίας, κελί εισαγωγής του δείγματος, ανιχνευτή, ενισχυτή και μετατροπέα A/D. Μέρος της ακτινοβολίας απορροφάται από το δείγμα, προκαλώντας δονήσεις και περιστροφές, οι οποίες δημιουργούν σήμα, το οποίο λαμβάνεται από τον ανιχνευτή και αφού περάσει από το μετατροπέα μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή δέχεται μετασχηματισμό Fourier προς δημιουργία γραφήματος φάσματος.



Εικόνα 13. Αρχή λειτουργίας οργάνου FT-IR

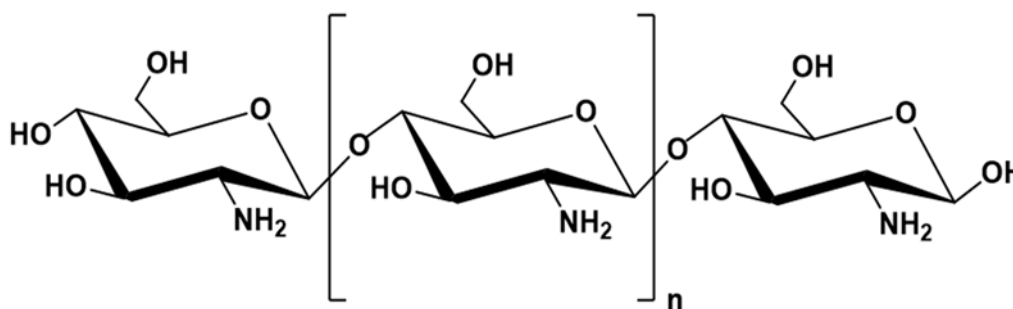
Το φάσμα είναι ξεχωριστό για κάθε μόριο καθώς οι κορυφές οι οποίες λαμβάνονται (ακίδες στο φάσμα) αντιστοιχούν στην κίνηση/δόνηση συγκεκριμένης χαρακτηριστικής ομάδας και αποδίδονται στις ιδιότητες της. Καθίστανται επομένως δυνατή η ταυτοποίηση καθαρών ενώσεων καθώς και

εύρεση προσμίξεων και αποτελέσματα οξείδωσης της ένωσης. Η φασματοσκοπία υπερέθρου θα χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση του εγκλεισμού της καφεΐνης στα σχηματιζόμενα χιτοσώματα και νιοσώματα.^{[69],[70]}

Χιτοζάνη

Τα λιποσώματα, δύναται να επικαλυφθούν εξωτερικά και με άλλες βιοσυμβατές ουσίες. Όταν η επικάλυψη αυτή αποτελείται από το πολυμερές της χιτοζάνης, τα κυστιδία αποκαλούνται χιτοσώματα.

Η χιτοζάνη είναι ένας κατιονικός φυσικός πολυσακχαρίτης, βιοσυμβατός, βιοδιασπάσιμος, με χαμηλή τοξικότητα και έχει τη δυνατότητα χημικών και ενζυμικών τροποποιήσεων, γι' αυτό και χρησιμοποιείται ως μήτρα για την ενθυλάκωση διαφόρων ενώσεων. Η επιλογή της μήτρας επηρεάζει την %ΕΕ, τη σταθερότητα και το προφίλ απελευθέρωσης. Η χιτοζάνη θεωρείται GRAS (γενικά αναγνωρισμένη ως ασφαλής) από την FDA. Η κατιονική της φύση οδηγεί στην ανάπτυξη διαφόρων δομών, όπως: νανοσωματίδια, γαλακτώματα, ίνες, γέλες και μεμβράνες. Η χιτοζάνη λαμβάνεται από μερική ακετυλίωση χιτίνης, η οποία βρίσκεται στα κελύφη καρκινοειδών (γαρίδας καβούρια, αστακοί), ενώ την καλύτερη πηγή χιτοζάνης αποτελούν τα κελύφη γαρίδας. Το ετεροπολυμερές της χιτοζάνης σχηματίζει 1-4-γλυκοζιδικούς δεσμούς που συνδέουν την Ν-ακέτυλο-2-άμινο-2-δέοξυ-D-γλυκοκυρανόζη (Ν-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη) με την 2-άμινο-2-δέοξυ-D-γλυκοκυρανόζη (D-γλυκοζαμίνη).



Σχήμα 9. Δομή της χιτοζάνης

Η χιτοζάνη διαθέτει πολλές λειτουργικές ομάδες, υδροξυλομάδες, αμινομάδες, ακετυλοαμινομάδες, οι οποίες τις προσδίδουν πολλαπλές ιδιότητες. Οι αμινομάδες ευνοούν τη διάλυση της χιτοζάνης σε όξινα διαλύματα. Λόγω ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων και των αμινομάδων αποκτά κρυσταλλική δομή. Η κύρια αλυσίδα είναι υδρόφιλη, διαθέτει όμως και μια μικρή υδρόφοβη συμπεριφορά λόγω των Ν-ακέτυλο ομάδων, οι οποίες δυσχεραίνουν τη διάλυση σε ουδέτερο διάλυμα.

Οι ιδιότητες της καθορίζονται από το βαθμό ακετυλίωσης, τη μέση γραμμομοριακή μάζα, τη διαλυτότητα και την κρυσταλλικότητα. Σύμφωνα με τον Panda η αύξηση του μοριακού βάρους της χιτοζάνης έπεται και μείωση της διαλυτότητας και των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων.^{[37],[45],[50],[51]}



Εικόνα 14. Καθοριστικοί παράγοντες των ιδιοτήτων της χιτοζάνης

Ιδιότητες χιτοζάνης

Η χιτοζάνη είναι το μόνο φυσικό αλκαλικό πολυμερές με καλή βιοσυμβατότητα, ενώ παράλληλα είναι βιοδιασπώμενη και μη τοξική τόσο για τους ανθρώπους όσο και τα ζώα. Ορισμένες από τις πιο βασικές της ιδιότητες συνοψίζονται ακολούθως:

- ✓ Ικανότητα διείσδυσης στους ιστούς.
- ✓ Βελτίωση της θερμικής σταθερότητας των νανοσωματιδίων.
- ✓ Βελτίωση ιξώδους και διαλυτότητας.
- ✓ Ελεγχόμενη και παρατεταμένη απελευθέρωση
- ✓ Διαθέτει βλεννοπροσκολλητική ιδιότητα, η οποία οδηγεί σε παράταση χρόνου επαφής και χρόνου απορρόφησης, άρα και αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας.
- ✓ Ενίσχυση της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης της χιτοζάνης σε μορφή νανοσωματιδίων καθώς έχουν μεγαλύτερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο.
- ✓ Η χιτοζάνη δύναται να αποτελέσει τόσο μήτρα όσο και επικάλυψη σε πολυμερικά σωματίδια, φυσικά πολυμερή ή νανοσωματίδια λιπιδίων.
- ✓ Σε χιτοσώματα μπορούν να εγκλειστούν φυτοχημικά είδη όπως, υδατάνθρακες, λιπίδια, πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, φαινολικά, τερπενοειδή και αλκαλοειδή.

- ✓ Ενίσχυση αντιφλεγμονώδους δράσης. Αυτό συμβαίνει καθώς η φυσική άμυνα του οργανισμού οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας και σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον (συνθήκες φλεγμονής), συνθήκες στις οποίες ευνοείται η διάλυση της χιτοζάνης και η απελευθέρωση της εκάστοτε εγκλεισμένης δραστικής ουσίας.
- ✓ Η χιτοζάνη έχει αντικαρκινική δράση, εμποδίζοντας τον κυτταρικό μεταβολισμό, προκαλώντας αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. [43],[45],[46],[47],[49],[50],[54]

Χιτοζάνη και δέρμα

Όσον αφορά τις δερματικές ωφέλειες, η χιτοζάνη κατέχει εξέχοντα ρόλο. Στις σημερινές ιδίως συνθήκες όπου η ακτινοβολία του ηλίου συνιστά ένα μεγάλο κίνδυνο για την υγεία. Η ακτινοβολία UV είναι υπεύθυνη για τη φωτογήρανση του δέρματος. Η UVC (100-290 nm) φιλτράρεται από το όζον, όχι όμως οι ακτινοβολίες UVA (320-400), UVB (290-320), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα ηλιακά εγκαύματα, το δερματικό εκφυλισμό, τη φωτοευαισθησία, τη φωτογήρανση και καρκίνο του δέρματος. Η υπεριώδης ακτινοβολία δημιουργεί ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες είναι πολύ δραστικές και προκαλούν οξειδωτικό στρες και φλεγμονές, καθώς και οξείδωση των πρωτεϊνών, γεγονός το οποίο συνεπάγεται και περαιτέρω βλάβες στα μιτοχόνδρια και στο DNA.

Ο ολιγοσακχαρίτης της χιτοζάνης, έχει υγραντικές ιδιότητες καθώς και αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση. Η χιτοζάνη αναστέλλει ανεπιθύμητες αλλαγές στο δέρμα μετά από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ανακουφίζοντας από μακροσκοπικές και ιστοπαθολογικές βλάβες, καθώς βελτιώνει το ποσοστό του κολλαγόνου. Σύμφωνα με μελέτες γαλακτώματα τα οποία ενσωματώνουν χιτοζάνη παρουσιάζουν χαμηλή κυτταροτοξικότητα, υψηλή σταθερότητα αποθήκευσης και μικρή αντιηλιακή προστασία της τάξεως 4 SPF. [44],[45]

Χιτοσώματα

Τα χιτοσώματα σχηματίζονται με ενυδάτωση των λιποσωμάτων με τις μεθόδους οι οποίες αναλύονται ακολούθως.

Παρασκευή χιτοσωμάτων

Τα χιτοσώματα δύναται να παρασκευασθούν με τις εξής μεθόδους:

- ✓ Ιονοτροπική πήξη
- ✓ Μικρογαλακτοματοποίηση
- ✓ Συμπλοκοποίηση
- ✓ Ενυδάτωση λεπτής μεμβράνης

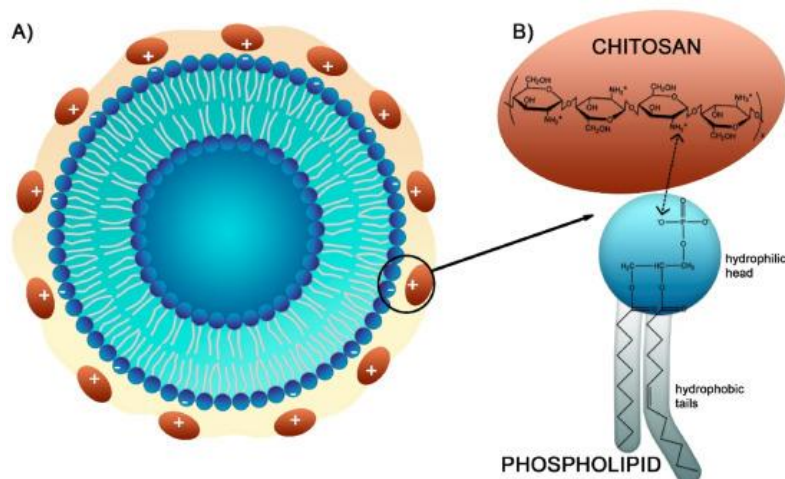
Η πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος, η οποία και αναλύεται στην εν λόγω εργασία, είναι η μέθοδος λεπτής μεμβράνης, η οποία περιλαμβάνει τα ίδια στάδια με την αναλυθείσα στο κεφάλαιο των λιποσωμάτων, ενώ επιπλέον

προστίθενται το στάδιο της ενυδάτωσης με διάλυμα χιτοζάνης. Ειδικότερα τα στάδια έχουν ως εξής:

- I. Ανάμιξη του επιθυμητού λιπιδίου με χοληστερόλη και διάλυση σε οργανικό διαλύτη
- II. Εξάτμιση του διαλύτη σε περιστροφικό αναδευτήρα (rotary).
- III. Ξήρανση σε αντλία κενού
- IV. Ολονύκτια παραμονή στο ψυγείο για περαιτέρω σταθεροποίηση
- V. Ενυδάτωση με διάλυμα χιτοζάνης και ανάδευση για 45 λεπτά με μία ώρα, υπό θέρμανση.
- VI. Υπερήχηση της διασποράς για περίπου πέντε λεπτά σε 30-40% δυναμικότητα.
- VII. Φυγοκέντρωση για 15 λεπτά
- VIII. Επαναιώρηση του ιζήματος

Για τον υπολογισμό του μεγέθους και της σταθερότητας των σωματιδίων χρησιμοποιείται το DLS μετά από αραιώση 1:10 της διασποράς των χιτοσωμάτων. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της επικάλυψης με χιτοζάνη δύναται να πραγματοποιηθεί μέσω του υπολογισμού του ζ-δυναμικού, το οποίο από αρνητικό (λόγω λιπιδίων/ λιποσώματα) μετατρέπεται σε θετικό. Η χιτοζάνη φέρει θετικό επιφανειακό φορτίο και τα χιτοσώματα τα οποία προκύπτουν αποκτούν τιμές ζ-δυναμικού, οι οποίες κυμαίνονται από 22-35 mV, γεγονός το οποίο φανερώνει την σταθερότητα τους. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία^[35], παρατηρείται καλύτερη απόδοση εγκλεισμού για χαμηλού μοριακού βάρους χιτοζάνη.

Όσο αυξάνει το αρνητικό φορτίο του λιπιδίου, τόσο αυξάνει η απορρόφηση της θετικά φορτισμένης χιτοζάνης, καθώς ενισχύεται η ηλεκτροστατική έλξη, με αποτέλεσμα την πολλαπλή επικάλυψη και την αύξηση της υδροδυναμικής διαμέτρου και επομένως του μεγέθους των σωματιδίων. Ειδικότερα η ενυδάτωση των λιπιδίων με χιτοζάνη οδηγεί στην πρωτονίωση της ομάδας αμίνης στην επιφάνεια της χιτοζάνης, η οποία σχηματίζει επικάλυψη γύρω από τα κυστίδια. Επομένως ένα ακόμη κριτήριο για τον έλεγχο της επικάλυψης είναι ο υπολογισμός του μεγέθους το οποίο θα πρέπει να παρουσιάζει αύξηση.^{[43],[54]}



Εικόνα 15. Δομή χιτοσωμάτων

Η συγκέντρωση της χιτοζάνης επηρεάζει το μέγεθος και φυσικά την απόδοση εγκλεισμού ΕΕ%. Σύμφωνα με μελέτες [37], τα χιτοσώματα παρουσιάζουν μεγαλύτερο μέγεθος και ΕΕ% σε σχέση με τα συμβατικά λιποσώματα, τα οποία αποτελούνται μόνο από φωσφολιπίδια και κάποιο επιφανειοδραστικό. Η αύξηση της συγκέντρωσης της χιτοζάνης αυξάνει και το βαθμό αποακετυλίωσης και συνεπώς το επιφανειακό φορτίο, το οποίο έπεται τη μείωση της %ΕΕ.

Μετά από πειράματα, συμπεράνθηκε πως η παρασκευή τους ευνοείται με την προσθήκη της υπό μαγνητική ανάδευση σε περίπου 1200 rpm για 2 ώρες και σε σταθερή θερμοκρασία ιδανικά 25°C η οποία δεν θα πρέπει να ξεπεράσει τους 40 για να μην υπάρξει υποβάθμιση της χιτοζάνης. Η ολονύκτια αποθήκευση τους στο ψυγείο συμβάλλει στη σταθεροποίησή τους, ενώ η φυγοκέντρωση για την παραλαβή τους και τον έμμεσο προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού οφείλει να γίνει στους 4°C στις 20000 rpm. [35],[37],[52],[53]

Σύμφωνα με μελέτες η αύξηση του χρόνου των υπερήχων οδηγεί και σε αύξηση της %ΕΕ. Η αύξηση της χιτοζάνης μέχρι ένα κρίσιμο σημείο συνεπάγεται την αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού, ενώ πέρα από αυτό μειώνεται καθώς η αυξημένη συγκέντρωση της χιτοζάνης δημιουργεί μεγαλύτερα σωματίδια με τάση να συσσωματώνονται. Για συγκεντρώσεις >0,2 %w/v παρατηρείται και μείωση της σταθερότητας. Σύμφωνα με τον Oberdoster μικρότερα σωματίδια προκαλούν μεγαλύτερη φλεγμονώδη αντίδραση σε σχέση με ίδιου είδους αλλά μεγαλύτερου μεγέθους σωματιδίων. [48],[54]

Χιτοσώματα και καφεΐνη

Ακόμη έχει δοκιμασθεί ο εγκλεισμός της καφεΐνης σε λιποσώματα φωσφατιδυλοχολίνης-χοληστερόλης, με επιφανειοδραστικό tween 80 και επικάλυψη χαμηλού μοριακού βάρους χιτοζάνης, τα οποία και αποτελούν αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

Η διαδικασία σχηματισμού του βασίζεται στη μέθοδο THF, όπου μετά τη δημιουργία του φιλμ στον πάτο της σφαιρικής φιάλης προστίθενται διάλυμα χιτοζάνης 1%, υπό ανάδευση και θέρμανση στους, προς αποφυγή δημιουργίας

ιζήματος. Η περιεκτικότητα της εγκλεισμένης καφεΐνης και επομένως και η απόδοση εγκλεισμού %EE δύναται να προσδιοριστεί έμμεσα από τα υπερκείμενα υγρά των υπερφυγοκεντρήσεων με χρήση του οργάνου UV-Vis. Ακόμη πραγματοποιείται έλεγχος της δημιουργίας των χιτοσωμάτων με τη μέθοδο του FT-IR, όπου κατασκευάζονται δισκία με προσθήκη σκόνης βρωμιούχου καλίου, σε αναλογία 1/100. Η μέθοδος θα πρέπει να δείξει ότι η καφεΐνη συνδέθηκε στις πολικές θέσεις της φωσφατιδυλοχολίνης.

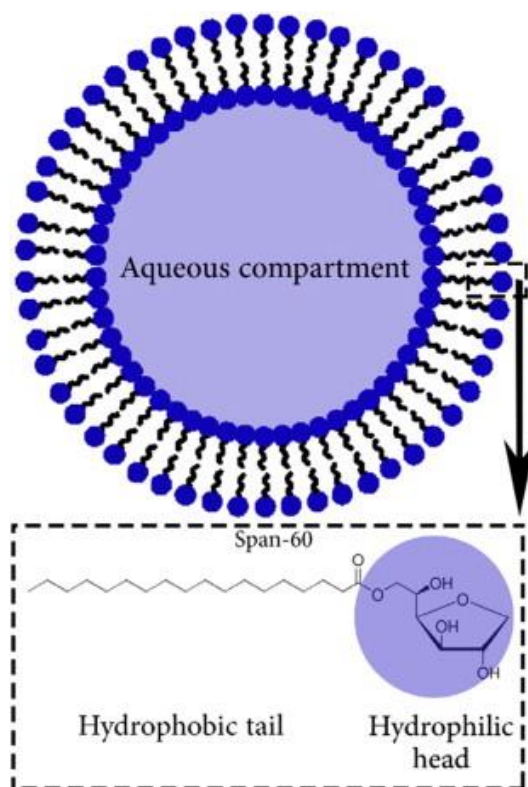
Σημαντική είναι ακόμη και η μελέτη της απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας (release), όπου πραγματοποιείται προσομοίωση της απελευθέρωσης σε ρυθμιστικό διάλυμα, υπό ανάδευση, όπου λαμβάνονται δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα και προσδιορίζεται ποσοτικά η απελευθερωμένη καφεΐνη στα 273 nm. Το μοντέλο το οποίο αναμένεται είναι το Korsmeyer-Peppas και το Higuchi. Η σταθερά K1 οφείλει να είναι μεγαλύτερη από την K2, αφού ο μηχανισμός απελευθέρωσης είναι η διάχυση.^{[48],[54]}

Νιοσώματα

Τα νιοσώματα (non-ionic surfactant vesicles: niosomes), ή αλλιώς μη ιοντικά κυστίδια, αποτελούνται από τουλάχιστον μία διπλοστιβάδα επιφανειοδραστικών ουσιών. Αυτά τα μη ιοντικά, τασιενεργά κυστίδια ή απλά νιοσώματα είναι μεγαλύτερα από τα συμβατικά λιποσώματα, καθώς δεν χρειάζονται φωσφολιπίδια για τη δημιουργία τους, αλλά επιφανειοδραστικές ουσίες, οι οποίες είναι φθηνότερες και σταθερότερες.

Όσον αφορά τη δομή τους, τα νιοσώματα διαθέτουν διπλοστιβάδες με υδρόφιλες εσωτερικές κοιλότητες και υδρόφοβα κελύφη. Μπορεί να είναι μονοστρωματικά ή πολυστρωματικά, τα οποία αποτελούνται από ομόκεντρους κύκλους διπλοστιβάδων ή ένα μεγαλύτερο κυστίδιο το οποίο ενσωματώνει μικρότερα.

Παρασκευάζονται από την ανάμιξη μη ιοντικών επιφανειοδραστικών, όπως αλκυλεστέρες, αλκυλαμίδια, τερπενοειδή, Spans, με ή χωρίς χοληστερόλη και άλλα λιπίδια, με τη μέθοδο της αυτοσυναρμολόγησης. Οι υδροφοβικές ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των υδρογονοθρακικών αλυσίδων και των ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ των πολικών ομάδων των κεφαλών, οδηγούν στη συγκρότηση των λιπιδίων.^{[38],[55],[56],[59]}



Εικόνα 16. Δομή νιοσωμάτων

Η χοληστερόλη αλληλεπιδρά με τις μη ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες και ενώ από μόνη της δεν δύναται να σχηματίσει διπλοστιβάδα, μπορεί να αναμειχθεί με τη σιβάδα, ρυθμίζοντας έτσι την ευκαμψία της μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερότερης σύνθεσης. Η προσθήκη χοληστερόλης επιτρέπει σε περισσότερες υδρόφοβες επιφανειοδραστικές ουσίες να σχηματίσουν νιοσώματα, καθώς περιορίζει την τάση συσσωμάτωσης, ενώ παράλληλα ελατώνει τη διαπερατότητα των μεμβρανών, εμποδίζοντας τις διαρροές και αυξάνοντας το χρόνο παραμονής των δραστικών ουσιών στο σώμα. [38],[56],[58]

Πλεονεκτήματα νιοσωμάτων

Τα νιοσώματα έναντι των συμβατικών λιποσωμάτων παρουσιάζουν ποικίλα πλεονεκτήματα, εκ των οποίων τα σημαντικότερα συνοψίζονται ακολούθως:

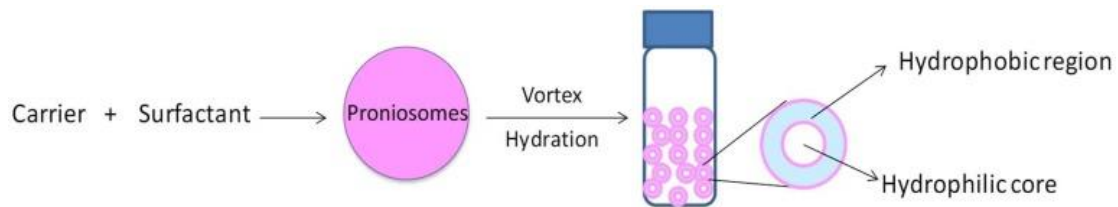
- ✓ Δύναται να εγκλείουν ταυτόχρονα (στο ίδιο κυστίδιο) υδρόφιλες και υδρόφοβες δραστικές ουσίες, οι μεν εγκλωβίζονται στον πυρήνα και οι δε στην υδρόφοβη περιοχή της διπλοστιβάδας.
- ✓ Είναι βιοδιασπώμενα και μη ανοσογόνα.
- ✓ Έχουν χαμηλή τοξικότητα.
- ✓ Διαθέτουν εξαιρετική βιοσυμβατότητα
- ✓ Ιδανική επιλογή για χορήγηση κυτταροτοξικών φαρμάκων.
- ✓ Παρουσιάζουν αυξημένη χημική σταθερότητα
- ✓ Έχουν χαμηλότερο κόστος

- ✓ Δεν απαιτούν κοστοβόρους χειρισμούς και συνθήκες αποθήκευσης.

Στα μειονεκτήματα τους ανήκει η χαμηλότερη απόδοση εγκλεισμού, περίπου 10-40%, αρκετά μικρότερη των λιποσωμάτων και των χιτοσωμάτων αντίστοιχα.^{[38],[55],[56],[58]}

Προνισώματα

Σημαντική προσθήκη στην κατηγορία των νισωμάτων, αποτελούν τα καινοτόμα προ-νισώματα (proniosomes), τα οποία δεν είναι παρά ξηρά νισώματα, τα οποία μετατρέπονται σε νισώματα, μετά από ενυδάτωση. Τα προνισώματα παρουσιάζουν καλύτερη φυσική σταθερότητα και ευκολία στη μεταφορά, με αποτέλεσμα τις ευκολότερες συνθήκες αποθήκευσης.^[56]

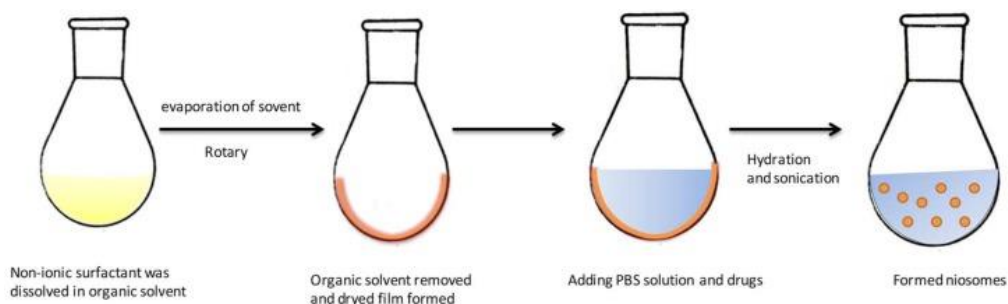


Σχήμα 10. Δημιουργία προνισωμάτων

Μέθοδοι σχηματισμού νισωμάτων

Τα νισώματα δύναται να σχηματιστούν με τις εξής κύριες μεθόδους:

- I. Μέθοδος υπερήχων
- II. Μικρορευστοποίηση (micro fluidization)
- III. Ενυδάτωση λεπτού φιλμ (σε συνδυασμό με τη μέθοδο των υπερήχων)
- IV. Εξάτμιση αντιστροφής φάσης.



Σχήμα 11. Σχηματισμός νισωμάτων με τη μέθοδο TFH

Οι συγκεκριμένες μέθοδοι επιτυγχάνουν ποσοστά απόδοσης εγκλεισμού μεταξύ 10 και 40 %. Η απόδοση εξαρτάται από το ποσοστό της χοληστερόλης, το είδος του επιφανειοδραστικού και φυσικά τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο.^{[55],[56]}

Όσον αφορά τη μέθοδο, όπως και στο σχηματισμό των απλών λιποσωμάτων, η υπερήχηση μειώνει το μέγεθος των σωματιδίων, καθώς διασπά τα συσσωματώματα και κατά αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται και υψηλότερη

ομοιογένεια, το οποίο υποδηλώνεται με την ελάττωση του δείκτη πολυδιασποράς, PDI. Ακόμη η αύξηση του χρόνου ενυδάτωσης οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού, καθώς έτσι επιτυγχάνεται πλήρης ενυδάτωση των πολικών κεφαλών.

Όσον αφορά τα συστατικά τα οποία συνιστούν τα νιοσώματα, η αναλογία χοληστερόλης και επιφανειοδραστικού είναι εξίσου σημαντική. Οι αναλογίες CH/Span οι οποίες χρησιμοποιούνται είναι των τάξεων των 30 ή 50 %, με συνθηέστερη την 1-1, χωρίς όμως αυτές να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στα μεγέθη των σχηματιζόμενων σωματιδίων. Η αύξηση της χοληστερόλης συνεπάγεται και αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού. Η συγκέντρωση της μολοταύτα δεν θα πρέπει να αυξηθεί πάνω από ένα κρίσιμο σημείο, καθώς μία ομάδα υδρογόνου του τμήματος της χοληστερόλης αλληλεπιδρά λειτουργικά με μία ομάδα οξυγόνου του επιφανειοδραστικού Span. Πέρα από αυτή την κρίσιμη συγκέντρωση δημιουργείται ο κίνδυνος διακοπής της διπλής στιβάδας και επομένως η μείωση του αριθμού των σχηματιζόμενων κυστιδίων.

Το πιο σύνηθες χρησιμοποιούμενο επιφανειοδραστικό αποτελεί η μονοστεατική σορβιτάνη, γνωστή και ως Span. Ανάλογα με το μήκος των αλυσίδων, κατηγοριοποιούνται σε Span 20, Span 40 και Span 60. Το Span 60 έχει αποδειχθεί ^{[55],[56]} πως οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού, έναντι των Span με χαμηλότερα μήκη αλύσου. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις μακριές κορεσμένες ακυλικές αλυσίδες, οι οποίες σε σχέση με τις κοντές αλυσίδες του Span 20 σχηματίζουν γέλες. Όσο αυξάνεται το μήκος αλύσου αυξάνεται και η θερμοκρασία μετάπτωσης με αποτέλεσμα μικρότερα Span να βρίσκονται σε υγρή κατάσταση, ενώ μεγαλύτερου μήκους αλυσίδας να σχηματίζουν γέλες, οι οποίες εγκλείουν καλύτερα τα υδατοδιαλυτά μόρια και να ελαττώνουν τη διαρροή τους. ^{[56],[57],[58]}

Στα νιοσώματα δίνεται η δυνατότητα προσθήκης συνεπιφανειοδραστικού, όπως η κινναριζίνη (cinnarizine), η οποία δρα ως γαλακτοματοποιητής.

Πράσινη Χημεία



Ο όρος πράσινη χημεία αναφέρεται στη διαδικασία σχεδιασμού χημικών προϊόντων η οποία είναι φιλικότερη στο περιβάλλον. Στόχος είναι η μείωση του αρνητικού αποτυπώματος τόσο στον άνθρωπο όσο και στο περιβάλλον. Η πράσινη χημεία απαιτεί γνώσεις από τη χημεία, τη χημική μηχανική και την τοξικολογία καθώς σκοπό της αποτελεί η βελτιστοποίηση διεργασιών, με τη δημιουργία νέων διαλυτών και καταλυτών, λιγότερο τοξικούς, μείωση της απαιτούμενης ενέργειας και ανακύκλωση των αποβλήτων και ενδιαμέσων προϊόντων. Οι βασικές αρχές που τη διέπουν είναι 12, θεσπίστηκαν από τον Paul Anastas και John Warner το 1998 και συνοψίζονται στο ακόλουθο σχήμα. ^{[67],[68]}



Σχήμα 12. Οι 12 αρχές της πράσινης χημείας

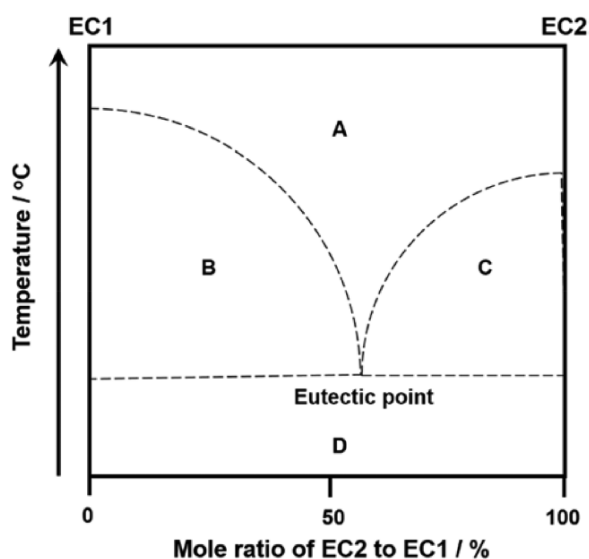
Πράσινοι διαλύτες (DES, NaDES, THEDES)

Οι διαλύτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία είναι κυρίως οργανικοί, οι οποίοι είναι δύσκολα αποικοδομήσιμοι, μη ανανεώσιμοι και τοξικοί για τον άνθρωπο. Καθίστανται λοιπόν αναπόδραστη ανάγκη εύρεσης νέων πιο 'πράσινων' διαλυτών. Χαμηλότερο κόστος και μικρότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα, έχουν τα ιοντικά υγρά (I.Y) και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES).

Τα ιοντικά υγρά αποτελούνται από ιόντα (οργανικά ανιόντα και κατιόντα) και διαθέτουν χαμηλό σημείο τήξεως, μικρότερο από το σημείο τήξεως του νερού ($T_{\text{τήξεως I.Y}} < 100^{\circ}\text{C}$). Λόγω της χαμηλής τάση ατμών τους θεωρούνται πράσινοι. Η πιθανή τους όμως βιοτοξικότητα έχει οδηγήσει στην αναζήτηση άλλων διαλυτών φιλικότερων προς το περιβάλλον.

Ο όρος ευτηκτικός αποδίδεται σε αυτόν που τήκεται εύκολα, έτσι λοιπόν και τα ευτηκτικά μείγματα σε ένα συγκεκριμένο εύρος αναλογιών των συστατικών που τα απαρτίζουν, παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαμηλό σημείο τήξεως. Οι βαθέως αυτηκτικοί διαλύτες (DES), παρουσιάζουν ακόμη πιο χαμηλό (βαθύ) σημείο

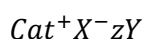
τήξεως, το οποίο μπορεί να βρίσκεται από 100-200°C χαμηλότερα των επιμέρους Σ.Τ των συστατικών. Παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η αναλογία των συστατικών επηρεάζουν το σημείο στο οποίο παρατηρείται η ταπείνωση του σημείου ζέσεως.



Διάγραμμα 1. Σχηματισμός ευτηκτικού σημείου [72]

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούνται από τουλάχιστον δύο συστατικά, ένα δότη δεσμού υδρογόνου, HBD (Hydrogen Bond Donor) και ένα δέκτη δεσμού υδρογόνου HBA (Hydrogen Bond Acceptor). Τα συστατικά αλληλεπιδρούν μέσω διαμοριακών δυνάμεων και όχι ιοντικών ή ομοιοπολικών δεσμών, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του φορτίου λόγω σύνδεσης του υδρογόνου, η οποία οδηγεί αφενός σε χαμηλή ενέργεια πλέγματος και αφετέρου στην ελάττωση του σημείου τήξεως του μείγματος.

Ο DES έχει τη μορφή:



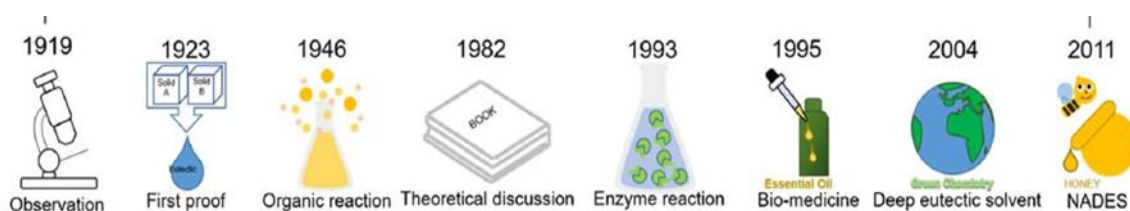
Όπου Cat^+ κατιόν αμμωνιακού ή φωσφονιακού άλατος, X^- και Y , βάση και οξύ κατά Lewis αντίστοιχα.

Υπάρχουν τέσσερις τύποι βασικοί τύποι DES, οι οποίοι συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7. Τύποι βαθέων ευτηκτικών διαλυτών, DES [75]

Τύπος	Γενική μορφή	Όροι
Τύπος I	$Cat^+X^-zMCl_x$	$M = Zn, (1, 5, 6) Sn, (7) Fe, Al, (8) Ga, (9) In (10)$
Τύπος II	$Cat^+X^-zMCl_x \cdot yH_2O$	$M = Cr, (11) Co, Cu, Ni, Fe$
Τύπος III	Cat^+X^-zRZ	$Z = CONH_2, (12) COOH, (13) OH (14)$
Τύπος IV	$MCl_x + RZ = MCl_{x-1}^+RZ + MCl_{x+1}^-$	$M = Al, Zn$ and $Z = CONH_2, OH$

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που απαρτίζονται από φυσικά συστατικά (οργανικά οξέα, βάσεις, σάκχαρα, πολυαλκόλες), καλούνται φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, NaDES. Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες έχουν χαμηλή θερμοδυναμική σταθερά, η οποία επηρεάζεται από τη γεωμετρία και τα περιβάλλον, οδηγώντας σε πιθανό διαχωρισμό στις επιμέρους ουσίες. Λόγω αυτής της θερμοδυναμικής μετατροπής, η ύπαρξη ευτηκτικής κατάστασης δεν αναγνωρίζεται εύκολα σε φυσικά υλικά. Παράδειγμα NaDES από την καθημερινή ζωή, αποτελεί το μέλι σχηματίζοντας ένα παχύρρευστο μείγμα σακχάρων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

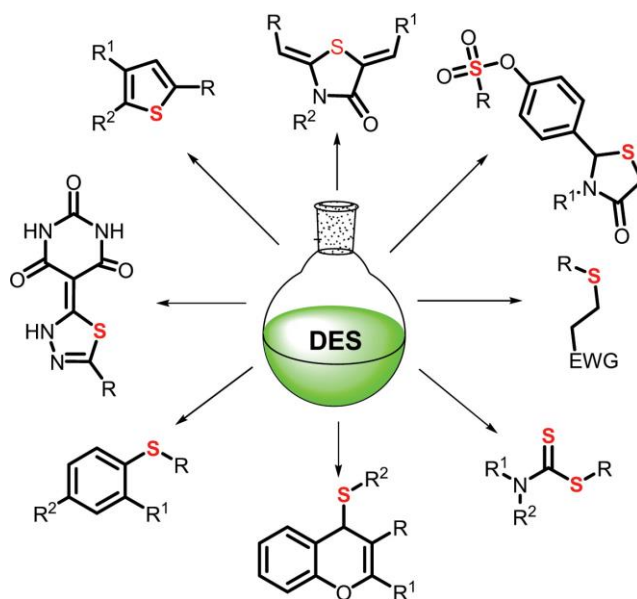


Εικόνα 17. Χρονολογική πορεία ανακάλυψης (φυσικών) βαθέων ευτηκτικών διαλυτών [72]

Ιδιότητες NaDES

Οι NaDES διαλύουν φυσικές και συνθετικές ουσίες με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, ενώ ταυτόχρονα είναι βιοσυμβατοί και βιοδιασπάσιμοι. Η χαμηλή τοξικότητα καθώς και τάση ατμών, μειώνει τις εκπομπές στην ατμόσφαιρα και το αποτύπωμα στο περιβάλλον. Ακόμη είναι ανανεώσιμοι και μπορούν να ανακυκλωθούν και να ξαναχρησιμοποιηθούν. Η αυξημένη διαλυτότητα και το χαμηλό κόστος καθιστούν τους NaDES πολύ καλή επιλογή διαλύτη σε μεθόδους εκχύλισης, αντικαθιστώντας έτσι συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, όπως DMSO.

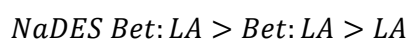
Τα συνηθέστερα συστατικά των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, είναι η χλωριούχος χολίνη, το γαλακτικό οξύ και η 1,2-προπανοδιόλη.[72],[73],[74],[75],[76]



Σχήμα 13. Διάφοροι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες

Οι θεραπευτικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες ,THEDES (Therapeutic Deep Eutectic Systems), αποτελούν υποσύνολο των DES με ενεργό φαρμακευτικό συστατικό. Συνιστούν ενισχυμένους φορείς βιοδραστικών μορίων, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του δραστικού φαρμάκου. Αποτελεί ιδανικό φορέα για υδρόφοβες ή υδρόφιλες δραστικές ουσίες καθώς βελτιώνει τη διαλυτότητα και τη διαπερατότητα τους, ενώ παράλληλα διατηρείται η αντιβακτηριδιακή τους δράση, οδηγώντας σε αυξημένη σταθερότητα και ελεγχόμενη απελευθέρωση, η οποία και συνεπάγεται τη χρήση μικρότερης δόσης της δραστικής ουσίας.^{[77],[78]}

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται τη χρήση NaDES, αποτελούμενο από βεταΐνη και γαλακτικό οξύ Bet:LA. Η βεταΐνη (HBA) έχει φυσική προέλευση και είναι ευρέως διαδεδομένη μεταξύ των οργανισμών, οδηγώντας σε χαμηλό κόστος. Παρότι είναι ουδέτερο μόριο, διαθέτει ένα θετικό τμήμα, λόγω του τεταρτοταγούς αμμωνίου και ένα αρνητικό, το οποίο οφείλεται στην καρβοξυλομάδα. Αυτές οι δύο ομάδες αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν ισχυρό δεσμό υδρογόνου με την υδροξυ-ομάδα του γαλακτικού οξέος, προς σχηματισμό ενός παχύρρευστου διαλύτη. Ο συγκεκριμένος διαλύτης χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη χιτοζάνη για δημιουργία φιλμ και επικαλύψεων σε σωματίδια. Πειραματικά έχει επιβεβαιωθεί πως το δημιουργούμενο φιλμ από NaDES Bet:LA σε σχέση με το φυσικό μείγμα Bet:LA και σκέτο LA (όλες οι περιπτώσεις σε συνδυασμό με τη χιτοζάνη), έχει μεγαλύτερο πάχος, οδηγώντας σε σωματίδια με την εξής σειρά μεγέθους:



Η παρατήρηση αυτή οφείλεται στο χαρακτηριστικό της βεταΐνης να δημιουργεί περαιτέρω χώρο μεταξύ των αλυσίδων της χιτοζάνης λόγω των αλληλεπιδράσεων μέσω των σχηματιζόμενων δεσμών υδρογόνου. Επιπλέον το NaDES αυξάνει την ελαστικότητα του φιλμ και επομένως την ανθεκτικότητά του, γεγονός το οποίο το καθιστά ιδανικό για επικαλύψεις σωματιδίων. Ιδίως το NaDES Bet:LA σε συνδυασμό με τη χιτοζάνη παρουσιάζει δύο φορές πιο ελαστικό φιλμ και τη

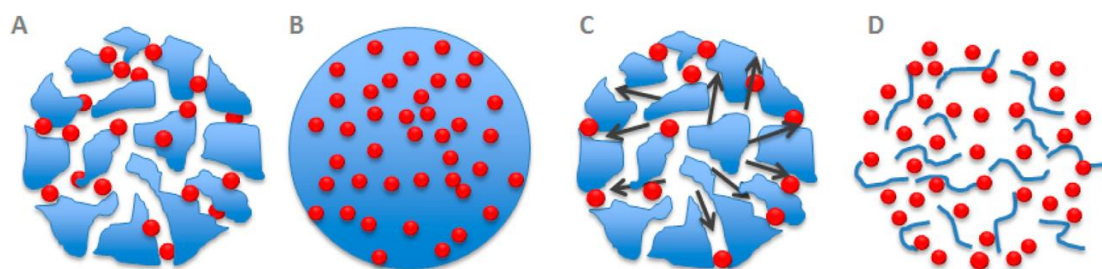
μισή διαπερατότητα από το NaDES ChCl:LA (χλωριούχου χολίνης: γαλακτικού οξέος), γι' αυτό και προτιμήθηκε η χρήση του στην παρούσα εργασία.^{[79],[80],[81]}

Μελέτη απελευθέρωσης (In Vitro Release Study)

Οι εγκλεισμένες δραστικές ουσίες διαθέτουν διάφορους μηχανισμούς απελευθέρωσης, οι οποίοι συνοψίζονται ακολούθως:

- A. Διάχυση μέσω πόρων γεμισμένων με νερό: μεταφορά της δραστικής ουσίας από την αρχική θέση της θέση στη μήτρα προς την εξωτερική επιφάνεια και στη συνέχεια μεταφορά της στο εξωτερικό περιβάλλον λόγω διαφοράς χημικού δυναμικού.
- B. Διάχυση μέσω της μήτρας: λαμβάνει χώρα για μη αποικοδομήσιμες μήτρες και η απελευθέρωση δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας αλλά από τα χαρακτηριστικά της μήτρας (πάχος, διαπερατότητα).
- C. Ωσμωτική άντληση: λαμβάνει χώρα σε ημιδιαπερατές μεμβράνες και οφείλεται στη διαφορά πιέσεων.
- D. Διάβρωση: εκδηλώνεται είτε ως επιφανειακή διάβρωση είτε ως μαζική διάβρωση. Κατά την επιφανειακή διάβρωση (surface erosion), πραγματοποιείται διάσπαση ξεκινώντας από την επιφάνεια της μήτρας οδηγώντας στην ελάττωση του μεγέθους της και η απελευθέρωση λαμβάνει χώρα όταν ο ρυθμός της διάβρωσης είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό διείσδυσης του νερού στο κυστιδίο. Κατά τη μαζική διάβρωση (bulk erosion) νερό διεισδύει και προκαλεί την ομοιογενή αποδόμηση της μήτρας με πιθανή υδρόλυση του κυστιδίου και επομένως δεν προστατεύει τη δραστική ουσία από το περιβάλλον.

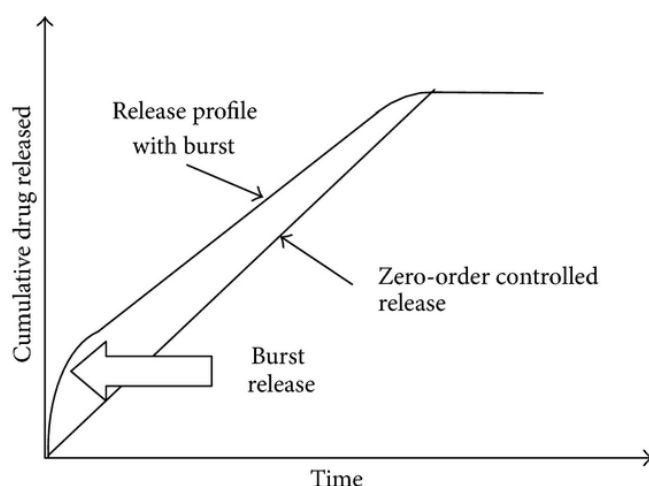
Οι μηχανισμοί απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών συνοψίζονται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 18. Μηχανισμοί απελευθέρωσης με: A) διάχυση μέσω πόρων, B) διάχυση μέσω μήτρας, C) ωσμωτική άντληση, D) διάβρωση^[60]

Το προφίλ απελευθέρωσης μπορεί να περιγράφεται από μία, δύο ή τρεις φάσεις. Για μία φάση, το μοντέλο λέγεται μηδενικό (zero order) και η απελευθέρωση χαρακτηρίζεται από κινητική πρώτης τάξης, ενώ ο ρυθμός της είναι σταθερός και ανεξάρτητος με τη συγκέντρωση. Το συγκεκριμένο μοντέλο δεν είναι σύνηθες για την περιγραφή απελευθέρωσης από πολυμερικά

σωματίδια και προτιμάται το διφασικό μοντέλο. Το εν λόγω μοντέλο παρουσιάζει δύο φάσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ταχεία απελευθέρωση (burst mode) της δραστικής ουσίας, από τη στιγμή που εισέρχεται το κυστίδιο στο διάλυμα και την σταδιακά επιβραδυνόμενη φάση, όπου και σχηματίζεται πλατώ (plateau). Στο διφασικό μοντέλο ο κύριος μηχανισμός που διέπει την απελευθέρωση είναι η διάχυση. Με την πάροδο του χρόνου μειώνεται η συγκέντρωση της εγκλεισμένης ουσίας και επομένως η διαφορά του χημικού δυναμικού, έχοντας ως αποτέλεσμα την επιβραδυνόμενη διάχυση και αποδέσμευση. Στο ακόλουθο διάγραμμα παρουσιάζεται αποδέσμευση με βάση το μηδενικό και το διφασικό μοντέλο.



Σχήμα 14. Διφασική απελευθέρωση δραστικής ουσίας σε σύγκριση με μηδενικής τάξης[60]

Συνήθως οι υδρόφοβες δραστικές συμμορφώνονται με το μηδενικό μοντέλο, ενώ οι υδρόφιλες παρουσιάζουν διφασικό ή λίγο πιο περίπλοκο τριφασικό προφίλ απελευθέρωσης.

Το τριφασικό μοντέλο αποτελείται και αυτό από μία αρχική φάση έκρηξης (early release), όπου λαμβάνει χώρα πρόωρη απελευθέρωση στην επιφάνεια. Ακολουθεί η φάση υστέρησης (lag phase) ή αργής απελευθέρωσης όπου κυριαρχεί το φαινόμενο της διάχυσης μέσω πόρων ή μήτρας, με ταυτόχρονη υδρόλυση και αποικοδόμηση της μήτρας. Η τελική φάση είναι ταχύτερη, αποτελεί την κύρια απελευθέρωση (main release) και ξεκινάει όταν λάβει χώρα το φαινόμενο της διάβρωσης.[60],[61],[62]

Ο ρυθμός της απελευθέρωσης εξαρτάται από:

- ✓ Τη διάβρωση της μήτρας
- ✓ Τη διαλυτότητα της δραστικής ουσίας
- ✓ Την εκρόφηση της επιφανειακά προσροφημένης δραστικής ουσίας

Η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας μπορεί να είναι άμεση η τροποποιημένη. Η άμεση αποδέσμευση αποτελείται από ένα στάδιο και περιγράφεται από

πρώτης τάξεως κινητική, ενώ στα συστήματα τροποποιημένης αποδέσμευσης επηρεάζεται η κινητική τους από το σύστημα μεταφοράς. Η τροποποιημένη αποδέσμευση μπορεί να λαμβάνει χώρα μόνο σε κάποιο σημείο (επιβραδυνόμενη αποδέσμευση) ή να είναι παρατεταμένη (εκτεταμένη αποδέσμευση). Η εκτεταμένη αποδέσμευση βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή σε φάρμακα τα οποία οφείλουν να έχουν συγκεκριμένη συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος, ενώ παράλληλα με αυτό τον τρόπο μειώνεται η συχνότητα χορήγησης του φαρμάκου.^[63]

Για την περιγραφή της κινητικής απελευθέρωσης εγκλεισμένων δραστικών ουσιών υπάρχουν μαθηματικά μοντέλα τα οποία περιγράφουν ποσοτικά το προφίλ απελευθέρωσης.

Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

Μηδενικής τάξης (zero order)

Το συγκεκριμένο μοντέλο χρησιμοποιείται για την περιγραφή απελευθέρωσης που οφείλεται σε ώσμωση και εκφράζεται από τον τύπο:

$$c_t = c_0 + k_0 t$$

Όπου c_t : η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται σε χρόνο t , c_0 η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα, k_0 η σταθερά απελευθέρωσης μηδενικής τάξης και t ο χρόνος σε ώρες.

Πρώτης τάξης (first order)

Το μοντέλο πρώτης τάξης περιγράφει την απορρόφηση και απέκκριση θεραπευτικών παραγόντων (υδατοδιαλυτοί) και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας, ενώ έχει τη μαθηματική έκφραση:

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{k}{2.303}$$

Όπου Q_t : η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται σε χρόνο t , Q_0 η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα, k η σταθερά απελευθέρωσης και t ο χρόνος σε ώρες.

Higuchi

Το συγκεκριμένο μοντέλο χρησιμοποιείται για την περιγραφή απελευθέρωσης η οποία εξαρτάται από τη διάχυση και υπακούει στον πρώτο νόμο του Fick

$$Q = k_H * t^{\frac{1}{2}} \quad \text{ή} \quad \frac{M_t}{M_0} = k_H * t^{\frac{1}{2}}$$

Όπου M_t : η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται σε χρόνο t , M_0 η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα, k_H η σταθερά Higuchi και t ο χρόνος σε ώρες.

Για να εφαρμοστεί το συγκεκριμένο μοντέλο γίνονται οι εξής παραδοχές:

- ✓ Η διάχυση λαμβάνει χώρα μόνο σε μία διάσταση
- ✓ Τα σωματίδια έχουν σφαιρικό σχήμα
- ✓ Η διάλυση στο μέσο απελευθέρωσης είναι γρήγορη και πλήρης
- ✓ Ο ρυθμός της διάχυσης είναι σταθερός
- ✓ Η διόγκωση του φορέα είναι αμελητέα

Μοντέλο Korsmeyer-Peppas

Αυτό το μοντέλο είναι ημι-εμπειρικό και χρησιμοποιείται για να περιγράψει μόνο το αρχικό 60% των δεδομένων. Σε αντίθεση με τα άλλα μοντέλα λαμβάνονται υπόψη η δομή και οι ιδιότητες του συστήματος. Γι' αυτό το λόγο παρουσιάζει καλύτερο R^2 και επομένως έχει καλύτερη συσχέτιση πειραματικών δεδομένων με την εξίσωση.

$$\frac{M_t}{M_0} = k * t^n$$

Όπου M_t : η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται σε χρόνο t , M_0 η συνολική ποσότητα της δραστικής ουσίας στην ισορροπία, k η κινητική σταθερά η οποία ενσωματώνει τις ιδιότητες του συστήματος, t ο χρόνος σε ώρες και n ο εκθέτης διάχυσης.

Ο εκθέτης n ανάλογα με τις τιμές που παίρνει προσδιορίζει και την κινητική που διέπει το σύστημα.

- $n \leq 0.5$, το σύστημα περιγράφεται από Fickian διάχυση, δηλαδή κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης
- $0.5 \leq n \leq 1$, το σύστημα περιγράφεται από μη Fickian διάχυση και τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα
- $n = 1$, το σύστημα περιγράφεται από μη Fickian διάχυση Case II, όπου κυριαρχούν τα φαινόμενα διόγκωσης ή χαλάρωσης.

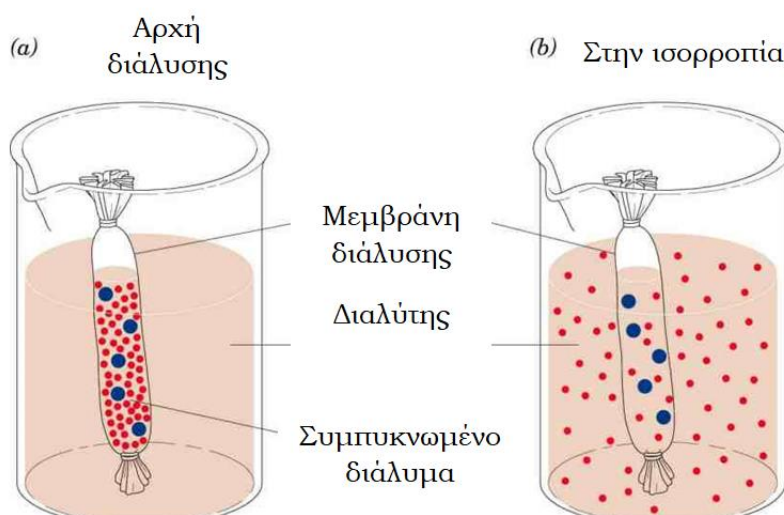
Όσο αυξάνεται η τιμή της σταθεράς τόσο πιο γρήγορη είναι η απελευθέρωση, ενώ για μικρότερες τιμές υποδυκνύει κακή απελευθέρωση.

Για την καφεΐνη αναμένεται υψηλή τιμή σταθεράς, η οποία οφείλεται στην υψηλή διαπερατότητα των φωσφολιπιδίων και αυξάνεται σε ισοτονικό περιβάλλον (pH=5.5) λόγω της συρρίκνωσης των κυστιδίων και επομένως αύξησης της αντίστασης που ασκούν οι μεμβράνες

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της απελευθέρωσης είναι οι ακόλουθοι:

- Χρήση μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης
- Ανάδευση ακολουθούμενη από (υπερ)φυγοκέντρωση
- Υπερδιήθηση
- Δοχεία διάλυσης (side by side diffusion cells)

Στην παρούσα μελέτη γίνεται χρήση μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης καθώς συνιστούν μία πιο απλή και λιγότερο χρονοβόρα διαδικασία.^{[64],[65],[66]}



Εικόνα 19. Μέθοδος μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης

Πειραματικό μέρος



Εικόνα 20. Χιτοσώματα σε διασπορά

Σκοπός

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πράσινων διεργασιών εγκλεισμού του φυσικού αλκαλοειδούς καφεΐνη σε βιοσυμβατά νανοσυστήματα με χρήση φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών. Ειδικότερα ως φορείς εξετάζονται λιποσώματα με περίβλημα χιτοζάνης (χιτοσώματα), καθώς και μη ιονικοί φορείς (νιοσώματα). Η μελέτη περιλαμβάνει και τη σύνθεση βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES) με συστατικά τη βεταΐνη (Bet) και το γαλακτικό οξύ (LA), ο οποίος αποτελεί μία πιο πράσινη εναλλακτική στο στάδιο της ενυδάτωσης του φιλμ των σχηματιζόμενων σωματιδίων. Η βελτιστοποίηση των πειραμάτων διεξάγεται με τη βοήθεια πειραματικού σχεδιασμού με χρήση του λογισμικού Design Expert. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές είναι: η περιεκτικότητα (% w/v) της χιτοζάνης, η περιεκτικότητα (% v/v) του NaDES καθώς και οι περιεκτικότητες (% w/v) των επιφανειοδραστικών tween 80 και Span 60 προς τη βελτιστοποίηση των εξαρτημένων μεταβλητών (αποκρίσεων), που είναι το μέγεθος των σωματιδίων, το ζ-δυναμικό, ο δείκτης πολυδιασποράς PDI και η απόδοση εγκλεισμού EE%. Το μέγεθος, το ζ-δυναμικό και ο δείκτης πολυδιασποράς προσδιορίζονται με τη χρήση της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), ενώ η απόδοση εγκλεισμού υπολογίζεται έμμεσα με βάση τις απορροφήσεις στο μήκος κύματος της καφεΐνης με τη βοήθεια του οργάνου UV-Vis. Οι φορείς και οι βιοδραστικές ουσίες μελετήθηκαν δομικά και με χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR). Επιπλέον αφότου προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες αναλογίες, πραγματοποιήθηκε μελέτη αποδέσμευσης της καφεΐνης (release) σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 5.5.

Όργανα και αντιδραστήρια

Στους ακόλουθους πίνακες παρατίθενται τα όργανα και οι συσκευές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη NaDES (Bet:LA) καθώς και των χιτοσωμάτων, τόσο με βάση τη φωσφατιδυλοχολίνη και το επιφανειοδραστικό tween 80, όσο και με

το Span 60, καθώς και των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διεξαγωγή της μελέτης.

Πίνακας 8. Όργανα και συσκευές

Όργανα-Συσκευές	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp	ZX4
Αντλία κενού	Edwards	RV-5
Ζυγός ακριβείας (έως 210 mg)	Kern	ADJ 200-4
Ζυγός ακριβείας (έως 2 mg)	Sartorius	M2P
Λουτρό υπερήχων	Branson	2210 Ultrasonic Bath
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη εστία	Witeg	MSH-20A
Περιστροφικός εξατμιστήρας	Buchi	Rotavapor® R-114
Φίλτρο	Branchia	Nonsterile Syringe Filters, Pore: 0.4 μm
Υπερφυγόκεντρος	ThermoScientific	Sorvall LYNX 6000 Super-speed Centrifuge
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Φασματοφωτόμετρο FT-IR/AT-IR	Jasco	4200
Dynamic Light Scattering (DLS)	Malvern Panalytical	Zetasizer Nano ZS
NMR	Varian	V600MHz
Probe υπερήχων	Sonics and Materials Inc	Vibra cell

Πίνακας 9. Αντιδραστήρια

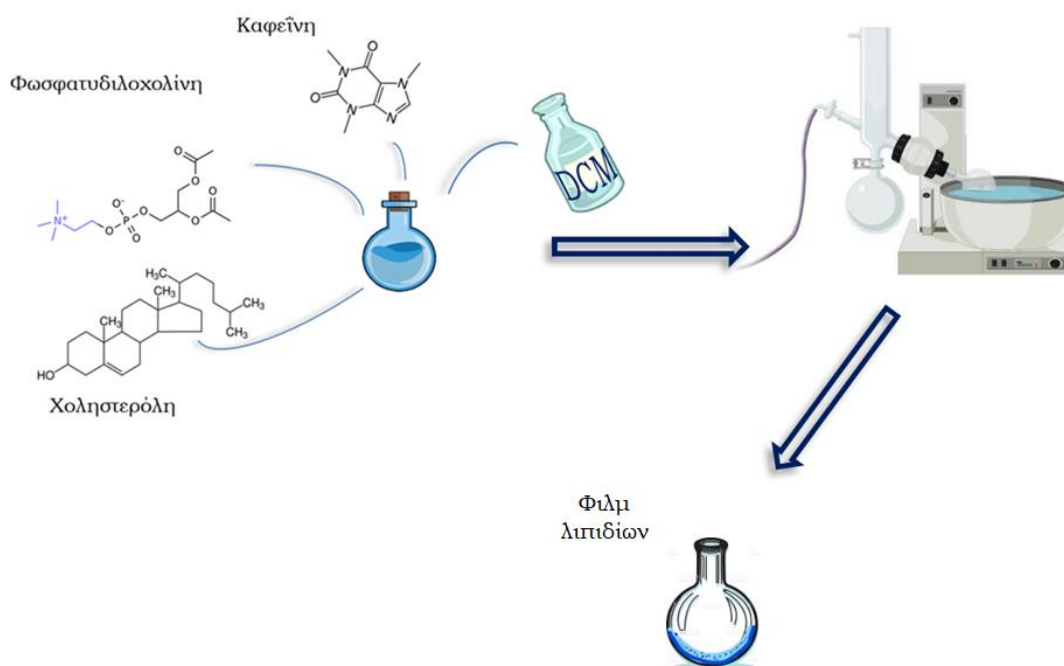
Αντιδραστήριο	Χημικός τύπος	Παρασκευαστής / Προμηθευτής
Αιθανόλη	C_2H_5OH	Sigma – Aldrich
Βεταΐνη (άνυδρη)	$C_5H_{11}NO_2$	Alfa Aesar
Βρωμιούχο κάλιο	KBr	Sigma – Aldrich
Γαλακτικό οξύ	$C_3H_6O_3$	Labbox
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο	KH_2PO_4	Penta
Διχλωρο μεθάνιο	CH_2Cl_2 (DCM)	-
Καφεΐνη	$C_8H_{10}N_4O_2$	C.F.Boehringer & Soehne
Μεθανόλη	CH_3OH	Carlo Ebra
Μονόξινο φωσφορικό κάλιο	K_2HPO_4	Penta
Νερό (υπερκάθαρο)	H_2O	-
Υδροξείδιο του νατρίου	$NaOH$	Sigma – Aldrich
Φωσφατυδιλοχολίνη	$C_{42}H_{80}NO_8P$ (PC)	Sigma – Aldrich
Χιτοζάνη (χαμηλού μοριακού βάρους)	$C_{56}H_{103}N_9O_{39}$	Tokyo Chemical Industry CO
Χοληστερόλη	$C_{27}H_{46}O$	Alfa Aesar
Span 60	$C_{24}H_{46}O_6$	Alfa Aesar
Tween 80	$C_{64}H_{124}O_{26}$	Alfa Aesar

Παρασκευή σωματιδίων

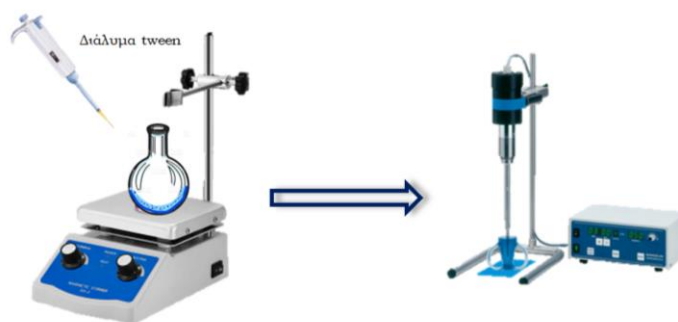
Σύνθεση λιποσωμάτων

Αρχικά παρασκευάστηκαν λιποσώματα, αποτελούμενα από χοληστερόλη και φωσφατυδιλοχολίνη καθώς και χιτοσώματα με βάση των αναλογίων, οι οποίες προέκυψαν από τη βιβλιογραφία και θα χρησιμεύσουν για σύγκριση με τα σωματίδια τα οποία παρασκευάστηκαν με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό Box Behken. Ακολουθώς παρουσιάζονται συνοπτικά τα βήματα σύνθεσης των λιποσωμάτων:

- I. Ζύγιση 10 mg καφεΐνης, 85 mg φωσφατυδιλοχολίνης και 15 mg χοληστερόλης.
- II. Προσθήκη των αντιδραστηρίων σε σφαιρική φιάλη των 50 ml.
- III. Διάλυση με προσθήκη 10 ml μείγματος δικλωρομεθανίου/μεθανόλης σε αναλογία 3/2, (DCM: 6 ml, MeOH: 4ml) και ανάδευση σε vortex.
- IV. Εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό αναδευτήρα rotary, υπό θέρμανση στους 60°C,
- V. Πλήρης απομάκρυνση του διαλύτη σε αντλία κενού Edwards, μετά από παραμονή για 3 ώρες.
- VI. Ενυδάτωση με διάλυμα tween 80 1% w/v (100mg tween + 10 ml υπερκάθαρο νερό, με το διάλυμα να προστίθενται στάγδην).
- VII. Έντονη ανάδευση του διαλύματος (600 rpm) σε θερμαινόμενη πλάκα για 1 ώρα στους 40°C.
- VIII. Υπερήχηση του διαλύματος με probe, σε 18% δυναμικότητα για 5 λεπτά.
- IX. Ολονύκτια αποθήκευση της διασποράς στο ψυγείο.



Σχήμα 15. Παρασκευή φιλμ λιπιδίων



Σχήμα 16. Ενυδάτωση λεπτού φιλμ και χρήση υπερήχων

Παρατηρήσεις/σκόλια

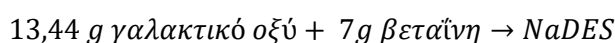
- Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προτιμάται ως διαλύτης σκέτο δικλωρομεθάνιο (DCM), κατόπιν όμως εργαστηριακών δοκιμών παρατηρήθηκε καλύτερη διαλυτότητα των λιπιδίων σε μίγμα DCM/MeOH.
- Η ανάμιξη του επιφανειοδραστικού με το φιλμ λιπιδίων, δεν είναι απαραίτητο να λάβει χώρα υπό θέρμανση. Κατόπιν όμως δοκιμών παρατηρήθηκε γρηγορότερη πλήρης διαλυτοποίηση για θερμοκρασία 40°C, έναντι της θερμοκρασίας δωματίου.
- Το στάδιο των υπερήχων είναι απαραίτητο για τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων καθώς τα λιπίδια σχηματίζουν μεγάλα σωματίδια ή και συσσωματώματα με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού φιλμ. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ομοιογένεια και σταθερότερα σωματίδια.



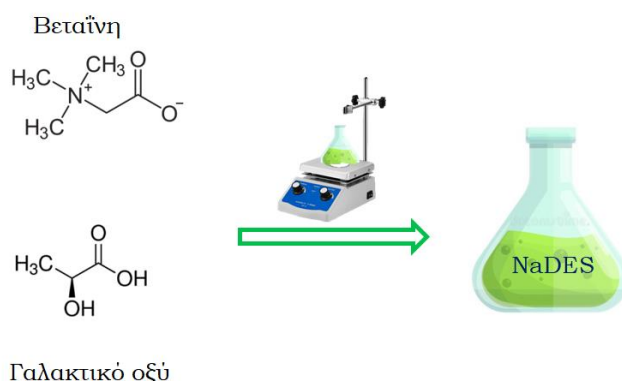
Εικόνα 21. Λυοφιλωμένα λιποσώματα

Συνθετική πορεία NaDES Bet:LA

Ο σχηματισμός των χιτοσωμάτων πραγματοποιείται όπως ακριβώς και των λιποσωμάτων με την προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου. Πραγματοποιείται διαβροχή των λιποσωμάτων με διάλυμα χιτοζάνης. Το συγκεκριμένο διάλυμα αποτελείται από ανάμιξη στερεής χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους με έναν βαθέως ευτηκτικό διαλύτη. Ο διαλύτης ο οποίος εξετάζεται στη συγκεκριμένη μελέτη είναι το NaDES βεταΐνης-γαλακτικού οξέος. Ο εν λόγω διαλύτης παρασκευάζεται με ανάμιξη των δύο συστατικών σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2. Ειδικότερα για τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, υδατικό διάλυμα γαλακτικού οξέος (80 %) και καθαρή βεταΐνη, ζυγίστηκαν οι ακόλουθες ποσότητες:

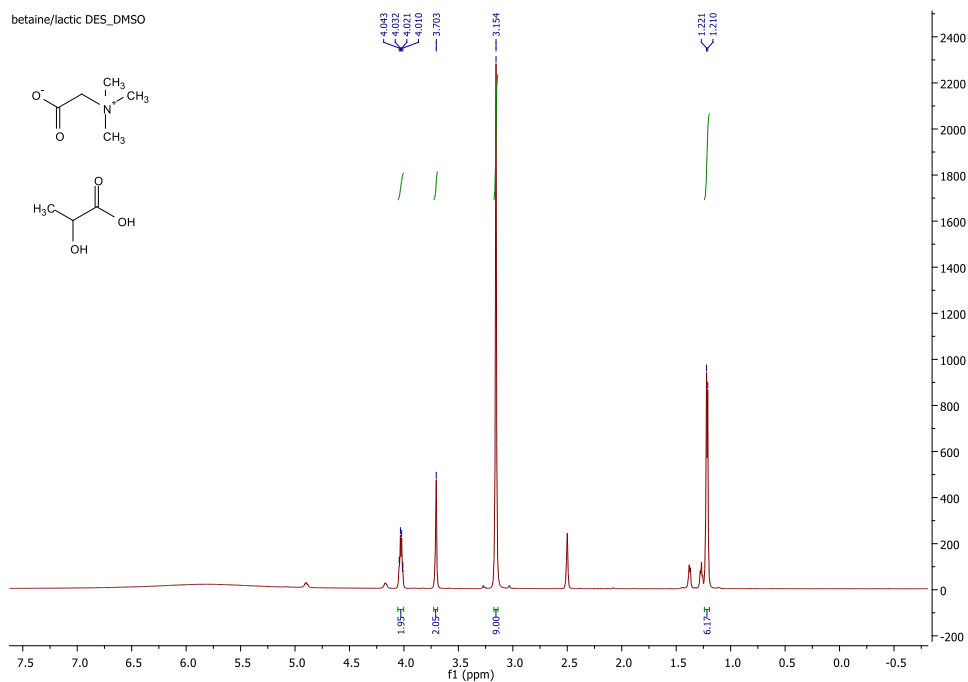


Τα αντιδραστήρια προστίθενται σε σφαιρική φιάλη των 100 ml και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση για 3 ώρες, υπό θέρμανση (40°C).



Σχήμα 17. Σύνθεση βαθέως ευτηκτικού διαλύτη

Για την επιβεβαίωση του σχηματισμού του συγκεκριμένου βαθέως ευτηκτικού διαλύτη, λήφθηκε φάσμα πυρηνικού συντονισμού $^1\text{H NMR}$, το οποίο διαφαίνεται ακολούθως.



Διάγραμμα 2. Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6)

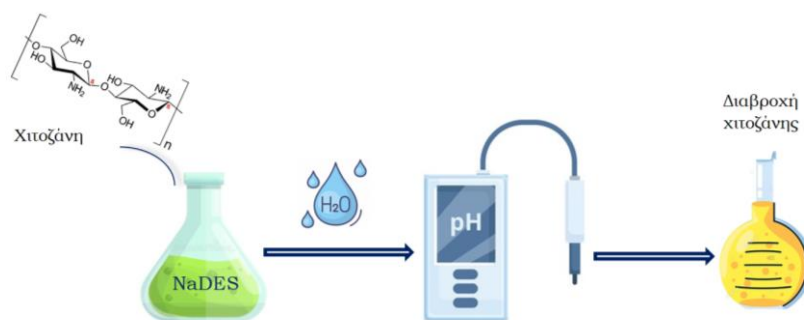
Στο φάσμα το οποίο διαφαινεται άνωθεν, εντοπίζονται τα πρωτόνια των δύο συστατικών του NaDES, βεταΐνη και γαλακτικό οξύ, τα οποία λόγω του αλειφατικού τους χαρακτήρα αναμένεται να βρίσκονται στα υψηλά πεδία. Στα 4.03 ppm παρατηρείται τετραπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J=6.6$ Hz, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, ένα για κάθε ομάδα μεθινίου (θέση 2b) σε κάθε μόριο γαλακτικού οξέος. Η απλή κορυφή στα 3.70 ppm που ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αντιστοιχεί στην ομάδα μεθυλενίου (θέση 1b) του μορίου βεταΐνης. Στα 3.15 ppm εντοπίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για εννέα πρωτόνια και αντιστοιχεί στα εννέα ισοδύναμα πρωτόνια των μεθυλίων του αζώτου (θέση 1c) της βεταΐνης. Η διπλή κορυφή στα 1.22 ppm με σταθερά σύζευξης $J=6.6$ Hz ολοκληρώνεται για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθύλιο του κάθε μορίου γαλακτικού οξέος. Καθώς τα πρωτόνια των υδροξυλίων είναι δεν είναι ιδιαίτερα προστατευμένα, παρουσιάζουν ευκινησία, με αποτέλεσμα την εμφάνιση χαμηλής έντασης κορυφή στην περιοχή (7-5ppm).



Εικόνα 22. Εργαστηριακή σύνθεση NaDES

Σύνθεση χιτοσωμάτων

Η σύνθεση των χιτοσωμάτων πραγματοποιείται με τη μέθοδο της ενυδάτωσης του λεπτού φιλμ (thin film hydration), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο των λιπιδίων. Για το σχηματισμό του περιβλήματος με χιτοζάνη πραγματοποιείται διαβροχή του σχηματιζόμενου φιλμ με διάλυμα χιτοζάνης, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:



Σχήμα 18. Ενυδάτωση λεπτού φιλμ με διάλυμα χιτοζάνης με χρήση βαθέως ευτηκτικού διαλύτη

- I. Σε κωνική φιάλη προσθέεται η χιτοζάνη με την επιθυμητή ποσότητα NaDES και αραιώνεται με υπερκάθαρο νερό.
- II. Εν συνεχεία ρυθμίζεται το pH του διαλύματος με διάλυμα 20 % w/v υδροξειδίου του νατρίου στο 5.8.
- III. Τέλος το παρασκευασθέν διάλυμα φιλτράρεται με χρήση φίλτρου Branchia 0.4 μm .

Παρατηρήσεις/σχόλια

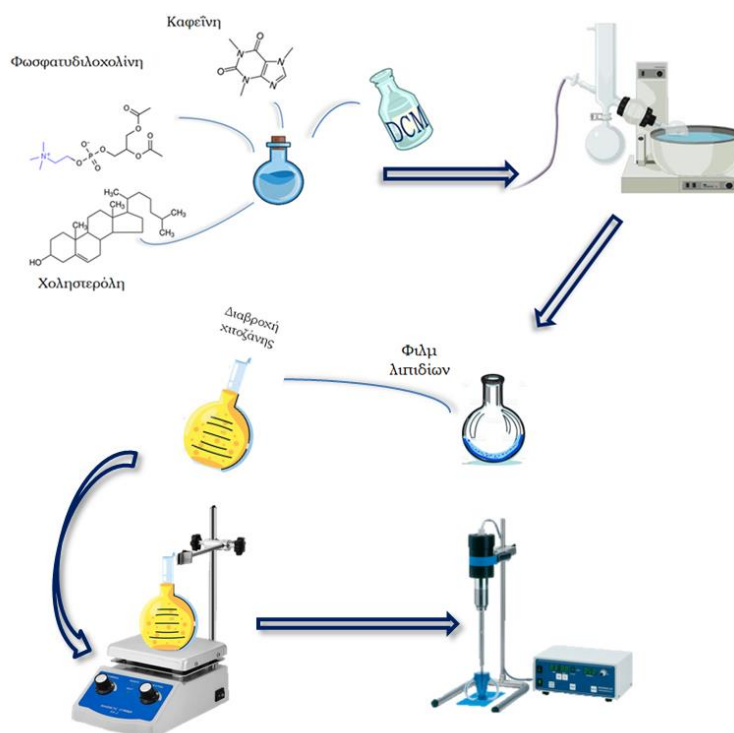
- Η ρύθμιση του pH αποτελεί απαραίτητο στάδιο της παρασκευής της διαβροχής καθώς για $\text{pH} > 6.5$ η χιτοζάνη καθιζάνει και σχηματίζει ίζημα. Αυτό οφείλεται στην παρουσία N-ακέτυλο ομάδων, οι οποίες παρουσιάζουν υδρόφοβη συμπεριφορά, οι οποίες δυσχεραίνουν τη διάλυση σε ουδέτερο διάλυμα.
- Το φιλτράρισμα εμποδίζει την είσοδο και πιθανό εγκλεισμό άλλων ουσιών στα σωματίδια, των οποίων ενδεχομένως επηρεάσει το μέγεθος και τη σταθερότητα.



Εικόνα 23. Εργαστηριακή σύνθεση χιτοσωμάτων

Τα χιτοσώματα παρασκευάστηκαν ως εξής:

- I. Ζύγιση 10 mg καφεΐνης, 85 mg φωσφατιδυλοχολίνης και 15 mg χοληστερόλης.
- II. Προσθήκη των αντιδραστηρίων σε σφαιρική φιάλη των 50 ml.
- III. Διάλυση με προσθήκη 10 ml μείγματος δικλωρομεθανίου/μεθανόλης σε αναλογία 3/2, (DCM: 6 ml, MeOH: 4ml) και ανάδευση σε vortex.
- IV. Εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό αναδευτήρα rotary, υπό θέρμανση στους 60°C,
- V. Πλήρης απομάκρυνση του διαλύτη σε αντλία κενού Edwards, μετά από παραμονή για 3 ώρες.
- VI. Διαβροχή με παρασκευασθέν διάλυμα χιτοζάνης και προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας επιφανειοδραστικού tween 80.
- VII. Έντονη ανάδευση του διαλύματος (600 rpm) σε θερμαινόμενη πλάκα για 1 ώρα στους 40°C.
- VIII. Υπερήχηση του διαλύματος με probe, σε 18% δυναμικότητα για 5 λεπτά.
- IX. Ολονύκτια αποθήκευση της διασποράς στο ψυγείο.



Σχήμα 19. Σύνθεση χιτοσωμάτων

Παρατηρήσεις/Σχόλια

- Η θερμοκρασία στις διαδικασίες θέρμανσης δεν θα πρέπει να ξεπεράσει τους 60°C, καθώς υπάρχει κίνδυνος υποβάθμισης της χιτοζάνης.
- Πέρα από τις ποσότητες των λιπιδίων χοληστερόλη και φωσφατυδιλοχολίνη, δεν αναφέρονται: η ποσότητα χιτοζάνης, περιεκτικότητα NaDES, ποσότητα tween 80 καθώς σε κάθε πείραμα διαφέρουν και υπολογίζονται με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό Box Behken, ο οποίος και θα αναλυθεί εκτενέστερα στην παράγραφο των αποτελεσμάτων.

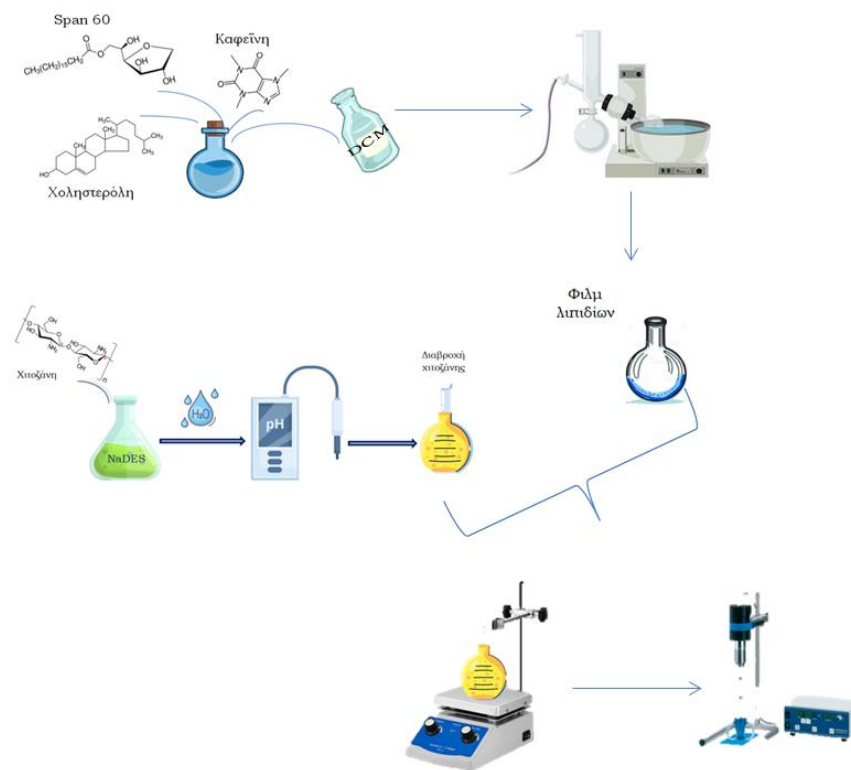
Σύνθεση νιοσωμάτων

Στην παρούσα εργασία πέρα από τα συμβατικά λιποσώματα, τα αναβαθμισμένα χιτοσώματα, μελετήθηκαν και τα καινοτόμα νιοσώματα. Τα νιοσώματα αναπτύχθηκαν και αυτά με τη μέθοδο της ενυδάτωσης λεπτού φιλμ και η κύρια διαφορά έγκειται στα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, όπου αντί της φωσφατιδυλοχολίνης χρησιμοποιήθηκε το επιφανειοδραστικό Span 60 και όχι Tween 80 σε μεταγενέστερο στάδιο.

Τα νιοσώματα παρασκευάστηκαν ως εξής:

- I. Ζύγιση 10 mg καφεΐνης, 100 mg χοληστερόλης και της επιθυμητής ποσότητας Span 60.
- II. Προσθήκη των αντιδραστηρίων σε σφαιρική φιάλη των 50 ml.
- III. Διάλυση με προσθήκη 10 ml μείγματος δικλωρομεθανίου/μεθανόλης σε αναλογία 3/2, (DCM: 6 ml, MeOH: 4ml) και ανάδευση σε vortex.
- IV. Εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό αναδευτήρα rotary, υπό θέρμανση στους 60°C,
- V. Πλήρης απομάκρυνση του διαλύτη σε αντλία κενού Edwards, μετά από παραμονή για 3 ώρες.
- VI. Διαβροχή με παρασκευασθέν διάλυμα χιτοζάνης.
- VII. Έντονη ανάδευση του διαλύματος (600 rpm) σε θερμαινόμενη πλάκα για 1 ώρα στους 40°C.
- VIII. Υπερήχηση του διαλύματος με probe, σε 30% δυναμικότητα για 5 λεπτά.
- IX. Ολονύκτια αποθήκευση της διασποράς στο ψυγείο.

Ακολούθως διαφαίνεται συνοπτικά η πορεία σχηματισμού των νιοσωμάτων.



Σχήμα 20. Σύνθεση νιοσωμάτων

Για τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς PDI και του ζ-δυναμικού χρησιμοποιήθηκε δυναμική σκέδαση φωτός, DLS, ενώ για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των διασπορών των σωματιδίων και προσδιορίστηκε έμμεσα μέσω της απορρόφησης σε όργανο UV-Vis. Ακόμη πραγματοποιήθηκε, έλεγχος δομής με δισκιοποίηση και μέτρηση σε FT-IR καθώς και μελέτη απελευθέρωσης της εγκλεισμένης καφεΐνης (release).



Εικόνα 24. Λυοφιλωμένα νιοσώματα και χιτοσώματα

Αποτελέσματα-Συζήτηση

Μέγεθος, PDI και ΕΕ% χιτοσωμάτων

Η παρούσα μελέτη έχει ως απώτερο σκοπό τη βελτιστοποίηση του μεγέθους των σωματιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς καθώς και τη μεγιστοποίηση της απόδοσης εγκλεισμού ΕΕ%. Οι παράμετροι υπό εξέταση διαφαινούνται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 10. Παράμετροι υπό μελέτη προς βελτιστοποίηση συγκεκριμένων αποκρίσεων των χιτοσωμάτων

Χιτοσώματα	
<u>Παράμετροι</u>	<u>Αποκρίσεις</u>
Περιεκτικότητα CS (w/v)	Μέγεθος σωματιδίων
Περιεκτικότητα NaDES (v/v)	Δείκτης πολυδιασποράς
Περιεκτικότητα Tween 80 (w/v)	Απόδοση εγκλεισμού ΕΕ%

Για τον υπολογισμό των αναλογιών και κατάστρωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Design Expert, όπου και πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός Box Behken 3x3. Αρχικά τοποθετούνται άνω και κάτω όρια για τις παραμέτρους καθώς και τιμές βελτιστοποίησης των αποκρίσεων. Ακολουθώς διαφαινούνται αυτές οι οριοθετήσεις:

Πίνακας 11. Οριοθέτηση παραμέτρων χιτοσωμάτων

Factor	Units	Minimum	Maximum	Coded Low	Coded High	Mean	Std. Dev.
NADES	% v/v	2.00	5.00	-1 ↔ 2.00	+1 ↔ 5.00	3.50	1.13
CS	% w/v	0.30	0.70	-1 ↔ 0.30	+1 ↔ 0.70	0.50	0.15
TWEEN 80	% w/v	0.50	2.00	-1 ↔ 0.50	+1 ↔ 2.00	1.25	0.56

Στόχος είναι η μεγιστοποίηση της απόδοσης εγκλεισμού ΕΕ%, η προσέγγιση της τιμής 0.3 για το δείκτη πολυδιασποράς με όρια τις τιμές 0.2 και 0.6 καθώς και η ελαχιστοποίηση του μεγέθους των σωματιδίων με όρια τις τιμές 150 και 400 nm. Ακολουθεί πίνακας με τις τιμές των παραμέτρων των προτεινόμενων πειραμάτων, οι οποίες προέκυψαν μέσω του Design Expert.

Πίνακας 12. Προβλεπόμενα πειράματα για τη σύνθεση των χιτοσωμάτων

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Run	A:NADES	B:CS	C:TWEEN 80
	% v/v	% w/v	% w/v
1	3.5	0.5	1.25
2	5	0.5	0.5
3	2	0.5	0.5

4	5	0.7	1.25
5	3.5	0.7	2
6	5	0.5	2
7	2	0.3	1.25
8	2	0.7	1.25
9	3.5	0.5	1.25
10	3.5	0.7	0.5
11	3.5	0.3	0.5
12	3.5	0.3	2
13	2	0.5	2
14	5	0.3	1.25
15	3.5	0.5	1.25



Εικόνα 25. Λυοφιλωμένα χιτοσώματα με βάση τις αναλογίες του πειραματικού σχεδιασμού

Παράλληλα με τον υπολογισμό του μεγέθους και του δείκτη πολυδιασποράς PDI υπολογίστηκαν και οι αντίστοιχες τιμές του ζ-δυναμικού. Μετά το πέρας του σχηματισμού των σωματιδίων με τη μέθοδο ενυδάτωσης του λεπτού φιλμ, σύμφωνα με τις αναλογίες που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό, ακολούθησε προετοιμασία των δειγμάτων για μέτρηση με το DLS. Από τη διασπορά των σωματιδίων πάρθηκε ποσότητα 10 μ l, τα οποία αραιώθηκαν με 10 ml υπερκάθαρο νερό. Στη συνέχεια ακολούθησε χρήση υπερήχων (120 W) για 3 λεπτά, η οποία βοηθά στο να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των σωματιδίων.

Παρατηρήσεις/Σχόλια

- Η αραιώση του δείγματος πραγματοποιείται για να υπάρξει μεγαλύτερη ομοιομορφία και συνεπώς ακρίβεια υπολογισμού του μεγέθους των σωματιδίων.
- Χρησιμοποιείται υπερκάθαρο νερό ώστε να έχει ιδιαίτερα χαμηλή αγωγιμότητα και επομένως και περιεχόμενα ιόντα τα οποία επηρεάζουν τον υπολογισμό του ζ-δυναμικού.
- Η υπερήχηση με τη μέθοδο του probe περιλαμβάνει τη βύθιση της κωνικής φιάλης, η οποία περιείχε τα σωματίδια, σε παγόλουτρο με σκοπό την αποφυγή ανάπτυξης υψηλών θερμοκρασιών και ενδεχόμενη υποβάθμιση των σωματιδίων.

Τα περισσότερα διαγράμματα τα οποία προέκυψαν με τη χρήση του οργάνου DLS συμπεριλαμβάνονται στο παράρτημα.

Όπως διαφαίνεται στα διαγράμματα 71,72,73,74 του παραρτήματος, τα σωματίδια αποκτούν μέγεθος της κλίμακας νάνο, άρα υπάρχει επιτυχής Παρασκευή νανοσωματιδίων, με αποδεκτό δείκτη πολυδιασποράς. Ο PDI δεν είναι βέλτιστος και αυτό αποδίδεται σε διαφορετικού μεγέθους σωματίδια, τα οποία απεικονίζονται ως δυο διαφορετικές οικογένειες, με τη μία να κυριαρχεί και να αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της κατανομής. Οι τιμές του PDI, υποδηλώνουν μία τάση συσσωμάτωσης. Το ζ-δυναμικό όμως βρέθηκε >5 mV σε όλα τα πειράματα ενώ σε μερικά προσέγγισε την τιμή 30 mV, γεγονός το οποίο υποδεικνύει σταθερότητα των σωματιδίων.

Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα 69,70,73,74 τα συμβατικά λιποσώματα έναντι των χιτοσωμάτων έχουν μικρότερο μέγεθος. Η αύξηση της υδροδυναμικής διαμέτρου οφείλεται στο περιβλήμα της χιτοζάνης, το οποίο και αποτελεί ένδειξη επιτυχούς δημιουργίας του. Επιπρόσθετα όσον αφορά το ζ-δυναμικό παρατηρήθηκε αλλαγή προσήμου, το οποίο είναι αρνητικό για τα συμβατικά λιποσώματα και θετικό στα χιτοσώματα λόγω του θετικού φορτίου της χιτοζάνης. Τόσο το μέγεθος όσο και το ζ-δυναμικό υποδεικνύουν τον επιτυχή σχηματισμό χιτοσωμάτων, ο οποίος θα επιβεβαιωθεί και στη συνέχεια μέσω των φασμάτων FT-IR.

Η απόδοση εγκλεισμού υπολογίζεται μέσω της ακόλουθης εξίσωσης:

$$\text{Απόδοση εγκλεισμού EE\%} = \frac{\text{μάζα ουσίας που εγκλείστηκε (mg)}}{\text{αρχική μάζα ένωσης (mg)}} * 100\%$$

Η μάζα της ουσίας που εγκλείστηκε δύναται να υπολογισθεί είτε άμεσα είτε έμμεσα. Ο άμεσος προσδιορισμός απαιτεί λύση των σωματιδίων και είναι καταστρεπτική μέθοδος. Ο έμμεσος προσδιορισμός βασίζεται στον υπολογισμό της μάζας της ένωσης η οποία δεν εγκλείστηκε. Η ποσότητα της καφεΐνης η οποία δεν εγκλείστηκε απαιτεί την ακόλουθη προετοιμασία. Αρχικά η διασπορά των σωματιδίων υφίστανται λυοφιλοποίηση, ώστε να παρθούν σε ξηρή μορφή.

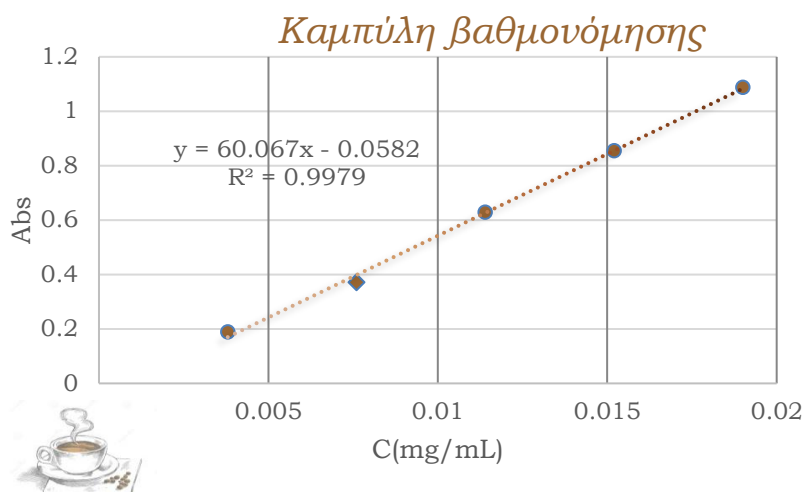
Εν συνεχεία τα σωματίδια επαναδιαλύονται με 20 ml υπερκάθαρου νερού και φυγοκεντρούνται. Η φυγοκέντρωση πραγματοποιείται με χρήση υπερφυγοκέντρου και ρυθμίζεται στις 25000 στροφές το λεπτό (rpm), στους 4°C για 40 λεπτά. Μετά το πέρας της διαδικασίας σχηματίζεται ίζημα στο πάτο του σωλήνα, αποτελούμενο από τα χιτοσώματα και μία υδατική φάση, υπερκείμενο υγρό το οποίο αποτελείται από νερό και τη μη εγκλεισμένη καφεΐνη. Το ίζημα επαναδιασπείρεται με υπερκάθαρο νερό, και επαναλαμβάνεται η διαδικασία δις. Τα υπερκείμενα υγρά συλλέγονται και μη τη χρήση του οργάνου UV-Vis, υπολογίζεται η ποσότητα της μη εγκλεισμένης καφεΐνης.

Για τον υπολογισμό της ποσότητας της καφεΐνης υπολογίζονται οι αντίστοιχες απορροφήσεις από τα υπερκείμενα υγρά. Η καφεΐνη απορροφά στα 273 nm, όμως μετά από μετρήσεις βρέθηκε πως και το διάλυμα NaDES βεταΐνης-γαλακτικού απορροφά σε παραπλήσιο μήκος κύματος, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ξεκάθαρο φάσμα το οποίο θα ταυτοποιεί την ύπαρξη της καφεΐνης. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος παρασκευάσθηκε τυφλό διάλυμα blank με την εκάστοτε περιεκτικότητα του πράσινου διαλύτη προς κατασκευή base line. Το υπερκείμενο υγρό το οποίο φωτομετρήθηκε αραιώθηκε όχι με νερό όπως συνηθίζεται αλλά με το αντίστοιχο blank διάλυμα. Μετά από μετρήσεις παρατηρήθηκε πως με την πρώτη φυγοκέντρωση ξεπλαιίνεται η μεγαλύτερη ποσότητα της μη εγκλεισμένης καφεΐνης και επομένως δεν χρειάζεται ο υπολογισμός των απορροφήσεων από τις επόμενες εκπλύσεις. Ακόμη φωτομετρήθηκαν διαλύματα διαφορετικών γνωστών συγκεντρώσεων καφεΐνης με σκοπό τη δημιουργία καμπύλης συσχέτισης συγκέντρωσης με απορρόφηση, η οποία καθιστά δυνατή την ποσοτικοποίηση. Για τις ακόλουθες συγκεντρώσεις κατγράφησαν οι εξής απορροφήσεις:

Πίνακας 13. Συγκεντρώσεις και αντίστοιχες απορροφήσεις διαλυμάτων καφεΐνης

<i>C(mg/mL)</i>	<i>abs</i>
0.0190	1.0879
0.0152	0.8554
0.0114	0.6295
0.0076	0.3712
0.0038	0.1887

Ακολουθεί και το αντίστοιχο διάγραμμα



Διάγραμμα 3. Καμπύλη συσχέτισης και απορρόφησης καφεΐνης συγκέντρωσης

Με τη μέθοδο των ελαχίστων των τετραγώνων προκύπτει η εξίσωση της ευθείας που συσχετίζει την απορρόφηση με τη συγκέντρωση. Η προκύπτουσα εξίσωση, η οποία να χρησιμοποιηθεί για αντιστοίχιση των απορροφήσεων με τις συγκεντρώσεις είναι η εξής:

$$\text{Συγκέντρωση καφεΐνης (mg/ml)} = 60.067 * \text{Απορρόφηση (abs)} - 0.0582$$

Η συγκέντρωση της καφεΐνης υπολογίζεται μέσω του νόμου αραιώσης του Ostwald : $C_1V_1=C_2V_2$, καθώς το διάλυμα έχει αραιωθεί, 50 μl του εκάστοτε δείγματος με 1350 μl του blank αντίστοιχης ποσότητας NaDES. Αφού υπολογισθούν οι επιμέρους συγκεντρώσεις υπολογίζονται και οι αντίστοιχες μάζες της καφεΐνης (πολλαπλασιάζοντας με 20, εφόσον η αρχική αραιώση έγινε με χρήση 20 ml νερού).

Η μάζα της εγκλεισμένης καφεΐνης υπολογίζεται ως εξής:

$$m \text{ εγκλεισμένης καφεΐνης} = m \text{ καφεΐνης αρχική} - m \text{ καφεΐνης που δεν εγκλείστηκε}$$

Η αρχική μάζα της καφεΐνης είναι αυτή η οποία ζυγίστηκε και η μάζα καφεΐνης η οποία δεν εγκλείστηκε υπολογίστηκε με βάση τις απορροφήσεις.

Ακολούθως συνοψίζονται όλες οι αποκρίσεις, συμπεριλαμβανόμενης και της εκάστοτε απόδοσης εγκλεισμού EE% για όλες τις διαφορετικές αναλογίες συστατικών των σωματιδίων.

Πίνακας 14. Παράγοντες μελέτης χιτοσωμάτων και αντίστοιχες αποκρίσεις

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response 1	Response 2	Response 3
Run	<u>A:NADES</u>	<u>B:CS</u>	<u>C:TWEEN 80</u>	<u>Size</u>	<u>PDI</u>	<u>EE</u>
	% v/v	% w/v	% w/v	nm		%
1	3.5	0.5	1.25	393.2	0.642	63
2	5	0.5	0.5	353.8	0.738	69
3	2	0.5	0.5	227.3	0.544	30
4	5	0.7	1.25	360.8	0.539	54


5	3.5	0.7	2	387.5	0.643	77
6	5	0.5	2	392.9	0.614	36
7	2	0.3	1.25	549.4	0.626	31
8	2	0.7	1.25	462.8	0.641	24
9	3.5	0.5	1.25	259	0.566	31
10	3.5	0.7	0.5	364.8	0.533	42
11	3.5	0.3	0.5	369.8	0.640	56
12	3.5	0.3	2	413.5	0.603	51
13	2	0.5	2	365.8	0.651	50
14	5	0.3	1.25	312.2	0.596	77
15	3.5	0.5	1.25	266.2	0.539	54

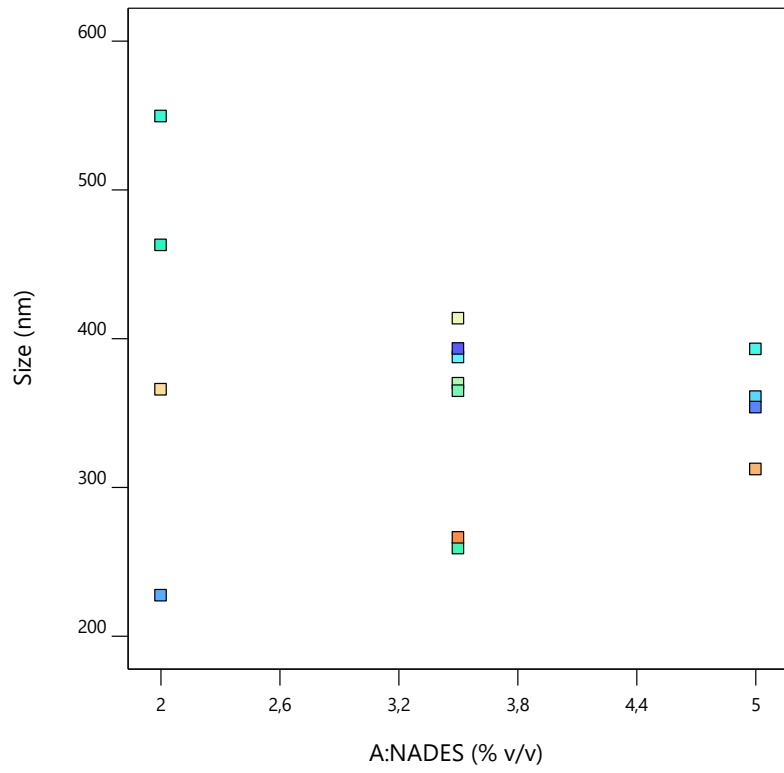
Όπως φαίνεται και από το συγκεντρωτικό πίνακα επιτεύχθηκαν αρκετά υψηλές αποδόσεις εγκλεισμού, με μέγιστη τιμή 77% και με μέση τιμή 49%. Μέσο μέγεθος σωματιδίων προέκυψε 365.3 nm και μέση τιμή δείκτη πολυδιασποράς PDI 0.607. Για τις ευρεθείσες τιμές πραγματοποιείται βελτιστοποίηση των παραμέτρων (συγκέντρωση NaDES, CS, Tween 80).

Με χρήση του Design Expert δοκιμάζονται μοντέλα και με βάση τη σημαντικότητα των παραμέτρων του κάθε μοντέλου για την κάθε παράμετρο επιλέγεται το κατάλληλο.

Μέγεθος χιτοσωμάτων

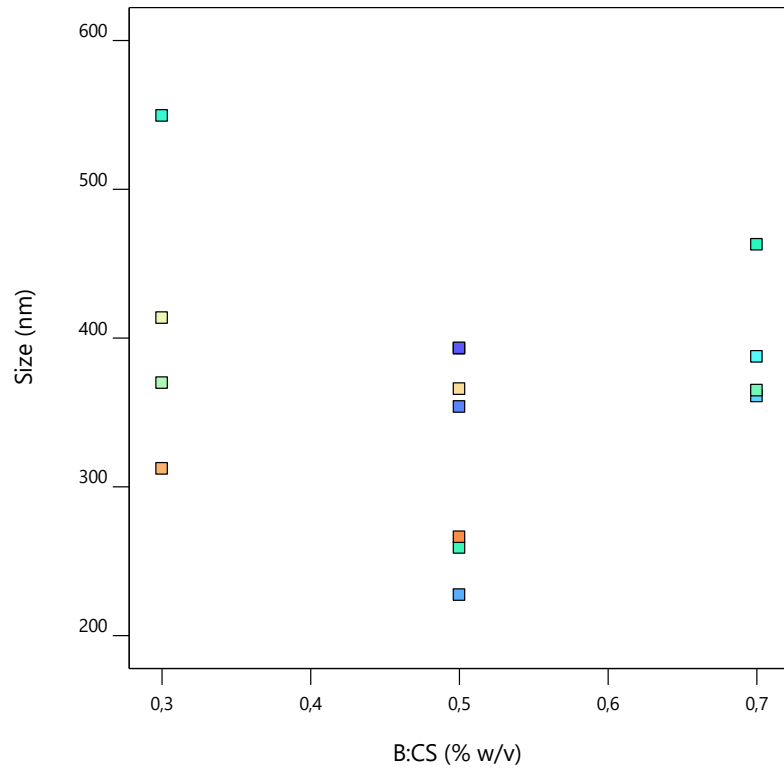
Αρχικά αναλύεται η επίδραση της περιεκτικότητας των ανεξάρτητων μεταβλητών, NaDES (%v/v), CS (%w/v) και Tween 80(%w/v) στο μέγεθος των χιτοσωμάτων.

Correlation: -0,218
Color points by
Run
1  15



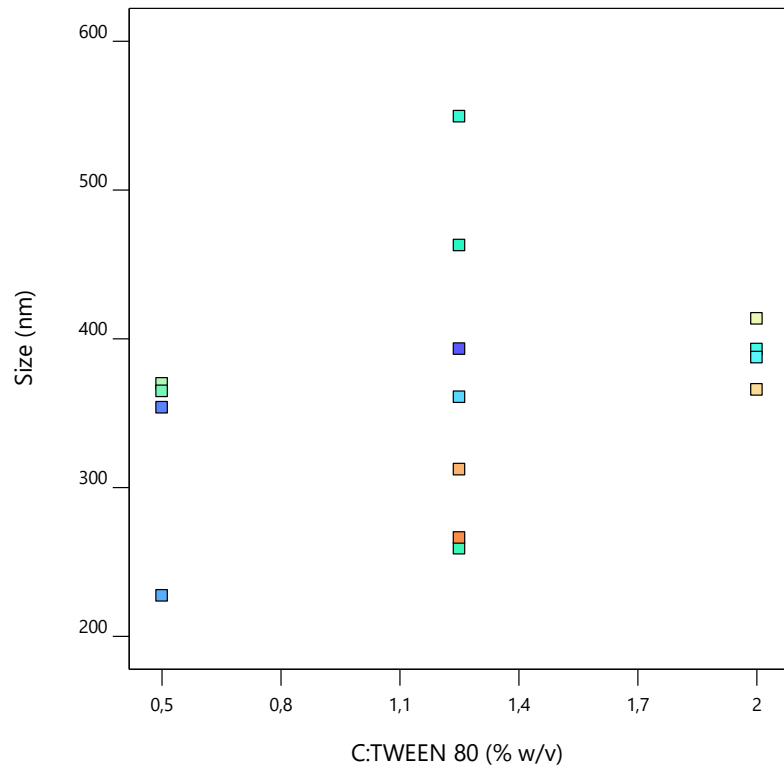
Διάγραμμα 4. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με το μέγεθος των σωματιδίων

Correlation: -0,081
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 5. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης με το μέγεθος των σωματιδίων

Correlation: 0,286
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 6. Συσχέτιση περιεκτικότητας Tween 80 με το μέγεθος των σωματιδίων

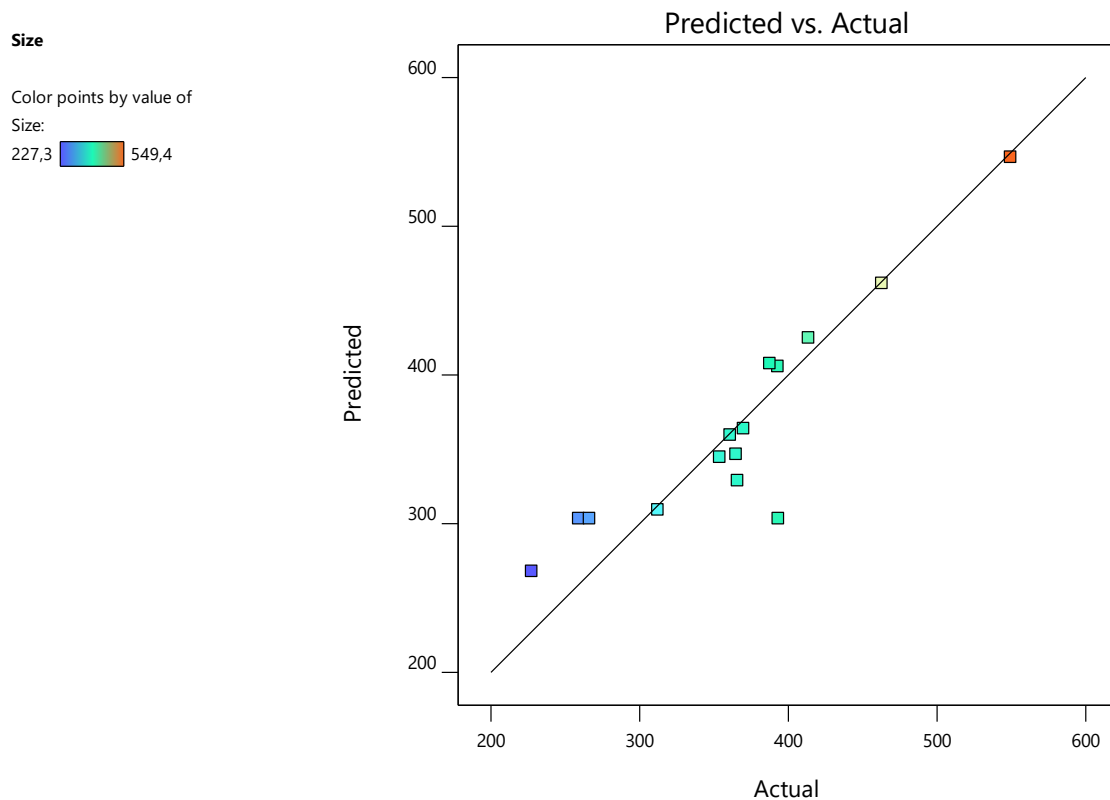
Με βάση τα διαγράμματα αποτυπώνεται η συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας NaDES, χιτοζάνης και Tween 80 με το μέγεθος των σωματιδίων. Παρατηρείται πως για χαμηλότερη συγκέντρωση NaDES 2% v/v, τα μεγέθη των σωματιδίων είναι μεγαλύτερα και πιο ανομοιόμορφα κατανομημένα, ενώ για υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρείται ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων. Η αύξηση της περιεκτικότητας της χιτοζάνης αρχικά οδηγεί σε μείωση του μεγέθους και εν συνεχεία σε αύξηση. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ιδιότητα της χιτοζάνης να δημιουργεί σταθερότερα σωματίδια και επομένως να μειώνει την τάση συσσωμάτωσης άρα και το μέγεθος μέχρι μία κρίσιμη τιμή, όπου πλέον δημιουργείται αρκετά μεγαλύτερου πάχους περίβλημα, το οποίο οδηγεί τελικά σε αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων. Όσον αφορά το επιφανειοδραστικό Tween 80 παρατηρείται πως σε χαμηλότερη περιεκτικότητα δημιουργούνται μικρότερου μεγέθους σωματίδια, ενώ για μέση τιμή παρατηρείται διασπορά του μεγέθους. Με βάση αυτά τα αρχικά διαγράμματα, συμπεραίνεται πως η μεγαλύτερη περιεκτικότητα NaDES, 5% v/v και η μέση τιμή χιτοζάνης, 0.5 % w/v οδηγούν στη δημιουργία μικρότερου μεγέθους σωματιδίων, το οποίο είναι και επιθυμητό.

Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου αρχικά ελέγχεται ο λόγος των δύο ακραίων τιμών που λαμβάνει το μέγεθος των σωματιδίων:

$$\lambda = \frac{\text{μέγιστη τιμή μεγέθους σωματιδίων}}{\text{ελάχιστη τιμή μεγέθους σωματιδίων}} = \frac{549.4}{249.3} = 2.42 < 10$$

Εφόσον ο συγκεκριμένος λόγος έχει τιμή μικρότερη του 10 δεν απαιτείται καμία μετατροπή (λογαρίθμηση, δύναμη, ρίζα).

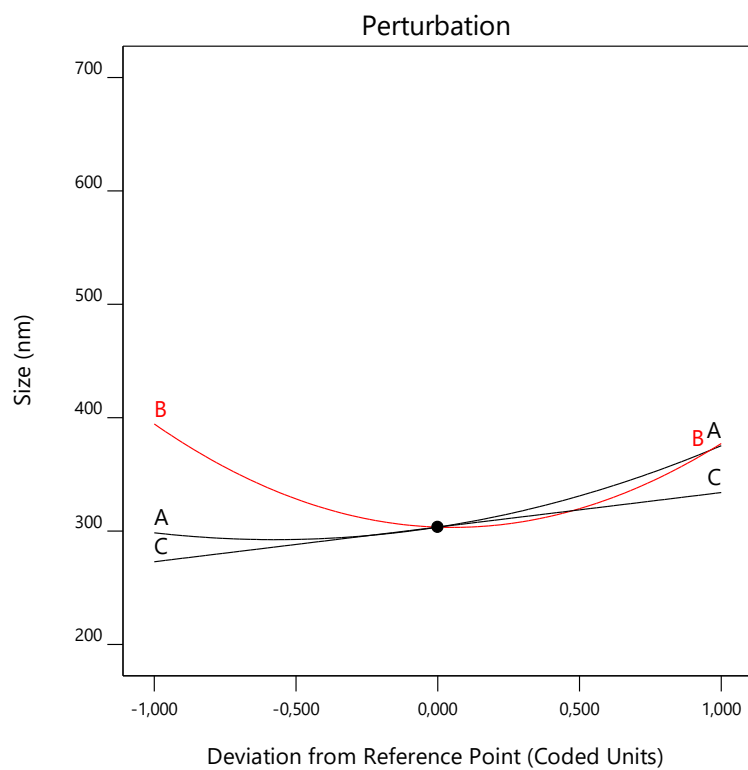
Ακολουθεί στατιστική ανάλυση ANOVA, όπου και εξετάζεται η σημαντικότητα των ανεξάρτητων μεταβλητών καθώς και πεπλεγμένων όρων αυτών. Το μέγεθος των σωματιδίων περιγράφεται καλύτερα από το τροποποιημένο κυβικό μοντέλο (cubic model). Οι όροι οι οποίοι το αποτελούν οφείλουν να έχουν p value < 0.05 για να θεωρούνται σημαντικοί καθώς και το ίδιο το μοντέλο να παρουσιάζει αποδεκτή τιμή p value. Για το επιλεγμένο μοντέλο προέκυψε p value = 0.0273 < 0.5, f value = 4.83, ενώ η έλλειψη προσαρμογής (lack of fit) προέκυψε ίση με 0.9624 > 0.05, δηλαδή η μη προσαρμογή στο μοντέλο οφείλεται κατά 96.24% σε θόρυβο και επομένως δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντική (το επιθυμητό είναι το p value του lack of fit να μην είναι σημαντικό). Συνεπώς με βάση τα κριτήρια των τιμών p value, f value, το μοντέλο μπορεί να περιγράψει καλά τη συσχέτιση των ανεξάρτητων μεταβλητών με το μέγεθος των σωματιδίων. Το R² λαμβάνει την τιμή 0.8284, η οποία υποδηλώνει σχετικά καλή προσαρμογή ενώ προέκυψε Adjusted R² = 0,6568 και Predicted R² = 0,5582. Η διαφορά Adjusted R² - Predicted R² = 0,0986 < 0.2 και επομένως το μοντέλο έχει καλή προβλεψιμότητα. Οι προβλεπόμενες τιμές μεγεθών και αυτές οι οποίες υπολογίστηκαν με τη χρήση του DLS συσχετίζονται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 7. Πραγματικές τιμές μεγέθους σωματιδίων και προβλεπόμενες από το μοντέλο

Factor Coding: Actual

Actual Factors
 A: NADES = 3,5
 B: CS = 0,5
 C: TWEEN 80 = 1,25



Διάγραμμα 8. Επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο μέγεθος των σωματιδίων

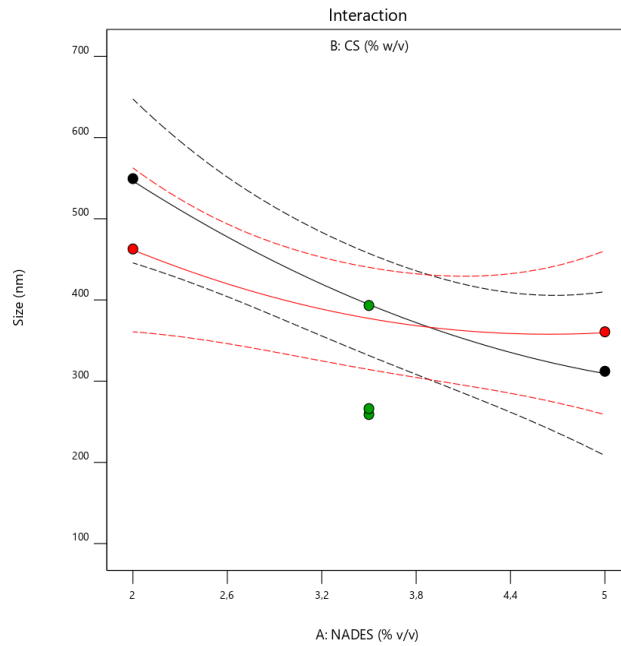
Όπως διαφαίνεται και στο διάγραμμα άνωθεν, ο παράγοντας της χιτοζάνης επηρεάζει περισσότερο το μέγεθος των σωματιδίων.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 - - 95% CI Bands

X1 = A: NADES
 X2 = B: CS

Actual Factor
 C: TWEEN 80 = 1,25

B- 0,3
 B+ 0,7



Διάγραμμα 9. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και χιτοζάνης ως προς το μέγεθος των σωματιδίων

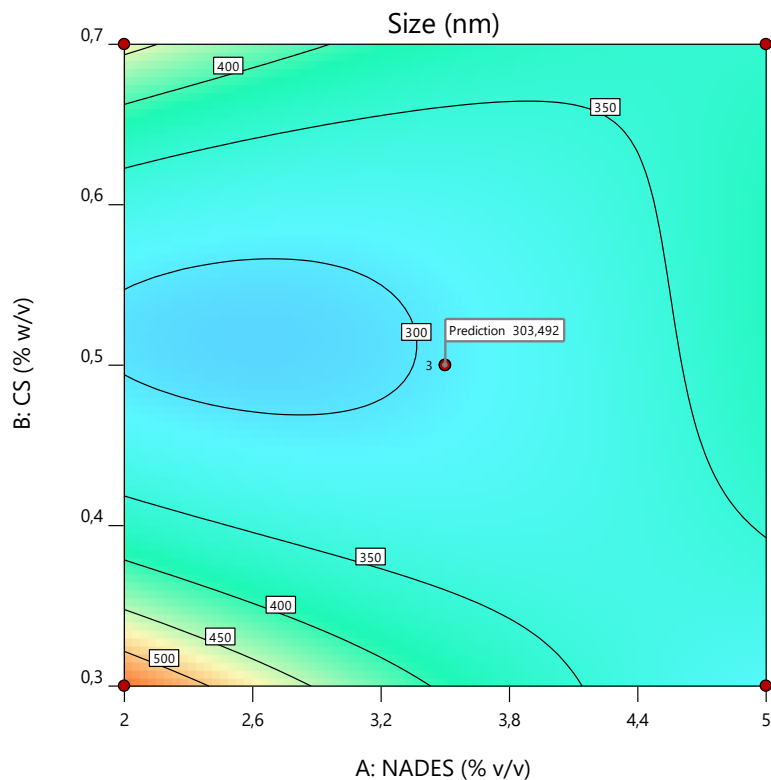
Στο διάγραμμα παρατηρείται πως η περιεκτικότητα της χιτοζάνης και του NaDES αλληλεπιδρούν και επομένως η ξεχωριστή μελέτη τους δεν έχει νόημα.

Factor Coding: Actual

● Design Points
 227,3 549,4

X1 = A: NADES
 X2 = B: CS

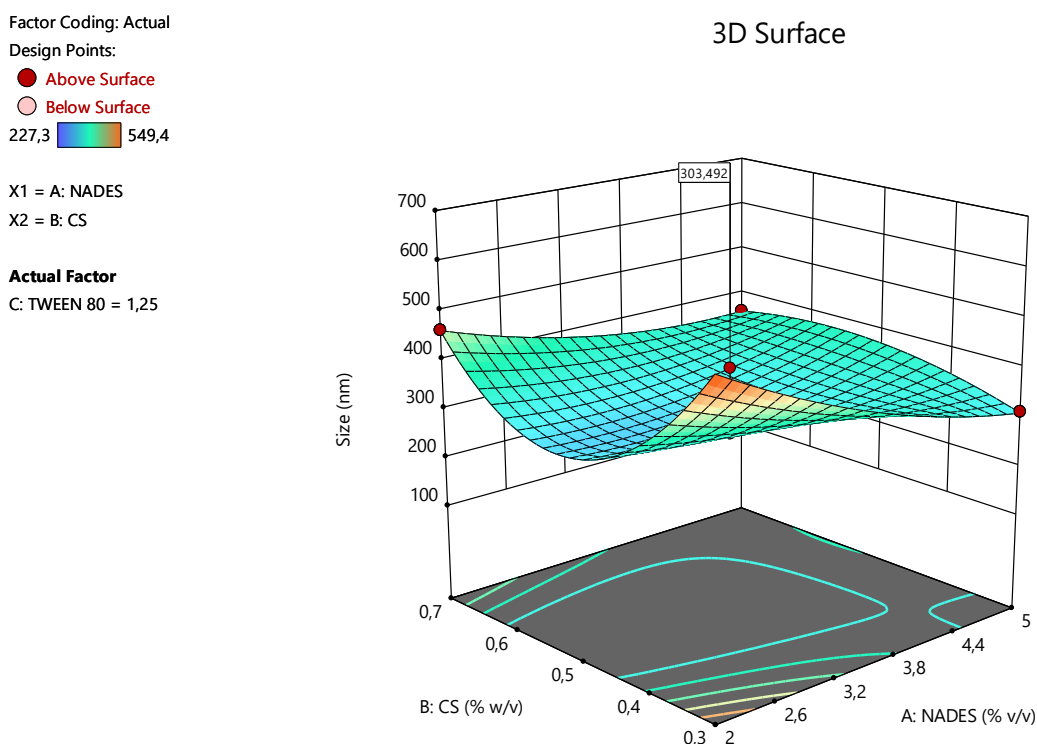
Actual Factor
 C: TWEEN 80 = 1,25



Διάγραμμα 10. Συσχέτιση μεγέθους σωματιδίων και περιεκτικότητας NaDES, CS

Το παραπάνω διάγραμμα επιτρέπει τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων για συγκεκριμένη περιεκτικότητα Tween 80=1.25% w/v. Για παράδειγμα ο συνδυασμός 3.5% v/v NaDES και 0.5% w/v CS, αναμένεται να δημιουργήσει σωματίδια 303.5 nm έναντι της τιμής 393.2 nm, η οποία υπολογίστηκε. Για άλλα ζεύγη τιμών το μοντέλο παρουσιάζει μικρότερη ή μεγαλύτερη ακρίβεια, εντός των ορίων του σφάλματος.

Το διάγραμμα που ακολουθεί συνοψίζει το επιλεγμένο μοντέλο και καθιστά δυνατό τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων.

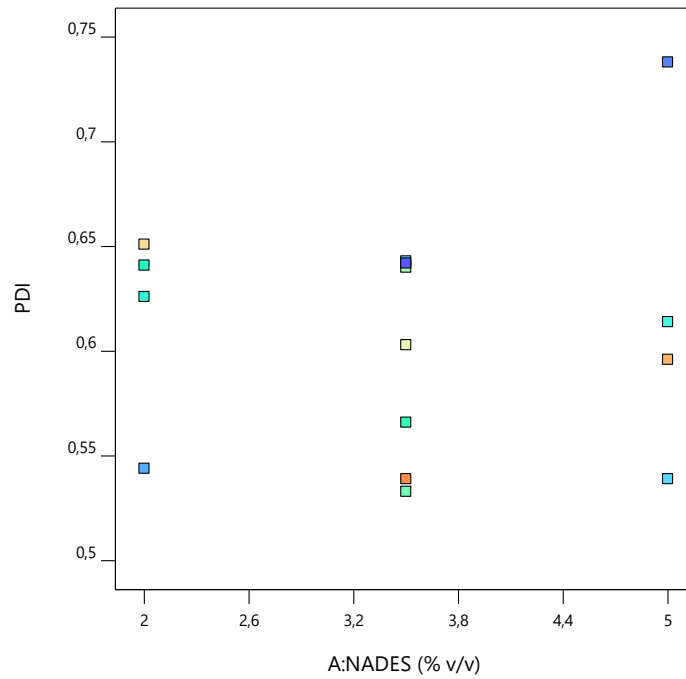


Διάγραμμα 11. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES,CS, Tween 80 με το μέγεθος των σωματιδίων.

Δείκτης πολυδιασποράς PDI των χιτοσωμάτων

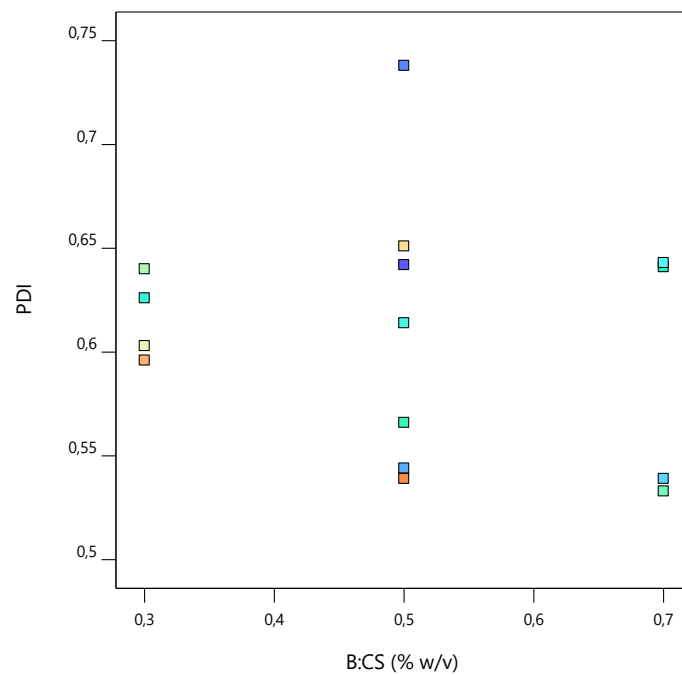
Ακολουθείται η ίδια διαδικασία ανάλυσης των ανεξάρτητων μεταβλητών ως προς την απόκριση του δείκτη πολυδιασποράς PDI.

Correlation: 0,042
Color points by
Run
1 15



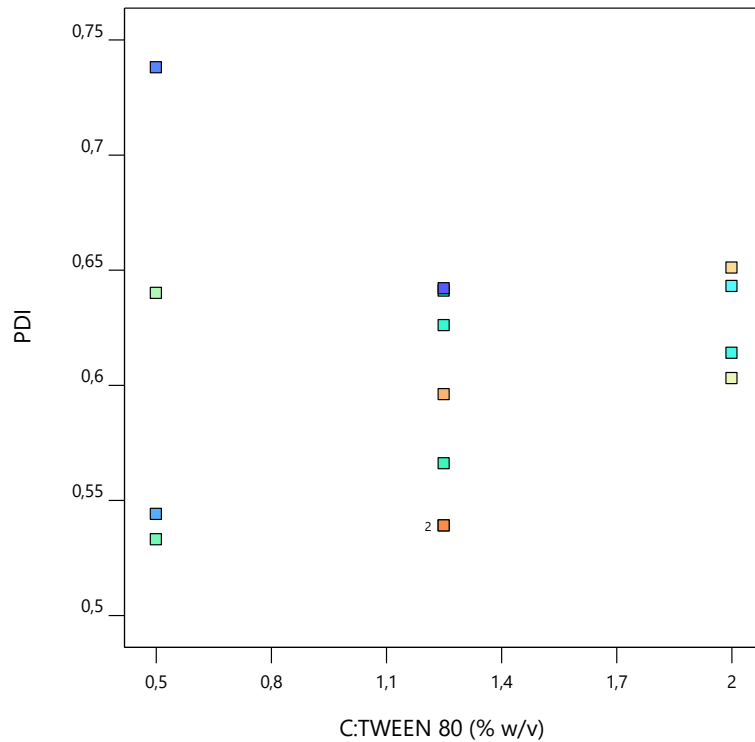
Διάγραμμα 12. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων

Correlation: -0,182
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 13. Συσχέτιση περιεκτικότητας CS με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων

Correlation: 0,094
 Color points by
 Run
 1 15



Διάγραμμα 14. Συσχέτιση περιεκτικότητας Tween 80 με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων

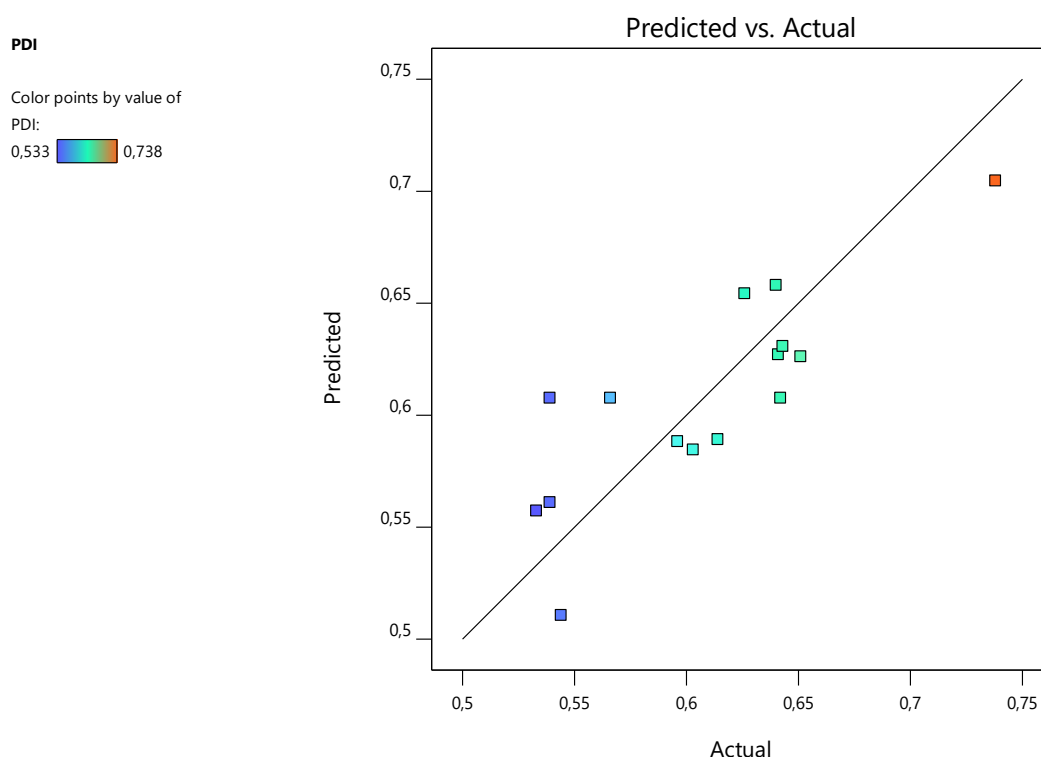
Με βάση τα διαγράμματα αποτυπώνεται η συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας NaDES, χιτοζάνης και Tween 80 με τον δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων. Παρατηρείται πως για περιεκτικότητα NaDES ίση με 3.5% v/v, ο δείκτης πολυδιασποράς είναι μικρότερος, ενώ για υψηλή περιεκτικότητα ίση με 5%, οι τιμές κατανέμονται ανομοιόμορφα. Για μικρότερες περιεκτικότητες χιτοζάνης, παρατηρείται μικρότερος δείκτης πολυδιασποράς, γεγονός το οποίο πιθανώς οφείλεται σε πιο ομοιόμορφη διαβροχή των σωματιδίων, ενώ για μέση τιμή περιεκτικότητας ίση με 0.5% w/v, παρατηρείται τόσο η ελάχιστη όσο και η μέγιστη τιμή που λαμβάνει ο δείκτης, γεγονός το οποίο υποδεικνύει συσχέτιση και με άλλη παράμετρο. Το επιφανειοδραστικό Tween 80 για περιεκτικότητα ίση με 1.25 % w/v, παρουσιάζει κατά μέσο όρο μικρότερη τιμή του δείκτη πολυδιασποράς, γεγονός το οποίο οφείλεται στην ιδιότητα του Tween 80 να προσδίδει συνοχή και σταθερότητα στα σωματίδια.

Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου, όπως και στην περίπτωση του μεγέθους, ελέγχεται ο λόγος λ των δύο ακραίων τιμών που λαμβάνει ο δείκτης πολυδιασποράς.

$$\lambda = \frac{\text{μέγιστη τιμή PDI}}{\text{ελάχιστη τιμή PDI}} = \frac{0.738}{0.533} = 1.384 < 10$$

Χωρίς λοιπόν να προηγηθεί κάποια μετατροπή ($\lambda < 10$), ακολουθεί στατιστική ανάλυση ANOVA, η οποία υποδεικνύει το τροποποιημένο κυβικό μοντέλο (cubic model) ως πιο κατάλληλο. Για το επιλεγμένο μοντέλο προέκυψε p value=0.0359 < 0.5, f value=3.94, ενώ η έλλειψη προσαρμογής (lack of fit)

προέκυψε ίση με $0.8390 > 0.05$, δεν θεωρείται σημαντική και το 83.9% της μη προσαρμογής στο μοντέλο οφείλεται σε θόρυβο. Συνεπώς με βάση τα κριτήρια των τιμών p value, f value, το μοντέλο μπορεί να περιγράψει καλά τη συσχέτιση των ανεξάρτητων μεταβλητών με το μέγεθος των σωματιδίων. Το R^2 λαμβάνει την τιμή $0.6866 < 0.7$ και επομένως η προσαρμογή δεν έχει τόσο μεγάλη ακρίβεια, ενώ προέκυψε $\text{Adjusted } R^2 = 0,5125$ και $\text{Predicted } R^2 = 0,1824$. Η διαφορά $\text{Adjusted } R^2 - \text{Predicted } R^2 = 0,3301 > 0.2$ και επομένως το μοντέλο δεν έχει καλή προβλεψιμότητα. Το γεγονός αυτό γίνεται και καλύτερα κατανοητό μέσα από το ακόλουθο διάγραμμα, όπου οι προβλεπόμενες τιμές του δείκτη πολυδιασποράς PDI αποκλείουν από τις πειραματικά ευρεθείσες.



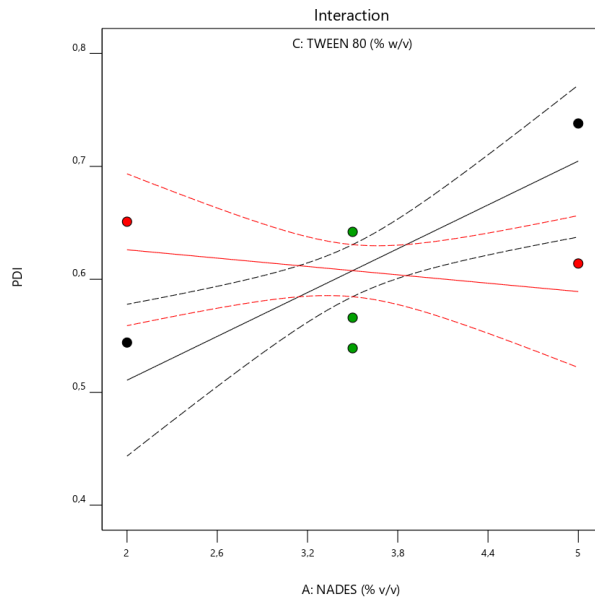
Διάγραμμα 15. Πραγματικές τιμές δείκτη πολυδιασποράς και προβλεπόμενες από το μοντέλο

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 --- 95% CI Bands

X1 = A: NADES
 X2 = C: TWEEN 80

Actual Factor
 B: CS = 0,5

C- 0,5
 C+ 2



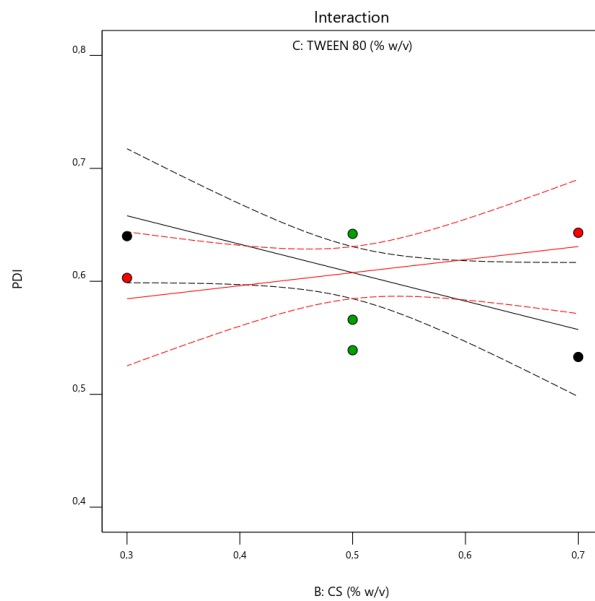
Διάγραμμα 16. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και Tween 80 ως προς το δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 --- 95% CI Bands

X1 = B: CS
 X2 = C: TWEEN 80

Actual Factor
 A: NADES = 3,5

C- 0,5
 C+ 2



Διάγραμμα 17. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης και Tween 80 ως προς το δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων

Οι τεμνόμενες ευθείες και στα δύο διαγράμματα υποδηλώνουν τη συσχέτιση της περιεκτικότητας του Tween 80 τόσο με της χιτοζάνης όσο και με το NaDES, όσον αφορά την επίδραση τους στο δείκτη πολυδιασποράς.

Factor Coding: Actual

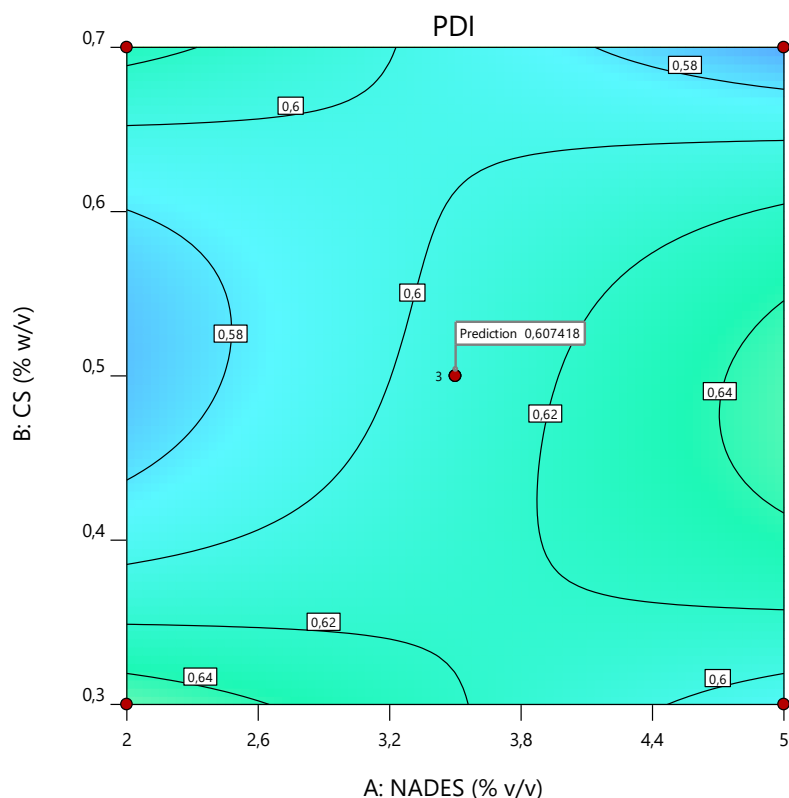
● Design Points
0,533 0,738

X1 = A: NADES

X2 = B: CS

Actual Factor

C: TWEEN 80 = 1,25



Διάγραμμα 18. Συσχέτιση δείκτη πολυδιαφοράς και περιεκτικότητας NaDES, CS

Με χρήση του παραπάνω διαγράμματος υπολογίζεται ενδεικτικά ο δείκτης πολυδιαφοράς των σωματιδίων για συγκεκριμένη περιεκτικότητα Tween 80= 1.25 % w/v. Το σημείο (0.5% w/v CS, 3.5 % v/v NaDES), το οποίο είναι και τριπλό καθώς λαμβάνει συντεταγμένες από τις μέσες τιμές όλων των ανεξάρτητων μεταβλητών αντιστοιχίζεται σε τιμές δείκτη πολυδιαφοράς ίσες με: 0.642, 0,566, 0,539, ενώ αναμένεται να δημιουργήσει σωματίδια με δείκτη πολυδιαφοράς 0.607. Παρουσιάζεται απόκλιση της τάξεως του 4% (για τον μέσο όρο των τιμών του δείκτη).

Τέλος ακολουθεί τρισδιάστατο διάγραμμα όπου συνοψίζεται το επιλεγμένο μοντέλο και καθίστανται δυνατός ο υπολογισμός του δείκτη πολυδιαφοράς PDI των σωματιδίων.

Factor Coding: Actual

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

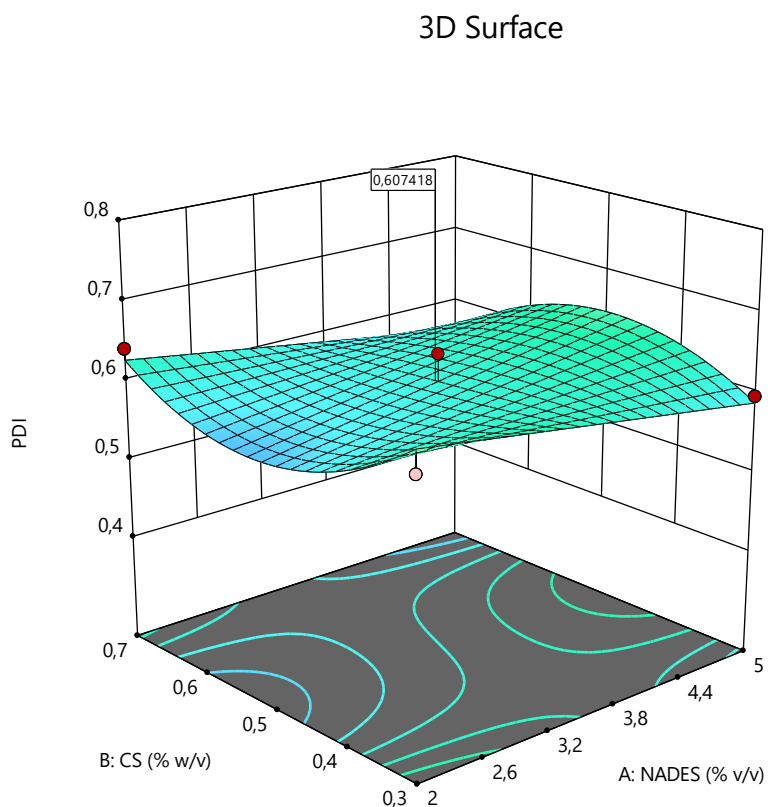
0,533  0,738

X1 = A: NADES

X2 = B: CS

Actual Factor

C: TWEEN 80 = 1,25

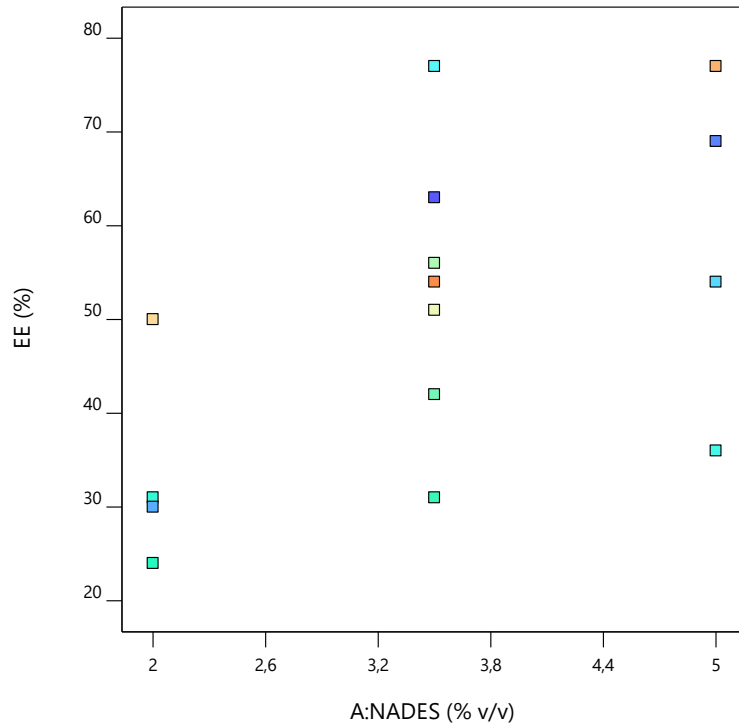


Διάγραμμα 19. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES, CS, Tween 80 δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων.

Απόδοση εγκλεισμού EE% των χιτοσωμάτων

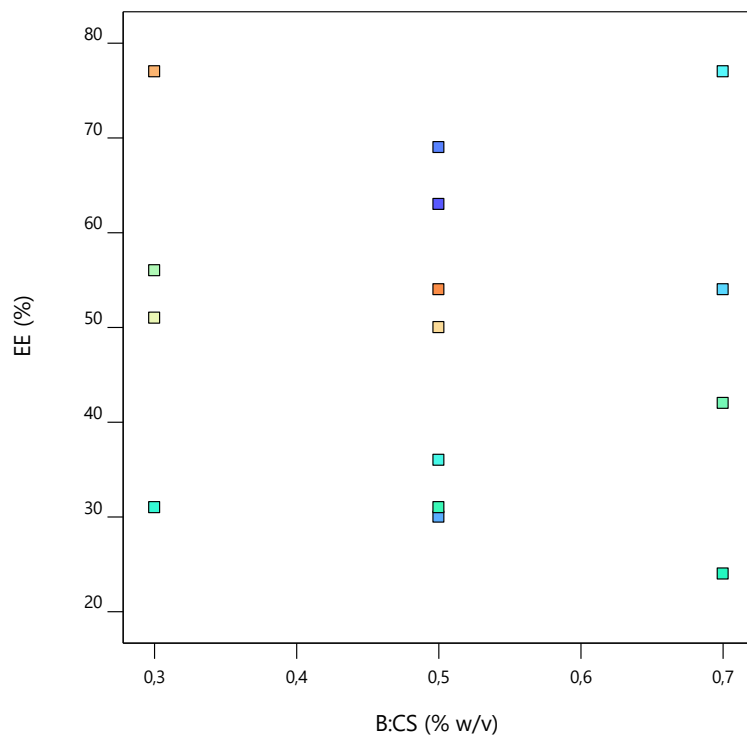
Ακολουθεί ανάλυση της επίδρασης της περιεκτικότητας των ανεξάρτητων μεταβλητών, NaDES (%v/v), CS (%w/v) και Tween 80 (%w/v) στην απόδοση εγκλεισμού EE%.

Correlation: 0,557
Color points by
Run
1 15




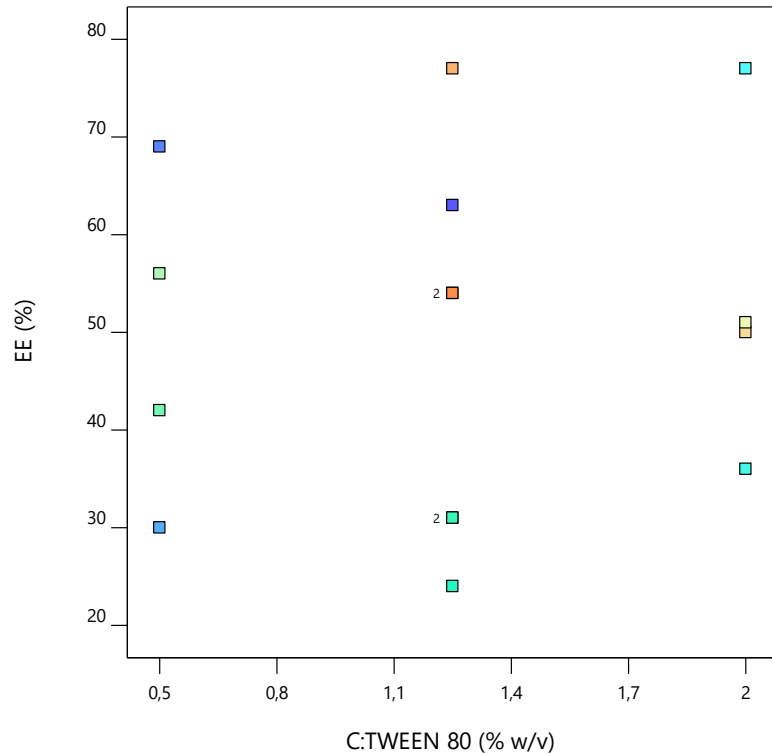
Διάγραμμα 20. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με την απόδοση εγκλεισμού

Correlation: -0,099
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 21. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης με την απόδοση εγκλεισμού

Correlation: 0,094
 Color points by
 Run
 1 



Διάγραμμα 22. Συσχέτιση περιεκτικότητας Tween 80 με την απόδοση εγκλεισμού

Με βάση τα διαγράμματα αποτυπώνεται η συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας NaDES, χιτοζάνης και Tween 80 με την απόδοση εγκλεισμού. Παρατηρείται πως η αύξηση της περιεκτικότητας του NaDES επιδρά σημαντικά στην αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού ενώ όσον αφορά τις περιεκτικότητες της χιτοζάνης και του Tween 80 οι τιμές είναι αρκετά διεσπαρμένες και εξετάζοντας τις μεμονωμένα δεν μπορεί να προκύψει κάποιο συμπέρασμα.

Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου αρχικά ελέγχεται ο λόγος των δύο ακραίων τιμών που λαμβάνει το μέγεθος των σωματιδίων:

$$\lambda = \frac{\text{μέγιστη τιμή EE\%}}{\text{ελάχιστη τιμή EE\%}} = \frac{77}{24} = 3.2 < 10$$

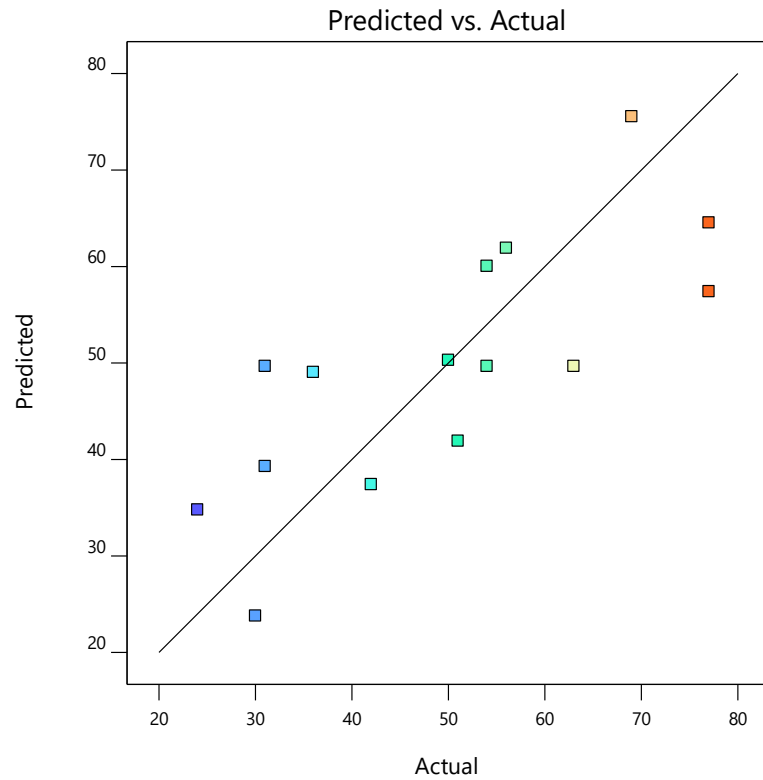
Κατά την στατιστική ανάλυση ANOVA, επιλέχθηκε ως πιο κατάλληλο το μοντέλο 2FI, το οποίο έχει $p \text{ value} = 0.0469 < 0.5$, $f \text{ value} = 3.57$, ενώ η έλλειψη προσαρμογής (lack of fit) προέκυψε ίση με $0.7878 > 0.05$, δηλαδή η μη προσαρμογή στο μοντέλο οφείλεται κατά 78,78% σε θόρυβο και επομένως δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντική. Το R^2 λαμβάνει την τιμή $0.5878 < 0.7$, η οποία υποδηλώνει ότι ιδιαίτερα καλή προσαρμογή ενώ προέκυψε Adjusted $R^2 = 0,4224$ και Predicted $R^2 = 0,0484$. Η διαφορά Adjusted R^2 - Predicted $R^2 > 0.2$ και επομένως το μοντέλο δεν έχει καλή προβλεψιμότητα, το οποίο και διαφαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα:

EE

Color points by value of

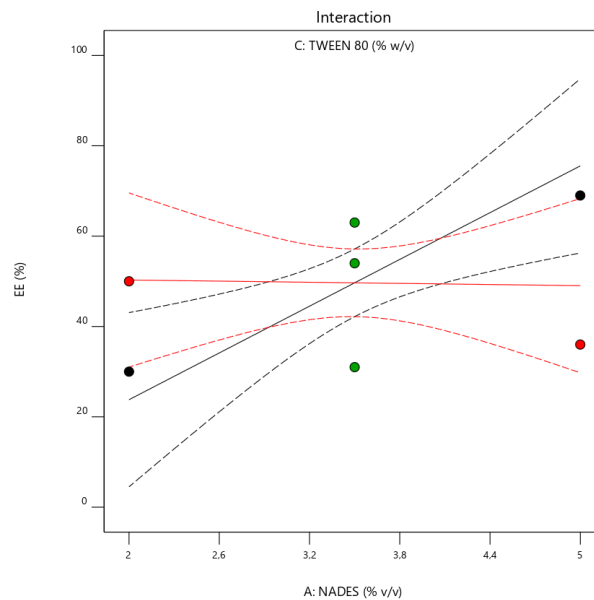
EE:

24 77



Διάγραμμα 23. Πραγματικές τιμές απόδοσης εγκλεισμού και προβλεπόμενες από το μοντέλο

Factor Coding: Actual
● Design Points
--- 95% CI Bands
X1 = A: NADES
X2 = C: TWEEN 80
Actual Factor
B: CS = 0,5
C- 0,5
C+ 2



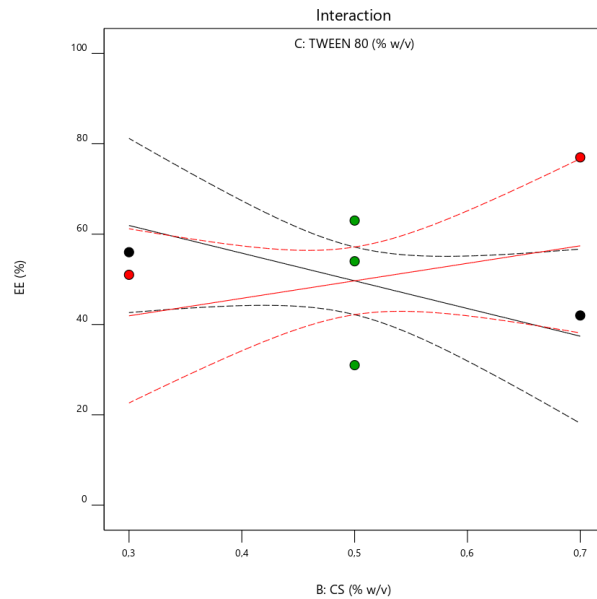
Διάγραμμα 24. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και Tween 80 ως προς την απόδοση εγκλεισμού

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 --- 95% CI Bands

X1 = B: CS
 X2 = C: TWEEN 80

Actual Factor
 A: NADES = 3,5

C: 0,5
 C+ 2



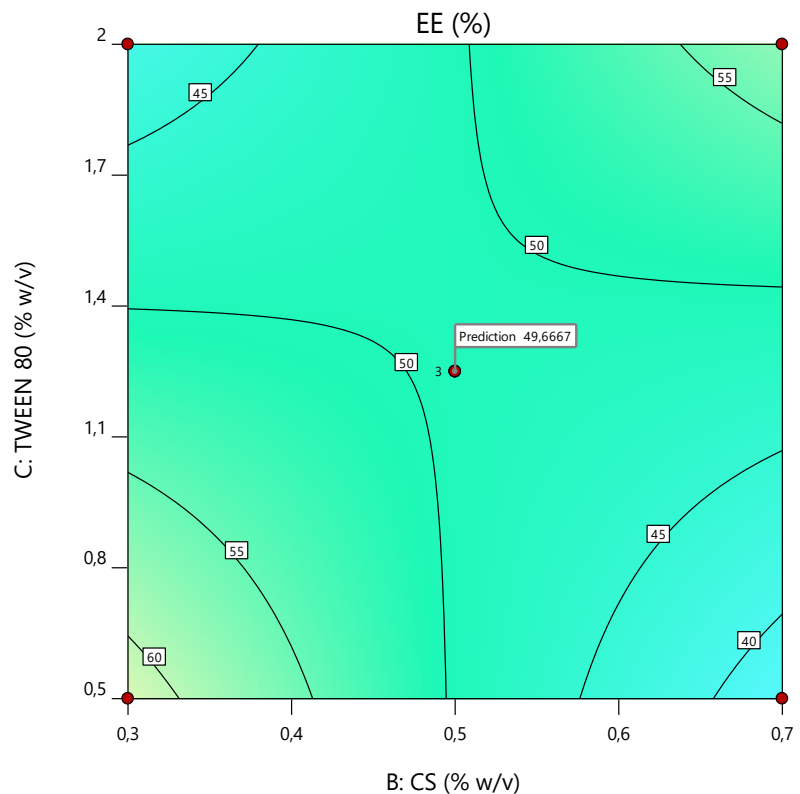
Διάγραμμα 25. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης και Tween 80 ως προς την απόδοση εγκλεισμού

Μέσω των διαγραμμάτων γίνεται αντιληπτό πως η περιεκτικότητα του Tween 80 αλληλεπιδρά με τις άλλες δυο ανεξάρτητες μεταβλητές και επομένως η ξεχωριστή μελέτη της δεν έχει νόημα, όπως και σχολιάστηκε προηγουμένως στο διάγραμμα συσχέτισης περιεκτικότητας Tween 80 και απόδοσης εγκλεισμού.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 24 77

X1 = B: CS
 X2 = C: TWEEN 80

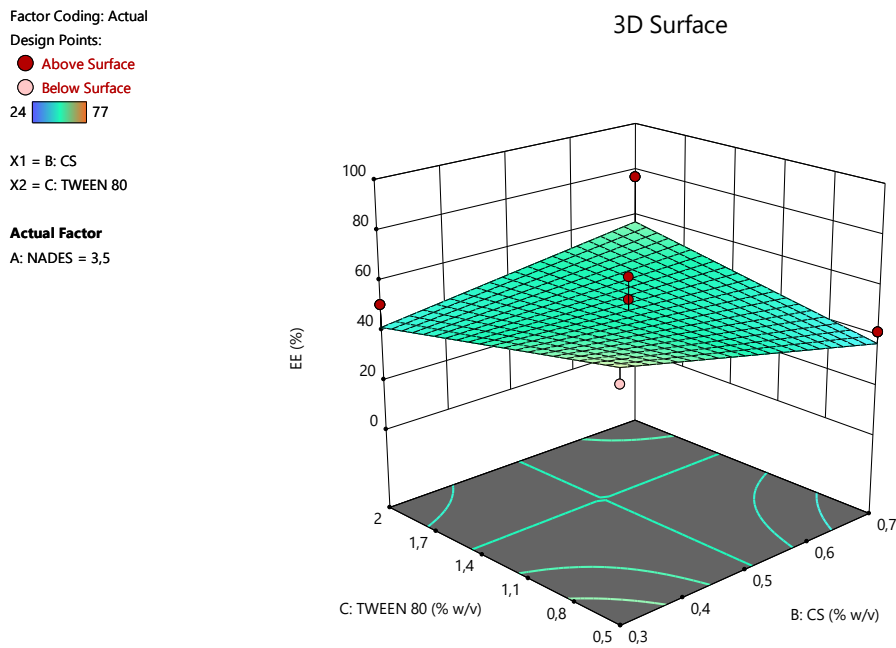
Actual Factor
 A: NADES = 3,5



Διάγραμμα 26. Συσχέτιση απόδοσης εγκλεισμού και περιεκτικότητας CS και Tween 80

Με χρήση του παραπάνω διαγράμματος υπολογίζεται ενδεικτικά ο δείκτης πολυδιαποράς των σωματιδίων για συγκεκριμένη περιεκτικότητα NaDES =3.5 % v/v. Το σημείο (0.5% w/v CS, 1.25 % w/v Tween 80), αντιστοιχίζεται σε τιμές EE% ίσες με: 63%, 31% και 54%, ενώ με βάση το μοντέλο αναμένεται τιμή 49%. Η απόκλιση από το μέσο όρο είναι ελάχιστη <1%, αλλά δεν λαμβάνεται υπόψη καθώς από τις επιμέρους αποδόσεις διαφέρει αρκετά, όπως και αυτές άλλωστε μεταξύ τους.

Τέλος ακολουθεί τρισδιάστατο διάγραμμα όπου συνοψίζεται το επιλεγμένο μοντέλο και καθίστανται δυνατός ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλεισμού

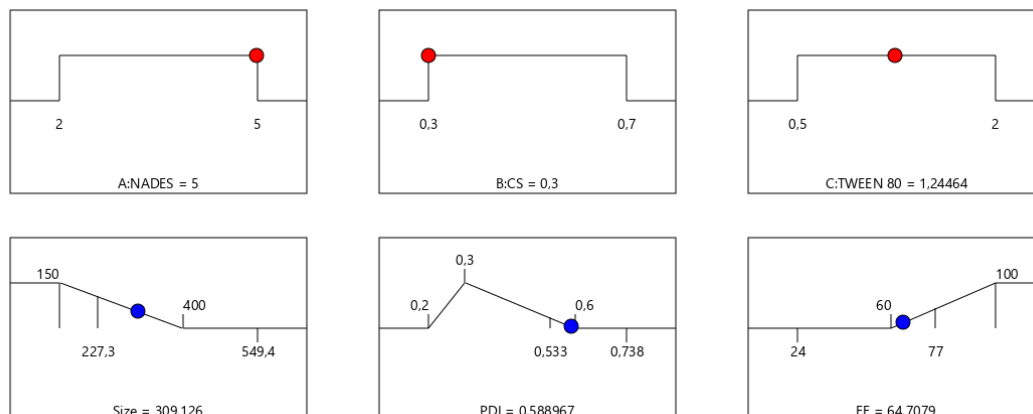


EE%.

Διάγραμμα 27. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES, CS, Tween 80 με την απόδοση εγκλεισμού EE%.

Βελτιστοποίηση χιτοσωμάτων

Με βάση όλων των παραμέτρων και των αντίστοιχων μοντέλων, η σύνθεση των χιτοσωμάτων βελτιστοποιείται για τις ακόλουθες περιεκτικότητες, ενώ οι αποκρίσεις λαμβάνουν τις εξής τιμές:



Desirability = 0,117
Solution 1 out of 27

Σχήμα 21. Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών σύνθεσης χιτοσωμάτων και αναμενόμενες αποκρίσεις

Επόμενο στάδιο αποτέλεσε η σύνθεση χιτοσωμάτων με τα εξής χαρακτηριστικά:

Πίνακας 15. Παράμετροι για σύνθεση βέλτιστων χιτοσωμάτων

Χιτοσώματα		
NaDES (% v/v)	CS (%w/v)	Tween 80 (%w/v)
5	0.3	1.25

Με βάση αυτές τις αναλογίες παρασκευάστηκαν τα 'βέλτιστα' χιτοσώματα, των οποίων τα μεγέθη, ο δείκτης πολυδιασποράς PDI, το ζ-δυναμικό καθώς η απόδοση εγκλεισμού EE%, συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 16. Μέγεθος, PDI, EE% για τις βέλτιστες αναλογίες των χιτοσωμάτων

Βέλτιστα Χιτοσώματα				
	Μέγεθος (nm)	PDI	zeta (mV)	EE%
	342.7	0.544	7.4	47
	344.8	0.607	18.2	82
	259.5	0.589	21.2	41
Μέση τιμή	315.7 ± 39.7	0.580± 0.026	15.6± 5.9	56

Για τον μέσο όρο των τιμών των αποκρίσεων κατασκευάζεται πίνακας όπου συγκρίνονται με τα προβλεπόμενα από τον πειραματικό σχεδιασμό καθώς και οι αποκλίσεις οι οποίες παρουσίασαν.

Πίνακας 17. Σύγκριση πειραματικών και προβλεπόμενων αποκρίσεων των χιτοσωμάτων

Βέλτιστα χιτοσώματα			
	Μέγεθος (nm)	PDI	EE%
Πειραματικά	315.7	0.580	56
Προβλεπόμενα	309.2	0.588	64
Αποκλίσεις (%)	2.1	1.361	12

Οι αποκλίσεις οι οποίες παρουσιάστηκαν είναι αναμενόμενες και εντός των ορίων του σφάλματος. Μεγαλύτερη απόκλιση παρατηρείται στην απόδοση εγκλεισμού, η οποία οφείλεται σε μία τιμή, 82%.

Επιβεβαίωση του μοντέλου (confirmation)

Για περαιτέρω σύγκριση των αποκρίσεων πραγματοποιείται έλεγχος επιβεβαίωσης του μοντέλου (confirmation). Για τις ακόλουθες αποκρίσεις με χρήση του προγράμματος Design Expert προκύπτει πίνακας των αποκλίσεων των βελτιστών σωματιδίων από τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές των αποκρίσεων.

Πίνακας 18. Τιμές αποκρίσεων για τα 'βέλτιστα' χιτοσώματα

Size	PDI	EE
342.7	0.544	47
344.8	0.607	82
259.5	0.589	41

Πίνακας 19. Επιβεβαίωση εγκυρότητας των αποκρίσεων των χιτοσωμάτων

Response	Predicted Mean	Predicted Median	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	95% PI high
Size	309.1	309.1	47.20	3	50.63	189.4	428.86
PDI	0.588	0.588	0.04	3	0.035	0.510	0.6676
EE	65	65	13.0	3	10.5	41.3	88.1

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα, τα σωματίδια τα οποία σχηματίστηκαν έχουν προδιαγραφές εντός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού.

Σύγκριση εναλλακτικών διαλυτών

Ακόμη παρασκευάστηκαν χιτοσώματα με χρήση διαφορετικών διαλυτών (αντί του NaDES Bet:LA), καθώς και δοκιμάστηκε και η παράλειψη του επιφανειοδραστικού Tween 80. Αρχικά δοκιμάστηκε η διαλυτοποίηση της χιτοζάνης σε διάλυμα σκέτου γαλακτικού οξέος, όμοιας περιεκτικότητας με της προβλεπόμενης για το συνδυασμό βεταΐνης-γαλακτικού οξέος, ίση με 5 % v/v LA. Η εν λόγω διαβροχή παρασκευάστηκε με προσθήκη 5 ml LA σε 100 ml υπερκάθαρο νερό, ενώ οι υπόλοιπες αναλογίες διατηρήθηκαν σταθερές (0.3 % w/v CS, 1.25 Tween 80). Στη συνέχεια παρασκευάστηκε διάλυμα αποτελούμενο από Bet:LA, χωρίς θέρμανση και ανάδευση. Αυτό το μίγμα παρασκευάστηκε ώστε να έχει μάζα ίση με του αντίστοιχου NaDES 5.5 g (καθώς έχει πυκνότητα 1.1 g/ml). Επομένως το φυσικό μείγμα αποτελείται από 1.88 g Bet και 3.62 g LA, δίχως αυτά να σχηματίζουν βαθέως ευτηκτικό διαλύτη. Τέλος παρασκευάστηκαν χιτοσώματα χωρίς επιφανειοδραστικό, αποτελούμενα από 5% v/v NaDES και 0.3% w/v CS). Όλα τα σωματίδια σχηματίστηκαν με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού φιλμ και ακολούθησε μελέτη με χρήση των οργάνων DLS και UV-Vis για τον προσδιορισμό του μεγέθους τους, του δείκτη πολυδιασποράς, του ζ-δυναμικού (το οποίο δεν αποτελεί παράμετρο αλλά τιμή ενδεικτική της σταθερότητας) και της απόδοσης εγκλεισμού προς τη μεταξύ τους σύγκριση. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 20. Σύγκριση μεγέθους, PDI, EE% για διαφορετικούς διαλύτες

Χιτοσώματα				
Διάλυμα διαβροχής	Μέγεθος (nm)	PDI	zeta (mV)	EE%
3.65% v/v δ. NaDES (Bet:LA, ½)	315.7 ± 39.7	0.580 ± 0.026	15.6 ± 5.9	56
3.65% v/v δ. Γαλακτικού οξέως (LA)	268.3 ± 60.5	0.613 ± 0.048	17.3 ± 0.9	31
3.65% v/v δ. Bet:LA ½ (Φυσικό μείγμα)	776.6 ± 305.6	0.628 ± 0.183	15.8 ± 0.4	42
Χωρίς Tween 80	466.0 ± 111.7	0.488 ± 0.066	27.2 ± 0.5	80

Όσον αφορά το μέγεθος των κυστιδίων, το μεγαλύτερο παρουσιάστηκε με τη χρήση φυσικού μείγματος, γεγονός το οποίο μπορεί να ερμηνευθεί με την όχι καλή διαβροχή των σωματιδίων και όχι καλή διαλυτοποίηση της χιτοζάνης, που είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του στρώματος του περιβλήματος, οδηγώντας έτσι σε αύξηση του μεγέθους και του δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων, λόγω αυτής της ανομοιόμορφης κατανομής. Η περίπτωση του σκέτου γαλακτικού οξέος οδήγησε σε ικανοποιητικού μεγέθους σωματίδια, τα οποία όμως είχαν ανομοιόμορφη κατανομή, πιθανότητα λόγω μη καλής διαβροχής και χαμηλή απόδοση εγκλεισμού. Η περίπτωση της απουσίας Tween 80 φαίνεται να δημιουργήσει αρκετά καλών χαρακτηριστικών σωματίδια, με καλή ομοιομορφία και υψηλή τιμή απόδοσης εγκλεισμού, αλλά με βάση τις πειραματικές μάζες των σχηματιζόμενων κυστιδίων, παρουσίασε αρκετά μικρότερη απόδοση διεργασίας σε σχέση με τις περιπτώσεις οι οποίες περιείχαν

επιφανειοδραστικό παράγοντα. Όλα τα σωματίδια παρουσίασαν θετική τιμή ζ-δυναμικού, η οποία επιβεβαιώνει την επιτυχή επικάλυψη με χιτοζάνη, ενώ παράλληλα ήταν μεγαλύτερη από 15 mV, οδηγώντας σε σχετικά σταθερά σωματίδια χωρίς τάση συσσωμάτωσης.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη όλες αυτές τις παραμέτρους, ο πιο αποδοτικός συνδυασμός ήταν και αυτός ο οποίος μελετήθηκε εκτενέστερα, κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η χρήση του καινοτόμου βαθέως ευτηκτικού διαλύτη NaDES Bet:LA σε συνδυασμό με το επιφανειοδραστικό Tween 80 για τη σύνθεση χιτοσωμάτων με εγκλεισμένη καφεΐνη.

Μέγεθος, PDI και EE% νιοσωμάτων

Ακολουθώς μελετάται η επίδραση της περιεκτικότητας της χιτοζάνης, του NaDES και του επιφανειοδραστικού Span 60 στο μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και την απόδοση εγκλεισμού EE% των νιοσωμάτων

Πίνακας 21. Παράμετροι υπό μελέτη προς βελτιστοποίηση συγκεκριμένων αποκρίσεων των νιοσωμάτων

Νιοσώματα	
<u>Παράμετροι</u>	<u>Αποκρίσεις</u>
Περιεκτικότητα CS (w/v)	Μέγεθος σωματιδίων
Περιεκτικότητα NaDES (v/v)	Δείκτης πολυδιασποράς
Περιεκτικότητα Span 60 (w/v)	Απόδοση εγκλεισμού EE%

Για τον υπολογισμό των αναλογιών και κατάστρωση των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός Box Behken 3x3 χρήση του λογισμικού Design Expert. Οι οριοθετήσεις των παραμέτρων διαφαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 22. Οριοθέτηση παραμέτρων νιοσωμάτων

Factor	Name	Units	Type	Minimum	Maximum	Coded Low	Coded High	Mean	Std. Dev.
A	NADES	% v/v	Numeric	2.00	5.00	-1 ↔ 2.00	+1 ↔ 5.00	3.50	1.13
B	CS	% w/v	Numeric	0.30	0.70	-1 ↔ 0.30	+1 ↔ 0.70	0.50	0.15
C	Span 60	% w/v	Numeric	0.50	2.00	-1 ↔ 0.50	+1 ↔ 2.00	1.25	0.56

Στόχος, όπως και στη μελέτη των χιτοσωμάτων, αποτελεί η μεγιστοποίηση της απόδοσης εγκλεισμού EE%, η προσέγγιση της τιμής 0.5 για το δείκτη πολυδιασποράς με όρια τις τιμές 0.3 και 0.7 καθώς και η ελαχιστοποίηση του μεγέθους των σωματιδίων με όρια τις τιμές 180 και 500 nm (οι τιμές των ορίων προέκυψαν με βάση τις ευρεθείσες τιμές των αποκρίσεων). Ακολουθώς

διαφαίνεται πίνακας με τις τιμές των παραμέτρων των προτεινόμενων πειραμάτων, οι οποίες προέκυψαν μέσω του Design Expert.

Πίνακας 23. Προβλεπόμενα πειράματα για τη σύνθεση των νισσωμάτων

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Run	A:NADES	B:CS	C:Span 60
	% v/v	% w/v	% w/v
1	3.5	0.5	1.25
2	2	0.5	0.5
3	5	0.3	1.25
4	3.5	0.3	0.5
5	3.5	0.7	2
6	2	0.5	2
7	3.5	0.5	1.25
8	3.5	0.3	2
9	5	0.7	1.25
10	5	0.5	2
11	5	0.5	0.5
12	2	0.3	1.25
13	3.5	0.7	0.5
14	2	0.7	1.25
15	3.5	0.5	1.25



Εικόνα 26. Λυοφιλωμένα νισσώματα με βάση τις αναλογίες του πειραματικού σχεδιασμού

Παράλληλα με τον υπολογισμό του μεγέθους και του δείκτη πολυδιασποράς PDI υπολογίστηκαν και οι αντίστοιχες τιμές του ζ-δυναμικού, με χρήση του οργάνου DLS, ενώ η προετοιμασία των δειγμάτων των νισσωμάτων είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην παράγραφο των χιτοσωμάτων..

Ορισμένα ενδεικτικά διαγράμματα τα οποία προέκυψαν με τη χρήση του οργάνου DLS συμπεριλαμβάνονται στο παράρτημα.

Όπως διαφαίνεται στα διαγράμματα του παραρτήματος, τα σωματίδια αποκτούν μέγεθος της κλίμακας νάνο, άρα υπάρχει επιτυχής σχηματισμός νανοσωμάτων.. Ο δείκτης πολυδιαποράς PDI παρουσιάζει αρκετές διακυμάνσεις (δεν είναι βέλτιστος) και αυτό αποδίδεται σε διαφορετικού μεγέθους σωματίδια. Οι τιμές του PDI, υποδηλώνουν μία τάση συσσωμάτωσης. Το ζ-δυναμικό όμως βρέθηκε >5 mV σε όλα τα πειράματα ενώ στα περισσότερα προσέγγισε την τιμή 30 mV, γεγονός το οποίο υποδεικνύει σταθερότητα των σωματιδίων.

Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα 69,70,71,72 τα συμβατικά λιποσώματα έναντι των νανοσωμάτων έχουν μικρότερο μέγεθος. Το επιφανειοδραστικό Span 60 δημιούργησε επιτυχή επικάλυψη καθώς το ζ-δυναμικό αποκτά θετική τιμή, έναντι της αρνητικής τιμής που χαρακτηρίζει τα συμβατικά λιποσώματα. Οι δύο αυτοί παράγοντες φανερώνουν τον επιτυχή σχηματισμό νανοσωμάτων, ο οποίος θα επιβεβαιωθεί και στη συνέχεια μέσω των φασμάτων FT-IR.

Η απόδοση εγκλεισμού υπολογίζεται μέσω της ακόλουθης εξίσωσης:

$$\text{Απόδοση εγκλεισμού } EE\% = \frac{\text{μάζα ουσίας που εγκλείστηκε (mg)}}{\text{αρχική μάζα ένωσης (mg)}} * 100\%$$

Η μάζα της ουσίας που εγκλείστηκε (καφεΐνη) δεν δύναται να υπολογισθεί άμεσα, παρά μόνο με λύση των σωματιδίων. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιείται έμμεσος προσδιορισμός από τον υπολογισμό της καφεΐνης η οποία δεν εγκλείστηκε. Η ποσότητα της καφεΐνης, υπολογίζεται όπως και στην περίπτωση των χιτοσωμάτων μέσω φωτομέτρησης των υπερκειμένων υγρών, τα οποία έχουν προκύψει από φυγοκέντρηση των διασπορών των σωματιδίων, με τη χρήση του οργάνου UV-Vis. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιείται με χρήση υπερφυγοκέντρου και ρυθμίζεται στις 25000 στροφές το λεπτό (rpm), στους 4°C για 40 λεπτά. Η συγκέντρωση της καφεΐνης υπολογίζεται με βάση την εξίσωση:

$$\text{Συγκέντρωση καφεΐνης (mg/ml)} = 60.067 * \text{Απορρόφηση (abs)} - 0.0582$$

Η συγκέντρωση της καφεΐνης υπολογίζεται μέσω του νόμου αραιώσης του Ostwald : $C1V1=C2V2$, καθώς το διάλυμα έχει αραιωθεί, 100 μl του εκάστοτε δείγματος με 2900 μl του blank αντίστοιχης ποσότητας NaDES. Αφού υπολογισθούν οι επιμέρους συγκεντρώσεις υπολογίζονται και οι αντίστοιχες μάζες της καφεΐνης (πολλαπλασιάζοντας με 20, εφόσον η αρχική αραιώση έγινε με χρήση 20 ml νερού).

Η μάζα της εγκλεισμένης καφεΐνης υπολογίζεται ως εξής:

$$m \text{ εγκλεισμένης καφεΐνης} = m \text{ καφεΐνης αρχική} - m \text{ καφεΐνης που δεν εγκλείστηκε}$$

Η αρχική μάζα της καφεΐνης είναι αυτή η οποία ζυγίστηκε και η μάζα καφεΐνης η οποία δεν εγκλείστηκε υπολογίστηκε με βάση τις απορροφήσεις.

Ακολουθως συνοψίζονται όλες οι αποκρίσεις, συμπεριλαμβανόμενης και της εκάστοτε απόδοσης εγκλεισμού ΕΕ% για όλες τις διαφορετικές αναλογίες συστατικών των σωματιδίων.

Πίνακας 24. Παράγοντες μελέτης νιοσωμάτων και αντίστοιχες αποκρίσεις

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response 1	Response 2	Response 3
Run	A:NADES	B:CS	C:Span 60	Size	PDI	EE
	% v/v	% w/v	% w/v	nm		%
1	3.5	0.5	1.25	519.0	0.563	31
2	2	0.5	0.5	266.3	0.532	10
3	5	0.3	1.25	342.5	0.576	12
4	3.5	0.3	0.5	340.1	0.524	30
5	3.5	0.7	2	332.0	0.573	60
6	2	0.5	2	346.1	0.530	18
7	3.5	0.5	1.25	311.3	0.551	26
8	3.5	0.3	2	344.4	0.556	35
9	5	0.7	1.25	594.0	0.699	45
10	5	0.5	2	273.9	0.468	28
11	5	0.5	0.5	535.5	0.625	04
12	2	0.3	1.25	362.0	0.532	37
13	3.5	0.7	0.5	389.2	0.573	29
14	2	0.7	1.25	300.7	0.507	21
15	3.5	0.5	1.25	380.6	0.552	34

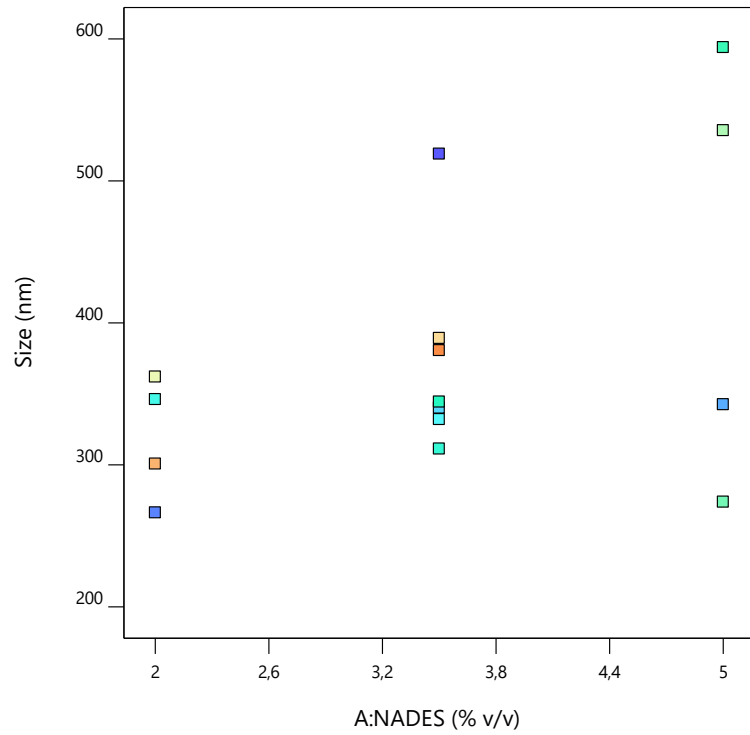
Όπως φαίνεται και από το συγκεντρωτικό πίνακα επιτεύχθηκαν αρκετά υψηλές αποδόσεις εγκλεισμού, με μέγιστη τιμή 60% και με μέση τιμή 28%. Οι συγκεκριμένες τιμές απόδοσης εγκλεισμού όσον αφορά τα νιοσώματα, είναι ιδιαίτερα καλές εφόσον κινούνται ανάμεσα στο αναμενόμενο διάστημα [10%, 40%]. Μέσο μέγεθος σωματιδίων προέκυψε 375.8nm και μέση τιμή δείκτη πολυδιασποράς PDI 0.558. Για τις ευρεθείσες τιμές πραγματοποιείται βελτιστοποίηση των παραμέτρων (συγκέντρωση NaDES, CS, Span 60).

Με χρήση του Design Expert δοκιμάζονται μοντέλα και με βάση τη σημαντικότητα των παραμέτρων του κάθε μοντέλου για την κάθε παράμετρο επιλέγεται το κατάλληλο.

Μέγεθος νιοσωμάτων

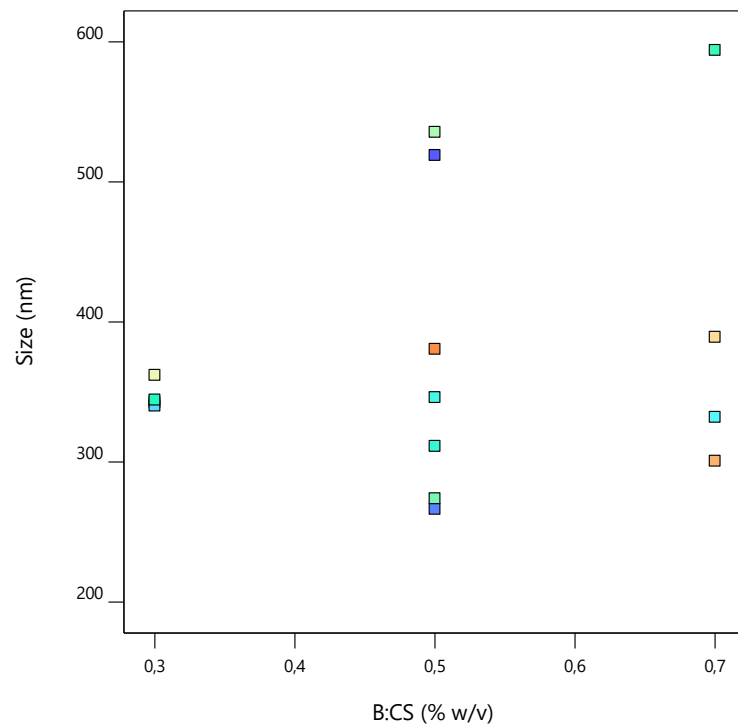
Αρχικά αναλύεται η επίδραση της περιεκτικότητας των ανεξάρτητων μεταβλητών, NaDES (%v/v), CS (%w/v) και Span 60 (%w/v) στο μέγεθος των νιοσωμάτων.

Correlation: 0,458
Color points by
Run
1 15




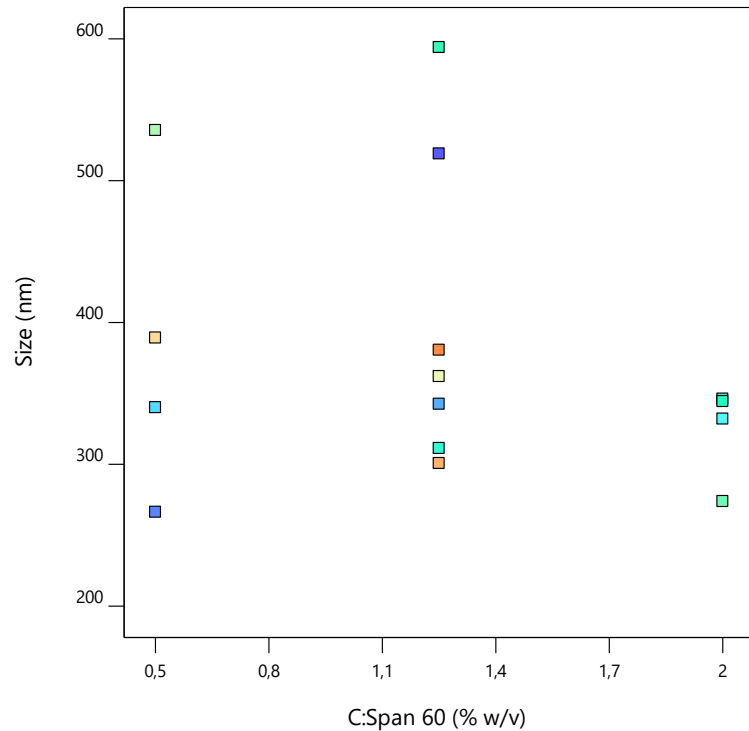
Διάγραμμα 28. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με το μέγεθος των σωματιδίων

Correlation: 0,221
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 29. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης με το μέγεθος των σωματιδίων

Correlation: -0,228
 Color points by
 Run
 1 



Διάγραμμα 30. Συσχέτιση περιεκτικότητας Span 60 με το μέγεθος των σωματιδίων

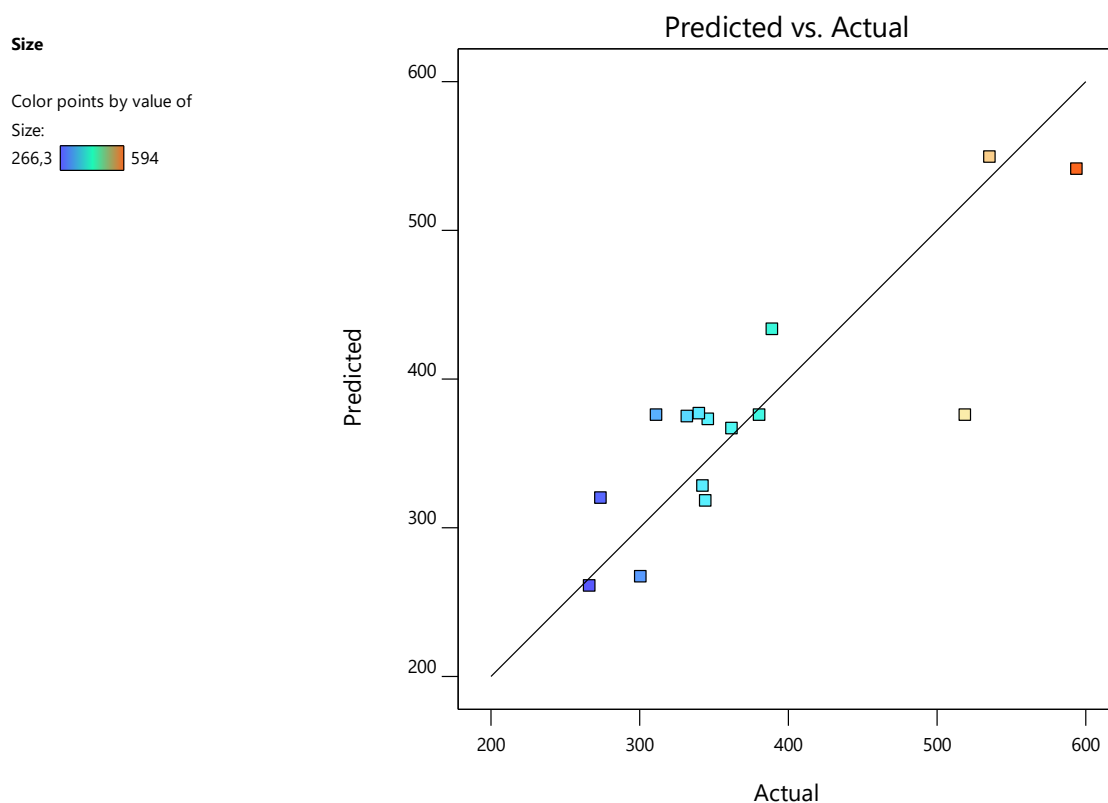
Με βάση τα διαγράμματα αποτυπώνεται η συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας NaDES, χιτοζάνης και Span 60 με το μέγεθος των σωματιδίων. Μικρότερα μεγέθη παρατηρούνται για χαμηλότερη συγκέντρωση NaDES 2% v/v, ενώ για υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων και πιο ανομοιόμορφη κατανομή. Η αύξηση της περιεκτικότητας της χιτοζάνης αρχικά οδηγεί σε μείωση του μεγέθους και εν συνεχεία σε αύξηση. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ιδιότητα της χιτοζάνης να δημιουργεί σταθερότερα σωματίδια και επομένως να μειώνει την τάση συσσωμάτωσης άρα και το μέγεθος μέχρι μία κρίσιμη τιμή, όπου πλέον δημιουργείται αρκετά μεγαλύτερου πάχους περίβλημα, το οποίο οδηγεί τελικά σε αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων. Όσον αφορά το επιφανειοδραστικό Span 60 οι τιμές του μεγέθους των νιοσωμάτων ελαττώνονται για αύξηση της περιεκτικότητας του. Μια αρχική εκτίμηση για σύνθεση μικρότερου μεγέθους νιοσωμάτων είναι η μικρότερη περιεκτικότητα NaDES, 2% v/v, η μέση τιμή χιτοζάνης, 0.5 % w/v και η μέγιστη τιμή Span 60, 2% w/v.

Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου αρχικά ελέγχεται ο λόγος των δύο ακραίων τιμών που λαμβάνει το μέγεθος των σωματιδίων:

$$\lambda = \frac{\text{μέγιστη τιμή μεγέθους σωματιδίων}}{\text{ελάχιστη τιμή μεγέθους σωματιδίων}} = \frac{594.0}{266.3} = 2.23 < 10$$

Εφόσον ο συγκεκριμένος λόγος έχει τιμή μικρότερη του 10 δεν απαιτείται καμία μετατροπή (λογαριθμηση, δύναμη, ρίζα).

Ακολουθεί στατιστική ανάλυση ANOVA, όπου και εξετάζεται η σημαντικότητα των ανεξάρτητων μεταβλητών καθώς και πεπλεγμένων όρων αυτών. Το μέγεθος των σωματιδίων περιγράφεται καλύτερα από το 2FI model. Οι όροι οι οποίοι το αποτελούν οφείλουν να έχουν $p \text{ value} < 0.05$ για να θεωρούνται σημαντικοί καθώς και το ίδιο το μοντέλο να παρουσιάζει αποδεκτή τιμή $p \text{ value}$. Για το επιλεγμένο μοντέλο προέκυψε $p \text{ value} = 0.0245 < 0.5$, $f \text{ value} = 4.51$, ενώ η έλλειψη προσαρμογής (lack of fit) προέκυψε ίση με $0.9569 > 0.05$, δηλαδή η μη προσαρμογή στο μοντέλο οφείλεται κατά 95.69% σε θόρυβο και επομένως δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντική (το επιθυμητό είναι το $p \text{ value}$ του lack of fit να μην είναι σημαντικό). Συνεπώς με βάση τα κριτήρια των τιμών $p \text{ value}$, $f \text{ value}$, το μοντέλο μπορεί να περιγράψει καλά τη συσχέτιση των ανεξάρτητων μεταβλητών με το μέγεθος των σωματιδίων. Το R^2 λαμβάνει την τιμή $0.7149 > 0.7$, η οποία υποδηλώνει αποδεκτή προσαρμογή ενώ προέκυψε $\text{Adjusted } R^2 = 0.5566$ και $\text{Predicted } R^2 = 0.4014$. Η διαφορά $\text{Adjusted } R^2 - \text{Predicted } R^2 = 0.1552 < 0.2$ και επομένως το μοντέλο έχει καλή προβλεψιμότητα. Οι προβλεπόμενες τιμές μεγεθών και αυτές οι οποίες υπολογίστηκαν με τη χρήση του DLS συσχετίζονται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 31. Πραγματικές τιμές μεγέθους σωματιδίων και προβλεπόμενες από το μοντέλο

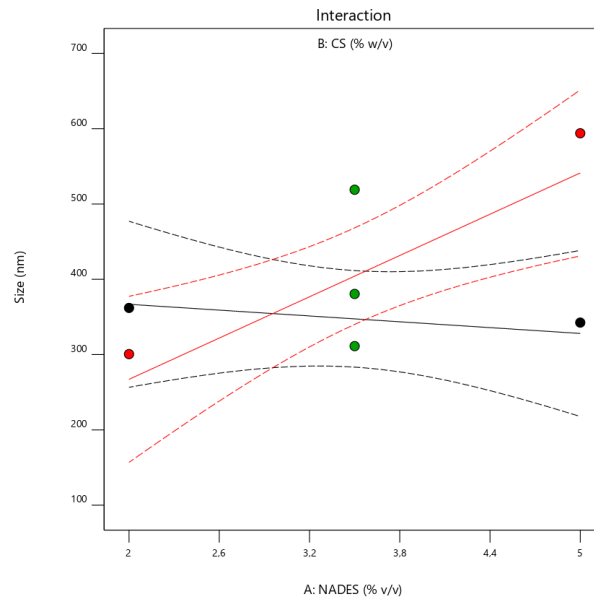
Οι ευρεθείσες τιμές παρουσιάζουν κάποιες αποκλίσεις από τις προβλεπόμενες από το μοντέλο.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 - - 95% CI Bands

X1 = A: NADES
 X2 = B: CS

Actual Factor
 C: Span 60 = 1.25

B: 0.3
 B+ 0.7



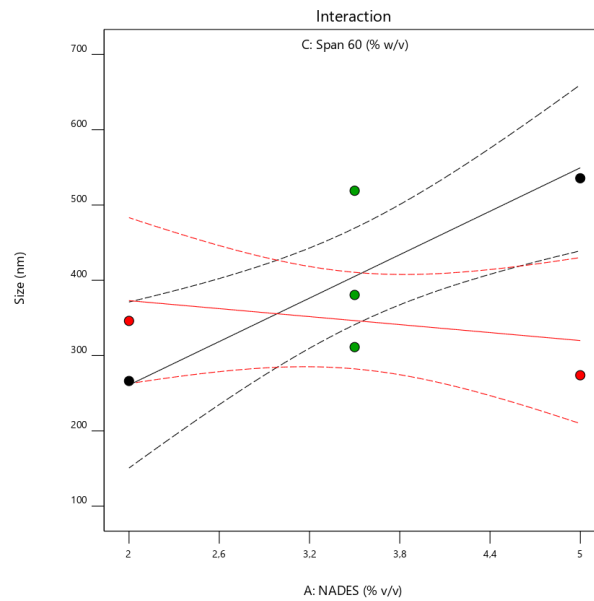
Διάγραμμα 32. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και χιτοζάνης ως προς το μέγεθος των σωματιδίων

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 - - 95% CI Bands

X1 = A: NADES
 X2 = C: Span 60

Actual Factor
 B: CS = 0.5

C: 0.5
 C+ 2



Διάγραμμα 33. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και Span 60 ως προς το μέγεθος των σωματιδίων

Στο διάγραμμα παρατηρείται πως ο παράγοντας της περιεκτικότητας του NaDES αλληλεπιδρά με τις περιεκτικότητες της χιτοζάνης και του Span 60 και επομένως η ξεχωριστή μελέτη τους δεν έχει νόημα.

Factor Coding: Actual

● Design Points

266,3 594

Size (nm) = 380,6

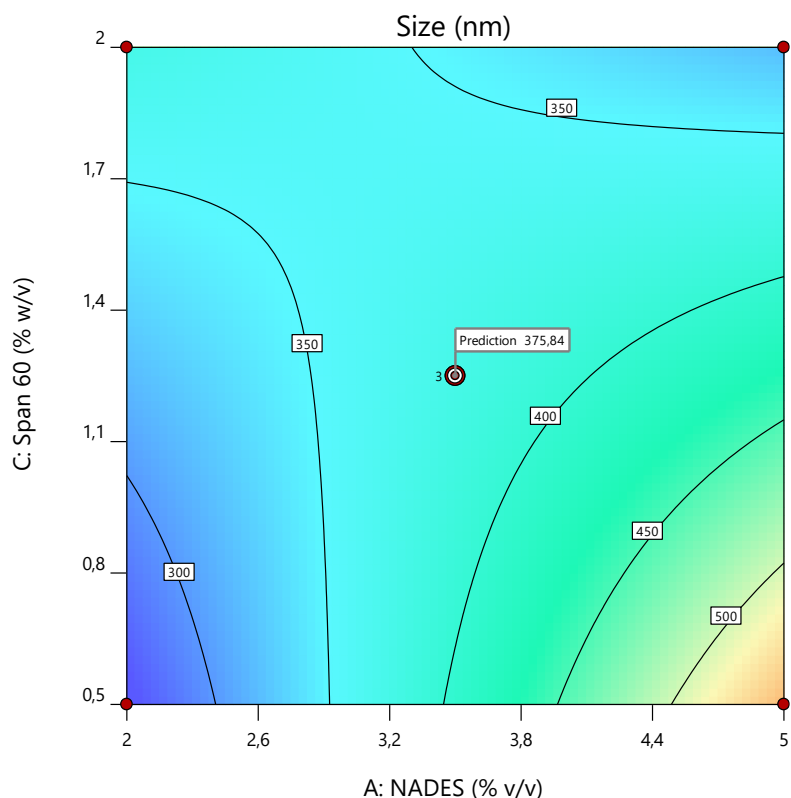
Std # 13 Run # 15

X1 = A: NADES = 3,5

X2 = C: Span 60 = 1,25

Actual Factor

B: CS = 0,5



Διάγραμμα 34. Συσχέτιση μεγέθους σωματιδίων και περιεκτικότητας NaDES, Span 60

Το παραπάνω διάγραμμα επιτρέπει τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων για συγκεκριμένη περιεκτικότητα CS=0.5% w/v. Παραδείγματος χάριν το σημείο (NaDES=3.5% v/v, Span 60=1.25% w/v), αναμένεται να δημιουργήσει σωματίδια μεγέθους 375.8 nm έναντι των ευρεθέντων τιμών: 519.0, 311.3, 380.6 nm, αποκλείοντας από το μέσο όρο κατά 6.2%. Με τις τιμές 311.3 και 380.6 παρουσιάζει σχετικά καλή πρόβλεψη, ενώ για την τιμή 519.0 αποκλείει αρκετά. Εφόσον η απόκλιση από το μέσο όρο και από τις δύο εκ των τριών τιμών είναι μικρή, η μεγάλη απόκλιση από την τιμή 519.0 μπορεί να αποδοθεί σε τυχαίο γεγονός.

Το διάγραμμα που ακολουθεί συνοψίζει το επιλεγμένο μοντέλο και καθιστά δυνατό τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων

Factor Coding: Actual

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

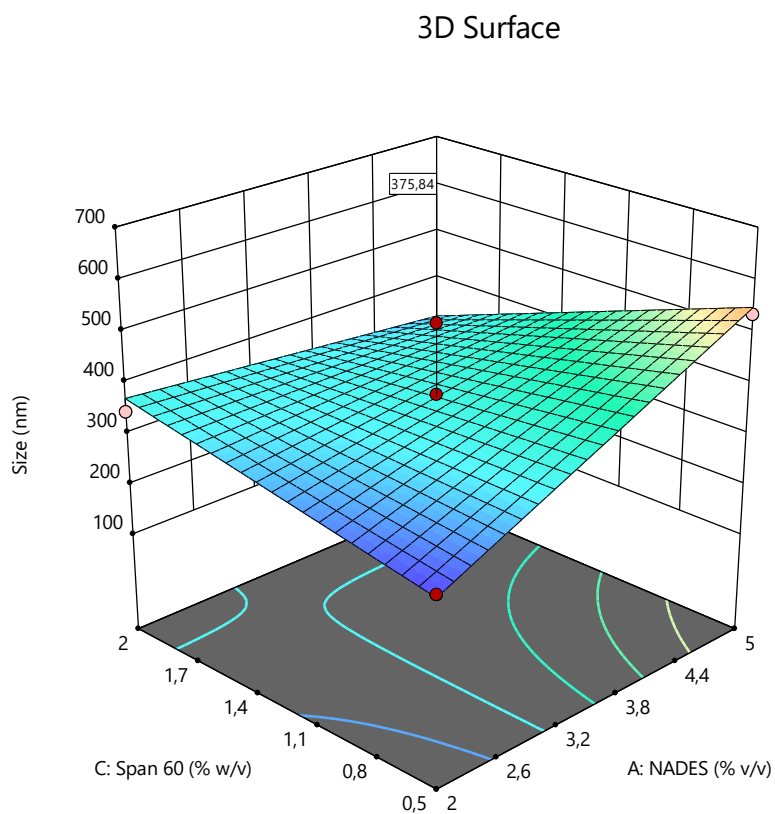
266,3  594

X1 = A: NADES

X2 = C: Span 60

Actual Factor

B: CS = 0,5

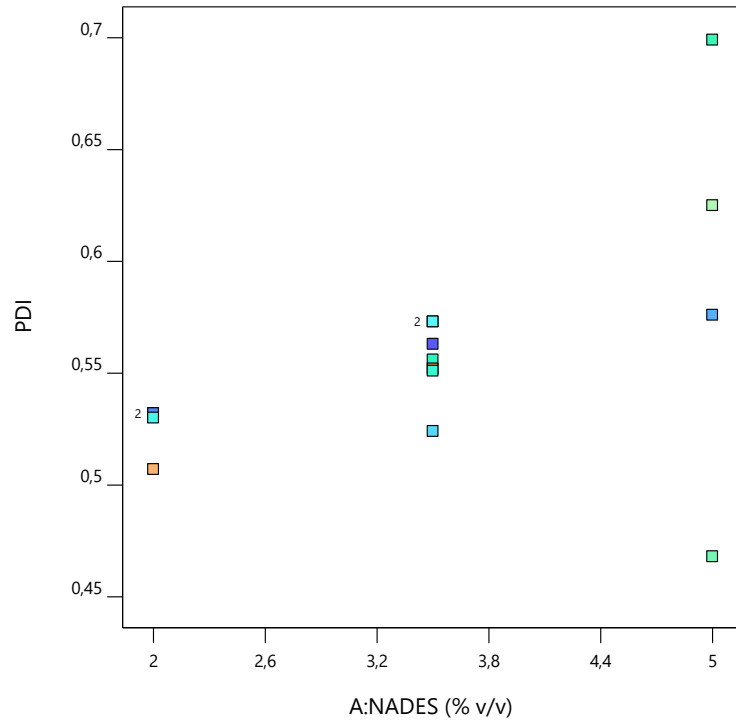


Διάγραμμα 35. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES, CS, Span 60 με το μέγεθος των σωματιδίων.

Δείκτης πολυδιασποράς PDI των νιοσωμάτων

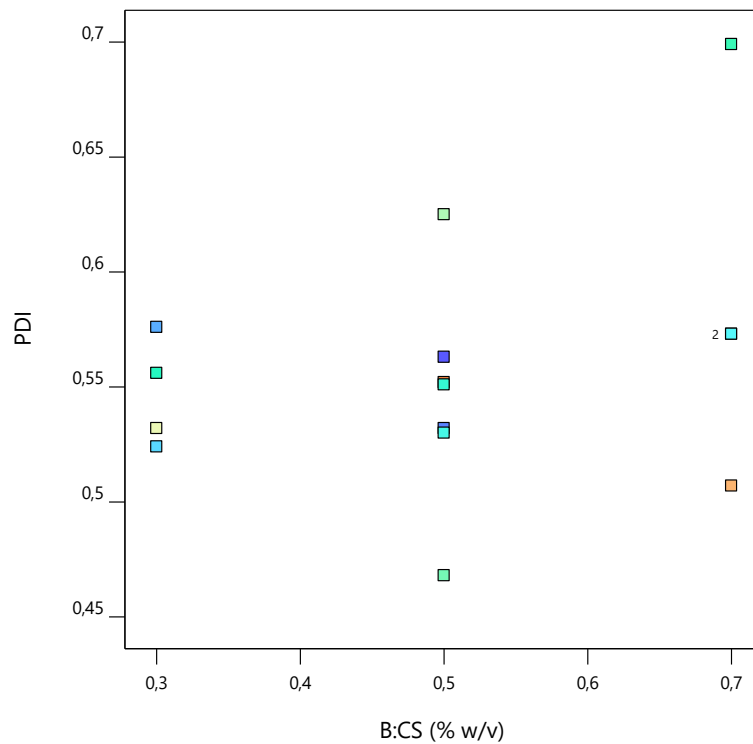
Ακολουθείται η ίδια διαδικασία ανάλυσης των ανεξάρτητων μεταβλητών ως προς την απόκριση του δείκτη πολυδιασποράς PDI.

Correlation: 0,477
Color points by
Run
1 15




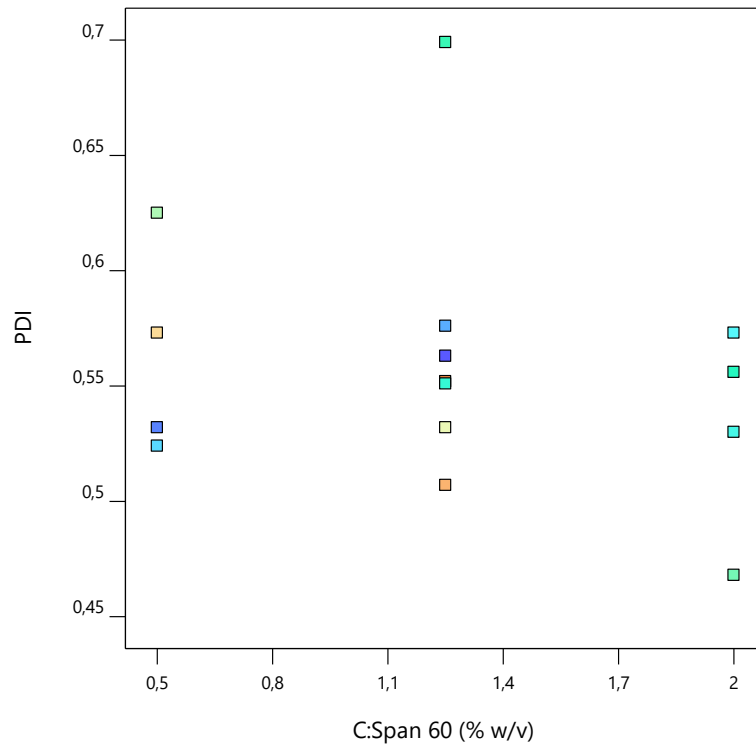
Διάγραμμα 36. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων

Correlation: 0,293
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 37. Συσχέτιση περιεκτικότητας CS με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων

Correlation: -0,227
 Color points by
 Run
 1 



Διάγραμμα 38. Συσχέτιση περιεκτικότητας Span 60 με τον δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων

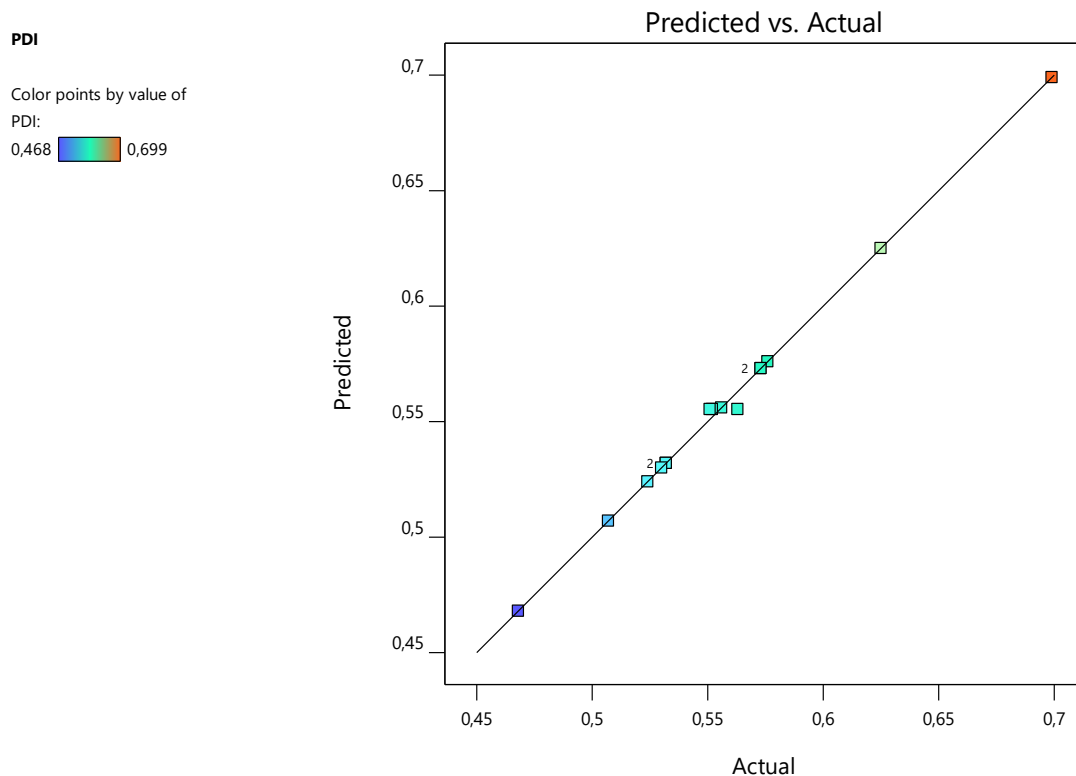
Με βάση τα διαγράμματα αποτυπώνεται η συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας NaDES, χιτοζάνης και Span 60 με τον δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων. Παρατηρείται πως για χαμηλότερες περιεκτικότητες NaDES 2 ή 3.5% v/v, ο δείκτης πολυδιασποράς είναι μικρότερος, ενώ για υψηλή περιεκτικότητα ίση με 5%, οι τιμές αυξάνουν και κατανέμονται ανομοιόμορφα. Για περιεκτικότητα χιτοζάνης ίση με 0.5% w/v, παρατηρείται μικρότερος δείκτης πολυδιασποράς, γεγονός το οποίο πιθανώς οφείλεται σε πιο ομοιόμορφη διαβροχή των σωματιδίων. Η αύξηση της περιεκτικότητας του επιφανειοδραστικού Span 60 συνεπάγεται μείωση του δείκτη πολυδιασποράς, ενώ για περιεκτικότητα ίση με 2 % w/v, παρουσιάζει την ελάχιστη τόσο απόλυτα όσο και κατά μέσο όρο μικρότερη τιμή του δείκτη πολυδιασποράς γεγονός το οποίο οφείλεται στην ιδιότητα του να προσδίδει συνοχή και σταθερότητα στα σωματίδια.

Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου, όπως και στην περίπτωση του μεγέθους, ελέγχεται ο λόγος λ των δύο ακραίων τιμών που λαμβάνει ο δείκτης πολυδιασποράς.

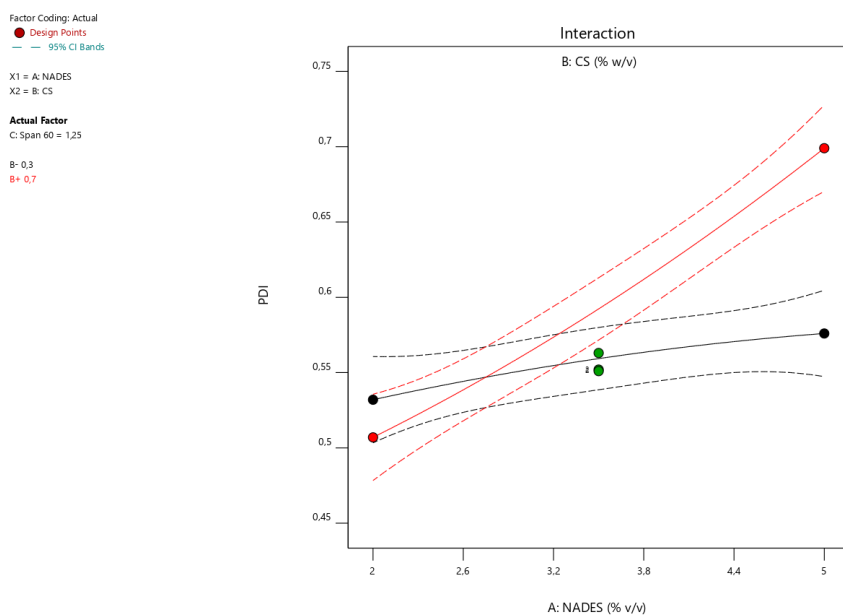
$$\lambda = \frac{\text{μέγιστη τιμή PDI}}{\text{ελάχιστη τιμή PDI}} = \frac{0.699}{0.498} = 1.493 < 10$$

Χωρίς λοιπόν να προηγηθεί κάποια μετατροπή ($\lambda < 10$), ακολουθεί στατιστική ανάλυση ANOVA, η οποία υποδεικνύει το τροποποιημένο κυβικό μοντέλο (cubic model) ως πιο κατάλληλο. Για το επιλεγμένο μοντέλο προέκυψε p value=0.0135<0.5. Το R^2 λαμβάνει την τιμή 0.9977 και επομένως η

προσαρμογή αναμένεται να έχει ιδιαίτερα μεγάλη ακρίβεια, ενώ προέκυψε Adjusted $R^2 = 0,9842$. Με βάση τις τιμές αυτές αναμένεται να παρουσιάζεται γραμμικότητα μεταξύ των τιμών που λαμβάνει ο δείκτης πολυδιασποράς καθώς και πολύ μικρή απόκλιση μεταξύ των προβλεπόμενων και ευρεθέντων τιμών, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από το ακόλουθο διάγραμμα:



Διάγραμμα 39. Πραγματικές τιμές δείκτη πολυδιασποράς και προβλεπόμενες από το μοντέλο

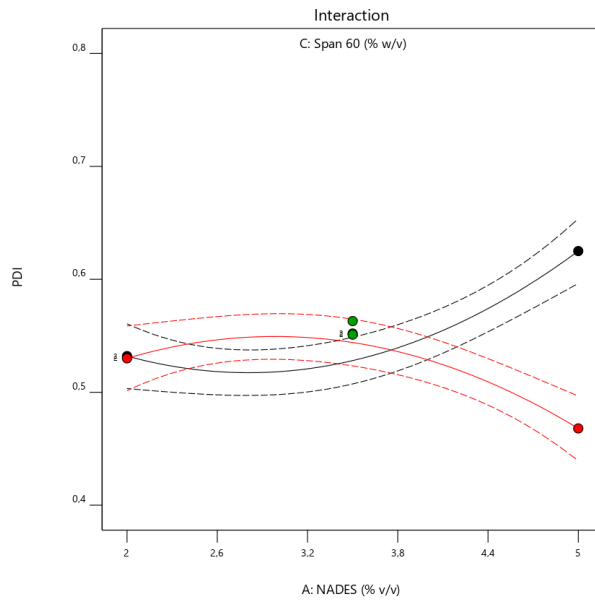


Διάγραμμα 40. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και χιτοζάνης ως προς το δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 --- 95% CI Bands

X1 = A: NADES
 X2 = C: Span 60

Actual Factor
 B: CS = 0,5
 C: 0,5
 C+ 2



Διάγραμμα 41. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και Span 60 ως προς το δείκτη πολυδιασποράς των σωματιδίων

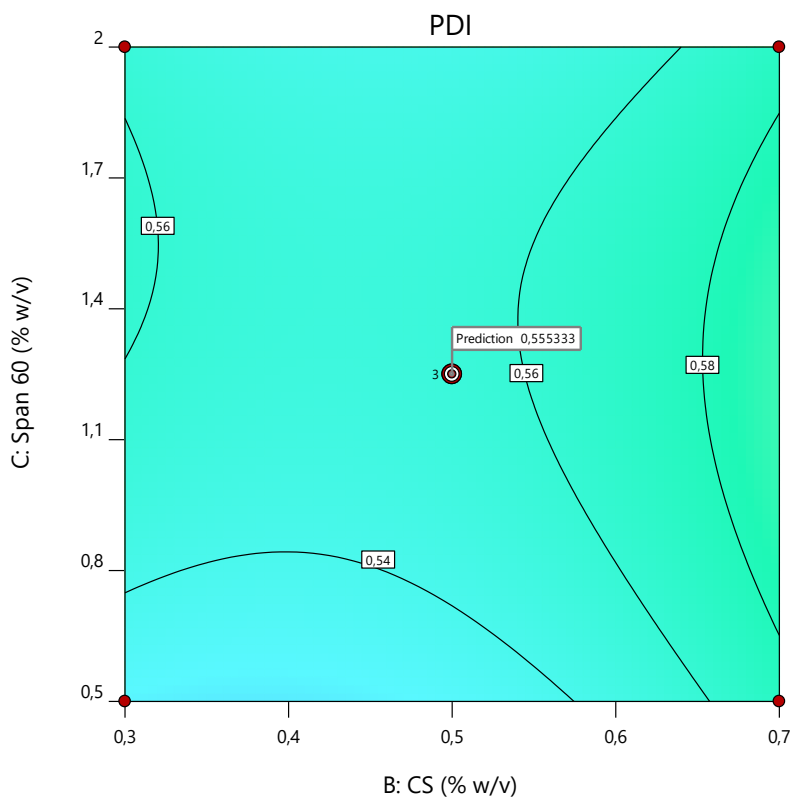
Οι τεμνόμενες ευθείες υποδηλώνουν τη συσχέτιση της περιεκτικότητας του NaDES τόσο με της χιτοζάνης όσο και με του Span 60 όσον αφορά την επίδραση τους στο δείκτη πολυδιασποράς.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 0,468 0,699

PDI = 0,552
 Std # 13 Run # 15

X1 = B: CS = 0,5
 X2 = C: Span 60 = 1,25

Actual Factor
 A: NADES = 3,5



Διάγραμμα 42. Συσχέτιση δείκτη πολυδιασποράς και περιεκτικότητας CS, Span 60

Με χρήση του παραπάνω διαγράμματος υπολογίζεται ενδεικτικά ο δείκτης πολυδιαφοράς των σωματιδίων για συγκεκριμένη περιεκτικότητα NaDES= 3.5 % v/v. Το σημείο (0.5% w/v CS, 1.25 % w/v Span 60), λαμβάνει τιμές δείκτη πολυδιαφοράς ίσες με: 0.563, 0,552, 0,551, ενώ αναμένεται να δημιουργήσει σωματίδια με δείκτη πολυδιαφοράς 0.555. Οι αποκλίσεις από την κάθε τιμή ξεχωριστά είναι πολύ μικρές, γεγονός αναμενόμενο αφού στο διάγραμμα συσχέτισης των προβλεπόμενων τιμών με τις πραγματικές, οι πειραματικά ευρεθείσες βρίσκονται πάνω στην ευθεία του μοντέλου.

Τέλος ακολουθεί τρισδιάστατο διάγραμμα όπου συνοψίζεται το επιλεγμένο μοντέλο και καθίστανται δυνατός ο υπολογισμός του δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων.

Factor Coding: Actual

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

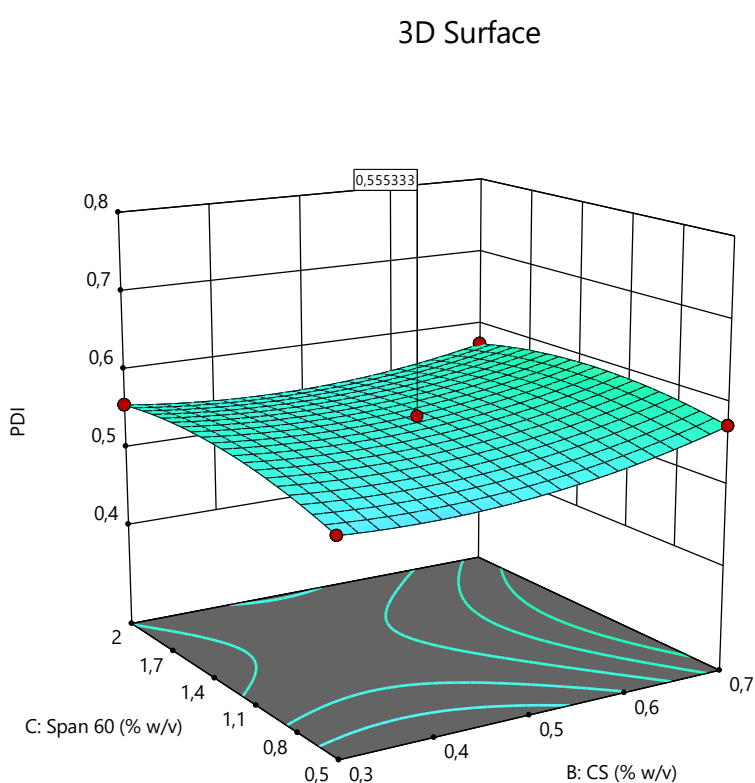
0,468  0,699

X1 = B: CS

X2 = C: Span 60

Actual Factor

A: NADES = 3,5

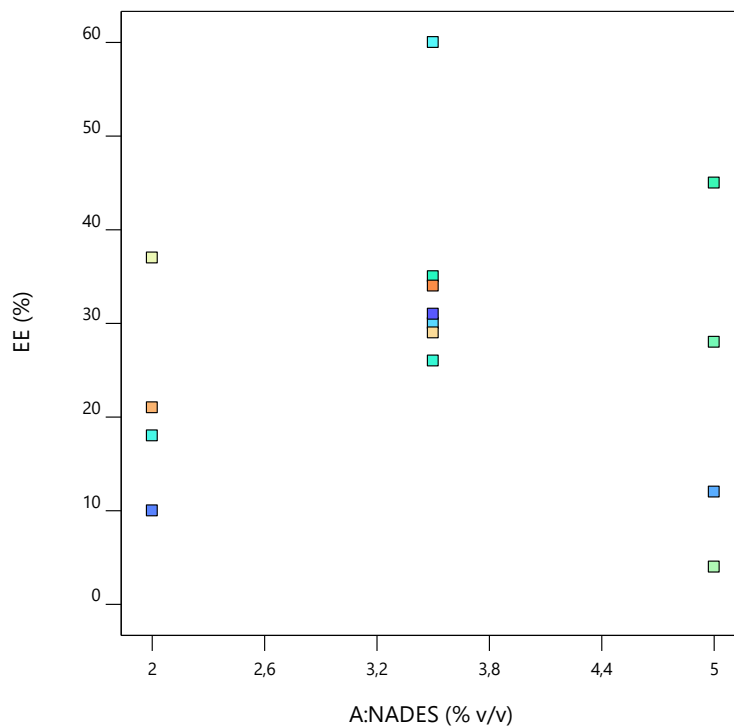


Διάγραμμα 43. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES, CS, Span 60 δείκτη πολυδιασποράς PDI των σωματιδίων.


Απόδοση εγκλεισμού EE% των νιοσωμάτων

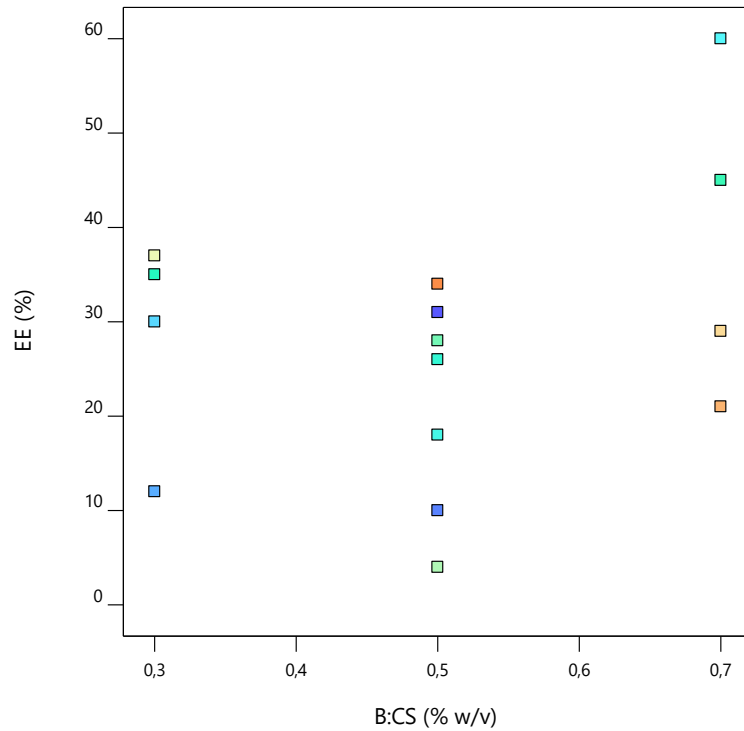
Ακολουθεί ανάλυση της επίδρασης της περιεκτικότητας των ανεξάρτητων μεταβλητών, NaDES (%v/v), CS (%w/v) και Span 60 (%w/v) στην απόδοση εγκλεισμού EE%.

Correlation: 0.020
Color points by
Run
1 15




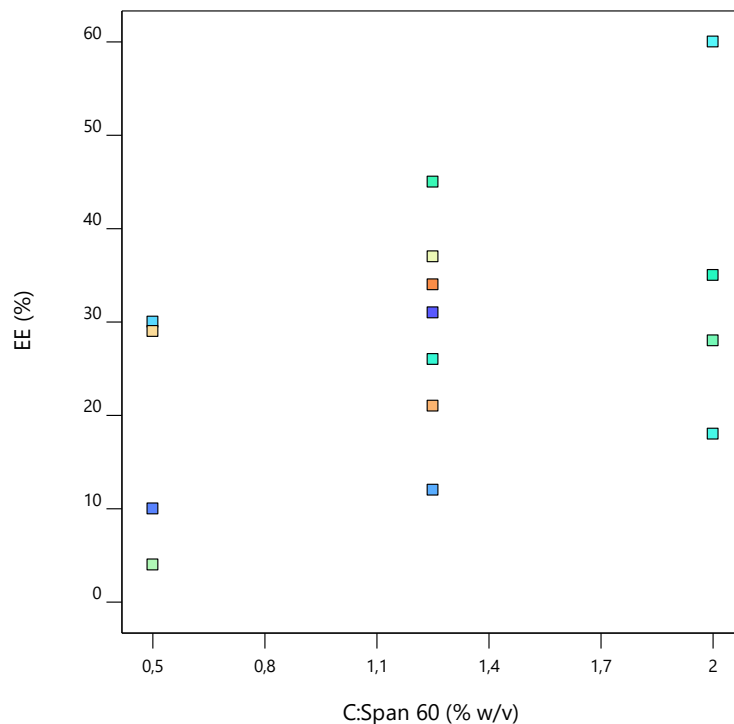
Διάγραμμα 44. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES με την απόδοση εγκλεισμού

Correlation: 0,274
 Color points by
 Run
 1 



Διάγραμμα 45. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης με την απόδοση εγκλεισμού

Correlation: 0,454
 Color points by
 Run
 1 



Διάγραμμα 46. Συσχέτιση περιεκτικότητας Span 60 με την απόδοση εγκλεισμού

Με βάση τα διαγράμματα αποτυπώνεται η συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας NaDES, χιτοζάνης και Span 60 με την απόδοση εγκλεισμού. Παρατηρείται πως για περιεκτικότητα NaDES ίση με 3.5% v/v αυξάνεται η τιμή απόδοσης εγκλεισμού. Όσον αφορά την περιεκτικότητα της χιτοζάνης w/v,

μεγαλύτερες αποδόσεις παρατηρούνται για τιμή περιεκτικότητας ίση με 0.7 %, Το συγκεκριμένο γεγονός συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, όπου η αύξηση της κίτοζάνης μέχρι ένα κρίσιμο σημείο συνεπάγεται την αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού. Η αύξηση της περιεκτικότητας του Span 60 οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού, ενώ για τιμή περιεκτικότητας 2% w/v παρατηρείται και η μέγιστη τιμή απόδοσης εγκλεισμού.

Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου αρχικά ελέγχεται ο λόγος των δύο ακραίων τιμών που λαμβάνει το μέγεθος των σωματιδίων:

$$\lambda = \frac{\text{μέγιστη τιμή EE\%}}{\text{ελάχιστη τιμή EE\%}} = \frac{60}{4} = 15 > 10$$

Εφόσον προέκυψε $\lambda > 10$ πραγματοποιείται μετατροπή των τιμών απόδοσης εγκλεισμού. (λογαρίθμηση με βάση το φυσικό νεπέριο λογάριθμο, ln).


Δοκιμάζονται τα ακόλουθα μοντέλα με το quadratic να παρουσιάζει καλύτερη προσαρμογή.

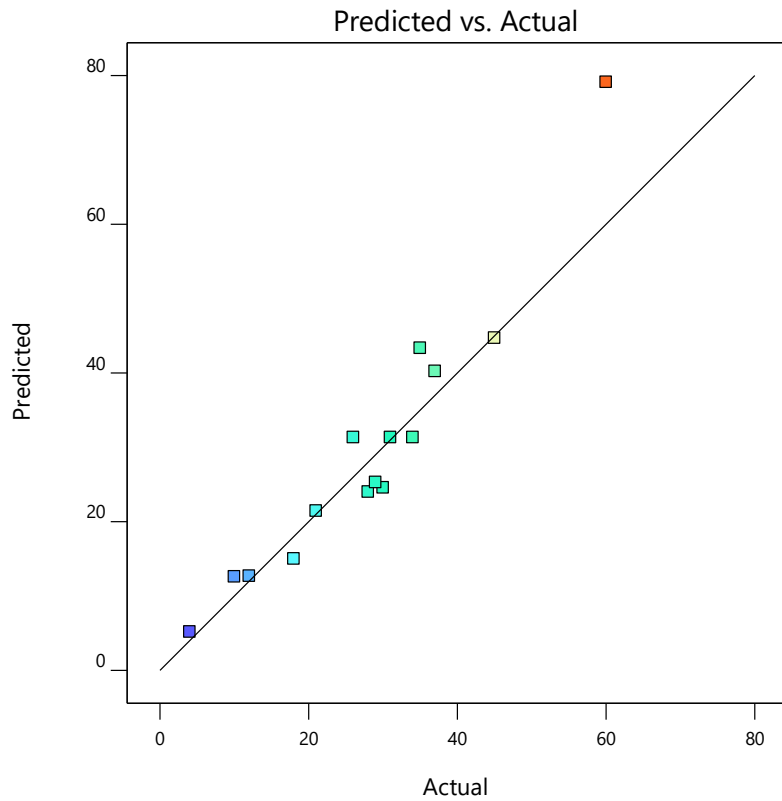
Πίνακας 25. Προτεινόμενα μοντέλα συσχέτισης απόδοσης εγκλεισμού EE% με τις ανεξάρτητες μεταβλητές (NaDES, CS, Span 60)

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Linear	0.3038	0.0352	0.0729	-0.5276	
2FI	0.3768	0.0340	0.1160	-1.5536	
Quadratic	0.0096	0.1402	0.8309	0.1134	Suggested
Cubic	0.1402		0.9595		Aliased

Κατά την στατιστική ανάλυση ANOVA, επιλέχθηκε ως πιο κατάλληλο το μοντέλο το quadratic με p value=0.0143<0.5 , f value=8.64, ενώ η έλλειψη προσαρμογής (lack of fit) προέκυψε ίση με 0.1402>0.05, και επο'μενως δεν θεωρείται σημαντική. Το R² λαμβάνει την τιμή 0.9396, η οποία έπεται ιδιαίτερα καλή προσαρμογή ενώ προέκυψε Adjusted R² =0,8309 και Predicted R²=0,1134. Η διαφορά Adjusted R² - Predicted R²>0.2. Στο ακόλουθο διάγραμμα διαφαινόνται οι αποκλίσεις από τις προβλεπόμενες τιμές.

EE
(adjusted for curvature)

Color points by value of
EE:
1,386  4,094



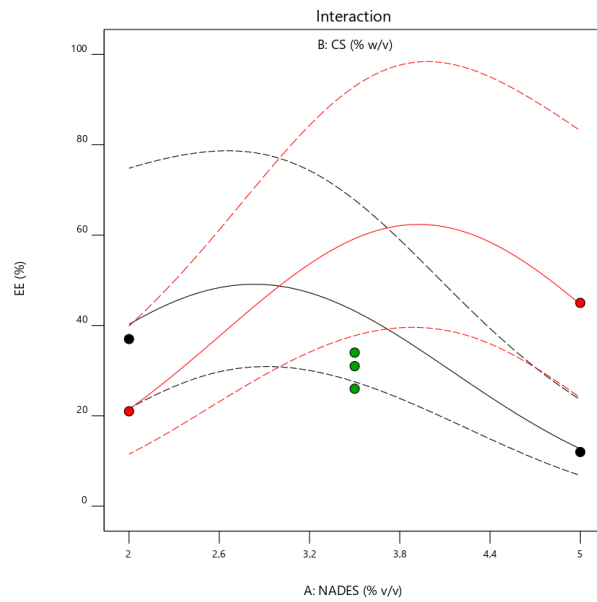
Διάγραμμα 47 . Πραγματικές τιμές απόδοσης εγκλεισμού και προβλεπόμενες από το μοντέλο

Factor Coding: Actual
● Design Points
--- 95% CI Bands

X1 = A: NADES
X2 = B: CS

Actual Factor
C: Span 60 = 1,25

B= 0,3
B= 0,7



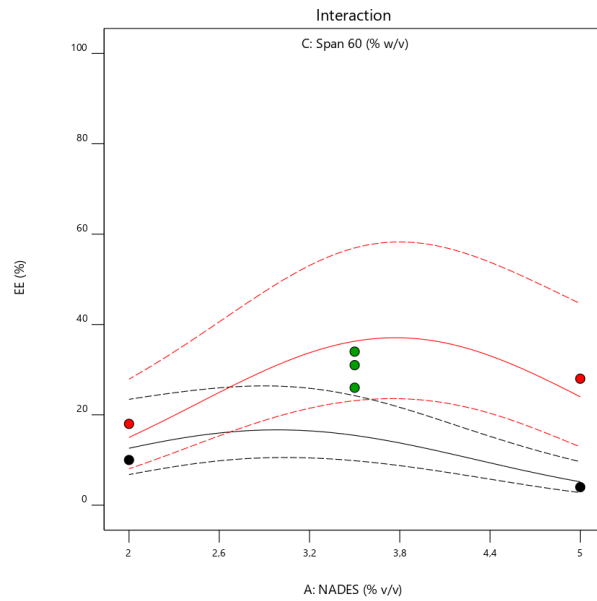
Διάγραμμα 48. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και χιτοζάνης ως προς την απόδοση εγκλεισμού

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 --- 95% CI Bands

X1 = A: NaDES
 X2 = C: Span 60

Actual Factor
 B: CS = 0,5

C- 0,5
 C+ 2



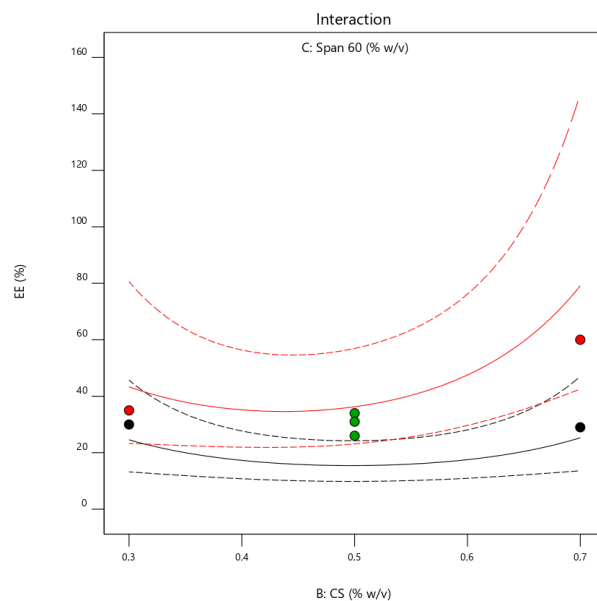
Διάγραμμα 49. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES και Span 60 ως προς την απόδοση εγκλεισμού

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 --- 95% CI Bands

X1 = B: CS
 X2 = C: Span 60

Actual Factor
 A: NaDES = 3,5

C- 0,5
 C+ 2



Διάγραμμα 50. Συσχέτιση περιεκτικότητας χιτοζάνης και Span 60 ως προς την απόδοση εγκλεισμού.

Η περιεκτικότητα του NaDES και της χιτοζάνης επιδρούν συνεργιστικά στην απόδοση εγκλεισμού (τέμνουσες καμπύλες στο διάγραμμα), ενώ η περιεκτικότητα του Span 60 φαίνεται να επηρεάζει την EE%, χωρίς να επηρεάζεται παράλληλα από τις περιεκτικότητες του NaDES και της χιτοζάνης (μη τέμνουσες καμπύλες).

Factor Coding: Actual

● Design Points

4  60

EE (%) = 34

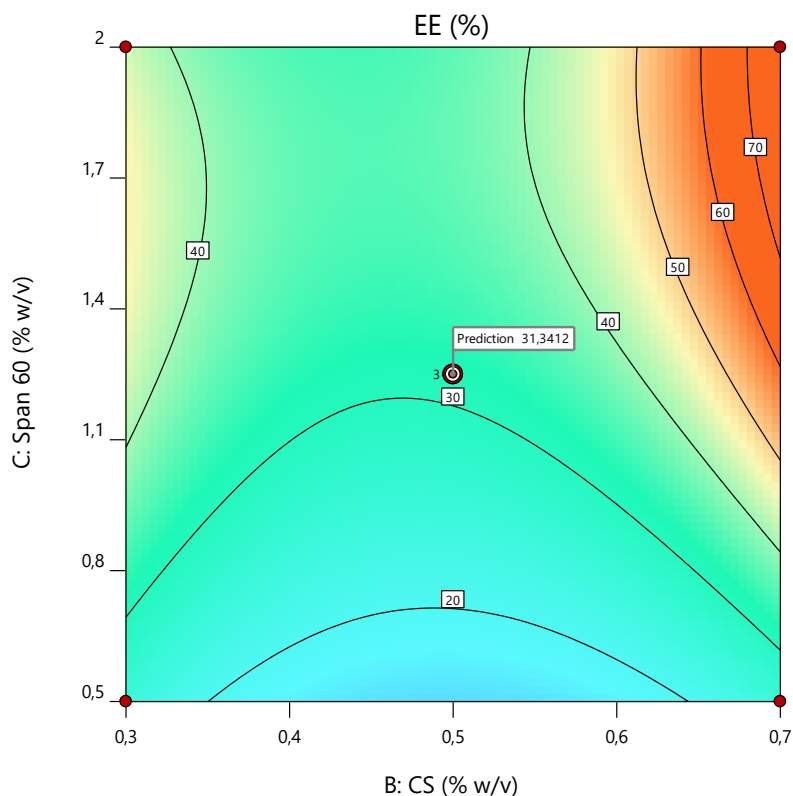
Std # 13 Run # 15

X1 = B: CS = 0,5

X2 = C: Span 60 = 1,25

Actual Factor

A: NADES = 3,5



Διάγραμμα 51. Συσχέτιση απόδοσης εγκλεισμού και περιεκτικότητας CS και Span 60

Με χρήση του παραπάνω διαγράμματος υπολογίζεται ενδεικτικά η απόδοση εγκλεισμού των σωματιδίων για συγκεκριμένη περιεκτικότητα NaDES = 3.5 % v/v. Το σημείο (0.5% w/v CS, 1.25 % w/v Span 60), αντιστοιχίζεται σε τιμές EE% ίσες με: 26%, 31% και 34%, ενώ με βάση το μοντέλο αναμένεται τιμή 31%.

Τέλος ακολουθεί τρισδιάστατο διάγραμμα όπου συνοψίζεται το επιλεγμένο μοντέλο και καθίστανται δυνατός ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλεισμού EE%.

Factor Coding: Actual

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

4  60

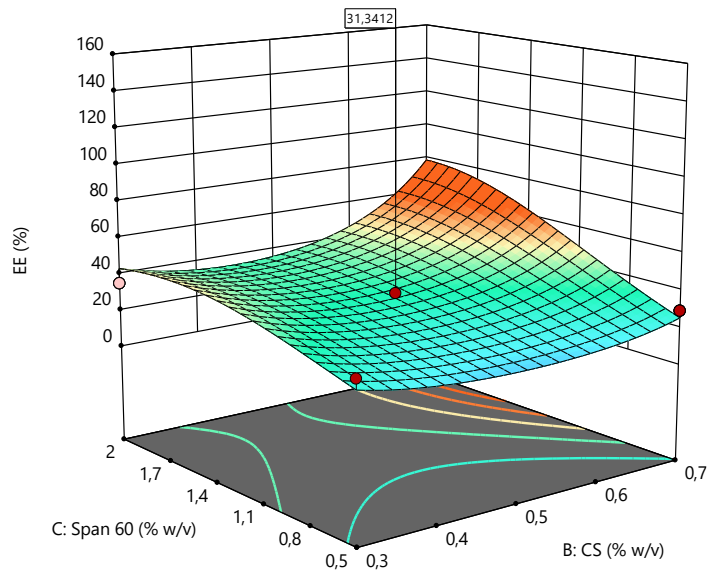
X1 = B: CS

X2 = C: Span 60

Actual Factor

A: NADES = 3,5

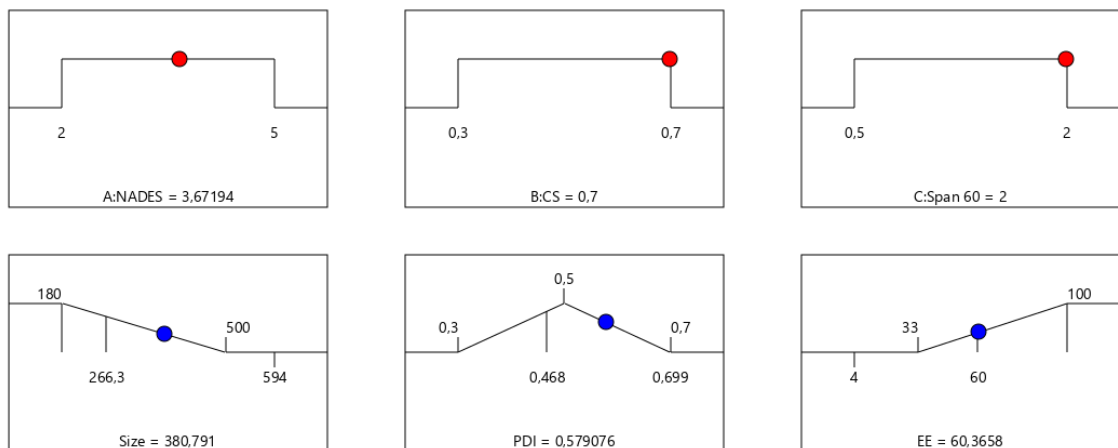
3D Surface



Διάγραμμα 52. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES, CS, Span 60 με την απόδοση εγκλεισμού EE%.

Βελτιστοποίηση νιοσωμάτων

Με βάση όλων των παραμέτρων και των αντίστοιχων μοντέλων, η σύνθεση των νιοσωμάτων βελτιστοποιείται για τις ακόλουθες περιεκτικότητες, ενώ οι αποκρίσεις λαμβάνουν τις εξής τιμές:



Desirability = 0,443
Solution 1 out of 45

Σχήμα 22. Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών σύνθεσης νιοσωμάτων και αναμενόμενες αποκρίσεις

Επόμενο στάδιο αποτέλεσε η σύνθεση νισώματα με τα εξής χαρακτηριστικά:

Πίνακας 26. Παράμετροι για σύνθεση βέλτιστων νισωμάτων

Νισώματα		
NaDES (% v/v)	CS (%w/v)	Span 60 (%w/v)
3.65	0.7	2

Με βάση αυτές τις αναλογίες παρασκευάστηκαν τα 'βέλτιστα' νισώματα, των οποίων τα μεγέθη, ο δείκτης πολυδιασποράς PDI, το ζ-δυναμικό καθώς η απόδοση εγκλεισμού EE%, συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 27. Μέγεθος, PDI, EE% για τις βέλτιστες αναλογίες των νισωμάτων

Βέλτιστα Νισώματα				
	Μέγεθος (nm)	PDI	zeta (mV)	EE%
	528.6	0.600	31.5	67
	491.2	0.533	37.1	52
	426.7	0.577	40.0	52
Μέση Τιμή	482.2 ± 42.1	0.570 ± 0.028	36.2 ± 3.5	

Για τον μέσο όρο των τιμών των αποκρίσεων κατασκευάζεται πίνακας όπου συγκρίνονται με τα προβλεπόμενα από τον πειραματικό σχεδιασμό καθώς και οι αποκλίσεις οι οποίες παρουσίασαν.

Πίνακας 28. Σύγκριση πειραματικών και προβλεπόμενων αποκρίσεων των νισωμάτων

Βέλτιστα Νισώματα			
	Μέγεθος (nm)	PDI	EE%
Πειραματικά	482.2	0.570	57
Προβλεπόμενα	380.8	0.579	60
Αποκλίσεις (%)	26.6	1.554	5

Οι αποκλίσεις οι οποίες παρουσιάστηκαν είναι αναμενόμενες, ενώ μεγαλύτερη παρατηρείται ως προς το μέγεθος των σωματιδίων, το οποίο μπορεί να μειωθεί με αύξηση του χρόνου των υπερήχων.

Σύγκριση εναλλακτικών διαλυτών

Ακόμη όπως και στην περίπτωση των χιτοσωμάτων παρασκευάστηκαν νισώματα με χρήση διαφορετικών διαλυτών (αντί του NaDES Bet:LA). Στα νισώματα η χρήση του επιφανειοδραστικού δεν μπορεί να παραληφθεί καθώς το Span 60 αποτελεί βασικό συστατικό της μεμβράνης, έναντι της φωσφατιδυλοχολίνης, η οποία συνιστά τη φωσφολιπιδική μεμβράνη των χιτοσωμάτων. Αρχικά δοκιμάστηκε η διαλυτοποίηση της χιτοζάνης σε διάλυμα σκέτου γαλακτικού οξέος, όμοιας περιεκτικότητας με της προβλεπόμενης για το συνδυασμό βεταΐνης-γαλακτικού οξέος, ίση με 3.67 % v/v LA. Η εν λόγω

διαβροχή παρασκευάστηκε με προσθήκη 3.67 ml LA σε 100 ml υπερκάθαρο νερό, ενώ οι υπόλοιπες αναλογίες διατηρήθηκαν σταθερές (0.7 % w/v CS, 2 Span 60). Στη συνέχεια παρασκευάστηκε διάλυμα αποτελούμενο από Bet:LA, χωρίς θέρμανση και ανάδευση, αποτελούμενο από 1.383 g Bet και 2.654 g LA, δίχως αυτά να σχηματίζουν βαθώς ευτηκτικό διαλύτη. Μετά τη σύνθεση των σωματιδίων ακολούθησαν οι γνωστές αναλύσεις προς υπολογισμό του μεγέθους τους, του δείκτη πολυδιασποράς, του ζ-δυναμικού και της απόδοσης εγκλεισμού προς τη μεταξύ τους σύγκριση.



Εικόνα 27. Λυοφιλωμένα σωματίδια (54: χιτοσώματα με διαλύτη γαλακτικό οξύ, 56: χιτοσώματα με διαλύτη φυσικό μείγμα, 49: νιοσώματα με διαλύτη γαλακτικό οξύ, 48: νιοσώματα (blank), 52: χιτοσώματα, 47: νιοσώματα)

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 29. Σύγκριση μεγέθους, PDI, EE% για διαφορετικούς διαλύτες

Νιοσώματα				
Διάλυμα διαβροχής	Μέγεθος (nm)	PDI	zeta (mV)	EE%
3.65% v/v δ. NaDES (Bet:LA, ½)	482.2 ± 42.1	0.570 ± 0.028	36.2 ± 3.5	57
3.65% v/v δ. Γαλακτικού οξέως (LA)	308.6 ± 37.3	0.499 ± 0.046	22.0 ± 0.9	53
3.65% v/v δ. Bet:LA ½ (Φυσικό μείγμα)	392.3 ± 89.9	0.598 ± 0.071	40.6 ± 1.1	65

Όσον αφορά το μέγεθος των κυστιδίων, το μεγαλύτερο παρουσιάστηκε για τη διαβροχή με 3.65% v/v δ. NaDES (Bet:LA, ½), ενώ το μικρότερο για τη διαβροχή με σκέτο γαλακτικό οξύ. Στην περίπτωση όμως του γαλακτικού οξέος η τιμή του ζ-δυναμικού είναι αρκετά μικρότερη, με αποτέλεσμα την όχι και τόσο καλή σταθερότητα, καθώς στην περίπτωση των νιοσωμάτων οφείλει σύμφωνα με τη βιβλιογραφία να λαμβάνει τιμή μεγαλύτερη των 30 mV. Η περίπτωση του φυσικού μείγματος οδήγησε στη δημιουργία σχετικά καλών προδιαγραφών σωματιδίων, τα οποία όμως δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη ομοιόμορφη κατανομή. Έπεται λοιπόν πως η χρήση Bet:LA είναι καθοριστική για τη σύνθεση των νιοσωμάτων. Η συνολική απόδοση διεργασίας ήταν

υψηλότερη για τον κανονικό συνδυασμό, ο οποίος και κρίνεται συνολικά ως προτιμητέος για τον εγκλεισμό της καφεΐνης.

Μελέτη απελευθέρωσης (In Vitro Release Study)

Για τη μελέτη της κινητικής απελευθέρωσης της καφεΐνης, τόσο για τα χιτοσώματα όσο και για τα νιοσώματα, εφαρμόζεται η μέθοδος των μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης. Το διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται, το οποίο και παίζει ρόλο εξωτερικού περιβάλλοντος επιλέγεται να είναι όξινο, ως ισοτονικό με το pH του δέρματος. Το ισοτονικό διάλυμα παρασκευάστηκε με την ανάμειξη διαλύματος όξινου φωσφορικού καλίου και δισόξινου φωσφορικού καλίου. Η διαδικασία περιγράφεται συνοπτικά ακολούθως:

- I. Διάλυση 1.74 g K_2HPO_4 σε 100 ml υπερκάθαρο νερό ($\Delta 2$)
- II. Διάλυση 2.07 g KH_2PO_4 σε 150 ml υπερκάθαρο νερό ($\Delta 1$)
- III. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος με pH 5.50, χρήση 100 ml εκ του διαλύματος $\Delta 1$ και ρύθμιση με το $\Delta 2$.
- IV. Τοποθέτηση διασποράς των σωματιδίων σε μεμβράνη.
- V. Τοποθέτηση της μεμβράνης στο παρασκευασθέν διάλυμα και τοποθέτηση του συστήματος σε μάτι με σταθερή θερμοκρασία $T=37^\circ C$, υπό ανάδευση.
- VI. Συλλογή 2 ml εκ του διαλύματος σε δοχείο erendorf, ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (20 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 1d, 2d) και προσθήκη 2 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα προς μη μεταβολή του όγκου.
- VII. Εύρεση απορρόφησης με χρήση του οργάνου UV-Vis.

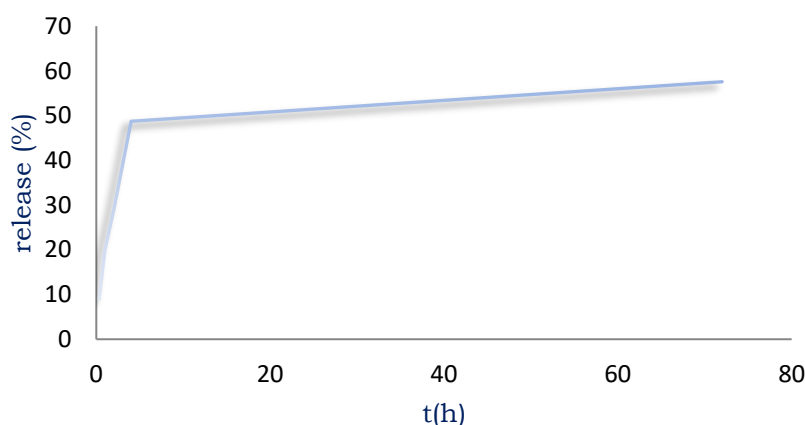


Εικόνα 28. Μεμβράνη διάλυσης-διάχυσης

Με βάση τις απορροφήσεις και για γνωστή ποσότητα εγκλεισμένης καφεΐνης (έχει προηγηθεί ο υπολογισμός απόδοσης εγκλεισμού), υπολογίζεται η ποσότητα που απελευθερώθηκε και στη συνέχεια κατασκευάζονται

διαγράμματα απορρόφησης χρόνου με στόχο την εύρεση του κινητικού μοντέλου που περιγράφει τη συγκεκριμένη αποδέσμευση. Η μελέτη απελευθέρωσης πραγματοποιήθηκε για δείγμα χιτοσωμάτων και νιοσωμάτων τα οποία είχαν τις 'βέλτιστες' αναλογίες, που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό. Ακολούθως διαφαίνονται οι προσαρμογές στα γνωστά κινητικά μοντέλα για τα χιτοσώματα αρχικά και στη συνέχεια για τα νιοσώματα.

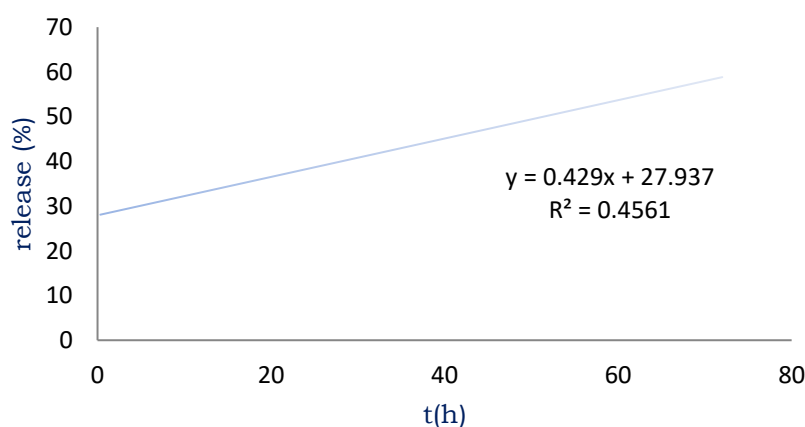
Chitosomes



Διάγραμμα 53. Αποδέσμευση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα συναρτήσει του χρόνου

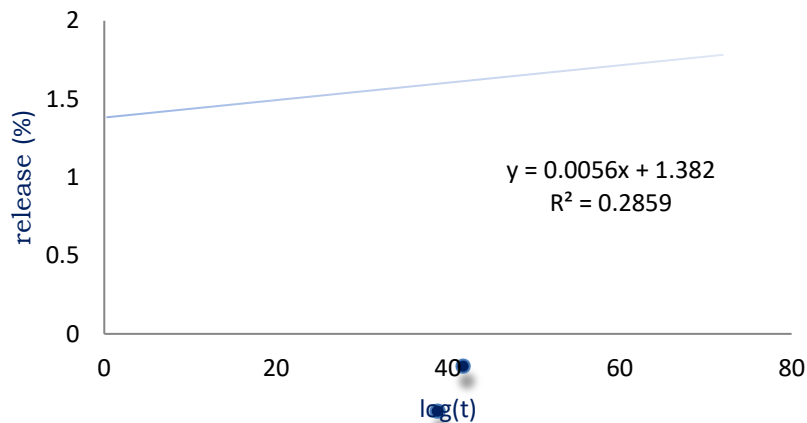
Μέσω του διαγράμματος γίνεται αντιληπτή η διαφασική απελευθέρωση της καφεΐνης, καθώς παρουσιάζεται αρχικά μία φάση έκρηξης (burst effect) και στη συνέχεια παρατηρείται επιβράδυνση του φαινομένου της απελευθέρωσης με τη δημιουργία πλάτος (plateau). Το 50% της καφεΐνης έχει απελευθερωθεί ήδη από τις πρώτες τέσσερις ώρες. Εφόσον παρουσιάζεται burst effect η κινητική μηδενικής τάξης δεν αναμένεται να περιγράφει καλά τη συγκεκριμένη απελευθέρωση και διαφαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα.

Zero order model



Διάγραμμα 54. Μοντέλο μηδενικής τάξης για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα

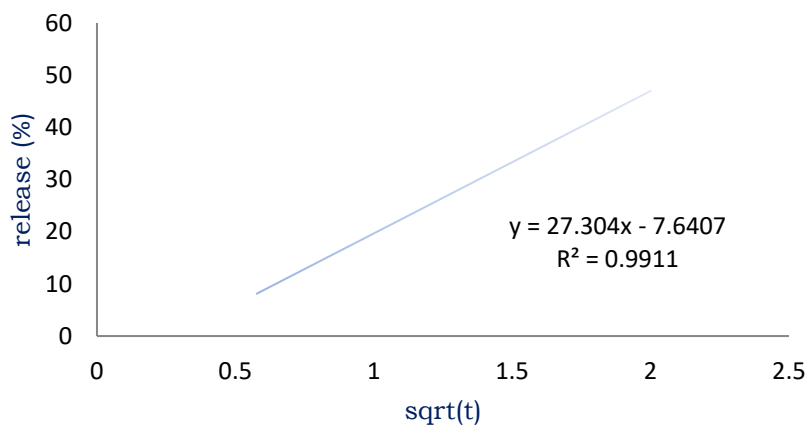
First order model



Διάγραμμα 55. Μοντέλο πρώτης τάξης για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα

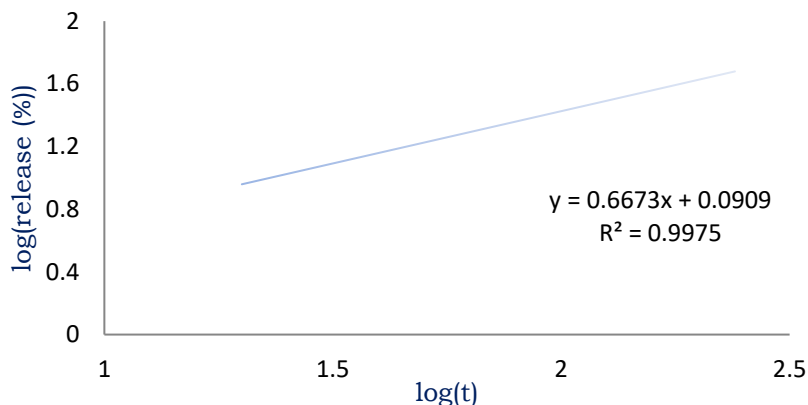
Τα μοντέλα μηδενικής και πρώτης τάξης δεν περιγράφουν καλά το σύστημα καθώς ο ρυθμός απελευθέρωσης δεν είναι σταθερός και δεν λαμβάνουν υπόψη τα δομικά χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των σωματιδίων. Ακολουθούν τα μοντέλα Higuchi και Korsmeyer-Perppas τα οποία αναμένεται να έχουν πολύ καλή προσαρμογή για το σύστημα καφεΐνης-χιτοσωμάτων, καθώς στις σταθερές τους συμπεριλαμβάνονται οι εκάστοτε ιδιότητες των σωματιδίων.

Higuchi model



Διάγραμμα 56. Μοντέλο Higuchi για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα

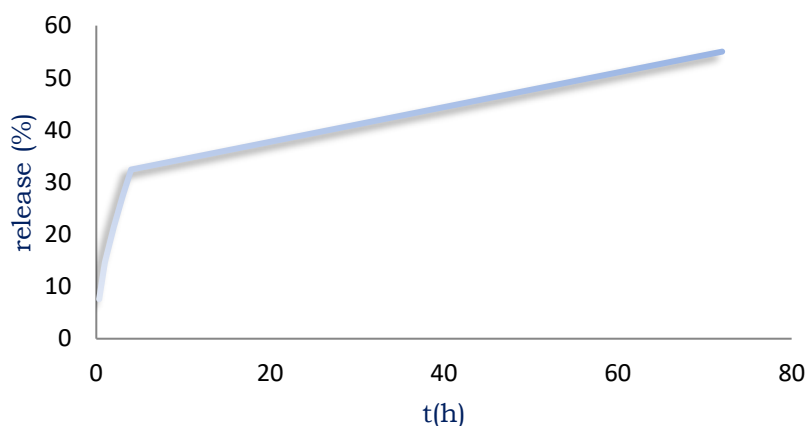
Korsmeyer-Peppas model



Διάγραμμα 57. Μοντέλο Korsmeyer-Peppas για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα

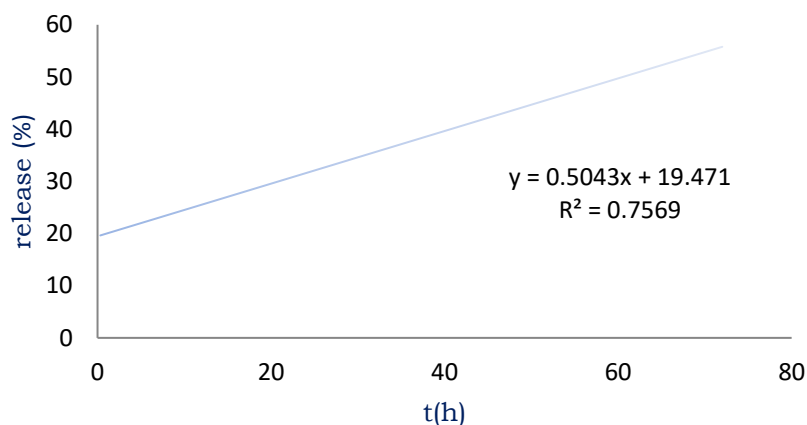
Και τα δύο μοντέλα παρουσίασαν $R^2 > 99\%$, γεγονός το οποίο οδηγεί σε πολύ καλή πρόβλεψη των υπολοίπων τιμών της απελευθέρωσης. Το μοντέλο Korsmeyer-Peppas, μπορεί βέβαια να χρησιμοποιηθεί μόνο για το πρώτο 60% των δεδομένων. Αποτελεί ημι-εμπειρικό μοντέλο και επομένως για την περιγραφή της κινητικής της απελευθέρωσης επιλέγεται το μοντέλο Higuchi. Παρότι είναι ημι-εμπειρικό περιγράφει αξιόπιστα τους παράγοντες που καθορίζουν την κινητική απελευθέρωσης. Η κλίση στο διάγραμμα ισούται με τον εκθέτη n . Για τις συγκεκριμένες αναλογίες προέκυψε $n=0.66$, δηλαδή το $n \in [0.5, 1]$. Για αυτές τις τιμές του εκθέτη το σύστημα περιγράφεται από μη Fickian διάχυση και τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα. Τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των χιτοσωμάτων σε ισοτονικό διάλυμα προκαλούν τη συρρίκνωση των κυστιδίων και έτσι δυσχεραίνεται η διάχυση της καφεΐνης. Όμοια παραθέτονται τα αντίστοιχα διαγράμματα για τα νισώματα, τα οποία αναμένεται να έχουν παρόμοια συμπεριφορά.

Niosomes



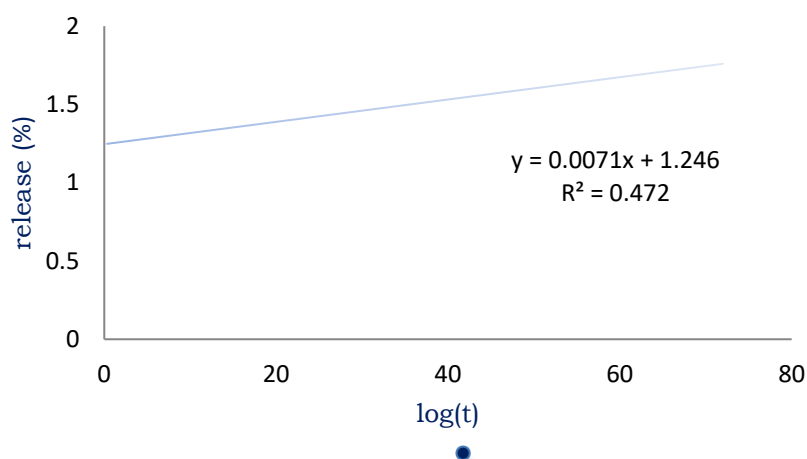
Διάγραμμα 58. Αποδέσμευση της καφεΐνης από τα νισώματα συναρτήσεως του χρόνου

Zero order model



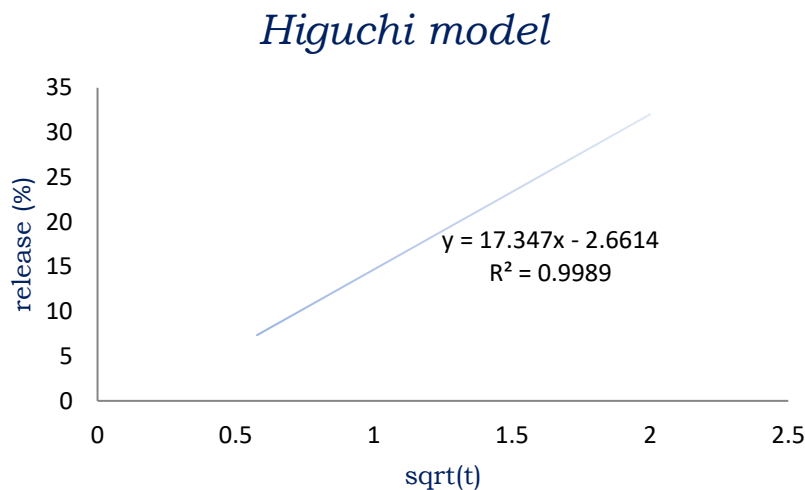
Διάγραμμα 59. Μοντέλο μηδενικής τάξης για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα νισώματα

First order model

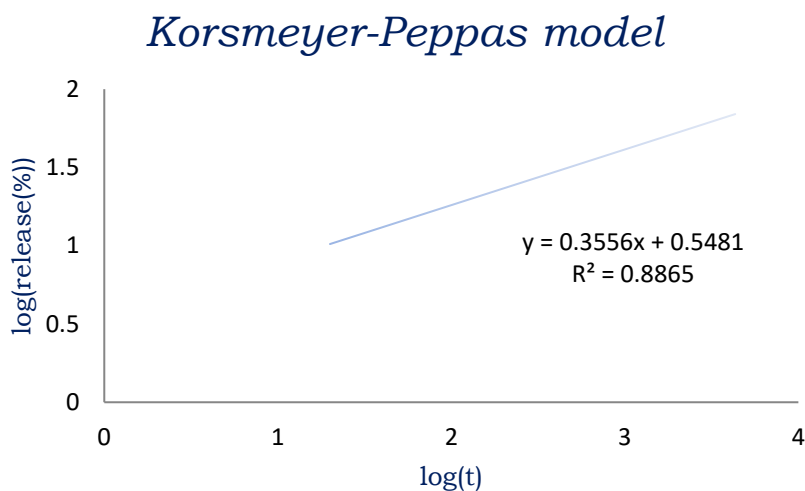


Διάγραμμα 60. Μοντέλο πρώτης τάξης για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα νισώματα

Όπως και στην περίπτωση των χιτοσωμάτων, παρατηρείται διφασικό προφίλ απελευθέρωσης της καφεΐνης, ενώ το μηδενικό και πρώτης τάξεως μοντέλο δεν παρουσιάζουν καλή προσαρμογή εφόσον έχουν $R^2=75$ και 48% αντίστοιχα. Το μηδενικής τάξης είναι καλύτερο και υποδεικνύει πιθανή εξάρτηση από τη διάχυση.



Διάγραμμα 61. Μοντέλο Higuchi για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα νισώματα



Διάγραμμα 62. Μοντέλο Korsmeyer-Peppas για την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα νισώματα

Σε αντίθεση με την περίπτωση των χιτοσωμάτων, λόγω της απουσίας των φωσφολιπιδίων (φωσφατιδυλοχολίνης), τα νισώματα έχουν πιο σφιχτές μεμβράνες, οι οποίες διευκολύνουν τη διέλευση της καφεΐνης και επικρατεί το φαινόμενο της διάχυσης. Το γεγονός αυτό επαληθεύεται και μέσω του διαγράμματος Korsmeyer-Peppas, όπου προκύπτει τιμή $n=0.36$, όπου $n \leq 0.5$, γεγονός το οποίο συνεπάγεται την περιγραφή του συστήματος από Fickian διάχυση, δηλαδή κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης. Η κατά Fick διάχυση συμφωνεί και με το μοντέλο Higuchi, το οποίο παρουσιάζει εξαιρετική εφαρμογή με $R^2=99\%$

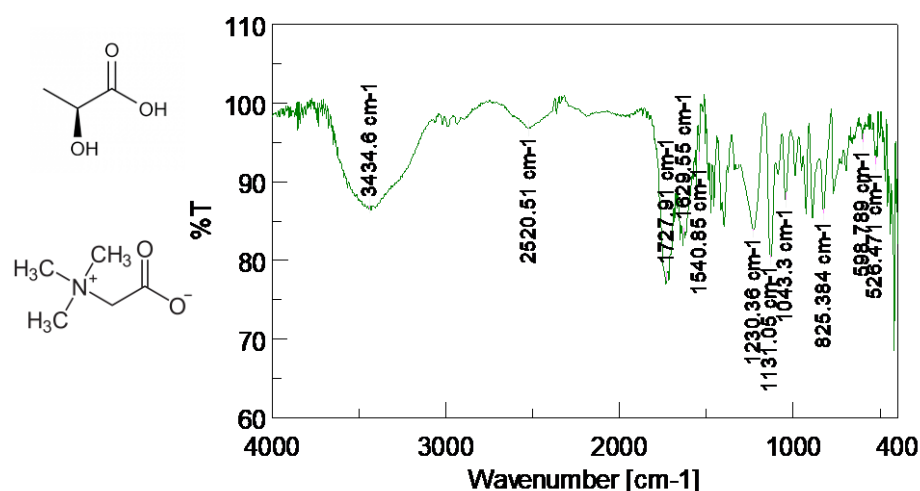
Εν κατακλείδι το μοντέλο Higuchi περιγράφει ικανοποιητικά την απελευθέρωση της καφεΐνης και από τα δύο τύπων σωματίδια, ενώ το μοντέλο Korsmeyer-Peppas υποδεικνύει ότι η αποδέσμευση στα χιτοσώματα οφείλεται τόσο στη

διάχυση όσο και στη διόγκωση των σωματιδίων ενώ στα νιοσώματα καθορίζεται από τη διάχυση.

Μελέτη δομής μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Τα νανοσυστήματα που παρασκευάστηκαν, οι φορείς και η ελεύθερη καφεΐνη μελετήθηκαν δομικά με χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR) χρησιμοποιώντας ταμπλέτες βρωμιούχου καλίου (KBr pellets).

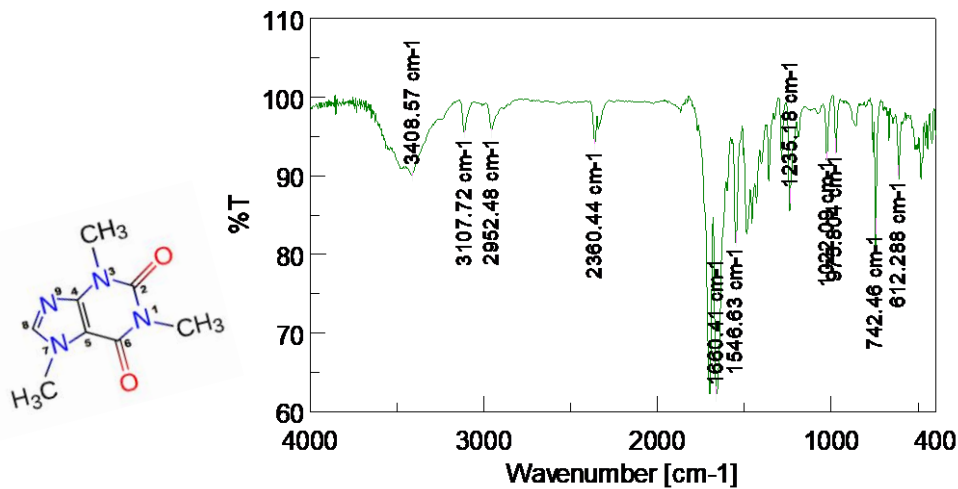
Αρχικά προετοιμάστηκαν τα δείγματα για την εισαγωγή τους στο κελί μέτρησης. Τα δείγματα ελαιοτριβήθηκαν με βρωμιούχο κάλιο (KBr) σε αναλογία 1:40 και στη συνέχεια με χρήση πρέσας, κατασκευάστηκαν παστίλιες, για τις οποίες λήφθηκαν τα αντίστοιχα φάσματα. Η μέθοδος βασίζεται στην εύρεση κορυφών στο φάσμα και αντιστοίχιση τους σε συγκεκριμένες ομάδες, με βάση τις ιδιότητες τους. Το φάσμα κάθε μορίου είναι μοναδικό και επομένως για τις καθαρές ουσίες με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών τους ομάδων, ταυτοποιείται και η ένωση.^[71] Με βάση αυτό το σκεπτικό λήφθηκαν τα φάσματα της καθαρής καφεΐνης, του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη Bet:LA και των αντίστοιχων τυφλών δειγμάτων (blanks) χιτοσωμάτων και νιοσωμάτων (δεν περιείχαν καφεΐνη). Αυτά τα φάσματα τα οποία αντιστοιχίζονται σε γνωστές ενώσεις αποτέλεσαν μέτρο σύγκρισης για τα φάσματα των χιτοσωμάτων και νιοσωμάτων, για τα οποία ελέγχθηκε ο εγκλεισμός της καφεΐνης και η επικάλυψη με χιτοζάνη. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων λήφθηκαν τα ακόλουθα φάσματα:



Διάγραμμα 63. Φάσμα FT-IR του NaDES Bet:LA

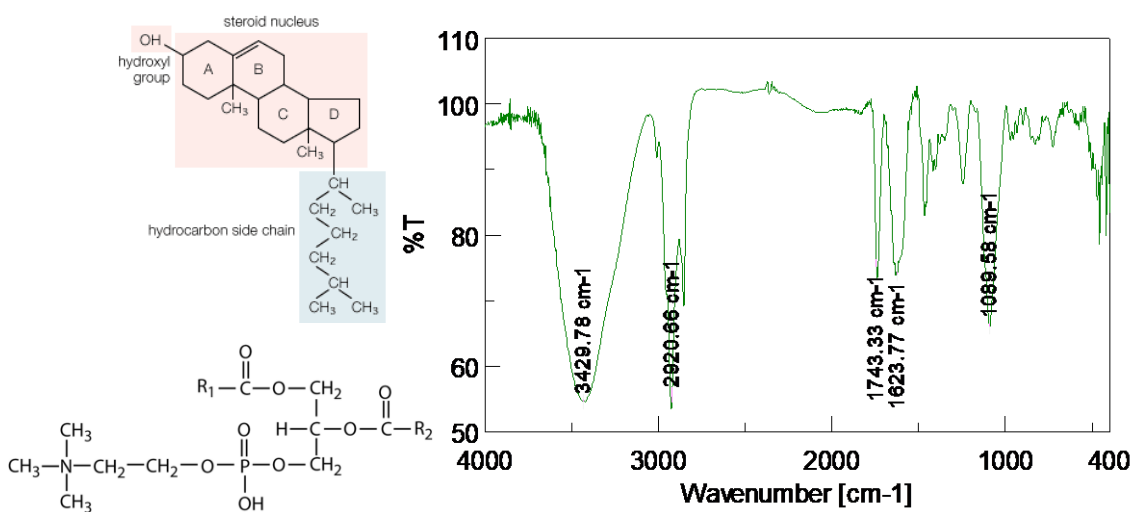
Στο συγκεκριμένο φάσμα παρουσιάζεται ευρεία κορυφή στο εύρος 3500 με 3000 cm^{-1} , το οποίο και αποδίδεται στις επιμέρους χαρακτηριστικές ομάδες του συστήματος βεταΐνης-γαλακτικού οξέος. Η κορυφή στα 3434 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης του O-H του γαλακτικού οξέος καθώς και στην αλληλεπίδραση του με το -O της βεταΐνης. Στα 1727 cm^{-1} παρατηρείται κορυφή, η οποία οφείλεται στη δόνηση τάσης του C=O του καρβοξυλικού

οξέος, ενώ στα 1540 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση τάσης του καρβονυλίου της βεταΐνης. Το παραπάνω φάσμα επιβεβαιώνει τη δημιουργία ευτηκτικού διαλύτη βεταΐνης-γαλακτικού οξέος.



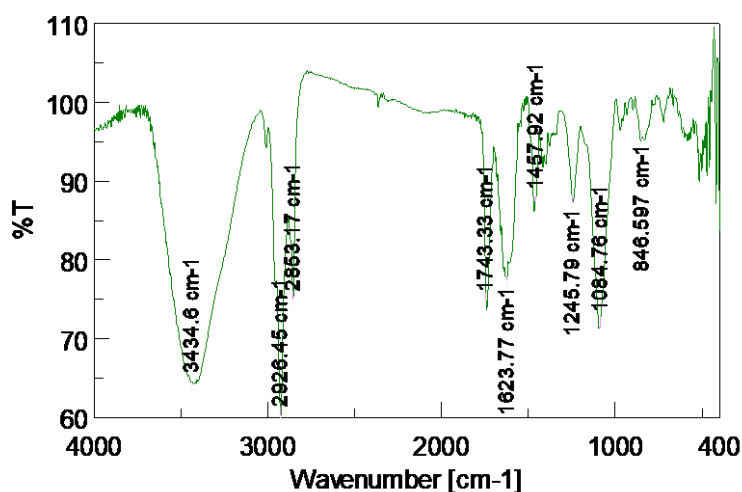
Διάγραμμα 64. Φάσμα FT-IR της καφεΐνης

Η παρατηρούμενη ευρεία κορυφή στα 3408 cm^{-1} αποδίδεται στη ύπαρξη δεσμού O-H. Οι κορυφές στα 3107 και 2952 cm^{-1} οφείλονται στην ασύμμετρη δόνηση του δεσμού C-H και του δεσμού C-H στις μεθυλομάδες αντίστοιχα. Η κορυφή στη ζώνη 1700 cm^{-1} και η κορυφή στα 1660 cm^{-1} αποδίδονται στη δόνηση τάσης των καρβονυλικών ομάδων C=O (2,6). Ενώ στη ζώνη $1600-1400\text{ cm}^{-1}$ οι κορυφές αποδίδονται στη δόνηση των δεσμών C=N και C=C. Οι κορυφές στα 1235 και 1022 και στα 973 cm^{-1} οφείλονται στη δόνηση τάσης των δεσμών C-H, C-N και C-C αντίστοιχα. Τέλος η κορυφή στα 742 cm^{-1} πιθανότατα οφείλεται στη δόνηση κάμψης του δεσμού C-C.



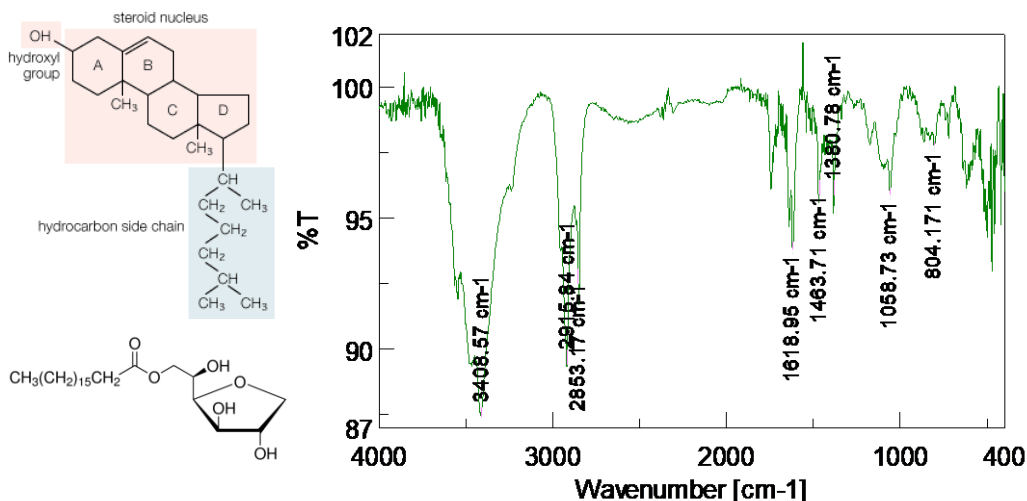
Διάγραμμα 65. Φάσμα FT-IR του τυφλού δείγματος των χιτσωμάτων

Στο άνωθεν διάγραμμα παρατηρείται ευρεία κορυφή στα 3429 cm^{-1} , η οποία ανήκει στη ζώνη $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ και οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού O-H μεταξύ του μορίου της κοληστερόλης και της φωσφατυδιλοχολίνης. Η εμφανιζόμενη κορυφή στα 2920 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού C-H. Οι κορυφές στα 1743 και στα 1623 cm^{-1} οφείλονται στη δόνηση κάμψης του δεσμού C-H και στη δόνηση τάσης του δεσμού C=C στους αρωματικούς δακτυλίους της κοληστερόλης. Τέλος η κορυφή στα 1089 cm^{-1} οφείλεται στη συμμετρική τάση δόνησης του PO_2 .



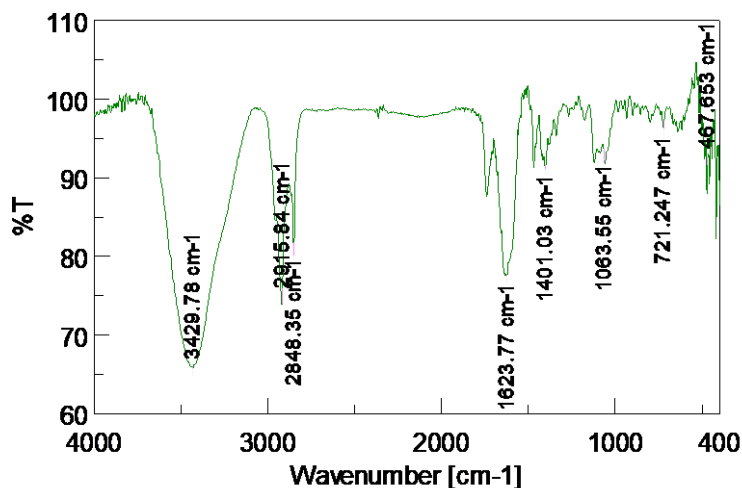
Διάγραμμα 66. Φάσμα FT-IR των χιτοσωμάτων

Συγκρίνοντας το διάγραμμα των χιτοσωμάτων με το διάγραμμα του αντίστοιχου τυφλού παρατηρείται ομοιότητα με μετατοπίσεις των βασικών κορυφών ενώ δεν υπάρχει ομοιότητα με το φάσμα της καφεΐνης, το οποίο υποδεικνύει τον εγκλεισμό της ένωσης. Η κορυφή από τα 3429 μετατοπίστηκε στα 3434 cm^{-1} , η κορυφή στα 2920 μετατοπίστηκε ελαφρώς στα 2926 cm^{-1} , ενώ παράλληλα αυξήθηκε η ένταση της. Η μετατόπιση της κορυφής από τα 1089 στα 1084 cm^{-1} αποδίδεται στη σύνδεση της καφεΐνης στην πολική κεφαλή του λιπιδίου και τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με την ομάδα PO_2 .



Διάγραμμα 67. Φάσμα FT-IR του τυφλού δείγματος νισσωμάτων

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ευρεία κορυφή στα 3408 cm⁻¹, η οποία ανήκει στη ζώνη 3500-3200 cm⁻¹ και οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού O-H μεταξύ του μορίου της χοληστερόλης και του Span 60. Οι κορυφές στα 2915 και 2853 cm⁻¹ οφείλονται σε δόνηση τάσης του δεσμού C-H στην ουρά της χοληστερόλης και του Span 60 αντίστοιχα. Η κορυφή στα 1618 cm⁻¹ οφείλονται στην δόνηση τάσης του δεσμού C=C του αρωματικού δακτυλίου της χοληστερόλης. Οι κορυφές στα 1463 και 1380 cm⁻¹ οφείλονται σε δόνηση τάσης του δεσμού C-H του CH₃ και στη δόνηση κάμψης του O-H του αρωματικού δακτυλίου. Τέλος η κορυφή στα 1058 cm⁻¹ οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού C-O, 2ταγούς αλκόολης.



Διάγραμμα 68. Φάσμα FT-IR των νισσωμάτων

Στο φάσμα των νισσωμάτων παρατηρήθηκε μετατόπιση της κύριας κορυφής από τα 3408 cm⁻¹ στα 3429 cm⁻¹. Ακόμη μετατοπίστηκε η κορυφή από τα 2853 cm⁻¹ στα 2848 cm⁻¹. Η κορυφή στα 1618 cm⁻¹ μετατοπίστηκε στα 1623 cm⁻¹ και παρουσίασε αυξημένη ένταση. Τέλος οι κορυφές στα 1463 και 1058 cm⁻¹ μετατοπίστηκαν στις θέσεις 1401 και 1063 cm⁻¹ αντίστοιχα. Η μετατόπιση

και αλλαγή της έντασης βασικών κορυφών χωρίς τη δημιουργία νέων υποδεικνύει τον επιτυχή εγκλεισμό της καφεΐνης.

Σημείωση: Κατά τη διάρκεια των εκτυλισσόμενων πειραμάτων δεν χρησιμοποιήθηκαν επικίνδυνες ή διαβρωτικές ουσίες (με εξαίρεση το διάλυμα καυστικού νατρίου) ενώ τηρήθηκαν όλα τα μέτρα προσωπικής προστασίας.



Εικόνα 29. 'Επικίνδυνες ουσίες'

Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός του φυσικού αλκαλοειδούς της καφεΐνης σε λιποσωμικά συστήματα με τη μέθοδο της ενυδάτωσης λεπτής μεμβράνης (Thin film hydration).

Ειδικότερα παρασκευάστηκαν συμβατικά λιποσώματα, αποτελούμενα από φωσφατυδιλοχολίνη χοληστερόλη και επιφανειοδραστικό παράγοντα Tween 80, ο οποίος ενίσχυσε τη σταθερότητα τους. Εξετάστηκε ενδελεχώς η επικάλυψη των λιποσωμάτων με το φυσικό βιοσυμβατό πολυμερές της χιτοζάνης προς δημιουργία χιτοσωμάτων, καθώς και η δημιουργία μη ιονικών τασιενεργών κυστιδίων, νιοσωμάτων. Για τη σύνθεση των νιοσωμάτων δεν απαιτείται χρήση φωσφολιπιδίων, όπως φωσφατυδιλοχολίνη, αλλά αντ' αυτού επιφανειοδραστική ουσία, η οποία σε συνδυασμό με τη χοληστερόλη συνιστά τη λιπιδική σιβάδα. Η επιφανειοδραστική ουσία που επιλέχθηκε ήταν το Span 60 καθώς υπερέχει ιδιοτήτων έναντι των άλλων Spans, αφού διαθέτει μεγαλύτερο μήκος αλύσου, το οποίο ερμηνεύεται με υψηλότερη θερμοκρασία μετάπτωσης και επομένως σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εγκλείει καλύτερα δραστικές ουσίες.

Η πολυμερική επικάλυψη της χιτοζάνης, επιβεβαιώθηκε μέσω μελέτης με δυναμική σκέδαση φωτός DLS, καθώς ενισχύει την ηλεκτροστατική έλξη, με αποτέλεσμα την πολλαπλή επικάλυψη και τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη χιτοσώματα και νιοσώματα να αποκτούν μεγαλύτερη υδροδυναμική διάμετρο, γεγονός το οποίο ερμηνεύεται με αυξημένη τιμή μεγέθους, έναντι των λιποσωμάτων. Ακόμη οι θετικές τιμές του ζ-δυναμικού, έναντι των αρνητικών τιμών στην περίπτωση των λιποσωμάτων, επιβεβαίωσαν τον επιτυχή σχηματισμό φιλμ χιτοζάνης. Η διαλυτοποίηση της χιτοζάνης πραγματοποιήθηκε με χρήση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη NaDES, συνιστούμενο από βεταΐνη και γαλακτικό οξύ (Bet:LA). Η σύνθεση του NaDES Bet:LA, επιβεβαιώθηκε μέσω της μελέτης φάσματος πυρηνικού συντονισμού Η NMR καθώς και μέσω φασματομετρίας υπερύθρου FT-IR. Ακόμη επιβεβαιώθηκε ο επιτυχής εγκλεισμός της καφεΐνης στα χιτοσώματα και νιοσώματα μέσω των αντίστοιχων φασμάτων FT-IR.

Πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός Box Behken, με χρήση του προγράμματος Design Expert, προς τη βελτιστοποίηση των χιτοσωμάτων και νιοσωμάτων. Οι παράμετροι οι οποίες εξετάστηκαν, όσον αφορά τα χιτοσώματα ήταν: η περιεκτικότητα %v/v του NaDES, η περιεκτικότητα %w/v της χιτοζάνης καθώς και η περιεκτικότητα %w/v του επιφανειοδραστικού Tween 80, ενώ η αναλογία της φωσφατυδιλοχολίνης και χοληστερόλης παρέμεινε σταθερή και ίση με 85:15. Για τα νιοσώματα εξετάστηκαν οι ίδιες παράμετροι, αλλά αντί της περιεκτικότητας του επιφανειοδραστικού Tween 80, μελετήθηκε η περιεκτικότητα %w/v του Span 60. Για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης εγκλεισμού EE%, του μεγέθους σωματιδίων και του δείκτη πολυδιασποράς PDI, προέκυψαν οι ακόλουθες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών.

Πίνακας 30. 'Βέλτιστες' αναλογίες χιτοσωμάτων

Χιτοσώματα		
NaDES (% v/v)	CS (%w/v)	Tween 80 (%w/v)
5	0.3	1.25

Πίνακας 31. 'Βέλτιστες' αναλογίες νιοσώματων

Νιοσώματα		
NaDES (% v/v)	CS (%w/v)	Span 60 (%w/v)
3.65	0.7	2

Όσον αφορά τις αποκρίσεις αυτών των παραμέτρων, οι οποίες και βελτιστοποιήθηκαν, συντέθηκαν χιτοσώματα και νιοσώματα, προς επιβεβαίωση των προβλεπόμενων τιμών.

Πίνακας 32. Σύγκριση των αποκρίσεων χιτοσωμάτων και νιοσώματων, τα οποία παρασκευάστηκαν με τις 'βέλτιστες' αναλογίες

	Χιτοσώματα	Νιοσώματα
Size (nm)	315.7	482.2
PDI	0.580	0.570
EE%	56	57
zeta	15.6	36.2

Ο συγκεκριμένος πίνακας συνοψίζει τιμές, οι οποίες προέκυψαν από το μέσο όρο τριών δοκιμών (batches). Τα 'βέλτιστα' χιτοσώματα και νιοσώματα παρουσίασαν σχετικά κοντινά μεγέθη, τα οποία ανήκαν στην κλίμακα του νάνο, οπότε και επιτεύχθηκε ο στόχος της δημιουργίας νανοσυστημάτων, ενώ παράλληλα παρουσίασαν καλή ομοιομορφία και σταθερότητα. Το μέγεθος των νιοσώματων είναι εκ των ουκ άνευ μεγαλύτερο των χιτοσωμάτων λόγω της ύπαρξης του επιφανειοδραστικού Span 60. Η απόδοση εγκλεισμού προέκυψε αρκετά υψηλή, ιδίως για τα νιοσώματα, τα οποία εν γένει παρουσιάζουν μικρότερες αποδόσεις έναντι των χιτοσωμάτων. Το Span 60 κρίθηκε ιδιαίτερα σημαντικό συστατικό των νιοσώματων καθώς απέκτησαν ζ-δυναμικό >30 mV, υποδεικνύοντας σημαντική σταθερότητα χωρίς τάση συσσωμάτωσης.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μελέτη χρήσης εναλλακτικών διαλυτών, όπως φυσικού μείγματος των επιμέρους συστατικών του NaDES, βεταΐνη και γαλακτικό οξύ, διάλυση με σκέτο γαλακτικό οξύ, καθώς και παράλειψη του επιφανειοδραστικού Tween 80, στην περίπτωση των χιτοσωμάτων. Με κριτήρια το μέγεθος των σωματιδίων, το δείκτη πολυδιασποράς, την απόδοση εγκλεισμού, το ζ-δυναμικό καθώς και την απόδοση διεργασίας, αποδείχθηκε πως συνολικά υπερτερεί η χρήση του NaDES, τόσο στη διαβροχή των χιτοσωμάτων, όσο και των νιοσώματων.

Τέλος πραγματοποιήθηκε μελέτη απελευθέρωσης της καφεΐνης με τη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης. Και για τις δυο κατηγορίες κυστιδίων, εμφανίσθηκε διφασικό προφίλ απελευθέρωσης, ενώ καλύτερη προσαρμογή είχαν στα μοντέλα: Higuchi και Korsmeyer-Peppas. Το μοντέλο Higuchi περιγράφει την απελευθέρωση της καφεΐνης από τα χιτοσώματα και τα νιοσώματα, ενώ με βάση την κλίση n στο διάγραμμα του ημι-εμπειρικού μοντέλου προσδιορίσθηκε και το φαινόμενο το οποίο περιγράφει την κινητική. Τα χιτοσώματα παρουσίασαν $0.5 < n < 1$ και επομένως το σύστημα περιγράφεται από μη Fickian διάχυση, όπου τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα, ενώ τα νιοσώματα παρουσίασαν $n < 0.5$, γεγονός το οποίο συνεπάγεται την περιγραφή του συστήματος από Fickian διάχυση, δηλαδή κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης. Τα κυρίαρχα φαινόμενα απελευθέρωσης για κάθε σύστημα συμφωνούν και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των χιτοσωμάτων προκαλούν τη συρρίκνωση των κυστιδίων, δυσχεραίνοντας έτσι τη διάχυση της καφεΐνης, σε αντίθεση με τα νιοσώματα, τα οποία έχουν πιο σφιχτές μεμβράνες, οι οποίες διευκολύνουν τη διέλευση της καφεΐνης και επικρατεί το φαινόμενο της διάχυσης.

Εν κατακλείδι, τόσο τα χιτοσώματα όσο και τα νιοσώματα εμφάνισαν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά, τα οποία συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, υψηλές αποδόσεις εγκλεισμού της καφεΐνης, ενώ η διαβροχή τους με χρήση NaDES, έναντι κάποιου τοξικού οργανικού διαλύτη, καθιστά τη διεργασία σύνθεσης τους ιδιαίτερα πράσινη και καινοτόμα.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η μελέτη εγκλεισμού της καφεΐνης τόσο σε επικαλυμένα με χιτοζάνη λιποσώματα (χιτοσώματα), όσο και σε μη ιονικούς τασιενεργούς φορείς (νιοσώματα), απέδωσε ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα για περαιτέρω διερεύνηση.

Όσον αφορά τα σχηματιζόμενα σωματίδια προτείνεται η μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων τους μέσω TGA/DSC. Ακόμη οφείλει να πραγματοποιηθεί μελέτη ως προς τη μορφολογία τους, μέσω της τεχνικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης Cryo-SEM, η οποία θα επιτρέψει την παρατήρηση τους σε 'παγωμένη' κατάσταση, προς αποφυγή της τήξης των λιπιδίων και άρα προς επίτευξη μεγαλύτερων μεγεθύνσεων.

Η διαδικασία σύνθεσης των κυστιδίων βασίζεται στις αρχές της πράσινης χημείας, ενώ δύναται να γίνει ακόμη πιο 'πράσινη', με ενσωμάτωση σταδίου ανάκτησης του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη NaDES (μέθοδος διαχωρισμού από το νερό με ζεόλιθους).

Με βάση τις γνωστές αντιοξειδωτικές ιδιότητες της καφεΐνης, μπορεί να γίνει και περαιτέρω αξιολόγηση αυτών μέσω της μελέτης με AAPH με παράλληλη αξιολόγηση της επίδρασης της με το ctDNA.

Με εφελκτικό την ιδιότητα της καφεΐνης να απορροφά στο υπεριώδες φάσμα, προτείνεται η χρήση της ως ενισχυτικό φίλτρο προστασίας από τις ακτινοβολίες UVa και UVb σε αντηλιακή κρέμα. Η βλεννοπροσκολλητική ιδιότητα της χιτοζάνης μπορεί να δράσει συνεργιστικά στη βελτίωση ιδιοτήτων της κρέμας, ενώ παράλληλα η υγραντική και αντιφλεγμονώδης δράση της αναμένεται να προσφέρει ανακούφιση από τις ήδη υπάρχουσες ιστοπαθολογικές βλάβες στα μιτοχόνδρια και στο DNA, οι οποίες οφείλονται στη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου, προκληθέντες από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Η ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων σε φαρμακοτεχνική μορφή θα αξιολογηθεί μέσω της μελέτης του προφίλ απελευθέρωσης, το οποίο με βάση την διεξαχθείσα προσομοίωση αποδέσμευσης της καφεΐνης σε pH ισοτονικό του δέρματος, ίσο με 5.5, αναμένεται να παρουσιάζεται ελεγχόμενη, συντελώντας έτσι στη διατήρηση υψηλής περιεκτικότητας της δραστικής ουσίας (καφεΐνη και χιτοζάνη) στο σώμα, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης της.

Εφόσον πρόκειται για πιθανό προϊόν με αυξημένη χρονική περίοδο χρήσης, θα πραγματοποιηθεί και μελέτη σταθερότητας τόσο των σωματιδίων που απαρτίζουν την κρέμα, όσο και του ίδιου του προϊόντος για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

Συμμετοχή σε διεθνή συνέδρια

ΔΣ1. Ioanna Pitterou, **Marina Spilioti**, Anastasia Detsi, Encapsulation of caffeine in chitosomes using natural deep eutectic solvents, European Symposium on Organic Chemistry, July 5-6, 2021, 2021

ΔΣ2. Ioanna Pitterou, **Marina Spilioti**, Anastasia Detsi, Process development and optimization for the encapsulation of caffeine in chitosomes using natural deep eutectic solvents, 9th International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, 9 - 12 September 2021

Βιβλιογραφία

- [1] Jenny T. (2015). *The history of caffeine*. Ανακτήθηκε από <https://caffeinehomeostasisjenny.weebly.com/history-of-caffeine.html>
- [2] *Timeline of Coffee - Milestones of Coffee*. (2021). Ανακτήθηκε από <http://www.historyofcoffee.net/coffee-history/timeline-of-coffee/>
- [3] Melitta. (2021). *Η ζώνη του καφέ*. Ανακτήθηκε από https://www.melitta.gr/gr_herkunft_woher_name_el,70099.html
- [4] BBC ideas. (2020). *Sperm, skulls and the hidden history of coffee*. Ανακτήθηκε από <https://www.youtube.com/watch?v=bZluelZpf4>
- [5] Explore mode. (2019). *The History of Coffee*. Ανακτήθηκε από https://www.youtube.com/watch?v=wuliy5c_iHw
- [6] Βαλαβανίδης, Θ., & Ευσταθίου, Κ. (2009). Καφεΐνη: Η χημική ένωση του μήνα. Ανακτήθηκε από http://195.134.76.37/chemicals/chem_caffeine.htm
- [7] Fredholm, B. B. (2010). Methylxanthines (Vol. 200). Springer Science & Business Media. Ανακτήθηκε από https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-13443-2_1
- [8] International Food Information Council. (2020). A Brief History of Coffee. Ανακτήθηκε από <https://foodinsight.org/caffeine/a-brief-history-of-coffee/>
- [9] *The basics about: Coffee*. (2016). Ανακτήθηκε από <https://www.youtube.com/watch?v=vFcS080VYQ0>
- [10] Ψωμιάδου, Ε. (2017). *Καφεΐνη: Τι προκαλεί στον οργανισμό μας*. Ανακτήθηκε από <https://www.iatronet.gr/diatrofi/trofima-rofimata/article/42357/kafeni-ti-prokalei-ston-organismo-mas.html>
- [11] *Caffeine definition*. (2021). Ανακτήθηκε από <https://www.dictionary.com/browse/caffeine>
- [12] Armstrong, L. E., Casa, D. J., Maresh, C. M., & Ganio, M. S. (2007). Caffeine, fluid-electrolyte balance, temperature regulation, and exercise-heat tolerance. *Exercise and sport sciences reviews*, 35(3), 135-140. doi: 10.1097/jes.0b013e3180a02cc1
- [13] González-Calderón, D., González-Romero, C., González-González, C. A., & Fuentes-Benites, A. (2015). Synthesis of caffeine from theobromine: Bringing back an old experiment in a new setting. *Educación química*, 26(1), 9-12. Ανακτήθηκε από <http://www.scielo.org.mx/pdf/eq/v26n1/v26n1a2.pdf>
- [14] Καπώλη, Γ. (2015). Όσα πρέπει να γνωρίζετε για την αποκαφεϊνοποίηση. Ανακτήθηκε από <https://www.onmed.gr/diatrofi/story/332577/osa-prepei-na-gnorizete-gia-tin-apokafeinopoiisi>

- [15] Γκακνή, Δ. (2016). Καφεΐνη. Ανακτήθηκε από <https://www.mednutrition.gr/portal/efarmoges/leksiko-diatrofis/14833-kafeini>
- [16] Caffeine informer. (2021). Caffeine Content of Drinks. Ανακτήθηκε από <https://www.caffeineinformer.com/the-caffeine-database>
- [17] Καφεΐνη: Τι λένε οι μελέτες για τα οφέλη και τις αρνητικές επιπτώσεις. (2020). Ανακτήθηκε από <https://www.votanistas.com/healthy-tips/kafeini-ti-lene-oi-meletes-gia-ta-ofeli-kai-tis-arnitikes-ariptwseis/>
- [18] Γεωργακόπουλος, Ε. (x.x). Καφές καφεΐνη και υγεία: Τα συμπεράσματα μιας νέας βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Ανακτήθηκε από <https://dregeorgakopoulos.gr/kafes-kafeini-kai-ygeia-ta-symperasmata-mias-neas-vivliografikis-anaskopisis/>
- [19] Drugbank. *Caffeine Pharmacodynamics*. Ανακτήθηκε από <https://go.drugbank.com/drugs/DB00201>
- [20] MacDonnell, K. (2021). The 4 Different Types of Coffee Beans: A Complete Overview. Ανακτήθηκε από <https://coffeeaffection.com/different-types-coffee-beans/>
- [21] *Coffee beans: main types and regions of cultivation*. (2021). Ανακτήθηκε από <https://www.shutterstock.com/el/image-vector/world-map-coffee-beans-main-types-445977976>
- [22] Βαλούρδου, Σ. (x.x). Η καφεΐνη βοηθάει την αθλητική απόδοση;. Ανακτήθηκε από <https://www.nutri-book.gr/arthra/diatrofi-athliton/i-kafeini-boithaei-tin-athlitiki-apodosi>
- [23] Natural Medicines Comprehensive Database Consumer Version. (2021). *Caffeine*. Ανακτήθηκε από <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-979/caffeine>
- [24] Institute of Medicine. (2001). *Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations*. Ανακτήθηκε από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK223808/>
- [25] Βιοτική. (2019). *Τι είναι το λιπόσωμα;*. Ανακτήθηκε από https://www.eubiotiki.gr/index.php?route=journal2/blog/post&journal_blog_post_id=13
- [26] Cell biotechnology. (x.x). *Λιποσώματα*. Ανακτήθηκε από <https://liposoma.gr>
- [27] Λέκκα, Μ., Γαλανοπούλου, Ν., Λεονταρίτης, Γ., & Κητισούλη, Ε. (2015). Βιολογικές μεμβράνες: από τη δομή στις λειτουργίες. Ανακτήθηκε από https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/4307/2/00_master%20document.pdf

- [28] Παππαϊωάννου, Ι., Θεοδώρου, Α., Καλογερόπουλος, Κ., Πετροπούλου, Α., & Μαλλιαρουδάκη, Ι. Cell nanohealers: Νανοθεραπευτές κυττάρων σε δράση. Ανακτήθηκε από: <http://1lyk-arsak.att.sch.gr/wp-content/uploads/2013/06/CELL-NANOHEALERS-NANOΘΕΡΑΠΕΥΤΕΣ-ΚΥΤΤΑΡΩΝ-ΣΕ-ΔΡΑΣΗ-ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΤΙΚΗ-ΕΡΓΑΣΙΑ1.pdf>
- [29] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8(1), 1-9. doi: [10.1186/1556-276X-8-102](https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102)
- [30] Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H., & Galons, H. (2019). Composition design and medical application of liposomes. *European journal of medicinal chemistry*, 164, 640-653. doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007
- [31] Freitas, C., Lucks, J. S., & Müller, R. H. (1994). P238 effect of storage conditions on long-term stability of “solid lipid nanoparticles”(SLN) in aqueous dispersion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1-2), 178. doi.org/10.1016/0928-0987(94)90411-1
- [32] Joshi, M. D., & Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 71(2), 161-172.. doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.003
- [33] Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (2015). *Lipid nanoparticles: Production, characterization and stability* (pp. 11-22). New York, NY, USA: Springer International Publishing. doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.003
- [34] Shah, B., Khunt, D., Bhatt, H., Misra, M., & Padh, H. (2015). Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles: effect on formulation and characterization parameters. *European journal of pharmaceutical sciences*, 78, 54-66. doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.003
- [35] Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C., & Alonso, M. J. (2009). Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), 257-263. doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.020
- [36] KÜchler, S., Radowski, M. R., Blaschke, T., Dathe, M., Plendl, J., Haag, R., & Kramer, K. D. (2009). Nanoparticles for skin penetration enhancement—a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), 243-250. doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.019
- [37] Ahmed, T. A. (2020). Development of rosuvastatin flexible lipid-based nanoparticles: promising nanocarriers for improving intestinal cells cytotoxicity. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 21(1), 1-12. Ανακτήθηκε από

<https://bmcpharmacoltoxicol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40360-020-0393-8>

- [38] Grimaldi, N., Andrade, F., Segovia, N., Ferrer-Tasies, L., Sala, S., Veciana, J., & Ventosa, N. (2016). Lipid-based nanovesicles for nanomedicine. *Chemical society reviews*, 45(23), 6520-6545. DOI: 10.1039/C6CS00409A
- [39] Yang, T., Cui, F. D., Choi, M. K., Lin, H., Chung, S. J., Shim, C. K., & Kim, D. D. (2007). Liposome formulation of paclitaxel with enhanced solubility and stability. *Drug delivery*, 14(5), 301-308. doi.org/10.1080/10717540601098799
- [40] Khosa, A., Reddi, S., & Saha, R. N. (2018). Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 598-613. doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.055
- [41] Maja, L., Željko, K., & Mateja, P. (2020). Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104984. doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984
- [42] Anderson, M., & Omri, A. (2004). The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug delivery*, 11(1), 33-39. doi.org/10.1080/10717540490265243
- [43] Shukla, S. K., Chan, A., Parvathaneni, V., & Gupta, V. (2020). Metformin-loaded chitosomes for treatment of malignant pleural mesothelioma—A rare thoracic cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 128-141. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.146
- [44] Kong, S. Z., Li, D. D., Luo, H., Li, W. J., Huang, Y. M., Li, J. C., ... & Li, S. D. (2018). Anti-photoaging effects of chitosan oligosaccharide in ultraviolet-irradiated hairless mouse skin. *Experimental gerontology*, 103, 27-34. doi.org/10.1016/j.exger.2017.12.018
- [45] Ntohogian, S., Gavriliadou, V., Christodoulou, E., Nanaki, S., Lykidou, S., Naidis, P., & Bikiaris, D. N. (2018). Chitosan nanoparticles with encapsulated natural and uf-purified annatto and saffron for the preparation of uv protective cosmetic emulsions. *Molecules*, 23(9), 2107. doi.org/10.3390/molecules23092107
- [46] Detsi, A., Kavetsou, E., Kostopoulou, I., Pitterou, I., Pontillo, A. R. N., Tzani, A., ... & Zoumpoulakis, P. (2020). Nanosystems for the encapsulation of natural products: The case of chitosan biopolymer as a matrix. *Pharmaceutics*, 12(7), 669. doi.org/10.3390/pharmaceutics12070669
- [47] Pontillo, A. R. N., Konstanteli, E., Bairaktari, M. M., & Detsi, A. (2021). Encapsulation of the Natural Product Tyrosol in Carbohydrate Nanosystems and Study of Their Binding with ctDNA. *Polymers*, 13(1), 87. doi.org/10.3390/polym13010087

- [48] Seyedabadi, M. M., Rostami, H., Jafari, S. M., & Fathi, M. (2021). Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine. *Food Bioscience*, 40, 100857. doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100857
- [49] Alomrani, A., Badran, M., Harisa, G. I., ALshehry, M., Alhariri, M., Alshamsan, A., & Alkholief, M. (2019). The use of chitosan-coated flexible liposomes as a remarkable carrier to enhance the antitumor efficacy of 5-fluorouracil against colorectal cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(5), 603-611. doi.org/10.1016/j.jsps.2019.02.008
- [50] Nalini, T., Basha, S. K., Sadiq, A. M. M., Kumari, V. S., & Kaviyarasu, K. (2019). Development and characterization of alginate/chitosan nanoparticulate system for hydrophobic drug encapsulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 65-72. doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.002
- [51] Yang, Y., Wang, S., Wang, Y., Wang, X., Wang, Q., & Chen, M. (2014). Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery. *Biotechnology advances*, 32(7), 1301-1316. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.007
- [52] Al-Nemrawi, N. K., Alshraiedeh, N. A. H., Zayed, A. L., & Altaani, B. M. (2018). Low molecular weight chitosan-coated PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of tobramycin for cystic fibrosis. *Pharmaceuticals*, 11(1), 28. doi.org/10.3390/ph11010028
- [53] Bang, S. H., Hwang, I. C., Yu, Y. M., Kwon, H. R., Kim, D. H., & Park, H. J. (2011). Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. *Journal of microencapsulation*, 28(7), 595-604. doi.org/10.3109/02652048.2011.557748
- [54] Thomas, S., Grohens, Y., & Ninan, N. (Eds.). (2015). Nanotechnology applications for tissue engineering. William Andrew. (chapter 15, 13-16)
- [55] Abdelkader, H., Farghaly, U., & Moharram, H. (2014). Effects of surfactant type and cholesterol level on niosomes physical properties and in vivo ocular performance using timolol maleate as a model drug. *Journal of pharmaceutical investigation*, 44(5), 329-337. Ανακτήθηκε από <https://link.springer.com/article/10.1007/s40005-014-0121-8>
- [56] Ge, X., Wei, M., He, S., & Yuan, W. E. (2019). Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. *Pharmaceutics*, 11(2), 55. doi.org/10.3390/pharmaceutics11020055
- [57] Yeo, L. K., Chaw, C. S., & Elkordy, A. A. (2019). The effects of hydration parameters and co-surfactants on methylene blue-loaded niosomes prepared by the thin film hydration method. *Pharmaceutics*, 12(2), 46. doi.org/10.3390/ph12020046

- [58] Yeo, L. K., Olusanya, T. O., Chaw, C. S., & Elkordy, A. A. (2018). Brief effect of a small hydrophobic drug (cinnarizine) on the physicochemical characterisation of niosomes produced by thin-film hydration and microfluidic methods. *Pharmaceutics*, 10(4), 185. doi.org/10.3390/pharmaceutics10040185
- [59] Moghassemi, S., & Hadjizadeh, A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. *Journal of controlled release*, 185, 22-36. doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.015
- [60] Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical reviews*, 116(4), 2602-2663. doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346
- [61] Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217-223.
- [62] Huang, X., & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 73(2-3), 121-136. doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6
- [63] Δεμέτζος, Κ. (Επιμ). Φαρμακευτική Τεχνολογία-Μεταφορά και Στοχευμένη Δράση Φαρμάκων. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρασιανού
- [64] Shaikh, H. K., Kshirsagar, R. V., & Patil, S. G. (2015). Mathematical models for drug release characterization: a review. *World J. Pharm. Pharm. Sci*, 4(4), 324-338
- [65] Mircioiu, C., Voicu, V., Anuta, V., Tudose, A., Celia, C., Paolino, D., ... & Mircioiu, I. (2019). Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 11(3), 140. doi.org/10.3390/pharmaceutics11030140
- [66] Wu, I. Y., Bala, S., Škalko-Basnet, N., & Di Cagno, M. P. (2019). Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 138, 105026. doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105026
- [67] Anastas, P. T., & Warner, J. C. (1998). Green chemistry. *Frontiers*, 640, 1998.
- [68] Fellet, M. (2019). Green Chemistry and Engineering: Towards a Sustainable Future
- [69] Shukla, A. K., & Iravani, S. (Eds.). (2018). *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles*. Elsevier. Chapter 12.

[70] Pandey, A., Höfer, R., Taherzadeh, M., Nampoothiri, M., & Larroche, C. (Eds.). (2015). *Industrial biorefineries and white biotechnology*. Elsevier. (Chapter 17)

[71] IR Spectrum Table & Chart. Ανακτήθηκε από <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>

[72] Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2018). Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *Journal of natural products*, 81(3), 679-690. doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945

[73] Papadopoulou, A. A., Tzani, A., Alivertis, D., Katsoura, M. H., Polydera, A. C., Detsi, A., & Stamatis, H. (2016). Hydroxyl ammonium ionic liquids as media for biocatalytic oxidations. *Green Chemistry*, 18(4), 1147-1158. DOI: 10.1039/C5GC02381E

[74] Rogers, R. D., & Seddon, K. R. (2003). Ionic liquids--solvents of the future?. *Science*, 302(5646), 792-793. DOI: 10.1126/science.1090313

[75] Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical reviews*, 114(21), 11060-11082. doi.org/10.1021/cr300162p

[76] Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). Natural deep eutectic solvents--solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063-1071. doi.org/10.1021/sc500096j

[77] Roda, A., Santos, F., Matias, A. A., Paiva, A., & Duarte, A. R. C. (2020). Design and processing of drug delivery formulations of therapeutic deep eutectic systems for tuberculosis. *The Journal of Supercritical Fluids*, 161, 104826. doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104826

[78] Aroso, I. M., Silva, J. C., Mano, F., Ferreira, A. S., Dionísio, M., Sá-Nogueira, I., ... & Duarte, A. R. C. (2016). Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 98, 57-66. doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.002

[79] Gutiérrez, A., Alcalde, R., Atilhan, M., & Aparicio, S. (2020). Insights on betaine+ lactic acid deep eutectic solvent. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(25), 11880-11892. doi.org/10.1021/acs.iecr.0c00762

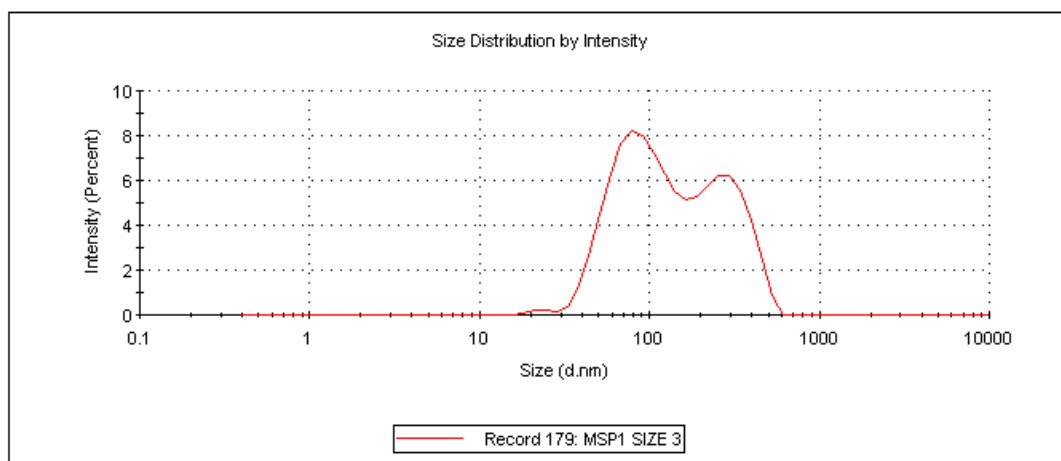
[80] Pontillo, A. R. N., Koutsoukos, S., Welton, T., & Detsi, A. (2021). Investigation of the influence of natural deep eutectic solvents (NaDES) in the properties of chitosan-stabilised films. *Materials Advances*. DOI: 10.1039/D0MA01008A

[81] Galvis-Sánchez, A. C., Castro, M. C. R., Biernacki, K., Gonçalves, M. P., & Souza, H. K. (2018). Natural deep eutectic solvents as green plasticizers for chitosan thermoplastic production with controlled/desired mechanical and barrier properties. *Food Hydrocolloids*, 82, 478-489.
doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.026

Παράρτημα διαγραμμάτων

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 187.0	Peak 1: 92.45	59.8	35.46
Pdl: 0.444	Peak 2: 279.9	39.6	91.00
Intercept: 0.889	Peak 3: 23.21	0.6	3.189

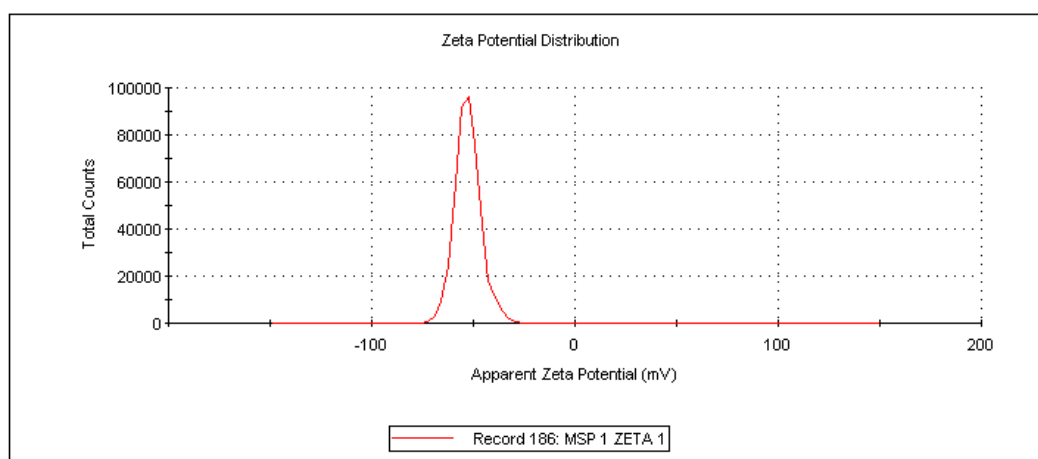
Result quality : Refer to quality report



Διάγραμμα 69. DLS λιποσωμάτων

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -52.7	Peak 1: -52.7	100.0	6.34
Zeta Deviation (mV): 6.34	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0283	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

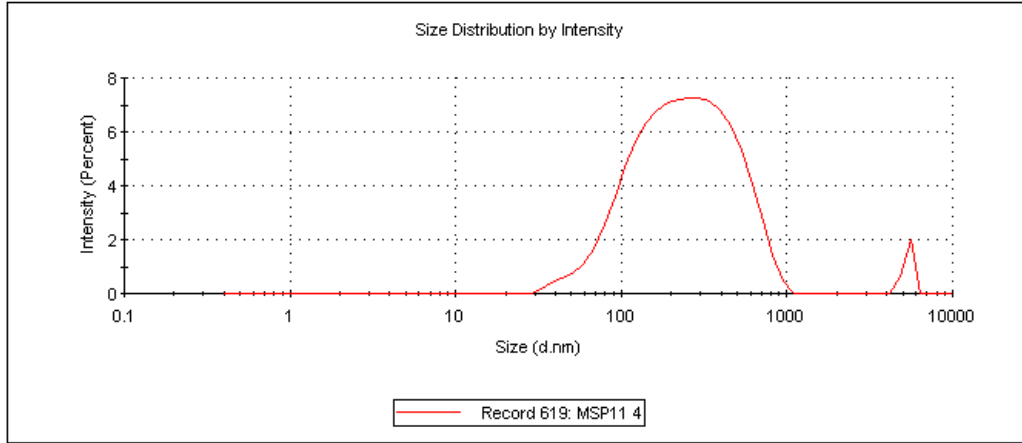
Result quality : Good



Διάγραμμα 70. DLS λιποσωμάτων

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 235.6	Peak 1: 285.6	97.3	184.3
PDI: 0.405	Peak 2: 5375	2.7	325.6
Intercept: 0.943	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

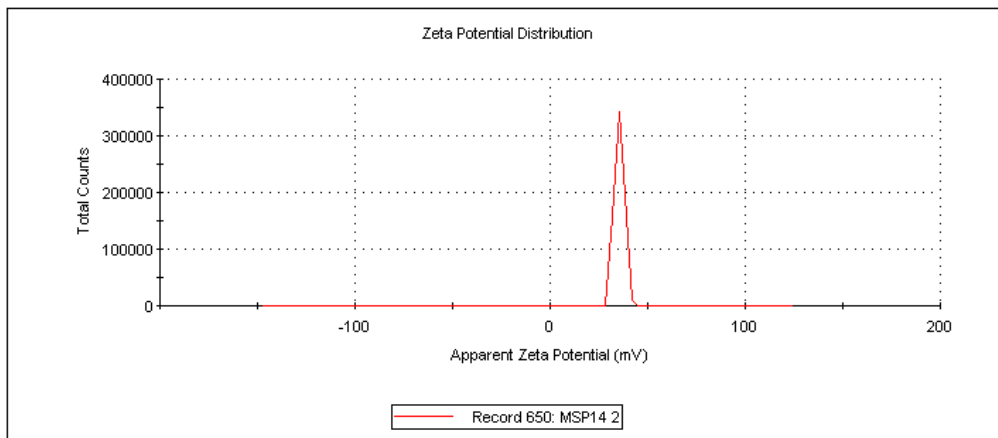
Result quality : Good



Διάγραμμα 71. DLS νισσωμάτων

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 35.4	Peak 1: 35.4	100.0	2.46
Zeta Deviation (mV): 2.46	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0340	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

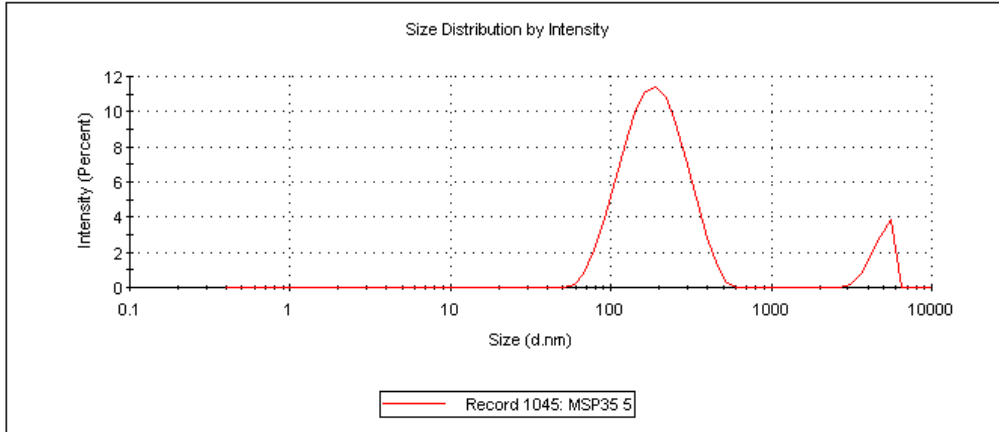
Result quality : Good



Διάγραμμα 72. DLS νισσωμάτων

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 202.4	Peak 1: 200.0	90.7	85.90
Pdl: 0.426	Peak 2: 4871	9.3	691.4
Intercept: 0.903	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

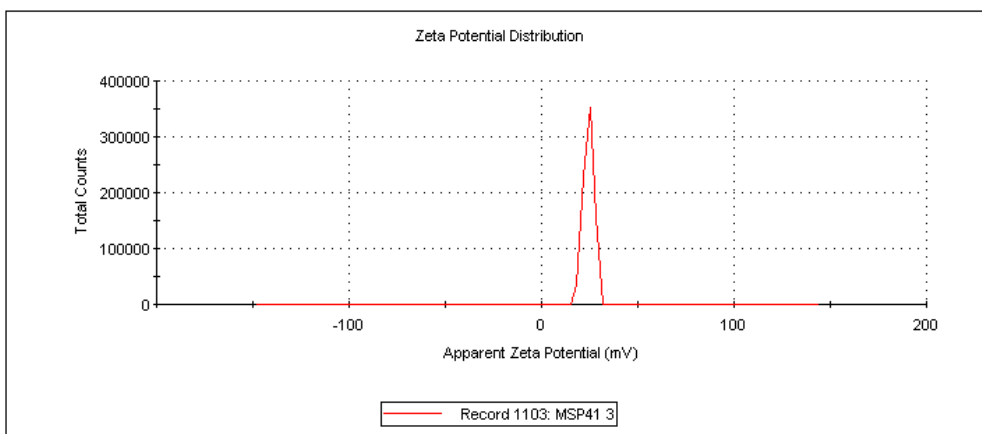
Result quality : Good



Διάγραμμα 73. DLS χιτοσωμάτων

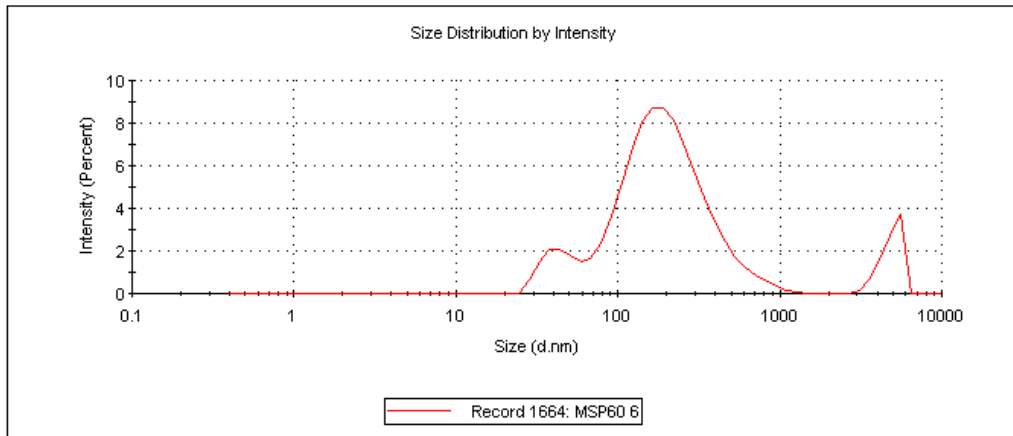
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 24.4	Peak 1: 24.4	100.0	2.66
Zeta Deviation (mV): 2.66	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0156	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : Good



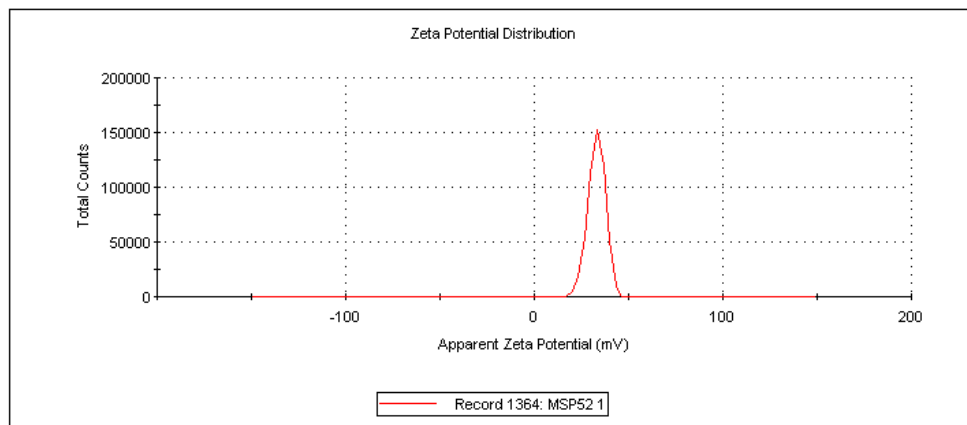
Διάγραμμα 74. DLS χιτοσωμάτων

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 172.7	Peak 1: 228.9	81.9	151.8
Pdl: 0.541	Peak 2: 43.49	9.4	9.343
Intercept: 0.878	Peak 3: 4878	8.7	691.7
Result quality : Good			



Διάγραμμα 75. DLS για βέλτιστες αναλογίες χιτοσωμάτων

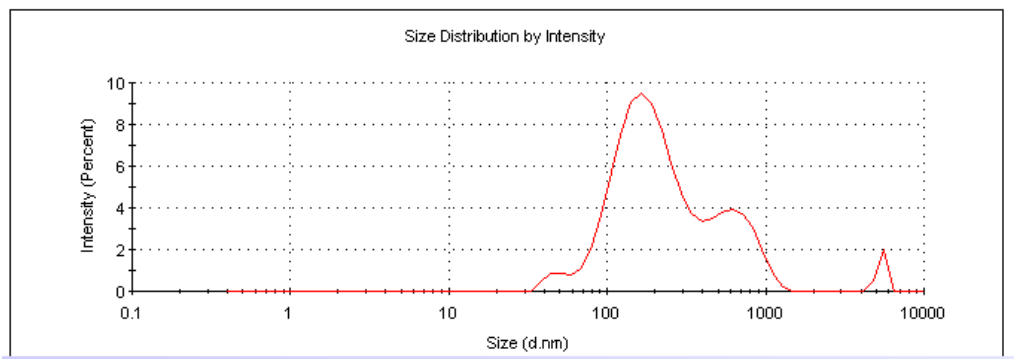
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 21.8	Peak 1: 33.0	100.0	4.57
Zeta Deviation (mV): 59.0	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0176	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			



Διάγραμμα 76. DLS για βέλτιστες αναλογίες χιτοσωμάτων

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 228.9	Peak 1: 188.4	71.3	82.73
Pdl: 0.453	Peak 2: 644.2	23.6	200.5
Intercept: 0.930	Peak 3: 49.03	2.8	7.297

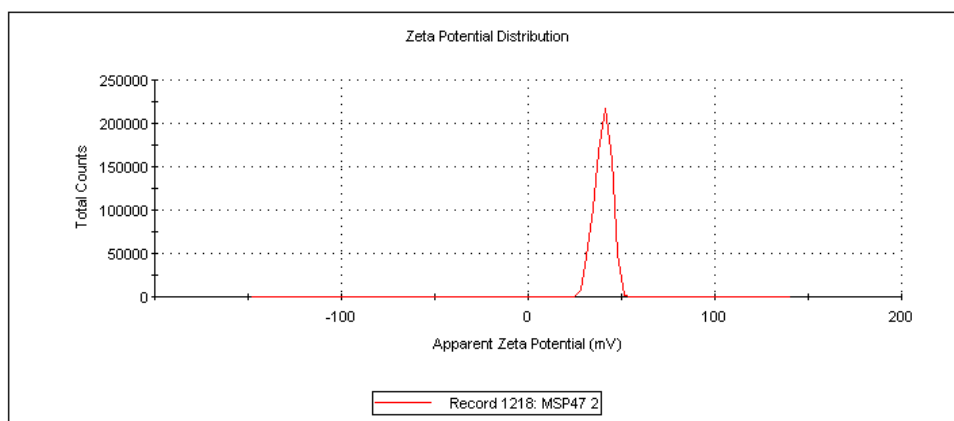
Result quality : Good



Διάγραμμα 77. DLS για βέλτιστες αναλογίες νιοσωμάτων

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 40.1	Peak 1: 40.1	100.0	4.52
Zeta Deviation (mV): 4.52	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0102	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : Good



Διάγραμμα 78. DLS για βέλτιστες αναλογίες νιοσωμάτων