



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΟΥΣ ΝΑΡΙΝΓΙΝΗ ΣΕ ΝΑΝΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ/ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ

Διπλωματική εργασία

Ιωάννα Μελά

Επιβλέπουσα: Αναστασία Δέτση, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2022

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

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 2021 – 2022.

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω βαθύτατα την Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. κα. Αναστασία Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και καινοτόμο θέμα, αλλά κυρίως για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Οι συμβουλές της και η εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπό μου αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα για την επιτυχή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά κυρίως συντέλεσαν στο να αγαπήσω το αντικείμενο με το οποίο ασχολήθηκα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν για την κριτική ανάγνωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τις από καρδιάς ευχαριστίες μου στην Ιωάννα Πιττερού, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., για την άψογη συνεργασία μας, την απεριόριστη στήριξή της και την αδιάκοπη βοήθειά της στην επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος κι αν προέκυπτε κατά την εκπόνηση της εργασίας μου χάριν των γνώσεων και της επιστημονικής της κατάρτισης.

Ακόμη, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., καθώς και στους υπόλοιπους συμφοιτητές μου που εκπόνησαν τη διπλωματική τους εργασία στο εργαστήριο αυτό, για την αρμονική συνεργασία, το πάντα ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε, την κατανόηση και την στήριξή τους.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένειά μου και το κοντινό μου φιλικό περιβάλλον για την αγάπη, την ενθάρρυνση, την υπομονή και την στήριξη που μου παρείχαν όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ναρινγίνη ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των φλαβονοειδών και πρόκειται για ένα φυσικό γλυκοζίτη φλαβανόνης που συναντάται φυσικά στα εσπεριδοειδή, και ιδιαίτερα στο γκρέιπφρουτ, προσδίδοντάς τους μάλιστα την πικρή τους γεύση. Παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών και φαρμακολογικών δράσεων, όπως η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης, η αντικαρκινική και η καρδιοπροστατευτική δράση, χάρη στις οποίες έχει αποδειχθεί ότι μία διατροφή πλούσια σε αυτή μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη χρόνιων ασθενειών.

Η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και ο εκτεταμένος μεταβολισμός από του στόματος χορήγησής της δυσχεραίνουν, όμως, την περαιτέρω χρήση της σε βιολογικές εφαρμογές. Για την αντιμετώπιση των περιορισμών αυτών προτείνεται ο εγκλωβισμός της σε νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο τη βιοδιαθεσιμότητα και επιδρώντας στη φαρμακοκινητική της. Ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση βιοδιασπώμενων πολυμερικών νανοφορέων, καθώς χαρακτηρίζονται από αυξημένη βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα και χαμηλή τοξικότητα, ενώ ταυτόχρονα παρέχουν τη δυνατότητα τροποποιημένης αποδέσμευσης του φαρμάκου.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μίας πράσινης διεργασίας εγκλωβισμού του φυσικού φλαβονοειδούς ναρινγίνη σε νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης με χρήση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NADES) βεταΐνης – γαλακτικού οξέος (Bet:LA) (1:2) για τη διαλυτοποίηση της χιτοζάνης. Η προ – πηκτωμάτωση του αλγινικού με άλας και έπειτα η πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση των δύο πολυμερών αποτελεί τη μέθοδο παρασκευής των νανοσυστημάτων.

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας πραγματοποιείται μέσω πειραματικού σχεδιασμού Box Behnken με επιλεγμένες ανεξάρτητες μεταβλητές να είναι η περιεκτικότητα του διαλύματος της χιτοζάνης (% *w/v CS*), του διαλύματος του αλγινικού (% *w/v AL*) και του διαλύματος του χρησιμοποιούμενου φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (% *v/v NADES Bet:LA (1:2)*). Οι αποκρίσεις που εξετάζονται είναι το μέγεθος, η κατανομή του μεγέθους, το επιφανειακό φορτίο και η απόδοση εγκλωβισμού των παραγόμενων νανοσυστημάτων.

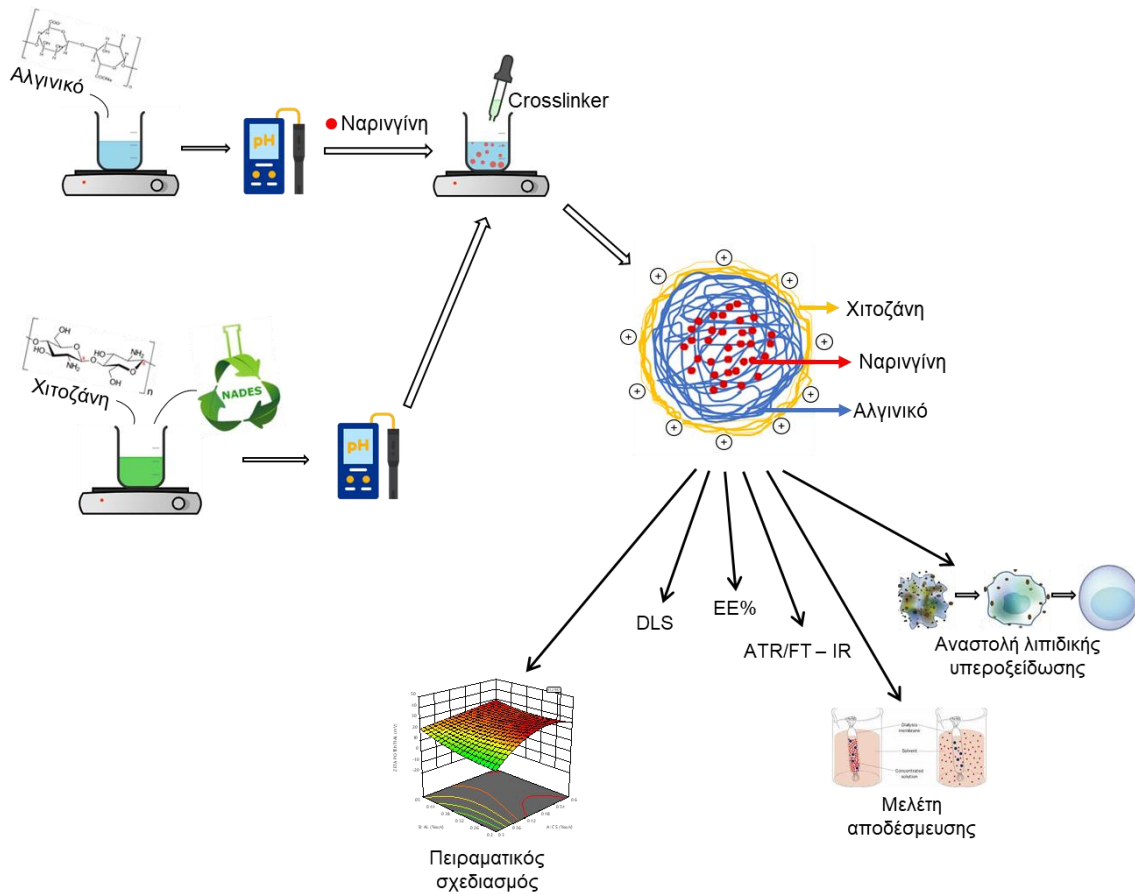
Τα βέλτιστα νανοσυστήματα εμφανίζουν μέγεθος $292.1 \pm 41.9 \text{ nm}$ και αποδεκτό δείκτη πολυδιασποράς 0.462 ± 0.061 , ενώ είναι αρκετά σταθερά παρουσιάζοντας ζ – δυναμικό $+22.4 \pm 2.7 \text{ mV}$. Η απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε αυτά κρίνεται επίσης υψηλή και είναι ίση με 66%.

Τα νανοσυστήματα χαρακτηρίζονται περαιτέρω δομικά μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR/FT – IR), ενώ παράλληλα μελετάται *in vitro* η αποδέσμευση της ναρινγίνης σε συνθήκες προσομοίωσης του ανθρώπινου δέρματος. Συνολικά αποδεσμεύεται

το 43% της εγκλωβισμένης ένωσης σε 120 h με την κινητική μοντελοποίηση να υποδεικνύει ως μηχανισμό αποδέσμευσης τη διάχυση κατά Fick. Επιπρόσθετα, εξετάζεται *in vitro* η ικανότητα της αποδεσμευμένης ναρινγίνης να αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση. Τέλος, εκτιμάται η σταθερότητα των παραγόμενων νανοσωματιδίων σε διάστημα εβδομήντα ημερών.

Επιστημονική Περιοχή: Πράσινη Χημεία, Φαρμακευτική Χημεία, Νανοτεχνολογία

Λέξεις κλειδιά: ναρινγίνη, πολυμερικά νανοσυστήματα, αλγινικό, χιτοζάνη, φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, μελέτη αποδέσμευσης, αντιοξειδωτική δράση



Εικόνα 1. Γραφική περίληψη

ABSTRACT

Naringin belongs to the wide family of flavonoids and is a natural flavanone glycoside which naturally occurs in citrus fruits, especially in grapefruit, inducing their bitter taste. Due to its numerous biological and pharmacological activities, such as antioxidant, anti – inflammatory, anticancer and cardioprotective activity, naringin has gained great interest as a candidate drug in the prevention of chronic diseases.

However, the use of naringin in biological applications is restricted due to its low water solubility and extensive oral metabolism. To address these limitations, the encapsulation of naringin improves its bioavailability and effects on its pharmacokinetics. The use of biodegradable polymeric nanocarriers is of particular scientific interest, as they are biocompatible, biodegradable, non – toxic and also provide the possibility of controlled drug release.

The aim of the present diploma thesis is the development and optimization of a green process regarding the encapsulation of the natural flavonoid naringin in alginate – chitosan nanosystems using the natural deep eutectic solvent (NADES) betaine – lactic acid (Bet:LA) (1:2) for the dissolution of chitosan. The nanosystems are prepared in a two – step procedure based on the pre – ionotropic gelation of alginate with a salt followed by the polyelectrolytic complexation of the two polymers.

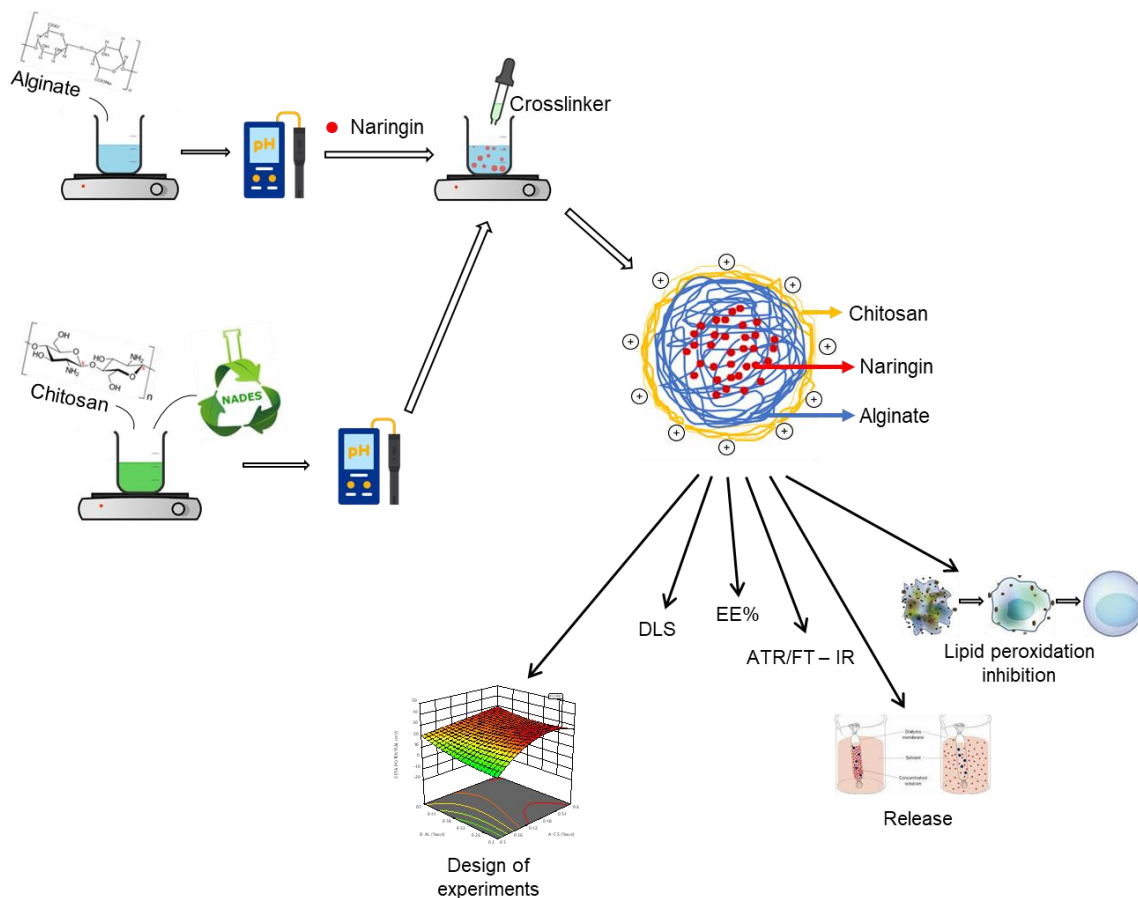
A Box Behnken experimental design is used for the optimization of the process. The selected independent variables are the content of the chitosan solution (% *w/v CS*), the alginate solution (% *w/v AL*) and the natural deep eutectic solvent solution (% *v/v NADES Bet:LA (1:2)*). As for the responses, the dependent variables examined are the particle size, particle size distribution, zeta – potential and encapsulation efficiency of the produced nanosystems.

The optimal nanosystems have an average particle size of $292.1 \pm 41.9 \text{ nm}$ and an acceptable polydispersity index of 0.462 ± 0.061 , while they are quite stable presenting a zeta – potential of $+22.4 \pm 2.7 \text{ mV}$. The encapsulation efficiency is also considered high and is equal to 66%.

Furthermore, the nanosystems are structurally characterized using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR/FT – IR). The *in vitro* release of naringin is studied in conditions simulating those of the human skin. The 43% of the entrapped compound is released in 120 *h* with the kinetic modeling studies indicating Fick diffusion as the release mechanism. Additionally, the ability of released naringin to inhibit lipid peroxidation is examined *in vitro*. Finally, the stability of the produced nanoparticles over seventy days is evaluated.

Scientific Area: Green Chemistry, Pharmaceutical Chemistry, Nanotechnology

Key words: naringin, polymeric nanoparticles, alginate, chitosan, natural deep eutectic solvents, drug release, antioxidant activity



Εικόνα 2. Graphical abstract

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|---|----|
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ..... | 1 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 2 |
| ABSTRACT..... | 4 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 10 |
| 1.1 Εισαγωγή στη Νανοτεχνολογία | 10 |
| 1.1.1 Ιστορική αναδρομή..... | 10 |
| 1.1.2 Εφαρμογές της νανοτεχνολογίας | 11 |
| 1.1.3 Επίδραση της νανοτεχνολογίας στην Ιατρική και τη Φαρμακευτική | 11 |
| 1.2 Νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων | 12 |
| 1.2.1 Παθητική και ενεργητική στόχευση νανοσυστημάτων | 13 |
| 1.2.2 Επιλογή φορέα εγκλωβισμού..... | 14 |
| 1.2.3 Διαλυτοί μακρομοριακοί φορείς φαρμάκων..... | 14 |
| 1.2.4 Κολλοειδή και σωματιδιακά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων | 15 |
| 1.2.4.1 Δενδριμερή..... | 15 |
| 1.2.4.2 Στερεά πολυμερικά νανοσωματίδια | 16 |
| 1.2.4.3 Στερεά πρωτεϊνικά νανοσωματίδια..... | 17 |
| 1.2.4.4 Στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια | 18 |
| 1.2.4.5 Ανόργανα νανοσωματίδια | 18 |
| 1.2.4.6 Πολυμερικά μικύλλια | 19 |
| 1.2.4.7 Λιποσώματα και κυστίδια επιφανειοδραστικών ουσιών..... | 19 |
| 1.3 Μηχανισμοί αποδέσμευσης δραστικών ενώσεων από νανοφορείς | 20 |
| 1.4 Χαρακτηρισμός νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων | 25 |
| 1.4.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)..... | 26 |
| 1.4.1.1 Αρχή λειτουργίας για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της κατανομής του μεγέθους | 26 |
| 1.4.1.2 Αρχή λειτουργίας για τον προσδιορισμό του ζ – δυναμικού | 27 |
| 1.5 Τοξικότητα των νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων | 28 |
| 1.6. Βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή ως φορείς συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων | 29 |
| 1.6.1 Αλγινικά | 29 |
| 1.6.1.1 Προέλευση, δομή και ιδιότητες των αλγινικών | 29 |

| | |
|---|----|
| 1.6.1.2 Βιοϊατρικές εφαρμογές των αλγινικών | 30 |
| 1.6.2 Χιτοζάνη..... | 31 |
| 1.6.2.1 Προέλευση, δομή και ιδιότητες της χιτοζάνης..... | 31 |
| 1.6.2.2 Βιοϊατρικές εφαρμογές της χιτοζάνης | 32 |
| 1.7 Νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης..... | 32 |
| 1.7.1 Μέθοδοι παρασκευής νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης | 33 |
| 1.7.1.1 Ιονοτροπική πηκτωμάτωση..... | 33 |
| 1.7.1.2 Πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση..... | 34 |
| 1.8 Πράσινη νανοτεχνολογία | 34 |
| 1.8.1 Πράσινη χημεία και πράσινοι διαλύτες..... | 34 |
| 1.8.1.1 Ιοντικά υγρά | 36 |
| 1.8.1.2 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες..... | 36 |
| 1.8.1.3 Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες..... | 37 |
| 1.8.2 Εφαρμογές της πράσινης χημείας στη νανοτεχνολογία | 38 |
| 1.9 Φυσικά προϊόντα και νανοτεχνολογία..... | 39 |
| 1.9.1 Φλαβονοειδή..... | 39 |
| 1.9.1.1 Χημική δομή και ταξινόμηση των φλαβονοειδών..... | 39 |
| 1.9.1.2 Βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών | 40 |
| 1.9.2 Φλαβανόνες: Ναρινγίνη | 41 |
| 1.9.2.1 Χημική δομή της ναρινγίνης | 42 |
| 1.9.2.2 Βιοσύνθεση της ναρινγίνης..... | 42 |
| 1.9.2.3 Απομόνωση της ναρινγίνης..... | 43 |
| 1.9.2.4 Βιολογικές δράσεις της ναρινγίνης | 44 |
| 1.9.2.5 Φαρμακοκινητική και τοξικότητα της ναρινγίνης | 45 |
| 1.9.2.6 Εγκλωβισμός ναρινγίνης σε νανοσυστήματα | 46 |
| ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ..... | 47 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 48 |
| 2.1 Αντιδραστήρια | 48 |
| 2.2 Όργανα και συσκευές | 49 |
| 2.3 Σύνθεση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη | 49 |
| 2.3.1 Ταυτοποίηση του παραγόμενου NADES | 50 |
| 2.3.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου NADES..... | 51 |

| | |
|--|----|
| 2.3.2.1 Προσδιορισμός της πυκνότητας | 51 |
| 2.3.2.2 Προσδιορισμός του <i>pH</i> | 51 |
| 2.4 Σύνθεση των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης | 51 |
| 2.4.1 Σύνθεση των κενών νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης | 56 |
| 2.5 Χαρακτηρισμός των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης | 56 |
| 2.5.1 Προσδιορισμός μεγέθους, κατανομής μεγέθους και ζ – δυναμικού..... | 56 |
| 2.5.2 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού | 58 |
| 2.5.2.1 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού με έμμεσο τρόπο..... | 60 |
| 2.5.2.2 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού με άμεσο τρόπο | 61 |
| 2.5.3 Μελέτη δομής μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και αποσβένουσα ολική ανάκλαση | 63 |
| 2.5.4 Μελέτη αποδέσμευσης <i>in vitro</i> | 64 |
| 2.5.5 Αξιολόγηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης | 66 |
| 2.6 Βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με χρήση πειραματικού σχεδιασμού..... | 68 |
| 2.6.1 Προκαταρκτικά πειράματα – Επιλογή ορίων των ανεξάρτητων μεταβλητών..... | 69 |
| 2.6.2 Πειράματα πειραματικού σχεδιασμού | 69 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 71 |
| 3.1 Πειραματικός σχεδιασμός..... | 71 |
| 3.1.1 Αποτελέσματα πειραμάτων πειραματικού σχεδιασμού | 71 |
| 3.1.2 Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων | 73 |
| 3.1.2.1 Μέγεθος νανοσυστημάτων | 73 |
| 3.1.2.2 Δείκτης πολυδιασποράς νανοσυστημάτων | 77 |
| 3.1.2.3 Z – δυναμικό νανοσυστημάτων | 80 |
| 3.1.2.4 Απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων | 84 |
| 3.1.3 Βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων..... | 88 |
| 3.1.4 Επιβεβαίωση του μοντέλου – Βέλτιστα νανοσυστήματα | 90 |
| 3.2 Περαιτέρω χαρακτηρισμοί των βέλτιστων νανοσυστημάτων | 92 |
| 3.2.1 Προσδιορισμός της απόδοσης εγκλωβισμού στα βέλτιστα νανοσυστήματα με άμεσο τρόπο | 92 |
| 3.2.2 Μελέτη δομής των βέλτιστων νανοσυστημάτων μέσω ATR/FT – IR... | 93 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.3 Μελέτη αποδέσμευσης <i>in vitro</i> της ναρινγίνης από τα βέλτιστα νανοσυστήματα..... | 99 |
| 3.2.4 Αξιολόγηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης από την αποδεσμευμένη ναρινγίνη | 103 |
| 3.3 Σύγκριση φυσικοχημικών ιδιοτήτων των βέλτιστων κενών και με εγκλωβισμένη ναρινγίνη νανοσυστημάτων..... | 104 |
| 3.4 Μελέτη της επίδρασης της χρήσης υπερήχων στις φυσικοχημικές ιδιότητες των βέλτιστων νανοσυστημάτων | 105 |
| 3.5 Μελέτη της επίδρασης των εναλλακτικών διαλυτών χιτοζάνης στις φυσικοχημικές ιδιότητες των βέλτιστων νανοσυστημάτων | 106 |
| 3.6 Μελέτη σταθερότητας των υδατικών διασπορών των βέλτιστων νανοσυστημάτων..... | 108 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 110 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ..... | 113 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 114 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... | 122 |
| ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ | 125 |
| ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ | 127 |
| ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ | 129 |
| ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ | 130 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή στη Νανοτεχνολογία

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

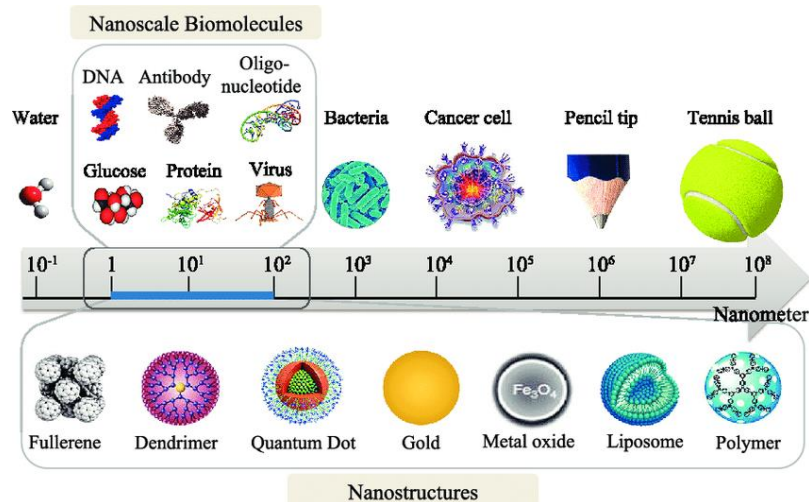
Η ακριβής προέλευση και ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας είναι ασαφής. Ένα διάσημο παράδειγμά της εντοπίζεται χιλιάδες χρόνια πριν και συγκεκριμένα στον 4ο αιώνα μ.Χ. στο κύπελλο του Λυκούργου, το οποίο αναγνωρίζεται ως ένα από τα παλαιότερα συνθετικά νανοϋλικά. Πρόκειται για δείγμα διχρωμικού γυαλιού, το οποίο λόγω της ύπαρξης νανοσωματιδίων αργύρου και χρυσού όταν φωτίζεται απ' έξω παίρνει πράσινο χρώμα, ενώ όταν φωτίζεται από μέσα παίρνει κόκκινο χρώμα. Η χρήση νανοσωματιδίων αργύρου, χρυσού ή χαλκού παρατηρείται στα παράθυρα μεσαιωνικών εκκλησιών προσδίδοντάς τους φωτεινές χρωματικές παραλλαγές, αλλά και κατά τη διάρκεια του 9ου – 17ου αιώνα σε κεραμικά υαλώματα. Τα υλικά αυτά χρησιμοποιούνταν για εκατοντάδες χρόνια χωρίς όμως οι υαλοτεχνίτες να κατανοούν πως δημιουργούνται τα διαφορετικά χρώματα, ώσπου το 1857 ο Michael Faraday απέδειξε πως τα νανοσωματίδια χρυσού σε ορισμένες συνθήκες φωτισμού οφείλονται για τις χρωματικές παραλλαγές. Στα επόμενα χρόνια η ανάπτυξη των φυσικών επιστημών, της τεχνολογίας και ιδιαίτερα της επιστήμης των υλικών βοήθησε στην κατανόηση της νανοτεχνολογίας.

Η έννοια της νανοτεχνολογίας διατυπώθηκε πρώτη φορά το 1959 από τον Richard Feynman κατά τη διάρκεια μίας διάλεξης με τίτλο «Υπάρχει άπλετος χώρος στο βάθος» (“There’ s plenty of room at the bottom”). Σε αυτή τη διάλεξη ο Feynman, ο οποίος θεωρείται ο πατέρας της σύγχρονης νανοτεχνολογίας, παρουσίασε ένα όραμα χρήσης μηχανών για την κατασκευή μηχανών έως το μοριακό επίπεδο. Ο όρος «νανοτεχνολογία» χρησιμοποιήθηκε πρώτα από τον Norio Taniguchi το 1974, για να περιγράψει την ακριβή κατασκευή υλικών στις διαστάσεις της νανοκλίμακας.

Η νανοτεχνολογία αποτελεί μία από τις πιο υποσχόμενες τεχνολογίες του 21ου αιώνα και αφορά τη μετατροπή της θεωρίας της νανοεπιστήμης σε χρήσιμες εφαρμογές κατασκευάζοντας ύλη στην κλίμακα των νανομέτρων. Συγκεκριμένα, και σύμφωνα με το United States National Nanotechnology Initiative (NNI) ως νανοτεχνολογία ορίζεται «μία επιστήμη, μηχανική και τεχνολογία που διεξάγεται σε νανοκλίμακα (1 έως 100 nm), όπου μοναδικά φαινόμενα επιτρέπουν νέες εφαρμογές σε ένα ευρύ φάσμα πεδίων, από τη χημεία, τη φυσική και τη βιολογία, στην ιατρική, τη μηχανική και την ηλεκτρονική».¹⁻³

1.1.2 Εφαρμογές της νανοτεχνολογίας

Οι νανοδομές μπορούν να οριστούν ως δομές με μεγέθη μικρότερα των 100 nm, συνεπώς οι νέες αυτές δομές είναι πολύ μικρές ώστε να υπακούουν στους νόμους της φυσικής, αλλά και πολύ μεγάλες ώστε να υπακούουν τους νόμους της κβαντομηχανικής. Έτσι, ανήκουν σε μία ενδιαμέση κλίμακα που καλείται «μεσοκλίμακα» και στην οποία κυρίαρχα είναι τα διεπιφανειακά φαινόμενα.⁴

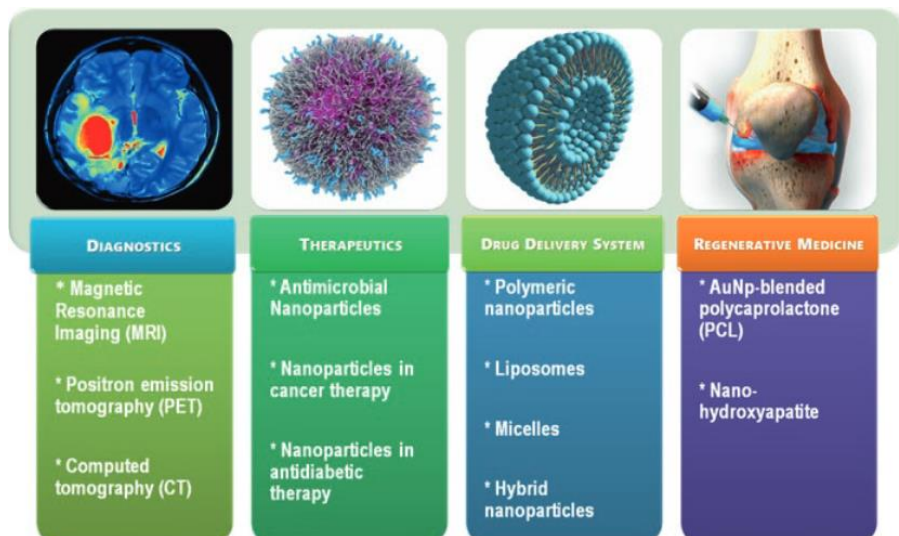


Εικόνα 3. Σύγκριση των διαστάσεων συνήθων νανοδομών με τις διαστάσεις μορίων, κυττάρων και αντικειμένων⁵

Λόγω της μεγάλης αναλογίας του εμβαδού επιφάνειάς τους προς τον όγκο οι δομές αυτές παρουσιάζουν αξιοσημείωτη βελτίωση στις φυσικές, μηχανικές, ηλεκτρικές, μαγνητικές και οπτικές ιδιότητές τους συγκριτικά με τα υλικά που εμπίπτουν στη μακροκλίμακα. Οι ανώτερες αυτές ιδιότητές τους καθιστά τα νανοσυστήματα χρήσιμα σε πληθώρα εφαρμογών σε διάφορους τομείς, όπως της ιατρικής, της φαρμακευτικής, της πληροφορικής, της ηλεκτρονικής, της γεωργίας, της ενέργειας και του περιβάλλοντος, αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών.^{2,3,6}

1.1.3 Επίδραση της νανοτεχνολογίας στην Ιατρική και τη Φαρμακευτική

Το εύρος των μεγεθών των νανοσυστημάτων στη νανοκλίμακα προσδίδει σ' αυτά ιδανική κινητικότητα στην κυκλοφορία του αίματος, ικανότητα διέλευσης των ιστών και διαπέρασης των βιολογικών μεμβρανών καθιστώντας τα χρήσιμα σε βιολογικές εφαρμογές. Έτσι, με την ανάπτυξη της νανοεπιστήμης τα τελευταία χρόνια οι εφαρμογές της νανοτεχνολογίας έχουν δώσει λύσεις στην απεικόνιση και τη διάγνωση με την ανάπτυξη ακριβών *in vitro* και *in vivo* διαγνωστικών, την αναγεννητική ιατρική με την επισκευή ενός κατεστραμμένου ιστού χρησιμοποιώντας νανοϋλικά και τη χρήση των νανοδομών στη θεραπεία ασθενειών ή ως συστήματα παράδοσης φαρμάκων.^{3,7}



Εικόνα 4. Παραδείγματα εφαρμογών της νανοτεχνολογίας στην Ιατρική και τη Φαρμακευτική⁸

1.2 Νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Τα νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων είναι στερεές κολλοειδείς δομές με μέγεθος από 1 έως 1000 nm που αποτελούνται από διάφορα μακρομόρια, στα οποία οι φαρμακευτικές ουσίες μπορούν να προσροφηθούν, να δεσμευτούν ή να συνδεθούν ομοιοπολικά.^{9,10}

Η ανάπτυξη συστημάτων στη νανοκλίμακα για τη μεταφορά φαρμάκων αποτελεί ελκυστικό πεδίο έρευνας για την επιστημονική κοινότητα χάρη στα πολλαπλά τους πλεονεκτήματα. Στα νανοσυστήματα το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων τους βρίσκεται στην επιφάνειά τους αυξάνοντας τη συνολική επιφάνειά τους, γεγονός που συμβάλει στη δέσμευση, την προσρόφηση ή τη μεταφορά ενώσεων όπως τα φάρμακα. Ταυτόχρονα, σημαντική είναι η ικανότητα των συστημάτων αυτών να βελτιώνουν το φαρμακοκινητικό προφίλ του φαρμάκου, αφού ο εξαιρετικά μικρός τους όγκος τους επιτρέπει να μεταφέρονται μέσω των λεπτών τριχοειδών αγγείων αποφεύγοντας τη φαγοκυττάρωση και διασφαλίζοντας εκτεταμένη κυκλοφορία στο αίμα. Έτσι, διεισδύουν εν τέλει στα κύτταρα και ιστούς στόχους, προκειμένου να απελευθερώσουν το βιοδραστικό μόριο. Τα νανοσυστήματα εξασφαλίζουν την σταθεροποίηση και την προστασία των βιοδραστικών μορίων από εξωγενείς παράγοντες, π.χ. τη χημική ή ενζυμική αποικοδόμηση, τη φωτοξείδωση κ.α. βελτιώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Πέρα από την προστασία τους οι νανοδομές αυτές μπορούν να τροποποιήσουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου, π.χ. στα υδρόφοβα φάρμακα, με στόχο την αύξηση της βιοσυμβατότητας, τη βελτίωση της φαρμακοκινητικής και κατ' επέκταση τη μείωση της τοξικότητάς τους. Ένα άλλο πλεονέκτημα των νανοσυστημάτων αποτελεί η επίτευξη παρατεταμένης ή ελεγχόμενης αποδέσμευσης του φαρμάκου επιλέγοντας το κατάλληλο σύστημα, διασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την

ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα ή την άνεση του ασθενή. Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η δυνατότητα χορήγησης των συστημάτων αυτών από διαφορετικές οδούς (στοματική, παρεντερική, ρινική, διαδερμική κ.α.).^{6,8,9,11}



Εικόνα 5. Μερικά από τα κύρια πλεονεκτήματα των νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων⁹

1.2.1 Παθητική και ενεργητική στόχευση νανοσυστημάτων

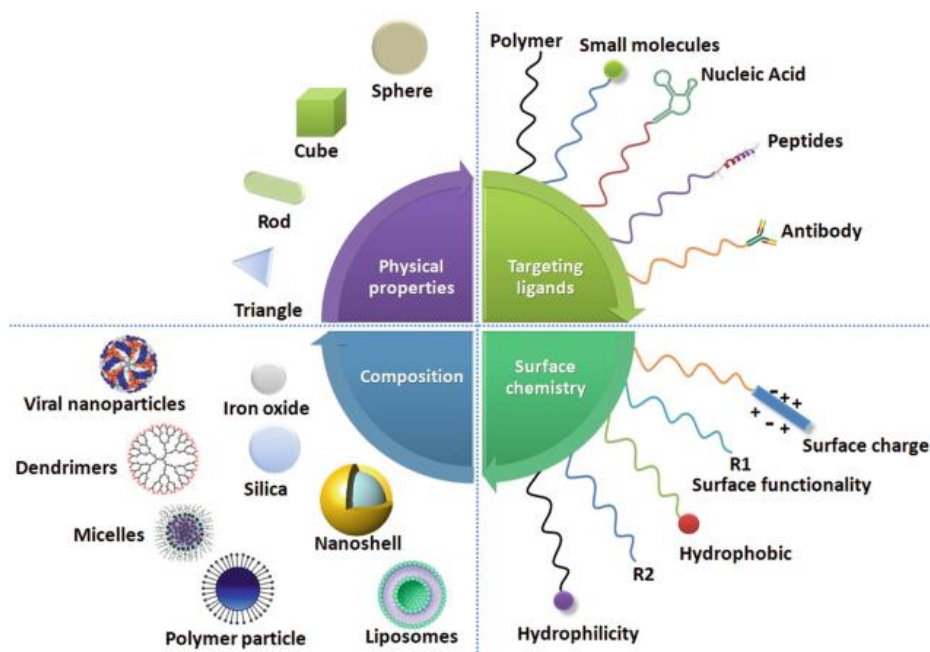
Τα συστήματα στοχευμένης χορήγησης φαρμάκων πλεονεκτούν, καθώς προστατεύουν τα υγιή κύτταρα από τοξικές ενώσεις, ενώ μειώνουν την απαιτούμενη δόση φαρμάκου καταπολεμώντας και τις παρενέργειες. Ο μηχανισμός που ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων στοχεύει διακρίνεται σε δύο βασικούς τύπους:¹²

- *Παθητική στόχευση:* Βασίζεται στα χαρακτηριστικά του νανοφορέα και στις ειδικές συνθήκες του κύτταρου – στόχου για την ορθή μεταφορά του φαρμάκου χωρίς να διαθέτει πρόσδεμα για τη δέσμευση σε συγκεκριμένο κύτταρο.
- *Ενεργητική στόχευση:* Τροποποιεί την εξωτερική επιφάνεια του νανοφορέα με χρήση αντισωμάτων, πεπτιδίων, νουκλειικών οξέων ή άλλων μικρών μορίων, τα οποία αναγνωρίζουν τα κύτταρα – στόχους βελτιώνοντας έτσι τη συγγένεια του νανοφορέα με αυτά.

1.2.2 Επιλογή φορέα εγκλωβισμού

Η επιλογή του κατάλληλου φορέα εγκλωβισμού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι:¹³

- τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου
- η φυσιολογία και η τοποθεσία του στόχου δράσης
- ο μηχανισμός στόχευσης
- η απαιτούμενη δόση φαρμάκου
- η οδός χορήγησης
- το προφίλ απελευθέρωσης του φαρμάκου και
- το επιθυμητό σχήμα και μέγεθος των νανοσυστημάτων



Εικόνα 6. Διάφορα νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων⁸

Τα διάφορα, λοιπόν, συστήματα φορέων φαρμάκων μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, οι οποίες και αναλύονται παρακάτω:¹³

- *Συστήματα διαλυτών μακρομοριακών φορέων*
- *Συστήματα κολλοειδών και σωματιδιακών φορέων*

1.2.3 Διαλυτοί μακρομοριακοί φορείς φαρμάκων

Τα συστήματα διαλυτών μακρομοριακών φορέων φαρμάκων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα αντισώματα, τα πολυμερή, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες, χρησιμοποιούνται με στόχο την προαγωγή της στοχευμένης δράσης των φαρμάκων. Σε αυτά τα συστήματα το φάρμακο είναι συζευγμένο με τον φορέα. Πλεονεκτούν έναντι των συστημάτων σωματιδιακών φορέων χάρη στο

μικρό τους μέγεθος που τα διευκολύνει να μετακινούνται έξω από τη συστηματική κυκλοφορία. Ο χρόνος ημιζωής των φορέων αυτών στο πλάσμα εξαρτάται από το μοριακό βάρος, την ιοντική φύση και την αλληλεπίδραση τους με άλλα βιολογικά συστατικά στην κυκλοφορία. Το βασικό μειονέκτημά τους έναντι του σωματιδιακού τύπου φορέων έγκειται στο ότι μπορούν να μεταφέρουν μικρότερη ποσότητα φαρμάκου.¹³

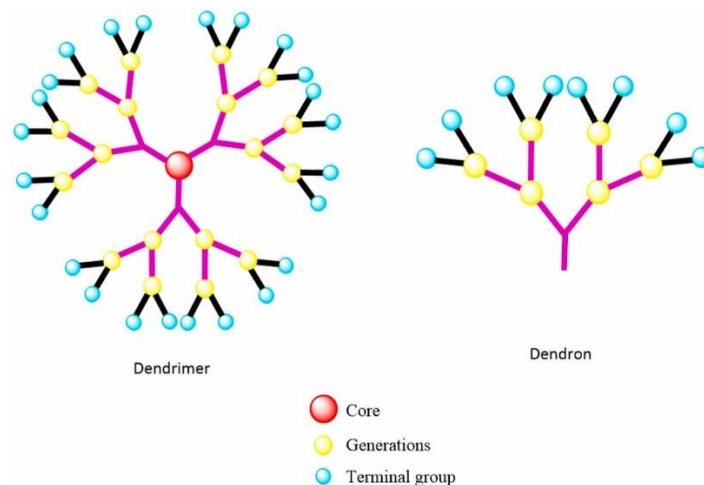
1.2.4 Κολλοειδή και σωματιδιακά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Τα κολλοειδή και σωματιδιακά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων κυμαίνονται στο εύρος μεταξύ 1 nm και 1 μm και σε αυτά περιλαμβάνονται τα δενδριμερή, τα νανοσωματίδια, τα μικκύλια, τα λιποσώματα και οι μικροσφαίρες. Σε αυτά τα συστήματα το φάρμακο συνδέεται συνήθως μη ομοιοπολικά στο φορέα, συνεπώς έχουν τη δυνατότητα μεγαλύτερης φόρτωσης φαρμάκου. Ταυτόχρονα, το φάρμακο μπορεί να εγκλωβιστεί και μέσα στον φορέα προστατεύοντάς το με αυτόν τον τρόπο από την αποδόμησή του. Ωστόσο, η φύση των σωματιδιακών αυτών φορέων μπορεί να οδηγήσει στην εξαφάνισή τους από τη συστηματική κυκλοφορία εξαιτίας της δράσης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων, ενώ το αυξημένο μέγεθός τους μπορεί να απαγορεύσει την εξαγγείωσή τους.¹³

1.2.4.1 Δενδριμερή

Τα δενδριμερή είναι υπερ – διακλαδισμένα μακρομόρια σε μονοδιασπορά και λόγω της ελεγχόμενης χημικής σύνθεσής τους το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 1 και 100 nm. Η δομή τους μπορεί να διακριθεί σε τρεις περιοχές:

- τον πυρήνα (core)
- τους κλάδους (branching units), οι οποίοι ξεκινούν από τον πυρήνα και συγκροτούν το δενδριμερές
- την εξωτερική επιφάνεια, στην οποία βρίσκονται οι τελικές ομάδες



Εικόνα 7. Η δομή ενός δενδριμερούς¹⁴

Οι κλάδοι περιγράφονται ως γενεές, ξεκινώντας από την κεντρική διακλάδωση στον πυρήνα ως γενεά 0 (G0) αυξανόμενες καθώς προστίθεται κάθε στιβάδα διακλάδωσης, δηλαδή G1, G2. Με την προσθήκη κάθε γενεάς αυξάνεται εκθετικά ο αριθμός των τελικών ομάδων που είναι διαθέσιμες και το μακρομόριο τείνει να υιοθετεί ένα πιο σφαιρικό σχήμα με κάθε γενεά.

Τα δενδριμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκου με παθητική στόχευση με μία επικάλυψη από πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) επιτυγχάνοντας την αύξηση του χρόνου ημιζωής τους στην κυκλοφορία του αίματος είτε με ενεργητική στόχευση προσθέτοντας ομάδες στόχευσης. Όσον αφορά τα φάρμακα, αυτά μπορούν είτε να συνδεθούν ομοιοπολικά στη δομή των δενδριμερών είτε να διαλυτοποιηθούν εντός της υδρόφοβης δομής τους.

Η ελεγχόμενη σχεδίαση των δενδριμερών, όσον αφορά παραμέτρους όπως το μέγεθος, το σχήμα και η χημεία της επιφάνειας, τα καθιστά πολύ ελκυστικά νανοϋλικά, τα οποία επιτρέπουν στους ερευνητές να βελτιώσουν ζητήματα σχετικά με την κυτταρική πρόσληψη, τη μεταφορά, τη βιοδιαθεσιμότητα, την εξάλειψη και την τοξικότητα.¹³⁻¹⁶

1.2.4.2 Στερεά πολυμερικά νανοσωματίδια

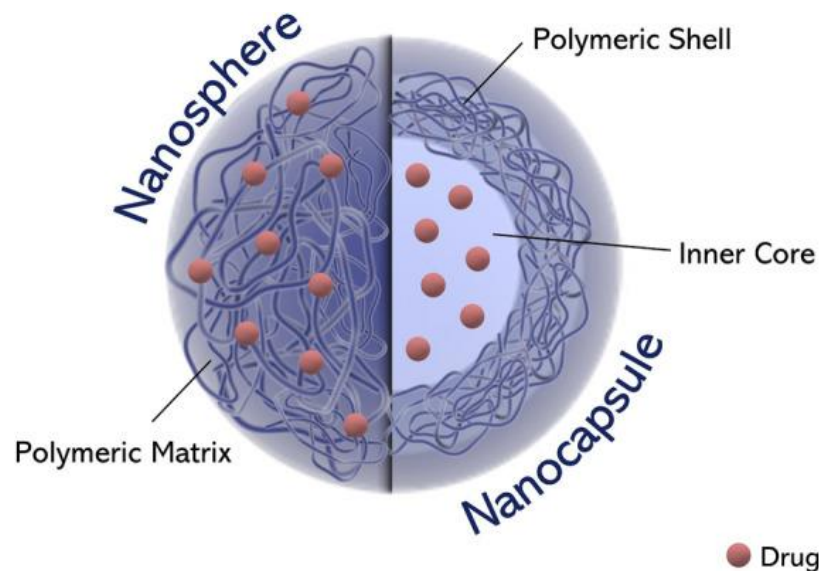
Τα στερεά πολυμερικά νανοσωματίδια μπορούν να παρασκευαστούν με χρήση μίας μεγάλης ποικιλίας φυσικών ή συνθετικών πολυμερών. Η πιο ευρεία μελέτη έχει πραγματοποιηθεί στα βιοδιασπώμενα πολυμερή και κυρίως στη χρήση του (πολυ)γαλακτικού οξέος (PLA), του πολυ(γαλακτικού – γλυκολικού) οξέος (PLGA) και της πολυ(καπρολακτόνης) (PCL).

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια πλεονεκτούν ως φορείς στα νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων χάρη στην υψηλή βιοσυμβατότητα, τη βιοαποδομησιμότητα και τις ελεγχόμενες ιδιότητές τους όπως το σχήμα, το μέγεθος και το επιφανειακό φορτίο. Ταυτόχρονα, η χρήση τους βελτιώνει την σταθερότητα των θεραπευτικών παραγόντων, παρατείνει την κυκλοφορία τους στο αίμα, αυξάνει την αποτελεσματικότητα της διασταύρωσής τους με τις βιολογικές μεμβράνες και καθορίζει τον ρυθμό απελευθέρωσής τους στα κύτταρα – στόχους.¹⁷

Η επιλογή του κατάλληλου πολυμερικού φορέα για το εκάστοτε νανοσύστημα μεταφοράς φαρμάκων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Αρχικά, ο πολυμερικός φορέας πρέπει να περιλαμβάνει τις λειτουργικές ομάδες για την επιτυχή ομοιοπολική σύνδεση με το θεραπευτικό παράγοντα, ενώ παράλληλα πρέπει να είναι βιοαποικοδομήσιμος και μη τοξικός. Το μοριακό βάρος του πολυμερούς είναι μια ακόμη βασική σχεδιαστική παράμετρος, η οποία επηρεάζεται από την οδό χορήγησης, τον τύπο του πολυμερούς (φυσικό ή συνθετικό), τη θέση δράσης, αλλά και τη νεφρική αποβολή του πολυμερούς μετά από συστηματική χορήγηση. Η αρχιτεκτονική του πολυμερούς παίζει κι αυτή καταλυτικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα των νανοσυστημάτων, καθώς η διακλάδωση, η ευκαμψία, ο

υδροδυναμικός όγκος και η υδρόφιλη φύση του έχουν επίδραση στην κυκλοφορία του πολυμερούς *in vivo* και στην αναστολή της νεφρικής του κάθαρσης αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής του εντός του ανθρώπινου οργανισμού. Τέλος, απαραίτητη είναι η υψηλή ικανότητα φόρτωσης του πολυμερικού νανοφορέα με το θεραπευτικό παράγοντα, η οποία αποκτά ακόμη μεγαλύτερη σημασία στην περίπτωση αντιμετώπισης πολλαπλών στόχων.¹⁸

Οι δύο τύποι στερεών πολυμερικών νανοσωματιδίων που κυριαρχούν στις βιοϊατρικές εφαρμογές είναι οι νανοσφαίρες και οι νανοκάψουλες. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι οι νανοσφαίρες είναι συστήματα συμπαγούς πολυμερικής μήτρας, όπου η δραστική ουσία μπορεί να διαλυθεί, να εγκλωβιστεί, να ενωθεί με ομοιοπολικούς δεσμούς ή να προσροφηθεί σε αυτήν, ενώ οι νανοκάψουλες αποτελούνται από μία κοιλότητα, όπου εγκλωβίζεται η δραστική ουσία και η οποία περιβάλλεται από ένα πολυμερικό κέλυφος. Η δραστική ουσία μπορεί να είναι σε στερεή, υγρή μορφή ή σε διασπορά μέσα στην κοιλότητα.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της μορφολογίας των δύο τύπων στερεών πολυμερικών νανοσωματιδίων¹⁹

1.2.4.3 Στερεά πρωτεϊνικά νανοσωματίδια

Τα στερεά πρωτεϊνικά νανοσωματίδια μπορούν να παραχθούν από διάφορες πηγές πρωτεϊνών, παραδείγματα των οποίων αποτελούν οι γλυκοπρωτεΐνες, η λυσοζύμη και η αλβουμίνη. Οι νανοδομές αυτές πλεονεκτούν, καθώς παρουσιάζουν χαρακτηριστικά τόσο των πρωτεϊνών, όπως η ευκαμψία, οι δυνατότητες σύζευξης, η βιοαποδομησιμότητα, η διαθεσιμότητα και η προσιτότητα και η σχετικά χαμηλή ανοσογονικότητα όσο και των νανοσυστημάτων όσον αφορά την ελεγχόμενη αποδέσμευση, τη βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα και την σταθερότητα. Ωστόσο, στη χρήση των πρωτεϊνικών νανοσωματιδίων υπεισέρχονται και κάποιες ανησυχίες που αφορούν την ετερογένεια των

πρωτεϊνών, οι οποίες ως φυσικά πολυμερή αποτελούν μίγματα διαφορετικών μοριακών βαρών που μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορές στα χαρακτηριστικά του προϊόντος και στις μεταβλητές από παρτίδα σε παρτίδα. Μια άλλη αξιοσημείωτη πρόκληση είναι η περιορισμένη δυνατότητα χορήγησης των νανοσυστημάτων αυτών από το στόμα καθιστώντας την παρεντερική χορήγηση επί του παρόντος την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη οδό χορήγησης. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες ως νανοφορείς είναι ευάλωτες στο χαμηλό pH του στομάχου που οδηγεί σε υδρόλυσή τους και αποικοδομήσιμες στο λεπτό έντερο από ένζυμα.²⁰

1.2.4.4 Στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια

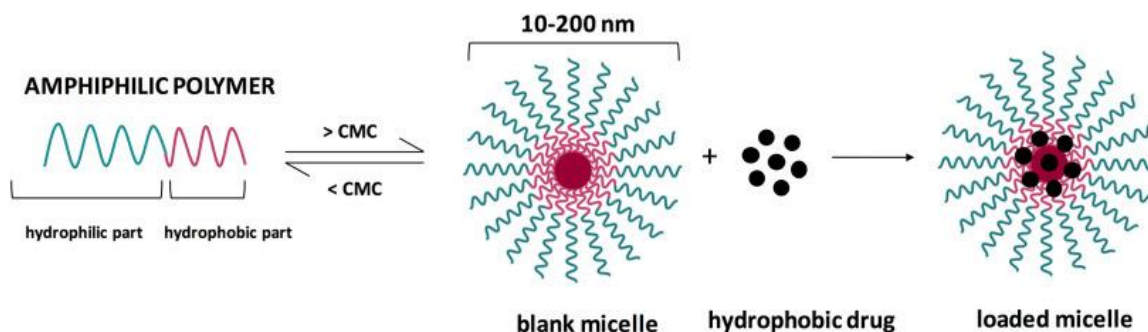
Τα στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια είναι κολλοειδή σωματίδια που παρασκευάζονται από λιπίδια που είναι στερεά τόσο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όσο και στη θερμοκρασία του ανθρωπίνου σώματος (π.χ. τριγλυκερίδια, κορεσμένα φωσφολιπίδια και λιπαρά οξέα) διεσπαρμένα μέσα σε μια υδατική φάση. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό τους χάρη στην ικανότητά τους να μειώνουν τη διεπιφανειακή ενέργεια μεταξύ του λιπιδίου και της υδατικής φάσης ευνοώντας τη φυσική σταθερότητα της διασποράς. Συνήθως το μέγεθος των διεσπαρμένων αυτών λιπιδικών σωματιδίων είναι της κλίμακας των πενήντα έως αρκετών εκατοντάδων νανομέτρων, ενώ εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα με σημαντικότερα τη δυνατότητα εγκλωβισμού τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων φαρμάκων, τη χαμηλή τοξικότητα, το χαμηλό κόστος και την υψηλή βιοδιαθεσιμότητα. Τα εναιωρήματα στερεών λιπιδικών νανοσωματιδίων έχουν αναπτυχθεί για παρεντερική, από του στόματος, οφθαλμική, δερματική και κοσμητική εφαρμογή, αλλά πρόσφατα έχουν ερευνηθεί ως πιθανά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων με στοχευμένη δράση με μία επικάλυψη αυτών με PEG.^{13,21}

1.2.4.5 Ανόργανα νανοσωματίδια

Τα ανόργανα νανοσωματίδια παρασκευάζονται από ανόργανα υλικά και σε αυτά περιλαμβάνονται οι νανοσωλήνες άνθρακα, τα κεραμικά, τα μέταλλα, τα οξείδια των μετάλλων και τα σουλφίδια των μετάλλων. Το πολύ μικρό μέγεθος τους (έως και 50 nm) και η σταθερότητά τους τα καθιστά χρήσιμους υποψήφιους ως φορείς εγκλωβισμού και προστασίας βιοδραστικών ενώσεων, ενώ γίνονται ακόμη πιο ελκυστικά με τη δυνατότητά τους να ξεφεύγουν το Δίκτυο Ενδοθηλιακού Συστήματος (ΔΕΣ) χάρη στο μικρό τους μέγεθος και να μην επηρεάζονται από τις αλλαγές του pH. Ωστόσο, ανασταλτικά λειτουργεί το γεγονός ότι δεν είναι γενικά βιοαποικοδομήσιμα και έτσι η εφαρμογή τους σε φαρμακευτικά προϊόντα είναι περιορισμένη.^{13,22}

1.2.4.6 Πολυμερικά μικύλλια

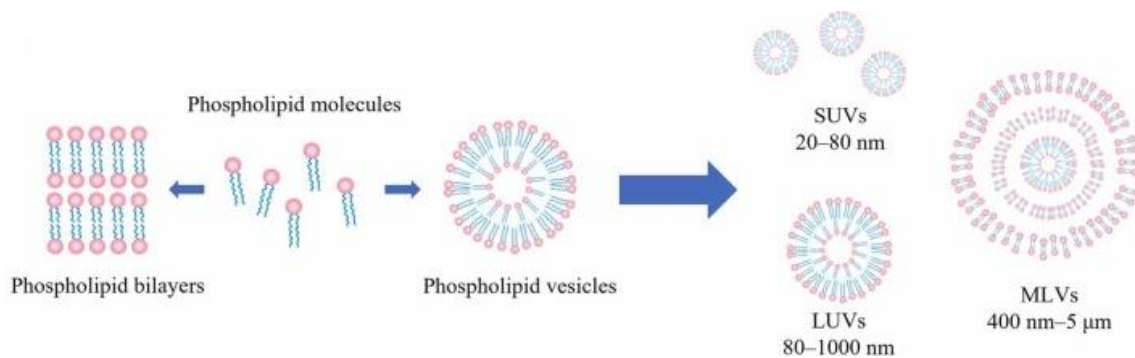
Τα πολυμερικά μικύλλια έχουν μέγεθος νανομέτρων και αποτελούνται από αμφίφιλα συμπολυμερή, τα οποία όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον σχηματίζουν μικύλλια. Ο υδρόφοβος πυρήνας τους είναι κατάλληλος για τον εγκλωβισμό και τη μεταφορά λιπόφιλων μορίων – φαρμάκων. Τα πολυμερικά μικύλλια παρουσιάζουν πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μικυλλίων, δηλαδή αυτών που σχηματίζονται από επιφανειοδραστικές ουσίες, λόγω της καλύτερης θερμοδυναμικής σταθερότητας τους σε βιολογικά συστήματα. Έτσι, οι δομές αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά των φαρμάκων με περιορισμένη διαλυτότητα διαφεύγοντας από το ΔΕΣ χάρη στο μικρό τους μέγεθος, ενώ παράλληλα μπορούν να προστεθούν στην επιφάνεια τους ομάδες στόχευσης αυξάνοντας την εκλεκτικότητα.^{13,22}



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση πολυμερικού μικυλλίου ως νανοσύστημα μεταφοράς φαρμάκων²³

1.2.4.7 Λιποσώματα και κυστίδια επιφανειοδραστικών ουσιών

Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων και αποτελούνται από ένα ή περισσότερα αμφίφιλα φωσφολιπίδια. Γενικά, πρόκειται για κλειστά σφαιρικά κυστίδια που διαθέτουν έναν υδατικό πυρήνα, ο οποίος περιβάλλεται από μία ή περισσότερες διπλές ομοκεντρικές στιβάδες φωσφολιπιδίων. Μάλιστα, οι στιβάδες αυτές μπορούν να τροποποιηθούν δομικά χρησιμοποιώντας στερόλες, πολυμερή, πρωτεΐνες ή σάκχαρα. Το συστατικό που συναντάται πιο συχνά, όμως, είναι η χοληστερόλη, η οποία αυξάνει την σταθερότητα και την ακαμψία της διπλής στιβάδας ρυθμίζοντας την ρευστότητά της. Τα λιποσώματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με το μέγεθος, τον αριθμό των διπλοστιβάδων και τη σύνθεσή τους. Έτσι, με βάση τον αριθμό των διπλοστιβάδων τα λιποσώματα ταξινομούνται στα μονοστρωματικά κυστίδια (ULV) και στα πολυστρωματικά κυστίδια (MLV). Τα ULV περικλείονται από μία διπλή στιβάδα λιπιδίων και ανάλογα με το μέγεθός τους μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες, τα μικρά μονοστρωματικά κυστίδια (SUV) με μεγέθη 30 – 100 nm, τα μεγάλα μονοστρωματικά κυστίδια (LUV) με μεγέθη 100 – 1000 nm και τα πολύ μεγάλα μονοστρωματικά κυστίδια (GUV) με μεγέθη 1 – 100 μm.

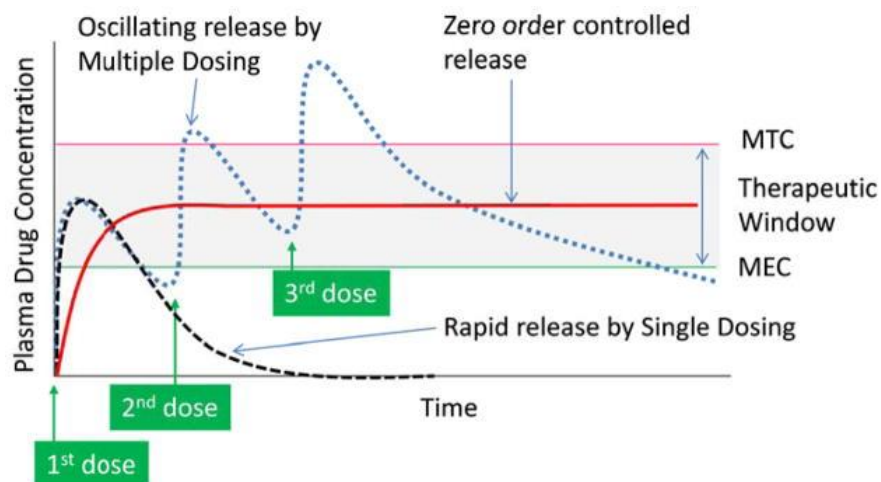


Εικόνα 10. Οι διάφοροι τύποι λιποσωμάτων²⁴

Τα βασικά πλεονεκτήματα των λιποσωμάτων έναντι άλλων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων είναι η δυνατότητα ταυτόχρονης φόρτωσης τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων δραστικών μορίων. Συγκεκριμένα, οι υδρόφιλες ουσίες εγκλωβίζονται στον πυρήνα των κυστιδίων ενώ οι υδρόφοβες στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Με αυτόν τον τρόπο, βελτιώνεται η βιοδιαθεσιμότητα των δραστικών ουσιών, οι οποίες προστατεύονται από την πρόωρη αποσύνθεση διασφαλίζοντας την ελεγχόμενη αποδέσμευσή τους. Αυτά τα χαρακτηριστικά τους είναι ο λόγος που αρκετά λιποσωμικά σκευάσματα χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πρακτική στη μεταφορά φαρμάκων και ως συστήματα μεταφοράς εμβολίων.²⁵

1.3 Μηχανισμοί αποδέσμευσης δραστικών ενώσεων από νανοφορείς

Η κύρια μέριμνα στον έλεγχο του φαρμακοκινητικού προφίλ ενός φαρμάκου είναι η ανάγκη διατήρησης του επιπέδου αυτού στο αίμα εντός του επιτρεπτού θεραπευτικού παραθύρου, δηλαδή μεταξύ της ελάχιστης αποτελεσματικής (θεραπευτικής) συγκέντρωσης (MEC) και της ελάχιστης τοξικής συγκέντρωσης (MTC). Ειδικότερα, όταν ένα φάρμακο χορηγείται ως μία μόνο μεγάλη δόση, το επίπεδο του φαρμάκου αυξάνεται πάνω από το MTC, προκαλώντας τοξικές παρενέργειες και στη συνέχεια πέφτει γρήγορα κάτω από το MEC, ενώ όταν χορηγείται σε πολλαπλές δόσεις με συγκεκριμένο χρονικό διάστημα μεταξύ αυτών μπορεί να μειωθεί η διακύμανση των επιπέδων αυτού στο πλάσμα. Το πρόβλημα σε αυτή την περίπτωση έγκειται στην πιθανή μη συμμόρφωση του ασθενούς με τις πολλαπλές χορηγήσεις φαρμάκου. Σε αυτό το σημείο τα νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων πλεονεκτούν, καθώς παρέχοντας τη δυνατότητα τροποποιημένης (παρατεταμένης ή ελεγχόμενης) αποδέσμευσης του φαρμάκου επιτυγχάνεται μία συγκεκριμένη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα εντός του θεραπευτικού παραθύρου, η οποία και παραμένει σταθερή για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Συχνά επιδιώκεται και ένας σταθερός ρυθμός αποδέσμευσης φαρμάκου (προφίλ αποδέσμευσης φαρμάκου μηδενικής τάξης).



Σχήμα 1. Τα προφίλ της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα στην περίπτωση λήψης μίας δόσης φαρμάκου, πολλαπλών δόσεων και ελεγχόμενης αποδέσμευσης μηδενικής τάξης²⁶

Η αποδέσμευση του φαρμάκου από ένα νανοφορέα επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος της σύνθεσης (φάρμακο, φορέας, έκδοχα), την αναλογία σύνθεσης, τις φυσικές ή χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών και τις μεθόδους παρασκευής. Ανάλογα με τον μηχανισμό της αποδέσμευσης του φαρμάκου από ένα νανοσύστημα αυτά μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες:

A. Συστήματα όπου η αποδέσμευση του φαρμάκου ελέγχεται από τη διάχυσή του διαμέσου του πολυμερούς (Diffusion – controlled release)

Διακρίνονται σε δύο κύριους τύπους, τα συστήματα τύπου μήτρας, τα οποία κατά την επαφή τους με υδατικό περιβάλλον και τη διείσδυση νερού σε αυτά πραγματοποιείται η διάχυση της δραστικής ουσίας διαμέσου των πόρων της πολυμερικής μήτρας, και τα συστήματα τύπου δεξαμενής, τα οποία αποτελούνται από τον πυρήνα που περιέχει η δραστική ουσία και την περιβαλλόμενη πολυμερική μεμβράνη. Σε αυτά η δραστική ουσία διαχέεται μέσω της πολυμερικής μεμβράνης λόγω της διαφοράς στη συγκέντρωσή της.

B. Συστήματα όπου η αποδέσμευση του φαρμάκου ελέγχεται από τη διείσδυση του διαλύτη σε αυτό (Solvent – controlled release)

Διακρίνονται σε δύο κύριους τύπους, τα ωσμωτικά συστήματα και τα διογκούμενα συστήματα. Στα ωσμωτικά συστήματα η αποδέσμευση λαμβάνει χώρα σε φορέα που καλύπτεται με μία ημιπερατή μεμβράνη, μέσω της οποίας μπορεί να ρέει νερό από το εξωτερικό του φορέα (με χαμηλή συγκέντρωση φαρμάκου) στο φορτωμένο με φάρμακο πυρήνα (με υψηλή συγκέντρωση φαρμάκου). Απεναντίας, στα διογκούμενα συστήματα η πρόσληψη του νερού έχει ως αποτέλεσμα τη διόγκωση

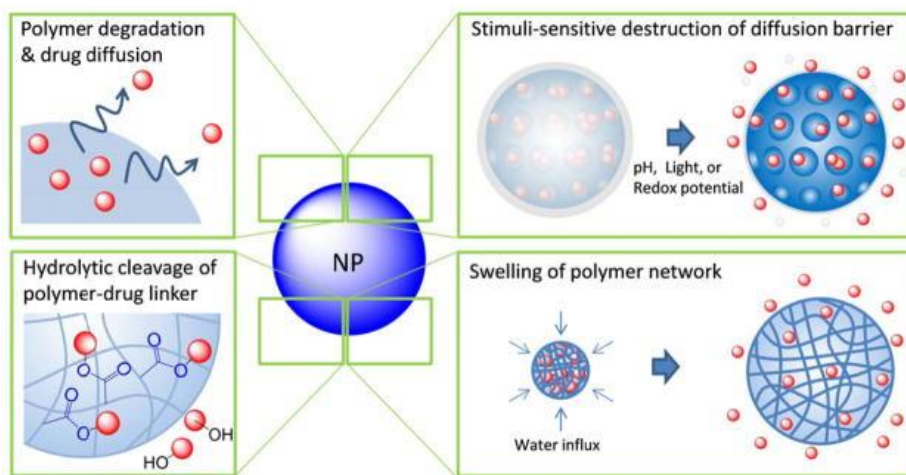
των σωματιδίων, τη διάλυση της δραστικής ουσίας και τη διάχυσή της μέσα από τη διογκωμένη πολυμερική μήτρα.

C. Συστήματα όπου η αποδέσμευση του φαρμάκου ελέγχεται από την αποικοδόμηση του πολυμερούς (Degradation – controlled release)

Στα συστήματα αυτά η δραστική ουσία αποδεσμεύεται μετά από τη διάρρηξη του πολυμερούς λόγω διάβρωσης, διάλυσης ή τήξης αυτού. Η αποικοδόμησή του μπορεί να πραγματοποιείται σε όλον τον όγκο του ή επιφανειακά. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και τα συστήματα, όπου η δραστική ουσία είναι χημικά συνδεδεμένη με το φορέα, οπότε η αποδέσμευσή της λαμβάνει χώρα με την υδρολυτική ή ενζυμική σχάση των δεσμών της με το πολυμερές.

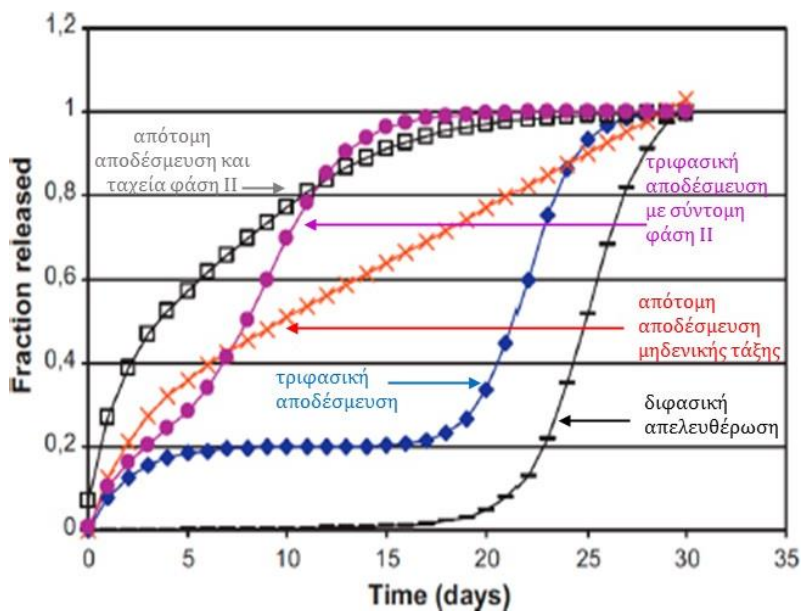
D. Συστήματα όπου η αποδέσμευση του φαρμάκου ελέγχεται από ερεθίσματα (Stimuli – controlled release)

Στα συστήματα αυτά η αποδέσμευση του φαρμάκου πραγματοποιείται με την ανταπόκριση του νανοφορέα σε εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το pH, η ιοντική ισχύς, ο ήχος, τα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για τη χορήγηση φαρμάκου σε συγκεκριμένους στόχους.^{26,27}



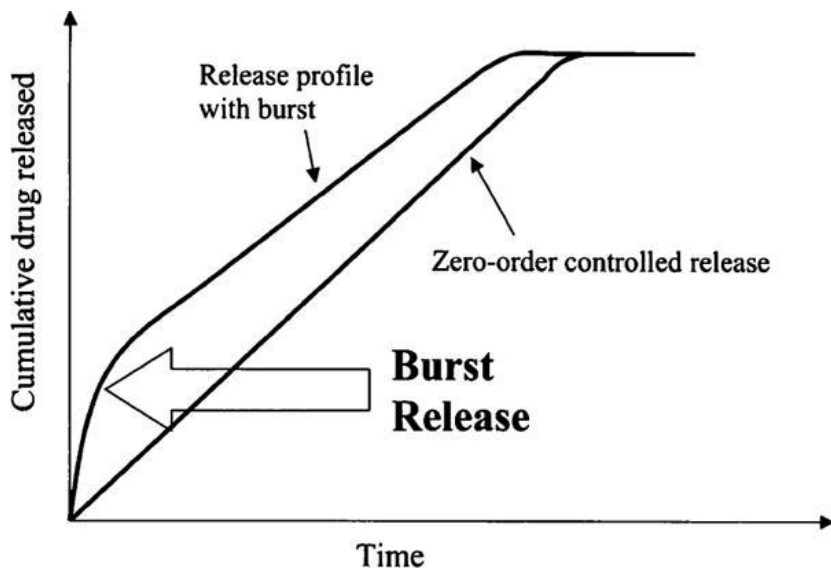
Εικόνα 11. Μηχανισμοί αποδέσμευσης δραστικών ουσιών από νανοσυστήματα²⁶

Για τα πολυμερικά νανοσυστήματα το συνηθέστερο προφίλ αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας είναι το τριφασικό προφίλ ή το διφασικό, εφόσον πρόκειται για μικρότερα σωματίδια. Ειδικότερα, η πρώτη φάση στο τριφασικό αυτό προφίλ αντιστοιχεί στην ταχεία αποδέσμευση της δραστικής ουσίας που είναι επιφανειακά προσροφημένη. Η δεύτερη φάση είναι μία βραδεία φάση και αποδίδεται στην βραδεία διάχυση της δραστικής ουσίας διαμέσου των πόρων της πολυμερικής μήτρας με ταυτόχρονη υδρόλυση και αποικοδόμηση του πολυμερούς. Τέλος, η τρίτη φάση του τριφασικού προφίλ αποδέσμευσης είναι μία ταχεία φάση, η οποία ελέγχεται από τη μαζική διάβρωση του πολυμερούς.



Σχήμα 2. Προφίλ αποδέσμευσης δραστικής ουσίας από νανοσυστήματα²⁸

Αρκετά κοινό σε αυτά τα συστήματα είναι η παρατήρηση του λεγόμενου “Burst effect”, κατά το οποίο όταν ένα νανοσύστημα μεταφοράς φαρμάκου τοποθετηθεί στο μέσο αποδέσμευσης υπάρχει ραγδαία και σύντομη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας ακολουθούμενη από ένα προφίλ σταθερής αποδέσμευσης, έως ότου σχηματιστεί πλάτο (“plateau”).



Σχήμα 3. Σύγκριση προφίλ αποδέσμευσης δραστικής ουσίας από νανοσυστήματα με παρατήρηση του burst effect και με μηδενικής τάξης αποδέσμευση²⁸

Σίγουρα, η συμπεριφορά που ακολουθεί ένα πολυμερικό νανοσύστημα στην αποδέσμευση της δραστικής ουσίας εξαρτάται από ένα ευρύ φάσμα φυσικοχημικών παραμέτρων, οι οποίες πρέπει να διερευνώνται κατά περίπτωση.

Έτσι, τα μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν την κινητική αποδέσμευσης των δραστικών ουσιών μπορούν να δώσουν απαντήσεις στην επίδραση διαφόρων παραμέτρων, όπως το σχήμα, το μέγεθος και η σύνθεση του συστήματος χορήγησης φαρμάκου, στο συνολικό ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου.²⁸

Τα κυριότερα κινητικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της αποδέσμευσης του φαρμάκου από το νανοσύστημα σε συνάρτηση με το χρόνο είναι τα εξής.^{27,29,30}

- *Μηδενικής τάξης (Zero order)*

Στο μοντέλο αυτό η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας είναι συνάρτηση του χρόνου και πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας. Εφαρμόζεται στα ωσμωτικά συστήματα και περιγράφεται από την εξίσωση:

$$C_t = C_0 + k_0 \cdot t$$

όπου C_0 η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα, C_t η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται στο χρόνο t , k_0 η σταθερά αποδέσμευσης μηδενικής τάξης και t ο χρόνος σε ώρες.

- *Πρώτης τάξης (First order)*

Η κινητική πρώτης τάξης αφορά συστήματα, στα οποία ο ρυθμός αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας, και περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

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

όπου Q_0 η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα, Q_t η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται στο χρόνο t , k η σταθερά αποδέσμευσης πρώτης τάξης και t ο χρόνος σε ώρες.

Η κινητική πρώτης τάξης εφαρμόζεται σε συστήματα με υδατοδιαλυτούς θεραπευτικούς παράγοντες, οι οποίοι εγκλωβίζονται σε πορώδη πολυμερική μήτρα.

- *Higuchi*

Το μοντέλο Higuchi περιγράφει την αποδέσμευση του φαρμάκου, η οποία πραγματοποιείται με διάχυση που υπακούει τον πρώτο νόμο του Fick, και εκφράζεται με την κινητική εξίσωση:

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

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

Η χρήση του μοντέλου αυτού εμπίπτει στις εξής παραδοχές:

- Η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο φορέα είναι υψηλότερη σε σχέση με το μέσο αποδέσμευσης
- Η διάχυση δεν έχει κατεύθυνση
- Η διόγκωση και η διαλυτότητα του φορέα είναι αμελητέες
- Ο ρυθμός διάχυσης της δραστικής ουσίας είναι σταθερός
- Η διάλυση στο μέσο αποδέσμευσης είναι πλήρης και ταχεία

- *Korsmeyer – Peppas*

Πρόκειται για ένα ημι – εμπειρικό μοντέλο και χρησιμοποιείται για την ανάλυση των πρώτων 60% των δεδομένων αποδέσμευσης. Περιγράφεται από την εξίσωση:

$$F = \frac{M_t}{M} = k_m \cdot t^n$$

όπου F το κλάσμα της δραστικής ουσίας που αποδεσμεύεται την χρονική στιγμή t , M η ποσότητα της δραστικής ουσίας στην ισορροπία, M_t η ποσότητα της δραστικής ουσίας που αποδεσμεύεται τη χρονική στιγμή t , k_m η κινητική σταθερά που ενσωματώνει δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του συστήματος, t ο χρόνος σε ώρες και n ο εκθέτης διάχυσης.

Η τιμή του εκθέτη διάχυσης n του κινητικού μοντέλου αυτού χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό του μηχανισμού αποδέσμευσης. Έτσι:

- Για $n \leq 0.5$ κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης
- Για $0.5 < n < 1$ τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ίσα
- Για $n = 1$ κυριαρχούν τα φαινόμενα της διόγκωσης και της χαλάρωσης των πολυμερικών αλυσίδων
- Για $n > 1$ πραγματοποιείται διάσπαση του πολυμερούς.

1.4 Χαρακτηρισμός νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων

Το μέγεθος, η μορφολογία, το επιφανειακό φορτίο, η υδροφιλικότητα της επιφάνειας, οι θερμικές και μηχανικές ιδιότητες και η σταθερότητα των νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά των δομών αυτών, τα οποία καθορίζουν την *in vivo* συμπεριφορά, βιοδιαθεσιμότητα και αποτελεσματικότητά τους και γι' αυτό πρέπει να εξετάζονται.

1.4.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS), γνωστή και ως φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο εργαστηριακά για τον προσδιορισμό του μεγέθους και του επιφανειακού φορτίου των νανοσυστημάτων. Τα συμπαγή και οικονομικά όργανα, αλλά και η δυνατότητα ολοκληρωμένης ανάλυσης των δεδομένων τα καθιστούν φιλικά προς το χρήστη, ενώ ταυτόχρονα οι τεχνικές είναι μη καταστροφικές, απαιτούν ελάχιστη προετοιμασία των δειγμάτων και είναι γρήγορες. Το DLS μπορεί να δώσει πληροφορίες για σωματίδια από μερικά νανόμετρα έως λίγα μικρόμετρα.

1.4.1.1 Αρχή λειτουργίας για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της κατανομής του μεγέθους

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της κατανομής του μεγέθους των νανοσωματιδίων βασίζεται στον υπολογισμό του συντελεστή διάχυσής τους μέσω της φωτοβόλησής του δείγματος αυτών που βρίσκεται σε διασπορά με μονοχρωματική ακτινοβολία (laser) συγκεκριμένου μήκους κύματος και της καταγραφής της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός εξαιτίας των τυχαίων κινήσεων Brown των σωματιδίων. Όταν τα σωματίδια βρίσκονται σε διασπορά, ακολουθούν την κίνηση Brown εξαιτίας των θερμικών συγκρούσεων μεταξύ αυτών και των μορίων διαλύτη. Η ταχύτητα της κίνησής τους εξαρτάται από το μέγεθός τους έχοντας ως αποτέλεσμα τη διακύμανση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Έτσι, από τον υπολογισμένο συντελεστή διάχυσης και με εφαρμογή της εξίσωσης Stokes – Einstein υπολογίζεται η υδροδυναμική διάμετρος των διεσπαρμένων σωματιδίων. Η εξίσωση Stokes – Einstein διατυπώνεται ως εξής:

$$D_h = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D_t}$$

όπου D_h η υδροδυναμική διάμετρος, η το ιξώδες του διαλύτη, k_B η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία και D_t ο συντελεστής διάχυσης.

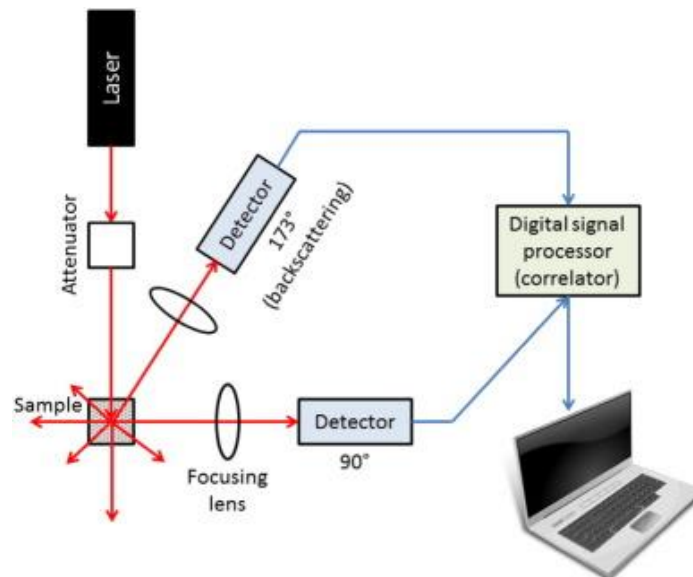
Βασική θεώρηση στην παραπάνω ανάλυση αποτελεί το γεγονός πως όλα τα σωματίδια θεωρούνται σφαιρικά.³¹⁻³³

Με την τεχνική αυτή, λοιπόν, λαμβάνεται μία καμπύλη κατανομής του δείγματος, καθώς και τιμές στατιστικής ανάλυσης του δείγματος. Από τις τιμές αυτές μπορεί να υπολογιστεί και ο δείκτης πολυδιασποράς (polydispersity index, PDI) ως το τετράγωνο της τυπικής απόκλισης σ διαιρούμενο με τη μέση υδροδυναμική διάμετρο των σωματιδίων D_h :

$$PDI = \left(\frac{\sigma}{D_h} \right)^2$$

Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) είναι μία άλλη σημαντική παράμετρος για το χαρακτηρισμό της διασποράς των νανοσωματιδίων, καθώς ορίζει το εύρος της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων. Στην πραγματικότητα, η τιμή του PDI μπορεί να κυμαίνεται από 0 έως 1, όπου τα κολλοειδή σωματίδια με PDI μικρότερα από 0.1 υποδηλώνουν μονοδιασπαρμένα σωματίδια και οι τιμές μεγαλύτερες από 0.1 πολυδιασπαρμένες κατανομές μεγέθους σωματιδίων.³⁴

Γενικά, οι μεγαλύτερες τιμές του δείκτη πολυδιασποράς υποδηλώνουν ανομοιομορφή διασπορά νανοσωματιδίων, επομένως ιδανικά για τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων ο δείκτης αυτός λαμβάνει τιμή μικρότερη του 0.3, ενώ μέχρι 0.5 θεωρείται αποδεκτή.³⁵



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση αρχής λειτουργίας της δυναμικής σκέδασης φωτός³²

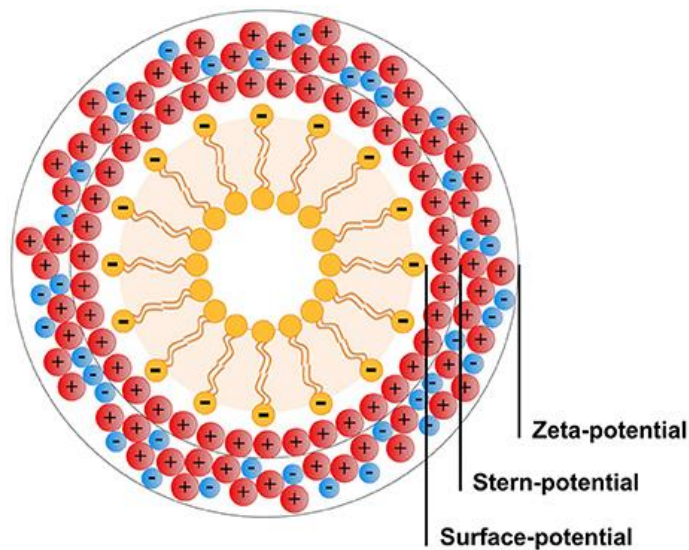
1.4.1.2 Αρχή λειτουργίας για τον προσδιορισμό του ζ – δυναμικού

Όταν ένα νανοσωματίδιο βρίσκεται σε ένα ιοντικό διάλυμα, η επιφάνεια του φορτισμένου σωματιδίου περιβάλλεται από ένα διπλό ηλεκτρικό στρώμα. Το πρώτο στρώμα είναι μία στιβάδα ιόντων που είναι αντίθετα φορτισμένα από την επιφάνεια του νανοσωματιδίου και ονομάζεται στιβάδα Stern. Το δεύτερο στρώμα ή στιβάδα διάχυσης βρίσκεται εξωτερικά της στιβάδας Stern και αποτελείται από αντίθετα φορτισμένα ιόντα (θετικά ή αρνητικά), τα οποία δέχονται έλξεις ή απώσεις από το επιφανειακό φορτίο των σωματιδίων. Μέσα στη στιβάδα διάχυσης, είναι ένα υποθετικό επίπεδο, το οποίο λειτουργεί σαν διεπιφάνεια μεταξύ των κινούμενων σωματιδίων και του στρώματος διασποράς, το οποίο έχει ηλεκτροφορηθεί. Το επίπεδο αυτό είναι το χαρακτηριστικό επίπεδο ολίσθησης και το ζ – δυναμικό είναι το ηλεκτροκινητικό δυναμικό που αναπτύσσεται σε αυτό. Το ζ – δυναμικό (zeta potential) μπορεί να προσδιοριστεί μέσω χρήσης κατάλληλων κυπελίδων που φέρουν ηλεκτρόδια και μετρώντας την κινητικότητα των

σωματιδίων, παρουσία ηλεκτρικού ρεύματος. Ειδικότερα, η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου αναγκάζει τα φορτισμένα σωματίδια να κινηθούν προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο με σταθερή ταχύτητα. Η ταχύτητα αυτή αναφέρεται και ως ηλεκτροφορητική κινητικότητα U_E και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Η εξάρτηση αυτή διατυπώνεται στην εξίσωση Henry:

$$U_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot z \cdot f(K_a)}{3 \cdot \eta}$$

όπου ε η διηλεκτρική σταθερά του μέσου διασποράς, z το ζ – δυναμικό, η το ιξώδες του μέσου διασποράς και $f(K_a)$ η συνάρτηση Helmholtz – Smoluchowski, η οποία για υδατικά διαλύματα παίρνει την τιμή 1.5.^{31,34}



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση του ζ – δυναμικού³¹

1.5 Τοξικότητα των νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων

Η τοξικότητα και η ασφάλεια των νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα. Η πιθανή τοξικότητά τους έγκειται στο πολύ μικρό τους μέγεθος, το οποίο τους επιτρέπει να διαπερνούν τους ανθρώπινους ιστούς, να φτάνουν ακόμα και στη συστηματική κυκλοφορία και πιθανόν να συσσωρεύονται σε όργανα και ιστούς.

Αυτή η ανησυχία έχει φέρει στο προσκήνιο τα φυσικά ή συνθετικά βιοαποδομήσιμα πολυμερή ως πιθανούς νανοφορείς στα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, τα οποία πλεονεκτούν καθώς αυξάνουν τη βιοσυμβατότητα, της βιοδιαθεσιμότητα, την ασφάλεια, τη διαπερατότητα και μειώνουν την τοξικότητα.

Ένας άλλος τρόπος μείωσης της τοξικότητας είναι η επιφανειακή επικάλυψη των νανοσωματιδίων με κάποιο βιοσυμβατό υλικό, φυσικό (όπως οι πρωτεΐνες ή οι πολυσακχαρίτες) ή συνθετικό (όπως η δεξτράνη ή η πολυαιθυλενογλυκόλη). Αυτό

το επιπλέον στρώμα καθιστά το νανοσύστημα «αόρατο» στο ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την σταθερότητα, το χρόνο ημίσειας ζωής, τη βιοσυμβατότητα, τη βιοαποικοδημισιμότητα και αντιστέκεται στη φαγοκυττάρωση του συστήματος από τα μακροφάγα κύτταρα.^{10,22}

1.6. Βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή ως φορείς συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων

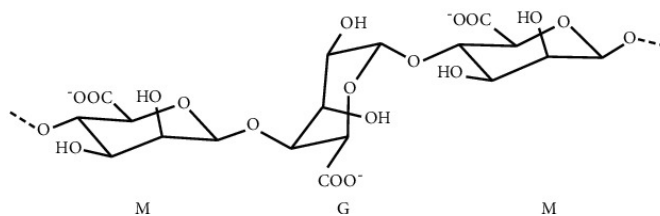
Η χρήση βιοαποικοδομήσιμων πολυμερικών νανοσωματιδίων για τη μεταφορά θεραπευτικών παραγόντων θεωρείται η πλέον προτιμητέα επιλογή στην ανάπτυξη καινοτόμων νανοσυστημάτων χάρη στις εξαιρετικές τους ιδιότητες, όπως η υψηλή βιοσυμβατότητα, βιοαποδομησιμότητα και η χαμηλή τοξικότητα. Συγκεκριμένα, τα πολυμερή αυτά αποικοδομούνται *in vivo* μέσω ενζυμικών δράσεων και χημικών αντιδράσεων με ζωντανούς οργανισμούς και τελικά αποβάλλονται από το ανθρώπινο σώμα με τη μορφή βιοσυμβατών παραπροϊόντων.

Τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την προέλευσή τους σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στα φυσικά και συνθετικά βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή. Τα φυσικά βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή λαμβάνονται από φυτά, ζώα ή μικροοργανισμούς και παραδείγματα αυτών είναι η χιτοζάνη, τα αλγινικά, η δεξτράνη, η ζελατίνη και η αγαρόζη, ενώ τα συνθετικά βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, όπως τα PLA, PLGA και PCL, συντίθενται χημικά. Γενικά, τα φυσικά βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή πλεονεκτούν έναντι των συνθετικών βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών ως προς το χαμηλότερο κόστος τους, ενώ τα συνθετικά βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή ως προς τη δυνατότητα καλύτερης επιτυγχανόμενης διασταύρωσης. Έτσι, η επιλογή αυτών των πολυμερών πρέπει να γίνεται με ακρίβεια εξετάζοντας μεμονωμένα κάθε περίπτωση συστήματος.^{36,37}

1.6.1 Αλγινικά

1.6.1.1 Προέλευση, δομή και ιδιότητες των αλγινικών

Τα αλγινικά ή αλγινικά οξέα είναι γραμμικοί, μη διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες αποτελούμενοι από γραμμικά διατεταγμένες αλυσίδες α – L – γουλουρονικού (G) οξέος και β – D – μανουρονικού οξέος (M) συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω 1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς σε ποικίλες αναλογίες ανάλογα με την προέλευσή τους.



Εικόνα 14. Χημική δομή αλγινικού οξέος

Πρόκειται για ένα φυσικό ανιονικό πολυμερές που προέρχεται από το κυτταρικό τοίχωμα των καφέ θαλάσσιων φυκιών, ενώ μπορεί να συντεθεί και από βακτήρια. Τα αλγινικά που είναι κυρίως εμπορικά διαθέσιμα προέρχονται από τα καφέ φύκια, τα οποία ξηραίνονται, υποβάλλονται σε διάφορες χημικές μεθόδους ώστε να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες και έπειτα επεξεργάζονται με υδατικά αλκαλικά διαλύματα, ειδικά το καυστικό νάτριο, προκειμένου να σχηματιστεί το άλας νατρίου του αλγινικού οξέος που είναι υδατοδιαλυτό. Γι' αυτό, τα αλγινικά είναι γενικά διαθέσιμα στην αγορά ως άλας νατρίου του αλγινικού οξέος (ή αλγινικό νάτριο).

Το πολυμερές αυτό είναι άμεσα διαθέσιμο, είναι φιλικό προς το περιβάλλον και είναι σχετικά φθινό στην παραγωγή του. Αυτά τα χαρακτηριστικά του μαζί με πολλά άλλα πλεονεκτήματά του, όπως η βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδημισιμότητα και η μη τοξικότητα, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πολλαπλών εφαρμογών με βάση τα αλγινικά στον τομέα της βιοϊατρικής.

Παράλληλα, η ικανότητα των υδατικών αλγινικών διαλυμάτων να σχηματίζουν νανοσωματίδια, όταν υποβάλλονται σε επεξεργασία με δισθενή ιόντα, κυρίως με δισθενή ιόντα ασβεστίου, η οποία λέγεται ιονοτροπική πηκτωμάτωση, έχει διερευνηθεί εκτενώς για την ανάπτυξη φορέων για παρατεταμένη ή ελεγχόμενη χορήγηση θεραπευτικών παραγόντων. Η αποδέσμευσή τους εξαρτάται από το pH που οδηγεί σε στοχευμένη χορήγηση. Συγκεκριμένα, το αλγινικό συρρικνώνεται σε περιβάλλον χαμηλού pH (γαστρικό περιβάλλον), οπότε τα εγκλωβισμένα σε αυτό φάρμακα δεν αποδεσμεύονται στο στομάχι, ενώ όταν το νανοσύστημα φτάνει στην εντερική οδό, το pH αυξάνεται και ακολουθεί η διόγκωση του φορέα που διευκολύνει την ταχεία αποσύνθεσή του και την αποδέσμευση του φαρμάκου.^{10,36,38-40}

1.6.1.2 Βιοϊατρικές εφαρμογές των αλγινικών

Οι αναφερόμενες στη βιβλιογραφία βιοϊατρικές εφαρμογές των αλγινικών εστιάζουν στη χρήση τους ως:⁴¹

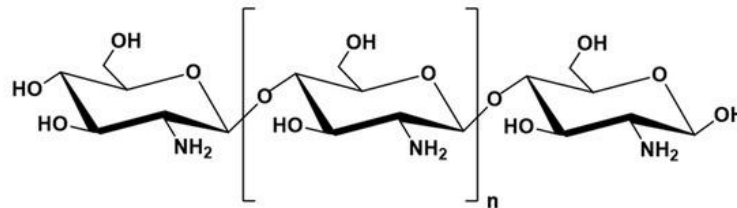
- έκδοχα σε διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές και κυρίως στα σκευάσματα γαστροκατασταλτικών συστημάτων χορήγησης φαρμάκων χάρη στη βλεννοσυγκολλητική τους δραστηριότητα
- φορείς εγκλωβισμού και χορήγησης φαρμάκων ενισχύοντας την στοχευμένη αποδέσμευσή τους
- υλικά για την παρασκευή υδρογελών
- φορείς ενθυλάκωσης πρωτεϊνών, καθώς η πολυμερική του μήτρα ελαχιστοποιεί τη μετουσίωση και την υποβάθμιση των πρωτεϊνών από τα γαστρικά υγρά και
- υλικά για την παρασκευή επιδέσμων προς επούλωση τραυμάτων

1.6.2 Χιτοζάνη

1.6.2.1 Προέλευση, δομή και ιδιότητες της χιτοζάνης

Η χιτοζάνη είναι ένας φυσικά απαντώμενος κατιοντικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από τη μερική απακετυλίωση της χιτίνης. Η χιτίνη είναι το δεύτερο ευρέως διαδεδομένο βιοπολυμερές στη φύση μετά την κυτταρίνη, η οποία και βρίσκεται στα κελύφη των καρκινοειδών (γαρίδες, καβούρια, αστακοί κ.α.). Στη βιομηχανία η χιτοζάνη παρασκευάζεται από τον εξωσκελετό αυτών των θαλάσσιων όντων, τα οποία είναι απόβλητα που προέρχονται από την αλιευτική βιομηχανία. Αρχικά, το ακατέργαστο υλικό υποβάλλεται σε αφαλάτωση, αποπρωτεϊνοποίηση, απόσπηση και ξήρανση για εκχύλιση της χιτίνης, η οποία στη συνέχεια απακετυλιώνεται, καθαρίζεται και αφήνεται να στεγνώσει, προκειμένου να συγκεντρωθεί η χιτοζάνη. Αυτή η μέθοδος είναι οικονομικά αποδοτική αφού οι πρώτες ύλες ως παραπροϊόντα δε συνδέονται με κάποιο κόστος, ενώ εμπορικά σε όλο τον κόσμο η τιμή της σε μορφή σκόνης εξαρτάται από την εφαρμογή, τις ιδιότητες και την καθαρότητά της.

Ειδικότερα, η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός ετεροπολυσακχαρίτης που αποτελείται από τη Ν – ακετυλο – 2 – αμινο – 2 – δεοξυ – D – γλυκοπυρανόζη (N – ακετυλο – D – γλυκοζαμίνη) και την 2 – αμινο – 2 – δεοξυ – D – γλυκοπυρανόζη (D – γλυκοζαμίνη) συνδεδεμένες με β – 1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 15. Χημική δομή της χιτοζάνης⁴²

Ο βαθμός απακετυλίωσης, το μοριακό βάρος και η πηγή προέλευσής της είναι παράγοντες που σχετίζονται στενά με τις φυσικοχημικές ιδιότητές της, οι οποίες οφείλονται στις αμινομάδες, τις υδροξυλομάδες και τις ακετυλομάδες στη δομή της. Επί παραδείγματι, η χιτοζάνη είναι διαλυτή σε διαλύματα όξινου pH, η διαλυτότητά της, όμως, σε ένα μέσο ασθενούς οξέος μεταβάλλεται σύμφωνα με το μοριακό βάρος της, το οποίο είναι ευθέως ανάλογο με τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου που υπάρχουν στο μόριο. Όσο υψηλότερο είναι το μοριακό βάρος, τόσο περισσότεροι είναι και οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου, οι οποίοι και παρεμποδίζουν τη διαδικασία διάλυσης του πολυμερούς. Παράλληλα, η διαλυτότητά της επηρεάζεται και από το βαθμό απακετυλίωσής της, καθώς αυτή επιτυγχάνεται όταν ο βαθμός απακετυλίωσης είναι μεγαλύτερος από 50% χάρη στην αντίδραση πρωτονίωσης των αμινομάδων. Μία άλλη ιδιότητα που εξαρτάται

από το βαθμό απακετυλίωσης είναι η αποικοδόμηση της χιτοζάνης στους έμβιους οργανισμούς. Ειδικότερα, όταν ο βαθμός απακετυλίωσής της είναι κάτω από 70%, η αποικοδόμηση είναι ταχύτερη. Γενικά, η χιτοζάνη έχει χαμηλό ιξώδες, είναι υδατοδιαλυτή, βιοσυμβατή, βιοαποικοδομήσιμη, μη τοξική, έχει αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση και είναι βλεννοσυγκολλητική, ενώ η κατιοντική φύση της χιτοζάνης οδηγεί υπό όξινες συνθήκες στην ανάπτυξη νανοσωματιδίων (ιονοτροπική πηκτωμάτωση).⁴²⁻⁴⁶

1.6.2.2 Βιοϊατρικές εφαρμογές της χιτοζάνης

Η χιτοζάνη και τα συστήματα που βασίζονται σε παράγωγά της πλεονεκτούν σε βιολογικές εφαρμογές χάρη στις εξαιρετικές ιδιότητές τους, όπως η υψηλή διαπερατότητα από τις κυτταρικές μεμβράνες, η δυνατότητα αλληλεπίδρασης με ανιοντικά βιομόρια (μακρομόρια της κυτταρικής μεμβράνης, νουκλεϊκά οξέα) λόγω της πρωτονίωσης των αμινομάδων της σε όξινα pH, η χαμηλή πρόσληψη από το ΔΕΣ, η βλεννοσυγκολλητικότητα λόγω του υψηλού θετικού φορτίου της, η δυνατότητα υψηλής φόρτισης φαρμάκου σε νανοσυστήματα και η επίτευξη τροποποιημένης αποδέσμευσης που ελέγχεται από το pH.^{10,43,44,46}

Έτσι, η χιτοζάνη πρωταγωνιστεί τα τελευταία χρόνια στους τομείς της φαρμακευτικής και ιατρικής, όπου χρησιμοποιείται ως:⁴⁷

- φορέας εγκλωβισμού βιοδραστικών ενώσεων
- υλικό για την παρασκευή υδρογελών
- υλικό για ανάπτυξη φαρμάκων που προορίζονται για τοπική στοματική χορήγηση και
- έκδοχα στην παρασκευή δισκίων

1.7 Νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης

Όπως αναλύεται και παραπάνω, το αλγινικό και η χιτοζάνη αποτελούν δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα βιοπολυμερή στην ανάπτυξη νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων παρουσιάζοντας το καθένα τις δικές του ξεχωριστές ιδιότητες χωρίς όμως να εκλείπουν τα μειονεκτήματα στη χρήση τους. Έτσι, πρόσφατα μελετάται η ανάπτυξη συστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης, με στόχο την υπέρβαση των περιορισμών του κάθε υλικού.

Ειδικότερα, η αυξημένη υδατοδιαλυτότητα του αλγινικού έχει ως αποτέλεσμα την αστάθεια των νανοσωματιδίων αλγινικού στο βιολογικό pH που εκδηλώνεται με τη διόγκωση του φορέα, η οποία και οδηγεί στη διαρροή και ταχύτερη αποδέσμευση του θεραπευτικού παράγοντα. Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου μπορεί να πραγματοποιηθεί σταυροσύνδεση των ιόντων των καρβοξυλομάδων του αλγινικού με τα κατιόντα των αμινομάδων της χιτοζάνης σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα ιοντικών αλληλεπιδράσεων, το οποίο μειώνει το πορώδες του συστήματος προστατεύοντας το εγκλωβισμένο φάρμακο από πρόωρη

απελευθέρωσή του. Επιπλέον, το αλγινικό γενικά συρρικνώνεται σε χαμηλό pH και διαλύεται σε υψηλές τιμές pH, σε αντίθεση με τη χιτοζάνη που διαλύεται σε χαμηλό pH, ενώ σε υψηλές τιμές pH γίνεται αδιάλυτη. Άρα, η υψηλή διαλυτότητα της χιτοζάνης σε χαμηλό pH μειώνεται από την κακή διαλυτότητα του αλγινικού σε χαμηλό pH, ενώ το αλγινικό σταθεροποιείται σε υψηλό pH από τη χιτοζάνη που είναι λιγότερο διαλυτή σε υψηλό pH. Ακόμη, η προσθήκη χιτοζάνης σε νανοσωματίδια αλγινικού μπορεί να παρατείνει το χρόνο επαφής των δραστικών συστατικών με το επιθήλιο, με ακολουθούμενη την ενίσχυση της απορρόφησης του φαρμάκου. Τέλος, τα συμπλέγματα χιτοζάνης και αλγινικού λειτουργούν συνεργητικά στην προστασία των φορτωμένων βιομορίων από την οξειδωση, την ενζυμική αποικοδόμηση και την υδρόλυση, διασφαλίζοντας την ασφαλή και αποτελεσματική παράδοσή τους στους επιθυμητούς ιστούς ή όργανα.⁴⁸⁻⁵¹

Συνοψίζοντας τα νανοσωματίδια αλγινικού – χιτοζάνης (chitosan – alginate nanoparticles, CANPs) κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος στη νανοεπιστήμη και την ανάπτυξη νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, καθώς:⁴⁹

- ✓ προστατεύουν τα φάρμακα στο γαστρεντερικό σωλήνα (GIT), αφού συρρικνώνονται σε χαμηλό pH προστατεύοντας τη δραστική ουσία από το επιθετικό γαστρικό περιβάλλον
- ✓ χαρακτηρίζονται από υψηλή ικανότητα φόρτωσης φαρμάκου και υψηλή απόδοση εγκλωβισμού του
- ✓ παρέχουν τη δυνατότητα παρατεταμένης αποδέσμευσης του φαρμάκου λόγω της εξάρτησής της από το pH οδηγώντας και σε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (π.χ. παρατεταμένη καταστολή της φλεγμονής)
- ✓ οι φορείς τους είναι μη τοξικοί, βιοσυμβατοί και αποικοδομήσιμοι

1.7.1 Μέθοδοι παρασκευής νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολλές τεχνικές σχετικά με τις μεθόδους σύνθεσης νανοσυστημάτων χιτοζάνης – αλγινικού. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες είναι οι μέθοδοι της ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης και της πολυηλεκτρολυτικής συμπλοκοποίησης. Εναλλακτικά, μπορούν να σχηματιστούν μέσω γαλακτωματοποίησης, ωστόσο η μέθοδος αυτή θεωρείται πιο σύνθετη μέθοδος παραγωγής, αν και επιτρέπει τον έλεγχο του μεγέθους των σωματιδίων και της κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων. Άλλες τεχνικές παρασκευής περιλαμβάνουν, αλλά δεν περιορίζονται σε αυτές, τη χρήση υπερήχων, τον ηλεκτροψεκασμό, την ηλεκτροστατική ζελατινοποίηση, την εξώθηση πολυμερικών διασπορών και την αυτο – συναρμολόγηση πολυσακχαριτών.

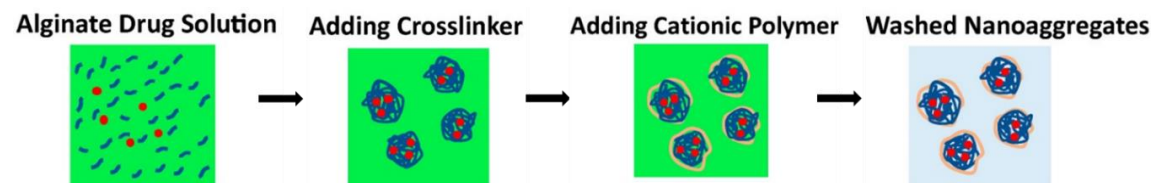
1.7.1.1 Ιονοτροπική πηκτωμάτωση

Η ιονοτροπική πηκτωμάτωση (ionotropic gelation) βασίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ χιτοζάνης και αλγινικού. Συγκεκριμένα, οι φυσικές

αλληλεπιδράσεις προέρχονται από την αρνητικά φορτισμένη ομάδα καρβοξυλικού οξέος του αλγινικού και τη θετικά φορτισμένη αμινομάδα της χιτοζάνης, η οποία οδηγεί σε συρρίκνωση και σχηματισμό νανοσωματιδίων σε χαμηλό pH. Αυτή η μέθοδος λαμβάνει χώρα γενικά με τη ρίψη του φορτωμένου με φάρμακο πολυμερικού πυρήνα σε ένα υδατικό διάλυμα κατιόντων που ακολουθείται από την προσθήκη του ανιοντικού πολυμερούς υπό μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συχνά στην παραγωγή νανοσωματιδίων, καθώς συνοδεύεται από υψηλή απόδοση εγκλωβισμού του φαρμάκου, καλή σχέση κόστους – αποτελεσματικότητας, από απλά πρωτόκολλα και είναι ασφαλής. Όμως, μπορεί να οδηγήσει σε ετερογενή κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων, απαιτώντας έτσι ελεγχόμενη ανάδευση και σταθερή ταχύτητα προσθήκης των διαλυμάτων.

1.7.1.2 Πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση

Σε μελέτες αναφέρεται ότι η σταθερότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πολυμερών μπορεί να αυξηθεί με την τροποποίηση της διαδικασίας της ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης και την προσθήκη σε αυτή ενός ακόμα σταδίου, αυτό της προ – πηκτωμάτωσης μεταξύ ενός από τους πολυσακχαρίτες και ενός άλατος ακολουθούμενο από το στάδιο της πολυηλεκτρολυτικής συμπλοκοποίησης με την προσθήκη του δεύτερου πολυσακχαρίτη. Η πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση προϋποθέτει ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντίθετα φορτισμένων ειδών, οι οποίες και συμβαίνουν μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ομάδων καρβοξυλικού οξέος από το αλγινικό και των θετικά φορτισμένων αμινομάδων από τη χιτοζάνη. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως χαμηλή τοξικότητα, ήπιες συνθήκες διεξαγωγής, παρουσία υδατικού περιβάλλοντος και μικρή αλλαγή στη χημεία του φαρμάκου που πρόκειται να εγκλωβιστεί. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η δυσκολία στον εγκλωβισμό φαρμάκων υψηλού μοριακού βάρους.^{49,51}



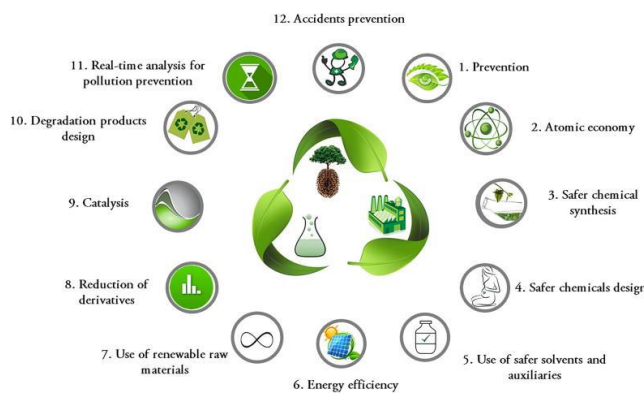
Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής νανοσωματιδίων αλγινικού – χιτοζάνης με τη μέθοδο της πολυηλεκτρολυτικής συμπλοκοποίησης⁵²

1.8 Πράσινη νανοτεχνολογία

1.8.1 Πράσινη χημεία και πράσινοι διαλύτες

Ο όρος «Πράσινη Χημεία» αναφέρεται στη χρήση χημικών δεξιοτήτων και γνώσεων για τη μείωση ή την εξάλειψη της χρήσης ή της παραγωγής επικίνδυνων

ουσιών κατά τον σχεδιασμό, την παραγωγή και την εφαρμογή χημικών προϊόντων, με στόχο την ελαχιστοποίηση του αρνητικού αποτυπώματος στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον. Το 1998 οι Paul Anastas και John Warner δημοσίευσαν το πρώτο εγχειρίδιο πράσινης χημείας, στο οποίο πρότειναν τις δώδεκα αρχές της, οι οποίες και συνοψίζονται στη ακόλουθη εικόνα. Συνοπτικά, οι δώδεκα αρχές της πράσινης χημείας βασίζονται στην ελαχιστοποίηση ή τη μη χρήση τοξικών διαλυτών στις χημικές διεργασίες και αναλύσεις, καθώς και στην αποφυγή δημιουργίας αποβλήτων που προκύπτουν από αυτές. Γι' αυτό, η ατομική και η ενεργειακή οικονομία κατέχουν εξέχουσες θέσεις, καθώς και η χρήση ανανεώσιμων και ασφαλών πρώτων υλών. Επιπλέον, η επιτάχυνση των χημικών αντιδράσεων μέσω της κατάλυσης μπορεί να συμβάλει, για παράδειγμα, στην εξοικονόμηση ενέργειας και στη μείωση της παραγωγής αποβλήτων. Μία από τις αρχές αφορά επίσης τη συνειδητή ανάπτυξη των χημικών προϊόντων, έτσι ώστε αυτά μετά την χρήση τους να αποικοδομούνται σε μη τοξικά παράγωγα. Γίνεται αντιληπτό πως αυτές οι αρχές αφορούν τον σχεδιασμό του προϊόντος, λαμβάνοντας υπόψιν τη σύνθεση, την επεξεργασία, την ανάλυσή του, αλλά και τη συμπεριφορά του μετά τη χρήση του.^{53,54}



Εικόνα 17. Οι δώδεκα αρχές της πράσινης χημείας⁵³

Η χημική βιομηχανία αποτελεί μία βιομηχανία με υψηλή αναγκαιότητα χρήσης διαλυτών, οι οποίοι είναι οργανικοί και λαμβάνονται από το αργό πετρέλαιο, μία δηλαδή μη ανανεώσιμη πηγή. Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη πράσινων διαλυτών, όπως ορίζουν οι αρχές της πράσινης χημείας, οι οποίοι θα ανταποκρίνονται στις ανάγκες της χημικής βιομηχανίας. Συγκεκριμένα, ένας ιδανικός πράσινος διαλύτης πρέπει να έχει χαμηλή τοξικότητα, μειωμένες περιβαλλοντικές επιπτώσεις και χαμηλό κόστος, ενώ πρέπει και να είναι βιοαποικοδομήσιμος, επαναχρησιμοποιήσιμος και να λαμβάνεται εύκολα από ανανεώσιμες πηγές. Παρά τις αυξημένες απαιτήσεις η έρευνα για φιλικούς προς το περιβάλλον διαλύτες προχωρά με ταχείς ρυθμούς, ώστε τις τελευταίες δύο δεκαετίες πολλοί πράσινοι διαλύτες να έχουν σχεδιαστεί και εισαχθεί στις χημικές διαδικασίες. Παραδείγματα αυτών αποτελούν τα ιοντικά υγρά, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες και οι φυσικοί

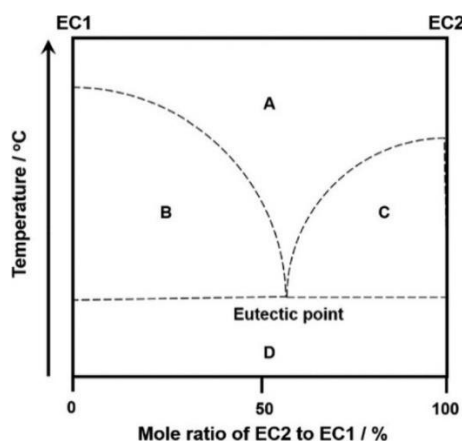
βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, τα υπερκρίσιμα υγρά και τα υγροποιημένα αέρια. Παρακάτω αναλύονται περαιτέρω οι δύο πρώτες κατηγορίες πράσινων διαλυτών.⁵⁵

1.8.1.1 Ιοντικά υγρά

Ως ιοντικά υγρά (ionic liquids) ορίζονται τα άλατα που είναι σε υγρή κατάσταση κάτω από τη θερμοκρασία των 100°C ή ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα ιοντικά υγρά θεωρούνται πράσινοι διαλύτες, καθώς έχουν πολύ χαμηλή τάση ατμών υπό συνθήκες περιβάλλοντος και ως εκ τούτου είναι μη πτητικά, παραμένουν σε υγρή κατάσταση σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, είναι κατά κύριο λόγο υδρόφιλα, έχουν πολύ χαμηλό ιξώδες και θερμική σταθερότητα, ενώ παρουσιάζουν καλή διαλυτότητα βιοπολυμερών χάρη στο συντονισμένο συνδυασμό τους από ανιόντα και κατιόντα. Ωστόσο, αρκετά ιοντικά υγρά είναι τοξικά και μη βιοαποδομήσιμα με βάση τις αξιολογήσεις του κύκλου ζωής τους, ενώ η σύνθεσή τους δεν ακολουθεί πάντα τις αρχές της πράσινης χημείας.⁵⁶

1.8.1.2 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (deep eutectic solvents, DES) είναι ένα μίγμα δύο ή περισσότερων συστατικών που είναι γενικά στερεά σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά όταν συνδυάζονται σε μια συγκεκριμένη μοριακή αναλογία, σχηματίζουν ένα υγρό διάλυμα λόγω της μείωσης του σημείου τήξεως σε σύγκριση με τα συστατικά του που οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων. Αποτελούνται από τουλάχιστον δύο συστατικά, ένα δότη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor, HBD) και ένα δέκτη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor, HBA). 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 μίγματος.⁵⁷



Σχήμα 4. Σχηματικό διάγραμμα του ευτηκτικού σημείου δύο συστατικών⁵⁸

Οι DES είναι γενικά εύκολο να παρασκευαστούν με την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο να είναι η θέρμανση και ανάδευση των συστατικών του σε αδρανή ατμόσφαιρα έως ότου σχηματιστεί ένα ομοιογενές υγρό. Δεν απαιτείται πρόσθετος διαλύτης, ενώ δεν πραγματοποιείται καμία αντίδραση, οπότε κατά συνέπεια δεν απαιτείται καθαρισμός του προκύπτοντος υγρού. Άλλες μέθοδοι παρασκευής των DES περιλαμβάνουν την εξάτμιση υπό κενό, την άλεση και την ξήρανση με κατάψυξη (freeze – drying).⁵⁹

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DES εξαρτώνται από τη φύση και τη μοριακή αναλογία των συστατικών των δεκτών δεσμών υδρογόνου και των δωτών δεσμών υδρογόνου, το μέγεθος του ανιόντος, το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας και το μοριακό βάρος. Γενικά, λοιπόν, οι DES χαρακτηρίζονται από:⁶⁰

- χαμηλότερο σημείο τήξης από τα καθαρά συστατικά τους λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ του δέκτη δεσμού υδρογόνου και του δότη δεσμού υδρογόνου
- υψηλό ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου λόγω της ύπαρξης ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου με άλλες αλληλεπιδράσεις, όπως οι δυνάμεις van der Waals και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ του δότη δεσμού υδρογόνου και του δέκτη δεσμών υδρογόνου που οδηγούν σε μείωση της ιοντικής κινητικότητας και του ελεύθερου κενού όγκου
- πυκνότητα κατά κύριο λόγο υψηλότερη από αυτή του νερού
- κακή αγωγιμότητα σε θερμοκρασία δωματίου λόγω του υψηλού ιξώδους τους
- μειωμένη επιφανειακή τάση
- αυξημένη πολικότητα
- pH που εξαρτάται από την οξύτητα και τη βασικότητα του δότη δεσμού υδρογόνου και του δέκτη δεσμού υδρογόνου
- υδροφιλία ως επί τον πλείστον
- χαμηλή τοξικότητα
- την ικανότητά τους να βιοδιασπώνται
- υγροσκοπικότητα

1.8.1.3 Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που απαρτίζονται από φυσικά συστατικά καλούνται φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (natural deep eutectic solvents, NADES). Τυπικά φυσικά συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή NADES είναι τα τεταρτοταγή άλατα, όπως η χλωριούχος χολίνη και η βεταΐνη, τα αμινοξέα (αλανίνη, σερίνη, προλίνη και γλουταμινικό οξύ), τα οργανικά οξέα, όπως το γαλακτικό, το μηλεϊνικό, το οξαλικό, το κιτρικό και το τρυγικό, οι αλκοόλες (γλυκερόλη, ξυλιτόλη, σορβιτόλη, αιθυλενογλυκόλη) και τα σάκχαρα, όπως η γλυκόζη, η μαννόζη, η ξυλόζη, η σακχαρόζη και η λακτόζη.^{57,61}

Γενικά, οι NADES παρουσιάζουν χαμηλή τάση ατμών άρα και χαμηλή πτητικότητα, δεν είναι εύφλεκτοι, είναι συμβατοί με το νερό, φιλικοί προς το περιβάλλον και έχουν τη δυνατότητα να διαλύουν φυσικές και συνθετικές ουσίες που παρουσιάζουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Γι' αυτά τα χαρακτηριστικά τους έχουν προσελκύσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας βρίσκοντας εφαρμογές σε διάφορους τομείς, όπως την οργανική σύνθεση, την ηλεκτροχημεία, ως μέσα εκχύλισης, τη βιοτεχνολογία, ως διαλύτες σε βιολογικές διεργασίες ή ενζυμικές αντιδράσεις, τη βιοκατάλυση και τη βιοϊατρική. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική βιομηχανία ως έκδοχα για την αύξηση της διαλυτότητας των υδρόφοβων φαρμάκων ή σε σκευάσματα χορήγησης φαρμάκων.⁵⁷

1.8.2 Εφαρμογές της πράσινης χημείας στη νανοτεχνολογία

Η επίδραση της πράσινης χημείας στη νανοτεχνολογία και τις εφαρμογές της στη φαρμακευτική επιστήμη είναι σημαντική τα τελευταία χρόνια σημειώνοντας πολλές πρωτοπορίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών αποτελούν οι διάφορες χρήσεις των (φυσικών) βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, όπως:^{59,62}

- ως οχήματα διαλυτοποίησης λιπόφιλων φαρμάκων
- η χρήση των θεραπευτικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (therapeutic deep eutectic solvents, THEDES), οι οποίοι αποτελούν υποσύνολο των DES με ενεργό φαρμακευτικό συστατικό στη δομή τους, στα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, γεγονός που ενισχύει την αποτελεσματικότητα όσον αφορά τη διαλυτότητα του φαρμάκου, τη βιοδιαθεσιμότητα και τη διαπερατότητα του στο δέρμα
- ο πολυμερισμός των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων με DES με στόχο τη βελτίωση της διαδερμικής διείσδυσης του φαρμάκου
- ως αναγωγικά μέσα και σταθεροποιητικούς παράγοντες για την παρασκευή μεταλλικών νανοσωματιδίων
- ως παράγοντες διασύνδεσης για το σχηματισμό πολυμερικών νανοσυστημάτων και υδρογελών
- ως διαλύτες στη διαδικασία παρασκευής νανοσυστημάτων μεταφοράς θεραπευτικών παραγόντων

Η χρήση των DES και NADES στη φαρμακευτική και τη νανοτεχνολογία περαιτέρω και στο μέλλον είναι δεδομένη και έγκειται στα αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν αυτοί οι πράσινοι διαλύτες. Μερικές από αυτές είναι η χαμηλή τοξικότητα καθώς και η τάση ατμών, το μικρό αποτύπωμά τους στο περιβάλλον, είναι ανανεώσιμοι, μπορούν να ανακυκλωθούν και να ξαναχρησιμοποιηθούν, εμφανίζουν αυξημένη διαλυτότητα και έχουν χαμηλό κόστος. Τέλος, αξιοσημείωτο πλεονέκτημα των DES και των NADES είναι ότι με την κατάλληλη επιλογή των συστατικών που τα αποτελούν, αποκτούν ιδιότητες, οι οποίες ενισχύουν και βελτιώνουν τα χαρακτηριστικά του τελικού σκευάσματος/υλικού.

1.9 Φυσικά προϊόντα και нанοτεχνολογία

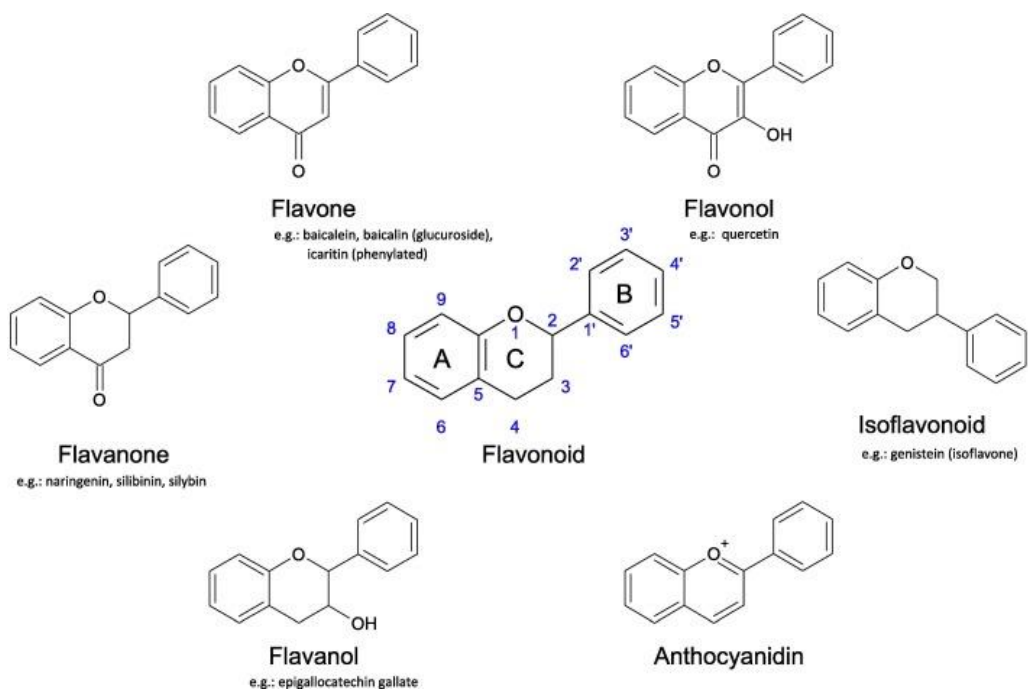
Απ' την αρχαιότητα ο άνθρωπος χρησιμοποιεί ευρέως τα φυσικά προϊόντα φυτικής προέλευσης ως φάρμακα ενάντια σε διάφορες ασθένειες. Τα σύγχρονα φάρμακα προέρχονται κυρίως από βότανα με βάση τις παραδοσιακές πρακτικές των παλαιών χρόνων, ενώ σχεδόν το 25% των σημαντικότερων φαρμακευτικών ενώσεων και των παραγώγων τους που είναι διαθέσιμα σήμερα προέρχονται από φυσικούς πόρους. Τα φυσικά προϊόντα παρουσιάζουν αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά, όπως χημική ποικιλομορφία, χημικές και βιολογικές ιδιότητες, είναι λιγότερο τοξικά συγκριτικά με τα χημικά προϊόντα, έχουν καλό θεραπευτικό δυναμικό και χαμηλή τιμή. Αυτά τα καθιστούν ευνοϊκά μόρια – οδηγούς στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές, φλεγμονώδεις και μικροβιακές ασθένειες. Το μεγαλύτερο πρόβλημα στη χρήση των φυσικών προϊόντων ως θεραπευτικά μέσα είναι η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, η *in vivo* αστάθεια και η δυσκολία στη διάλυσή τους, σημεία τα οποία και προκαλούν προβλήματα στις κλινικές δοκιμές. Λύση σε αυτά τα κρίσιμα σημεία μπορεί να δώσει η φόρτωση των φυσικών προϊόντων σε νανοσυστήματα, η οποία και αναπτύσσεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια. Έτσι, τα νανοσυστήματα μεταφοράς φυσικών προϊόντων βελτιώνουν τη βιοδιαθεσιμότητά τους, ενώ επιτυγχάνουν την στοχευμένη και ελεγχόμενη αποδέσμευσή τους. Οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες μελέτες εστιάζουν στην ανάπτυξη νανοσυστημάτων μεταφοράς διαφόρων φλαβονοειδών.⁶³⁻⁶⁵

1.9.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και βρίσκονται άφθονα σε φυτά, φρούτα, λαχανικά, σπόρους, τρόφιμα και ποτά (κρασί, μπύρα, τσάι) προσδίδοντάς τους το χαρακτηριστικό χρώμα, άρωμα και γεύση τους. Στα φυτά διατελούν πολλές λειτουργίες, όπως τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, τη προσέλκυση εντόμων και επικονιαστών, λειτουργούν ως μόρια σήματος και φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας. Τα φλαβονοειδή ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των φαινολικών ενώσεων και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των πολυφαινόλων με γνωστές περισσότερες από έξι χιλιάδες διαφορετικές δομικές παραλλαγές.

1.9.1.1 Χημική δομή και ταξινόμηση των φλαβονοειδών

Η δομή των φλαβονοειδών βασίζεται στο φαινυλο – βενζοπυρανικό σκελετό (C6-C3-C6), δηλαδή πρόκειται για τη γενική δομή ενός ανθρακικού σκελετού με δεκαπέντε άτομα άνθρακα, ο οποίος αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) συνδεδεμένους με έναν ετεροκυκλικό πυρανικό δακτύλιο (C). Με βάση τη δομή τους τα φλαβονοειδή μπορούν να ταξινομηθούν σε έξι χαρακτηριστικές κατηγορίες, τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις φλαβανόλες, τις φλαβανόνες, τα ισοφλαβονοειδή και τις ανθοκυανίνες.



Εικόνα 18. Χημική δομή και υποκατηγορίες των φλαβονοειδών⁶⁶

Τα φλαβονοειδή συναντώνται ως ελεύθερα αγλύκωνα ή γλυκοσιδικά συζυγή. Γενικά, τα αγλύκωνα φλαβονοειδή είναι υδρόφοβα μόρια, αλλά η γλυκοζυλίωσή τους τα καθιστά πιο υδατοδιαλυτά.^{66–69}

1.9.1.2 Βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών

Επιστημονικά στοιχεία αποδεικνύουν τα πολλά οφέλη των φλαβονοειδών για την ανθρώπινη υγεία, αφού μια διατροφή πλούσια στις ενώσεις αυτές μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη ορισμένων χρόνιων ασθενειών. Αυτά τα οφέλη προκύπτουν από τις βιολογικές δράσεις της οικογένειας αυτής των φυσικών προϊόντων, μερικές εκ των οποίων είναι:⁶⁸

- **Αντιοξειδωτική δράση**

Η αντιοξειδωτική ικανότητα ποικίλλει, καθώς εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων στον δακτύλιο Β και C. Η λειτουργική ομάδα του υδροξυλίου της δομής τους μπορεί να δωρίσει ένα ηλεκτρόνιο και υδρογόνο σε μια ρίζα μέσω συντονισμού, να σταθεροποιηθεί και να δημιουργήσει μια σχετικά σταθερή ρίζα φλαβονοειδούς. Γενικά, τα περισσότερα από τα φλαβονοειδή εμφανίζονται ως γλυκοσιδικά συζυγή, ώστε ο αριθμός και η θέση των συνδέσεων με το σάκχαρο να επηρεάζουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους. Απεναντίας, αν και τα αγλύκωνα φλαβονοειδή εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, εντούτοις η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι χαμηλότερη.

- *Αντιφλεγμονώδης δράση*

Σε μια φλεγμονή τα φλαβονοειδή μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της δραστηριότητας ρυθμιστικών ενζύμων (π.χ. πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφοδιεστεράση), παράγοντες μεταγραφής που σχετίζονται με τον έλεγχο των μεσολαβητών που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη διαδικασία και ρυθμιστές της δραστηριότητας των ανοσοκυττάρων (π.χ. αναστολή της κυτταρικής ενεργοποίησης, ωρίμανσης, μεταγωγής σήματος και εκκριτικών διεργασιών).

- *Αντικαρκινική δράση*

Τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω της αναστολής του σχηματισμού ελευθέρων ριζών και της καταστολής των ενζύμων που εμπλέκονται στην προώθηση και ανάπτυξη όγκων.

- *Καρδιοπροστατευτική δράση*

Τα φλαβονοειδή μπορούν να δράσουν ως καρδιοπροστατευτικοί παράγοντες ελέγχοντας το οξειδωτικό στρες (αποτρέποντας την οξείδωση λιποπρωτεϊνών), προκαλώντας αγγειοδιαστολή, αλληλεπιδρώντας με το μεταβολισμό των λιπιδίων και μειώνοντας τη συσσώρευση αιμοπεταλίων.

- *Αντιβακτηριδιακή δράση*

Τα φλαβονοειδή μπορούν να ασκήσουν αρκετούς μηχανισμούς δράσης κατά των βακτηρίων παρεμβαίνοντας στις λιπιδικές διπλοστιβάδες τους και προκαλώντας διαταραχή της βακτηριακής μεμβράνης και αναστολή διαφόρων διεργασιών τους.

- *Αντιμυκητιασική δράση*

Υπάρχουν αρκετοί αντιμυκητιασικοί μηχανισμοί που επιτελούνται από τα φλαβονοειδή, όπως η διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης, η πρόκληση αρκετών μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών και η αναστολή του σχηματισμού κυτταρικού τοιχώματος, της κυτταρικής διαίρεσης και της σύνθεσης RNA.

- *Αντιική δράση*

Τα φλαβονοειδή μπορούν να εμποδίσουν τη δέσμευση και τη διείσδυση των ιών στα κύτταρα και να παρεμποδίσουν την αντιγραφή ή τη μετάφρασή τους.

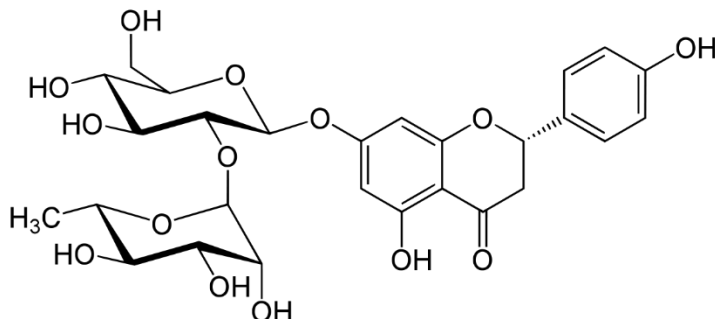
1.9.2 Φλαβανόνες: Ναρινγίνη

Οι φλαβανόνες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία των φλαβονοειδών που απαντάται γενικά σε όλα τα εσπεριδοειδή, όπως τα πορτοκάλια, τα λεμόνια και τα σταφύλια. Δομικά οι φλαβανόνες διαφέρουν από τις φλαβόνες στο γεγονός ότι ο δακτύλιος C είναι κορεσμένος και άρα ο διπλός δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3 του δακτυλίου αυτού είναι επίσης κορεσμένος. Μερικά παραδείγματα

φλαβανονών αποτελούν η εσπεριδίνη, η εριοδικτυόλη, η ναρινγενίνη και η ναρινγίνη.⁶⁹

1.9.2.1 Χημική δομή της ναρινγίνης

Η ναρινγίνη (naringin) είναι ένας φυσικός γλυκοζίτης φλαβονόνης που σχηματίζεται από τη φλαβονόνη ναρινγενίνη και το δισακχαρίτη νεοεσπεριδόζη, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Ο χημικός τύπος της ναρινγίνης είναι $C_{27}H_{32}O_{14}$ και έχει μοριακό βάρος 580.4 g/mol.

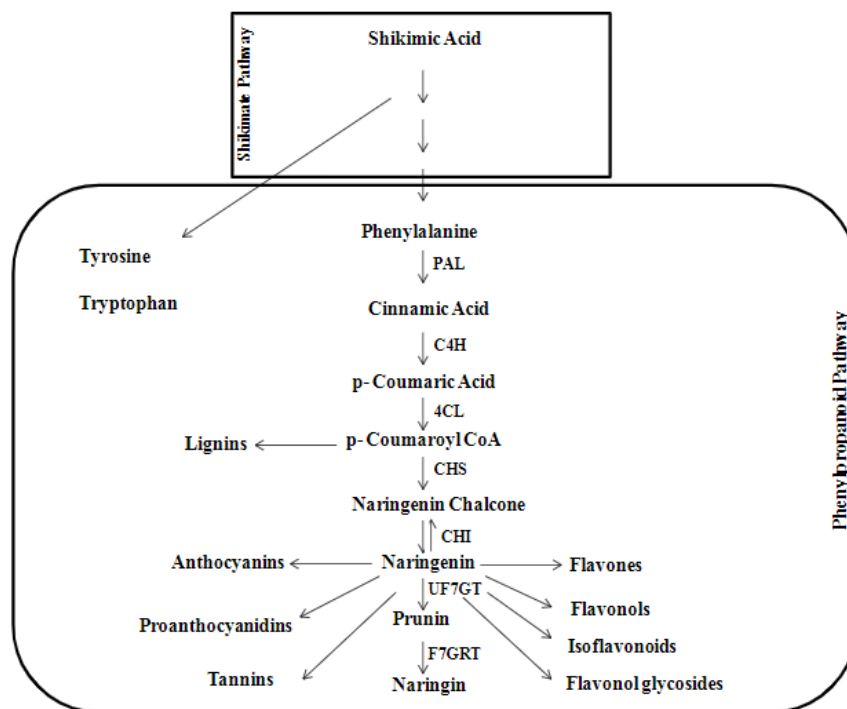


Εικόνα 19. Χημική δομή της ναρινγίνης⁷⁰

Ανακαλύφθηκε το 1857 από τον De Vry σε άνθη φρούτων σταφυλιών από την Ιάβα, ενώ η ονομασία της “naringin” πιθανότατα προέρχεται από τη σανσκριτική γλώσσα, όπου “narangi” σημαίνει «πορτοκάλι». Η ναρινγίνη συναντάται φυσικά στα εσπεριδοειδή και ιδιαίτερα στο γκρέιπφρουτ προσδίδοντας τους την πικρή τους γεύση.⁷¹

1.9.2.2 Βιοσύνθεση της ναρινγίνης

Οι φαιυλοπροπανοειδείς οδοί αποτελούν τα κυριότερα μονοπάτια για τη βιοσύνθεση της ναρινγίνης. Συνήθως ξεκινούν με τη φαιυλαλανίνη, ένα αρωματικό αμινοξύ, το οποίο είναι το τελικό προϊόν της οδού του σικιμικού οξέος. Η οδός των φαιυλοπροπανοειδών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων τελικών προϊόντων που ποικίλουν από φλαβονοειδή, τανίνες και λιγνίνες. Ο μεταβολισμός της πρόδρομου ουσίας, φαιυλαλανίνης, σε επτά στάδια που καταλύονται από ένζυμα της οδού βιοσύνθεσης φαιυλοπροπανοειδών οδηγούν στη σύνθεση της ναρινγίνης, όπως και περιγράφεται στην ακόλουθη εικόνα. Η οδός μέχρι τη σύνθεση του p-coumaroyl CoA χαρακτηρίζεται ως η γενική οδός του φαιυλοπροπανοειδούς, ενώ με την πρόοδο της οδού τα πρόδρομα διαφοροποιούνται σε ισοφλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, φλαβονόλες κ.α..^{70,72}



Εικόνα 20. Βιοσύνθεση της ναρινγίνης μέσω της φαινυλοπροπανοειδούς οδού⁷⁰

1.9.2.3 Απομόνωση της ναρινγίνης

Τρία βήματα απαιτούνται για την απομόνωση της ναρινγίνης από τα εσπεριδοειδή και αυτά είναι η εκχύλιση, ο διαχωρισμός και ο καθαρισμός. Γενικά, η περιεκτικότητα σε ναρινγίνη των εσπεριδοειδών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο χρόνος συλλογής τους, το μέρος του καρπού που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή της ναρινγίνης, καθώς και ο χρόνος ξήρασής τους. Αρχικά, ένας φούρνος μεταφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί, προκειμένου να αφυδατώσει το φλοιό των φρούτων ταχύτερα συγκριτικά με την έκθεσή τους στον ήλιο μειώνοντας το χρόνο έκθεσης στον αέρα και αποτρέποντας έτσι τη μικροβιακή δραστηριότητα, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στην υποβάθμιση της ναρινγίνης λόγω της μόλυνσής της με μεταβολίτες. Ακολουθεί η εκχύλιση, για την οποία χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της συμβατικής εκχύλισης με διαλύτη, της εκχύλισης Soxhlet, της εκχύλισης με υπερκρίσιμο υγρό, της εκχύλισης με υπερήχους και της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης, για την απομόνωση των πολυφαινολών. Η εκχύλιση των πολυφαινολών από τον πυρήνα των εσπεριδοειδών έχει μελετηθεί εκτενώς, μεταξύ άλλων με πρόσφατες βελτιστοποιήσεις που χρησιμοποιούν πράσινη επεξεργασία, επί παραδείγματι εκχύλιση με χρήση πράσινων διαλυτών. Έχει αποδειχθεί ότι η σύνθεση του εκχυλίσματος εξαρτάται από το διαλύτη που χρησιμοποιείται, την αναλογία δείγματος προς στερεό, το χρόνο εκχύλισης, τη θερμοκρασία και την πιθανή προεπεξεργασία που ακολουθήθηκε, ενώ μπορεί να πραγματοποιηθεί στοχευμένη εκχύλιση με στόχο την αύξηση της συγκέντρωσης

του επιθυμητού συστατικού στο εκχύλισμα. Μετά την εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων από τα εσπεριδοειδή απαιτείται καθαρισμός, ώστε να ληφθεί η καθαρή ναρινγίνη, η καθαρότητα της οποίας επιβεβαιώνεται με χρήση φασματοφωτομετρικών μεθόδων, π.χ. FT – IR, ¹H NMR και UV – Vis.^{73,74}

1.9.2.4 Βιολογικές δράσεις της ναρινγίνης

Η μελέτη της ναρινγίνης τα τελευταία χρόνια έχει αποδείξει τις υποσχόμενες θεραπευτικές της δράσεις, μερικές εκ των οποίων είναι οι:^{70,71,74,75}

- *Αντιοστεοπορωτική δράση (Αναγέννηση των οστών)*

Η ναρινγίνη έχει αποδειχθεί ότι έχει σημαντική επίδραση στην αποκατάσταση των οστών, καθώς αυξάνει την οστική πυκνότητα και την αντοχή των οστών, ενώ αναστέλλει την απέκκριση ασβεστίου στα ούρα.

- *Αντιφλεγμονώδης δράση*
- *Αντικαρκινική δράση*

Οι παράγοντες καταστολής, αποκλεισμού και μετασχηματισμού έχουν χρησιμοποιηθεί σε προσπάθειες για τον έλεγχο του καρκίνου. Οι κατασταλτικοί παράγοντες εμποδίζουν το σχηματισμό νέου καρκίνου από προκαρκινογόνα, οι ανασταλτικοί παράγοντες που εμποδίζουν τις καρκινογόνες ενώσεις να φτάσουν σε κρίσιμες θέσεις έναρξης και οι παράγοντες μετασχηματισμού διευκολύνουν το μεταβολισμό των καρκινογόνων συστατικών σε λιγότερο τοξικά υλικά ή αποτρέπουν τις βιολογικές τους δράσεις. Έτσι, η ναρινγίνη μπορεί να δράσει τόσο ως κατασταλτικός όσο και ως ανασταλτικός παράγοντας.

- *Δράση κατά του μεταβολικού συνδρόμου*

Η ναρινγίνη ρυθμίζει το μεταβολικό σύνδρομο ρυθμίζοντας προς τα πάνω την πρωτεϊνίναση και μειώνοντας την έκφραση βασικών γλυκονογενετικών ενζύμων.

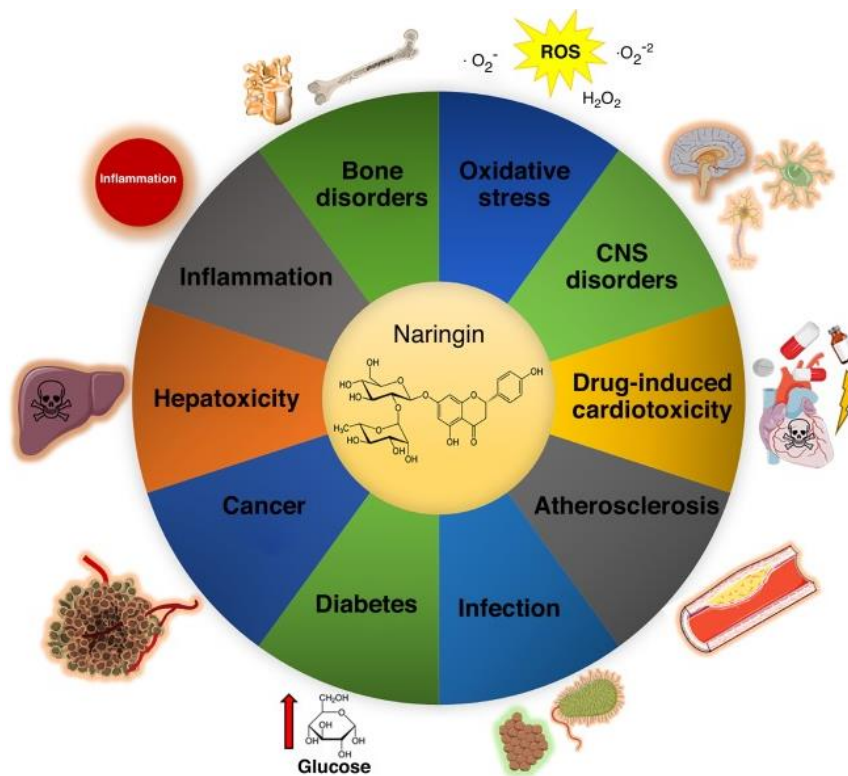
- *Αντιοξειδωτική δράση*

Η ναρινγίνη δύναται να καταστρέφει τις ελεύθερες ρίζες στον ανθρώπινο οργανισμό αποφεύγοντας έτσι και την πρόκληση οξειδωτικού στρες (κατάσταση ανισορροπίας δημιουργίας και καταστροφής ελευθέρων ριζών).

- *Δράση κατά των ασθενειών του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ)*

Η ναρινγίνη έχει ευεργετικές επιδράσεις σε πολλές ασθένειες του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Alzheimer, της νόσου του Parkinson και της επιληψίας.

- *Νεφροπροστατευτική δράση*
- *Ηπατοπροστατευτική δράση*
- *Αντιϊική δράση*



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση των βιολογικών δράσεων της ναρινγίνης⁷⁵

1.9.2.5 Φαρμακοκινητική και τοξικότητα της ναρινγίνης

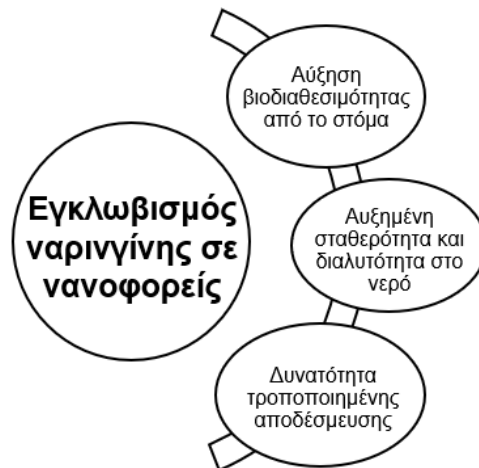
Η ναρινγίνη αποτελεί ένα φάρμακο τάξης II στο βιοφαρμακευτικό σύστημα ταξινόμησης, καθώς χαρακτηρίζεται από χαμηλή διαλυτότητα και υψηλή διαπερατότητα οδηγώντας και σε μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα. Συγκεκριμένα, η ναρινγίνη υδρολύεται στη ναρινγενίνη, τον αγλύκονο μεταβολίτη της από την εντερική χλωρίδα πριν από την απορρόφησή της και ο μεταβολισμός της στο εντερικό μικροβίωμα καθορίζεται κυρίως μέσω της έκτασης της σύζευξης με τα τμήματα σακχάρου της και την εξάλειψη αυτών από εντερικά βακτήρια. Η ναρινγίνη είναι ανθεκτική σε ενζυμικές προσβολές στο στομάχι και το λεπτό έντερο, οπότε τελικά φτάνει στο παχύ έντερο όπου και μεταβολίζεται. Έτσι, η ναρινγίνη απορροφάται γρήγορα στον ορό του πλάσματος, όπου η πρώτη κορυφή της συγκέντρωσής της εμφανίζεται στα δεκαπέντε λεπτά και μία άλλη στις τρεις ώρες μετά την από του στόματος χορήγηση, ενώ στα 480 *min* μετά τη χορήγηση, δεν ανιχνεύεται. Η χαμηλή διαλυτότητα και η αυξημένη διαπερατότητά της έχουν ως αποτέλεσμα τη μικρότερη βιοδιαθεσιμότητά της εξαιτίας της δομής με τους ογκώδεις υδρόφοβους δακτυλίους της.

Αρκετές μελέτες τοξικότητας έχουν αποδείξει ότι η ναρινγίνη είναι μη τοξική και ασφαλής. Η μέγιστη από του στόματος ανεκτή δόση σε αρουραίους έχει προσδιοριστεί ίση με 16 *mg/kg/d* χωρίς να έχουν παρουσιαστεί επιβλαβείς επιπτώσεις. Άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε αρουραίους με στόχο

τη μελέτη της τοξικότητας της ναρινγίνης σε βάθος χρόνου έδειξαν πως δόσεις έως και 1250 mg/kg για 24 εβδομάδες δεν προκάλεσαν τοξικότητα στα όργανα, αλλά μείωσαν το σωματικό βάρος και οδήγησαν σε απώλεια μαλλιών στους αρουραίους.^{71,72,74}

1.9.2.6 Εγκλωβισμός ναρινγίνης σε νανοσυστήματα

Παρά το ευρύ φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων της ναρινγίνης, η χαμηλή διαλυτότητά της στο νερό σε συνδυασμό με τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητά της δεν της επιτρέπουν να αποτελεί καλό υποψήφιο φάρμακο στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. Επιτακτική, λοιπόν, κρίνεται η ανάγκη εγκλωβισμού της σε νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων, τα οποία και έχουν αποδειχθεί ότι ενισχύουν την αποτελεσματικότητα των φορτωμένων φαρμάκων τους βελτιώνοντας τη διαλυτότητα και τη φαρμακοκινητική τους, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να σχεδιαστούν κατάλληλα ώστε να επιτυγχάνουν στοχευμένη δράση και παρατεταμένη αποδέσμευση.⁷⁶



Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση της ανάγκης ανάπτυξης συστημάτων μεταφοράς πολυφαινολών, όπως η ναρινγίνη

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μίας πράσινης διεργασίας εγκλωβισμού του φυσικού φλαβονοειδούς ναρινγίνη σε νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης.

Η μέθοδος που εξετάζεται για την παρασκευή των νανοσυστημάτων αυτών είναι η πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση των δύο βιοπολυμερών, της οποίας προηγείται και ένα στάδιο προ – πηκτωμάτωσης του ανιοντικού πολυσακχαρίτη με άλας, ενώ ο πράσινος χαρακτήρας της έγκειται στη διαλυτοποίηση του κατιοντικού πολυσακχαρίτη χιτοζάνη σε φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη (NADES). Ο NADES που επιλέγεται και εξετάζεται είναι ο Bet:LA σε γραμμομοριακή αναλογία (1:2).

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας πραγματοποιείται μέσω πειραματικού σχεδιασμού Box Behnken 3×4 δεκαπέντε πειραμάτων με χρήση του λογισμικού Design – Expert 12. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίζονται η περιεκτικότητα του διαλύματος της χιτοζάνης (% w/v CS), του διαλύματος του αλγινικού (% w/v AL) και του διαλύματος του χρησιμοποιούμενου φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (% v/v NADES Bet:LA (1:2)). Οι εξεταζόμενες αποκρίσεις (εξαρτημένες μεταβλητές) είναι το μέγεθος, η κατανομή του μεγέθους ή δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και το επιφανειακό φορτίο (ζ – δυναμικό) των παραγόμενων νανοσυστημάτων, καθώς και η απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε αυτά.

Ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων νανοσυστημάτων ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους και το ζ – δυναμικό τους λαμβάνει χώρα μέσω της μεθόδου της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), ενώ ως προς την απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε αυτά προσδιορισμένη είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο μέσω της φασματοσκοπίας ορατού – υπεριώδους (UV – Vis).

Έπειτα τη βελτιστοποίηση της διεργασίας τα παραγόμενα νανοσυστήματα μελετώνται δομικά μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR/FT – IR), πραγματοποιείται μελέτη *in vitro* της αποδέσμευσης της ναρινγίνης από αυτά σε συνθήκες προσομοίωσης του ανθρωπίνου δέρματος, ενώ εξετάζεται *in vitro* και η ικανότητα της αποδεσμευμένης ένωσης να αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση που υποκινείται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH. Τέλος, μελετάται η σταθερότητα των νανοσυστημάτων σε βάθος χρόνου και για διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσής τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά την πειραματική διαδικασία της παρασκευής και του χαρακτηρισμού των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη ναρινγίνη παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 1. Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για την παρασκευή και το χαρακτηρισμό των νανοσυστημάτων

| Αντιδραστήριο | Χημικός τύπος | Προμηθευτής |
|--|----------------------------------|------------------------|
| Αιθανόλη, 99.8% | C_2H_5OH | Sigma – Aldrich |
| Άλας νατρίου του αλγινικού οξέος (αλγινικό νάτριο) | $(NaC_6H_7O_6)_n$ | Glentham Life Sciences |
| Απεσταγμένο & υπερκάθαρο νερό | H_2O | - |
| Ασκορβικό οξύ | $C_6H_8O_6$ | Penta |
| Βεταΐνη (άνυδρη) | $C_5H_{11}NO_2$ | Glentham Life Sciences |
| Βορικό οξύ | H_3BO_3 | Sigma – Aldrich |
| Γαλακτικό οξύ, 80% | $C_3H_6O_3$ | Labkem |
| Διμεθυλοσουλφοξείδιο, 99.7% | C_2H_6OS | Fischer Scientific |
| Δισόξινο φωσφορικό κάλιο | KH_2PO_4 | Penta |
| Λινελαϊκό οξύ, 99% | $C_{18}H_{32}O_2$ | Sigma – Aldrich |
| Ναρινγίνη (ένυδρη) | $C_{27}H_{32}O_{14} \cdot xH_2O$ | TCI |
| Οξικό οξύ, 99.7% | $C_2H_4O_2$ | Honeywell Fluka |
| Όξινο φωσφορικό κάλιο | K_2HPO_4 | Penta |
| Υδροξείδιο του νατρίου | $NaOH$ | Sigma – Aldrich |
| Υδροχλώριο | HCl | Sigma – Aldrich |
| Χιτοζάνη (χαμηλού μοριακού βάρους) | $(C_6H_{11}NO_4)_n$ | Glentham Life Sciences |
| Χλωριούχο ασβέστιο | $CaCl_2$ | Sigma – Aldrich |
| Polysorbate 20 (Tween 20) | $C_{58}H_{114}O_{26}$ | Serva |
| Polysorbate 80 (Tween 80) | $C_{64}H_{124}O_{26}$ | Alfa Aesar |
| 2,2' – αζωδισ – (2 – αμιδινοπροπάνο) – διϋδροχλωρίδιο (AAPH) | $C_8H_{20}Cl_2N_6$ | Fluorochem |

2.2 Όργανα και συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιούνται κατά την πειραματική διαδικασία της παρασκευής και του χαρακτηρισμού των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη ναρινγίνη παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

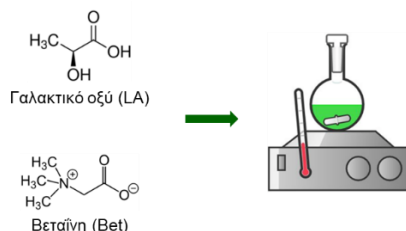
Πίνακας 2. Χρησιμοποιούμενα όργανα και συσκευές για την παρασκευή και το χαρακτηρισμό των νανοσυστημάτων

| Όργανο – Συσκευή | Κατασκευαστής | Μοντέλο |
|---|--------------------------|---|
| Αναδευτήρας τύπου vortex | Velp | ZX4 |
| Ζυγός ακριβείας (έως 220 g) | Kern | ADB 200 – 4 |
| Ζυγός ακριβείας (έως 2 g) | Sartorius | M2P |
| Λουτρό υπερήχων | Branson | 2210 Ultrasonic Bath |
| Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη εστία | Witeg | MSH – 20A |
| Πεχάμετρο | Metrohm | 744 pH Meter |
| Υπερφυγόκεντρος | Thermo Fisher Scientific | Sorvall LYNX 6000 Superspeed Centrifuge |
| Φασματοφωτόμετρο ATR/FT – IR | Jasco | FT – IR - 4X + ATR PRO 4X |
| Φασματοφωτόμετρο NMR | Varian | V600MHz |
| Φασματοφωτόμετρο UV – Vis | Jasco | V – 770 UV – Vis/NIR |
| Dynamic Light Scattering (DLS) | Malvern Panalytical | Zetasizer Nano ZS |
| Incubator shaker | Gallenkamp | OTSHTD.EU1.C |
| Probe υπερήχων (400 W) | Sonics & Materials Inc. | Vibra cell |
| Syringe filters 0.22 μm & 0.45 μm | Labbox | Non – sterile Nylon Syringe Filters, 0.22 μm & 0.45 μm Poro |
| Vacuum freeze dryer | Frozen in time | Lablyo Mini |

2.3 Σύνθεση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη

Η σύνθεση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη βεταΐνης – γαλακτικού οξέος σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2 (NADES Bet:LA (1:2)) πραγματοποιείται με τη μέθοδο της θέρμανσης και ανάδευσης των δύο συστατικών.

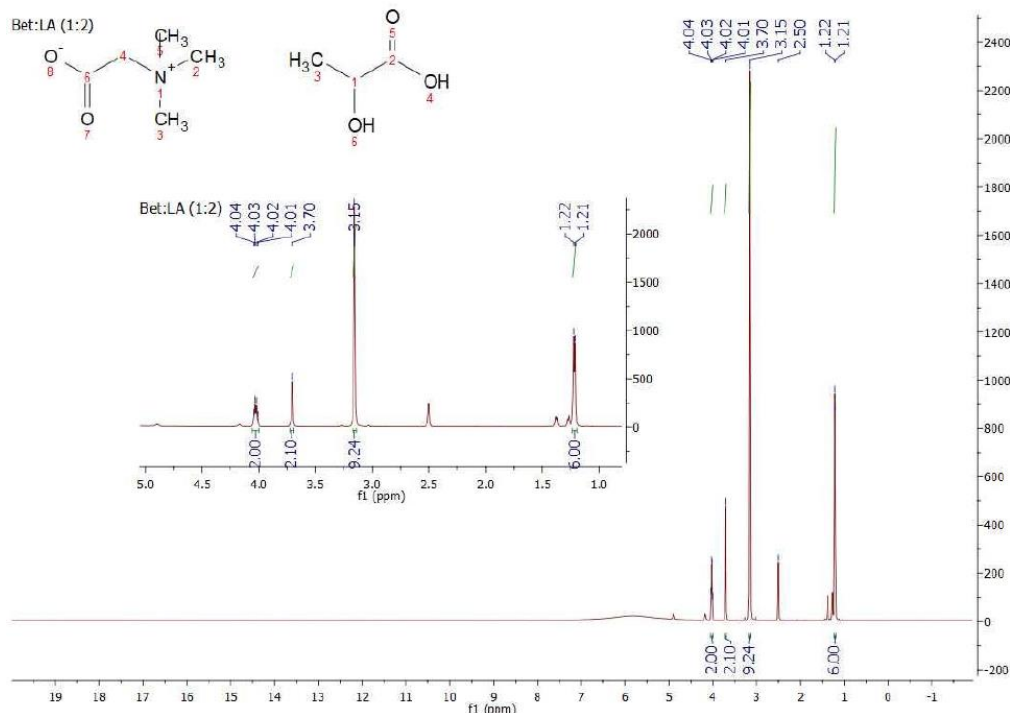
Ειδικότερα, προκείμενου να τηρείται η γραμμομοριακή αναλογία, ζυγίζονται κατάλληλες ποσότητες υδατικού διαλύματος γαλακτικού οξέος (LA) 80% w/w και άνυδρης βεταΐνης (Bet), τα οποία μεταφέρονται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση και θερμαινόμενη εστία, όπου και αφήνεται υπό ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 60°C για μία με δύο ώρες, έως ότου σχηματιστεί ένα ομοιογενές διάφανο ρευστό.



Σχήμα 5. Πειραματική διαδικασία σύνθεσης του NADES Bet:LA (1:2)

2.3.1 Ταυτοποίηση του παραγόμενου NADES

Για την επιβεβαίωση σχηματισμού του εν λόγω φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη λαμβάνεται φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), το οποίο παρατίθεται και σχολιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 1. Φάσμα ^1H NMR του NADES Bet:LA (1:2) (600 MHz, DMSO – d_6)

Η συχνότητα του οργάνου NMR, όπου έγινε η λήψη του φάσματος, είναι 600 MHz και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο

DMSO – d₆. Στα πιο χαμηλά πεδία, δηλαδή σε υψηλή συχνότητα, συντονίζονται τα πιο αποπροστατευμένα πρωτόνια, ενώ σε υψηλά πεδία, δηλαδή σε χαμηλή συχνότητα, τα πιο προστατευμένα πρωτόνια. Έτσι, η τετραπλή κορυφή στα 4.03 ppm που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια αντιστοιχεί στα μοναδικά πρωτόνια του άνθρακα 1 των δύο μορίων γαλακτικού οξέος βάση της γραμμομοριακής αναλογίας του NADES. Η απλή κορυφή στα 3.70 ppm ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο 4 της βεταΐνης. Έπειτα, στα 3.15 ppm εντοπίζεται μία άλλη απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για εννέα πρωτόνια, που αφορούν τα εννέα χημικά ισοδύναμα πρωτόνια των τριών μεθυλίων που είναι συνδεδεμένα στο άζωτο της βεταΐνης. Η απλή κορυφή στα 2.50 ppm αντιστοιχεί στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη DMSO – d₆. Στα πιο υψηλά πεδία και συγκεκριμένα στα 1.22 ppm εμφανίζονται τα πιο προστατευμένα πρωτόνια του μεθυλίου 3 του γαλακτικού οξέος. Η κορυφή ολοκληρώνεται για έξι πρωτόνια, αφού σύμφωνα με τη γραμμομοριακή αναλογία στο σχηματισμό του NADES συμμετέχουν δύο μόρια γαλακτικού οξέος. Τέλος, όσον αφορά τα πρωτόνια των υδροξυλίων, αυτά καθώς είναι πιο αποπροστατευμένα και είναι ιδιαίτερα ευκίνητα δεν είναι πάντα εμφανή σε φάσματα ¹H NMR, ειδικά όταν υπάρχει ποσότητα νερού στο δείγμα, όπως στην περίπτωση του παρασκευασθέντος NADES, όπου το γαλακτικό οξύ είναι υδατικό διάλυμα 80% w/w.

2.3.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου NADES

2.3.2.1 Προσδιορισμός της πυκνότητας

Ογκομετρείται 1 mL NADES Bet:LA (1:2), ποσότητα η οποία έπειτα ζυγίζεται και προσδιορίζεται περίπου ίση με 1 g. Συνεπώς, προσεγγιστικά και για τους απαιτούμενους παρακάτω υπολογισμούς θεωρείται πως η πυκνότητα του παραγόμενου NADES είναι ίση με 1 g/cm³.

2.3.2.2 Προσδιορισμός του pH

Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα του παραγόμενου NADES Bet:LA (1:2) 1% w/v, του οποίου το pH προσδιορίζεται ίσο με 2.65. Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, ο όξινος χαρακτήρας του παραγόμενου διαλύτη που οφείλεται στην οξύτητα του δότη δεσμών υδρογόνου (γαλακτικό οξύ).

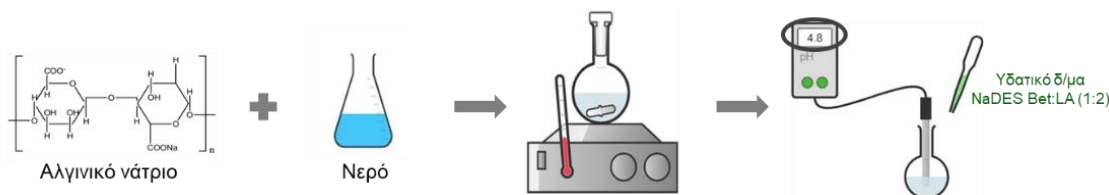
2.4 Σύνθεση των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης

Η σύνθεση των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη ναρινγίνη πραγματοποιείται με τη μέθοδο της πολυηλεκτρολυτικής συμπλοκοποίησης, της οποίας όμως προηγείται και ένα στάδιο προ – πηκτωμάτωσης του ανιοντικού πολυσακχαρίτη με άλας.

Αρχικά, παρασκευάζονται τα διαλύματα των δύο πολυηλεκτρολυτών, του αλγινικού και της χιτοζάνης, και ρυθμίζεται κατάλληλα το pH τους.

Το υδατικό διάλυμα του αλγινικού νατρίου (AL) παρασκευάζεται ως εξής:

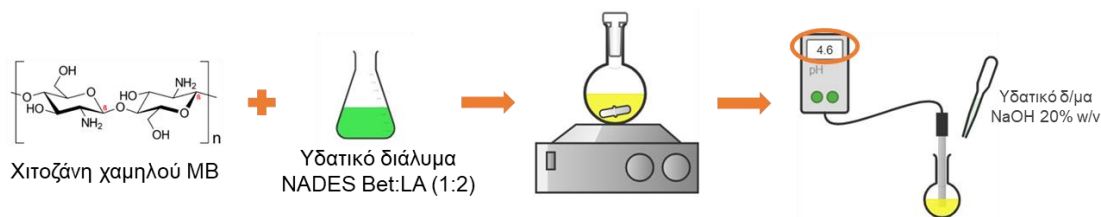
- I. Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται ζυγισμένη ποσότητα αλγινικού νατρίου μαζί με 20 mL απεσταγμένου νερού.
- II. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση και θερμαινόμενη εστία, όπου και αφήνεται υπό έντονη ανάδευση και θέρμανση στους 50°C, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του αλγινικού νατρίου.
- III. Η σφαιρική φιάλη απομακρύνεται από τον αναδευτήρα και αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- IV. Το pH του παρασκευασθέντος διαλύματος αλγινικού νατρίου ρυθμίζεται με υδατικό διάλυμα NADES Bet:LA (1:2) συγκεκριμένης περιεκτικότητας στην τιμή 4.8.



Σχήμα 6. Πειραματική διαδικασία παρασκευής του διαλύματος αλγινικού νατρίου

Το διάλυμα χιτοζάνης (CS) σε υδατικό διάλυμα NADES Bet:LA (1:2) παρασκευάζεται ως εξής:

- I. Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται ζυγισμένη ποσότητα χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους μαζί με 20 mL υδατικού διαλύματος NADES Bet:LA (1:2) συγκεκριμένης περιεκτικότητας.
- II. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση, όπου και αφήνεται υπό έντονη ανάδευση, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση της χιτοζάνης.
- III. Το pH του παρασκευασθέντος διαλύματος χιτοζάνης ρυθμίζεται με υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) 20% w/v στην τιμή 4.6.
- IV. Ακολουθεί φιλτράρισμα του διαλύματος χιτοζάνης με χρήση syringe filters πορώδους 0.45 μm .



Σχήμα 7. Πειραματική διαδικασία παρασκευής του διαλύματος χιτοζάνης

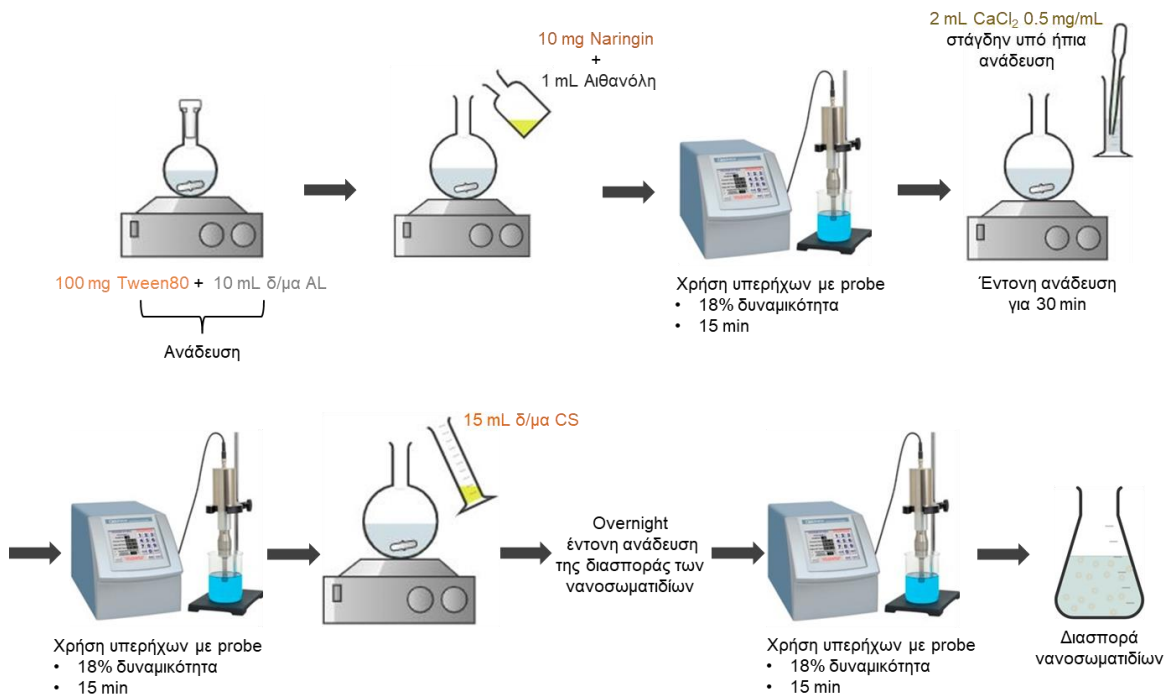
Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Χρησιμοποιείται χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους με υψηλό ποσοστό απακετυλίωσης ($\geq 90\%$), καθώς διαλύεται πιο εύκολα συγκριτικά με του υψηλότερου μοριακού βάρους και χαμηλού βαθμού απακετυλίωσης, οπότε είναι και πιο εύκολος ο εργαστηριακός χειρισμός της.
- Ως διαλύτης της χιτοζάνης επιλέγεται υδατικό διάλυμα του NADES Bet:LA (1:2), το οποίο όπως και διαπιστώνεται παραπάνω έχει όξινο pH .
- Απαιτείται το φιλτράρισμα του διαλύματος χιτοζάνης για την απομάκρυνση ακαθαρσιών, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος και την σταθερότητα των νανοσυστημάτων.
- Το pH των διαλυμάτων του αλγινικού και της χιτοζάνης πρέπει να ρυθμιστεί κατάλληλα, ώστε να μπορούν να επιτευχθούν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων πολυσακχαριτών, οι οποίες και οφείλονται στις αρνητικά φορτισμένες ομάδες καρβοξυλικού οξέος του αλγινικού και στις θετικά φορτισμένες αμινομάδες της χιτοζάνης. Έτσι, στην περίπτωση του αλγινικού όταν το pH των διαλυμάτων του είναι μικρότερο ή κοντά στην τιμή του pK_a του (~ 3.4), παρατηρείται δραστική μείωση του βαθμού ιοντισμού των μακρομορίων του, γεγονός που θα δυσχέραινε τη συμπλοκοποίησή του με το διάλυμα της χιτοζάνης. Όσον αφορά τη χιτοζάνη, αυτή είναι διαλυτή μόνο σε διαλύματα όξινων pH , όπου η τιμή του pH τους είναι μακριά από την τιμή του pK_a της. Βιβλιογραφικά προσδιορίζεται ότι οι βέλτιστες τιμές pH των διαλυμάτων του αλγινικού και της χιτοζάνης για την επίτευξη των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο βιοπολυμερών είναι 4.8 και 4.6, αντίστοιχα.^{77,78}

Με την παρασκευή των διαλυμάτων του αλγινικού και της χιτοζάνης και τη ρύθμιση του pH τους ακολουθεί η σύνθεση των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη ως εξής:⁷⁷

- I. Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθενται 100 mg Tween 80 μαζί με 10 mL από το παρασκευασθέν διάλυμα αλγινικού.
- II. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση, όπου και αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για 10 min.
- III. Σε ένα μικρό vial των 5 mL ζυγίζονται 10 mg ναρινγίνης (Nar), έπειτα προστίθεται 1 mL αιθανόλης (EtOH) και ακολουθεί ανάδευση του περιεχομένου του vial σε αναδευτήρα τύπου vortex. Για την πλήρη διαλυτοποίηση της ναρινγίνης μπορεί να χρειαστεί η θέρμανση του vial σε bath νερού χαμηλής θερμοκρασίας.
- IV. Η διαλυμένη στην αιθανόλη ναρινγίνη προστίθεται στη σφαιρική φιάλη με το αλγινικό διάλυμα και αφήνονται υπό ανάδευση για 10 min.
- V. Με το πέρασμα των 10 min το διάλυμα της διασποράς της ναρινγίνης στο αλγινικό μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 25 mL και ακολουθεί χρήση υπερήχων με probe σε 18% της δυναμικότητας του οργάνου για τρία

- πεντάλεπτα (15 min) με ενδιάμεση «ξεκούραση» του διαλύματος για ένα λεπτό.
- VI. Το διάλυμα της διασποράς της ναρινγίνης στο αλγινικό μεταφέρεται πάλι στη σφαιρική φιάλη των 50 mL και τοποθετείται στον αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση. Ογκομετρούνται 2 mL υδατικού διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) συγκέντρωσης 0.5 mg/mL, τα οποία και προστίθενται στάγδην και υπό ήπια ανάδευση στο περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση του διαλύματος για 30 min.
 - VII. Με το πέρας των 30 min το διάλυμα της σφαιρικής φιάλης μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 25 mL και ακολουθεί χρήση υπερήχων με probe σε 18% της δυναμικότητας του οργάνου για τρία πεντάλεπτα (15 min) με ενδιάμεση «ξεκούραση» του διαλύματος για ένα λεπτό.
 - VIII. Μετά τη χρήση υπερήχων με probe το διάλυμα μεταφέρεται πάλι στη σφαιρική φιάλη των 50 mL και τοποθετείται στον αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση. Ογκομετρούνται 15 mL από το παρασκευασθέν διάλυμα χιτοζάνης, τα οποία και προστίθενται με σταθερή ροή στο περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης.
 - IX. Η προκύπτουσα διασπορά των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης αφήνεται υπό έντονη ολονύκτια (overnight) ανάδευση.
 - X. Μετά την ολονύκτια έντονη ανάδευση το διάλυμα της διασποράς των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 25 mL και ακολουθεί χρήση υπερήχων με probe σε 18% της δυναμικότητας του οργάνου για τρία πεντάλεπτα (15 min) με ενδιάμεση «ξεκούραση» του διαλύματος για ένα λεπτό.
 - XI. Η διασπορά των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης αποθηκεύεται στη ψύξη ($T = 4^\circ C$) μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία της για το χαρακτηρισμό των παραγόμενων νανοσυστημάτων.



Σχήμα 8. Πειραματική διαδικασία σύνθεσης των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη ναρινγίνη

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Η χρήση της επιφανειοδραστικής ουσίας Tween 80 οδηγεί σε πιο σταθερές διασπορές νανοσωματιδίων, καθώς έχουν την ικανότητα να ελαττώνουν τη διεπιφανειακή ενέργεια μεταξύ των βιοπολυμερών και του μέσου διασποράς αποτρέποντας έτσι και τη συσσωμάτωση των σωματιδίων.⁷⁹
- Η ναρινγίνη είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό (1 mg/mL, 40°C). Πειραματικά διαπιστώνεται πως η ναρινγίνη είναι διαλυτή στην αιθανόλη, γι' αυτό και επιλέγεται η χρήση αυτού του διαλύτη.
- Το πρώτο στάδιο της χρήσης υπερήχων με probe έχει ως στόχο τη δημιουργία μίας ομοιόμορφης διασποράς της ναρινγίνης στο διάλυμα του αλγινικού.
- Το στάδιο της προ – πηκτωμάτωσης του πολυανιοντικού βιοπολυμερούς (αλγινικό νάτριο) πραγματοποιείται με την προσθήκη σε αυτό του υδατικού διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (crosslinker). Έτσι, τα δισθενή ιόντα του ασβεστίου (Ca^{2+}) αντικαθιστούν τα μονοσθενή ιόντα του νατρίου (Na^{+}), δημιουργώντας έτσι νανοσφαίρες αλγινικού με εγκλεισμένη σε αυτές δραστική ουσία τη ναρινγίνη. Η συγκέντρωση του διαλύματος $CaCl_2$ είναι μικρή, καθώς και η προσθήκη του γίνεται στάγδην υπό ήπια ανάδευση προς αποφυγή σχηματισμού γελών αλγινικού.
- Το δεύτερο στάδιο της χρήσης υπερήχων με probe έχει ως στόχο το σπάσιμο των συσσωματωμάτων που προκύπτουν από την προσθήκη του crosslinker, οδηγώντας στη μείωση του μεγέθους των νανοσφαιρών αλγινικού και στην αύξηση της σταθερότητάς τους. Ακόμη, το στάδιο αυτό προσφέρει στο

σύστημα την απαραίτητη ενέργεια, ώστε έπειτα με την προσθήκη του διαλύματος της χιτοζάνης να πραγματοποιηθεί η πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση και να προκύψουν νανοσφαίρες αλγινικού επικαλυμμένες με ένα στρώμα χιτοζάνης.

- Το τρίτο στάδιο της χρήσης υπερήχων με probe μετά την ολονύκτια έντονη ανάδευση της διασποράς των νανοσωματιδίων έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο των συσσωματωμάτων και άρα τη μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων οδηγώντας σε μία πιο ομοιόμορφη και σταθερή διασπορά νανοσωματιδίων.
- Η χρησιμοποιούμενη δυναμικότητα του οργάνου κατά τη χρήση υπερήχων με probe, καθώς και ο χρόνος χρήσης του, επιλέγονται με γνώμονα τον όγκο των διαλυμάτων και την ανάγκη προστασίας της χιτοζάνης από τον κίνδυνο υποβάθμισής της εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά τη μέθοδο των υπερήχων. Γι' αυτό το λόγο, η κωνική φιάλη βυθίζεται σε παγόλουτρο κατά τη διάρκεια της χρήσης υπερήχων με probe.

2.4.1 Σύνθεση των κενών νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης

Τα κενά (blank) νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης είναι αυτά τα νανοσυστήματα που δεν έχουν εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα, εν προκειμένω τη ναρινγίνη. Η πειραματική διαδικασία της σύνθεσής τους είναι ίδια με αυτή της σύνθεσης των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη τη ναρινγίνη διαφέροντας σε ένα σημείο. Συγκεκριμένα, παραλείπεται το στάδιο της προσθήκης της διαλυμένης σε αιθανόλη ναρινγίνης στο διάλυμα του αλγινικού.

2.5 Χαρακτηρισμός των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης

2.5.1 Προσδιορισμός μεγέθους, κατανομής μεγέθους και ζ – δυναμικού

Ο χαρακτηρισμός τόσο των κενών παραγόμενων νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης όσο και των παραγόμενων νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη τη δραστική ουσία ναρινγίνη ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους ή δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το επιφανειακό φορτίο τους (ζ – δυναμικό) πραγματοποιείται μέσω της μεθόδου της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).

Για την παρασκευή του δείγματος που προορίζεται για μέτρηση στο όργανο του DLS λαμβάνονται σε μεγάλο vial των 30 mL αρχικά 20 μL από τη διασπορά των παραγόμενων νανοσωματιδίων αλγινικού – χιτοζάνης και αραιώνονται με 20 mL υπερκάθαρου νερού. Το περιεχόμενο του vial οδηγείται για ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex και έπειτα για χρήση υπερήχων με probe σε 18% της δυναμικότητας του οργάνου για 2 min. Τέλος, οδηγείται ξανά για καλή ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex. Για τη μέτρηση στο όργανο του DLS χρησιμοποιείται

κυψελίδα τύπου Disposable capillary cell (DTS1070), η οποία και πληρώνεται με σύριγγα με το δείγμα της αραιωμένης υδατικής διασποράς των νανοσωματιδίων μέχρι και την αναγραφόμενη ένδειξη πλήρωσής της. Έπειτα, η κυψελίδα τοποθετείται στο όργανο του DLS, οπότε και λαμβάνονται με χρήση και του λογισμικού του οργάνου οι μετρήσεις για το μέσο μέγεθος (μέση υδροδυναμική διάμετρος) και την κατανομή του μεγέθους (ή δείκτης πολυδιασποράς, PDI), καθώς και για το επιφανειακό φορτίο (ζ – δυναμικό) των παραγόμενων νανοσυστημάτων. Για κάθε μέγεθος πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις με πολλαπλά σκαναρίσματα του δείγματος για την καθεμία. Καταγράφονται και οι τρεις μετρήσεις για κάθε μέγεθος, από τις οποίες εξάγεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση για κάθε μέγεθος.

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Η μεγάλη αυτή αραιώση του δείγματος της διασποράς των νανοσωματιδίων αλγινικού – χιτοζάνης πραγματοποιείται, προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη ομοιομορφία της διασποράς και κατ' επέκταση οι μετρήσεις να είναι ακριβείς.
- Χρησιμοποιείται υπερκάθαρο νερό για την αραιώση του δείγματος της διασποράς των νανοσωματιδίων αλγινικού – χιτοζάνης, καθώς αυτό έχει ιδιαίτερα χαμηλή αγωγιμότητα και συνεπώς περιεχόμενα ιόντα, τα οποία δε δύνανται να επηρεάσουν τη μέτρηση του ζ – δυναμικού.
- Η χρήση υπερήχων με probe στο δείγμα του DLS έχει ως στόχο το σπάσιμο των συσσωματωμάτων και άρα τη μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων οδηγώντας σε μία πιο ομοιόμορφη και σταθερή διασπορά νανοσωματιδίων που συνεπάγεται πιο αξιόπιστες μετρήσεις.
- Η χρησιμοποιούμενη δυναμικότητα του οργάνου κατά τη χρήση υπερήχων με probe, καθώς και ο χρόνος χρήσης του, επιλέγονται με γνώμονα τον όγκο των δειγμάτων και την ανάγκη προστασίας της χιτοζάνης από τον κίνδυνο υποβάθμισής της εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά τη μέθοδο των υπερήχων. Γι' αυτό το λόγο, η κωνική φιάλη βυθίζεται σε παγόλουτρο κατά τη διάρκεια της χρήσης υπερήχων με probe.
- Οι μετρήσεις για το μέγεθος και την κατανομή του μεγέθους πραγματοποιούνται με βάση ένα SOP (Standard Operating Procedure) και οι μετρήσεις για το ζ – δυναμικό με βάση ένα άλλο SOP. Ουσιαστικά μία μέτρηση στο όργανο του DLS που βασίζεται σε ένα SOP χρησιμοποιεί προκαθορισμένες παραμέτρους, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι οι μετρήσεις που αφορούν τον ίδιο τύπο δείγματος γίνονται με συνεπή τρόπο. Έτσι, η δημιουργία αυτών των αρχείων SOP απαιτεί τη συμπλήρωση πληροφοριών, όπως ο δείκτης διάθλασης και το pH του μέσου διασποράς (εν προκειμένω του νερού, $n = 1.3333$, $pH = 7$) και η απορρόφηση του δείγματος της διασποράς των νανοσωματιδίων στο συγκεκριμένο μήκος κύματος που εκπέμπει και το laser του οργάνου του DLS (εν προκειμένω 633 nm). Η απορρόφηση στα 633 nm του δείγματος της διασποράς των νανοσωματιδίων πρέπει να είναι

μικρότερη από 0.1, γεγονός που υποδεικνύει την υψηλή αραίωση του δείγματος που απαιτείται για μία ομοιόμορφη διασπορά.

- Οι μετρήσεις των δειγμάτων στο όργανο του DLS λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), οπότε πριν την πραγματοποίηση των μετρήσεων απαιτείται η προθέρμανση του οργάνου του DLS για περίπου 30 min, έως και ότου αποκτήσει την σωστή θερμοκρασία.

2.5.2 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού

Η απόδοση εγκλωβισμού (Encapsulation Efficiency, EE) της ναρινγίνης στα παραγόμενα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης υπολογίζεται μέσω της σχέσης:

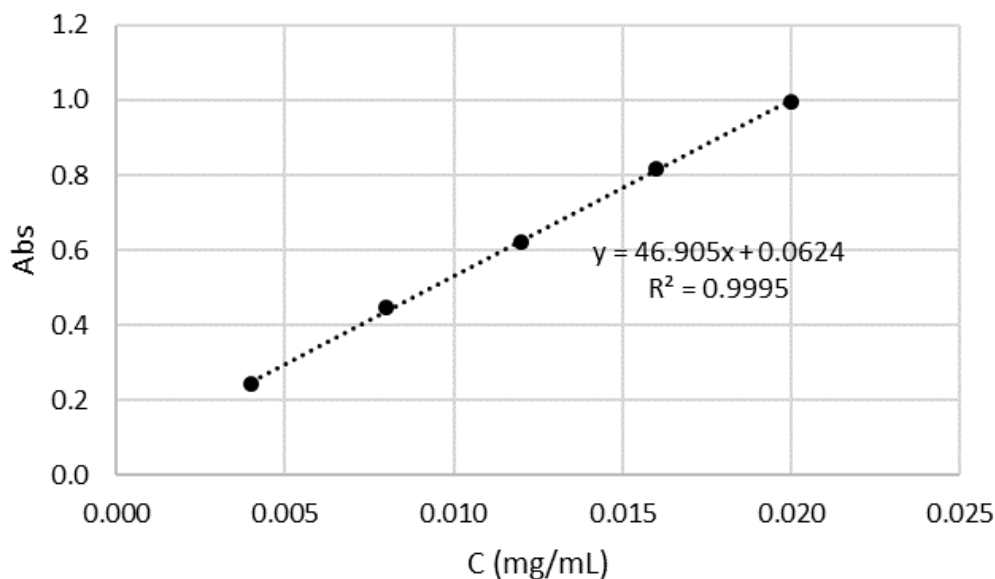
$$EE\% = \frac{\text{Μάζα ένωσης που εγκλωβίστηκε (mg)}}{\text{Αρχική μάζα ένωσης προς εγκλωβισμό (mg)}} \cdot 100\% \quad (1)$$

Η απόδοση εγκλωβισμού δύναται να προσδιοριστεί είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι στον άμεσο τρόπο ο υπολογισμός γίνεται με βάση τη μάζα της ένωσης που εγκλωβίστηκε, ενώ στον έμμεσο τρόπο ο υπολογισμός γίνεται με βάση τη μάζα της ένωσης που δεν εγκλωβίστηκε. Στη βιβλιογραφία ως επί τον πλείστον χρησιμοποιείται ο προσδιορισμός της απόδοσης εγκλωβισμού με έμμεσο τρόπο, καθώς αποτελεί μία γρήγορη και μη καταστρεπτική μέθοδος για το δείγμα. Εξίσου σημαντικός είναι, ωστόσο, και ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλωβισμού με άμεσο τρόπο, καθώς αν και είναι μία καταστρεπτική μέθοδος για το δείγμα (λύση νανοδοματιδίων), εντούτοις μπορεί να παρέχει πληροφορίες και σχετικά με την ομοιογένεια του δείγματος των νανοσυστημάτων, παράμετρος εξέχουσας σημασίας για τις βιολογικές αξιολογήσεις των νανοσυστημάτων. Γενικά, ορθό είναι να υπολογίζεται η απόδοση εγκλωβισμού και με τους δύο τρόπους με τις προκύπτουσες τιμές τους να είναι κοντινές.

Ο προσδιορισμός της απόδοσης εγκλωβισμού με άμεσο και έμμεσο τρόπο, δηλαδή ο προσδιορισμός της μάζας της ένωσης που εγκλωβίστηκε και που δεν εγκλωβίστηκε, αντίστοιχα, πραγματοποιείται με χρήση της φασματοσκοπίας υπεριώδους – ορατού (UV – Vis). Από την απορρόφηση των δειγμάτων η μάζα της ένωσης μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της ένωσης. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της ναρινγίνης καταστρώνεται με τη φωτομέτρηση διαλυμάτων ναρινγίνης σε αιθανόλη με γνωστές συγκεντρώσεις σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (283.8 nm), με στόχο τη δημιουργία καμπύλης συσχέτισης της συγκέντρωσης των διαλυμάτων της ναρινγίνης σε αιθανόλη με την απορρόφηση στα 283.8 nm . Ακολουθούν οι απορροφήσεις (*Abs*) των παρασκευασμένων διαλυμάτων ναρινγίνης σε αιθανόλη με γνωστές συγκεντρώσεις (*C*), καθώς και η προκύπτουσα πρότυπη καμπύλη αναφοράς της ναρινγίνης σε αιθανόλη.

Πίνακας 3. Απορροφήσεις διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων ναρινγίνης σε αιθανόλη

| C (mg/mL) | Abs (283.8 nm) |
|-----------|----------------|
| 0.020 | 0.995552 |
| 0.016 | 0.818564 |
| 0.012 | 0.622330 |
| 0.008 | 0.446160 |
| 0.004 | 0.243657 |



Διάγραμμα 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της ναρινγίνης σε αιθανόλη

Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων χαράζεται η βέλτιστη ευθεία στα πειραματικά δεδομένα, όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, η οποία και παρουσιάζει συντελεστή γραμμικής συσχέτισης των δύο μεγεθών κοντά στη μονάδα. Η εξίσωση της συσχέτισης της συγκέντρωσης των διαλυμάτων της ναρινγίνης σε αιθανόλη με την απορρόφηση στα 283.8 nm που εξάγεται είναι η εξής:

$$\text{Συγκέντρωση ναρινγίνης (mg/mL)} = \frac{\text{Απορρόφηση} - 0.0624}{46.905} \quad (2)$$

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα παραγόμενα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο προηγείται η λυοφιλοποίηση (freeze drying) της διασποράς τους, αλλά και της διασποράς των αντίστοιχων κενών παραγόμενων νανοσυστημάτων, ώστε να παρθούν σε ξηρή μορφή.

2.5.2.1 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού με έμμεσο τρόπο

Για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα παραγόμενα νανοσωσμήματα αλγινικού – χιτοζάνης με έμμεσο τρόπο τα λυοφιλοποιημένα κενά νανοσωματίδια και τα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια με εγκλωβισμένη τη ναρινγίνη επαναδιασπείρονται σε 20 mL απεσταγμένου νερού εντός ενός tube, το οποίο και οδηγείται για ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex και έπειτα σε λουτρό υπερήχων, έως ότου δημιουργηθεί μία όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφη διασπορά των νανοσωματιδίων. Οι δημιουργούμενες αυτές διασπορές των νανοσωματιδίων φυγοκεντρώνονται σε υπερφυγόκεντρο στα 28000 rpm (στροφές το λεπτό) και στους 4°C για 40 min. Κατά τη φυγοκέντρησή τους τα νανοσωματίδια συσσωματώνονται και καθιζάνουν στο πάτο του tube, ενώ το υπερκείμενο υγρό αποτελείται από μία υδατική φάση και τη ναρινγίνη που δεν έχει εγκλωβιστεί (στην περίπτωση των νανοσωματιδίων με φορτωμένη ναρινγίνη). Το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται και φιλτράρεται με χρήση syringe filters πορώδους 0.22 μm, προκειμένου να φωτομετρηθεί, ενώ τα νανοσωματίδια που έχουν καθιζάνει επαναδιασπείρονται σε 20 mL απεσταγμένου νερού και οδηγούνται ξανά για λυοφιλοποίηση, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω χαρακτηρισμούς.

Ακολουθεί η φωτομέτρηση των υπερκείμενων υγρών στο φασματοφωτόμετρο UV – Vis στο εύρος των 400 nm – 200 nm για την ποσοτικοποίηση της μη εγκλωβισμένης ναρινγίνης. Τα προκύπτοντα φάσματα, όμως, δε δίνουν ξεκάθαρη μέγιστη απορρόφηση στο μήκος κύματος που απορροφά η ναρινγίνη (283.8 nm). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε παραπλήσια μήκη κύματος απορροφά και το διάλυμα του NADES Bet:LA (1:2) και ειδικότερα η βεταΐνη. Για την επίλυση του προβλήματος αυτού καταστρώνεται αρχικά baseline στο όργανο χρησιμοποιώντας το υπερκείμενο υγρό από τη φυγοκέντρωση των κενών νανοσωματιδίων και έπειτα ακολουθεί η φωτομέτρηση των υπερκείμενων υγρών από τη φυγοκέντρωση των νανοσωματιδίων με φορτωμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη. Στην περίπτωση ανάγκης αραίωσης των δειγμάτων των υπερκείμενων αυτών υγρών η αραίωση πραγματοποιείται με τα υπερκείμενα υγρά από τα κενά νανοσωματίδια, έτσι ώστε να «διαγράφεται» η απορρόφηση της βεταΐνης. Από τις προκύπτουσες απορροφήσεις των δειγμάτων των υπερκείμενων υγρών και τη σχέση (2) της καμπύλης αναφοράς της ναρινγίνης ποσοτικοποιείται η μάζα της μη εγκλωβισμένης ναρινγίνης. Στη συνέχεια και με χρήση της παρακάτω εξίσωσης υπολογίζεται η απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα νανοσωματίδια αλγινικού – χιτοζάνης:

$$EE\% = \left(1 - \frac{\text{Μάζα μη εγκλωβισμένης ένωσης}}{\text{Αρχική μάζα ένωσης προς εγκλωβισμό}} \right) \cdot 100\% \quad (3)$$

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Η χρήση του λουτρού υπερήχων για τις διασπορές των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων σε νερό πρέπει να γίνεται με προσοχή για λίγο χρονικό διάστημα και με διαλείμματα, έτσι ώστε να αποφευχθεί η υποβάθμιση της χιτοζάνης από την αύξηση της θερμοκρασίας και η αποδέσμευση της ναρινγίνης από αυτά.
- Προκειμένου να είναι αξιόπιστες οι μετρήσεις των απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο UV – Vis οι προκύπτουσες τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων των υπερκείμενων υγρών πρέπει να είναι μεγαλύτερες από 0.1 και μικρότερες από 0.9 ($0.1 < Abs < 0.9$). Για να ικανοποιείται αυτός ο περιορισμός, και με χρήση των κυψελίδων πλήρωσης έως και 1.4 mL φωτομετρούνται συνήθως 60 μL από το υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος αραιωμένα με 1240 μL από το υπερκείμενο υγρό των κενών νανοσυστημάτων, ενώ όπου απαιτείται γίνονται διαφοροποιήσεις στις αναλογίες αυτές.
- Η συγκέντρωση της ναρινγίνης που δεν εγκλωβίστηκε, όπως προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς της και την απορρόφηση του δείγματος του υπερκείμενου υγρού, μετατρέπεται σε μάζα μέσω του νόμου αραιώσης του Ostwald ($C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$) με βάση την αραιώση του υπερκείμενου υγρού που έχει πραγματοποιηθεί πολλαπλασιάζοντας την προκύπτουσα συγκέντρωση από το νόμο του Ostwald με το συνολικό όγκο του υπερκείμενου υγρού, ο οποίος και ισούται με τα 20 mL του νερού που πραγματοποιήθηκε και η επαναδιασπορά των νανοσωματιδίων.
- Η σχέση (3) για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλωβισμού προκύπτει από τη σχέση (1) αναλογίζοντας πως η μάζα της εγκλωβισμένης ένωσης προκύπτει αν από την αρχική μάζα της ένωσης προς εγκλωβισμό αφαιρεθεί η μάζα της ένωσης που δεν εγκλωβίστηκε.
- Δεν πραγματοποιούνται περαιτέρω φυγοκεντρήσεις των επαναδιασπαρμένων νανοσωματιδίων για ξέπλυμα μεγαλύτερης ποσότητας μη εγκλωβισμένης ναρινγίνης, καθώς έπειτα από δοκιμές διαπιστώνεται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα της μη εγκλωβισμένης ναρινγίνης ξεπλένεται κατά την πρώτη φυγοκέντρωση.

2.5.2.2 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού με άμεσο τρόπο

Για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα παραγόμενα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης με άμεσο τρόπο αρχικά ζυγίζεται η συνολική μάζα των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων. Έπειτα, από τα λυοφιλοποιημένα αυτά νανοσωματίδια λαμβάνονται τρία δείγματα των 50 mg από τρεις διαφορετικές περιοχές και τοποθετούνται σε τρία διαφορετικά vial των 25 mL. Σε καθένα από τα vial προστίθενται 3 mL απεσταγμένου νερού και 1 mL αιθανόλης και έπειτα το περιεχόμενο των vial οδηγείται για ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex, έως ότου δημιουργηθεί μία ομοιόμορφη διασπορά των νανοσωματιδίων στο μίγμα

νερού - αιθανόλης. Ύστερα, τα vial τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων, όπου και παραμένουν μέχρι την ολοκληρωτική λύση των νανοσωματιδίων και την αποδέσμευση της εγκλωβισμένης σε αυτά ναρινγίνης. Έπειτα, τα δείγματα, τα οποία αποτελούνται από την αποδεσμευμένη ναρινγίνη διαλυμένη σε ένα μίγμα νερού – αιθανόλης, φιλτράρονται με χρήση syringe filters πορώδους $0.22 \mu m$.

Ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων αυτών στο φασματοφωτόμετρο UV – Vis και σε εύρος μεταξύ των $400 nm - 200 nm$ για την ποσοτικοποίηση της αποδεσμευμένης ναρινγίνης. Καταστρώνεται αρχικά baseline στο όργανο χρησιμοποιώντας ένα μίγμα νερού – αιθανόλης σε αναλογία όγκων 4:1 και έπειτα ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων. Στην περίπτωση ανάγκης αραίωσης των δειγμάτων η αραίωση πραγματοποιείται με το μίγμα αυτό νερού – αιθανόλης, έτσι ώστε να «διαγράφεται» η απορρόφησή του. Από τις προκύπτουσες απορροφήσεις των δειγμάτων και τη σχέση (2) της καμπύλης αναφοράς της ναρινγίνης ποσοτικοποιείται η μάζα της αποδεσμευμένης ναρινγίνης. Στη συνέχεια και με χρήση της εξίσωσης (1) υπολογίζεται η απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα νανοσωματίδια αλγινικού – χιτοζάνης.

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Μελετώνται τρία δείγματα από τρεις διαφορετικές περιοχές των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων, προκειμένου να εξεταστεί και η ομοιογένεια του ενός batch νανοσωματιδίων.
- Η χρήση της αιθανόλης πέρα του νερού ως μέσου διασποράς των νανοσωματιδίων αποσκοπεί στη διάλυση της αποδεσμευμένης ναρινγίνης.
- Όπως αναφέρεται και στον υπολογισμό της απόδοσης εγκλωβισμού με άμεσο τρόπο, προκειμένου να είναι αξιόπιστες οι μετρήσεις των απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο UV – Vis οι προκύπτουσες τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων πρέπει να είναι μεγαλύτερες από 0.1 και μικρότερες από 0.9 ($0.1 < Abs < 0.9$). Για να ικανοποιείται αυτός ο περιορισμός, και με χρήση των κυψελίδων πλήρωσης έως και $1.4 mL$ φωτομετρούνται συνήθως $100 \mu L$ από το δείγμα αραιωμένα με $600 \mu L$ από το μίγμα νερού – αιθανόλης, ενώ όπου απαιτείται γίνονται διαφοροποιήσεις στις αναλογίες αυτές.
- Η συγκέντρωση της ναρινγίνης που αποδεσμεύτηκε, όπως προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς της και την απορρόφηση του δείγματος, μετατρέπεται σε μάζα μέσω του νόμου αραίωσης του Ostwald ($C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$) με βάση την αραίωση του δείγματος που έχει πραγματοποιηθεί πολλαπλασιάζοντας την προκύπτουσα συγκέντρωση από το νόμο του Ostwald με τον συνολικό όγκο του μέσου διασποράς των νανοσωματιδίων, ο οποίος και ισούται με τα $5 mL$ του μίγματος νερού – αιθανόλης. Τέλος, η μάζα αυτή ανάγεται στη συνολική μάζα των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων του ενός batch.
- Η σχέση (1) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλωβισμού, καθώς η μάζα της εγκλωβισμένης ένωσης αντιστοιχεί στη μάζα της ένωσης που αποδεσμεύτηκε κατά τη λύση των νανοσωματιδίων. Τελικά, λαμβάνεται ο

μέσος όρος των υπολογισμένων αποδόσεων για τα τρία δείγματα ναοσωματιδίων από το batch.

- ο Η αποδεσμευμένη ναρινγίνη διαλυμένη στο μίγμα νερού – αιθανόλης αποθηκεύεται στη ψύξη, με σκοπό τη χρήση της στη μελέτη της αντιοξειδωτικής της δράσης.

2.5.3 Μελέτη δομής μέσω φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier και αποσβένουσα ολική ανάκλαση

Το φάσμα απορρόφησης στο υπέρυθρο αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει κυρίως στην ποιοτική ανάλυση και ταυτοποίηση ενώσεων. Συγκεκριμένα, οι απορροφήσεις των δονήσεων σκελετού (skeletal vibrations) ενώσεων εμφανίζονται στη χαμηλότερη περιοχή του μέσου υπέρυθρου φάσματος μεταξύ $1500\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$, επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από όλη τη δομή του μορίου και οφείλονται συνήθως στις δονήσεις τάσης των ομάδων C – C, C – O και C – N. Αυτή η περιοχή του φάσματος είναι μοναδική για κάθε ένωση, χαρακτηρίζει το μόριο σαν σύνολο και γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο ονομάζεται περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος (fingerprint region). Οι δονήσεις των χαρακτηριστικών ή δραστικών ομάδων (characteristic or functional group vibrations) ενός μορίου συνήθως εμφανίζονται στην ίδια περιοχή του φάσματος με μικρές μετατοπίσεις μεταξύ $4000\text{ cm}^{-1} - 1400\text{ cm}^{-1}$ και οφείλονται στις δονήσεις τάσης των ομάδων O – H, N – H και C – H των αλειφατικών ομάδων.

Η λειτουργία της τεχνικής ATR βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης (total internal reflection), το οποίο συμβαίνει όταν μία δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας (με υψηλότερο δείκτη διάθλασης, n_1) σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας (με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, n_2). Στα ATR εξαρτήματα χρησιμοποιείται ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης ένας διαφανής κρύσταλλος στην υπέρυθρη ακτινοβολία με υψηλό δείκτη διάθλασης, πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο υφίσταται πολλαπλές ολικές ανακλάσεις στον κρύσταλλο, με αποτέλεσμα να διέρχεται από το δείγμα πολλές φορές, από το οποίο και απορροφάται. Η ATR/FT – IR φασματοσκοπία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μη καταστρεπτικές και πιο ευέλικτες μεθόδους, η οποία παρέχει φάσματα πολύ υψηλής ποιότητας για μία πολύ μεγάλη ποικιλία υλικών. Το βασικό πλεονέκτημα της ATR-FTIR μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαιτεί οποιαδήποτε επεξεργασία του δείγματος ή ομογενοποίησή του για το σχηματισμό δισκίου με σκόνη *KBr*, παρά μόνο μία απειροελάχιστη ποσότητα δείγματος που τοποθετείται σε επαφή με τον κρύσταλλο ως έχει.⁸⁰

Τα παραγόμενα κενά ναοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης και τα αντίστοιχα ναοσυστήματα με εγκλωβισμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη μελετώνται δομικά με φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier και αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR/FT – IR). Για τον σκοπό αυτό λαμβάνονται πέρα από τα

φάσματά τους και τα φάσματα των νανοφορέων, του αλγινικού και της χιτοζάνης, της εγκλωβισμένης δραστικής ένωσης, δηλαδή της ναρινγίνης, καθώς και του χρησιμοποιούμενου NADES Bet:LA (1:2) και των συστατικών του, δηλαδή της βεταΐνης και του γαλακτικού οξέος. Τα φάσματα λαμβάνονται στην περιοχή του μέσου υπερύθρου μεταξύ $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$.

2.5.4 Μελέτη αποδέσμευσης *in vitro*

Για τη μελέτη της αποδέσμευσης της ναρινγίνης από τα παραγόμενα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης *in vitro* χρησιμοποιείται η μέθοδος της μεμβράνης διάλυσης – διάχυσης. Προσομοιώνονται οι συνθήκες *pH* και θερμοκρασίας του δέρματος, στοχεύοντας σε μελέτη της αποδέσμευσης της ναρινγίνης σε μία πιθανή επιδερμική εφαρμογή των νανοσυστημάτων. Έτσι, επιλέγεται ως εξωτερικό περιβάλλον ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με τιμή *pH* ίση με 5.5 και θερμοκρασία όπως αυτή του δέρματος, δηλαδή $T = 32^{\circ}\text{C}$.

Η πειραματική διαδικασία της μελέτης αποδέσμευσης της ναρινγίνης από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης περιγράφεται συνοπτικά παρακάτω:

- I. Σε ποτήρι ζέσεως των 150 mL διαλύονται 1.74 g όξινου φωσφορικού καλίου K_2HPO_4 σε 100 mL απεσταγμένου νερού, οπότε και παρασκευάζεται το διάλυμα 1 ($\Delta 1$).
- II. Σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL διαλύονται 2.07 g δισόξινου φωσφορικού καλίου KH_2PO_4 σε 150 mL απεσταγμένου νερού, οπότε και παρασκευάζεται το διάλυμα 2 ($\Delta 2$).
- III. Στο $\Delta 2$ προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από το $\Delta 1$ προς σχηματισμό ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με *pH* 5.5.
- V. Σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL προστίθενται 40 mL από το παρασκευασθέν ρυθμιστικό διάλυμα και τοποθετείται σε αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση και θερμαινόμενη εστία, όπου και αφήνεται υπό ήπια ανάδευση και ήπια θέρμανση στους 32°C .
- VI. Ένα batch νανοσωματιδίων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη, του οποίου έχει προηγηθεί ο προσδιορισμός της απόδοσης εγκλωβισμού με έμμεσο τρόπο, επαναδιασπείρεται σε 10 mL απεσταγμένο νερό εντός ενός tube. Το tube οδηγείται για ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex και έπειτα σε λουτρό υπερήχων, έως ότου δημιουργηθεί μία όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφη διασπορά των νανοσωματιδίων.
- VII. Η διασπορά αυτή των νανοσυστημάτων μεταφέρεται στη μεμβράνη διάλυσης – διάχυσης, η οποία έπειτα τοποθετείται στο ποτήρι ζέσεως με τα 40 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών που βρίσκεται υπό ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 32°C .
- VIII. Πραγματοποιούνται δειγματοληψίες από το διάλυμα εντός του ποτηριού ζέσεως ανά συγκεκριμένα τακτά χρονικά διαστήματα την πρώτη ημέρα

(20 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h) και ανά πιο αραιά χρονικά διαστήματα για τις επόμενες τέσσερις ημέρες. Συγκεκριμένα, συλλέγεται 1 mL από το διάλυμα εντός του ποτηριού ζέσεως, το οποίο και μεταφέρεται σε errendorf, με την ταυτόχρονη προσθήκη 1 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε αυτό, ώστε ο όγκος εντός του ποτηριού ζέσεως να παραμένει σταθερός στα 40 mL. Γι' αυτό το λόγο, τοποθετείται και parafilm για τη σφράγιση του από πάνω, με στόχο την αποφυγή εξάτμισης του περιεχόμενου διαλύματος.

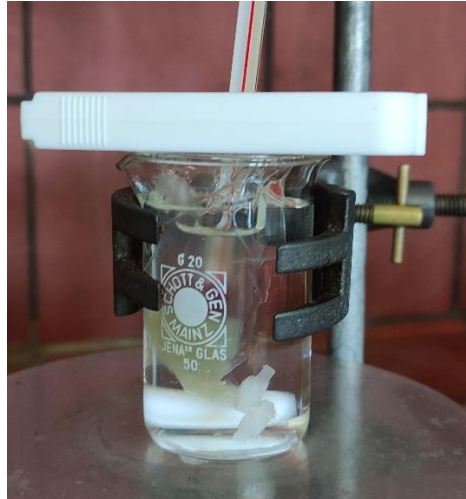
- IX. Τα δείγματα των δειγματοληψιών φιλτράρονται με χρήση syringe filters πορώδους 0.22 μm .
- X. Ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων των δειγματοληψιών στο φασματοφωτόμετρο UV – Vis και σε εύρος μεταξύ των 400 nm – 200 nm για την ποσοτικοποίηση της αποδεσμευμένης ναρινγίνης. Καταστρώνεται αρχικά baseline στο όργανο χρησιμοποιώντας το παρασκευασθέν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και έπειτα ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων. Στην περίπτωση ανάγκης αραιώσης των δειγμάτων η αραιώση πραγματοποιείται επίσης με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, έτσι ώστε να «διαγράφεται» η απορρόφησή του. Από τις προκύπτουσες απορροφήσεις των δειγμάτων και για γνωστή ποσότητα εγκλωβισμένης ένωσης από τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλωβισμού υπολογίζεται το ποσοστό αποδέσμευσης της ναρινγίνης από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης (Release%) για κάθε χρονικό διάστημα δειγματοληψίας.

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Η χρήση του λουτρού υπερήχων για τις διασπορές των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων σε νερό πρέπει να γίνεται με προσοχή για λίγο χρονικό διάστημα και με διαλείμματα, έτσι ώστε να αποφευχθεί η υποβάθμιση της χιτοζάνης από την αύξηση της θερμοκρασίας και η πρόωρη αποδέσμευση της ναρινγίνης από αυτά.
- Η συγκέντρωση της ναρινγίνης που αποδεσμεύτηκε, όπως προκύπτει από την καμπύλη αναφορά της και την απορρόφηση του δείγματος, μετατρέπεται σε μάζα μέσω του νόμου αραιώσης του Ostwald ($C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$) με βάση την αραιώση του δείγματος που έχει πραγματοποιηθεί πολλαπλασιάζοντας την προκύπτουσα συγκέντρωση από το νόμο του Ostwald με τον συνολικό όγκο της δειγματοληψίας (1 mL). Τέλος, η μάζα αυτή ανάγεται στη συνολική μάζα που αποδεσμεύτηκε εντός του ρυθμιστικού διαλύματος πολλαπλασιάζοντάς την με το συνολικό του όγκο (40 mL), ενώ σε αυτή προστίθεται και η μάζα της αποδεσμευμένης ναρινγίνης στον όγκο των προηγούμενων δειγματοληψιών (cumulative release).

- ο Τελικά, μέσω της παρακάτω σχέσης υπολογίζεται το ποσοστό αποδέσμευσης της ναρινγίνης από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης (Release%) για κάθε χρονικό διάστημα δειγματοληψίας:

$$Release\% = \left(\frac{Μάζα \acute{\alpha}νωσης που αποδεσμεύτηκε}{Αρχική μάζα εγκλωβισμένης \acute{\alpha}νωσης} \right) \cdot 100\% \quad (4)$$



Εικόνα 23. Μελέτη αποδέσμευσης *in vitro* της ναρινγίνης από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης με τη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης – διάχυσης

2.5.5 Αξιολόγηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Η αποδεσμευμένη ναρινγίνη από τη λύση των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης αξιολογείται για την ικανότητά της να αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος, η οποία και επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών 2,2' – αζωδισ – (2 – αμιδινοπροπάνο) – διϋδροχλωρίδιο (AAPH).

Η πειραματική διαδικασία για τον έλεγχο της ικανότητας της αποδεσμευμένης ναρινγίνης να αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση μέσω φασματοφωτομετρίας UV – Vis περιγράφεται συνοπτικά παρακάτω:

- I. Αρχικά, καταστρώνεται baseline, με στόχο την αφαίρεση των απορροφήσεων των διαφόρων χρησιμοποιούμενων buffer από τις επόμενες μετρήσεις. Έτσι, στην κυψελίδα του φασματόμετρου πλήρωσης 1.4 mL εισάγονται:
 - 14 μ L ρυθμιστικού διαλύματος βορικού οξέος – υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης 50 mM και pH 9 (blank διάλυμα)
 - 1302 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με pH 7.4
 - 14 μ L του διαλύτη της αποδεσμευμένης ναρινγίνης, εν προκειμένω μίγμα νερού – αιθανόλης σε αναλογία όγκου 4:1
 - 70 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με pH 7.4

- II. Έπειτα, μετράται η απορρόφηση του AAPH στα 234 nm για χρόνο $t = 0$ και $t = 1\text{ min}$, ώστε να αφαιρεθεί από τις επόμενες μετρήσεις. Η κυψελίδα του οργάνου πληρώνεται με:
- $14\ \mu\text{L}$ ρυθμιστικού διαλύματος βορικού οξέος – υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης 50 mM και $\text{pH}\ 9$ (blank διάλυμα)
 - $1302\ \mu\text{L}$ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με $\text{pH}\ 7.4$
 - $14\ \mu\text{L}$ του διαλύτη της αποδεσμευμένης ναρινγίνης, εν προκειμένω μίγμα νερού – αιθανόλης σε αναλογία όγκου 4:1
 - $70\ \mu\text{L}$ διαλύματος AAPH σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με $\text{pH}\ 7.4$
- III. Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση του control δείγματος στα 234 nm για χρόνο $t = 0$ και $t = 1\text{ min}$, δηλαδή του δείγματος χωρίς την παρουσία πιθανού αντιοξειδωτικού. Η κυψελίδα του οργάνου πληρώνεται με:
- $14\ \mu\text{L}$ διαλύματος λινελαϊκού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος – υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης 50 mM και $\text{pH}\ 9$
 - $1302\ \mu\text{L}$ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με $\text{pH}\ 7.4$
 - $14\ \mu\text{L}$ του διαλύτη της αποδεσμευμένης ναρινγίνης, εν προκειμένω μίγμα νερού – αιθανόλης σε αναλογία όγκου 4:1
 - $70\ \mu\text{L}$ διαλύματος AAPH σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με $\text{pH}\ 7.4$
- IV. Τέλος, μετράται η απορρόφηση του δείγματος, δηλαδή με την παρουσία πιθανού αντιοξειδωτικού (αποδεσμευμένη ναρινγίνη), στα 234 nm για χρόνο $t = 0$ και $t = 1\text{ min}$. Η κυψελίδα του οργάνου πληρώνεται με:
- $14\ \mu\text{L}$ διαλύματος λινελαϊκού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος – υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης 50 mM και $\text{pH}\ 9$
 - $1302\ \mu\text{L}$ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με $\text{pH}\ 7.4$
 - $14\ \mu\text{L}$ της αποδεσμευμένης ναρινγίνης
 - $70\ \mu\text{L}$ διαλύματος AAPH σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με $\text{pH}\ 7.4$

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιείται στα 234 nm , καθώς σε αυτό το μήκος κύματος απορροφούν τα σχηματιζόμενα υπεροξειδία από τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών τοποθετείται πριν από κάθε μέτρηση σε έναν incubator shaker με ρυθμισμένη σταθερή θερμοκρασία στους 37°C , προκειμένου να παραμένει η θερμοκρασία του σταθερή στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος.
- Για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) λόγω της δράσης της αποδεσμευμένης ναρινγίνης αρχικά αφαιρείται η απορρόφηση του AAPH από την απορρόφηση τόσο του control δείγματος όσο και του δείγματος με την αποδεσμευμένη ναρινγίνη για κάθε χρονική στιγμή ξεχωριστά. Στη συνέχεια, υπολογίζονται οι μέσοι όροι των απορροφήσεων των δύο χρονικών στιγμών για το control δείγμα ($\Delta A_{control}$) και για το δείγμα με την

αποδεσμευμένη ναρινγίνη ($\Delta A_{released\ naringin}$). Τελικά, η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης υπολογίζεται ως εξής:

$$\%Αναστολής LP = \left(1 - \frac{\Delta A_{released\ naringin}}{\Delta A_{control}}\right) \cdot 100\% \quad (5)$$

- ο Πέρα από τη δράση της αποδεσμευμένης ναρινγίνης εξετάζεται και η δράση της ελεύθερης ναρινγίνης στην ίδια συγκέντρωση που μελετάται και η αποδεσμευμένη, αλλά και ενός πρότυπου αντιοξειδωτικού, το ασκορβικό οξύ (Vitamin C). Επίσης, μελετάται και η δράση του νανοφορέα, δηλαδή των κενών νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης.

2.6 Βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με χρήση πειραματικού σχεδιασμού

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης πραγματοποιείται μέσω πειραματικού σχεδιασμού με τη μέθοδο των αποκριτικών επιφανειών (Response Surface Method, RSM). Ειδικότερα, χρησιμοποιείται το λογισμικό Design – Expert 12 και ο πειραματικός σχεδιασμός Box Behnken.

Οι ανεξάρτητες μεταβλητές που μελετώνται είναι:

1. Η περιεκτικότητα του διαλύματος της χιτοζάνης CS (% w/v)
2. Η περιεκτικότητα του διαλύματος της αλγινικού AL (% w/v)
3. Η περιεκτικότητα του διαλύματος του NADES Bet:LA (1:2) (% v/v)

Οι μελετώμενες εξαρτημένες μεταβλητές («αποκρίσεις») αφορούν:

1. Το μέγεθος (size) των νανοσωματιδίων (nm)
2. Την κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων (ή δείκτης πολυδιασποράς, PDI) (–)
3. Το ζ – δυναμικό (z – potential) των νανοσωματιδίων (mV)
4. Την απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης EE% (–)

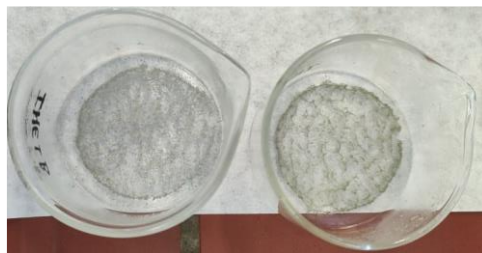
Έτσι, πρόκειται για έναν πειραματικό σχεδιασμό Box Behnken 3 × 4, που στόχο έχει την ελαχιστοποίηση του μεγέθους των παραγόμενων νανοσυστημάτων με αποδεκτά μεγέθη κάτω των 500 nm και του δείκτη πολυδιασποράς (PDI), ώστε να είναι πιο κοντά στο 0.1., τη μεγιστοποίηση της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα νανοσυστήματα και τη σύνθεση σταθερών νανοσυστημάτων που το ζ – δυναμικό τους να προσεγγίζει τα +30 mV.

Παρατήρηση/σχόλιο:

Σημειώνεται πως η απόκριση της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα νανοσυστήματα αφορά τον υπολογισμό της με έμμεσο τρόπο.

2.6.1 Προκαταρκτικά πειράματα – Επιλογή ορίων των ανεξάρτητων μεταβλητών

Για την εύρεση των άνω και κάτω ορίων των ανεξάρτητων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού αρχικά πραγματοποιούνται προκαταρκτικά πειράματα χρησιμοποιώντας τιμές για τις μεταβλητές αυτές που προτείνονται από τη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, επιλέγεται η περιεκτικότητα του διαλύματος του αλγινικού νατρίου να είναι 0.05% w/v, του διαλύματος της χιτοζάνης να είναι 0.1% w/v και του διαλύματος του NADES να είναι 2% v/v.⁷⁷ Τα παραγόμενα νανοσυστήματα εμφάνισαν μεγάλο μέγεθος κοντά στα 800 nm με ένα χαμηλό θετικό ζ – δυναμικό περίπου στα +4 mV, το οποίο αν και αποδεικνύει την επιτυχή πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση των δύο πολυσακχαριτών με την επικάλυψη του αλγινικού φορέα με ένα στρώμα χιτοζάνης, εντούτοις αποδεικνύει και ότι τα νανοσυστήματα δεν είναι σταθερά. Αυτό φάνηκε και κατά την παρατήρησή τους μετά το freeze – drying αυτών, όπου ήταν λιπαρά και όχι ξηρά, ενώ είχαν γκριζωπό χρώμα που πιθανόν οφείλεται στο αλγινικό και καθόλου υποκίτρινο χρώμα που θα οφειλόταν στη επιτυχή επικάλυψή τους με χιτοζάνη.



Εικόνα 24. Λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη ναρινγίνη από τα προκαταρκτικά πειράματα

Έτσι, αποφασίζεται η αύξηση των ορίων των τιμών των ανεξάρτητων μεταβλητών συγκριτικά με αυτών της βιβλιογραφίας στις τιμές που διαφαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4. Όρια των ανεξάρτητων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού

| Factor | Name | Units | Minimum | Maximum | Coded Low | Coded High | Mean | Std. Dev. |
|--------|-------|-------|---------|---------|-----------|------------|--------|-----------|
| A | CS | % w/v | 0.3000 | 0.6000 | -1 ↔ 0.30 | +1 ↔ 0.60 | 0.4500 | 0.1134 |
| B | AL | % w/v | 0.2000 | 0.5000 | -1 ↔ 0.20 | +1 ↔ 0.50 | 0.3500 | 0.1134 |
| C | NADES | % v/v | 2.00 | 6.00 | -1 ↔ 2.00 | +1 ↔ 6.00 | 4.00 | 1.51 |

2.6.2 Πειράματα πειραματικού σχεδιασμού

Με τον καθορισμό των τιμών των άνω και κάτω ορίων των ανεξάρτητων μεταβλητών το χρησιμοποιούμενο λογισμικό πρόγραμμα προτείνει την πραγματοποίηση ορισμένων πειραμάτων για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας

εγκλωβισμού. Ο αριθμός των πειραμάτων N που απαιτούνται για την ανάπτυξη του σχεδιασμού αυτού δίνεται από τη σχέση:

$$N = 2 \cdot k \cdot (k - 1) + C_0$$

όπου k ο αριθμός των ανεξάρτητων μεταβλητών και C_0 το πλήθος των επαναλήψεων του κεντρικού σημείου.

Έτσι, για τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές και τρεις επαναλήψεις του κεντρικού σημείου προκύπτουν δεκαπέντε προτεινόμενα πειράματα, οι μεταβλητές των οποίων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5. Προτεινόμενα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού

| Run | Factor 1 A: CS % w/v | Factor 2 B: AL % w/v | Factor 3 C: NADES % v/v |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| 1 | 0.30 | 0.35 | 2 |
| 2 | 0.60 | 0.35 | 6 |
| 3 | 0.30 | 0.35 | 6 |
| 4 | 0.45 | 0.20 | 6 |
| 5 | 0.60 | 0.50 | 4 |
| 6 | 0.30 | 0.20 | 4 |
| 7 | 0.45 | 0.50 | 6 |
| 8 | 0.60 | 0.20 | 4 |
| 9 | 0.60 | 0.35 | 2 |
| 10 | 0.45 | 0.35 | 4 |
| 11 | 0.45 | 0.35 | 4 |
| 12 | 0.30 | 0.50 | 4 |
| 13 | 0.45 | 0.20 | 2 |
| 14 | 0.45 | 0.50 | 2 |
| 15 | 0.45 | 0.35 | 4 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

3.1.1 Αποτελέσματα πειραμάτων πειραματικού σχεδιασμού

Τα αποτελέσματα με τις τιμές των αποκρίσεων για τα εκτελεσμένα δεκαπέντε πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6. Οι τιμές των αποκρίσεων για τα δεκαπέντε εκτελεσμένα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού

| Run | Factor 1 A: CS (% w/v) | Factor 2 B: AL (% w/v) | Factor 3 C: NADES (% v/v) | Response 1 SIZE (nm) | Response 2 PDI (-) | Response 3 ZETA POTENTIAL (mV) | Response 4 EE% (-) |
|-----|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 0.30 | 0.35 | 2 | 1959 | 0.370 | -0.92 | 21 |
| 2 | 0.60 | 0.35 | 6 | 674.8 | 0.529 | +20.3 | 59 |
| 3 | 0.30 | 0.35 | 6 | 454.9 | 0.447 | +5.07 | 55 |
| 4 | 0.45 | 0.20 | 6 | 314.3 | 0.489 | +28.0 | 90 |
| 5 | 0.60 | 0.50 | 4 | 518.0 | 0.574 | +27.3 | 93 |
| 6 | 0.30 | 0.20 | 4 | 720.6 | 0.486 | +10.8 | 94 |
| 7 | 0.45 | 0.50 | 6 | 555.6 | 0.589 | +25.6 | 94 |
| 8 | 0.60 | 0.20 | 4 | 513.1 | 0.450 | +27.2 | 82 |
| 9 | 0.60 | 0.35 | 2 | 771.7 | 0.715 | +5.25 | 33 |
| 10 | 0.45 | 0.35 | 4 | 329.2 | 0.464 | +23.5 | 85 |
| 11 | 0.45 | 0.35 | 4 | 274.7 | 0.449 | +24.1 | 91 |
| 12 | 0.30 | 0.50 | 4 | 341.2 | 0.478 | +21.0 | 89 |
| 13 | 0.45 | 0.20 | 2 | 440.4 | 0.484 | +4.92 | 55 |
| 14 | 0.45 | 0.50 | 2 | 2913 | 0.030 | -7.13 | 20 |
| 15 | 0.45 | 0.35 | 4 | 357.7 | 0.439 | +14.9 | 73 |

Παρατήρηση/σχόλιο:

Ενδεικτικά διαγράμματα κατανομής του μεγέθους και ζ – δυναμικού των παραγόμενων νανοσυστημάτων από τα δεκαπέντε πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού παρατίθενται στο παράρτημα.

Όπως φαίνεται και από τις τιμές των αποκρίσεων στον παραπάνω πίνακα, η παρασκευή των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη ναρινγίνη κρίνεται επιτυχής, καθώς αυτά παρουσιάζουν μέγεθος στη νανοκλίμακα με μέση υδροδυναμική διάμετρο $742.5 \pm 111.6 \text{ nm}$ και μέσο δείκτη πολυδιασποράς ίσο με την τιμή 0.471 ± 0.076 , ο οποίος και θεωρείται αποδεκτός. Σίγουρα η τιμή του PDI δεν είναι η βέλτιστη και αποδίδεται στην ύπαρξη δύο οικογενειών νανοσωματιδίων με διαφορετικό μέγεθος, όπως διαπιστώνεται και στα επισυναπτόμενα στο παράρτημα

διαγράμματα της κατανομής του μεγέθους. Η πρώτη οικογένεια που αποτελεί και το μεγαλύτερο ποσοστό της κατανομής βρίσκεται στη νανοκλίμακα, ενώ εμφανίζεται και μία πιο μικρή οικογένεια με μεγέθη κοντά στα μερικά χιλιάδες νανόμετρα, η οποία και αποδίδεται σε συσσωματωμένα νανοσωματίδια. Ακόμη, το προκύπτον μέσο ζ – δυναμικό των νανοσυστημάτων είναι $+14.9 \pm 1.2 \text{ mV}$, το θετικό φορτίο του οποίου αποδεικνύει την επιτυχή πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση μεταξύ των δύο πολυμερών (αλγινικό και χιτοζάνη) και ουσιαστικά την επικάλυψη των νανοσυστημάτων αλγινικού με χιτοζάνη. Μάλιστα, ορισμένα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού οδήγησαν στο σχηματισμό πολύ σταθερών διασπορών νανοσυστημάτων, αφού η τιμή του ζ – δυναμικού τους προσέγγισε το $+30 \text{ mV}$. Όσον αφορά τις προκύπτουσες αποδόσεις εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης, οι τιμές αυτών μπορούν να θεωρηθούν αρκετά υψηλές με τη μέγιστη τιμή τους να είναι ίση με 94% και τη μέση τιμή τους να είναι ίση με 69%.

Ταυτόχρονα, παρατηρείται πως τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού που αφορούν στην περιεκτικότητα του διαλύματος NADES 2% *v/v* δε δίνουν επιθυμητά αποτελέσματα, ειδικά γι' αυτά τα πειράματα, όπου οι περιεκτικότητες των διαλυμάτων του αλγινικού και της χιτοζάνης είναι περίπου ίδιες (Run 1 & Run 14). Τα πειράματα αυτά μάλιστα δεν μπορούν να θεωρηθούν επιτυχημένα, καθώς το αρνητικό ζ – δυναμικό των παραγόμενων νανοσωματιδίων υποδεικνύει τη μη πετυχημένη πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση των δύο πολυσακχαριτών και κατ' επέκταση την αποτυχημένη επικάλυψη με χιτοζάνη. Αυτό διαφαίνεται και στο μεγάλο μέγεθός τους που προσεγγίζει τα λίγα μικρόμετρα, αφού δεν είναι σταθερά με αποτέλεσμα να συσσωματώνονται. Έτσι, αν δε ληφθούν υπόψιν αυτά τα δύο αποτυχημένα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού, το μέσο μέγεθος των παραγόμενων νανοσωματιδίων μειώνεται στα $482.0 \pm 88.0 \text{ nm}$, το μέσο ζ – δυναμικό αυξάνεται στα $17.9 \pm 1.3 \text{ mV}$, όπως και η μέση απόδοση εγκλωβισμού που φτάνει το 76%, ενώ ο μέσος δείκτης πολυδιασποράς παρουσιάζει μία μικρή αύξηση στα $0.507 + 0.068$.



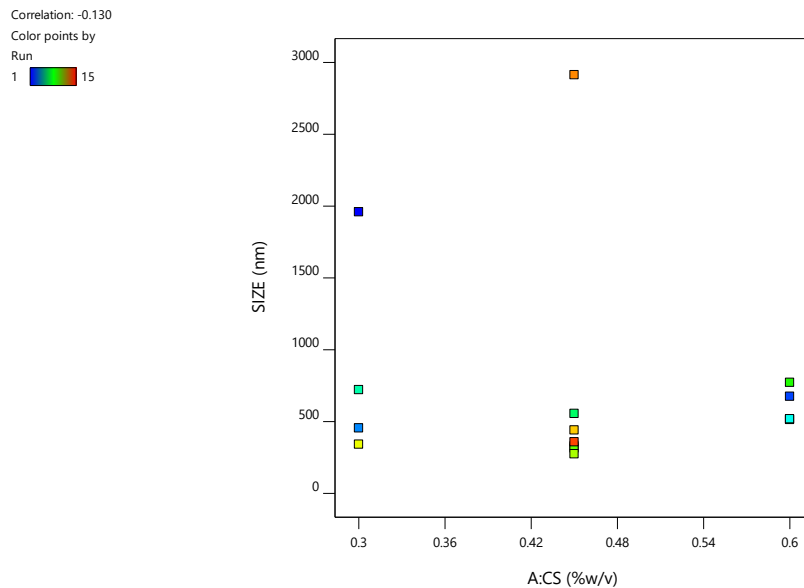
Εικόνα 25. Λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη ναρινγίνη από πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού

3.1.2 Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων

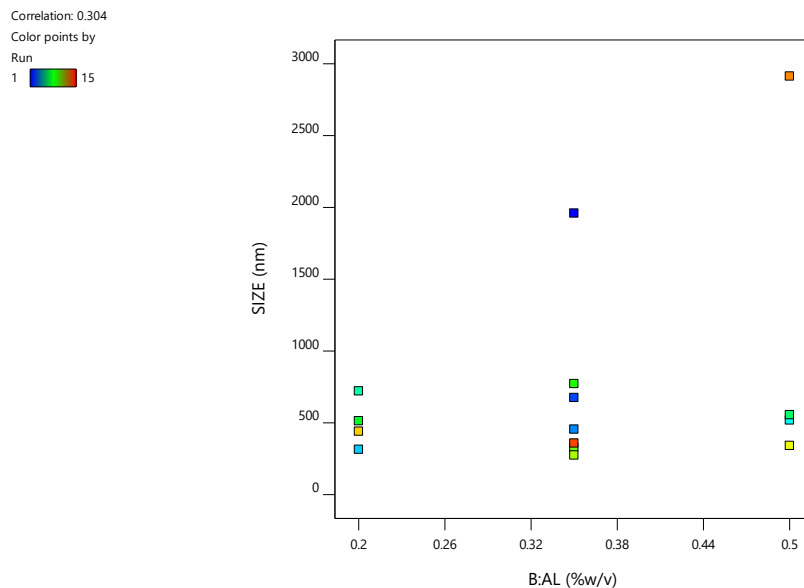
Πραγματοποιείται στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των αποκρίσεων στα δεκαπέντε πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού, με σκοπό την εξαγωγή του μαθηματικού μοντέλου που περιγράφει ικανοποιητικά την κάθε απόκριση.

3.1.2.1 Μέγεθος νανοσυστημάτων

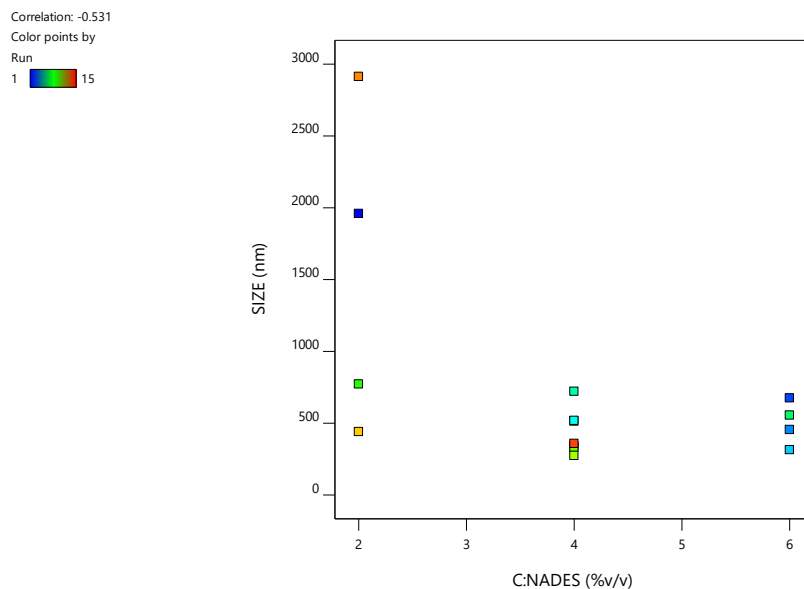
Αρχικά, αναλύεται η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών, δηλαδή οι περιεκτικότητες των διαλυμάτων της χιτοζάνης, του αλγινικού και του NADES, στο μέγεθος των παραγόμενων νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη.



Διάγραμμα 3. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος χιτοζάνης με το μέγεθος των νανοσυστημάτων



Διάγραμμα 4. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος αλγινικού με το μέγεθος των νανοσυστημάτων



Διάγραμμα 5. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NADES με το μέγεθος των νανοσυστημάτων

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται πως για τις υψηλότερες περιεκτικότητες του διαλύματος της χιτοζάνης (0.60% w/v) τα σχηματιζόμενα νανοσυστήματα εμφανίζουν το μικρότερο μέγεθος. Ταυτόχρονα, για τις μικρότερες περιεκτικότητες του διαλύματος του αλγινικού (0.20% w/v) το προκύπτον μέγεθος των νανοσυστημάτων είναι μικρότερο συγκριτικά με τις υψηλότερες περιεκτικότητες αλγινικού. Τέλος, όσον αφορά την περιεκτικότητα του διαλύματος NADES, διαπιστώνεται ότι η μικρότερη περιεκτικότητά του οδηγεί σε παρασκευή

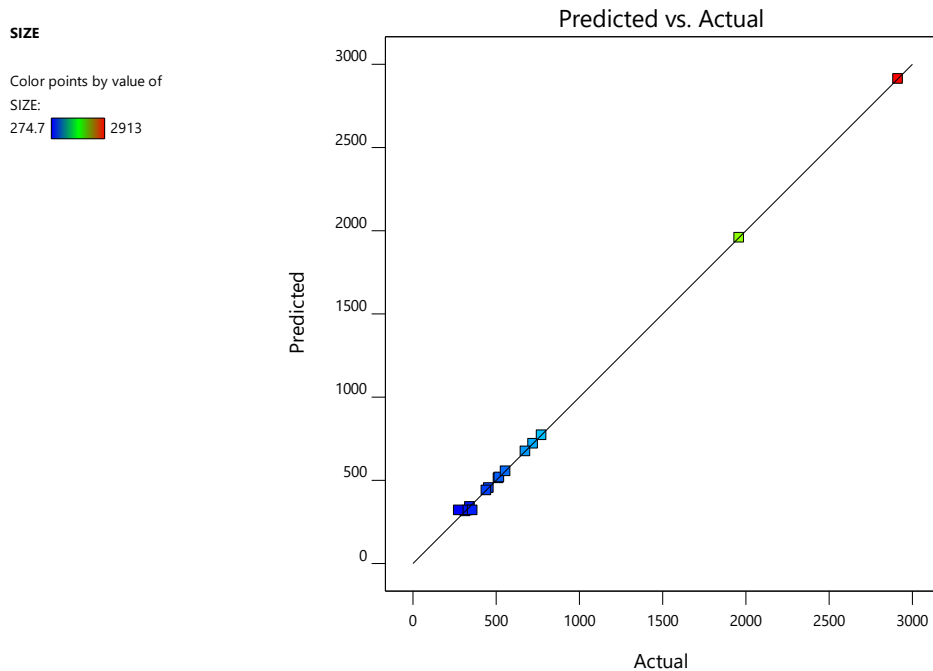
τόσο νανοσυστημάτων με μικρό μέγεθος όσο όμως και νανοσυστημάτων με αυξημένο μέγεθος που προσεγγίζει τα μικρόμετρα. Απεναντίας, η μέση και άνω ακραία τιμή της περιεκτικότητας του οδηγούν σε νανοσυστήματα με επιθυμητό μέγεθος στη νανοκλίμακα.

Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής επιλέγεται το κυβικό μοντέλο (cubic model), η εξίσωση του οποίου περιέχει τους όρους των ανεξάρτητων μεταβλητών, καθώς και πεπλεγμένους όρους αυτών. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA. Από το μοντέλο αυτό δεν αφαιρείται κανένας όρος, καθώς το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό (significant) παρουσιάζοντας τιμή p – value ίση με 0.0029, δηλαδή τιμή μικρότερη από την τιμή 0.05. Η τιμή 0.05 του p – value αποτελεί την κρίσιμη τιμή, κάτω απ’ την οποία το μοντέλο ή ένας όρος του μοντέλου είναι στατιστικά σημαντικός, ενώ πάνω απ’ αυτήν το μοντέλο ή ένα όρος του μοντέλου δεν είναι στατιστικά σημαντικός. Ταυτόχρονα, το μοντέλο παρουσιάζει τιμή F – value ίση με 346.13 υποδηλώνοντας ότι είναι στατιστικά σημαντικό, ενώ υπάρχει μόνο 0.29% πιθανότητα η υψηλή τιμή του F – value να οφείλεται σε θόρυβο.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει το μέγεθος των νανοσυστημάτων

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F – value | P – value | |
|-------------------|----------------|----|-------------|-----------|-----------|-------------|
| Model | 7.387E+06 | 12 | 6.156E+05 | 346.13 | 0.0029 | significant |
| A: CS | 2.340E+05 | 1 | 2.340E+05 | 131.55 | 0.0075 | |
| B: AL | 1.841E+06 | 1 | 1.841E+06 | 1035.27 | 0.0010 | |
| C: NADES | 1.542E+06 | 1 | 1.542E+06 | 866.95 | 0.0012 | |
| AB | 36921.62 | 1 | 36921.62 | 20.76 | 0.0449 | |
| AC | 4.951E+05 | 1 | 4.951E+05 | 278.34 | 0.0036 | |
| BC | 1.245E+06 | 1 | 1.245E+06 | 699.81 | 0.0014 | |
| A ² | 11572.19 | 1 | 11572.19 | 6.51 | 0.1254 | |
| B ² | 79470.78 | 1 | 79470.78 | 44.68 | 0.0217 | |
| C ² | 1.279E+06 | 1 | 1.279E+06 | 719.18 | 0.0014 | |
| ABC | 0.0000 | 0 | | | | |
| A ² B | 1.192E+06 | 1 | 1.192E+06 | 670.35 | 0.0015 | |
| A ² C | 97350.78 | 1 | 97350.78 | 54.74 | 0.0178 | |
| AB ² | 1.097E+05 | 1 | 1.097E+05 | 61.66 | 0.0158 | |
| AC ² | 0.0000 | 0 | | | | |
| B ² C | 0.0000 | 0 | | | | |
| BC ² | 0.0000 | 0 | | | | |
| A ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| B ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| C ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| Pure Error | 3557.17 | 2 | 1778.58 | | | |
| Cor Total | 7.391E+06 | 14 | | | | |

Ακόμη, η προσαρμογή των πειραματικών τιμών του μεγέθους των νανοσυστημάτων στο επιλεγμένο μοντέλο κρίνεται πολύ καλή παρουσιάζοντας συντελεστή γραμμικής συσχέτισης με τιμή κοντά στη μονάδα και συγκεκριμένα 0.9995. Αυτή η καλή προσαρμογή αποδεικνύεται και στο παρακάτω διάγραμμα, όπου απεικονίζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές ληφθείσες τιμές του μεγέθους από τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού. Τέλος, και η τιμή του Adequate Precision που σχετίζεται με το λόγο του σήματος προς το θόρυβο είναι ικανοποιητική, αφού είναι μεγαλύτερη από τέσσερα (*Adequate Precision* = 66.190).



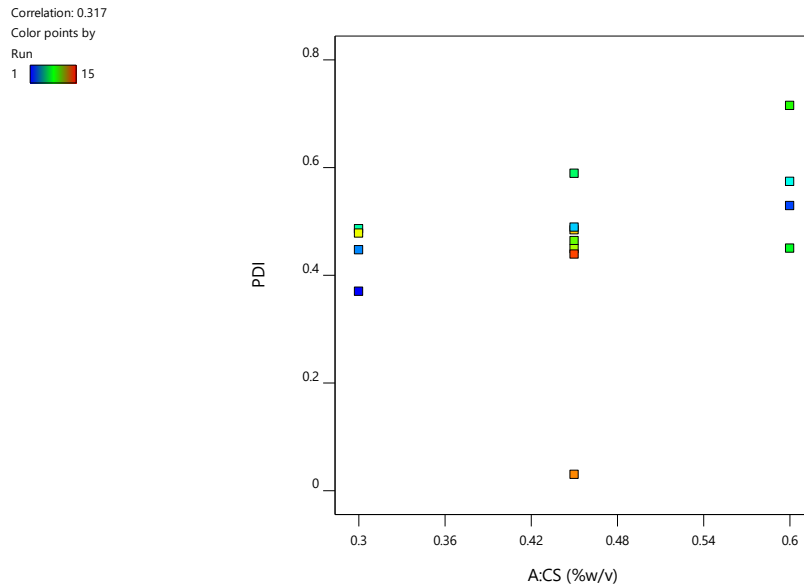
Διάγραμμα 6. Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών του μεγέθους των νανοσυστημάτων

Συμπερασματικά, η εξίσωση του μοντέλου παλινδρόμησης που συσχετίζει τις ανεξάρτητες μεταβλητές A (περιεκτικότητα του διαλύματος χιτοζάνης), B (περιεκτικότητα του διαλύματος αλγινικού) και C (περιεκτικότητα του διαλύματος NADES) με το μέγεθος των νανοσυστημάτων (απόκριση 1, R1) είναι:

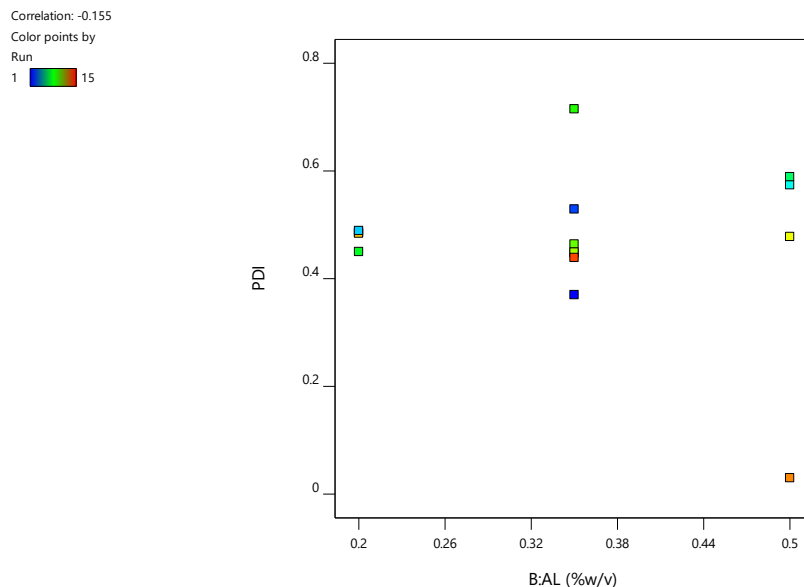
$$\begin{aligned}
 R1 = & 320.53 - 241.85 \cdot A + 678.48 \cdot B - 620.88 \cdot C + 96.07 \cdot A \cdot \\
 & B + 351.80 \cdot A \cdot C - 557.82 \cdot B \cdot C + 55.98 \cdot A^2 + 146.71 \cdot \\
 & B^2 + 588.58 \cdot C^2 - 772.10 \cdot A^2 \cdot B + 220.62 \cdot A^2 \cdot \\
 & C + 234.17 \cdot A \cdot B^2
 \end{aligned} \quad (6)$$

3.1.2.2 Δείκτης πολυδιασποράς νανοσυστημάτων

Αρχικά, αναλύεται η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των παραγόμενων νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη.

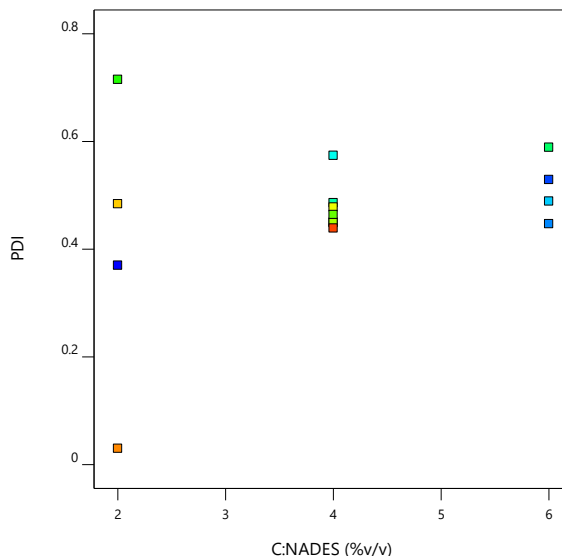


Διάγραμμα 7. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος χιτοζάνης με το δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων



Διάγραμμα 8. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος αλγινικού με το δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων

Correlation: 0.296
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 9. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NADES με το δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων

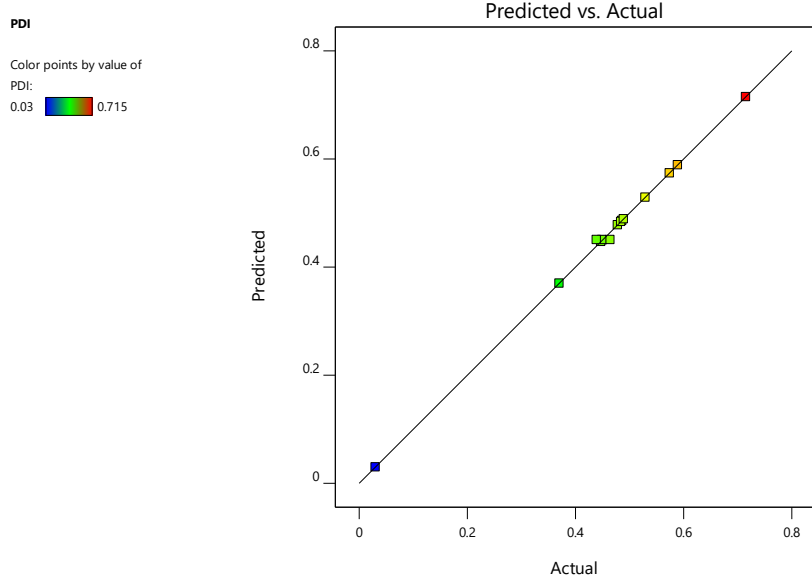
Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται πως για τις χαμηλότερες περιεκτικότητες του διαλύματος της χιτοζάνης (0.30% w/v) τα σχηματιζόμενα νανοσυστήματα εμφανίζουν το μικρότερο δείκτη πολυδιασποράς. Ταυτόχρονα, για τις μικρότερες περιεκτικότητες του διαλύματος του αλγινικού (0.20% w/v) ο προκύπτων δείκτης πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων είναι μικρότερος συγκριτικά με τις υψηλότερες περιεκτικότητες αλγινικού. Τέλος, όσον αφορά την περιεκτικότητα του διαλύματος NADES, διαπιστώνεται ότι η μικρότερη περιεκτικότητά του οδηγεί σε παρασκευή τόσο νανοσυστημάτων με μικρό δείκτη πολυδιασποράς όσο όμως και νανοσυστημάτων με αυξημένο δείκτη πολυδιασποράς. Απεναντίας, η μέση και άνω ακραία τιμή της περιεκτικότητάς του οδηγούν σε νανοσυστήματα με επιθυμητή τιμή του PDI.

Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής επιλέγεται ξανά το κυβικό μοντέλο (cubic model), η εξίσωση του οποίου περιέχει τους όρους των ανεξάρτητων μεταβλητών, καθώς και πεπλεγμένους όρους αυτών. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA. Από το μοντέλο αυτό δεν αφαιρείται κανένας όρος, καθώς το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό (significant) παρουσιάζοντας τιμή p – value ίση με 0.0064, δηλαδή τιμή μικρότερη από την τιμή 0.05. Ταυτόχρονα, το μοντέλο παρουσιάζει τιμή F – value ίση με 155.15 υποδηλώνοντας ότι είναι στατιστικά σημαντικό, ενώ υπάρχει μόνο 0.64% πιθανότητα η υψηλή τιμή του F – value να οφείλεται σε θόρυβο.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει το δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value | |
|-------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|-------------|
| Model | 0.2948 | 12 | 0.0246 | 155.15 | 0.0064 | significant |
| A: CS | 0.0456 | 1 | 0.0456 | 287.89 | 0.0035 | |
| B: AL | 0.0313 | 1 | 0.0313 | 197.87 | 0.0050 | |
| C: NADES | 0.0795 | 1 | 0.0795 | 502.26 | 0.0020 | |
| AB | 0.0044 | 1 | 0.0044 | 27.51 | 0.0345 | |
| AC | 0.0173 | 1 | 0.0173 | 109.21 | 0.0090 | |
| BC | 0.0767 | 1 | 0.0767 | 484.60 | 0.0021 | |
| A ² | 0.0247 | 1 | 0.0247 | 156.01 | 0.0063 | |
| B ² | 0.0046 | 1 | 0.0046 | 29.32 | 0.0325 | |
| C ² | 0.0011 | 1 | 0.0011 | 6.91 | 0.1194 | |
| ABC | 0.0000 | 0 | | | | |
| A ² B | 0.0276 | 1 | 0.0276 | 174.39 | 0.0057 | |
| A ² C | 0.0566 | 1 | 0.0566 | 357.58 | 0.0028 | |
| AB ² | 0.0168 | 1 | 0.0168 | 106.33 | 0.0093 | |
| AC ² | 0.0000 | 0 | | | | |
| B ² C | 0.0000 | 0 | | | | |
| BC ² | 0.0000 | 0 | | | | |
| A ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| B ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| C ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| Pure Error | 0.0003 | 2 | 0.0002 | | | |
| Cor Total | 0.2951 | 14 | | | | |

Ακόμη, η προσαρμογή των πειραματικών τιμών του δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων στο επιλεγμένο μοντέλο κρίνεται πολύ καλή παρουσιάζοντας συντελεστή γραμμικής συσχέτισης με τιμή κοντά στη μονάδα και συγκεκριμένα 0.9989. Αυτή η καλή προσαρμογή αποδεικνύεται και στο παρακάτω διάγραμμα, όπου απεικονίζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές ληφθείσες τιμές του δείκτη πολυδιασποράς από τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού. Τέλος, και η τιμή του Adequate Precision είναι ικανοποιητική (*Adequate Precision* = 58.476).



Διάγραμμα 10. Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών του δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων

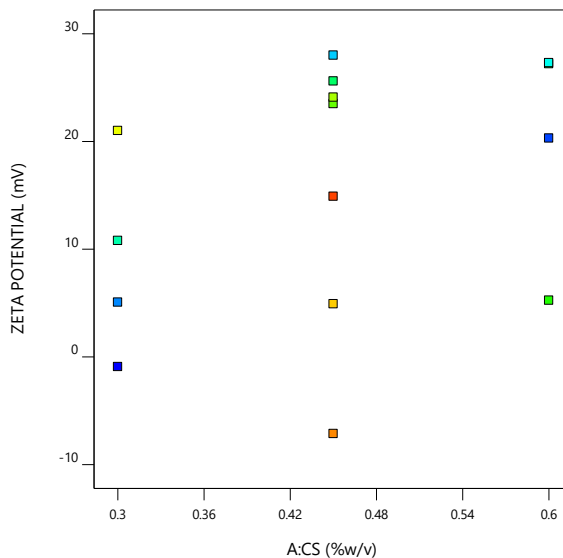
Συμπερασματικά, η εξίσωση του μοντέλου παλινδρόμησης που συσχετίζει τις ανεξάρτητες μεταβλητές A (περιεκτικότητα του διαλύματος χιτοζάνης), B (περιεκτικότητα του διαλύματος αλγινικού) και C (περιεκτικότητα του διαλύματος NADES) με το δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων (απόκριση 2, R2) είναι:

$$\begin{aligned}
 R2 = & 0.4507 + 0.1068 \cdot A - 0.0885 \cdot B + 0.1410 \cdot C + 0.0330 \cdot A \cdot B - 0.0658 \cdot A \cdot C + 0.1385 \cdot B \cdot C + 0.0818 \cdot A^2 - 0.0355 \cdot B^2 - 0.0172 \cdot C^2 + 0.1175 \cdot A^2 \cdot B - 0.1683 \cdot A^2 \cdot C - 0.0918 \cdot A \cdot B^2 \quad (7)
 \end{aligned}$$

3.1.2.3 Z – δυναμικό νανοσυστημάτων

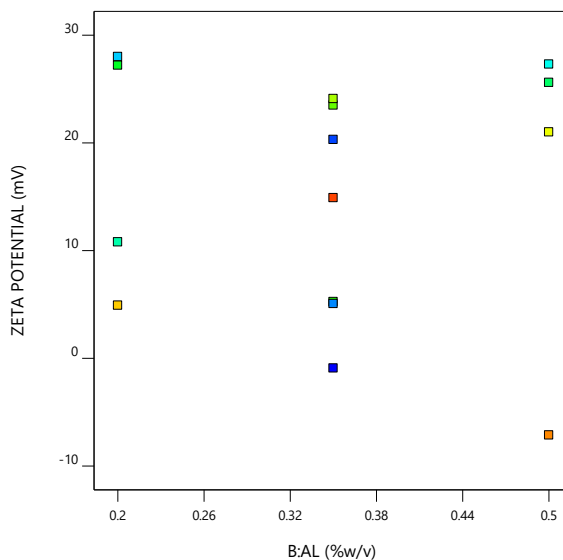
Αρχικά, αναλύεται η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο ζ – δυναμικό των παραγόμενων νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη.

Correlation: 0.362
Color points by
Run
1 15



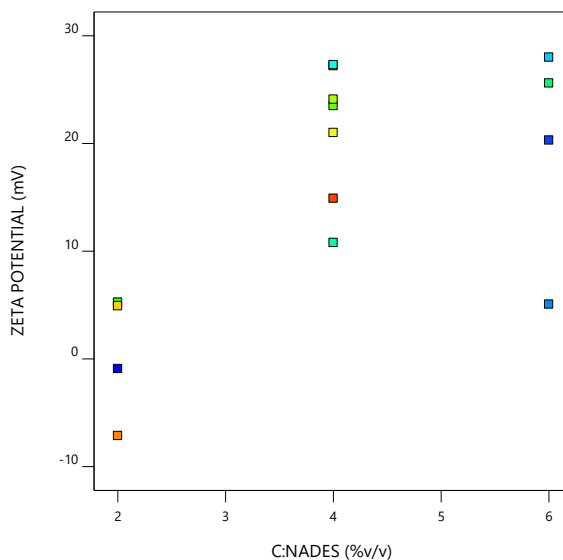
Διάγραμμα 11. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος χιτοζάνης με το ζ – δυναμικό των νανοσυστημάτων

Correlation: -0.034
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 12. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος αλγινικού με το ζ – δυναμικό των νανοσυστημάτων

Correlation: 0.631
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 13. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NADES με το ζ – δυναμικό των νανοσυστημάτων

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται πως για τις υψηλότερες περιεκτικότητες του διαλύματος της χιτοζάνης (0.60% w/v) τα σχηματιζόμενα νανοσυστήματα εμφανίζουν υψηλό θετικό ζ – δυναμικό. Ταυτόχρονα, για τις μικρότερες περιεκτικότητες του διαλύματος του αλγινικού (0.20% w/v) το προκύπτον ζ – δυναμικό των νανοσυστημάτων είναι μεγαλύτερο συγκριτικά με τις υψηλότερες περιεκτικότητες αλγινικού. Τέλος, όσον αφορά την περιεκτικότητα του διαλύματος NADES, διαπιστώνεται ότι η μικρότερη περιεκτικότητά του οδηγεί σε παρασκευή νανοσυστημάτων με χαμηλό ζ – δυναμικό που σε ορισμένες περιπτώσεις παίρνει και αρνητική τιμή. Απεναντίας, η μέση και άνω ακραία τιμή της περιεκτικότητάς του, και κυρίως η μέση, οδηγούν σε νανοσυστήματα με επιθυμητή τιμή του ζ – δυναμικού.

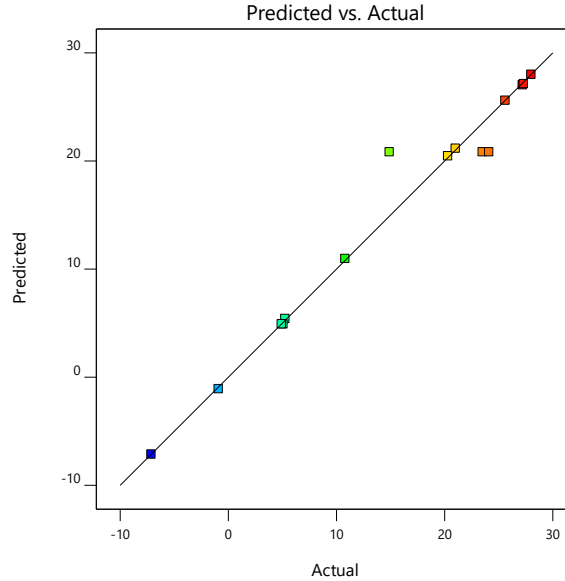
Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής επιλέγεται το απλοποιημένο κυβικό μοντέλο (reduced cubic model), η εξίσωση του οποίου περιέχει τους όρους των ανεξάρτητων μεταβλητών, καθώς και πεπλεγμένους όρους αυτών. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, στην οποία και δεν εμφανίζονται οι όροι του μοντέλου που έχουν αφαιρεθεί, προκειμένου το προκύπτον μοντέλο να είναι στατιστικά σημαντικό. Έτσι, το απλοποιημένο αυτό μοντέλο παρουσιάζει τιμή p – value ίση με 0.0465, δηλαδή τιμή μικρότερη από την τιμή 0.05. Ταυτόχρονα, το μοντέλο παρουσιάζει τιμή F – value ίση με 9.24 υποδηλώνοντας ότι είναι στατιστικά σημαντικό, ενώ υπάρχει 4.65% πιθανότητα η υψηλή τιμή του F – value να οφείλεται σε θόρυβο. Η F – value του Lack of fit του μοντέλου είναι ίση με 0.0080, υποδηλώνοντας πως είναι στατιστικά ασήμαντη μπροστά στην τιμή του γνήσιου σφάλματος (pure error) και πως υπάρχει 93.68% πιθανότητα να έχει αυτήν την τιμή λόγω θορύβου.

Πίνακας 9. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει το ζ – δυναμικό των νανοσυστημάτων

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value | |
|------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|-----------------|
| Model | 1801.82 | 11 | 163.80 | 9.24 | 0.0465 | significant |
| A: CS | 243.06 | 1 | 243.06 | 13.71 | 0.0342 | |
| B: AL | 52.20 | 1 | 52.20 | 2.94 | 0.1847 | |
| C: NADES | 778.69 | 1 | 778.69 | 43.91 | 0.0070 | |
| AB | 25.50 | 1 | 25.50 | 1.44 | 0.3165 | |
| AC | 20.54 | 1 | 20.54 | 1.16 | 0.3607 | |
| BC | 23.28 | 1 | 23.28 | 1.31 | 0.3350 | |
| A ² | 20.22 | 1 | 20.22 | 1.14 | 0.3639 | |
| B ² | 35.06 | 1 | 35.06 | 1.98 | 0.2544 | |
| C ² | 452.26 | 1 | 452.26 | 25.50 | 0.0150 | |
| ABC | 0.0000 | 0 | | | | |
| A ² B | 76.57 | 1 | 76.57 | 4.32 | 0.1293 | |
| A ² C | 151.15 | 1 | 151.15 | 8.52 | 0.0615 | |
| B ² C | 0.0000 | 0 | | | | |
| BC ² | 0.0000 | 0 | | | | |
| A ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| B ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| C ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| Residual | 53.20 | 3 | 17.73 | | | |
| Lack of Fit | 0.2126 | 1 | 0.2126 | 0.0080 | 0.9368 | not significant |
| Pure Error | 52.99 | 2 | 26.49 | | | |
| Cor Total | 1855.02 | 14 | | | | |

Ακόμη, η προσαρμογή των πειραματικών τιμών του ζ – δυναμικού των νανοσυστημάτων στο επιλεγμένο μοντέλο κρίνεται πολύ καλή παρουσιάζοντας συντελεστή γραμμικής συσχέτισης με τιμή κοντά στη μονάδα και συγκεκριμένα 0.9713. Αυτή η καλή προσαρμογή αποδεικνύεται και στο παρακάτω διάγραμμα, όπου απεικονίζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές ληφθείσες τιμές του ζ – δυναμικού από τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού. Τέλος, και η τιμή του Adequate Precision είναι ικανοποιητική (*Adequate Precision* = 9.327).

ZETA POTENTIAL
 Color points by value of
 ZETA POTENTIAL:
 -7.13 28



Διάγραμμα 14. Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών του ζ – δυναμικού των νανοσυστημάτων

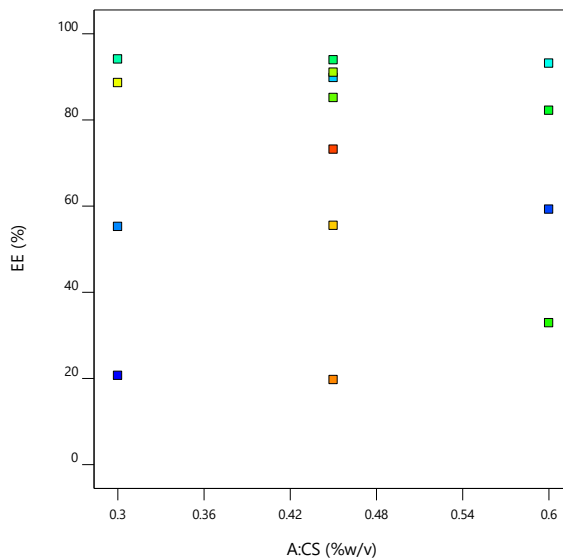
Συμπερασματικά, η εξίσωση του μοντέλου παλινδρόμησης που συσχετίζει τις ανεξάρτητες μεταβλητές A (περιεκτικότητα του διαλύματος χιτοζάνης), B (περιεκτικότητα του διαλύματος αλγινικού) και C (περιεκτικότητα του διαλύματος NADES) με το ζ – δυναμικό των νανοσυστημάτων (απόκριση 3, R3) είναι:

$$\begin{aligned}
 R3 = & \\
 & 20.83 + 5.51 \cdot A - 3.61 \cdot B + 13.95 \cdot C - 2.52 \cdot A \cdot B + 2.27 \cdot A \cdot C \\
 & + 2.41 \cdot B \cdot C - 2.34 \cdot A^2 + 3.08 \cdot B^2 - 11.07 \cdot C^2 + 6.19 \cdot A^2 \cdot B \\
 & - 8.69 \cdot A^2 \cdot C
 \end{aligned} \quad (8)$$

3.1.2.4 Απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων

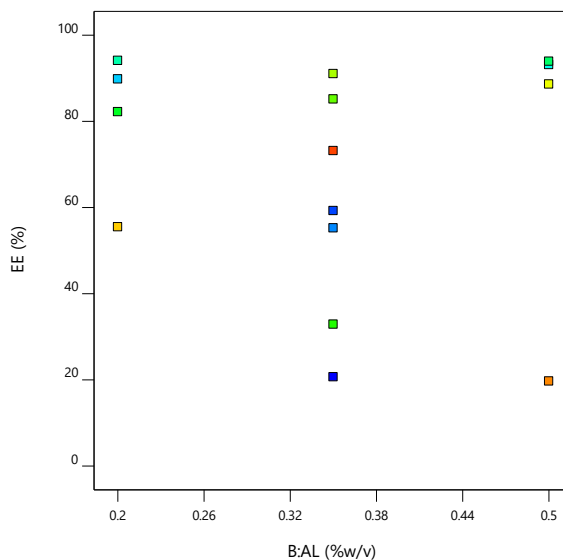
Αρχικά, αναλύεται η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στην απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα παραγόμενα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης.

Correlation: 0.031
Color points by
Run
1 15



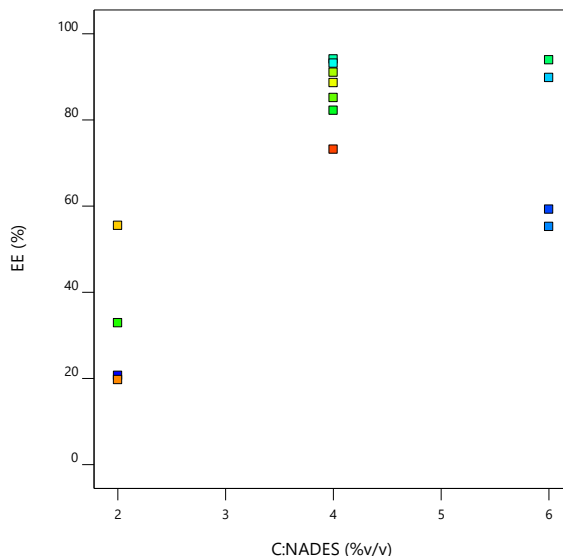
Διάγραμμα 15. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος χιτοζάνης με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων

Correlation: -0.092
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 16. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος αλγινικού με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων

Correlation: 0.595
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 17. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NADES με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων

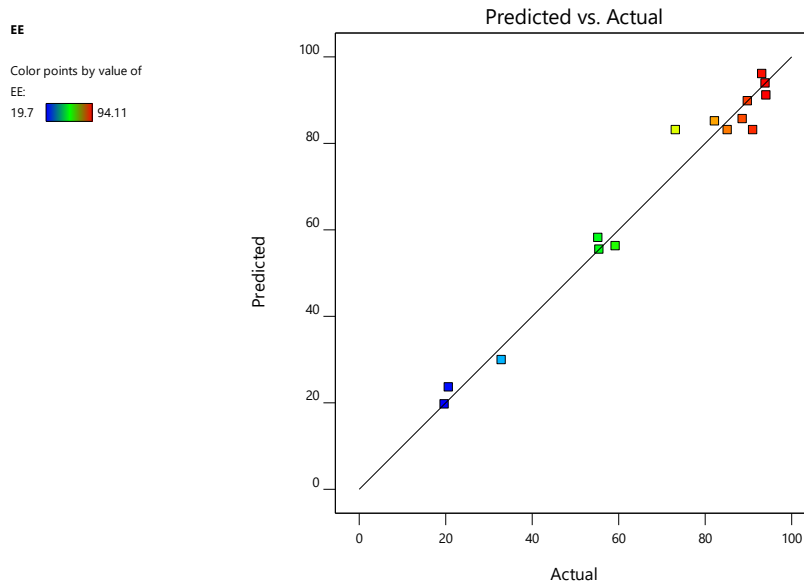
Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται πως για τις υψηλότερες περιεκτικότητες του διαλύματος της χιτοζάνης (0.60% *w/v*) τα σχηματιζόμενα νανοσυστήματα εμφανίζουν υψηλή απόδοση εγκλωβισμού. Ταυτόχρονα, για τις μικρότερες περιεκτικότητες του διαλύματος του αλγινικού (0.20% *w/v*) η προκύπτουσα απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων είναι επίσης μεγάλη. Τέλος, όσον αφορά την περιεκτικότητα του διαλύματος NADES, διαπιστώνεται ότι η μικρότερη περιεκτικότητά του οδηγεί σε παρασκευή νανοσυστημάτων με χαμηλή απόδοση εγκλωβισμού.

Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής επιλέγεται το απλοποιημένο κυβικό μοντέλο (reduced cubic model), η εξίσωση του οποίου περιέχει τους όρους των ανεξάρτητων μεταβλητών, καθώς και πεπλεγμένους όρους αυτών. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, στην οποία και δεν εμφανίζονται οι όροι του μοντέλου που έχουν αφαιρεθεί, προκειμένου το προκύπτον μοντέλο να είναι στατιστικά σημαντικό. Έτσι, το απλοποιημένο αυτό μοντέλο παρουσιάζει τιμή *p* – value ίση με 0.0345, δηλαδή τιμή μικρότερη από την τιμή 0.05. Ταυτόχρονα, το μοντέλο παρουσιάζει τιμή *F* – value ίση με 11.45 υποδηλώνοντας ότι είναι στατιστικά σημαντικό, ενώ υπάρχει 3.45% πιθανότητα η υψηλή τιμή του *F* – value να οφείλεται σε θόρυβο. Η *F* – value του Lack of fit του μοντέλου είναι ίση με 0.8415, υποδηλώνοντας πως είναι στατιστικά ασήμαντη μπροστά στην τιμή του γνήσιου σφάλματος (pure error) και πως υπάρχει 45.58% πιθανότητα να έχει αυτήν την τιμή λόγω θορύβου.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value | |
|------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|-----------------|
| Model | 9892.61 | 11 | 899.33 | 11.45 | 0.0345 | significant |
| A: CS | 9.75 | 1 | 9.75 | 0.1241 | 0.7480 | |
| B: AL | 250.91 | 1 | 250.91 | 3.19 | 0.1719 | |
| C: NADES | 2945.23 | 1 | 2945.23 | 37.49 | 0.0088 | |
| AB | 67.40 | 1 | 67.40 | 0.8580 | 0.4226 | |
| AC | 16.85 | 1 | 16.85 | 0.2145 | 0.6748 | |
| BC | 398.00 | 1 | 398.00 | 5.07 | 0.1099 | |
| A ² | 245.88 | 1 | 245.88 | 3.13 | 0.1750 | |
| B ² | 782.43 | 1 | 782.43 | 9.96 | 0.0510 | |
| C ² | 4008.85 | 1 | 4008.85 | 51.03 | 0.0056 | |
| ABC | 0.0000 | 0 | | | | |
| A ² B | 172.42 | 1 | 172.42 | 2.19 | 0.2351 | |
| A ² C | 283.34 | 1 | 283.34 | 3.61 | 0.1538 | |
| B ² C | 0.0000 | 0 | | | | |
| BC ² | 0.0000 | 0 | | | | |
| A ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| B ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| C ³ | 0.0000 | 0 | | | | |
| Residual | 235.69 | 3 | 78.56 | | | |
| Lack of Fit | 69.80 | 1 | 69.80 | 0.8415 | 0.4558 | not significant |
| Pure Error | 165.89 | 2 | 82.95 | | | |
| Cor Total | 10128.30 | 14 | | | | |

Ακόμη, η προσαρμογή των πειραματικών τιμών της απόδοσης εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων στο επιλεγμένο μοντέλο κρίνεται πολύ καλή παρουσιάζοντας συντελεστή γραμμικής συσχέτισης με τιμή κοντά στη μονάδα και συγκεκριμένα 0.9767. Αυτή η καλή προσαρμογή αποδεικνύεται και στο παρακάτω διάγραμμα, όπου απεικονίζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές ληφθείσες τιμές της απόδοσης εγκλωβισμού από τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού. Τέλος, και η τιμή του Adequate Precision είναι ικανοποιητική (*Adequate Precision* = 9.636).



Διάγραμμα 18. Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών της απόδοσης εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων

Συμπερασματικά, η εξίσωση του μοντέλου παλινδρόμησης που συσχετίζει τις ανεξάρτητες μεταβλητές A (περιεκτικότητα του διαλύματος χιτοζάνης), B (περιεκτικότητα του διαλύματος αλγινικού) και C (περιεκτικότητα του διαλύματος NADES) με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων (απόκριση 4, R4) είναι:

$$\begin{aligned}
 R4 = & 83.12 + 1.10 \cdot A - 7.92 \cdot B + 27.13 \cdot C + 4.11 \cdot A \cdot B - 2.05 \cdot A \cdot \\
 & C + 9.97 \cdot B \cdot C - 8.16 \cdot A^2 + 14.56 \cdot B^2 - 32.95 \cdot C^2 + 9.28 \cdot \\
 & A^2 \cdot B - 11.90 \cdot A^2 \cdot C
 \end{aligned} \quad (9)$$

3.1.3 Βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων γίνεται με γνώμονα την ελαχιστοποίηση του μεγέθους και της κατανομής τους μεγέθους τους (size & PDI) και τη μεγιστοποίηση του επιφανειακού τους φορτίου (zeta – potential) και της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε αυτά (EE%). Με βάση αυτά τα κριτήρια, λοιπόν, η σύνθεση των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη δραστική ένωση τη ναρινγίνη βελτιστοποιείται για τις τιμές των ανεξαρτήτων μεταβλητών που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα μαζί με τις προβλεπόμενες τιμές των αποκρίσεων. Ακολουθούν και τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσεως δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών, της περιεκτικότητας του διαλύματος της χιτοζάνης και του αλγινικού, ενώ η τρίτη μεταβλητή, η περιεκτικότητα του διαλύματος NADES παραμένει σταθερή και λαμβάνει τη βέλτιστη τιμή της.

Πίνακας 11. Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων

| Ανεξάρτητες μεταβλητές | | | Αποκρίσεις | | | |
|------------------------|------------------|---------------------|--------------|------------|-----------------------|------------|
| A: CS (% w/v) | B: AL (% w/v) | C: NADES (% v/v) | Size (nm) | PDI (-) | z – potential (mV) | EE% (-) |
| 0.54 | 0.20 | 4.9 | 274.7 | 0.428 | +31.3 | 95 |

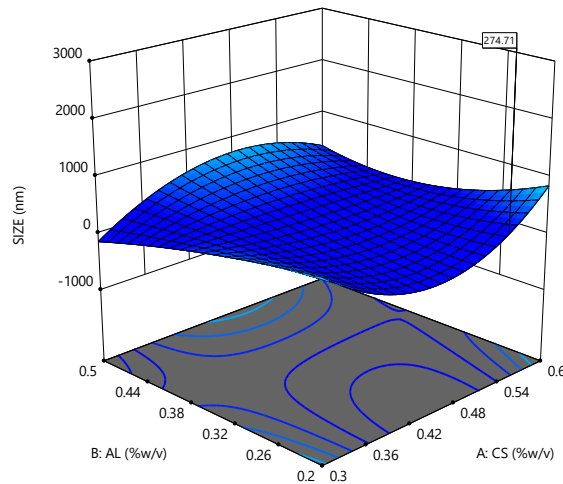
Factor Coding: Actual

● Design Points
274.7 2913

X1 = A: CS
X2 = B: AL

Actual Factor
C: NADES = 4.90359

3D Surface



Διάγραμμα 19. 3D επιφάνεια του μεγέθους των νανοσυστημάτων συναρτήσει των μεταβλητών A και B και για βέλτιστο C

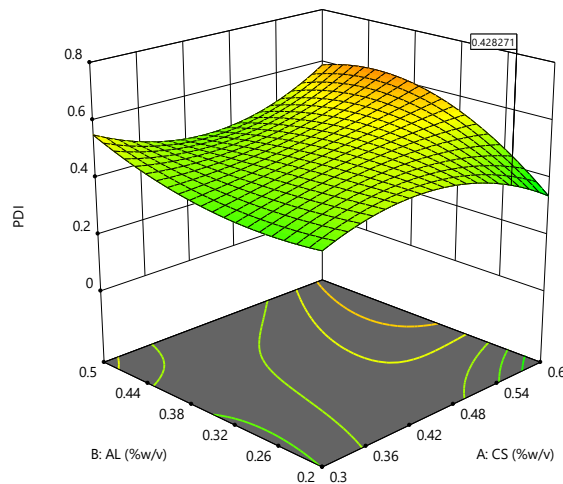
Factor Coding: Actual

● Design Points
0.03 0.715

X1 = A: CS
X2 = B: AL

Actual Factor
C: NADES = 4.90359

3D Surface

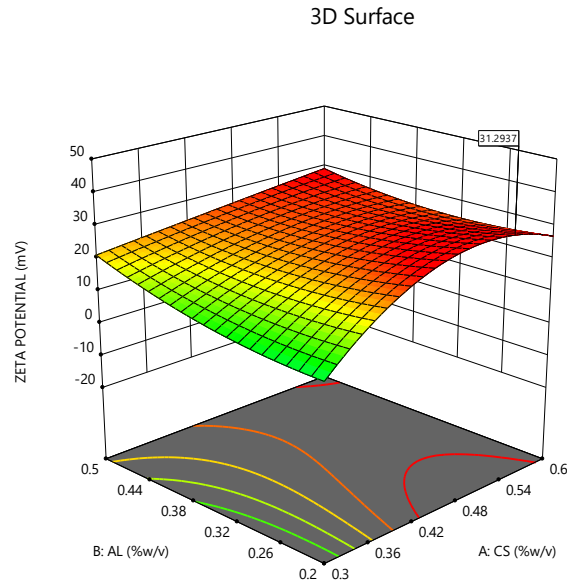


Διάγραμμα 20. 3D επιφάνεια του δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων συναρτήσει των μεταβλητών A και B και για βέλτιστο C

Factor Coding: Actual
● Design Points
-7.13 28

X1 = A: CS
X2 = B: AL

Actual Factor
C: NADES = 4.90359

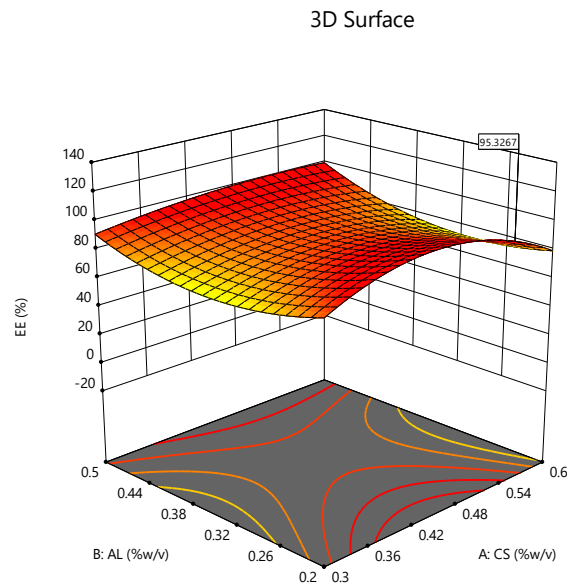


Διάγραμμα 21. 3D επιφάνεια του ζ – δυναμικού των νανοσυστημάτων συναρτήσει των μεταβλητών A και B και για βέλτιστο C

Factor Coding: Actual
● Design Points
19.7 94.11

X1 = A: CS
X2 = B: AL

Actual Factor
C: NADES = 4.90359



Διάγραμμα 22. 3D επιφάνεια της απόδοσης εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων συναρτήσει των μεταβλητών A και B και για βέλτιστο C

3.1.4 Επιβεβαίωση του μοντέλου – Βέλτιστα νανοσυστήματα

Επόμενος στόχος είναι η επιβεβαίωση του μοντέλου (confirmation), δηλαδή η επαλήθευση των προβλεπόμενων τιμών των αποκρίσεων για τις προκύπτουσες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών μετά τη βελτιστοποίηση της διεργασίας.

Έτσι, παρασκευάζονται τρία batch νανοσυστημάτων (confirmation runs) σύμφωνα με τις βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών που παρουσιάζονται στον

Πίνακας 11, τα οποία αποτελούν και τα βέλτιστα νανοσυστήματα. Οι πειραματικές τιμές των αποκρίσεων, καθώς και το ποσοστό της απόκλισής τους από τις προβλεπόμενες τιμές μετά τη βελτιστοποίηση της διεργασίας παρατίθενται παρακάτω.

Πίνακας 12. Πειραματικές τιμές των αποκρίσεων και σύγκριση αυτών με τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές τους

| Confirmation runs | Size (nm) | PDI (-) | z – potential (mV) | EE% (-) |
|--------------------------|------------------|----------------|---------------------------|----------------|
| Confirmation run 1 | 268.6 | 0.468 | +22.5 | 65 |
| Confirmation run 2 | 261.4 | 0.450 | +23.7 | 66 |
| Confirmation run 3 | 346.1 | 0.467 | +21.2 | 68 |
| Average actual | 292.1±41.9 | 0.462±0.061 | +22.4±2.7 | 66 |
| Predicted | 274.7 | 0.428 | +31.3 | 95% |
| % απόκλισης | 6.3% | 7.8% | 28% | 31% |

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, το ποσοστό της απόκλισης της μέσης παρατηρούμενης πειραματικής τιμής για το μέγεθος και την κατανομή του μεγέθους (PDI) είναι αναμενόμενο και εντός των ορίων του σφάλματος. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το ζ – δυναμικό και την απόδοση εγκλωβισμού είναι πιο μεγάλα, χωρίς όμως να προμηνύουν τη μη επιβεβαίωση του μοντέλου.

Στον πίνακα που ακολουθεί, λοιπόν, συμπεραίνεται πως η επιβεβαίωση του μοντέλου είναι επιτυχής, καθώς οι μέσες τιμές των αποκρίσεων των τριών εκτελεσμένων πειραμάτων σύμφωνα με τις βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών είναι εντός των ορίων των προβλεπόμενων τιμών τους για ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Πίνακας 13. Επιβεβαίωση του μοντέλου για διάστημα εμπιστοσύνης 95%

| Response | Predicted Mean | Predicted Median | Std Dev | n | 95% PI low | Data Mean | 95% PI high |
|---------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------|----------|-------------------|------------------|--------------------|
| Size (nm) | 274.7 | 274.7 | 42.2 | 3 | 101.6 | 292.1 | 447.8 |
| PDI (-) | 0.428 | 0.428 | 0.012 | 3 | 0.377 | 0.462 | 0.480 |
| z – potential (mV) | 31.3 | 31.3 | 4.2 | 3 | 18.9 | 22.4 | 43.7 |
| EE% (-) | 95 | 95 | 8 | 3 | 59 | 66 | 111 |

Συνεπώς, συμπεραίνεται πως η διεργασία σύνθεσης των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη ναρινγίνη βελτιστοποιείται για τις τιμές των ανεξαρτήτων μεταβλητών του Πίνακας 11, προκύπτοντας νανοσωματίδια με μέγεθος στη νανοκλίμακα, αποδεκτό δείκτη

πολυδιασποράς, ικανοποιητική απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης και θετικό ζ – δυναμικό που υποδηλώνει τόσο την σταθερότητά τους όσο και την επιτυχή τους επικάλυψη με χιτοζάνη. Η επικάλυψη αυτή διαφαίνεται και στο υποκίτρινο χρώμα των λυοφιλοποιημένων βέλτιστων νανοσωματιδίων της παρακάτω εικόνας.



Εικόνα 26. Βέλτιστα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια

3.2 Περαιτέρω χαρακτηρισμοί των βέλτιστων νανοσυστημάτων

3.2.1 Προσδιορισμός της απόδοσης εγκλωβισμού στα βέλτιστα νανοσυστήματα με άμεσο τρόπο

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, τα αποτελέσματα της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης κατά τη βελτιστοποίησή τους μέσω πειραματικού σχεδιασμού αφορούν τον προσδιορισμό της με έμμεσο τρόπο. Εξίσου σημαντικός, όμως, είναι και ο προσδιορισμός της απόδοσης εγκλωβισμού με άμεσο τρόπο, καθώς παρέχει πληροφορίες για την ομοιογένεια του δείγματος, αλλά και για την ακριβή ποσότητα της εγκλωβισμένης ένωσης, γνώση απαραίτητη για τις μετέπειτα βιολογικές αξιολογήσεις των νανοσυστημάτων. Έτσι, από ένα batch των βέλτιστων νανοσωματιδίων λαμβάνονται τρία δείγματα από διαφορετικές περιοχές του και οι τιμές της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε αυτά παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 14. Απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα βέλτιστα νανοσυστήματα υπολογισμένη με άμεσο τρόπο

| Batch βέλτιστων νανοσυστημάτων | ΕΕ% (-) |
|---------------------------------------|----------------|
| 1ο δείγμα | 53 |
| 2ο δείγμα | 49 |
| 3ο δείγμα | 54 |
| Average | 52 |

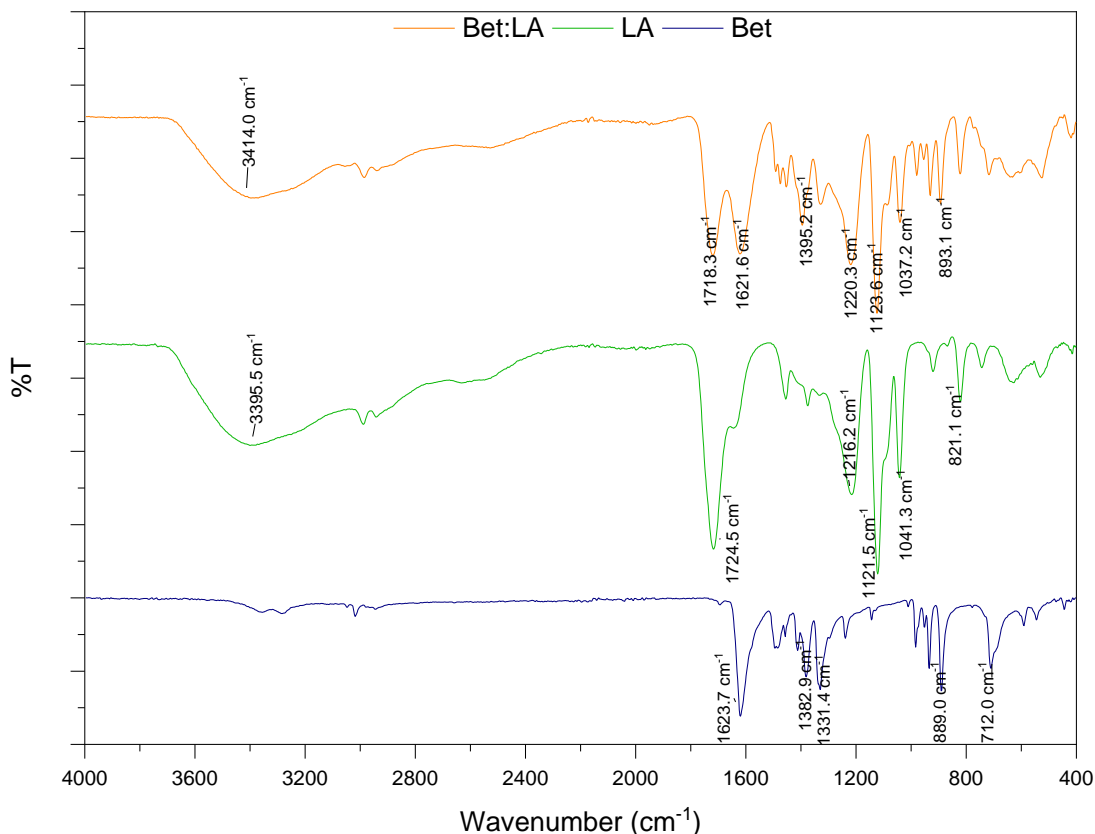
Η μέση απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα βέλτιστα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης υπολογισμένη με άμεσο τρόπο είναι ίση με 52%. Σίγουρα, λοιπόν, διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη τιμή της υπολογισμένη με έμμεσο τρόπο (66%). Η προσδιορισμένη με άμεσο τρόπο τιμή είναι πιο ρεαλιστική, καθώς η πιο υψηλή τιμή της έμμεσης μεθόδου μπορεί να οφείλεται στη χαμηλή

διαλυτότητα της ναρινγίνης στο νερό, ώστε να την καθιστά δύσκολα ανιχνεύσιμη σε υδατικό διάλυμα κατά τη φωτομέτρηση αυτού σε φασματοφωτόμετρο UV – Vis.

3.2.2 Μελέτη δομής των βέλτιστων νανοσυστημάτων μέσω ATR/FT – IR

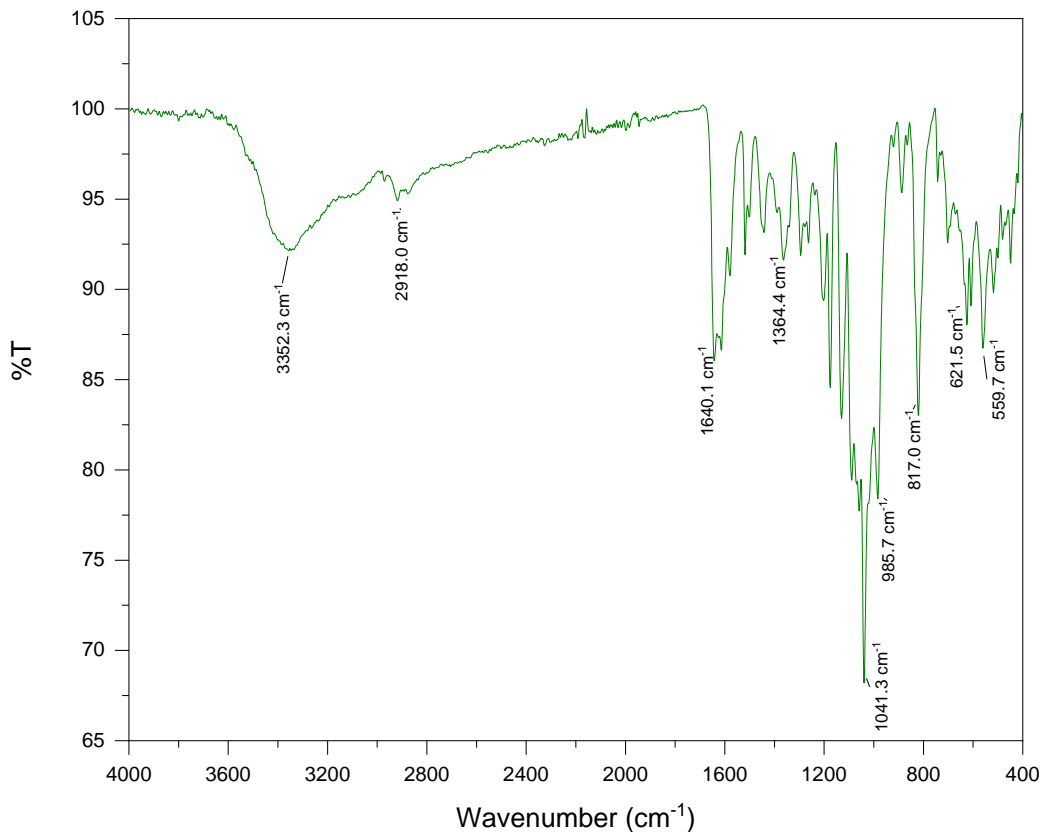
Για τη δομική μελέτη των βέλτιστων νανοσυστημάτων με εγκλωβισμένη τη ναρινγίνη πέρα από το φάσμα ATR/FT – IR αυτών λαμβάνονται και τα αντίστοιχα φάσματα των κενών νανοσυστημάτων, καθώς και τα φάσματα των συστατικών που τα απαρτίζουν (νανοφορείς, εγκλωβισμένη ένωση, χρησιμοποιούμενος διαλύτης και τα συστατικά αυτού).

Αρχικά, στο Διάγραμμα 23 παρουσιάζονται στιβαγμένα τα φάσματα ATR/FT – IR του χρησιμοποιούμενου NADES Bet:LA (1:2) και των συστατικών του (βεταΐνη και γαλακτικό οξύ). Στο φάσμα της βεταΐνης σχηματίζεται μία κορυφή στα 1623.7 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στις δονήσεις τάσης της καρβονυλικής ομάδας στο μόριό της ($C = O$). Στο φάσμα του γαλακτικού οξέος εμφανείς είναι δύο κορυφές, η πρώτη σε κυματαριθμό 3395.5 cm^{-1} , η οποία και αντιπροσωπεύει τις δονήσεις τάσης του των ομάδων $O - H$ στα μόριά του, και η δεύτερη σε κυματαριθμό 1724.5 cm^{-1} , η οποία και αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης των ομάδων $C = O$ στα μόρια του. Όσον αφορά τώρα το φάσμα του NADES Bet:LA (1:2), μπορεί να παρατηρηθεί μια έντονη ζώνη απορρόφησης στα 3414.0 cm^{-1} , η οποία και αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης των ομάδων $O - H$ στα μόρια του γαλακτικού οξέος σε αυτόν. Επιπλέον, μια ζώνη απορρόφησης των ομάδων $C = O$ των μορίων του γαλακτικού οξέος εμφανίζεται στα 1718.3 cm^{-1} , ενώ στα 1621.6 cm^{-1} παρατηρείται η αντίστοιχη καμπύλη για την καρβονυλική ομάδα της βεταΐνης. Άξιο παρατήρησης είναι το γεγονός πως τόσο οι δονήσεις τάσεις των ομάδων $C = O$ όσο και των ομάδων $O - H$ στο φάσμα του παραγόμενου NADES είναι μετατοπισμένες συγκριτικά με αυτές των συστατικών του. Αυτό υποδηλώνει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ του δέκτη και του δότη δεσμών υδρογόνου στα ευτηκτικά μίγματα. Με βάση τις δομικές πληροφορίες που λαμβάνονται από το παρακάτω διάγραμμα επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου προς σχηματισμό του NADES, το φάσμα του οποίου διατηρεί τις χαρακτηριστικές ζώνες των συστατικών του που αντικατοπτρίζουν τις λειτουργικές ομάδες που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις τους.⁸¹



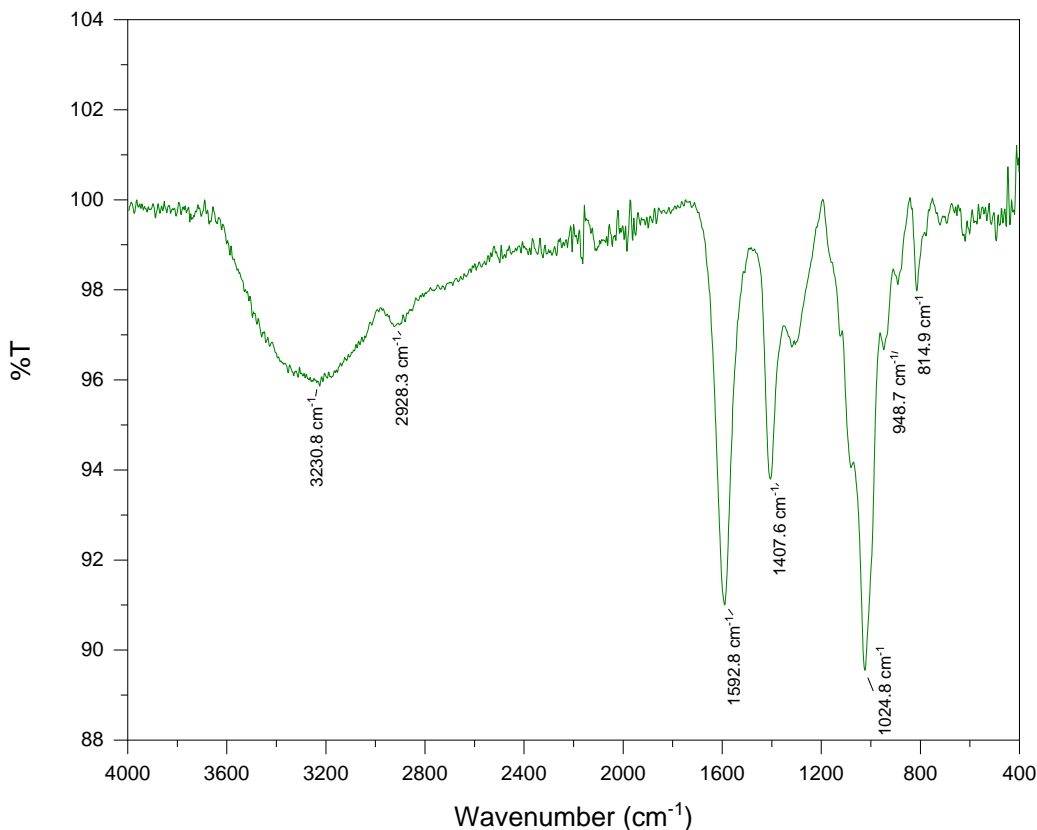
Διάγραμμα 23. Στιβαγμένα φάσματα ATR/FT – IR της βεταΐνης, του γαλακτικού οξέος και του NADES Bet:LA (1:2)

Στο φάσμα της ναρινγίνης (Διάγραμμα 24) οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3352.3 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων $O - H$, στα 2918.0 cm^{-1} λόγω των δονήσεων τάσης των ομάδων $C - H$, στα 1640.1 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του καρβονυλίου του ενός αρωματικού δακτυλίου, στα 1364.4 cm^{-1} χάρη στις δονήσεις τάσης των φαινολικών υδροξυλίων και στα 985.7 cm^{-1} λόγω της αξονικής παραμόρφωσης του δεσμού $C - O - C$.⁷⁶



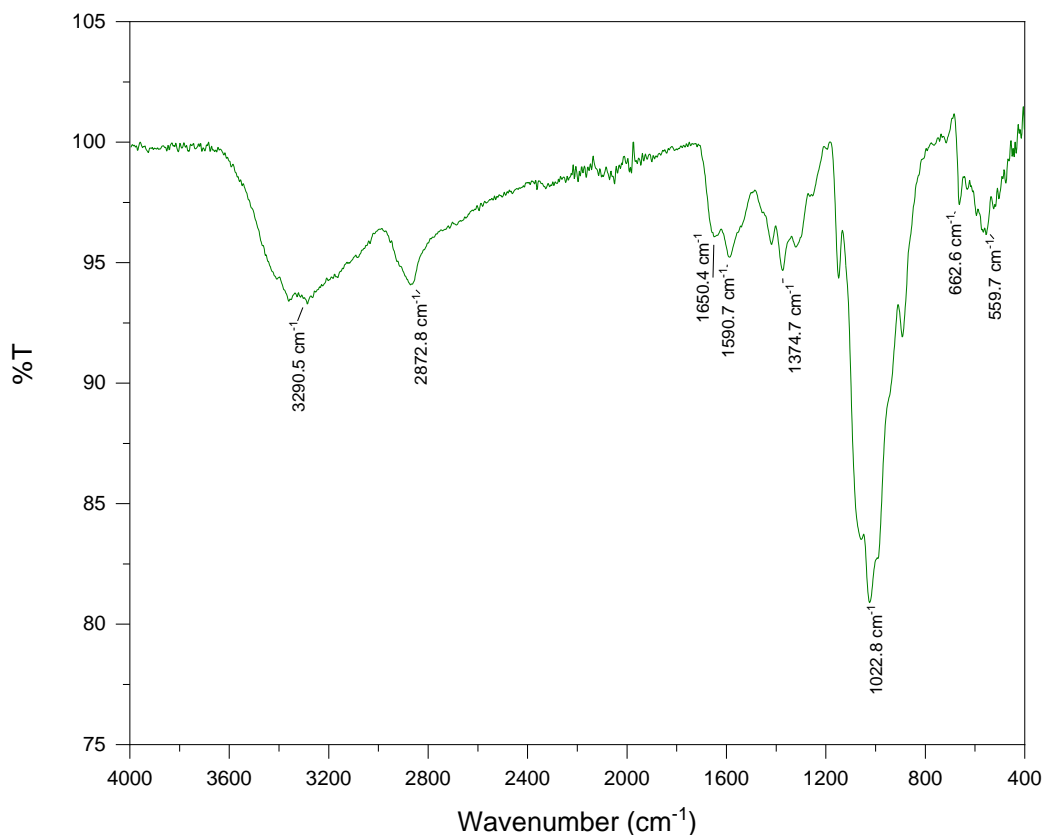
Διάγραμμα 24. Φάσμα ATR/FT – IR της ναρινγίνης

Αναφορικά με το φάσμα του αλγινικού νατρίου (Διάγραμμα 25) αυτό παρουσιάζει κορυφές στα 3230.8 cm^{-1} λόγω δονήσεων τάσης των ομάδων $O - H$ και στα 2928.3 cm^{-1} , η οποία και οφείλεται στη δόνηση τάσης των ομάδων $C - H$. Οι κορυφές στα 1592.8 cm^{-1} και στα 1407.6 cm^{-1} αντιστοιχούν στη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση τάσης των καρβονυλικών ομάδων, αντίστοιχα. Τέλος, η κορυφή στα 1024.8 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης των δεσμών $C - O$.⁸²



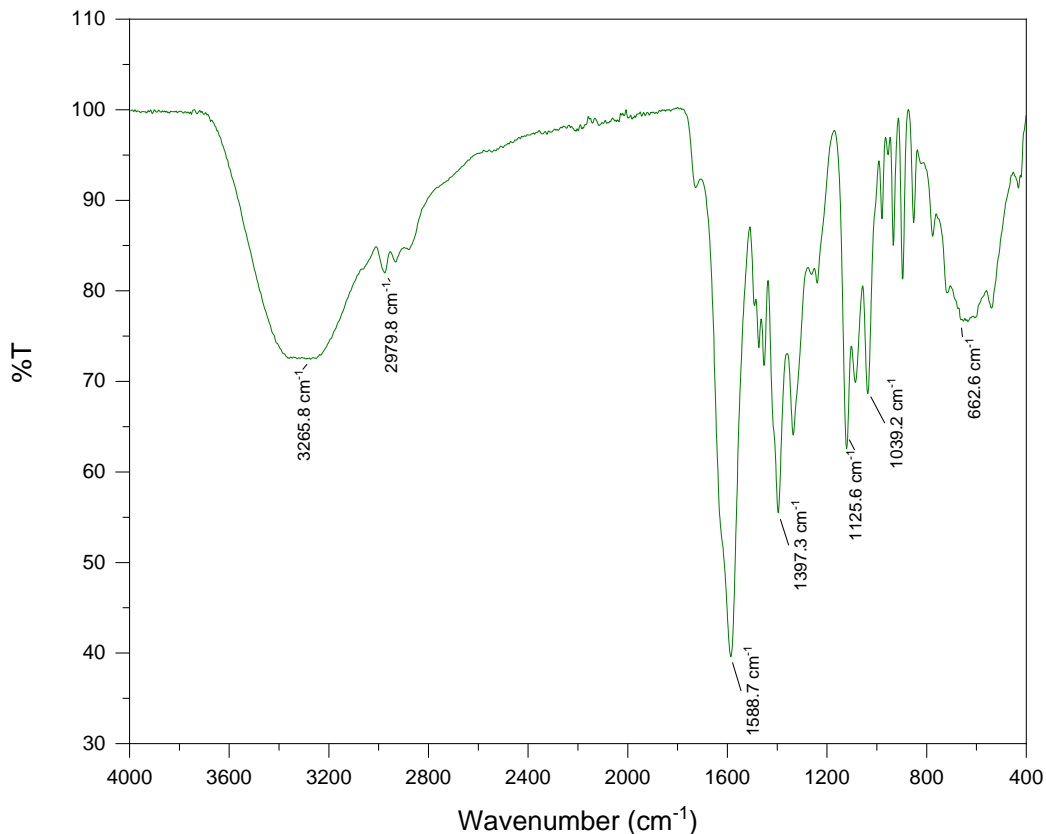
Διάγραμμα 25. Φάσμα ATR/FT – IR του αλγινικού νατρίου

Στο φάσμα της χιτοζάνης (Διάγραμμα 26) οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3290.5 cm^{-1} που αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών $O - H$ και $N - H$, στα 2872.8 cm^{-1} που οφείλεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης των δεσμών $C - H$, στα 1650.4 cm^{-1} , στα 1590.7 cm^{-1} και στα 1374.7 cm^{-1} που αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης των δεσμών $-NH_2$. Μάλιστα, οι τρεις αυτές κορυφές επιβεβαιώνουν ότι η χιτοζάνη που χρησιμοποιείται έχει υψηλό ποσοστό απακετυλίωσης. Τέλος, η κορυφή στα 1022.8 cm^{-1} αφορά την ασύμμετρη δόνηση τάσης των δεσμών $C - O - C$.⁸²



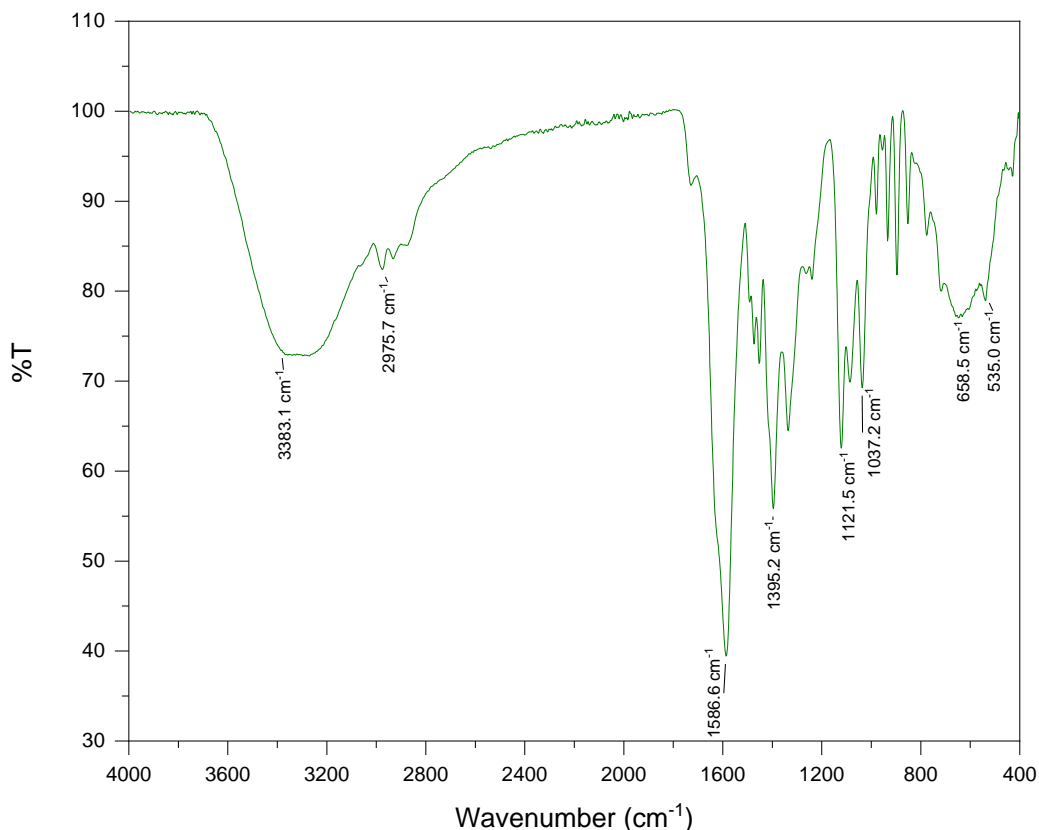
Διάγραμμα 26. Φάσμα ATR/FT – IR της χιτοζάνης

Στο φάσμα των βέλτιστων κενών νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης παρατηρούνται βασικές κορυφές των δύο νανοφορέων, όπως για παράδειγμα στα 3265.8 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση τάσης των δεσμών $O - H$, στα 2979.8 cm^{-1} λόγω της ασύμμετρης δόνησης τάσης των δεσμών $C - H$ ή στα 1039.2 cm^{-1} που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού $C - O$. Οι περισσότερες από αυτές, όμως, είναι μετατοπισμένες, όπως οι κορυφές στα 1588.7 cm^{-1} και στα 1397.3 cm^{-1} που αφορούν τη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση τάση των καρβονυλικών ομάδων, αντίστοιχα, ενώ άλλες δεν εμφανίζονται καθόλου. Αυτές οι τροποποιήσεις στις ζώνες απορρόφησης των αμινομάδων, των καρβοξυλικών ομάδων και των αμιδικών δεσμών οφείλονται στην επιτυχή πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση των δύο βιοπολυμερών μέσω της αλληλεπίδρασης των καρβοξυλικών ομάδων του αλγινικού με τις αμινομάδες της χιτοζάνης προς σχηματισμό σταθερών νανοσφαιρών.



Διάγραμμα 27. Φάσμα ATR/FT – IR των βέλτιστων κενών νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης

Συγκρίνοντας το φάσμα των βέλτιστων νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη (Διάγραμμα 28) με το αντίστοιχο φάσμα των κενών βέλτιστων νανοσυστημάτων παρατηρούνται πολλές ομοιότητες, με τις διαφοροποιήσεις τους να οφείλονται σε μετατοπίσεις κάποιων βασικών κορυφών. Αυτό συν το γεγονός ότι οι χαρακτηριστικές κορυφές της ναρινγίνης δεν είναι διακριτές, υποδεικνύει τον επιτυχή εγκλωβισμό της ένωσης στις νανοσφαίρες του συστήματος αλγινικού – χιτοζάνης. Σε μερικές περιπτώσεις, μάλιστα, χαρακτηριστικές κορυφές της ναρινγίνης αλληλεπικαλύπτονται με αυτές των νανοφορέων δημιουργώντας μεγαλύτερες κορυφές που αποδίδονται στις πιθανές αλληλεπιδράσεις της ένωσης με το πολυμερικό σύστημα. Επί παραδείγματι, αν και η κορυφή στα 1640.1 cm^{-1} δεν εμφανίζεται, αυτή πιθανότατα έχει συγχωνευτεί με την κορυφή στα 1588.7 cm^{-1} του φορέα οδηγώντας σε μία νέα κορυφή στα 1586.6 cm^{-1} , σημείο που υποδηλώνει την αλληλεπίδραση της ναρινγίνης με τη χιτοζάνη μέσω δεσμών υδρογόνου.



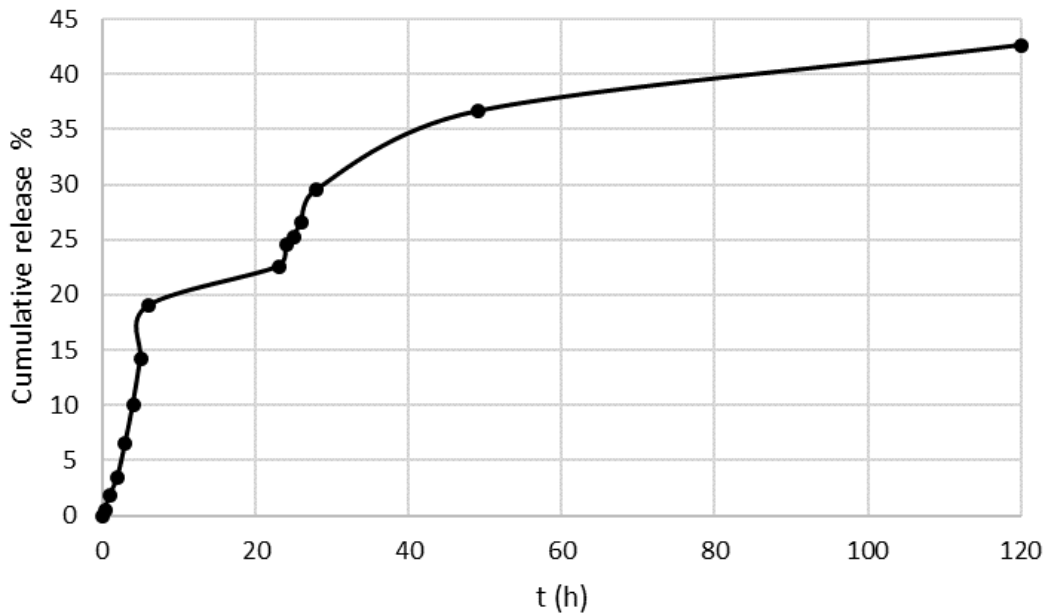
Διάγραμμα 28. Φάσμα ATR/FT – IR των βέλτιστων ναοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη

3.2.3 Μελέτη αποδέσμευσης *in vitro* της ναρινγίνης από τα βέλτιστα ναοσυστήματα

Πραγματοποιείται μελέτη της αποδέσμευσης της ναρινγίνης από το ένα batch των βέλτιστων ναοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης *in vitro* με τη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης – διάχυσης σε *pH* 5.5 και θερμοκρασία 32°C, προσομοιώνοντας τις συνθήκες του ανθρώπινου δέρματος. Το προκύπτον προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης από τους ναοφορείς σε αυτές τις συνθήκες παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 29, το οποίο σημειώνεται ότι προκύπτει με βάση την μέση απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης υπολογισμένη με άμεσο τρόπο, καθώς και αυτή θεωρείται πιο αξιόπιστη.

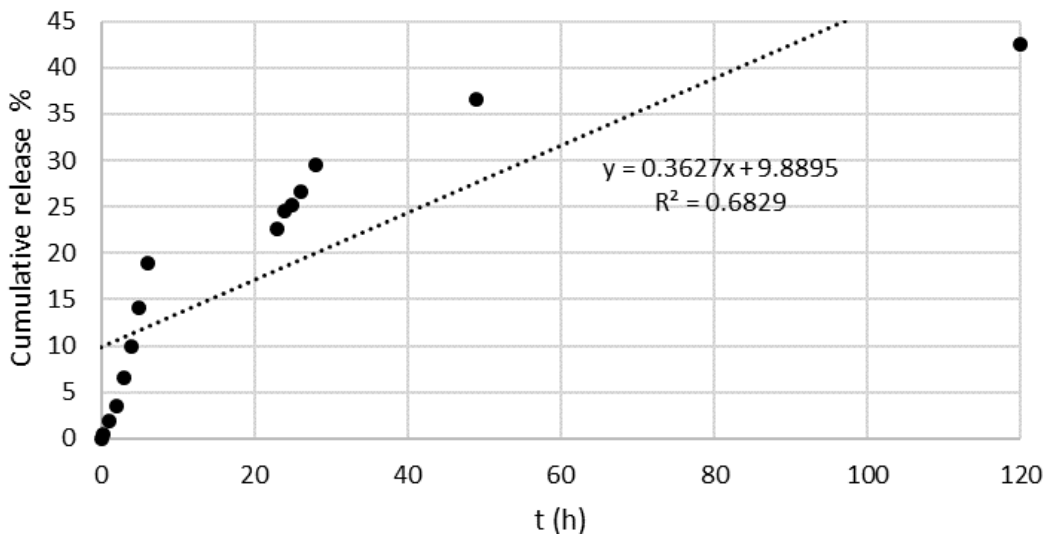
Από το προκύπτον, λοιπόν, προφίλ αποδέσμευσης συμπεραίνεται πως αυτό είναι διφασικό, καθώς αρχικά στις έξι πρώτες ώρες παρουσιάζεται μία ταχεία αποδέσμευση της ναρινγίνης (“Burst effect”), όπου το 19% της συνολικής ποσότητας της εγκλωβισμένης ναρινγίνης αποδεσμεύεται, ενώ σταδιακά το ποσοστό αποδέσμευσής της αρχίζει να σταθεροποιείται σχηματίζοντας πλατό (“plateau”). Η αρχική αποδέσμευση της ναρινγίνης οφείλεται σε αποδεσμευμένα μόρια ναρινγίνης, τα οποία και ήταν ασθενώς συνδεδεμένα στην επιφάνεια των

νανοσωματιδίων. Εν τέλει, σε συνολικό χρόνο μελέτης 120 h, δηλαδή πέντε ημέρες, αποδεσμεύεται αθροιστικά τελικά το 43% της συνολικής εγκλωβισμένης ναρινγίνης.

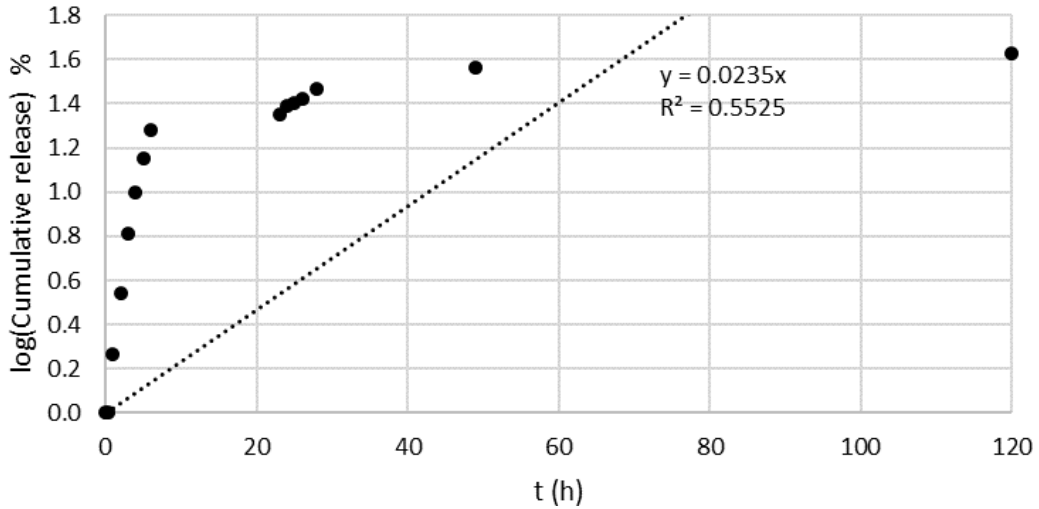


Διάγραμμα 29. Προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης *in vitro* από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης για pH 5.5 και θερμοκρασία 32°C

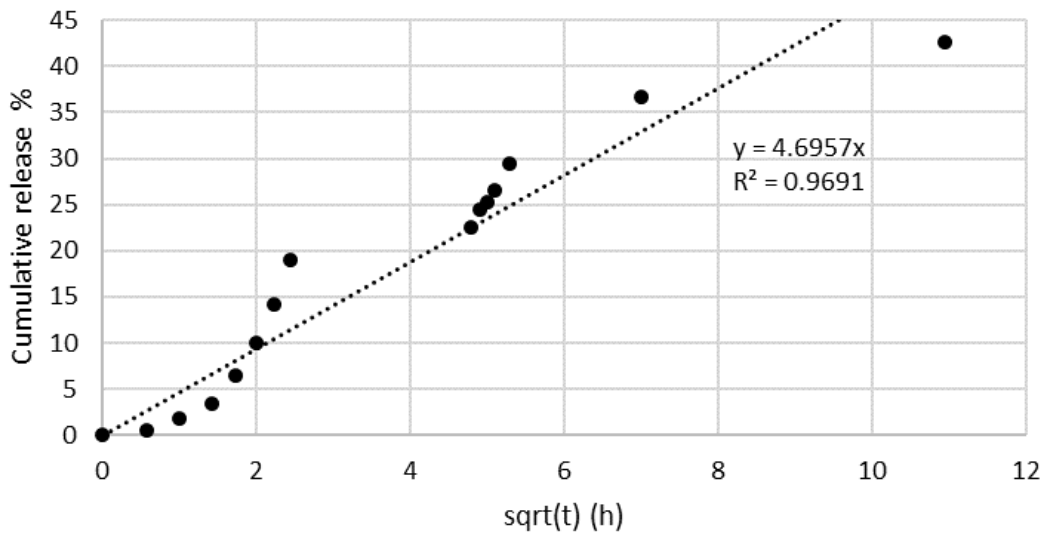
Ακολουθώς παρατίθενται τα διαγράμματα προσαρμογής των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης στα κυριότερα μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν την κινητική της αποδέσμευσης αυτής.



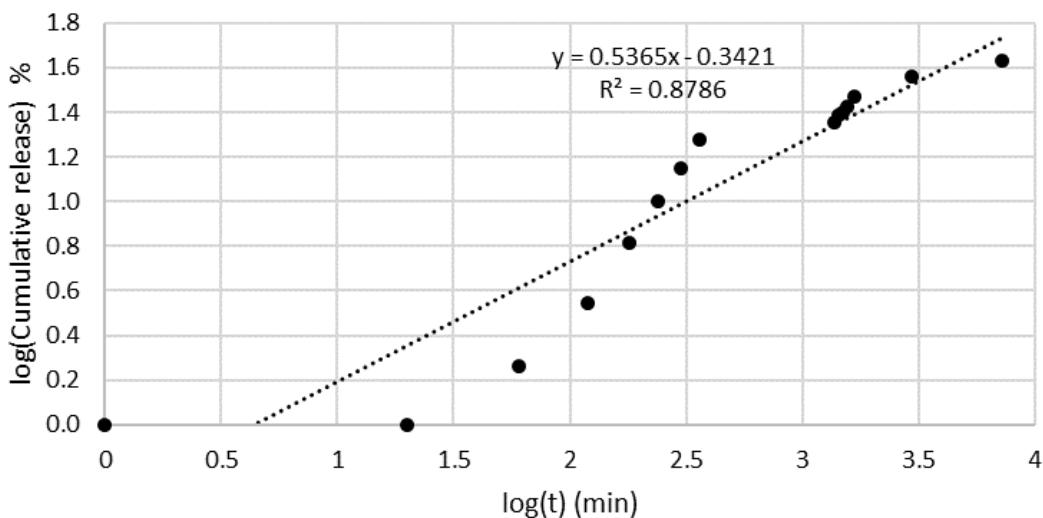
Διάγραμμα 30. Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης *in vitro* από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης στο κινητικό μοντέλο μηδενικής τάξης



Διάγραμμα 31. Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης *in vitro* από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης στο κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης



Διάγραμμα 32. Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης *in vitro* από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης στο κινητικό μοντέλο Higuchi



Διάγραμμα 33. Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης *in vitro* από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης στο κινητικό μοντέλο Korsmeyer – Peppas

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι τα κινητικά μοντέλα μηδενικής και πρώτης τάξης δεν περιγράφουν καλά την κινητική της αποδέσμευσης της ναρινγίνης από το σύστημα παρουσιάζοντας συντελεστές γραμμικής συσχέτισης μακριά από τη μονάδα, $R^2 = 0.6829$ και $R^2 = 0.5525$, αντίστοιχα. Απεναντίας, τον υψηλότερο συντελεστή γραμμικής συσχέτισης με τιμή πολύ κοντινή στη μονάδα εμφανίζει το κινητικό μοντέλο Higuchi ($R^2 = 0.9691$), το οποίο και περιγράφει κατάλληλα την κινητική αποδέσμευσης της ναρινγίνης από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης και η οποία σύμφωνα με το μοντέλο αυτό βασίζεται στη διάχυσή της βασιζόμενη στον πρώτο νόμο του Fick. Ταυτόχρονα, καλή προσαρμογή δίνει και το ημι – εμπειρικό κινητικό μοντέλο Korsmeyer – Peppas ($R^2 = 0.8786$), του οποίου ο εκθέτης διάχυσης n υποδεικνύει το μηχανισμό της αποδέσμευσης. Έτσι, για την προκύπτουσα τιμή του εκθέτη διάχυσης που αντιστοιχεί στην κλίση της εξίσωσης προσαρμογής $n = 0.5365 > 0.5$, επιβεβαιώνεται ότι κατά την αποδέσμευση της ναρινγίνης από τα νανοσωματίδια τα φαινόμενα διάχυσής της και διόγκωσης των πολυμερικών αλυσίδων είναι ισοδύναμα.

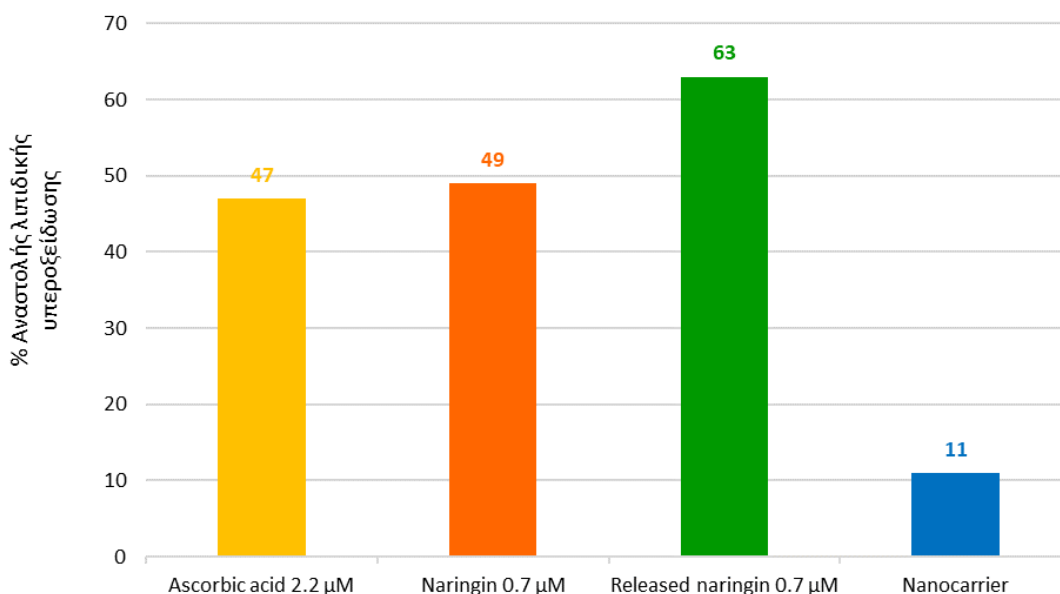
Από τις παραπάνω, λοιπόν, παρατηρήσεις συμπεραίνεται πως τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης παρέχουν τη δυνατότητα παρατεταμένης αποδέσμευσης του φαρμάκου, καθώς η αποδέσμευσή του ελέγχεται από τη διάχυσή του μέσω του πολυμερικού συμπλέγματος, καθώς και τη χαλάρωση και διόγκωση των πολυμερών. Αυτή η παρατήρηση αναφέρεται και σε βιβλιογραφικές μελέτες αντίστοιχων συστημάτων με διάφορους εγκλωβισμένους θεραπευτικούς παράγοντες.⁸²

Παρατήρηση/σχόλιο:

Η μελέτη της αποδέσμευσης *in vitro* της ναρινγίνης από τα νανοσυστήματα για ακόμη μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (προς επίτευξη μεγαλύτερου ποσοστού αποδέσμευσης) δεν είναι εφικτή με την επιλεγμένη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης – διάχυσης, καθώς οι πολλαπλές αραιώσεις του buffer κατά τις δειγματοληψίες οδηγούν σε αναξιόπιστες μετρήσεις μετά από τις πρώτες πέντε ημέρες.

3.2.4 Αξιολόγηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης από την αποδεσμευμένη ναρινγίνη

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της *in vitro* βιοδοκιμής για τον έλεγχο της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP), που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, από την αποδεσμευμένη ναρινγίνη. Το ποσοστό αναστολής αναφέρεται σε συγκέντρωση της εξεταζόμενης ένωσης ίση με $0.7 \mu M$ και για μελέτη της αναστολής του φαινομένου της λιπιδικής υπεροξειδωσης για 1 min . Η συγκέντρωση αυτή προκύπτει κατά τον προσδιορισμό της άμεσης απόδοσης των βέλτιστων νανοσυστημάτων. Ακόμη, όσον αφορά τις ενώσεις αναφοράς, η ελεύθερη ναρινγίνη εξετάζεται και αυτή σε συγκέντρωση $0.7 \mu M$, ενώ το πρότυπο αντιοξειδωτικό ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση $2.2 \mu M$, προκειμένου τα αποτελέσματά τους να είναι συγκρίσιμα. Τέλος, μελετάται και η δράση του νανοφορέα, δηλαδή των κενών νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης.



Διάγραμμα 34. Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των εξεταζόμενων ενώσεων για συγκεκριμένη συγκέντρωση αυτών και του νανοφορέα για συνολική μελέτη του φαινομένου για 1 min

Παρατηρείται πως και οι τρεις μελετώμενες ενώσεις παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης με το υψηλότερο να το εμφανίζει η αποδεσμευμένη ναρινγίνη, μετά η ελεύθερη ναρινγίνη και έπειτα το πρότυπο αντιοξειδωτικό, το ασκορβικό οξύ. Απεναντίας, όσον αφορά το νανοφορέα, δηλαδή τα κενά νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης, αυτός δεν εμφανίζει σημαντικό ποσοστό αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η δράση της αποδεσμευμένης και της ελεύθερης ναρινγίνης οφείλεται στα φαινολικά υδροξύλια στη δομή τους, τα οποία δεσμεύουν τις σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες και μέσω συντονισμού μπορούν να δημιουργήσουν σχετικά σταθερές ρίζες φλαβονοειδών. Τέλος, αξιοσημείωτο είναι ότι η δράση της αποδεσμευμένης ναρινγίνης είναι ισχυρότερη από αυτή της ελεύθερης ναρινγίνης, γεγονός που υποδεικνύει πως η ναρινγίνη κατά τον εγκλωβισμό της στα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης διατηρεί την αντιοξειδωτική δράση της, αλλά και ότι ο εγκλωβισμός της οδηγεί σε ενισχυμένη δράση αυτής. Ενδεχομένως, κατά τον εγκλωβισμό της η ναρινγίνη να επιδέχεται φυσικοχημικές τροποποιήσεις μέσω των δεσμών της με τους νανοφορείς, οι οποίες και να αυξάνουν την αντιοξειδωτική της δράση κατά την αποδέσμευσή της.

3.3 Σύγκριση φυσικοχημικών ιδιοτήτων των βέλτιστων κενών και με εγκλωβισμένη ναρινγίνη νανοσυστημάτων

Τα βέλτιστα κενά και φορτωμένα με ναρινγίνη νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης συγκρίνονται ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους τους (ή PDI) και το επιφανειακό τους φορτίο (ζ – δυναμικό), οι τιμές των οποίων παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 15. Μέγεθος, κατανομή του μεγέθους και ζ – δυναμικό των βέλτιστων κενών και φορτωμένων με ναρινγίνη νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης

| | Size (nm) | PDI (–) | z – potential (mV) |
|---|------------------|----------------|---------------------------|
| Βέλτιστα κενά νανοσυστήματα | 376.4 ± 23.9 | 0.438 ± 0.051 | +10.5 ± 0.7 |
| Βέλτιστα νανοσυστήματα με εγκλωβισμένη ναρινγίνη | 292.1 ± 41.9 | 0.462 ± 0.061 | +22.4 ± 2.7 |

Με βάση τις τιμές του Πίνακας 15 τα βέλτιστα κενά νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης παρουσιάζουν μεγαλύτερο μέγεθος, παρόμοιο δείκτη πολυδιασποράς και σημαντικά μειωμένο ζ – δυναμικό σε σύγκριση με τα αντίστοιχα βέλτιστα φορτωμένα με ναρινγίνη νανοσυστήματα. Ο εγκλωβισμός της ναρινγίνης στα νανοσωματίδια οδηγεί στη σταθεροποίησή τους παρουσιάζοντας υψηλότερο ζ – δυναμικό, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με τις πολυμερικές αλυσίδες των νανοφορέων και τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ τους. Αυτή η αυξημένη σταθερότητα οδηγεί στο σχηματισμό

νανοσωματιδίων με μικρότερο μέγεθος συγκριτικά με τα κενά νανοσωματίδια που όντας λιγότερο σταθερά πιθανόν να έχουν αυξημένη τάση προς συσσωμάτωση, αν και βιβλιογραφικά συνήθως ο εγκλωβισμός δραστικών ενώσεων σε νανοσωματίδια οδηγεί σε μεγαλύτερα μεγέθη συγκριτικά με τα κενά νανοσωματίδια.

3.4 Μελέτη της επίδρασης της χρήσης υπερήχων στις φυσικοχημικές ιδιότητες των βέλτιστων νανοσυστημάτων

Εξετάζεται η επίδραση των δύο πρώτων σταδίων της χρήσης υπερήχων με probe κατά την πειραματική διαδικασία της παρασκευής των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης στις τελικές φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Τα δύο αυτά πρώτα στάδια αφορούν τη χρήση υπερήχων στη διασπορά του αλγινικού νατρίου με τη ναρινγίνη και στη διασπορά των νανοσωματιδίων αλγινικού με εγκλωβισμένη τη ναρινγίνη μετά την προσθήκη του crosslinker $CaCl_2$. Έτσι, παρασκευάζονται βέλτιστα νανοσωματίδια παραλείποντας το δεύτερο στάδιο των υπερήχων και βέλτιστα νανοσωματίδια κατά την παρασκευή των οποίων παραλείπονται και τα δύο πρώτα στάδια υπερήχων. Σημειώνεται ότι το τρίτο στάδιο της χρήσης των υπερήχων κατά την πειραματική διαδικασία σύνθεσης των νανοσυστημάτων δεν εξετάζεται, καθώς αποτελεί ένα σύνηθες στάδιο στην παρασκευή νανοσωματιδίων, που στόχο έχει το σπάσιμο των συσσωματωμάτων και το σχηματισμό πιο σταθερών σωματιδιακών διασπορών.

Τα φορτωμένα με ναρινγίνη νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης που παρασκευάζονται με τους τρόπους που αναφέρονται παραπάνω συγκρίνονται ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους τους (ή PDI) και το επιφανειακό τους φορτίο (ζ – δυναμικό) με τα αντίστοιχα βέλτιστα νανοσυστήματα, οι τιμές των οποίων παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 16. Μέγεθος, κατανομή του μεγέθους και ζ – δυναμικό των βέλτιστων νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης και των αντίστοιχων νανοσυστημάτων με παραλειπόμενα στάδια χρήσης υπερήχων

| Παραλειπόμενα στάδια χρήσης υπερήχων | Size (nm) | PDI (-) | z – potential (mV) |
|--------------------------------------|---------------|---------------|--------------------|
| Κανένα (Βέλτιστα νανοσυστήματα) | 292.1 ± 41.9 | 0.462 ± 0.061 | +22.4 ± 2.7 |
| 2ο στάδιο | 403.8 ± 61.0 | 0.541 ± 0.173 | -4.6 ± 0.4 |
| 1ο & 2ο στάδιο | 368.4 ± 124.8 | 0.496 ± 0.092 | -16.2 ± 3.8 |

Όπως διαφαίνεται στα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, και για τις δύο περιπτώσεις παραλειπόμενων σταδίων χρήσης υπερήχων κατά την πειραματική διαδικασία δεν παρασκευάζονται νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης με επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες. Το προκύπτον μέγεθός τους είναι σημαντικά

μεγαλύτερο, ο δείκτης πολυδιασποράς προσεγγίζει περισσότερο την τιμή 0.5, ενώ δεν επιτυγχάνεται η επικάλυψη των νανοσωματιδίων αλγινικού με χιτοζάνη, γεγονός που υποδεικνύεται και από την αρνητική τιμή του ζ – δυναμικού.

Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, η ανάγκη των δύο πρώτων σταδίων χρήσης υπερήχων με probe κατά την πειραματική διαδικασία σύνθεσης των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη για δύο λόγους:

- αρχικά για την επίτευξη μίας ομοιόμορφης διασποράς της ναρινγίνης με το αλγινικό (1ο στάδιο)
- έπειτα για την προσφορά ενέργειας στο σύστημα των φορτισμένων με ναρινγίνη νανοσωματιδίων αλγινικού, προκειμένου να επιτευχθεί η μετέπειτα επικάλυψή τους με το διάλυμα της χιτοζάνης

3.5 Μελέτη της επίδρασης των εναλλακτικών διαλυτών χιτοζάνης στις φυσικοχημικές ιδιότητες των βέλτιστων νανοσυστημάτων

Για τη μελέτη της επίδρασης των εναλλακτικών διαλυτών χιτοζάνης στις φυσικοχημικές ιδιότητες των βέλτιστων νανοσυστημάτων, παρασκευάζονται τα αντίστοιχα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης με βάση τις τιμές των ανεξαρτήτων μεταβλητών που προκύπτουν από τη βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσής τους χρησιμοποιώντας ως διαλύτες της χιτοζάνης, το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ και το φυσικό μίγμα βεταΐνης – γαλακτικού οξέος σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2. Συγκεκριμένα, παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα γαλακτικού και οξικού οξέος 4.9% v/v , περιεκτικότητα ίση με τη χρησιμοποιούμενη περιεκτικότητα του υδατικού διαλύματος NADES Bet:LA (1:2). Ακόμη, παρασκευάζεται φυσικό μίγμα βεταΐνης – γαλακτικού οξέος σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2, το οποίο προκύπτει με την απλή ανάδευση των τριών του συστατικών (βεταΐνη, γαλακτικό οξύ και νερό) σε κατάλληλα ζυγισμένες ποσότητες το καθένα, ώστε να τηρείται η γραμμομοριακή αναλογία και η συνολική μάζα της βεταΐνης και του υδατικού διαλύματος γαλακτικού οξέος 80% w/w να είναι ίση με 4.9 g ($\rho_{NADES\ Bet:LA\ (1:2)} \approx 1\ g/cm^3$).

Τα βέλτιστα νανοσυστήματα με χρήση διαφορετικού διαλύτη χιτοζάνης το καθένα συγκρίνονται ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους τους (ή PDI), το επιφανειακό τους φορτίο (ζ – δυναμικό) και την απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε αυτά, οι τιμές των οποίων παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 17. Μέγεθος, κατανομή του μεγέθους, ζ – δυναμικό και απόδοση εγκλωβισμού των βέλτιστων νανοσυστημάτων με χρήση διαφορετικών διαλυτών χιτοζάνης

| Διαλύτης χιτοζάνης | Size (nm) | PDI (-) | z – potential (mV) | EE% (-) |
|----------------------------------|------------|-------------|--------------------|---------|
| NADES Bet:LA (1:2) | 292.1±41.9 | 0.462±0.061 | +22.4±2.7 | 66% |
| Lactic acid | 299.3±41.2 | 0.432±0.088 | +25.8±3.1 | 60% |
| Acetic acid | 271.5±28.4 | 0.437±0.028 | +28.4±3.1 | 52% |
| Φυσικό μίγμα Bet:LA (1:2) | 283.8±20.7 | 0.494±0.070 | +14.9±1.3 | 64% |

Συμπεραίνεται, λοιπόν, πως αναφορικά με το μέγεθος και την κατανομή του μεγέθους των παρασκευασθέντων νανοσυστημάτων ο διαλύτης της χιτοζάνης δεν επιφέρει σημαντικές διαφοροποιήσεις, καθώς οι τιμές τους κυμαίνονται στα ίδια πλαίσια και για τις τέσσερις περιπτώσεις. Στην απόδοση εγκλωβισμού παρατηρείται μία μείωση της τιμής στην περίπτωση του οξικού οξέος (52%), ενώ για τους υπόλοιπους διαλύτες η τιμή της απόδοσης κυμαίνεται μεταξύ 60% – 65%. Η σημαντική διαφορά παρουσιάζεται στην περίπτωση χρήσης του φυσικού μίγματος Bet:LA (1:2) ως διαλύτη της χιτοζάνης και συγκεκριμένα στη προκύπτουσα τιμή του ζ – δυναμικού των νανοσωματιδίων, η οποία και είναι σημαντικά μικρότερη από τις αντίστοιχες τιμές στις περιπτώσεις των άλλων διαλυτών. Έτσι, η μειωμένη του τιμή υποδεικνύει το σχηματισμό μίας όχι και τόσο σταθερής διασποράς σωματιδίων που προμηνύει και την όχι τόσο καλή επικάλυψη των νανοσωματιδίων με χιτοζάνη. Το γεγονός αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί, καθώς η απλή ανάδευση των συστατικών που απαρτίζουν το φυσικό μίγμα δεν οδηγεί και στο σχηματισμό του NADES, ο οποίος πέρα από τη διάλυση της χιτοζάνης έχει τη δυνατότητα να ενισχύει και να βελτιώνει τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Στην προκείμενη περίπτωση η χρήση του NADES σταθεροποιεί τη διασπορά των νανοσυστημάτων μέσω του εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου και άλλων αλληλεπιδράσεων, όπως van der Waals και ηλεκτροστατικές δυνάμεις, μεταξύ των συστατικών του.

Συμπερασματικά, η χρήση ενός πράσινου διαλύτη, όπως ο NADES Bet:LA (1:2), μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό νανοσυστημάτων με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τα αντίστοιχα που προκύπτουν με χρήση συμβατικών διαλυτών, όπως το γαλακτικό και το οξικό οξύ.



Εικόνα 27. Βέλτιστα λυοφιλοπονημένα νανοσωματίδια με χρήση ως διαλύτη χιτοζάνης το φυσικό μίγμα Bet:LA (1:2), το οξικό και το γαλακτικό οξύ

3.6 Μελέτη σταθερότητας των υδατικών διασπορών των βέλτιστων νανοσυστημάτων

Υδατικές διασπορές των παραγόμενων βέλτιστων νανοσυστημάτων αξιολογούνται ως προς την σταθερότητά τους μετά από διάστημα εβδομήντα ημερών. Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές του μεγέθους, της κατανομής του μεγέθους (ή PDI) και του επιφανειακού φορτίου (ζ – δυναμικό) των υδατικών διασπορών των νανοσυστημάτων, όπως προσδιορίζονται αμέσως μετά την παρασκευή τους, μετά από την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($T = 25^{\circ}\text{C}$) για διάστημα εβδομήντα ημερών και μετά από την αποθήκευσή τους στη ψύξη ($T = 4^{\circ}\text{C}$) για διάστημα εβδομήντα ημερών.

Πίνακας 18. Μελέτη σταθερότητας των υδατικών διασπορών των βέλτιστων νανοσυστημάτων ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους και το ζ – δυναμικό

| | Size (nm) | PDI (–) | z – potential (mV) |
|--|--------------|-------------|----------------------|
| Ημέρα παρασκευής | 292.1±41.9 | 0.462±0.061 | +22.4±2.7 |
| Αποθήκευση για 70 days σε $T = 25^{\circ}\text{C}$ | 287.2±46.2 | 0.377±0.046 | +20.8±4.0 |
| Αποθήκευση για 70 days σε $T = 4^{\circ}\text{C}$ | 355.5 ± 43.8 | 0.339±0.056 | +14.1±0.7 |

Όπως παρατηρείται από τις τιμές του παραπάνω πίνακα, κατά την αποθήκευση των νανοσυστημάτων για εβδομήντα ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος οι τιμές του μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ – δυναμικού τους παρουσιάζουν μικρές αποκλίσεις συγκριτικά με αυτές που αντιστοιχούν στην ημέρα της σύνθεσής τους. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως τα παραγόμενα νανοσυστήματα είναι ιδιαίτερα σταθερά με την πάροδο του χρόνου.

Όσον αφορά την αποθήκευσή τους για εβδομήντα ημέρες σε ψύξη, τα αποτελέσματα των τιμών του μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ – δυναμικού των παραγόμενων νανοσωματιδίων εμφανίζουν σημαντικές διαφορές με τις αντίστοιχες τιμές τους την ημέρα της παρασκευής τους. Ειδικότερα, μεγάλη μείωση διαφαίνεται στο ζ – δυναμικό, η οποία υποδεικνύει μία όχι τόσο σταθερή διασπορά νανοσωματιδίων, γεγονός που δικαιολογεί την αύξηση του μεγέθους

τους εξαιτίας της συσσωμάτωσής τους. Αν και το ζ – δυναμικό ακόμα και στην αποθήκευσή τους στη ψύξη παραμένει θετικό, φαίνεται πως η μείωση της θερμοκρασίας ευνοεί την τάση προς συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιείται ο εγκλωβισμός του φυσικού φλαβονοειδούς ναρινγίνη σε στερεά πολυμερικά νανοσυστήματα και συγκεκριμένα σε νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης με τη μέθοδο της πολυηλεκτρολυτικής συμπλοκοποίησης, της οποίας προηγείται και ένα στάδιο προ – πηκτωμάτωσης του ανιοντικού πολυσακχαρίτη με άλας. Μάλιστα, η μέθοδος παρασκευής τους αποκτά πράσινο χαρακτήρα με τη διαλυτοποίηση του κατιοντικού πολυσακχαρίτη χιτοζάνη στο φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη (NADES) βεταΐνης – γαλακτικού οξέος (Bet:LA) σε γραμμομοριακή αναλογία (1:2).

Για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης πραγματοποιείται πειραματικός σχεδιασμός Box Behnken 3×4 δεκαπέντε πειραμάτων με χρήση του λογισμικού Design – Expert 12. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίζονται η περιεκτικότητα % w/v του διαλύματος της χιτοζάνης και του διαλύματος του αλγινικού και η περιεκτικότητα % v/v του διαλύματος του χρησιμοποιούμενου NADES. Οι εξεταζόμενες αποκρίσεις (εξαρτημένες μεταβλητές) είναι το μέγεθος, η κατανομή του μεγέθους ή δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και το επιφανειακό φορτίο (ζ – δυναμικό) των παραγόμενων νανοσυστημάτων, καθώς και η απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε αυτά.

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσής τους λαμβάνει χώρα με γνώμονα την ελαχιστοποίηση του μεγέθους και της κατανομής του μεγέθους τους και την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του επιφανειακού φορτίου τους και της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε αυτά. Έτσι, προκύπτουν οι βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών, οι οποίες αφορούν διάλυμα χιτοζάνης με περιεκτικότητα 0.54 % w/v , διάλυμα αλγινικού με περιεκτικότητα 0.20 % w/v και διάλυμα NADES με περιεκτικότητα 4.9 % v/v . Ταυτόχρονα, για τις βέλτιστες αυτές τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών προκύπτουν και οι προβλεπόμενες από το στατιστικό μοντέλο τιμές των αποκρίσεων. Παρασκευάζονται, λοιπόν, νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης σύμφωνα με τις βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών, οπότε και επιβεβαιώνονται οι προβλεπόμενες τιμές των αποκρίσεων για ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Οι πειραματικές τιμές των αποκρίσεων παρατίθενται στον **Πίνακας 19**.

Πίνακας 19. Φυσικοχημικές ιδιότητες των βέλτιστων νανοσυστημάτων

| Size (<i>nm</i>) | PDI (–) | z – potential (<i>mV</i>) | EE% (–) |
|------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|
| 292.1±41.9 | 0.462±0.061 | +22.4±2.7 | 66 |

Έτσι, η παρασκευή τους θεωρείται επιτυχής, καθώς τα βέλτιστα νανοσυστήματα εμφανίζουν μέγεθος στη νανοκλίμακα με ικανοποιητικό δείκτη πολυδιασποράς και

θετικό ζ – δυναμικό, η απόλυτη τιμή του οποίου υποδεικνύει την σταθερότητά τους, ενώ το θετικό πρόσημό του την πετυχημένη επικάλυψη των νανοσωματιδίων αλγινικού με χιτοζάνη. Η τιμή της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε αυτά προσδιορισμένη με έμμεσο τρόπο κρίνεται ικανοποιητική, όπως και η αντίστοιχη τιμή της προσδιορισμένη με άμεσο τρόπο (52%) με τη μικρότερη τιμή της να οφείλεται στη χαμηλή διαλυτότητα της ναρινγίνης στο νερό που την καθιστά δύσκολα ανιχνεύσιμη σε υδατικό διάλυμα κατά τη φωτομέτρησή του.

Τα βέλτιστα κενά και με εγκλωβισμένη ναρινγίνη νανοσυστήματα μελετώνται δομικά μέσω φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier και αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR/FT – IR). Η ομοιότητα που παρατηρείται μεταξύ των φασμάτων τους, ώστε να μη διακρίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της εγκλωβισμένης ένωσης, υποδεικνύει τον επιτυχή εγκλωβισμό της ναρινγίνης στις νανοσφαίρες του συστήματος αλγινικού – χιτοζάνης. Ακόμη, οι τροποποιήσεις σε ζώνες απορρόφησης χαρακτηριστικών δεσμών των δύο αυτών φασμάτων με τα φάσματα των δύο βιοπολυμερών (χιτοζάνη και αλγινικό) οφείλονται στην επιτυχή πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση των δύο πολυσακχαριτών.

Η μελέτη της αποδέσμευσης της ναρινγίνης από τα βέλτιστα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης *in vitro* με τη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης – διάχυσης σε συνθήκες προσομοίωσης του ανθρώπινου δέρματος οδηγεί σε διφασικό προφίλ αποδέσμευσής της. Ειδικότερα, παρατηρείται ταχεία αποδέσμευση του 19% της συνολικής εγκλωβισμένης ποσότητάς της στις έξι πρώτες ώρες, ενώ σταδιακά το ποσοστό αποδέσμευσής της σταθεροποιείται, ώσπου σε συνολικό χρόνο μελέτης 120 h αποδεσμεύεται αθροιστικά το 43% της συνολικής εγκλωβισμένης ναρινγίνης. Αποδεικνύεται, έτσι, πως τα συστήματα αυτά παρέχουν τη δυνατότητα παρατεταμένης αποδέσμευσης του φαρμάκου. Το κινητικό μοντέλο που περιγράφει κατάλληλα την κινητική αποδέσμευσης της ναρινγίνης είναι το μοντέλο Higuchi, γεγονός που υποδηλώνει πως η αποδέσμευσή της βασίζεται στη διάχυση που υπακούει στον πρώτο νόμο του Fick. Ταυτόχρονα, η τιμή του εκθέτη διάχυσης n του κινητικού μοντέλου Korsmeyer – Peppas επιβεβαιώνει την ισοδυναμία των φαινομένων της Fickian διάχυσης και της χαλάρωσης των πολυμερικών αλυσίδων κατά την αποδέσμευση της ναρινγίνης από τα νανοσωματίδια.

Τα καινοτόμα νανοσυστήματα που αναπτύσσονται αξιολογούνται ακόμη ως προς τη δυνατότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, οπότε και προκύπτει πως η αποδεσμευμένη από τα νανοσυστήματα ναρινγίνη εμφανίζει μεγαλύτερη δράση (63%) από την ελεύθερη ναρινγίνη (49%) στις ίδιες συγκεντρώσεις (0.7 μM). Άρα, αποδεικνύεται πως η ναρινγίνη κατά τον εγκλωβισμό της διατηρεί την αντιοξειδωτική δράση της, αλλά και ο εγκλωβισμός της οδηγεί σε ενισχυμένη δράση αυτής.

Συγκρίνοντας τα βέλτιστα κενά και φορτωμένα με ναρινγίνη νανοσωματίδια διαπιστώνεται πως ο εγκλωβισμός της ναρινγίνης οδηγεί στη σταθεροποίησή τους παρουσιάζοντας υψηλότερο ζ – δυναμικό και κατ’ επέκταση στο σχηματισμό νανοσωματιδίων με μικρότερο μέγεθος. Ακόμη, τα στάδια της χρήσης υπερήχων με probe κατά την πειραματική διαδικασία σύνθεσής τους κρίνονται αναγκαία, ώστε να σχηματιστούν νανοσυστήματα με τις επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες. Αξιολογείται και η σταθερότητα των υδατικών διασπορών των νανοσωματιδίων για διάστημα εβδομήντα ημερών, κατά την οποία συμπεραίνεται ότι τα νανοσυστήματα είναι ιδιαίτερα σταθερά στην πάροδο του χρόνου για αποθήκευση αυτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ στην περίπτωση αποθήκευσής τους σε ψύξη παρατηρείται μεγάλη μείωση στο ζ – δυναμικό τους, η οποία οδηγεί σε συσσωμάτωση και αύξηση του μεγέθους τους.

Τέλος, κατά τη μελέτη της επίδρασης της χρήσης εναλλακτικών διαλυτών χιτοζάνης στο μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους, το ζ – δυναμικό και την απόδοση εγκλωβισμού των παραγόμενων νανοσυστημάτων συμπεραίνεται πως η χρήση του πράσινου NADES οδηγεί στο σχηματισμό νανοσυστημάτων με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τα αντίστοιχα που προκύπτουν με χρήση συμβατικών διαλυτών, όπως το γαλακτικό και το οξικό οξύ. Απεναντίας, η χρήση του φυσικού μίγματος Bet:LA (1:2) ως διαλύτη της χιτοζάνης δεν οδηγεί σε νανοσυστήματα με επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες. Αποδεικνύεται, λοιπόν, πως η χρήση του NADES, πέρα από τη χρήση του ως διαλύτη της χιτοζάνης, ενισχύει και βελτιώνει τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Η μελέτη εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης, όπως συμπεραίνεται από το σύνολο της παρούσας εργασίας, αποτελεί μία μελέτη με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον και ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Κρίνεται βέβαια σκόπιμο να διερευνηθεί εκτενέστερα, έτσι προτείνονται οι εξής μελλοντικοί στόχοι:

- Μελέτη της μορφολογίας των νανοσυστημάτων μέσω της τεχνικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης (TEM)
- Μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων των νανοσυστημάτων με χρήση της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) και της θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA)
- Μελέτη της σταθερότητας των νανοσυστημάτων σε βάθος χρόνου μεγαλύτερο των εβδομήντα ημερών όχι μόνο ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους και το ζ – δυναμικό τους, αλλά και ως προς την απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης σε αυτά
- Αξιολόγηση των βιολογικών δράσεων των νανοσυστημάτων με διάφορες βιοδοκιμές, π.χ. αντιφλεγμονώδης δράση, ικανότητα επούλωσης πληγών
- Παρασκευή των αντίστοιχων νανοσυστημάτων αλγινικού χωρίς την επικάλυψη της χιτοζάνης και συγκριτική τους μελέτη με τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους, το ζ – δυναμικό, την απόδοση εγκλωβισμού, τη μορφολογία τους, αλλά και την κινητική αποδέσμευσης της ναρινγίνης από αυτά
- Ενσωμάτωση των νανοσυστημάτων σε φαρμακοτεχνική μορφή

Προτείνεται η ενσωμάτωση των παραγόμενων νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης σε βιοσυμβατά φιλμ φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών – χιτοζάνης. Η βιοσυμβατή και βιοδιασπώμενη φύση μαζί με την ισχυρή αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση της χιτοζάνης καθιστούν τα φιλμ της ιδιαίτερα ενδιαφέροντα για χρήσεις στη φαρμακευτική βιομηχανία και συγκεκριμένα ως επιδέσμους για επούλωση πληγών. Μάλιστα, η ενσωμάτωση σε αυτά των νανοσυστημάτων με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη ναρινγίνη μπορεί να προσφέρει ελεγχόμενη αποδέσμευσή της, διατηρώντας σταθερά υψηλή τη συγκέντρωσή της στο ανθρώπινο σώμα και ενισχύοντας έτσι τη δράση της. Τα βιοσυμβατά αυτά φιλμ πρέπει να μελετηθούν ως προς τα χαρακτηριστικά τους, αλλά και την κινητική αποδέσμευσης της ναρινγίνης από αυτά.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Bayda, S.; Adeel, M.; Tuccinardi, T.; Cordani, M.; Rizzolio, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* **2019**, *25* (1). <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>.
- (2) Rafique, M.; Tahir, M. B.; Rafique, M. S.; Hamza, M. History and Fundamentals of Nanoscience and Nanotechnology. In *Nanotechnology and Photocatalysis for Environmental Applications*; Elsevier, 2020; pp 1–25. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821192-2.00001-2>.
- (3) Leon, L.; Chung, E. J.; Rinaldi, C. A Brief History of Nanotechnology and Introduction to Nanoparticles for Biomedical Applications. In *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications*; Elsevier, 2019; pp 1–4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00001-1>.
- (4) Sim, S.; Wong, N. K. Nanotechnology and Its Use in Imaging and Drug Delivery (Review). *Biomed Rep* **2021**, *14* (5). <https://doi.org/10.3892/br.2021.1418>.
- (5) Saallah, S.; Lenggoro, I. W. Nanoparticles Carrying Biological Molecules: Recent Advances and Applications. *KONA Powder and Particle Journal* **2018**, *35* (0), 89–111. <https://doi.org/10.14356/kona.2018015>.
- (6) Nikalje, A. P. Nanotechnology and Its Applications in Medicine. *Med Chem (Los Angeles)* **2015**, *5* (2). <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000247>.
- (7) Ho, J. Q.; Arabi, L.; Basu, M.; Khaled, F.; Gonzalez, Y.; Ghegelieu, D.; Javdani, N.; Aieneravaie, M.; Georgala, P.; Sepand, M. R.; Rafat, M.; Zanganeh, S. Nanotechnology and Nanomedicine. In *Nanomedicine for Ischemic Cardiomyopathy*; Elsevier, 2020; pp 9–21. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817434-0.00002-7>.
- (8) Saxena, S. K.; Khurana, S. M. P. *NanoBioMedicine*; Springer Singapore, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9898-9>.
- (9) Simonazzi, A.; Cid, A. G.; Villegas, M.; Romero, A. I.; Palma, S. D.; Bermúdez, J. M. Nanotechnology Applications in Drug Controlled Release. In *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*; Elsevier, 2018; pp 81–116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00003-3>.
- (10) George, A.; Shah, P. A.; Shrivastav, P. S. Natural Biodegradable Polymers Based Nano-Formulations for Drug Delivery: A Review. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V. April 20, 2019, pp 244–264. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.011>.
- (11) Sahu, T.; Ratre, Y. K.; Chauhan, S.; Bhaskar, L. V. K. S.; Nair, M. P.; Verma, H. K. Nanotechnology Based Drug Delivery System: Current Strategies and Emerging Therapeutic Potential for Medical Science. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Editions de Sante June 1, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102487>.

- (12) Attia, M. F.; Anton, N.; Wallyn, J.; Omran, Z.; Vandamme, T. F. An Overview of Active and Passive Targeting Strategies to Improve the Nanocarriers Efficiency to Tumour Sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Blackwell Publishing Ltd August 1, 2019, pp 1185–1198. <https://doi.org/10.1111/jphp.13098>.
- (13) Perrie Rades Thomas., Yvonne. *FASTtrack : Pharmaceuticals - Drug Delivery and Targeting.*; Pharmaceutical Press, 2012.
- (14) Patel, P.; Patel, V.; Patel, P. M. Synthetic Strategy of Dendrimers: A Review. *Journal of the Indian Chemical Society*. Elsevier B.V. July 1, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100514>.
- (15) Patel, V.; Patel, P.; Patel, J. v.; Patel, P. M. Dendrimer as a Versatile Platform for Biomedical Application: A Review. *Journal of the Indian Chemical Society*. Elsevier B.V. July 1, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100516>.
- (16) Mukherjee, S.; Mukherjee, S.; Abourehab, M. A. S.; Sahebkar, A.; Kesharwani, P. Exploring Dendrimer-Based Drug Delivery Systems and Their Potential Applications in Cancer Immunotherapy. *Eur Polym J* **2022**, *177*, 111471. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111471>.
- (17) Bigaj-Józefowska, M. J.; Grześkowiak, B. F. Polymeric Nanoparticles Wrapped in Biological Membranes for Targeted Anticancer Treatment. *Eur Polym J* **2022**, *176*, 111427. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111427>.
- (18) Javia, A.; Vanza, J.; Bardoliwala, D.; Ghosh, S.; Misra, L. A.; Patel, M.; Thakkar, H. Polymer-Drug Conjugates: Design Principles, Emerging Synthetic Strategies and Clinical Overview. *Int J Pharm* **2022**, *623*, 121863. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121863>.
- (19) Gagliardi, A.; Giuliano, E.; Venkateswararao, E.; Fresta, M.; Bulotta, S.; Awasthi, V.; Cosco, D. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Front Pharmacol* **2021**, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>.
- (20) Habibi, N.; Mauser, A.; Ko, Y.; Lahann, J. Protein Nanoparticles: Uniting the Power of Proteins with Engineering Design Approaches. *Advanced Science* **2022**, *9* (8), 2104012. <https://doi.org/10.1002/advs.202104012>.
- (21) Katopodi, A.; Detsi, A. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of Natural Products as Promising Systems for Their Bioactivity Enhancement: The Case of Essential Oils and Flavonoids. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2021**, *630*, 127529. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127529>.
- (22) Demetzos, C. *Pharmaceutical Nanotechnology*; Springer Singapore: Singapore, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0791-0>.
- (23) Ghezzi, M.; Pescina, S.; Padula, C.; Santi, P.; del Favero, E.; Cantù, L.; Nicoli, S. Polymeric Micelles in Drug Delivery: An Insight of the Techniques for Their Characterization and Assessment in Biorelevant Conditions.

- Journal of Controlled Release* **2021**, 332, 312–336.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.031>.
- (24) Tang, L.; Winkeljann, B.; Feng, S.; Song, J.; Liu, Y. Recent Advances in Superlubricity of Liposomes for Biomedical Applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2022**, 218, 112764.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112764>.
- (25) Dymek, M.; Sikora, E. Liposomes as Biocompatible and Smart Delivery Systems – The Current State. *Adv Colloid Interface Sci* **2022**, 102757.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102757>.
- (26) Lee, J. H.; Yeo, Y. Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers. *Chem Eng Sci* **2015**, 125, 75–84.
<https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>.
- (27) Son, G.-H.; Lee, B.-J.; Cho, C.-W. Mechanisms of Drug Release from Advanced Drug Formulations Such as Polymeric-Based Drug-Delivery Systems and Lipid Nanoparticles. *J Pharm Investig* **2017**, 47 (4), 287–296.
<https://doi.org/10.1007/s40005-017-0320-1>.
- (28) Kamaly, N.; Yameen, B.; Wu, J.; Farokhzad, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev* **2016**, 116 (4), 2602–2663.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>.
- (29) Mathematical Models of Drug Release. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*; Elsevier, 2015; pp 63–86.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.
- (30) Mircioiu, C.; Voicu, V.; Anuta, V.; Tudose, A.; Celia, C.; Paolino, D.; Fresta, M.; Sandulovici, R.; Mircioiu, I. Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* **2019**, 11 (3), 140. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030140>.
- (31) Carvalho, P. M.; Felício, M. R.; Santos, N. C.; Gonçalves, S.; Domingues, M. M. Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Front Chem* **2018**, 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00237>.
- (32) Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential – What They Are and What They Are Not? *Journal of Controlled Release* **2016**, 235, 337–351.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- (33) Falke, S.; Betzel, C. Dynamic Light Scattering (DLS); 2019; pp 173–193.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9_6.
- (34) Raval, N.; Maheshwari, R.; Kalyane, D.; Youngren-Ortiz, S. R.; Chougule, M. B.; Tekade, R. K. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*; Elsevier, 2019; pp 369–400.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>.
- (35) Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M. Impact of Particle

- Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10* (2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- (36) Jana, P.; Shyam, M.; Singh, S.; Jayaprakash, V.; Dev, A. Biodegradable Polymers in Drug Delivery and Oral Vaccination. *Eur Polym J* **2021**, *142*, 110155. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110155>.
- (37) Prajapati, S. K.; Jain, A.; Jain, A.; Jain, S. Biodegradable Polymers and Constructs: A Novel Approach in Drug Delivery. *Eur Polym J* **2019**, *120*, 109191. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.08.018>.
- (38) *Alginates in Drug Delivery*; Elsevier, 2020. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-02298-7>.
- (39) Hariyadi, D. M.; Islam, N. Current Status of Alginate in Drug Delivery. *Adv Pharmacol Pharm Sci* **2020**, *2020*, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2020/8886095>.
- (40) Gheorghita Puscaselu, R.; Lobiuc, A.; Dimian, M.; Covasa, M. Alginate: From Food Industry to Biomedical Applications and Management of Metabolic Disorders. *Polymers (Basel)* **2020**, *12* (10), 2417. <https://doi.org/10.3390/polym12102417>.
- (41) Giridhar Reddy, S. Alginates - A Seaweed Product: Its Properties and Applications. In *Properties and Applications of Alginates*; IntechOpen, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98831>.
- (42) Sami El-banna, F.; Mahfouz, M. E.; Leporatti, S.; El-Kemary, M.; A. N. Hanafy, N. Chitosan as a Natural Copolymer with Unique Properties for the Development of Hydrogels. *Applied Sciences* **2019**, *9* (11), 2193. <https://doi.org/10.3390/app9112193>.
- (43) Othman, S. I.; Alturki, A. M.; Abu-Taweel, G. M.; Altoom, N. G.; Allam, A. A.; Abdelmonem, R. Chitosan for Biomedical Applications, Promising Antidiabetic Drug Delivery System, and New Diabetes Mellitus Treatment Based on Stem Cell. *Int J Biol Macromol* **2021**, *190*, 417–432. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.154>.
- (44) de Araújo, J. T. C.; Tavares Junior, A. G.; di Filippo, L. D.; Duarte, J. L.; Ribeiro, T. de C.; Chorilli, M. Overview of Chitosan-Based Nanosystems for Prostate Cancer Therapy. *Eur Polym J* **2021**, *160*, 110812. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110812>.
- (45) Shoueir, K. R.; El-Desouky, N.; Rashad, M. M.; Ahmed, M. K.; Janowska, I.; El-Kemary, M. Chitosan Based-Nanoparticles and Nanocapsules: Overview, Physicochemical Features, Applications of a Nanofibrous Scaffold, and Bioprinting. *Int J Biol Macromol* **2021**, *167*, 1176–1197. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.072>.
- (46) Aranaz, I.; Alcántara, A. R.; Civera, M. C.; Arias, C.; Elorza, B.; Heras Caballero, A.; Acosta, N. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers (Basel)* **2021**, *13* (19), 3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>.

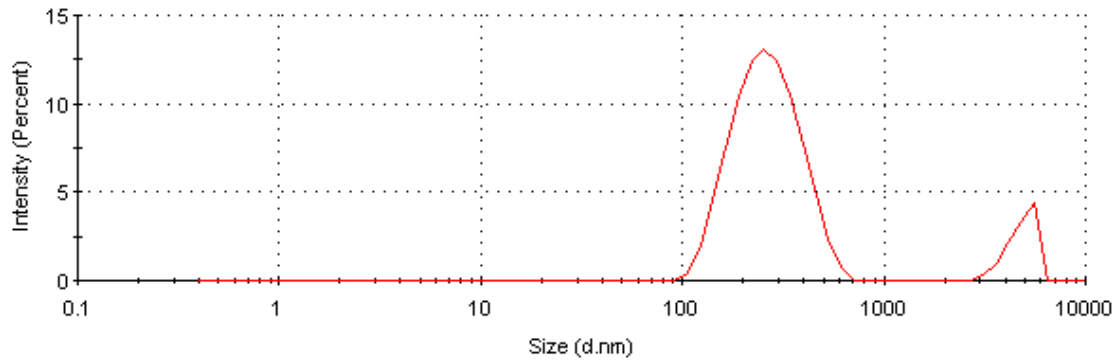
- (47) Detsi, A.; Kavetsou, E.; Kostopoulou, I.; Pitterou, I.; Pontillo, A. R. N.; Tzani, A.; Christodoulou, P.; Siliachli, A.; Zoumpoulakis, P. Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products: The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (7), 669. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070669>.
- (48) Katuwavila, N. P.; Perera, A. D. L. C.; Samarakoon, S. R.; Soysa, P.; Karunaratne, V.; Amaratunga, G. A. J.; Karunaratne, D. N. Chitosan-Alginate Nanoparticle System Efficiently Delivers Doxorubicin to MCF-7 Cells. *J Nanomater* **2016**, *2016*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/3178904>.
- (49) Li, S.; Zhang, H.; Chen, K.; Jin, M.; Vu, S. H.; Jung, S.; He, N.; Zheng, Z.; Lee, M.-S. Application of Chitosan/Alginate Nanoparticle in Oral Drug Delivery Systems: Prospects and Challenges. *Drug Deliv* **2022**, *29* (1), 1142–1149. <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2058646>.
- (50) Schoeller, J.; Itel, F.; Wuertz-Kozak, K.; Gaiser, S.; Luisier, N.; Hegemann, D.; Ferguson, S. J.; Fortunato, G.; Rossi, R. M. PH-Responsive Chitosan/Alginate Polyelectrolyte Complexes on Electrospun PLGA Nanofibers for Controlled Drug Release. *Nanomaterials* **2021**, *11* (7), 1850. <https://doi.org/10.3390/nano11071850>.
- (51) Niculescu, A.-G.; Grumezescu, A. M. Applications of Chitosan-Alginate-Based Nanoparticles—An Up-to-Date Review. *Nanomaterials* **2022**, *12* (2), 186. <https://doi.org/10.3390/nano12020186>.
- (52) Choukaife, H.; Doolaanea, A. A.; Alfatama, M. Alginate Nanoformulation: Influence of Process and Selected Variables. *Pharmaceutics* **2020**, *13* (11), 335. <https://doi.org/10.3390/ph13110335>.
- (53) de Marco, B. A.; Rechelo, B. S.; Tótolí, E. G.; Kogawa, A. C.; Salgado, H. R. N. Evolution of Green Chemistry and Its Multidimensional Impacts: A Review. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2019**, *27* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>.
- (54) Becker, J.; Manske, C.; Randl, S. Green Chemistry and Sustainability Metrics in the Pharmaceutical Manufacturing Sector. *Curr Opin Green Sustain Chem* **2022**, *33*, 100562. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100562>.
- (55) Janicka, P.; Płotka-Wasyłka, J.; Jatkowska, N.; Chabowska, A.; Fares, M. Y.; Andruch, V.; Kaykhaili, M.; Gębicki, J. Trends in the New Generation of Green Solvents in Extraction Processes. *Curr Opin Green Sustain Chem* **2022**, 100670. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100670>.
- (56) Singh, S. K.; Savoy, A. W. Ionic Liquids Synthesis and Applications: An Overview. *J Mol Liq* **2020**, *297*, 112038. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112038>.
- (57) Lomba, L.; Ribate, P.; Sangüesa, E.; Concha, J.; Garralaga, P.; Errazquin, D.; García, C. B.; Giner, B. Deep Eutectic Solvents: Are They Safe? **2021**. <https://doi.org/10.3390/app>.

- (58) Liu, Y.; Friesen, J. B.; McAlpine, J. B.; Lankin, D. C.; Chen, S.-N.; Pauli, G. F. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod* **2018**, *81* (3), 679–690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>.
- (59) Hansen, B. B.; Spittle, S.; Chen, B.; Poe, D.; Zhang, Y.; Klein, J. M.; Horton, A.; Adhikari, L.; Zelovich, T.; Doherty, B. W.; Gurkan, B.; Maginn, E. J.; Ragauskas, A.; Dadmun, M.; Zawodzinski, T. A.; Baker, G. A.; Tuckerman, M. E.; Savinell, R. F.; Sangoro, J. R. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem Rev* **2021**, *121* (3), 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>.
- (60) Omar, K. A.; Sadeghi, R. Physicochemical Properties of Deep Eutectic Solvents: A Review. *J Mol Liq* **2022**, *360*, 119524. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119524>.
- (61) Yang, Z. Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology; 2018; pp 31–59. https://doi.org/10.1007/10_2018_67.
- (62) Zainal-Abidin, M. H.; Hayyan, M.; Ngoh, G. C.; Wong, W. F.; Looi, C. Y. Emerging Frontiers of Deep Eutectic Solvents in Drug Discovery and Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release* **2019**, *316*, 168–195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.09.019>.
- (63) Patra, J. K.; Das, G.; Fraceto, L. F.; Campos, E. V. R.; Rodriguez-Torres, M. D. P.; Acosta-Torres, L. S.; Diaz-Torres, L. A.; Grillo, R.; Swamy, M. K.; Sharma, S.; Habtemariam, S.; Shin, H. S. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects 10 Technology 1007 Nanotechnology 03 Chemical Sciences 0306 Physical Chemistry (Incl. Structural) 03 Chemical Sciences 0303 Macromolecular and Materials Chemistry 11 Medical and Health Sciences 1115 Pharmacology and Pharmaceutical Sciences 09 Engineering 0903 Biomedical Engineering Prof Ueli Aebi, Prof Peter Gehr. *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd. September 19, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- (64) Xu, B.; Watkins, R.; Wu, L.; Zhang, C.; Davis, R. Natural Product-Based Nanomedicine: Recent Advances and Issues. *Int J Nanomedicine* **2015**, *6055*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S92162>.
- (65) Enrico, C. Nanotechnology-Based Drug Delivery of Natural Compounds and Phytochemicals for the Treatment of Cancer and Other Diseases; 2019; pp 91–123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64185-4.00003-4>.
- (66) Renault–Mahieux, M.; Mignet, N.; Seguin, J.; Alhareth, K.; Paul, M.; Andrieux, K. Co–Encapsulation of Flavonoids with Anti–Cancer Drugs: A Challenge Ahead. *Int J Pharm* **2022**, *623*, 121942. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121942>.
- (67) Awouafack, M. D.; Tane, P.; Morita, H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*; InTech, 2017. <https://doi.org/10.5772/67881>.

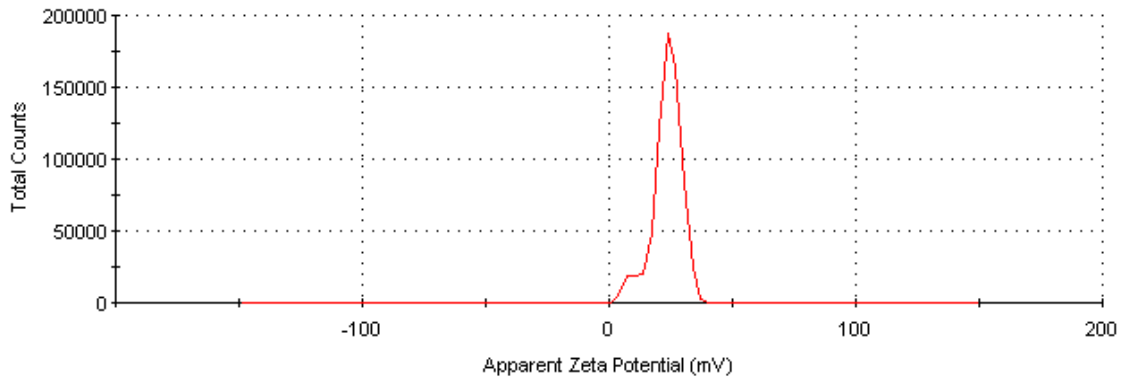
- (68) Dias, M. C.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>.
- (69) Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: An Overview. *Journal of Nutritional Science*. Cambridge University Press January 8, 2016. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- (70) Sharma, P.; Kumar, V.; Guleria, P. Naringin: Biosynthesis and Pharmaceutical Applications. *Indian J Pharm Sci* **2019**, *81* (6). <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.596>.
- (71) Ansari, B.; Aschner, M.; Hussain, Y.; Efferth, T.; Khan, H. Suppression of Colorectal Carcinogenesis by Naringin. *Phytomedicine* **2022**, *96*, 153897. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153897>.
- (72) Sharma, A.; Bhardwaj, P.; Arya, S. K. Naringin: A Potential Natural Product in the Field of Biomedical Applications. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* **2021**, *2*, 100068. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100068>.
- (73) Caballero, S.; Li, Y. O.; McClements, D. J.; Davidov-Pardo, G. Encapsulation and Delivery of Bioactive Citrus Pomace Polyphenols: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2021**, 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1922873>.
- (74) Chen, R.; Qi, Q.-L.; Wang, M.-T.; Li, Q.-Y. Therapeutic Potential of Naringin: An Overview. *Pharm Biol* **2016**, *54* (12), 3203–3210. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1216131>.
- (75) Lavrador, P.; Gaspar, V. M.; Mano, J. F. Bioinspired Bone Therapies Using Naringin: Applications and Advances. *Drug Discov Today* **2018**, *23* (6), 1293–1304. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.012>.
- (76) Mohanty, S.; Konkimalla, V. B.; Pal, A.; Sharma, T.; Si, S. C. Naringin as Sustained Delivery Nanoparticles Ameliorates the Anti-Inflammatory Activity in a Freund's Complete Adjuvant-Induced Arthritis Model. *ACS Omega* **2021**, *6* (43), 28630–28641. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03066>.
- (77) Natrajan, D.; Srinivasan, S.; Sundar, K.; Ravindran, A. Formulation of Essential Oil-Loaded Chitosan–Alginate Nanocapsules. *J Food Drug Anal* **2015**, *23* (3), 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.001>.
- (78) Rivera, M. C.; Pinheiro, A. C.; Bourbon, A. I.; Cerqueira, M. A.; Vicente, A. A. Hollow Chitosan/Alginate Nanocapsules for Bioactive Compound Delivery. *Int J Biol Macromol* **2015**, *79*, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.003>.
- (79) Scolari, I. R.; Páez, P. L.; Sánchez-Borzone, M. E.; Granero, G. E. Promising Chitosan-Coated Alginate-Tween 80 Nanoparticles as Rifampicin Coadministered Ascorbic Acid Delivery Carrier Against Mycobacterium Tuberculosis. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20* (2), 67. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1278-7>.
- (80) Bieberle-Hütter, A.; Bronneberg, A. C.; George, K.; van de Sanden, M. C. M. Operando Attenuated Total Reflection Fourier-Transform Infrared (ATR-

- FTIR) Spectroscopy for Water Splitting. *J Phys D Appl Phys* **2021**, *54* (13), 133001. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/abd435>.
- (81) Mohd Fuad, F.; Mohd Nadzir, M. The Formulation and Physicochemical Properties of Betaine-Based Natural Deep Eutectic Solvent. *J Mol Liq* **2022**, *360*, 119392. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119392>.
- (82) Kaur, I.; Agnihotri, S.; Goyal, D. Fabrication of Chitosan–Alginate Nanospheres for Controlled Release of Cartap Hydrochloride. *Nanotechnology* **2022**, *33* (2), 025701. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ac2d4c>.

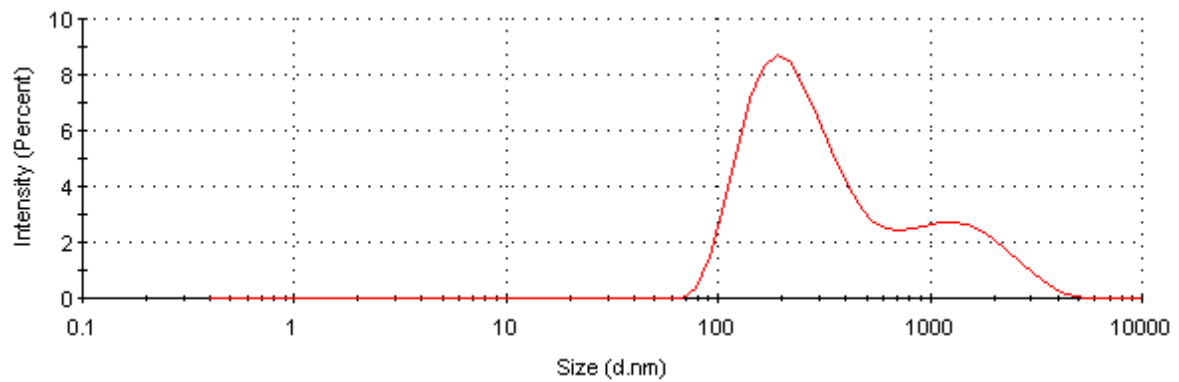
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



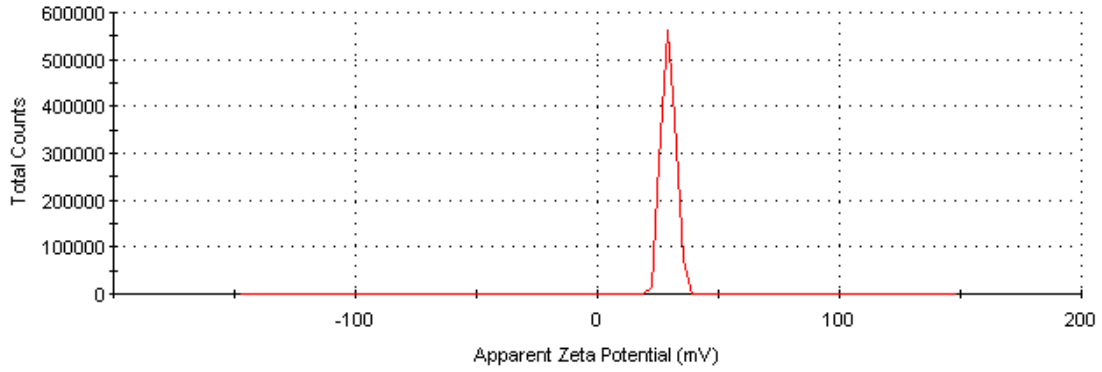
Διάγραμμα 35. Κατανομή μεγέθους των νανοσυστημάτων του πειράματος 9 του πειραματικού σχεδιασμού



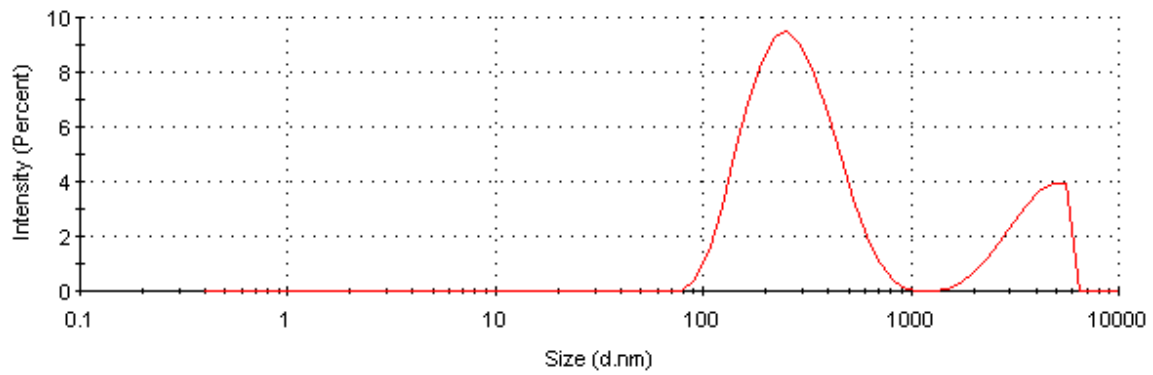
Διάγραμμα 36. Z – δυναμικό των νανοσυστημάτων του πειράματος 9 του πειραματικού σχεδιασμού



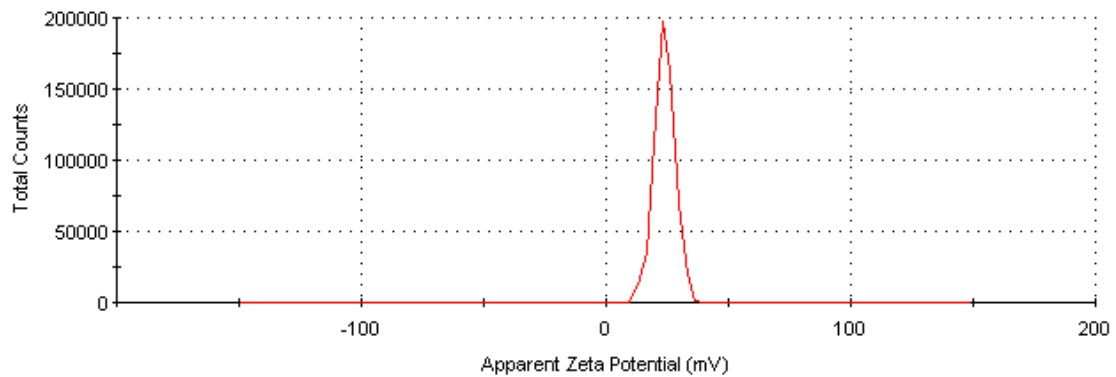
Διάγραμμα 37. Κατανομή μεγέθους των νανοσυστημάτων του πειράματος 10 του πειραματικού σχεδιασμού



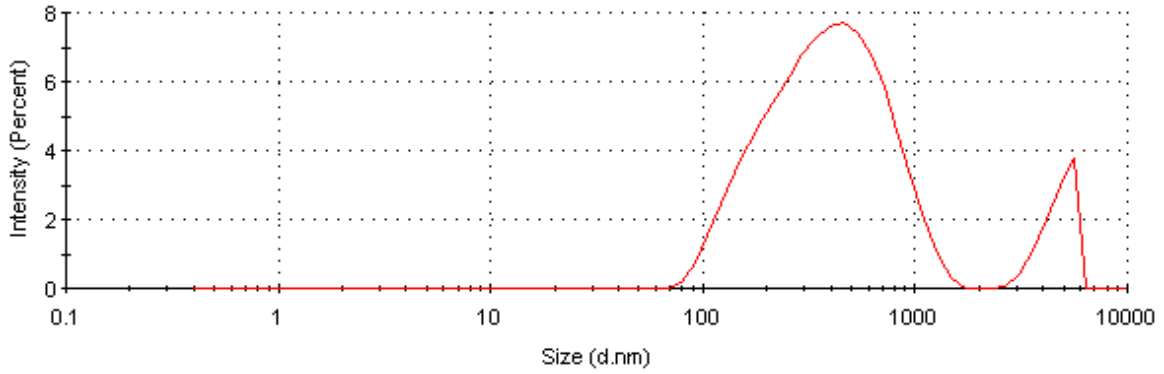
Διάγραμμα 38. Z – δυναμικό των νανοσυστημάτων του πειράματος 10 του πειραματικού σχεδιασμού



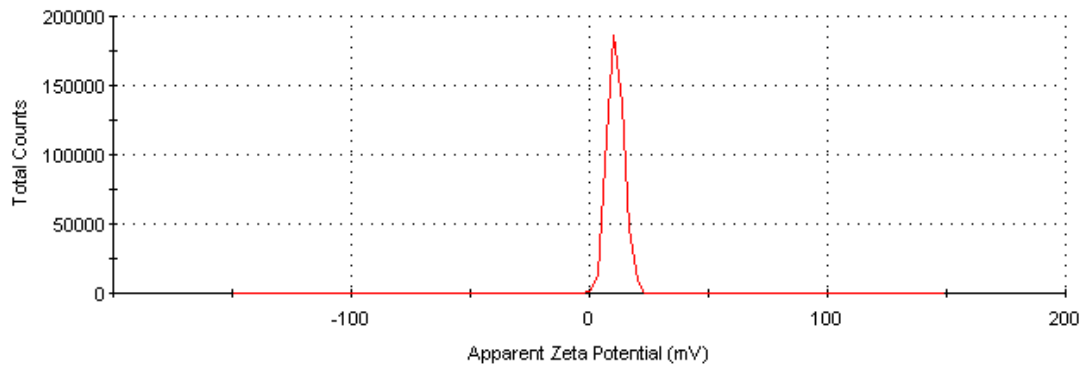
Διάγραμμα 39. Κατανομή μεγέθους των βέλτιστων νανοσυστημάτων



Διάγραμμα 40. Z – δυναμικό των βέλτιστων νανοσυστημάτων



Διάγραμμα 41. Κατανομή μεγέθους των βέλτιστων κενών νανοσυστημάτων



Διάγραμμα 42. Z – δυναμικό των βέλτιστων κενών νανοσυστημάτων

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

| | |
|---|----|
| Διάγραμμα 1. Φάσμα ^1H NMR του NADES Bet:LA (1:2) (600 MHz, DMSO – d_6) | 50 |
| Διάγραμμα 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της ναρινγίνης σε αιθανόλη..... | 59 |
| Διάγραμμα 3. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος χιτοζάνης με το μέγεθος των νανοσυστημάτων..... | 73 |
| Διάγραμμα 4. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος αλγινικού με το μέγεθος των νανοσυστημάτων..... | 74 |
| Διάγραμμα 5. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NADES με το μέγεθος των νανοσυστημάτων..... | 74 |
| Διάγραμμα 6. Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών του μεγέθους των νανοσυστημάτων | 76 |
| Διάγραμμα 7. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος χιτοζάνης με το δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων | 77 |
| Διάγραμμα 8. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος αλγινικού με το δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων | 77 |
| Διάγραμμα 9. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NADES με το δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων | 78 |
| Διάγραμμα 10. Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών του δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων | 80 |
| Διάγραμμα 11. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος χιτοζάνης με το ζ – δυναμικό των νανοσυστημάτων | 81 |
| Διάγραμμα 12. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος αλγινικού με το ζ – δυναμικό των νανοσυστημάτων | 81 |
| Διάγραμμα 13. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NADES με το ζ – δυναμικό των νανοσυστημάτων | 82 |
| Διάγραμμα 14. Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών του ζ – δυναμικού των νανοσυστημάτων..... | 84 |
| Διάγραμμα 15. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος χιτοζάνης με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων | 85 |
| Διάγραμμα 16. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος αλγινικού με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων | 85 |
| Διάγραμμα 17. Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NADES με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων | 86 |
| Διάγραμμα 18. Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών της απόδοσης εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων..... | 88 |
| Διάγραμμα 19. 3D επιφάνεια του μεγέθους των νανοσυστημάτων συναρτήσει των μεταβλητών A και B και για βέλτιστο C | 89 |
| Διάγραμμα 20. 3D επιφάνεια του δείκτη πολυδιασποράς των νανοσυστημάτων συναρτήσει των μεταβλητών A και B και για βέλτιστο C | 89 |
| Διάγραμμα 21. 3D επιφάνεια του ζ – δυναμικού των νανοσυστημάτων συναρτήσει των μεταβλητών A και B και για βέλτιστο C | 90 |

| | |
|---|-----|
| Διάγραμμα 22. 3D επιφάνεια της απόδοσης εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων συναρτήσει των μεταβλητών A και B και για βέλτιστο C | 90 |
| Διάγραμμα 23. Στιβαγμένα φάσματα ATR/FT – IR της βεταΐνης, του γαλακτικού οξέος και του NADES Bet:LA (1:2)..... | 94 |
| Διάγραμμα 24. Φάσμα ATR/FT – IR της ναρινγίνης | 95 |
| Διάγραμμα 25. Φάσμα ATR/FT – IR του αλγινικού νατρίου..... | 96 |
| Διάγραμμα 26. Φάσμα ATR/FT – IR της χιτοζάνης | 97 |
| Διάγραμμα 27. Φάσμα ATR/FT – IR των βέλτιστων κενών νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης..... | 98 |
| Διάγραμμα 28. Φάσμα ATR/FT – IR των βέλτιστων νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη δραστική ουσία τη ναρινγίνη | 99 |
| Διάγραμμα 29. Προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης <i>in vitro</i> από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης για pH 5.5 και θερμοκρασία 32°C..... | 100 |
| Διάγραμμα 30. Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης <i>in vitro</i> από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης στο κινητικό μοντέλο μηδενικής τάξης..... | 100 |
| Διάγραμμα 31. Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης <i>in vitro</i> από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης στο κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης..... | 101 |
| Διάγραμμα 32. Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης <i>in vitro</i> από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης στο κινητικό μοντέλο Higuchi | 101 |
| Διάγραμμα 33. Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της ναρινγίνης <i>in vitro</i> από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης στο κινητικό μοντέλο Korsmeyer – Peppas..... | 102 |
| Διάγραμμα 34. Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των εξεταζόμενων ενώσεων για συγκεκριμένη συγκέντρωση αυτών και του νανοφορέα για συνολική μελέτη του φαινομένου για 1 min | 103 |
| Διάγραμμα 35. Κατανομή μεγέθους των νανοσυστημάτων του πειράματος 9 του πειραματικού σχεδιασμού | 122 |
| Διάγραμμα 36. Z – δυναμικό των νανοσυστημάτων του πειράματος 9 του πειραματικού σχεδιασμού | 122 |
| Διάγραμμα 37. Κατανομή μεγέθους των νανοσυστημάτων του πειράματος 10 του πειραματικού σχεδιασμού | 122 |
| Διάγραμμα 38. Z – δυναμικό των νανοσυστημάτων του πειράματος 10 του πειραματικού σχεδιασμού | 123 |
| Διάγραμμα 39. Κατανομή μεγέθους των βέλτιστων νανοσυστημάτων | 123 |
| Διάγραμμα 40. Z – δυναμικό των βέλτιστων νανοσυστημάτων | 123 |
| Διάγραμμα 41. Κατανομή μεγέθους των βέλτιστων κενών νανοσυστημάτων .. | 124 |
| Διάγραμμα 42. Z – δυναμικό των βέλτιστων κενών νανοσυστημάτων..... | 124 |

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1. Γραφική περίληψη | 3 |
| Εικόνα 2. Graphical abstract | 5 |
| Εικόνα 3. Σύγκριση των διαστάσεων συνήθων νανοδομών με τις διαστάσεις μορίων, κυττάρων και αντικειμένων ⁵ | 11 |
| Εικόνα 4. Παραδείγματα εφαρμογών της νανοτεχνολογίας στην Ιατρική και τη Φαρμακευτική ⁸ | 12 |
| Εικόνα 5. Μερικά από τα κύρια πλεονεκτήματα των νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων ⁹ | 13 |
| Εικόνα 6. Διάφορα νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων ⁸ | 14 |
| Εικόνα 7. Η δομή ενός δενδριμερούς ¹⁴ | 15 |
| Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της μορφολογίας των δύο τύπων στερεών πολυμερικών νανოსωματιδίων ¹⁹ | 17 |
| Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση πολυμερικού μικυλλίου ως νανοσύστημα μεταφοράς φαρμάκων ²³ | 19 |
| Εικόνα 10. Οι διάφοροι τύποι λιποσωμάτων ²⁴ | 20 |
| Εικόνα 11. Μηχανισμοί αποδέσμευσης δραστικών ουσιών από νανοσυστήματα ²⁶ | 22 |
| Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση αρχής λειτουργίας της δυναμικής σκέδασης φωτός ³² | 27 |
| Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση του ζ – δυναμικού ³¹ | 28 |
| Εικόνα 14. Χημική δομή αλγινικού οξέος | 29 |
| Εικόνα 15. Χημική δομή της χιτοζάνης ⁴² | 31 |
| Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με τη μέθοδο της πολυηλεκτρολυτικής συμπλοκοποίησης ⁵² | 34 |
| Εικόνα 17. Οι δώδεκα αρχές της πράσινης χημείας ⁵³ | 35 |
| Εικόνα 18. Χημική δομή και υποκατηγορίες των φλαβονοειδών ⁶⁶ | 40 |
| Εικόνα 19. Χημική δομή της ναρινγίνης ⁷⁰ | 42 |
| Εικόνα 20. Βιοσύνθεση της ναρινγίνης μέσω της φαινυλοπροπανοειδούς οδού ⁷⁰ | 43 |
| Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση των βιολογικών δράσεων της ναρινγίνης ⁷⁵ | 45 |
| Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση της ανάγκης ανάπτυξης συστημάτων μεταφοράς πολυφαινολών, όπως η ναρινγίνη | 46 |
| Εικόνα 23. Μελέτη αποδέσμευσης <i>in vitro</i> της ναρινγίνης από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χιτοζάνης με τη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης – διάχυσης..... | 66 |
| Εικόνα 24. Λυοφιλοποιημένα νανოსωματίδια αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη ναρινγίνη από τα προκαταρκτικά πειράματα | 69 |
| Εικόνα 25. Λυοφιλοποιημένα νανოსωματίδια αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένη ναρινγίνη από πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού..... | 72 |
| Εικόνα 26. Βέλτιστα λυοφιλοποιημένα νανοςωματίδια | 92 |

Εικόνα 27. Βέλτιστα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια με χρήση ως διαλύτη χιτοζάνης το φυσικό μίγμα Bet:LA (1:2), το οξικό και το γαλακτικό οξύ..... 108

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|--|-----|
| Πίνακας 1. Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για την παρασκευή και το χαρακτηρισμό των ναοσυστημάτων | 48 |
| Πίνακας 2. Χρησιμοποιούμενα όργανα και συσκευές για την παρασκευή και το χαρακτηρισμό των ναοσυστημάτων | 49 |
| Πίνακας 3. Απορροφήσεις διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων ναρινγίνης σε αιθανόλη | 59 |
| Πίνακας 4. Όρια των ανεξάρτητων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού. | 69 |
| Πίνακας 5. Προτεινόμενα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού..... | 70 |
| Πίνακας 6. Οι τιμές των αποκρίσεων για τα δεκαπέντε εκτελεσμένα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού | 71 |
| Πίνακας 7. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει το μέγεθος των ναοσυστημάτων..... | 75 |
| Πίνακας 8. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει το δείκτη πολυδιασποράς των ναοσυστημάτων | 79 |
| Πίνακας 9. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει το ζ – δυναμικό των ναοσυστημάτων | 83 |
| Πίνακας 10. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την απόδοση εγκλωβισμού των ναοσυστημάτων..... | 87 |
| Πίνακας 11. Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της διεργασίας σύνθεσης των ναοσυστημάτων | 89 |
| Πίνακας 12. Πειραματικές τιμές των αποκρίσεων και σύγκριση αυτών με τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές τους..... | 91 |
| Πίνακας 13. Επιβεβαίωση του μοντέλου για διάστημα εμπιστοσύνης 95% | 91 |
| Πίνακας 14. Απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης στα βέλτιστα ναοσυστήματα υπολογισμένη με άμεσο τρόπο | 92 |
| Πίνακας 15. Μέγεθος, κατανομή του μεγέθους και ζ – δυναμικό των βέλτιστων κενών και φορτωμένων με ναρινγίνη ναοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης . | 104 |
| Πίνακας 16. Μέγεθος, κατανομή του μεγέθους και ζ – δυναμικό των βέλτιστων ναοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης και των αντίστοιχων ναοσυστημάτων με παραλειπόμενα στάδια χρήσης υπερήχων | 105 |
| Πίνακας 17. Μέγεθος, κατανομή του μεγέθους, ζ – δυναμικό και απόδοση εγκλωβισμού των βέλτιστων ναοσυστημάτων με χρήση διαφορετικών διαλυτών χιτοζάνης..... | 107 |
| Πίνακας 18. Μελέτη σταθερότητας των υδατικών διασπορών των βέλτιστων ναοσυστημάτων ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους και το ζ – δυναμικό | 108 |
| Πίνακας 19. Φυσικοχημικές ιδιότητες των βέλτιστων ναοσυστημάτων..... | 110 |

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

| | |
|--|----|
| Σχήμα 1. Τα προφίλ της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα στην περίπτωση λήψης μίας δόσης φαρμάκου, πολλαπλών δόσεων και ελεγχόμενης αποδέσμευσης μηδενικής τάξης ²⁶ | 21 |
| Σχήμα 2. Προφίλ αποδέσμευσης δραστικής ουσίας από νανοσυστήματα ²⁸ | 23 |
| Σχήμα 3. Σύγκριση προφίλ αποδέσμευσης δραστικής ουσίας από νανοσυστήματα με παρατήρηση του burst effect και με μηδενικής τάξης αποδέσμευση ²⁸ | 23 |
| Σχήμα 4. Σχηματικό διάγραμμα του ευτηκτικού σημείου δύο συστατικών ⁵⁸ | 36 |
| Σχήμα 5. Πειραματική διαδικασία σύνθεσης του NADES Bet:LA (1:2) | 50 |
| Σχήμα 6. Πειραματική διαδικασία παρασκευής του διαλύματος αλγινικού νατρίου | 52 |
| Σχήμα 7. Πειραματική διαδικασία παρασκευής του διαλύματος χιτοζάνης | 52 |
| Σχήμα 8. Πειραματική διαδικασία σύνθεσης των νανοσυστημάτων αλγινικού – χιτοζάνης με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη ναρινγίνη | 55 |