



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

Διπλωματική εργασία

Βιοσυμβατά ιοντικά υγρά ως φορείς του φλαβονοειδούς χρυσίνη

Βουτσά Ασπασία

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Αναστασία Δέτση, Καθηγήτρια στη Σχολή Χημικών
Μηχανικών

Αθήνα, Ιούλιος 2023



NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS

SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING

DEPARTMENT I: CHEMICAL SCIENCES

ORGANIC CHEMISTRY LABORATORY

Diploma Thesis

Biocompatible ionic liquids as carriers of the flavonoid chrysin

Voutsas Aspasia

Supervisor: Anastasia Detsi, Professor

Athens, July 2023

Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Αναστασίας Δέτση. Θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Αναστασία Δέτση για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Επίσης, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τις ΥΔ Στυλιανή Καλαφατέλη και Ιωάννα Πιττερού για την πολύτιμη βοήθειά τους και τις συμβουλές τους.

Περίληψη

Είναι σημείο των καιρών η τάση που διέπει την ανθρώπινη σκέψη προς στροφή σε έναν πιο «πράσινο» τρόπο ζωής, πιο βιώσιμο. Έτσι και η χημική βιομηχανία αναζητά τρόπους και μέσα για το σχεδιασμό πράσινων τεχνολογιών και βιώσιμων προϊόντων. Η παρούσα εργασία κινείται στους άξονες της Πράσινης Χημείας και Μηχανικής και της Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας, αξιοποιώντας φιλικότερους για το περιβάλλον και τον άνθρωπο διαλύτες για τον εγκλεισμό και την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της βιοδραστικής ένωσης χρυσίνης.

Η χρυσίνη αποτελεί μια βιολογικά ενεργή ουσία γνωστή για τις αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητές της. Όμως, εμπόδιο στην ευρεία χρήση της ως φαρμάκου είναι η υδροφοβικότητά της. Επειδή είναι πρακτικώς αδιάλυτη στο νερό, το ανθρώπινο σώμα δεν μπορεί να τη μεταβολίσει, οπότε χαρακτηρίζεται από χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Για αυτό το λόγο, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη συστημάτων χορήγησής της, τα οποία αυξάνουν την υδροφιλικότητά της, καθιστώντας την ικανή να απορροφηθεί από τον οργανισμό και έτσι εκείνος να καρπωθεί τα φαρμακευτικά της οφέλη.

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES) και τα ιοντικά υγρά (Ionic Liquids, ILs) αποτελούν δύο υποσχόμενες κατηγορίες πράσινων διαλυτών με, γενικά, χαμηλή τοξικότητα, υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα, αμελητέα πτητικότητα, μεγάλη ποικιλία και ευρύ φάσμα εφαρμογών. Στην παρούσα εργασία συνετέθησαν δύο πράσινοι διαλύτες με βάση τα συστατικά χολίνη και γερανικό οξύ σε δύο μοριακές αναλογίες: οι Choline Geranate (CAGE) 1:1 και CAGE 1:2. Το CAGE 1:1 είναι καθαρά ιοντικό υγρό (αποτελούμενο από ένα μέρος χολίνης και ένα μέρος γερανικού οξέος), ενώ το CAGE 1:2 (αποτελούμενο από ένα μέρος χολίνης και δύο μέρη γερανικού οξέος) εμφανίζει ιδιότητες ιοντικών υγρών και βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Είναι γνωστό ότι οι δύο αυτοί πράσινοι διαλύτες εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, χαμηλή κυτταροτοξικότητα και υψηλή διαλυτική ικανότητα για μια πληθώρα ουσιών. Δημιουργούν νανοσωματίδια μικκυλιακού χαρακτήρα στην κατάλληλη αναλογία με υδατικά διαλύματα (>66% περίσσεια σε υδατικό διάλυμα) και συνεπώς καθίστανται ικανά για χρήση στον τομέα της βιοϊατρικής για διαδερμική χορήγηση.

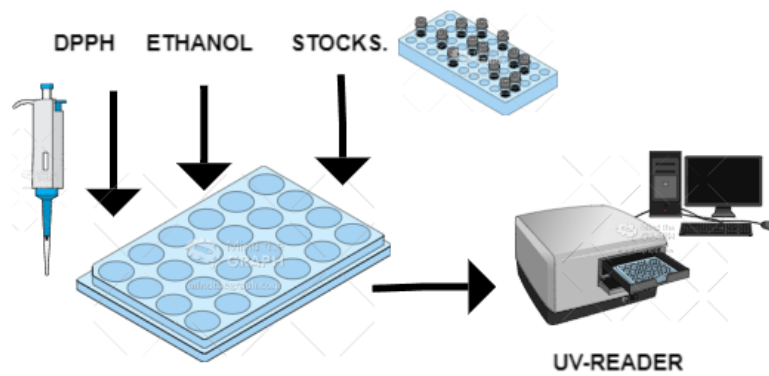
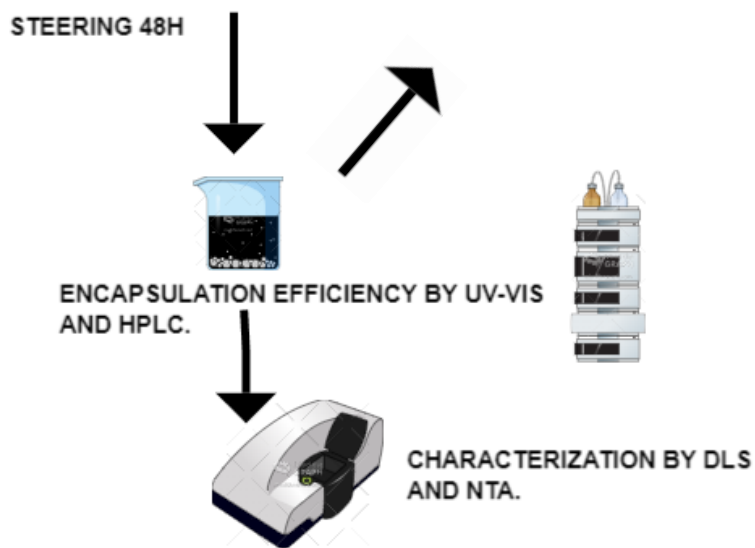
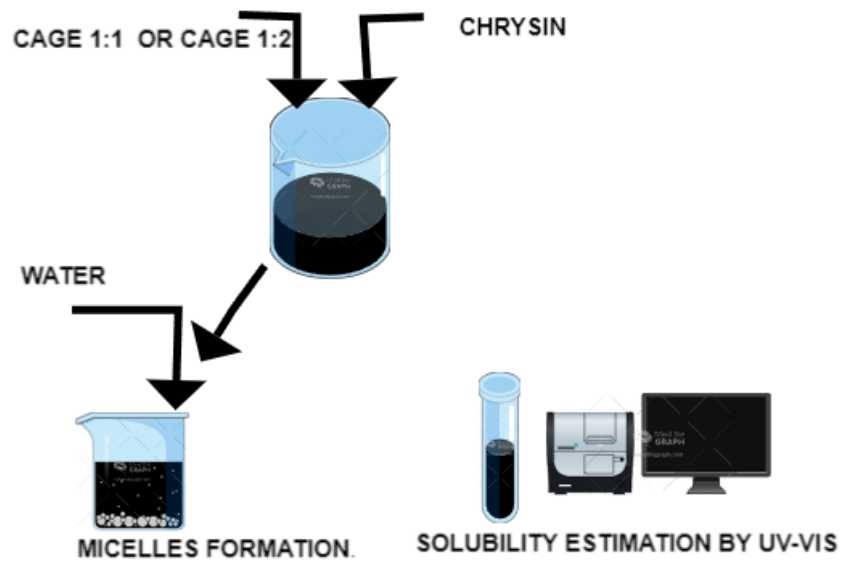
Αρχικά αποδείχθηκε ότι οι δύο αυτοί διαλύτες αυξάνουν τη διαλυτότητα της υδρόφοβης χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα έως και 192 φορές. Το CAGE 1:2 φάνηκε αποδοτικότερο στην αύξηση της διαλυτότητάς της (αφού την αυξάνει έως και 192 φορές) συγκριτικά με το CAGE 1:1 (το οποίο την αυξάνει έως και 134 φορές). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός της χρυσίνης σε μικκύλια των δύο αυτών διαλυτών σε υδατικό μέσο σε διάφορες αναλογίες φόρτωσης (drug loading) και τα συστήματα που προκύπτουν αξιολογούνται με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS) και Ανάλυση Παρακολούθησης Νανοσωματιδίων (NTA). Τα συστήματα εγκλεισμών παρουσιάζουν σταθερότητα και πολυδιασπορά.

Τέλος, τα νανοσυστήματα μεταφοράς της χρυσίνης μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και πιο συγκεκριμένα ως προς την ικανότητα σάρωσής τους ελευθέρων ριζών. Η

μελέτη αυτή διεξήχθη *in vitro* με τη μέθοδο δοκιμής DPPH. Διαπιστώθηκε ότι τα συστήματα δεν εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Παρόλα αυτά, η παρούσα μελέτη δίνει ενθαρρυντικά αποτελέσματα για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τον εγκλεισμό φαρμακευτικών ουσιών στους δύο αυτούς πράσινους διαλύτες.

Λέξεις-κλειδιά: ιοντικά υγρά, (φυσικοί) βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, CAGE (1:2), CAGE (1:1), χρυσίνη, εγκλεισμός, νανοσωματίδια NTA

Graphical Abstract



Abstract

It is a sign of the times that the trend in human thinking is shifting towards a greener, more sustainable way of life. Thus, the chemical industry is also looking for ways and means to design green technologies and sustainable products. The present work is along the lines of Green Chemistry and Engineering and Pharmaceutical Nanotechnology, utilizing environmentally and human friendly solvents for the encapsulation and increasing the bioavailability of the bioactive compound chrysin.

Chrysin is a biologically active substance known for its anti-inflammatory, anti-cancer and antioxidant properties. However, an obstacle to its widespread use as a drug is its hydrophobicity. Due to the fact that it is practically insoluble in water, the human body cannot metabolise it, so it is characterised by low bioavailability. For this reason, it is necessary to develop delivery systems that increase its hydrophilicity, making it capable of being absorbed by the body and thus enabling it to reap its medicinal benefits.

Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and Ionic Liquids (ILs) are two promising categories of green solvents with, in general, low toxicity, high biodegradability, negligible volatility, a wide variety and a wide range of applications. In the present work, two green solvents based on the components choline and geranic acid were synthesized in two molar ratios: the CAGE 1:1 and CAGE 1:2. CAGE 1:1 is purely an ionic liquid, while CAGE 1:2 exhibits properties of ionic liquids and deep eutectic solvents. These two green solvents are known to exhibit antimicrobial properties, low cytotoxicity and high solubility for a variety of substances. They form nanoparticles of micelle character in the appropriate proportion with aqueous solutions (>66% excess in aqueous solution) and thus become suitable for use in the field of biomedicine in transdermal administration.

Initially, these two solvents were shown to increase the solubility of hydrophobic chrysin in aqueous solution up to 192-fold. CAGE 1:2 appeared to be more efficient in increasing its solubility (it increases the solubility up to 192-folds) compared to CAGE 1:1 (it increases the solubility up to 134-folds). Then, encapsulation of chrysin in micelles of these two solvents in aqueous medium at different loading ratios was performed and the resulting systems were evaluated by Dynamic Light Scattering (DLS) and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). The encapsulation systems exhibit stability and polydispersity. The micelles exhibit small size (150nm).

Finally, the chrysin transport nanosystems were studied for their antioxidant activity and more specifically for their free radical scavenging ability. This study was carried out *in vitro* using the DPPH assay method. It was found that the systems do not exhibit strong antioxidant activity. However, the present study gives encouraging results for further research on the antioxidant activity of the aforementioned. Nevertheless, the present study gives encouraging results for further research on the incorporation of pharmaceutical substances into these two green solvents.

Keywords: ionic liquids, (natural) deep eutectic solvents, CAGE (1:2), CAGE (1:1), chrysin, encapsulation, NTA nanoparticles

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	1
Περίληψη.....	2
Graphical Abstract.....	4
Abstract	5
Κατάλογος Γραφημάτων	11
Κατάλογος Πινάκων	14
Κατάλογος Σχημάτων-Εικόνων	15
1.Θεωρητικό μέρος.....	17
1.1 Εισαγωγή.....	17
1.1.1 Χορήγηση φαρμάκων (drug delivery) και Νανοτεχνολογία.....	17
1.2 Μερικές κατηγορίες νανοσυστημάτων	19
1.3 Μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων.....	23
1.3.1 Εγκλωβισμός ουσιών στα νανοσυστήματα.....	23
1.4 Ανάγκη χρήσης πράσινων διαλυτών	24
1.5 Ιοντικά υγρά (ILs) – Ορισμός και ιδιότητες.....	24
1.5.1 Εφαρμογές ιοντικών υγρών	26
1.6 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DESs) – Ορισμός και ιδιότητες.....	27
1.6.1 Εφαρμογές βαθέως ευτηκτικών διαλυτών	28
1.6.2 Ιδιότητες των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.....	31
1.7 Διαφορές μεταξύ βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και ιοντικών υγρών	32
1.8 Γερανικό οξύ	33
1.9 Χολίνη	34
1.9.1 Πηγές χολίνης στη φύση	34
1.9.2 Ιοντικά υγρά με βάση τη χολίνη.....	35
1.9.3 Διαδερμική χορήγηση φαρμάκων από ιοντικά υγρά με βάση τη χολίνη.....	35
1.10 CAGE: choline geranate	36
1.10.1 Σύνθεση του CAGE.....	36
1.10.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες του CAGE	37
1.10.3 Αντιμικροβιακές ιδιότητες	38
1.10.4 Δυνατότητα επούλωσης πληγών από ικρίωματα CAGE.....	38
1.10.5 Το CAGE στα συστήματα χορήγησης φαρμάκων	39
1.10.6 Διαδερμική χορήγηση.....	40
1.10.7 Το CAGE στα συστήματα χορήγησης από το στόμα.....	41
1.10.8 Υποδόρια χορήγηση φαρμάκων μέσω CAGE.....	42
1.10.9 Αλληλεπίδραση του CAGE με σωματικά υγρά.....	42

1.10.10 Κλινικές δοκιμές με CAGE	43
1.10.11 Ιξώδες του CAGE με διαφορετική αναλογία νερού-CAGE	43
1.10.12 Αντιοξειδωτική δράση CAGE	44
1.11 Χρυσίνη	45
1.11.1 Πηγές χρυσίνης.....	47
1.11.2 Γενικές ιδιότητες φλαβονοειδών	47
1.11.3 Θεραπευτικές ιδιότητες χρυσίνης	47
1.11.4 Μεταβολισμός της χρυσίνης	50
1.11.5 Επίδραση της χρυσίνης στις παρενέργειες που σχετίζονται με τη φαρμακοθεραπεία	50
1.11.6 Καινοτόμοι τρόποι χορήγησης της χρυσίνης	51
1.11.7 Αντιοξειδωτική δράση χρυσίνης	52
1.12 Δοκιμή DPPH	52
1.13 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων	53
1.13.1 Υγρή χρωματογραφία (HPLC).....	56
1.13.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	58
1.13.3 Ανάλυση Παρακολούθησης Νανοσωματιδίων (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA).....	60
2. Πειραματικό Μέρος	63
2.1 Σκοπός.....	63
2.2 Όργανα και αντιδραστήρια.....	63
2.3 Παρασκευή διαλύματος Buffer pH=7,44	64
2.4 Σύνθεση πράσινων διαλυτών	65
2.4.1 Σύνθεση CAGE 1:1.....	65
2.4.2 Σύνθεση CAGE 1:2.....	65
2.5 Μελέτη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:1	66
2.6 Μελέτη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:2	67
2.7 Προσδιορισμός της απόδοσης εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1	68
2.8 Προσδιορισμός της απόδοσης εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:2	70
2.9 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 με χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης (HPLC).....	70
2.10 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης χρυσίνης, CAGE 1:1, CAGE 1:2 και εγκλεισμών με μέθοδο DPPH	71
2.11 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων ιοντικών υγρών και εγκλεισμών	73
2.11.1 Χαρακτηρισμός με τη μέθοδο DLS	73
2.11.2 Χαρακτηρισμός με τη μέθοδο NTA.....	73
3. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	75

3.1 Μελέτη διαλυτότητας χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE 1:1 και CAGE 1:2	75
3.1.1 Καμπύλη αναφοράς για διαλυτότητα χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE 1:1	75
3.1.2 Καμπύλη αναφοράς για διαλυτότητα χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE 1:2	78
3.1.3 Συμπεράσματα Διαδικασίας	79
3.2 Σχηματισμός μικκυλίων CAGE 1:1 και CAGE 1:2 και εγκλεισμός χρυσίνης σε αυτά.....	80
3.3 Απόδοση εγκλεισμού χρυσίνης σε CAGE 1:1 και CAGE 1:2 με μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis	81
3.4 Απόδοση εγκλεισμού χρυσίνης σε CAGE 1:1 με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	81
3.5 Διαφορά στις αποδόσεις εγκλεισμού με τις μεθόδους φασματοσκοπίας και υγρής χρωματογραφίας	85
3.5.1 Συμπεράσματα διαδικασίας	85
3.6 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων με τη μέθοδο DLS.....	86
3.7 Χαρακτηρισμός σωματιδίων με τη μέθοδο NTA.....	89
3.7.1 Μελέτη του δείγματος CAGE 1:1.....	89
3.7.2 Μελέτη του δείγματος CAGE 1:2.....	91
3.7.3 Μελέτη δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 σε συγκέντρωση 5mg/g	93
3.7.4 Μελέτη δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 σε συγκέντρωση 1mg/g	96
3.7.5 Μελέτη του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 σε συγκέντρωση 20 mg/g.....	99
3.7.6 Μελέτη δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:2 σε συγκέντρωση 1mg/g	101
3.7.7 Μελέτη δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:2 σε συγκέντρωση 20mg/g	104
3.7.8 Μελέτη δειγμάτων από τον προσδιορισμό της διαλυτότητας της χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE 1:1	106
3.8 Συγκριτική συζήτηση αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων (DLS και NTA).....	109
3.9 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH.....	111
3.10 Οπτική παρατήρηση της σάρωσης των ριζών DPPH από τα νανοσυστήματα	113
4.Συμπεράσματα.....	115
5.Προτάσεις για το μέλλον	117
6.Βιβλιογραφία.....	118
6.1 Βιβλιογραφία Σχημάτων	123

7. Παράρτημα 125

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 1: Ιξώδες μιγμάτων CAGE-νερού για διάφορες περιεκτικότητες σε νερό. ^[36]	44
Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης στα 270nm	76
Γράφημα 3: Γραφική αναπαράσταση της συγκέντρωσης της διαλυτοποιημένης χρυσίνης συναρτήσει των συγκεντρώσεων των υδατικών διαλυμάτων σε CAGE (1:1) . Καμπύλη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE (1:1).	77
Γράφημα 4: Γραφική αναπαράσταση της συγκέντρωσης της διαλυτοποιημένης χρυσίνης συναρτήσει των συγκεντρώσεων των υδατικών διαλυμάτων σε CAGE (1:2). Καμπύλη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE (1:2).	78
Γράφημα 5: Καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης στην HPLC	82
Γράφημα 6: Χρωματογράφημα της χρυσίνης από τη στήλη της HPLC.....	82
Γράφημα 7: Γραφική απεικόνιση της απορρόφησης της καθαρής χρυσίνης σε φάσμα UV από συσκευή της HPLC.....	83
Γράφημα 8:Χρωματογράφημα εγκλεισμού συγκέντρωσης 1mg/g.....	83
Γράφημα 9:Χρωματογράφημα εγκλεισμού συγκέντρωσης 5mg/g.....	84
Γράφημα 10 :Χρωματογράφημα εγκλεισμού συγκέντρωσης 20mg/g.....	84
Γράφημα 11: Μία εκ των επιμέρους σαρώσεων DLS για το μέγεθος των σωματιδίων του εγκλεισμού με CAGE 1:2 και συγκέντρωση 1mg/g (εμφανής η καλή ομοιομορφία)	87
Γράφημα 12:Μία εκ των επιμέρους σαρώσεων DLS για το μέγεθος των σωματιδίων του εγκλεισμού με CAGE 1:1 και συγκέντρωση 5mg/g (εμφανής η κακή ομοιομορφία)	88
Γράφημα 13 :Μία εκ των επιμέρους σαρώσεων DLS για το ζ-δυναμικό των σωματιδίων του εγκλεισμού με CAGE 1:2 και συγκέντρωση 20mg/g.	88
Γράφημα 14:Στιγμιαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων CAGE 1:1 και του μεγέθους τους.....	90
Γράφημα 15: Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος CAGE 1:1.	91
Γράφημα 16:Στιγμιαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων CAGE 1:2 και του μεγέθους τους.....	92
Γράφημα 17:Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος CAGE 1:2.	93
Γράφημα 18:Στιγμιαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 5mg/g και του μεγέθους τους.....	94
Γράφημα 19:Στιγμιαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 5mg/g, του μεγέθους τους και της έντασης, σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D).	95
Γράφημα 20:Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος εγκλεισμού CAGE 1:1 5mg/g.	96
Γράφημα 21: Στιγμιαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 1mg/g και του μεγέθους τους.....	97
Γράφημα 22:Στιγμιαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 1mg/g, του μεγέθους τους και της έντασης, σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D).	98
Γράφημα 23:Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος εγκλεισμού CAGE 1:1 1mg/g.	98
Γράφημα 24: Στιγμιαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 20mg/g και του μεγέθους τους.....	99

Γράφημα 25: Στιγμαϊαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 20mg/g, του μεγέθους τους και της έντασης, σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D).	100
Γράφημα 26: Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος εγκλεισμού CAGE 1:1 20mg/g.	101
Γράφημα 27: Στιγμαϊαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 1mg/g και του μεγέθους τους.....	102
Γράφημα 28: Στιγμαϊαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 1mg/g, του μεγέθους τους και της έντασης, σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D).	103
Γράφημα 29: Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος εγκλεισμού CAGE 1:2 1mg/g.	103
Γράφημα 30: Στιγμαϊαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 20mg/g και του μεγέθους τους.	104
Γράφημα 31: Στιγμαϊαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 20mg/g, του μεγέθους τους και της έντασης, σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D).	105
Γράφημα 32: Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος εγκλεισμού CAGE 1:2 20mg/g.	106
Γράφημα 33: Στιγμαϊαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων της μελέτης διαλυτότητας και του μεγέθους τους (αριστερά: συγκέντρωση CAGE 1:1 300mM, δεξιά: συγκέντρωση 600mM).....	108
Γράφημα 34: Στιγμαϊαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων της μελέτης διαλυτότητας, του μεγέθους τους και της έντασης σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D) (από πάνω και αριστερά: συγκέντρωση 300mM, 450mM, 600mM σε CAGE 1:1).....	108
Γράφημα 35: Συγκεντρωτικά διαγράμματα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων των δειγμάτων της μελέτης διαλυτότητας(από πάνω και αριστερά: συγκέντρωση 300mM, 450mM, 600mM σε CAGE 1:1).	109
Γράφημα 36 : Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος Chrysin και χρόνο επώασης 15 min	125
Γράφημα 37: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος Chrysin και χρόνο επώασης 30 min	125
Γράφημα 38: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος Chrysin και χρόνο επώασης 60min	126
Γράφημα 39: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 15min	126
Γράφημα 40 : Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 30min	127
Γράφημα 41 : Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 60min	127
Γράφημα 42: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 15min	128
Γράφημα 43 : Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 30min	128
Γράφημα 44: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 60min	129

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 :Τεχνικές χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων ^[52]	53
Πίνακας 2 :Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τεχνικών για χαρακτηρισμό νανοσωματιδίων	55
Πίνακας 3: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν	63
Πίνακας 4 :Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν	64
Πίνακας 5: Δημιουργία 7 διαφορετικών stock CAGE 1:1.....	67
Πίνακας 6 :Συνθήκες μεθόδου HPLC	70
Πίνακας 7:Δείγματα που χαρακτηρίστηκαν με τη μέθοδο NTA.....	73
Πίνακας 8: Αποδόσεις εγκλεισμού για τα δείγματα εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 .	81
Πίνακας 9: Αποδόσεις εγκλεισμού για τα δείγματα εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:2 .	81
Πίνακας 10: Απόδοση εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 με τη μέθοδο HPLC	84
Πίνακας 11: Συγκριτική αποτύπωση των αποδόσεων εγκλεισμού για ίδια δείγματα με τις μεθόδους UV-Vis και HPLC.	85
Πίνακας 12: Αποτελέσματα του DLS για τα δείγματα εγκλεισμών	86
Πίνακας 13: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων CAGE 1:1.	89
Πίνακας 14: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων CAGE 1:2.	92
Πίνακας 15: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων εγκλεισμού χρυσίνης σε CAGE 1:1 5mg/g.....	94
Πίνακας 16: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων εγκλεισμού χρυσίνης σε CAGE 1:1 1mg/g.....	96
Πίνακας 17: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 20 mg/g.....	99
Πίνακας 18: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 1mg/g.	101
Πίνακας 19: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 20mg/g.	104
Πίνακας 20: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων στο δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 300mM.....	106
Πίνακας 21: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων στο δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 450mM.....	107
Πίνακας 22: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων στο δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 600mM.....	107
Πίνακας 23: Συγκριτική μελέτη αποτελεσμάτων για το μέγεθος των νανοσωματιδίων από τις μελέτες DLS και NTA.	110
Πίνακας 24: Αποτελέσματα δοκιμής DPPH στα νανοσυστήματα.	112

Κατάλογος Σχημάτων-Εικόνων

Εικόνα 1:Σχηματική απεικόνιση διαφόρων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων με βάση τη νανοτεχνολογία. ^[3]	19
Εικόνα 2:Μοριακές δομές και διαστάσεις διαφόρων CDs: A,B, β-CD και Γ, γ-CD. Οι θέσεις 2, 3 και 6 υποδεικνύονται με τους αριθμούς 2, 3 και 6, αντίστοιχα. ^[7]	21
Εικόνα 3: Δομές ορισμένων αλογονιδικών αλάτων και δοτών δεσμών υδρογόνου που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. ^[12]	28
Εικόνα 4: Δομή γερανικού οξέος ^[37]	34
Εικόνα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της σύνθεσης CAGE με μοριακή αναλογία διττανθρακικής χολίνης και γερανικού οξέος1:1 (RTIL) και 1:2 (DES)). ^[28]	37
Εικόνα 6: a) Χημικές δομές της χολίνης και του γερανικού οξέος και b) CAGE που παρασκευάζεται με μετάθεση άλατος διττανθρακικής χολίνης και γερανικού οξέος σε μοριακή αναλογία 1:2. ^[29]	37
Εικόνα 7: Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα της διαδικασίας ηλεκτροσυγκόλλησης που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ικρωμάτων CAGE για την επούλωση πληγών. ^[28]	39
Εικόνα 8: Φάρμακα που έχουν μεταφερθεί με επιτυχία μέσω του CAGE. ^[28]	40
Εικόνα 9: Το σχήμα μελέτης για την από του στόματος χορήγηση φαρμάκων σε αρουραίους και ανθρώπους με τη βοήθεια του CAGE. ^[28]	41
Εικόνα 10: Η αλληλεπίδραση των συστατικών CAGE 1:2. ^[28]	43
Εικόνα 11:Κατηγορίες φλαβονοειδών ^[15]	46
Εικόνα 12: Δομή μορίου χρυσίνης ^[15]	46
Εικόνα 13: Αντίδραση αναγωγής ρίζας DPPH από αντιοξειδωτική ουσία. ^[38]	52
Εικόνα 14 :Περιοχές μεγέθους για την ανάλυση σωματιδίων των συζητούμενων τεχνικών ^[52]	55
Εικόνα 15 : Διάγραμμα ροής HPLC ^[48]	56
Εικόνα 16 :Διάταξη σκέδασης φωτός. Το φως που σκεδάζεται από τα σωματίδια με την πάροδο του χρόνου σε γωνία σκέδασης θ εστιάζεται σε ανιχνευτή ή σε καλώδιο οπτικών ινών συνδεδεμένο με ανιχνευτή για περαιτέρω επεξεργασία δεδομένων σε μεταγενέστερο στάδιο. ^[50]	58
Εικόνα 17 :Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας της NTA ^[53]	61
Εικόνα 18: Παραλλαγές της εξίσωσης Stokes-Einstein ^[54]	61
Εικόνα 19: Από αριστερά προς τα δεξιά, η συσκευή DLS του εργαστηρίου Γενικής Χημείας και η συσκευή UV-reader του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας.....	64
Εικόνα 20: Μοριακή δομή γερανικού οξέος και χολίνης προς σχηματισμό cage 1:1 ^[36]	65
Εικόνα 21: Αντίδραση σχηματισμού CAGE 1:2 ^[27]	66
Εικόνα 22: Διαδικασία σχηματισμού CAGE 1:1 και CAGE 1:2 και τελικά προϊόντα.....	66
Εικόνα 23: Stock διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:1 μετά τη διαδικασία επώασης.....	67
Εικόνα 24: Δημιουργία αραιώσεων των stock διαλυτότητας για μέτρηση στο UV-vis.....	68
Εικόνα 25: Stock διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:2 μετά τη διαδικασία επώασης.....	68
Εικόνα 26: Δημιουργία εγκλεισμών 5mg/g, 20mg/g με CAGE 1:1.....	69
Εικόνα 27: Δημιουργία εγκλεισμών 1mg/g, 5mg/g, 20mg/g με CAGE 1:1.....	69
Εικόνα 28: Τρόπος πλήρωσης του plate.....	72
Εικόνα 29: Οπτική παρατήρηση της προσθήκης υπερκάθαρου νερού σε σύστημα CAGE 1:1-χρυσίνης. Η θολρότητα υποδεικνύει το σχηματισμό λαμέλων.....	80
Εικόνα 30:Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων CAGE 1:1.....	90
Εικόνα 31:Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων CAGE 1:2.....	92

Εικόνα 32:Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 5mg/g.	95
Εικόνα 33: Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 1mg/g.	97
Εικόνα 34:Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 20 mg/g	100
Εικόνα 35: Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 1mg/g.	102
Εικόνα 36:Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 20mg/g	105
Εικόνα 37: Δείγματα του CAGE 1:1 σε micro-plate, σε σειρά μειούμενης συγκέντρωσης, μετά από χρόνο επώασης 15 min.	114
Εικόνα 38: Δείγματα των εγκλεισμών με CAGE 1:1 συγκέντρωσης 5mg/g σε micro-plate, σε σειρά μειούμενης συγκέντρωσης, μετά από χρόνο επώασης 15 min	114

1.Θεωρητικό μέρος

1.1 Εισαγωγή

1.1.1 Χορήγηση φαρμάκων (drug delivery) και Νανοτεχνολογία

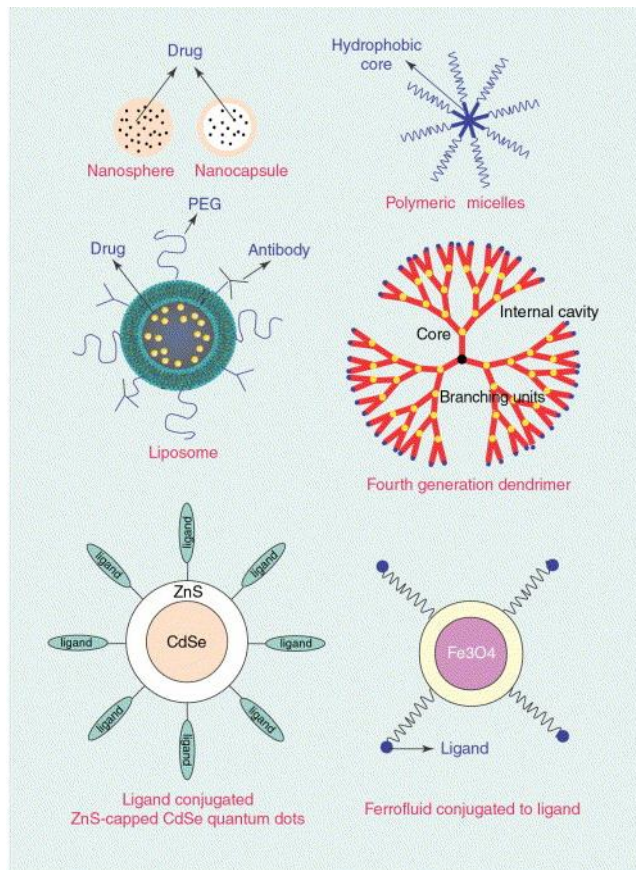
Στην ιστορία της ιατρικής, αν συγκριθούν οι πρακτικές του σήμερα με αυτές των προηγούμενων ετών και ειδικότερα του προηγούμενου αιώνα, παρατηρείται εκθετική πρόοδος σε θέματα αντιμετώπισης ανίατων ασθενειών. Παρατηρείται η ανάπτυξη πολλών νέων φαρμάκων, όμως αρκετά από αυτά προκαλούν παρενέργειες, ενώ άλλα είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά στις δοκιμές *in vitro*, χωρίς να εμφανίζουν τη ζητούμενη δράση *in vivo*. Υπάρχει επομένως αρκετό περιθώριο βελτίωσης για τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων και για την ανάπτυξη φαρμακευτικών τεχνικών.

Τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων (drug-delivery systems) (DDS) χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά θεραπευτικών φαρμάκων στο σώμα, όπως απαιτείται για την ασφαλή επίτευξη του επιθυμητού θεραπευτικού αποτελέσματος. Τέτοια συστήματα σχεδιάζονται συνήθως με σκοπό i) τη βελτίωση της υδατικής διαλυτότητας και της χημικής σταθερότητας των δραστικών ουσιών, ii) την αύξηση της φαρμακολογικής δραστηριότητας και iii) τη μείωση των παρενεργειών. Τα σύγχρονα συστήματα χορήγησης φαρμάκων έχουν σημειώσει συνεχή πρόοδο από τη δεκαετία του 1950, όταν παρουσιάστηκε το πρώτο σκεύασμα παρατεταμένης αποδέσμευσης Dexedrine¹. Ο στόχος κάθε συστήματος χορήγησης φαρμάκου είναι να παρέχει και να διατηρεί θεραπευτικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο βιολογικό σημείο-στόχο.^[4] Η έρευνα στον τομέα της χορήγησης φαρμάκων έχει επικεντρωθεί όχι μόνο στη βελτίωση των από του στόματος και των ενέσιμων συστημάτων, αλλά και στο άνοιγμα πρόσθετων οδών χορήγησης, συμπεριλαμβανομένων των πνευμονικών, διαδερμικών οφθαλμικών και ρινικών οδών. Κάθε οδός έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Πολλά νέα DDS που κάνουν χρήση αυτών των οδών αρχίζουν να υφίστανται κλινικές δοκιμές και ορισμένα έχουν ήδη φθάσει στην αγορά. Για να επιτευχθεί επιτυχής κλινική μετάφραση, τα DDS πρέπει, τουλάχιστον, να είναι ασφαλή, να επιτελούν τη θεραπευτική τους λειτουργία, να προσφέρουν βολική χορήγηση και να είναι εύκολα στην κατασκευή.

Ένα σύστημα χορήγησης που έχει αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες είναι η κατασκευή συστημάτων νανοσωματιδίων. Η νανοτεχνολογία, όρος που προέρχεται από την ελληνική λέξη *nano*, που σημαίνει νάνος, εφαρμόζει τις αρχές της μηχανικής, της ηλεκτρονικής, της φυσικής και της επιστήμης των υλικών και της κατασκευής σε μοριακό ή υπομικροσκοπικό επίπεδο. Τα υλικά σε νανοκλίμακα θα μπορούσαν να είναι μια συσκευή ή ένα σύστημα, τα οποία μπορεί ή αυτά θα μπορούσαν να είναι υπερμοριακές δομές, σύμπλοκα ή σύνθετα υλικά. Η νανοτεχνολογία αποτελεί διεπιστημονικό πεδίο, το οποίο έχει φέρει επανάσταση στον τρόπο σύνθεσης και χορήγησης φαρμάκων. Ένας από τους πρώτους υποστηρικτές της νανοτεχνολογίας, ο Albert Franks, την όρισε ως «τον τομέα της επιστήμης και της τεχνολογίας

όπου οι διαστάσεις και κυμαίνονται μεταξύ 0,1 nm και 100 nm». Εκτός από τις εξελίξεις σε άλλους επιστημονικούς κλάδους, όπως στην ηλεκτρονική και τη ρομποτική, η νανοτεχνολογία αναμένεται να σημειώσει σημαντική πρόοδο στις κύριες βιοϊατρικές εφαρμογές, μεταξύ άλλων στους τομείς της γονιδιακής θεραπείας, της χορήγησης φαρμάκων, της απεικόνισης και των νέων τεχνικών ανακάλυψης φαρμάκων.

Έχουν δημιουργηθεί αρκετά είδη νανοσωματιδίων ώστε αυτά να μιμούνται ή να αλλάζουν τις βιολογικές λειτουργίες. Υπάρχουν αρκετά είδη νανοσωματιδίων που έχουν κατασκευαστεί όπως λιποσώματα, προλιποσώματα, μικροσφαίρες, γέλες, προφάρμακα, κυκλοδεξτρίνες μεταξύ άλλων (σχήμα 1). Μπορούν να εντοπιστούν διάφοροι λόγοι για τους οποίους η ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας και των νανοσωματιδίων κρίνεται αναγκαία. Αρχικά, τα ήδη διαθέσιμα παραδοσιακά φάρμακα για στοματική ή ενέσιμη χορήγηση δεν αποτελούν τη βέλτιστη σύνθεση για κάθε προϊόν. Επιπλέον, τα φάρμακα που έχουν ως κύρια δραστική τους ουσία πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα, χρειάζονται έναν πιο εξειδικευμένο φορέα που θα ενισχύει την αποτελεσματικότητά τους και θα τα προστατέψει από ενδεχόμενη αποικοδόμηση. Ακόμα, το μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων τα βοηθά να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, να διαλύονται περισσότερο, να εισέρχονται στο πνευμονικό σύστημα και να απορροφώνται μέσω των στενών συνδέσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων του δέρματος, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα. Συνεχίζοντας, η νανοτεχνολογία μπορεί να αντιμετωπίσει ζητήματα που σχετίζονται με τα τρέχοντα φαρμακευτικά προϊόντα, όπως η παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων, ή μπορεί να προσθέσει στην απόδοση και την αποδοχή τους, είτε αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα, είτε βελτιώνοντας την ασφάλεια και τη συμμόρφωση των ασθενών. Επιπλέον, τα νεότερα φάρμακα που αναπτύσσονται με τη βοήθεια της υπολογιστικής χημείας, χρησιμοποιώντας τη γνώση που αποκτήθηκε από το πρόγραμμα του ανθρώπινου γονιδιώματος, απαιτούν συστήματα χορήγησης φαρμάκων για την αποτελεσματική χρήση τους. Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει τη χορήγηση φαρμάκων που είναι ιδιαίτερα αδιάλυτα στο νερό ή ασταθή στο βιολογικό περιβάλλον.^{[1][2][3][4][5]}



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση διαφόρων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων με βάση τη νανοτεχνολογία.^[3]

1.2 Μερικές κατηγορίες νανοσυστημάτων

Πολυμερή βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια

Η χρήση βιοαποικοδομήσιμων υλικών για την παρασκευή νανοσωματιδίων επιτρέπει τη συνεχή απελευθέρωση του φαρμάκου στο σημείο-στόχο για διάστημα ημερών ή ακόμη και εβδομάδων. Τα νανοσωματίδια θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν αποτελεσματικό μηχανισμό χορήγησης για φάρμακα των οποίων οι στόχοι είναι κυτταροπλασματικοί.^[3]

Κεραμικά νανοσωματίδια

Ο αναδυόμενος τομέας της χρήσης ανόργανων (κεραμικών) σωματιδίων με εγκλωβισμένα βιομόρια έχει δυναμικές εφαρμογές σε πολλά πεδία της σύγχρονης επιστήμης των υλικών, συμπεριλαμβανομένης της χορήγησης φαρμάκων. Τα κεραμικά νανοσωματίδια έχουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως το ότι οι διαδικασίες παρασκευής είναι σχετικά παρόμοιες με τη γνωστή διαδικασία sol-gel, απαιτούν συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος και μπορούν εύκολα να παρασκευαστούν με το επιθυμητό μέγεθος, σχήμα και πορώδες. Το εξαιρετικά χαμηλό μέγεθός τους (λιγότερο από 50 nm) μπορεί να τα βοηθήσει να διαφύγουν από το δίκτυο ενδοθηλιακό σύστημα του σώματος. Επιπλέον, δεν παρατηρείται διόγκωση ή

μεταβολή του πορώδους με την αλλαγή του pH. Αυτά τα σωματίδια προστατεύουν αποτελεσματικά τα ενισχυμένα μόρια (ένζυμα, φάρμακα κ.λπ.) από τη μετουσίωση που προκαλείται από το εξωτερικό pH και τη θερμοκρασία.^[3]

Λιποσώματα

Τα λιποσώματα είναι μικρά τεχνητά κυστίδια σφαιρικού σχήματος που μπορούν να παραχθούν από φυσικά μη τοξικά φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. Λόγω του μεγέθους τους, του υδρόφοβου και υδρόφιλου χαρακτήρα τους, καθώς και της βιοσυμβατότητάς τους, τα λιποσώματα είναι πολλά υποσχόμενα συστήματα για τη χορήγηση φαρμάκων. Οι ιδιότητες των λιποσωμάτων ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με τη σύνθεση των λιπιδίων, το μέγεθος, το επιφανειακό φορτίο και τη μέθοδο παρασκευής. Ως εκ τούτου, ταξινομούνται σε κατηγορίες με βάση το μέγεθός τους και τον αριθμό των διπλοστοιβάδων. Τα φάρμακα που συνδέονται με λιποσώματα έχουν σημαντικά τροποποιημένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα φάρμακα σε διάλυμα. Είναι επίσης αποτελεσματικά στη μείωση της συστηματικής τοξικότητας και στην πρόληψη της πρόωμης αποικοδόμησης του ενθυλακωμένου φαρμάκου μετά την εισαγωγή στον οργανισμό-στόχο. Οι επιφάνειες των λιποσωμάτων μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν με την προσάρτηση μονάδων πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) στη διπλοστοιβάδα και να παράγουν έτσι αυτά που είναι γνωστά ως stealth-λιποσώματα, για να αυξηθεί ο χρόνος κυκλοφορίας τους στο αίμα. Επιπλέον, τα λιποσώματα μπορούν να συζευχθούν με αντισώματα ή συνδέσμους για την ενίσχυση της φαρμακευτικής θεραπείας με συγκεκριμένο στόχο.^[3]

Δενδριμερή

Τα δενδριμερή, που ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1980, είναι μακρομοριακές ενώσεις που αποτελούνται από μια σειρά διακλαδώσεων γύρω από έναν εσωτερικό πυρήνα. Τα δενδριμερή είναι ελκυστικά συστήματα για τη χορήγηση φαρμάκων λόγω του εύρους μεγέθους τους σε νανόμετρα, της ευκολίας παρασκευής και λειτουργοποίησης και της ικανότητάς τους να εμφανίζουν πολλαπλά αντίγραφα επιφανειακών ομάδων για διαδικασίες βιολογικής αναδιοργάνωσης. Τα μόρια δενδριμερών είναι μονοδιάσπαρτα συμμετρικά μακρομόρια που είναι χτισμένα γύρω από ένα μικρό μόριο ή σε ένα γραμμικό πολυμερικό πυρήνα χρησιμοποιώντας συνδέσμους και μονάδες διακλάδωσης. Η αλληλεπίδραση των μακρομορίων δενδριμερών με το μοριακό περιβάλλον ελέγχεται κυρίως από τις τερματικές τους ομάδες. Τροποποιώντας τα άκρα τους, το εσωτερικό ενός δενδριμερούς μπορεί να γίνει υδρόφιλο, ενώ η εξωτερική του επιφάνεια υδρόφοβη, ή το αντίστροφο.^{[3][8]}

Μαγνητικά νανοσωματίδια

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια αποτελούν ένα ισχυρό και ευέλικτο διαγνωστικό εργαλείο στη βιολογία και την ιατρική. Συνδεδεμένα με ένα κατάλληλο αντίσωμα, χρησιμοποιούνται για τη σήμανση συγκεκριμένων μορίων, κυτταρικών πληθυσμών, δομών ή μικροοργανισμών. Έχουν αναπτυχθεί μαγνητικές τεχνικές ανοσοανάλυσης στις οποίες το μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται από τους μαγνητικά επισημασμένους στόχους ανιχνεύεται άμεσα με ένα

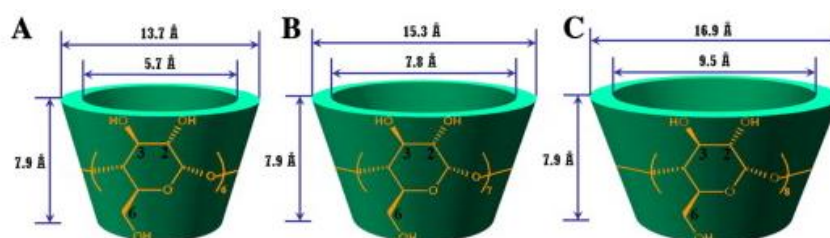
ευαίσθητο μαγνητόμετρο. Η δέσμευση του αντισώματος σε μόρια-στόχους ή σε οργανισμούς που προκαλούν ασθένειες αποτελεί τη βάση αρκετών δοκιμών.^{[3][8]}

Νανοσωματίδια σιδήρου-αργύρου

Τα μεταλλικά νανοσωματίδια παρουσιάζουν ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθος και το σχήμα και ενδιαφέρουν για εφαρμογές που κυμαίνονται από καταλύτες και αισθητήρες έως οπτική, αντιβακτηριακή δράση και αποθήκευση δεδομένων. Για παράδειγμα, η αντιβακτηριακή δράση διαφόρων μεταλλικών νανοσωματιδίων, όπως τα κολλοειδή αργύρου, συνδέεται στενά με το μέγεθός τους, δηλαδή όσο μικρότεροι είναι οι πυρήνες αργύρου, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιβακτηριακή δράση. Επιπλέον, η καταλυτική δραστηριότητα αυτών των νανοσωματιδίων εξαρτάται επίσης από το μέγεθός τους, καθώς και από τη δομή, το σχήμα, την κατανομή μεγέθους και το χημικό-φυσικό περιβάλλον τους. Συνεπώς, ο έλεγχος του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους αποτελεί σημαντικό έργο. Γενικά, ο συγκεκριμένος έλεγχος του σχήματος, του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους επιτυγχάνεται συχνά με την αλλαγή των μεθόδων σύνθεσης, των αναγωγικών παραγόντων και των σταθεροποιητών.^[6]

Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs), μια οικογένεια μακροκυκλικών ολιγοσακχαριτών που συνδέονται με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς (σχήμα 2), έχουν μελετηθεί εκτενώς σε διάφορους τομείς από την ανακάλυψή τους από τον Villiers το 1891. Η υδρόφοβη κοιλότητα των CDs τους προσδίδει ικανότητα συμπερίληψης μιας ποικιλίας ενώσεων, από μικρά μόρια, ιόντα, πρωτεΐνες και ολιγονουκλεοτίδια. Οι βιοϊατρικές εφαρμογές των CDs είναι εξαιρετικά ελκυστικές λόγω της χαμηλής τοξικότητας και της χαμηλής ανοσογονικότητας. Οι CDs έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού με φάρμακα μέσω αλληλεπιδράσεων ξενιστή-ξενιστή στη φαρμακευτική επιστήμη και τεχνολογία. Οι σχετικές εφαρμογές περιλαμβάνουν την αύξηση της διαλυτότητας και της σταθερότητας του φαρμάκου, την ενίσχυση της απορρόφησης του φαρμάκου, τη συγκάλυψη οσμών και γεύσεων, τον έλεγχο των προφίλ απελευθέρωσης του φαρμάκου, την ανακούφιση της τοπικής και συστηματικής τοξικότητας και τη βελτίωση της διαπερατότητας του φαρμάκου διαμέσου βιολογικών φραγμών.^[7]



Εικόνα 2: Μοριακές δομές και διαστάσεις διαφόρων CDs: A, α -CD και B, β -CD και C, γ -CD. Οι θέσεις 2, 3 και 6 υποδεικνύονται με τους αριθμούς 2, 3 και 6, αντίστοιχα.^[7]

Πολυμερικά μικκύλια

Πρόσφατα, έχουν προσελκύσει σημαντική προσοχή οι διάφορες αμφίφιλες συμπολυμερείς μονάδες, οι οποίες μπορούν να αυτο-συσσωματώνονται σχηματίζοντας μικκύλια σε υδατικό διάλυμα και έχουν μελετηθεί εκτενώς ως φορείς φαρμάκων. Τα πολυμερικά μικκύλια έχουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών επιφανειοδραστικών μικκυλίων, καθώς έχουν καλύτερη θερμοδυναμική σταθερότητα σε φυσιολογικό διάλυμα, όπως υποδεικνύεται από τη χαμηλή κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση, η οποία καθιστά τα πολυμερικά μικκύλια σταθερά και αποτρέπει την ταχεία διάσπασή τους *in vivo*. Τα μικκύλια έχουν μια αρκετά στενή κατανομή μεγέθους στην περιοχή των νανομέτρων και χαρακτηρίζονται από τη μοναδική αρχιτεκτονική πυρήνα-κελύφους, στην οποία τα υδρόφοβα τμήματα διαχωρίζονται από το υδατικό εξωτερικό. Τα φάρμακα μπορούν να κατανεμηθούν στον υδρόφοβο πυρήνα των μικκυλίων και το εξωτερικό υδρόφιλο στρώμα σχηματίζει μια σταθερή διασπορά σε υδατικά μέσα, η οποία μπορεί στη συνέχεια να χορηγηθεί ενδοφλεβίως.^[3]

Η συμπεριφορά των μικκυλίων πρέπει να διακρίνεται από τα συνηθισμένα μοριακά διαλύματα στα οποία τα μόρια είναι μεμονωμένα διασκορπισμένα στο διαλύτη ή συνδέονται ως διμερή ή ολιγομερή, που παράγονται από τη στοίβαξη επίπεδων μορίων. Η προοδευτική συσσωμάτωση οδηγεί σε μονοτονική μείωση της συγκέντρωσης με το μέγεθος στην καμπύλη κατανομής. Συγκεκριμένα, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση, το μέγεθος της συσσωμάτωσης μεταβάλλεται έντονα και δεν μπορεί να οριστεί χαρακτηριστικό μέγεθος ανεξάρτητο από τη συγκέντρωση σε αυτή την περίπτωση. Η σημαντικότερη ιδιότητα των μικκυλιακών διαλυμάτων είναι η ικανότητά τους να διαλύουν υδρόφοβες διαλυμένες ουσίες.^[44]

Λειτουργικά πολυμερή μικκύλια που συντίθενται ως βιοσυμβατοί και βιοαποικοδομήσιμοι φορείς φαρμάκων περιλαμβάνουν (i) PEO-b-poly(P-benzyl-L-aspartate) (PEO-PBLA), (ii) PEO-b-poly(L-γαλακτικό οξύ) (PEO-PLA) και (iii) συζεύγματα PEO-λιπιδίων. Το PEO δεν είναι τοξικό. Τα PEO-PBLA και PEO-PLA έχουν υδρόφοβες μονάδες που βιοαποικοδομούνται σε μη τοξικά υποπροϊόντα *in vivo*. Η βιοαποικοδόμηση των συζευγμάτων PEO-λιπιδίων οδηγεί σε ελεύθερα PEO και λιπίδια. Τα φάρμακα πρέπει να απελευθερώνονται αργά από πολυμερή μικκύλια για τη στόχευση των φαρμάκων. Γρήγορη απελευθέρωση φαρμάκων από πολυμερή μικκύλια, δηλαδή απόρριψη δόσης, ποσοτικά προκαλεί κατακρήμνιση των υδρόφοβων φαρμάκων στο αγγειακό σύστημα. Υπάρχει ανεπαρκής χρόνος για τα πολυμερή μικκύλια να συσσωρευτούν στα σημεία-στόχους. Από την άλλη πλευρά, η αργή απελευθέρωση φαρμάκων από πολυμερή μικκύλια επιτρέπει τη συσώρευση των μικκυλίων στις θέσεις-στόχους, με ελάχιστη απώλεια φαρμάκου και εντοπισμένη απελευθέρωση φαρμάκου. Αυτό πιστεύεται ότι συμβαίνει για τα χημικά συζευγμένα πολυμερή μικκύλια. Ιδανικά μπορούμε να ελέγξουμε τα ποσοστά απελευθέρωσης του φαρμάκου από πολυμερικά μικκύλια.^[43]

1.3 Μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων

Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την παρασκευή νανοσωματιδίων, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες ανάλογα με το αν η σύνθεση απαιτεί αντίδραση πολυμερισμού ή επιτυγχάνεται απευθείας από ένα μακρομόριο ή ένα προσχηματισμένο πολυμερές. Οι μέθοδοι πολυμερισμού μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε πολυμερισμό γαλακτώματος και πολυμερισμό διεπιφάνειας, ενώ υπάρχουν δύο τύποι πολυμερισμού γαλακτώματος - οργανικός και υδατικός - ανάλογα με τη συνεχή φάση. Τα νανοσωματίδια μπορούν επίσης να παρασκευαστούν απευθείας από προσχηματισμένα συνθετικά ή φυσικά πολυμερή και με αποδιάταξη μακρομορίων. Πρόσφατα αυτά τα πολυμερή συστήματα έχουν παρασκευαστεί με τεχνικές νεφελοποίησης.

1.3.1 Εγκλωβισμός ουσιών στα νανοσυστήματα

Ο εγκλωβισμός των θεραπευτικών παραγόντων αυξάνει την αποτελεσματικότητα, την εξειδίκευση και την ικανότητα στόχευσης. Οι νανοφορείς (NCs) προστατεύουν το ωφέλιμο φορτίο τους από την πρόωρη αποικοδόμηση στο βιολογικό περιβάλλον, ενισχύουν τη βιοδιαθεσιμότητα και παρατείνουν την παρουσία στο αίμα και την κυτταρική απορρόφηση. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολλές μέθοδοι για τη σύνθεση των NCs. Οι μέθοδοι σύνθεσης επιλέγονται ανάλογα με τη χημική δομή του θεραπευτικού παράγοντα, το είδος της εφαρμογής και το χρόνο παραμονής στο εσωτερικό του σώματος. Μπορούν να συντεθούν NCs διαφορετικού μεγέθους με τη χρήση διαφορετικών μητρών. Οι συμβατικοί NCs απομακρύνονται από το σώμα με το μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα (MPS). Το MPS αναγνωρίζει τους NCs ως ξένα σωματίδια και τους απομακρύνει ταχέως από τη συστηματική κυκλοφορία. Ωστόσο, εάν απαιτείται παρατεταμένη παρουσία στο αίμα, η επιφάνεια των NCs τροποποιείται εύκολα ώστε να αποτραπεί η φαγοκυττάρωση. Η επιφάνεια των NCs τροποποιείται επίσης για να αυξηθεί η ικανότητα στόχευσής τους και η παράδοση του φαρμάκου στο σημείο-στόχο.

Η νανοενθυλάκωση φαρμάκων περιλαμβάνει τη δημιουργία σωματιδίων φορτωμένων με φάρμακο, με διάμετρο που κυμαίνεται από 1 έως 1000 nm. Ο όρος νανοσωματίδιο είναι μια συλλογική ονομασία, τόσο για τα νανοσφαιρίδια όσο και για τις νανοκάψουλες. Τα νανοσφαιρίδια έχουν δομή τύπου μήτρας. Τα φάρμακα μπορούν να απορροφηθούν στην επιφάνεια της σφαίρας ή να ενθυλακωθούν εντός του σωματιδίου. Οι νανοκάψουλες είναι κυψελιδωτά συστήματα στα οποία το φάρμακο περιορίζεται σε μια κοιλότητα που αποτελείται από έναν εσωτερικό υγρό πυρήνα, που περιβάλλεται από μια πολυμερή μεμβράνη. Σε αυτή την περίπτωση, οι δραστικές ουσίες διαλύονται συνήθως στον εσωτερικό πυρήνα, αλλά μπορεί επίσης να προσροφηθούν στην επιφάνεια της κάψουλας. ^[9]

1.4 Ανάγκη χρήσης πράσινων διαλυτών

Η παγκόσμια στροφή προς την Πράσινη Χημεία αποτελεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση κατά των συμβατικών χημικών πρακτικών. Ακολουθώντας την τάση αυτή, γίνεται επανεκτίμηση τόσο πρώτων υλών όσο και διεργασιών από το μηδέν, συνδυάζοντας την έρευνα για φυσικής προέλευσης βιώσιμες πρώτες ύλες και ανανεώσιμα υλικά, με περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον και οικονομικά αποδοτικές βιομηχανικές διεργασίες και εφαρμογές. Οι διαλύτες είναι συχνά ο καθοριστικός παράγοντας του κόστους, του περιβαλλοντικού αποτυπώματος και της ασφάλειας διαφόρων χημικών και φαρμακευτικών διεργασιών. Υπάρχουν διάφοροι τύποι οργανικών διαλυτών που διαλύουν πολυάριθμες νέες ενώσεις, μερικές από τις οποίες χρησιμοποιούνται σε φάρμακα, τρόφιμα και ροφήματα, καλλυντικά κλπ. Σε παγκόσμιο επίπεδο, λοιπόν, πραγματοποιείται έρευνα πάνω σε διάφορες ομάδες ενώσεων, για το αν και πώς μπορούν να λειτουργήσουν ως ασφαλέστερες ουσίες για χορήγηση φαρμάκων, με στόχο να προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα για την υγεία και την ευεξία από φυσικούς πόρους, με πράσινες μεθόδους. Σε αυτά τα πλαίσια, τα ιοντικά υγρά και οι ευτηκτικοί διαλύτες έχουν αναπτυχθεί με σκοπό να αντικαταστήσουν τους συμβατικούς διαλύτες. Στη μελέτη αυτή, το επίκεντρο του ενδιαφέροντος θα αποτελέσουν οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DESs) και τα ιοντικά υγρά (ILs).^{[41][42]}

1.5 Ιοντικά υγρά (ILs) – Ορισμός και ιδιότητες

Ως ιοντικά υγρά (ILs) ορίζονται συνήθως ως ενώσεις που αποτελούνται πλήρως από ιόντα, με σημείο τήξης κάτω από 100 °C. Το πρώτο IL (νιτρικό αιθυλαμμώνιο) αναφέρθηκε από τον Paul Walden το 1914, ο οποίος τότε δεν είχε συνειδητοποιήσει ότι τα ILs θα γίνονταν ένας σημαντικός επιστημονικός τομέας μετά από σχεδόν έναν αιώνα. Στην πραγματικότητα, τα ILs ως καινοτόμα ρευστά έλαβαν ευρεία προσοχή μόνο κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών. Αναδύεται μια διεπιστημονική μελέτη για τα ILs, που περιλαμβάνει τη χημεία, την επιστήμη των υλικών, τη χημική μηχανική και την περιβαλλοντική επιστήμη. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες σημαντικές θεμελιώδεις απόψεις είναι πλέον διαφορετικές από τις αρχικές έννοιες, καθώς οι γνώσεις σχετικά με τη φύση των ILs γίνονται βαθύτερες. Για παράδειγμα, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ILs αναγνωρίζονται τώρα ως ευρέως κυμαινόμενες από το συχνά αναφερόμενο "μη πτητικά, μη εύφλεκτα και σταθερά στον αέρα και το νερό" έως εκείνα που είναι σαφώς πτητικά, εύφλεκτα και ασταθή. Αυτό αποδίδεται σε πολυάριθμους συνδυασμούς κατιόντων και ανιόντων που ανταποκρίνονται στον ορισμό των ILs, οδηγώντας σε ποικίλες συμπεριφορές. Ανεξάρτητα από αυτό, τα ILs παραμένουν πιο επιθυμητά από τους συμβατικούς πτητικούς διαλύτες ή/και καταλύτες σε πολλές φυσικές και χημικές διεργασίες, παρουσιάζοντας συχνά πράσινες και χρήσιμες σχεδιαστικές ιδιότητες σε μεγάλο βαθμό.^[10]

Τα IIs σχηματίζονται μέσω της μεταφοράς ενός πρωτονίου από ένα οξύ Brønsted σε μια βάση Brønsted. Αυτό οδηγεί σε απόκτηση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών καθώς έχουν ένα πρωτόνιο διαθέσιμο για δεσμούς υδρογόνου και συνήθως μη αμελητέα πίεση ατμών, και ορισμένα είναι αποστάξιμα μέσα, όπου το σημείο βρασμού τους εμφανίζεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία από τη θερμοκρασία αποσύνθεσης.^[61]

Καθώς η χημική τους ποικιλία έχει αυξηθεί, τα IIs έχουν χωριστεί περαιτέρω σε πολλούς τύπους, π.χ. IIs θερμοκρασίας δωματίου (RTILs), IIs ειδικών καθηκόντων (TSILs), πολυϊονικά υγρά (PIIs) και υποστηριζόμενες μεμβράνες IL (SILMs), που περιλαμβάνουν σύνθετα υλικά IL υποστηριζόμενα σε οργανομεταλλικά πλαίσια (MOFs). Η υβριδική οργανική-ιοντική φύση των IIs και οι προκύπτουσες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις προκαλούν ένα πολύπλοκο σύνολο φαινομένων, δημιουργώντας έναν τομέα μελέτης που είναι ταυτόχρονα συναρπαστικός και προκλητικός. Οι επιστήμονες και οι μηχανικοί καλούνται συχνά να διαλέξουν γρήγορα τα κατάλληλα IIs για μια συγκεκριμένη διεργασία. Για το σκοπό αυτό, ο προσδιορισμός των σχέσεων δομής-απόδοσης που αποκαλύπτουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των IIs, των διαλυμένων ουσιών, των φορέων και των συστατικών των μιγμάτων καθίσταται ζωτικής σημασίας, απαιτώντας αυστηρή ολοκλήρωση πειραματικών, θεωρητικών και υπολογιστικών μεθόδων.^[10]

Το πιο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των ιοντικών υγρών είναι η αμελητέα τάση ατμών. Δεδομένου ότι τα ιοντικά υγρά αποτελούνται μόνο από ιόντα, απαιτείται σημαντική ποσότητα ενέργειας για να εξατμιστεί το ιόν. Η ενέργεια αυτή θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνη των ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ των ιόντων. Πράγματι, τα ιόντα σταθεροποιούνται σημαντικά από ένα ψευδοπλέγμα, το οποίο ελαχιστοποιεί την ενέργεια πλέγματος των αλάτων, παρόμοια με τους ιοντικούς κρυστάλλους. Κατά συνέπεια, η τάση εξαέρωσης είναι πολύ μεγαλύτερη από την ηλεκτροστατική δύναμη μεταξύ ενός κατιόντος και ενός ανιόντος. Αυτή η εξαιρετικά μεγάλη σταθεροποίηση είναι ο λόγος για τη θερμική σταθερότητα των ιοντικών υγρών. Αυτό εξηγεί ιδιότητες όπως η μηδενική τάση ατμών σε θερμοκρασίες έως 400°C και η φλογοανθεκτικότητα. Δεδομένου ότι ακόμη και τα ιοντικά υγρά αναφλέγονται μετά από διάσπαση, ο όρος «μη αναφλεξιμότητα» δεν είναι κατάλληλος για να εκφράσει τα χαρακτηριστικά των ιοντικών υγρών. Επομένως, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται η λέξη "φλογοανθεκτικότητα" ή "υψηλή αντοχή στη φλόγα".^[11]

Το ιξώδες ενός ιοντικού υγρού είναι σχετικά χαμηλό, παρά τις ισχυρές δυνάμεις ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των ιόντων. Δεδομένου ότι τα ιόντα των συστατικών περιβάλλονται από τα αντίθετα φορτισμένα ιόντα, η κίνηση των ιόντων των συστατικών είναι βασικά περιορισμένη. Αν και τα ιόντα αυτά είναι σταθεροποιημένα, το ιξώδες εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δομή των ιόντων συστατικών, και μόνο λίγα ιοντικά υγρά έχουν πολύ χαμηλό ιξώδες. Η σχέση μεταξύ της δομής των συστατικών ιόντων και του ιξώδους δεν είναι πλήρως κατανοητή, πιθανώς επειδή υπάρχουν διάφορες παράμετροι, όπως το σχήμα των ιόντων, η πυκνότητα φορτίου, η συνεισφορά άλλων δυνάμεων αλληλεπίδρασης, η διαμόρφωση των αλκυλο-αλυσίδων κ.λπ. Η ιοντική αγωγιμότητα των ιοντικών υγρών είναι ίση με τον αριθμό των ιόντων επί την κινητικότητά

τους. Δεδομένου ότι τα ιοντικά υγρά αποτελούνται μόνο από ιόντα, ο αριθμός των ιόντων ανά όγκο είναι μεγαλύτερος από εκείνον των συνηθισμένων διαλυμάτων άλατος. Ωστόσο, ο αριθμός δεν είναι τόσο μεγάλος όσο αναμένεται από το γεγονός ότι τα ιοντικά υγρά δεν περιέχουν μόρια διαλύτη. Η κινητικότητα των ιόντων των συστατικών στα ιοντικά υγρά αντικατοπτρίζει το ιξώδες, και λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα δύο χαρακτηριστικά, τα ιοντικά υγρά αναμένεται να έχουν υψηλή ιοντική αγωγιμότητα. Ιόντα αγωγίμα και μη πτητικά υγρά θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τους ηλεκτρολύτες στα διαλύματα, ιδίως σε συσκευές μετατροπής ενέργειας, όπως μπαταρίες, πυκνωτές κ.λπ. Ωστόσο, κάθε συσκευή απαιτεί διαφορετικά χαρακτηριστικά από τα ιοντικά υγρά και τα γνωστά ιοντικά υγρά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για τις εν λόγω συσκευές.^[11]

1.5.1 Εφαρμογές ιοντικών υγρών

Η χαρακτηριστική συμπεριφορά των ILs είναι προϊόν της κατιονικής και ανιονικής φύσης τους σε συνδυασμό με την υψηλή χημική, φυσική, βιολογική και θερμική σταθερότητα. Παρουσιάζουν ελάχιστη απελευθέρωση στο περιβάλλον και αξιοσημείωτη εξειδίκευση εργασιών με ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην ηλεκτροχημεία, το διαχωρισμό και τις εκχυλίσεις, τους διαλύτες και τους καταλύτες, την αναλυτική, φυσική, συνθετική, βιολογική, μηχανική χημεία και άλλα. Μερικές από τις εφαρμογές αναφέρονται παρακάτω.

Ηλεκτροχημεία

Τα ILs χρησιμοποιούνται ευρέως στην ηλεκτροχημεία λόγω της διευρυμένης συσχέτισής τους με καλές έως εξαιρετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως το ότι είναι καλοί αγωγιμοί ηλεκτρολύτες, έχουν υψηλό ιξώδες, μεγάλα παράθυρα ηλεκτροχημικού δυναμικού, υψηλή θερμική σταθερότητα, ευρύ φάσμα στερεών προς υγρά, ρυθμιζόμενη διαλυτότητα και πολλά άλλα. Η απόδοση οποιασδήποτε ηλεκτροχημικής συσκευής βασίζεται ουσιαστικά σε μια διεπαφή των ιδιοτήτων IL/ηλεκτροδίου. Επιπλέον, οι ιδιότητες των ILs/ηλεκτροδίων συνδέονται επίσης με δύο κυρίως μέρη: 1) αγωγιμότητα των ILs: Η αγωγιμότητα οποιασδήποτε ηλεκτροχημικής διάταξης βασίζεται τελικά στα ιόντα ελεύθερου φορτίου και στην κινητικότητά τους. Σε γενικές γραμμές, τα ILs έχουν εξαιρετική ιοντική αγωγιμότητα λόγω της εξ ολοκλήρου ιοντικής τους φύσης. 2) Ιξώδες των ILs: Τα ILs είναι εξαιρετικά ιξώδη λόγω της ιξώδους φύσης τους, ονομάζονται πράσινοι διαλύτες ή καταλύτες. Ωστόσο, ο κίνδυνος έκθεσης των ILs στην ατμόσφαιρα δεν είναι σαφής. Το υψηλό ιξώδες των ILs μπορεί να οφείλεται στα ιόντα διαφορετικού μεγέθους και στις αλληλεπιδράσεις κατιόντων-ανιόντων.^[62]

Ως διαλύτες

Τα ILs συμμετέχουν σε ποικίλες αντιδράσεις, όπως αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, αντιδράσεις όξινης βάσης, αντιδράσεις υποβοηθούμενες από μικροκύματα, υποκαταστάσεις, απόσπαση, προσθήκη, αντιδράσεις καταλυόμενες από οξέα, αντιδράσεις

βάσης ή πυρηνόφιλες αντιδράσεις, αντιδράσεις καταλυόμενες από μέταλλα μετάπτωσης κ.λπ. [62]

Μηχανική

Η ανάπτυξη των μηχανολογικών εφαρμογών των ILS διερευνήθηκε πριν από περίπου δύομισι δεκαετίες, όπου η πρώτη έκθεση των ILS που δημοσιεύθηκε βασίστηκε στην εκχύλιση. Επί του παρόντος, η χρήση των ILS σημειώνει τεράστια πρόοδο σε πολλούς τομείς της χημείας, της φυσικής, της μηχανικής και σε πολλούς άλλους. Επιπλέον, έχει επίσης δημιουργηθεί η πρώτη εμπορική μονάδα που χρησιμοποιεί IL. [62]

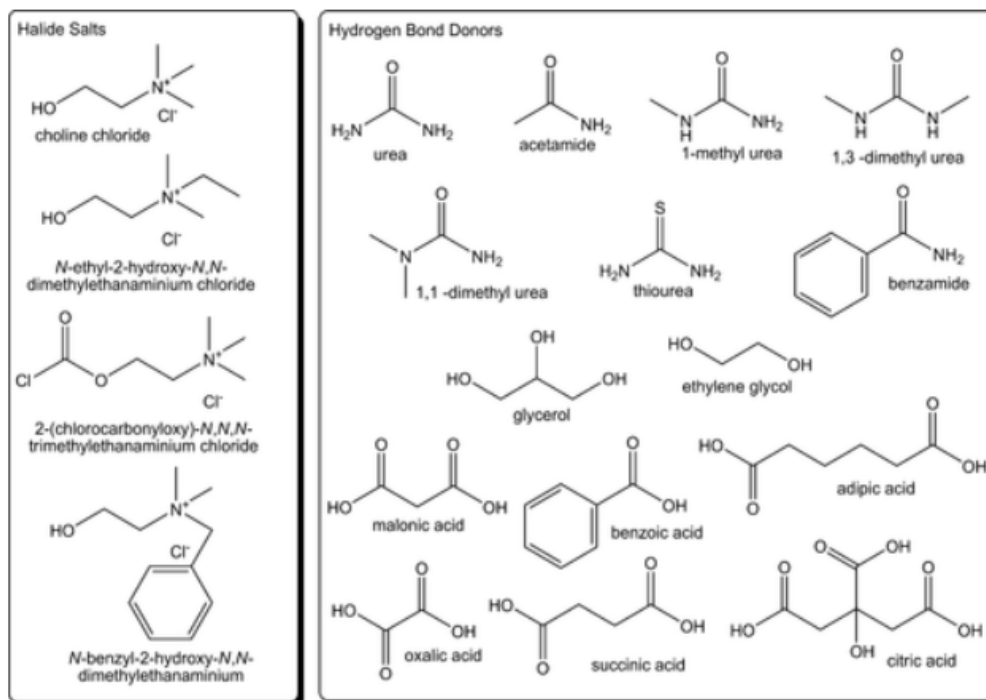
Βιολογία-Ιατρική

Εκτός από τη χρήση των συμβατικών οργανικών διαλυτών στην τεχνολογία ανακάλυψης φαρμάκων, η χρήση των ILS ως εναλλακτικών μέσων αντίδρασης διέπεται από περισσότερη προσοχή και έγινε πιο δημοφιλής τα τελευταία χρόνια. Τα ILS είναι ιοντικές χημικές ενώσεις και έχουν αποκτήσει ποικίλες εφαρμογές σε πολλούς τομείς της σύγχρονης επιστήμης και τεχνολογίας. Όλα αυτά μπορεί να είναι εύλογα λόγω των ρυθμιζόμενων εξαιρετικών ιδιοτήτων τους, οι οποίες μπορούν να μεταβληθούν με την αλλαγή της αναλογίας κατιόντων και ανιόντων ειδικά για τις ανάγκες τους. Εκτός από τις χημικές και φυσικές ιδιότητες των ILS, συνδέονται με υψηλή βιολογική δραστηριότητα η οποία προσελκύει σημαντικά μεγαλύτερο ενδιαφέρον από τους οικολόγους, τους φαρμακολόγους και τους βιοχημικούς. Επιπλέον, έχουν εξεταστεί για βιολογική δραστηριότητα ως προς τις αντιμικροβιακές, κυτταροτοξικές κ.λπ. ιδιότητές τους και στο πεδίο των εφαρμογών χορήγησης φαρμάκων και σύνθεσης φαρμάκων. [62]

1.6 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DESs) – Ορισμός και ιδιότητες

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DESs) αναγνωρίζονται πλέον ευρέως ως μια νέα κατηγορία αναλόγων ιοντικών υγρών (ILs), επειδή μοιράζονται πολλά χαρακτηριστικά και ιδιότητες με τα ILs. Οι όροι DES και IL έχουν χρησιμοποιηθεί συγκεχυμένα στη βιβλιογραφία, αν και είναι απαραίτητο να επισημανθεί ότι στην πραγματικότητα πρόκειται για δύο διαφορετικούς τύπους διαλυτών. Τα DESs είναι συστήματα που σχηματίζονται από ένα ευτηκτικό μείγμα οξέων και βάσεων Lewis ή Brønsted που μπορεί να περιέχουν μια ποικιλία ανιονικών ή/και κατιονικών ειδών (σχήμα 3). Αντίθετα, τα ILs σχηματίζονται από συστήματα που αποτελούνται κυρίως από έναν τύπο διακριτού ανιόντος και κατιόντος. Με άλλα λόγια, ο όρος DESs αναφέρεται σε υγρά που βρίσκονται κοντά στην ευτηκτική σύνθεση των μιγμάτων αλάτων και δοτών δεσμών υδρογόνου, δηλαδή στη μοριακή αναλογία των συστατικών που δίνει το χαμηλότερο σημείο τήξης. Αν και οι φυσικές ιδιότητες των DESs είναι παρόμοιες με άλλα ILs, οι χημικές τους ιδιότητες υποδηλώνουν τομείς εφαρμογής που είναι σημαντικά διαφορετικοί. [12]

Τα DESs περιέχουν μεγάλα, μη συμμετρικά ιόντα που έχουν χαμηλή ενέργεια πλέγματος και, ως εκ τούτου, χαμηλά σημεία τήξης. Συνήθως λαμβάνονται με τη συμπλοκοποίηση ενός άλατος τεταρτοταγούς αμμωνίου με ένα μεταλλικό άλας ή έναν δότη δεσμών υδρογόνου (HBD). Η αποεστίαση φορτίου που συμβαίνει μέσω του δεσμού υδρογόνου μεταξύ π.χ. ενός ιόντος αλογονιδίου και του τμήματος του δότη υδρογόνου, είναι υπεύθυνη για τη μείωση του σημείου τήξης του μίγματος σε σχέση με τα σημεία τήξης των επιμέρους συστατικών. [12]



Εικόνα 3: Δομές ορισμένων αλογονιδικών αλάτων και δοτών δεσμών υδρογόνου που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.[12]

1.6.1 Εφαρμογές βαθέως ευτηκτικών διαλυτών

Μεταλλουργία και ηλεκτροαπόθεση

Ένα από τα πρώτα θέματα που προκάλεσαν το ενδιαφέρον για τους DESs ως κατηγορία διαλυτών ήταν για μεταλλουργικές εφαρμογές, όταν ανακαλύφθηκε ότι τα μέταλλα και τα άλατα μετάλλων παρουσίαζαν υψηλές διαλυτότητες και ηλεκτρικές αγωγιμότητες στους DESs, καθιστώντας τους υποσχόμενους υποψηφίους για την εκχύλιση/ανακύκλωση μετάλλων σε διάλυμα, τον εξευγενισμό μεταλλευμάτων και την ηλεκτρόλυση /ηλεκτροαπόθεση. Οι στρατηγικοί DESs ενσωματώνονται στις διαδικασίες ανάκτησης, καθαρισμού, τήξης, κραματοποίησης και επιμετάλλωσης για την παραγωγή χρήσιμων αποθεμάτων υλικών, τόσο από πρώτες όσο και από ανακυκλωμένες πηγές, ανοίγοντας

δρόμο για τη μεταλλουργία και άλλες πιο σύνθετες εφαρμογές που χρησιμοποιούν μέταλλα για την παραγωγή ποικίλων χρήσιμων εργαλείων.^[13]

Διεργασίες διαχωρισμού

Πιο πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι ορισμένοι DESs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ακόμη μεγαλύτερη ποικιλία διαδικασιών διαχωρισμού. Οι διαχωρισμοί είναι μια βιομηχανικά σημαντική πτυχή της χημικής επεξεργασίας που περιλαμβάνει το φυσικό διαχωρισμό δύο ή περισσότερων συστατικών. Η πλειονότητα των σύγχρονων ζητημάτων στη βιομηχανία χημικής επεξεργασίας έχει να κάνει με την παραγωγή ανεπιθύμητων ενώσεων ως παραπροϊόντων. Ως εκ τούτου, ένα σημαντικό μέρος της έρευνας στον τομέα των εφαρμογών των DESs έχει κατευθυνθεί προς τους διαχωρισμούς.^[13]

Συστήματα ισχύος και τεχνολογίες μπαταριών

Λόγω της πανταχού παρουσίας των επαναφορτιζόμενων μπαταριών στους υπολογιστές και τα smartphones, υπάρχει σημαντική ζήτηση για στρατηγικές και υλικά για τη βελτίωση των τεχνολογιών αποθήκευσης και μετατροπής ενέργειας, συμπεριλαμβανομένης της λειτουργικότητας και της ασφάλειας. Επειδή οι σημερινοί ηλεκτρολύτες που χρησιμοποιούνται στις μπαταρίες ιόντων λιθίου (LIBs) έχουν οδηγήσει σε αρκετές αποτυχίες, η δυνατότητα ενός ανθεκτικού στη φλόγα υποκατάστατου που δεν κάνει συμβιβασμούς σε άλλους τομείς, είναι σίγουρα ελκυστική. Ως εκ τούτου, οι DESs εξετάζονται ως πιθανοί ηλεκτρολύτες για τις LIBs λόγω της κατεσταλμένης αναφλεξιμότητάς τους, του μεγάλου θερμοκρασιακού εύρους στο οποίο είναι υγροί και της υψηλής αγωγιμότητάς τους.^[13]

Βιοκατάλυση και οργανική χημεία

Η βιοκατάλυση είναι ένας κλάδος της οργανικής χημείας που χρησιμοποιεί ένζυμα ή μικρόβια ως καταλύτες για τη επιτάχυνση αντιδράσεων όπως οι εποξειδώσεις, οι μετεστεροποιήσεις και ο σχηματισμός δεσμών C-C. Ενσωματώνει τη μελέτη φυσικών συστημάτων στα οποία συμβαίνει αυτό, καθώς και προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων αντιδράσεων που θα μπορούσε να επιταχύνει η βιοκατάλυση. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται συνήθως σε υδατικό διάλυμα και, ως εκ τούτου, η προσεκτική επιλογή τόσο του ενζύμου όσο και του διαλύτη είναι υψίστης σημασίας, καθώς πρέπει να συνεργάζονται για να παράγουν χρήσιμα προϊόντα.^[13]

Οι DESs διαθέτουν διάφορα βασικά χαρακτηριστικά που αποδεικνύουν ότι έχουν μεγάλες δυνατότητες να διευκολύνουν νέες βιοκαταλυτικές οδούς. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους ως υγρά με την ικανότητα να υποστηρίζουν μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, ενζύμων και άλλων βιοδραστικών διαλυτών ουσιών, τα καθιστά δυνητικά υποψήφια. Ειδικότερα, οι DESs είναι κατάλληλοι για ενζυμικά συστήματα.^[13]

Απορρόφηση αερίων

Η προσρόφηση και η δέσμευση του CO₂ είναι ένα επίκαιρο θέμα με στόχο τη μείωση της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Μεγάλες προσπάθειες επικεντρώνονται στην ανάπτυξη πηγών ενέργειας που δεν εκπέμπουν CO₂. Ωστόσο, αυτές δε βρίσκονται στο στάδιο όπου μπορούν

να εφαρμοστούν σε μεγάλη κλίμακα. Ο σχεδιασμός μιας βιώσιμης συνθετικής διαδικασίας για την παρασκευή ανακυκλώσιμων στερεών ροφητικών ουσιών που παρουσιάζουν ενισχυμένη ικανότητα απορρόφησης είναι ζωτικής σημασίας. Η χρήση των DESs για την παρασκευή αυτών των υλικών φαίνεται πολλά υποσχόμενη όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα και τη βιωσιμότητα. Δύο ομάδες στην Κίνα και την Ισπανία χρησιμοποίησαν την ιονοθερμική σύνθεση για την παραγωγή πορωδών πλαισίων κατάλληλων για τη δέσμευση CO₂. Τα συμπεράσματα της έρευνας ήταν αρκετά ενθαρρυντικά για τη χρήση των DESs στην εφαρμογή απορρόφησης αερίων. ^[12]

Βιοϊατρικές εφαρμογές των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών

Η ιατρική έρευνα αναζητά διαρκώς νέους τρόπους για την παροχή φαρμάκων και θεραπειών και διάφορες πτυχές των DESs έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για αυτό, ως πιθανά οχήματα για τη χορήγηση φαρμάκων. Η δυνατότητα χρήσης των DESs για την επέκταση των επιλογών παράδοσης βελτιωμένων φαρμακευτικών προϊόντων αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα πιθανή εξέλιξη για την ιατρική έρευνα. Οι πρωταρχικές προσπάθειες σημείωσαν τη μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων που μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό βαθέως ευτηκτικών υγρών και κατέληξαν στο ότι οι DESs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως οχήματα διαλυτοποίησης φαρμάκων, καθώς διάφορα σημαντικά φάρμακα, όπως η λιδοκαΐνη/απριλοκαΐνη, είναι τα ίδια ευτηκτικά υγρά. Η καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα βαθέως ευτηκτικά υγρά και η ιατρική μπορούν να συνδυαστούν είναι συνετή. ^[13]

Ένας αναδυόμενος τομέας έρευνας για τους DESs είναι η χρήση τους σε βιομετασχηματισμούς. Ο βιομετασχηματισμός είναι μια χημική τροποποίηση που πραγματοποιείται από έναν οργανισμό ή ένα ένζυμο σε μια χημική ένωση και είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωσή μας, καθώς επιτρέπει στον οργανισμό να μετατρέπει τα απορροφούμενα θρεπτικά συστατικά (τροφή, οξυγόνο κ.λπ.) σε ουσίες που χρειαζόμαστε για να λειτουργήσουμε. Ο οργανισμός χρησιμοποιεί επίσης τη βιομετατροπή ή το μεταβολισμό για να μετατρέψει ένα απορροφημένο φάρμακο στον ενεργό παράγοντα ή για να μετατρέψει τις τοξίνες του σώματος σε λιγότερο επιβλαβείς ουσίες που μπορούν να αποβληθούν. Παραδοσιακά, οι βιομετασχηματισμοί πραγματοποιούνται σε υδατικούς διαλύτες. Ωστόσο, η βιοκατάλυση έχει επίσης επιχειρηθεί σε πολικούς οργανικούς διαλύτες, όπως η ακετόνη, η μεθανόλη ή το DMSO, αν και οι πολικοί οργανικοί διαλύτες μετουσιώνουν τακτικά τα ένζυμα. Η αντικατάσταση των πολικών οργανικών διαλυτών με DESs επιτρέπει τη διάλυση υποστρωμάτων χωρίς απενεργοποίηση των ενζύμων. Ένας DES μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους: ως συνδιαλύτης με το νερό για να βοηθήσει τα μη πολικά υποστρώματα να διαλυθούν σε υδατικό διάλυμα, ως δεύτερη φάση σε μίγμα νερού-DES ή ως μη πτητικός αντικαταστάτης μη υδατικού διαλύτη. Οι DESs γενικά δύνανται να αποτελέσουν μια τεχνικά και οικονομικά βιώσιμη εναλλακτική λύση στους οργανικούς διαλύτες. ^[12]

Σύνθεση νανοσωματιδίων

Η νανομηχανική/νανοτεχνολογία είναι η πρακτική της μηχανικής και της μελέτης συστημάτων μεγέθους νανοκλίμακας και είναι ένας τομέας που έχει συγκεντρώσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, λόγω των πιθανών εφαρμογών του σε πολλούς τομείς, όπως η ιατρική, η παραγωγή ενέργειας και η ηλεκτρονική. Η έρευνα για την ενσωμάτωση των DESs στη νανοτεχνολογία βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη, καθώς μέχρι σήμερα έχει δημοσιευτεί περιορισμένος μόνο αριθμός άρθρων για το θέμα. Ωστόσο, οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής προσφέρουν αδιάσειστα στοιχεία ότι οι DESs μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία στη νανοτεχνολογία και σε συναφείς εφαρμογές. Πολύ περισσότερες μελέτες μέχρι σήμερα έχουν επικεντρωθεί σε ILs παρά σε DESs στη νανοτεχνολογία. Ωστόσο, οι γνώσεις που έχουν αποκτηθεί συχνά επεκτείνονται εύκολα στη μελέτη των DESs.

Ένα από τα κύρια ζητήματα της νανομηχανικής είναι η κατανόηση της δομής και της συμπεριφοράς των υλικών σε σχετικές κλίμακες μήκους. Ως εκ τούτου, οι έρευνες σχετικά με την ετερογένεια και τη μικροδομή των DESs αποτελούν τομέα βασικού ενδιαφέροντος.^[13]

1.6.2 Ιδιότητες των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών

Ενώ οι DESs και τα συμβατικά ILs έχουν διαφορετικές χημικές ιδιότητες, έχουν παρόμοιες φυσικές ιδιότητες, ιδίως τη δυνατότητα να είναι ρυθμιζόμενοι διαλύτες που μπορούν να προσαρμοστούν σε ένα συγκεκριμένο τύπο χημείας. Παρουσιάζουν επίσης χαμηλή τάση ατμών, σχετικά μεγάλη θερμοκρασιακή περιοχή στην οποία είναι υγροί και μη αναφλεξιμότητα. Οι DESs έχουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών ILs, όπως είναι η ευκολία παρασκευής τους και η μεγάλη διαθεσιμότητά τους από σχετικά φθηνά συστατικά (τα ίδια τα συστατικά είναι τοξικολογικά καλά χαρακτηρισμένα, οπότε μπορούν εύκολα να αποσταλούν για επεξεργασία μεγάλης κλίμακας), είναι, ωστόσο, γενικά λιγότερο χημικά αδρανή. Η παραγωγή των DESs περιλαμβάνει την απλή ανάμιξη των δύο συστατικών, γενικά με μέτρια θέρμανση. Αυτό διατηρεί ένα συγκριτικά χαμηλό κόστος παραγωγής σε σχέση με τα συμβατικά ILs (όπως τα υγρά με βάση το ιμιδαζόλιο) και επιτρέπει εφαρμογές μεγάλης κλίμακας. Ενώ τα επιμέρους συστατικά των DESs τείνουν να χαρακτηρίζονται τοξικολογικά, υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες σχετικά με τις τοξικολογικές ιδιότητες των ίδιων των ευτηκτικών διαλυτών και αυτό πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω από την επιστημονική κοινότητα.^[12]

Συμπερασματικά, σε γενικές γραμμές, οι DESs χαρακτηρίζονται από χαμηλά σημεία τήξης, χαμηλή πτητικότητα, μη αναφλεξιμότητα, χαμηλή πίεση ατμών, διπολική φύση, χημική και θερμική σταθερότητα, υψηλή διαλυτότητα, ρυθμισιμότητα, χαμηλή τοξικότητα και βιοδιασπασιμότητα. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι διαλύτες αυτοί είναι χημικά ρυθμιζόμενοι, οι ιδιότητές τους μπορούν να προσαρμοστούν για τη δημιουργία ειδικών DESs για κάθε εργασία, ανάλογα με τις προβλεπόμενες εφαρμογές, με διαφορετικές φυσικοχημικές

ιδιότητες. Έχουν παρασχεθεί δεδομένα για τη συμπεριφορά φάσης, την πυκνότητα, το ιξώδες, την αγωγιμότητα, την επιφανειακή τάση, την ιονικότητα, την ηλεκτροχημική συμπεριφορά, την τοξικότητα και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις πολλών DESs, και πλούσιες βάσεις δεδομένων είναι διαθέσιμες στη διεθνή βιβλιογραφία.^[14]

1.7 Διαφορές μεταξύ βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και ιοντικών υγρών

Οι DESs διαφέρουν από τα ILs με δύο βασικούς τρόπους, τη φύση των αρχικών υλικών και τις μεθόδους σχηματισμού τους. Τα ILs είναι συνδυασμός οργανικών ετεροκυκλικών κατιόντων και οργανικών ή ανόργανων ανιόντων, ενώ οι DESs είναι συνδυασμός διαφόρων δεκτών δεσμών υδρογόνου (HBA) και δοτών δεσμών υδρογόνου (HBD). Ο αριθμός των πιθανών μιγμάτων είναι πρακτικά απεριόριστος τόσο για τα ILs όσο και για τους DESs. Με έναν τόσο μεγάλο αριθμό κατάλληλων αρχικών υλικών καθώς και των δυνατών συνδυασμών, έχουν τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα που επιτρέπουν την αλλαγή των ιδιοτήτων των ουσιών αυτών, ώστε να ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις συγκεκριμένων εφαρμογών. Για αυτό ακριβώς τόσο τα ILs όσο και οι DESs έχουν βρει ευρεία χρήση σε διάφορους τομείς της επιστήμης, της έρευνας και της τεχνολογίας.

Το τεράστιο πλεονέκτημα των DESs, ωστόσο, είναι ότι κατασκευάζονται από εν γένει μη τοξικές, εύκολα προσβάσιμες, φθηνές και βιώσιμες ενώσεις. Επιπλέον, τα κοινά συστατικά των DESs είναι βιοσυμβατές ενώσεις που απαντούν στη φύση και δεν είναι επικίνδυνες εάν απελευθερωθούν πίσω στη φύση. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι τα συστατικά των DESs, σε αντίθεση με τα ILs, δεν πρέπει να αντιδρούν μεταξύ τους, επομένως, είναι απαραίτητο να αποφεύγονται οι συνδυασμοί τέτοιων ενώσεων όπου αυτό είναι δυνατό.

Η σύνθεση των ILs περιλαμβάνει συχνά πολλά συνθετικά στάδια με τη χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων, οργανικών πτητικών διαλυτών, ενώ μπορεί να παράγονται παραπροϊόντα και απόβλητα. Γενικά, ο χρόνος αντίδρασης είναι μεγάλος (έως 48 ώρες) με τη θερμοκρασία να κυμαίνεται από 25 έως 100 °C. Η σύνθεση των ILs αποτελείται από δύο κύρια στάδια: (i) σχηματισμό κατιόντων (με πρωτονίωση της αμίνης με οξύ ή αντίδραση τετραμερισμού της αμίνης με αλογονοαλκάνιο) και (ii) ανταλλαγή ανιόντων (με κατεργασία του αλογονικού άλατος με οξύ Lewis ή με μετάθεση ανιόντων). Αντίθετα, οι DESs μπορούν να παρασκευαστούν απλά με θέρμανση ή με τη μέθοδο της άλεσης. Η μέθοδος θέρμανσης είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη: οι ενώσεις αναμιγνύονται και θερμαίνονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 50 °C και 100 °C υπό συνεχή ανάδευση για χρόνους που κυμαίνονται από λεπτά έως ώρες, έως ότου σχηματιστεί ένα ομοιογενές υγρό. Η μέθοδος άλεσης βασίζεται στην ανάμιξη των ενώσεων σε θερμοκρασία δωματίου και την άλεση τους σε γουδί με γουδοχέρι. Το υγρό που σχηματίζεται με τη μέθοδο θέρμανσης ή άλεσης λαμβάνεται με απόδοση 100% και με οικονομία ατόμων 100%. Μια άλλη μέθοδος, η ξήρανση με κατάψυξη, είναι επίσης γνωστή, αλλά είναι λίγο πιο περίπλοκη. Τα ξεχωριστά υδατικά διαλύματα των αρχικών συστατικών

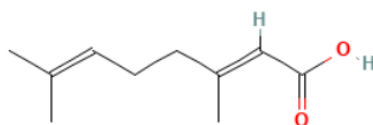
αναμιγνύονται μεταξύ τους και ξηραίνονται με κατάψυξη για να σχηματιστεί ένα διαυγές ιξώδες υγρό.

Η δομή και οι ιδιότητες των ILs καθώς και των DESs καθορίζονται από τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις: δυνάμεις Coulomb, δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις διασποράς. Εξ ορισμού, η συμπεριφορά των ILs κυριαρχείται από ιοντικές αλληλεπιδράσεις (δυνάμεις Coulomb), ενώ οι DESs, ως ευτηκτικά μίγματα δύο ή περισσότερων διαφορετικών συστατικών, παρουσιάζουν ισχυρή συμβολή από δεσμούς υδρογόνου. Αν και τα ILs και οι DESs διαφέρουν ως προς τη φύση των συστατικών τους και τον τύπο των κυρίαρχων διαμοριακών δυνάμεων, μοιράζονται πολλές ενδιαφέρουσες ιδιότητες, οι οποίες μπορούν να ρυθμιστούν με την επιλογή της φύσης και της αναλογίας των συστατικών.

Όπως βλέπουμε, οι φυσικές ιδιότητες των ILs και των DESs είναι πολύ κοντά η μία στην άλλη, και το πιο σημαντικό είναι ότι, χάρη στο μεγάλο αριθμό πιθανών συνδυασμών των αρχικών υλικών, είναι επίσης εξαιρετικά ρυθμιζόμενες ανάλογα με τις απαιτήσεις για συγκεκριμένη χρήση. Από την άλλη πλευρά, αυτό καθιστά αδύνατη τη γενίκευση των χημικών ιδιοτήτων τους, όπως η τοξικότητα, η σταθερότητα, η βιοδιασπασιμότητα, η ευφλεκτότητα, η οικολογικότητα κ.λπ. Από περιβαλλοντική άποψη, οι DESs υπερτερούν των ILs λόγω της υψηλότερης βιοαποικοδομησιμότητάς τους και της χαμηλότερης τοξικότητάς τους. Η φυσική προέλευση των συστατικών δίνει στους DESs αυτό το μεγάλο πλεονέκτημα έναντι των ILs, ενώ τα συστατικά των ILs είναι άλατα ονίου, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα. Εκτός από τους παράγοντες της τοξικολογίας, της βιοδιασπασιμότητας και της ανακυκλωσιμότητας, υπάρχουν πολλές άλλες εκτιμήσεις που επηρεάζουν την ποιότητα της πράσινης χημείας των ILs, όπως ο μεγάλος χρόνος αντίδρασης σε υψηλές θερμοκρασίες, η χρήση πτητικών και μη ανανεώσιμων διαλυτών, οι μεγάλες ποσότητες χημικών ουσιών, η μεγάλη ποσότητα υποπροϊόντων ως αποβλήτων και η υψηλή σταθερότητα στο νερό (τα ILs γίνονται επίμονοι ρύποι στα λύματα). Επιπλέον, οι διαφορετικές χημικές ιδιοτήτές τους ενθαρρύνουν τους τομείς εφαρμογής που είναι σημαντικά πιο ποικίλοι. Για παράδειγμα, πολλά ένζυμα παρουσιάζουν τόσο υψηλή δραστηριότητα όσο και απροσδόκητα πολλά υποσχόμενη σταθερότητα σε DESs.^[46]

1.8 Γερανικό οξύ

Το γερανικό οξύ, ή 3,7-διμεθυλο-2,6-οκταδιενικό οξύ (σχήμα 4), είναι μια φερομόνη που χρησιμοποιείται από ορισμένους οργανισμούς. Είναι ένα ισομερές διπλού δεσμού του νερολικού οξέος. Το γερανικό οξύ είναι ένα φυσικό προϊόν που βρίσκεται στο *Pectiselongata*, στο *Vitisvinifera* και σε άλλους οργανισμούς. Η τιμή του logP του γερανικού οξέος κυμαίνεται ανάμεσα στο 1 και στο 4 σε σύστημα οκτανόλης νερού.^[37]



Εικόνα 4: Δομή γερανικού οξέος [37]

1.9 Χολίνη

Η χολίνη είναι ένα διατροφικό συστατικό που είναι σημαντικό για τη δομική ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών, το μεταβολισμό του μεθυλίου, τη χολινεργική νευροδιαβίβαση, τη διαμεμβρανική σηματοδότηση και τη μεταφορά και το μεταβολισμό των λιπιδίων και της χοληστερόλης. Τα ανθρώπινα κύτταρα που καλλιεργούνται έχουν απόλυτη απαίτηση για χολίνη. Όταν τα κύτταρα στερούνται τη χολίνη, πεθαίνουν με απόπτωση. [25]

1.9.1 Πηγές χολίνης στη φύση

Η χολίνη και οι εστέρες της χολίνης κατανέμονται ευρέως στα τρόφιμα, ωστόσο τα ζωικά προϊόντα περιέχουν γενικά περισσότερη χολίνη ανά μονάδα βάρους από ό, τι τα φυτά. Τα αυγά, το βοδινό κρέας, το κοτόπουλο, τα ψάρια και το γάλα, καθώς και επιλεγμένα φυτικά τρόφιμα, όπως τα σταυρανθή λαχανικά και ορισμένα φασόλια, είναι ιδιαίτερα καλές πηγές χολίνης, παρέχοντας τουλάχιστον το 10% της ημερήσιας απαίτησης ανά μερίδα. Οι άνθρωποι που καταναλώνουν *ad libitum* διατροφή προσλαμβάνουν μεταξύ 150 και 600 mg χολίνης/ημέρα ως ελεύθερη χολίνη και εστέρες χολίνης. Στη μελέτη NHANES του 2005, μόνο ένα μικρό μέρος των Αμερικανών σε όλες τις ηλικιακές ομάδες κατανάλωναν δίαιτες που κάλυπταν τη συνιστώμενη πρόσληψη χολίνης. Τα τρόφιμα περιέχουν επίσης το μεταβολίτη της χολίνης, τη βεταΐνη, η οποία δεν μπορεί να μετατραπεί σε χολίνη αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δότης μεθυλίου, εξοικονομώντας έτσι ορισμένες ανάγκες σε χολίνη. Τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης μπορούν να αποτελέσουν πλούσια πηγή βεταΐνης (που πήρε το όνομά της από τα τεύτλα), με τα προϊόντα σιτηρών να αποτελούν ιδιαίτερα καλές πηγές. [26]

Όσον αφορά στην τοξικότητα, το Ανώτατο Επιτρεπτό Όριο (UL) για τη χολίνη προέκυψε από το χαμηλότερο παρατηρούμενο επίπεδο ανεπιθύμητης ενέργειας (υπόταση) στον άνθρωπο και είναι 3,5 g/d για έναν ενήλικα. [26]

1.9.2 Ιοντικά υγρά με βάση τη χολίνη

Τα IIs με βάση τη χολίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη χορήγηση φαρμάκων λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων τους. Τα καθαρά IIs με βάση τη χολίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαλυτοποιητές φαρμάκων, ενισχυτές διαπερατότητας και αντιβακτηριακοί παράγοντες λόγω της αντιβακτηριακής τους δράσης κ.ο.κ. Εκτός αυτού, διάφοροι σχηματισμοί με IIs με βάση τη χολίνη μπορούν επίσης να διαδραματίσουν ρόλο στην παροχή φαρμάκων. Η παρασκευή και η έρευνα διαφορετικών IIs με βάση τη χολίνη, Απρωτικά Ιοντικά Υγρά (API-IIs) και διαφορετικών σχηματισμών με χρήση IIs με βάση τη χολίνη μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε καλύτερα την εφαρμογή των ιοντικών υγρών χολίνης.

1.9.3 Διαδερμική χορήγηση φαρμάκων από ιοντικά υγρά με βάση τη χολίνη

Το δέρμα είναι ο πιο σημαντικός φραγμός για την προστασία του ανθρώπινου σώματος. Λόγω των πλεονεκτημάτων της καλής συμμόρφωσης του ασθενούς, του συνεχούς ελέγχου της χορήγησης, της υψηλής τοπικής συγκέντρωσης και της αποφυγής της ηπατικής αποβολής πρώτης διόδου, η διαδερμική χορήγηση είναι η προτιμώμενη μέθοδος θεραπείας. Ωστόσο, αποτελεί τεράστια πρόκληση να ξεπεραστεί ο πολυστρωματικός δερματικός φραγμός, ιδίως ο υψηλότερος φραγμός μεταφοράς του δέρματος, η κεράτινη στιβάδα (SC). Η SC αποτελείται από πυκνά πακτωμένα κερατινοκύτταρα που περιβάλλονται από λιπίδια, και μόνο λίγα χαμηλής ποιότητας και ιδιαίτερα λιπόφιλα φάρμακα μπορούν να περάσουν από τον φραγμό της SC χωρίς βοήθεια. Η SC εμποδίζει τα περισσότερα φάρμακα να διεισδύσουν στο δέρμα, οδηγώντας σε ορισμένους περιορισμούς στη διαδερμική χορήγηση των περισσότερων φαρμάκων. Τα IIs με βάση τη χολίνη μπορούν να βοηθήσουν τα φάρμακα να ξεπεράσουν τα εμπόδια της SC στη διαδερμική χορήγηση φαρμάκων.^[27] Η διαδερμική χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων, ιδίως εκείνων που είναι αδιάλυτα στο νερό και σε άλλους συμβατικούς διαλύτες, αποτελεί τεράστια πρόκληση. Για τα δυσδιάλυτα φάρμακα, τα IIs με βάση τη χολίνη ενισχύουν τη διαδερμική απορρόφηση των φαρμάκων αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους. Τα μόρια των IIs με βάση τη χολίνη είναι πιθανό να γλιστρήσουν μέσα από τις λιπαρές ενώσεις, δημιουργώντας μικροσκοπικά στιγμιαία ανοίγματα, στα οποία μπορούν να διεισδύσουν βιολογικά ενεργά μόρια (αυτά που μεταφέρονται από τα IIs με βάση τη χολίνη), για να επιτευχθεί η διαδερμική διείσδυση των υδρόφιλων μακρομοριακών φαρμάκων. Έχει αναφερθεί επίσης ότι ο μηχανισμός διείσδυσης στο δέρμα υδρόφιλων μεγαλομοριακών φαρμάκων από IIs με βάση τη χολίνη αφορά κυρίως στην εξαγωγή λιπιδίων στην SC, όπως φαίνεται μέσω υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Οι κορυφές απορρόφησης που προέρχονται από τα λιπίδια στην SC μειώνονται μετά την επώαση των IIs με βάση τη χολίνη με τη SC.^[27]

1.10 CAGE: choline geranate

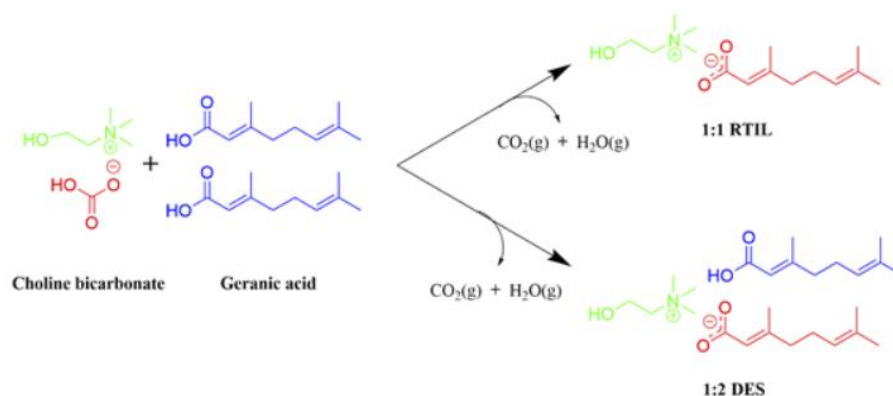
Ένας αριθμός μελετών βρίσκεται καθ' οδόν προς την πρόοδο του τομέα των βιοϊατρικών επιστημών με τη χρήση ιοντικών υγρών (ILs) και βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (DESs), λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους και της εγγενούς ρυθμισιμότητάς τους. Αυτοί οι σημαντικοί διαλύτες τείνουν να βελτιώνουν τις φυσικές ιδιότητες του φαρμάκου, να αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητά του και να προωθούν την παράδοση των ανθεκτικών φαρμάκων στον οργανισμό. Ένα τέτοιο ευρέως διαδεδομένο δελεαστικό σύστημα πολλαπλών χρήσεων IL/DES είναι το CAGE (choline geranate), το οποίο έχει αποκτήσει σημαντικό ενδιαφέρον λόγω της βιοσυμβατής και εξαιρετικά ισχυρής αντισηπτικής συμπεριφοράς του. Αυτό το βιοσυμβατό IL/DES έχει καταστήσει εύκολη τη διαλυτοποίηση υδρόφοβων και υδρόφιλων φαρμάκων και τη μεταφορά «δύσκολων» φαρμάκων μέσω φυσιολογικών φραγμών, σταθεροποιώντας πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Ως εκ τούτου, έχει χρησιμοποιηθεί ως φορέας διαδερμικής, υποδόριας και από του στόματος χορήγησης και ως αντιμικροβιακός παράγοντας για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών και πληγών, όπως έχει εγκριθεί από εργαστηριακές και κλινικές μεταφράσεις.

Από όλα τα API-ILs που έχουν συντεθεί και δοκιμαστεί μέχρι σήμερα για εφαρμογές χορήγησης φαρμάκων, το CAGE προηγείται έναντι των άλλων λόγω της βιοσυμβατότητάς του. Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες με βάση το CAGE έχουν μεγάλη ζήτηση ως κλινικοί παράγοντες λόγω της ασφάλειας και της υψηλότερης αποτελεσματικότητάς τους. Είναι ιδιαίτερα ασφαλείς για βιολογική χρήση, όπως προκύπτει από το ιστορικό τους. Το πρώτο συστατικό, η χολίνη, έχει χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο για την εγκυμοσύνη, καθώς παρέχει υποστήριξη στην ανάπτυξη του εμβρύου και αναστέλλει τη δυσλειτουργία των οργάνων. Το δεύτερο συστατικό, το γερανικό οξύ, είναι πανταχού παρόν στα εκχυλίσματα τσαγιού. Το CAGE, τελικά, έχει ένα ευρύ φάσμα δυνατοτήτων σε ανθεκτικές λοιμώξεις του οργανισμού, όπως λοιμώξεις στους πνεύμονες, το δέρμα, τις βλεννογόνες μεμβράνες και τη στοματική κοιλότητα.^[28]

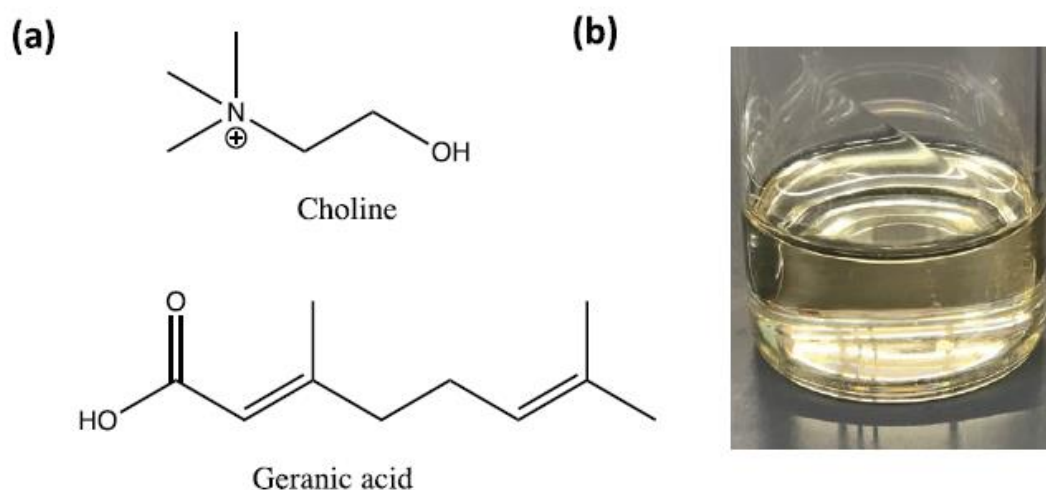
1.10.1 Σύνθεση του CAGE

Εργαστηριακά, το CAGE συντίθεται με αντίδραση μετάθεσης άλατος χρησιμοποιώντας εμπορικά και GRAS (Generally Recognized as Safe) αντιδραστήρια που υπάρχουν στον κατάλογο του FDA (Food and Drug Administration): διττανθρακική χολίνη και γερανικό οξύ. Το αν πρόκειται για ιοντικό υγρό RTIL ή DES, καθορίζεται από την αναλογία των δύο συστατικών του στο μίγμα. Τα NeatILs ή RTILs είναι οργανικά άλατα, που έχουν αναλογία 1:1 συστατικών κατιόντων και ανιόντων, ενώ τα DESs παρασκευάζονται με ποικίλες αναλογίες κατιόντων φορτισμένων ή ουδέτερων ειδών. Στα σχήματα 5 και 6 παρουσιάζεται η σύνθεση των CAGE που αναφέρονται κυρίως στη βιβλιογραφία με μοριακές αναλογίες συνδυασμού

1:1 και 1:2 της χολίνης και του γερανικού οξέος και χαρακτηρίζονται RTIL και DES, αντίστοιχα.^[28]



Εικόνα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της σύνθεσης CAGE με μοριακή αναλογία διττανθρακικής χολίνης και γερανικού οξέος 1:1 (RTIL) και 1:2 (DES).^[28]



Εικόνα 6: α) Χημικές δομές της χολίνης και του γερανικού οξέος και β) CAGE που παρασκευάζεται με μετάθεση άλατος διττανθρακικής χολίνης και γερανικού οξέος σε μοριακή αναλογία 1:2.^[29]

1.10.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες του CAGE

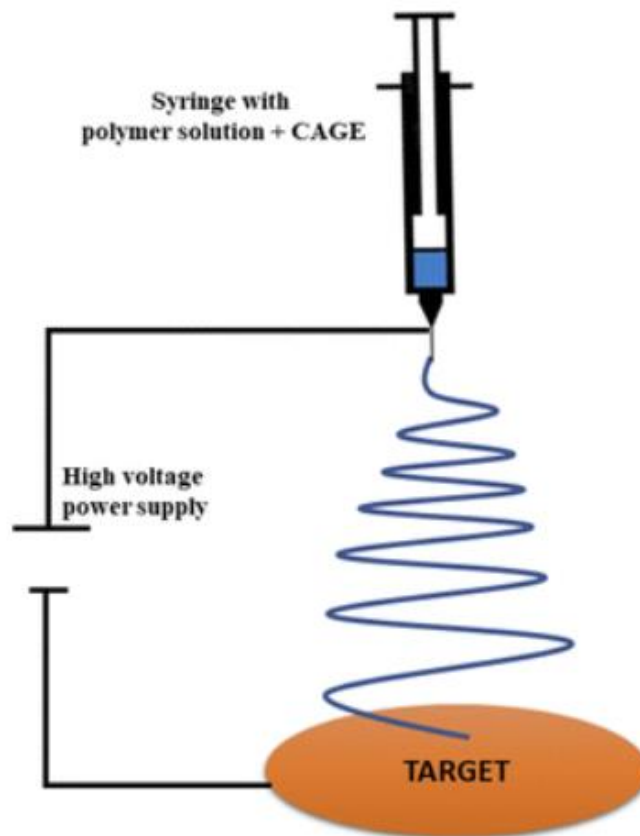
Το CAGE περιλαμβάνει κυρίως ιοντικά είδη και οι ιδιότητές του εξαρτώνται μη μονότονα από την πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ ιοντικών και ουδέτερων ειδών των διαφορετικών αναλογιών χολίνης και γερανικού οξέος. Η πιο αποτελεσματική αναλογία 1:2 του CAGE έχει ιώδες $569 \pm 19 \text{ mPa} \cdot \text{s}$, αγωγιμότητα $13,79 \pm 0,28 \text{ mS m}^{-1}$ με συντελεστή διάχυσης $2,2 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Επιπλέον, έχει μοριακό βάρος $440,32 \text{ g mL}^{-1}$ με πυκνότητα $0,989 \text{ g mL}^{-1}$ στους 25°C .^[28]

1.10.3 Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Τα συστήματα IL/DES με βάση το CAGE παρουσιάζουν υψηλή αντιμικροβιακή δράση, όχι μόνο έναντι βακτηρίων αλλά και έναντι μυκήτων και ιών. Είναι ιδιαίτερα δραστικά έναντι μικροβίων που απομονώθηκαν κλινικά από *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* και *Mycobacterium tuberculosis*, καθώς και εργαστηριακών στελεχών του ιού του απλού έρπητα. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα και ποντίκια δείχνουν ένα ίχνος τοξικότητας του CAGE με βελτιωμένη αναλογία αποτελεσματικότητας/τοξικότητας σε σύγκριση με τα αντισηπτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα. Το CAGE έχει τη μοναδική ιδιότητα διείσδυσης στο δέρμα λόγω της βιοσυμβατότητάς του και μπορεί να παρέχει αποτελεσματικά αντιβιοτικά. Η διεισδυτική δύναμη του CAGE δεν περιορίζεται μόνο στο χόριο, αλλά μπορεί να αντιμετωπίσει παθογόνα του δέρματος, παρουσιάζοντας τη δυνατότητα να θεραπεύσει μια λοίμωξη όπως το *Propionibacterium acnes*, όπως παρατηρήθηκε μέσω εργαστηριακών πειραμάτων. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν σαφώς τις θεραπευτικές και αντισηπτικές εφαρμογές του.^[28]

1.10.4 Δυνατότητα επούλωσης πληγών από ικρίωματα CAGE

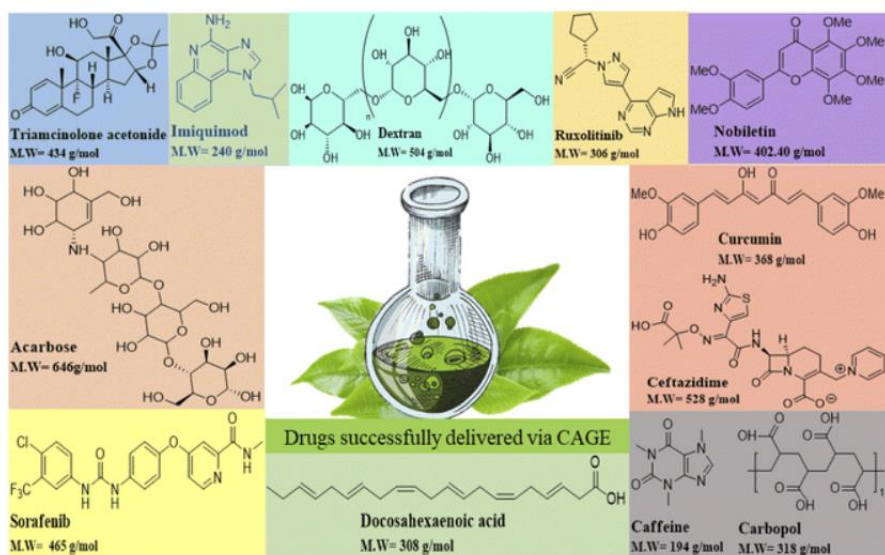
Η επούλωση των τραυμάτων είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία των ιστών από ξένους παράγοντες και παθογόνα, τα οποία θα μπορούσαν να είναι επικίνδυνα για τον ασθενή. Τα παθογόνα μπορούν να σχηματίσουν μικροβιακά βιοϋμένια πάνω και μέσα στον πληγωμένο ιστό που είναι ευάλωτος σε βακτηριακές αποικίες. Αυτά τα μικροβιακά βιοϋμένια θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε χρόνιες λοιμώξεις και είναι αρκετά ανθεκτικά στην αντιβιοτική θεραπεία. Πρόσφατα, τα ηλεκτροσπογγισμένα ικρίωματα που περιέχουν CAGE έχουν επικρατήσει για την αποτελεσματική μείωση των βακτηριακών αποικιών. Τα ευκαιριακά βακτηριακά παθογόνα είναι η κύρια αιτία που παρεμποδίζει τη διαδικασία επούλωσης των τραυμάτων. Όταν το CAGE χρησιμοποιήθηκε σε συσκευές ηλεκτροκλώσης ως ικρίωμα ηλεκτροκλώσης, προκάλεσε την αδρανοποίηση και των δύο τύπων βακτηρίων, τόσο των θετικών κατά Gram (είδος *Enterococcus*) όσο και των αρνητικών κατά Gram (*Pseudomonas aeruginosa*), μειώνοντας τις αποικίες (σχήμα 7).^[28]



Εικόνα 7: Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα της διαδικασίας ηλεκτροσυγκόλλησης που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ικριωμάτων CAGE για την επούλωση πληγών.^[28]

1.10.5 Το CAGE στα συστήματα χορήγησης φαρμάκων

Τα ιοντικά υγρά και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες έχουν πρόσφατα προταθεί ως βιοσυμβατοί διαλύτες για την εύκολη χορήγηση φαρμάκων και το CAGE είναι ένας από αυτούς. Έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα αποτελεσματικό μοντέλο χορήγησης φαρμάκων για διαδερμική και υποδόρια χορήγηση δύσκολων φαρμάκων, με τη μικρότερη τοξικότητα και αποτελεσματική διείσδυση στο δέρμα, λιγότερο ερεθισμό και την ικανότητα επίτευξης θεραπευτικών στόχων με ελάχιστες παρενέργειες. Στο σχήμα 8 παρουσιάζονται ορισμένα από τα φάρμακα που αναφέρθηκε ότι παραδίδονται με επιτυχία μέσω του CAGE.^{[28][34]}



Εικόνα 8: Φάρμακα που έχουν μεταφερθεί με επιτυχία μέσω του CAGE.^[28]

1.10.6 Διαδερμική χορήγηση

Η οδός διαδερμικής διείσδυσης έλαβε αυξημένη προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω των πολυάριθμων πλεονεκτημάτων της έναντι της από του στόματος και της ενέσιμης οδού χορήγησης φαρμάκων. Ως εκ τούτου, η διαδερμική διαπερατότητα έγινε μια ελκυστική οδός για τη χορήγηση βιοδραστικών μακρομορίων. Τα κύρια πλεονεκτήματα της διαδερμικής οδού περιλάμβαναν τα εξής: τη δυνατότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης με την πάροδο του χρόνου, την εξάλειψη της αποικοδόμησης του φαρμάκου στο γαστρεντερικό (GIT) με ενίσχυση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας και εντυπωσιακά ανώδυνη χορήγηση.^[30]

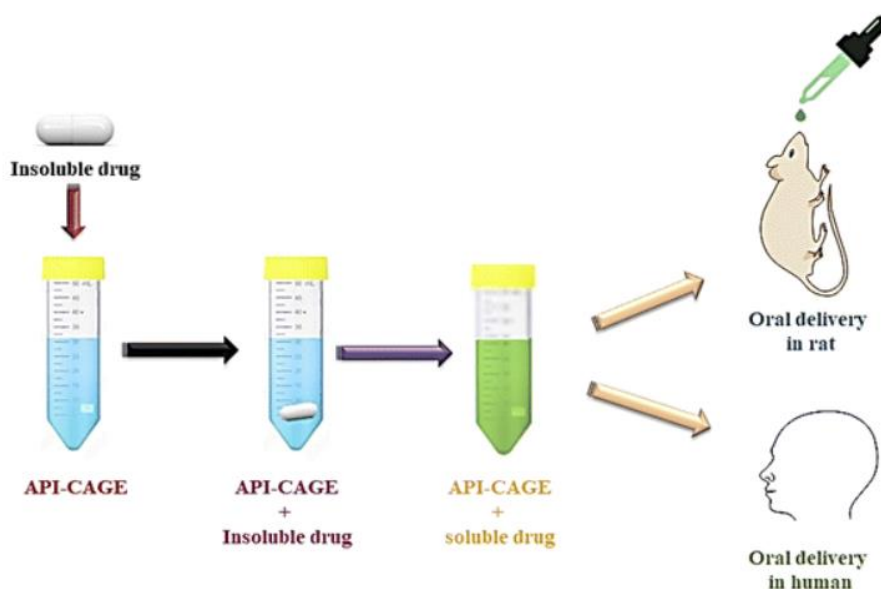
Τα ιοντικά υγρά και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες είναι σε θέση να διαλύουν αμφίφιλα μόρια και, επομένως, είναι ιδανικοί διαλύτες για τη διαδερμική χορήγηση μακρομορίων. Τα μόρια αυτών των εξαιρετικά ιξωδών ρευστών υποτίθεται ότι γλιστρούν γύρω και μέσα από τις λιπαρές ενώσεις των κυττάρων του δέρματος, δημιουργώντας μικρά παροδικά ανοίγματα μέσω των οποίων βιοδραστικά μόρια μπορούν να διαπεράσουν. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, καμία οριστική απόδειξη αυτού του υποτιθέμενου μηχανισμού δεν έχει διατυπωθεί. Η διαπερατότητα του ανθρώπινου δέρματος έχει αναφερθεί ότι ποικίλλει και, ως εκ τούτου, το δέρμα χοίρου χρησιμοποιείται συνήθως ως εναλλακτικό μοντέλο του ανθρώπινου δέρματος σε μελέτες διαδερμικής απορρόφησης με στόχο την ανάπτυξη διαδερμικών συσκευασιών.^[30]

Οι παραδοσιακές μέθοδοι για τη διαδερμική χορήγηση βιολογικών μακρομορίων, όπως πεπτίδια και άλλα υδρόφιλα και υδρόφοβα μόρια, αντιμετωπίζουν σοβαρούς περιορισμούς επειδή η διαπερατότητα του δέρματος είναι χαμηλή. Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες όπως το CAGE (κυρίως το CAGE 1:2) βελτιώνουν την παράδοση πρωτεϊνών όπως η ινσουλίνη (INS), η ωοαλβουμίνη (OVA) και η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA). Το CAGE τείνει να ενισχύει τη διαπερατότητα αυτών των πρωτεϊνών στο δέρμα χοίρων

ex vivo, επιταχύνοντας τη διείσδυσή τους στο χόριο και την επιδερμίδα. Περαιτέρω μελέτες καταδεικνύουν ότι η επικαλυμμένη με τιτάνιο BSA και η ινσουλίνη επικαλυμμένη με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη έχουν βελτιώσει την παροχή των πρωτεϊνών, παρουσιάζοντας έναν χρονοεξαρτώμενο τρόπο διείσδυσης. Το φάσμα IR μετασχηματισμού Fourier του δέρματος χοίρου δείχνει την εξαγωγή λιπιδίων από την κεράτινη στιβάδα (SC) του χοίρου. Επιπλέον, ο κυκλικός διχρωσμός τονίζει ότι το CAGE δεν έχει καμία επίδραση στη δευτερογενή διαμόρφωση της ινσουλίνης.^[28]

1.10.7 Το CAGE στα συστήματα χορήγησης από το στόμα

Η χορήγηση φαρμάκων μέσω της στοματικής οδού (στόμα) διευκολύνεται λόγω της αφθονίας των αιμοφόρων αγγείων και της απουσίας στενών συνδέσμων στο στοματικό επιθήλιο. Παράλληλα με τη δραματική ενίσχυση των ανθεκτικών υδρόφιλων θεραπευτικών ουσιών, το CAGE τροποποιεί επίσης την ικανότητα απορρόφησης φαρμάκων. Μπορεί να βελτιώσει τον χρόνο ημιζωής του φαρμάκου και τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Επιπλέον, αλλάζει τη βιοκατανομή του φαρμάκου βελτιώνοντας την ικανότητά του να στοχεύει τα όργανα. Το CAGE είναι ένα αποτελεσματικό μοντέλο χορήγησης φαρμάκων για την ενίσχυση της από του στόματος απορρόφησης υδρόφοβων φαρμάκων με διαφορετική βιοκατανομή για την επίτευξη του θεραπευτικού στόχου και την ελαχιστοποίηση των παρενεργειών (Εικόνα 9). Έχει διερευνηθεί για την από του στόματος χορήγηση ινσουλίνης καθώς και ορισμένων άλλων υδατοδιαλυτών φαρμάκων.^[28]



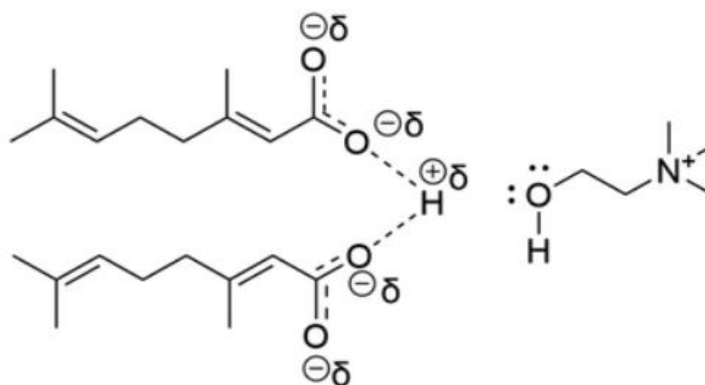
Εικόνα 9: Το σχήμα μελέτης για την από του στόματος χορήγηση φαρμάκων σε αρουραίους και ανθρώπους με τη βοήθεια του CAGE.^[28]

1.10.8 Υποδόρια χορήγηση φαρμάκων μέσω CAGE

Οι υποδόριες ενέσεις χρησιμοποιούνται για χαμηλή και συνεχή χορήγηση ορμονών, αντισωμάτων, πεπτιδίων και μικρών μορίων. Η προτίμηση για την ένεση εξαρτάται από συνδυασμούς αρχών όπως η αποτελεσματικότητα, η ασφάλεια, η επιλογή του ασθενούς και η φαρμακοοικονομία. Αντί της ενδοφλέβιας ένεσης, η υποδόρια μέθοδος είναι εύκολη και οικονομικά αποδοτική και προσφέρει σχετική βιοδιαθεσιμότητα για ορισμένα φάρμακα. Εκτός από τη χρήση του CAGE ως DES/IL στη διαδερμική χορήγηση και την από του στόματος χορήγηση, ένα από τα χαρακτηριστικά του είναι η υποδόρια χορήγηση. Για να δοκιμαστεί η αποτελεσματικότητά του, χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό πεπτίδιο-1 που μοιάζει με τη γλυκαγόνη (GLP-1) για υποδόρια χορήγηση. Γενικά, αποικοδομείται παρουσία του ενζύμου "διπεπτιδυλική πεπτιδάση-4 (DPP-4)" και απομακρύνεται ταχέως από το κυκλοφορικό σύστημα. Όταν όμως η χορήγηση πραγματοποιήθηκε μέσω καθαρού ή αραιωμένου CAGE, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου στο κυκλοφορικό σύστημα. Περαιτέρω μηχανιστικές μελέτες καταδεικνύουν ότι το CAGE παρεμποδίζει την ενζυμική αποικοδόμηση λόγω της αυτοσυγκρότησής του και βοηθά στον εγκλωβισμό και την εύκολη απελευθέρωση του GLP-1.^{[28][33]}

1.10.9 Αλληλεπίδραση του CAGE με σωματικά υγρά

Η εφαρμογή του CAGE για τη χορήγηση φαρμάκων απαιτεί την κατανόηση της μικροσκοπικής δομής του παρουσία νερού, το οποίο αποτελεί το μέσο για όλες τις αντιδράσεις που συμβαίνουν στο σώμα (Σχήμα 10). Στα φυσιολογικά υγρά, το νερό και το CAGE εμφανίζονται μαζί για βιοϊατρικές εφαρμογές και το νερό είναι ζωτικής σημασίας για τις φυσικοχημικές ιδιότητες του CAGE. Η αλληλεπίδραση του CAGE (χολίνη: γερανικό οξύ, 1:1) με το νερό μελετήθηκε μέσω πειραματικών και υπολογιστικών μελετών με έμφαση σε διάφορες παραμέτρους όπως η αγωγιμότητα, το ιξώδες και ο συντελεστής αυτοδιάχυσης. Αναφέρθηκε ότι σε συνθήκες αποθήκευσης, το καθαρό CAGE περιλαμβάνει 0,2 μοριακό κλάσμα νερού και οι ιδιότητες του CAGE παραμένουν σταθερές με ενδο-ιοντική αλληλεπίδραση, εφόσον το νερό δεν υπερβαίνει το 0,65 μοριακό κλάσμα. Τα γερανικά ιόντα προτείνεται να υφίστανται αναδιάταξη για την ελαχιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της υδρόφοβης ουράς και των μορίων του νερού, όπως αποδεικνύεται από τις αυξημένες αλληλεπιδράσεις των ιόντων στις ουρές και το πλατώ στο ιξώδες. Έτσι, η προ-ξήρανση του CAGE για διάφορες εφαρμογές δεν είναι υποχρεωτική, αλλά μπορεί να αραιωθεί για την αναδιοργάνωση των ανιόντων.^{[28][31][32]}



Εικόνα 10: Η αλληλεπίδραση των συστατικών CAGE 1:2.^[28]

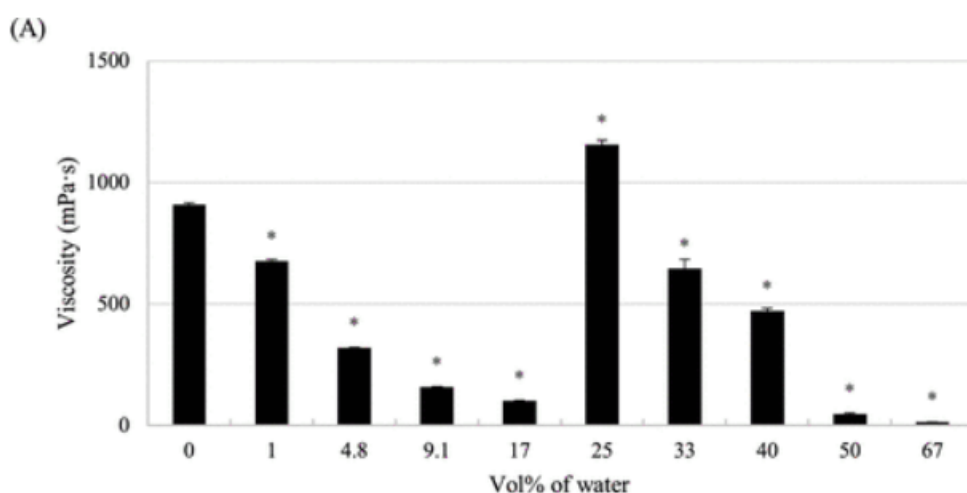
1.10.10 Κλινικές δοκιμές με CAGE

Το πεδίο εφαρμογής των ακαδημαϊκών ανακαλύψεων στα κλινικά στάδια καθυστερεί συχνά λόγω της διαφοράς μεταξύ της πρακτικής και της θεμελιώδους εργαστηριακής έρευνας. Συνήθως, οι ακαδημαϊκές καινοτομίες δεν είναι συμβατές με τις κλινικές λόγω των θεμάτων της κλιμάκωσης, της σταθερότητας και της ανθρώπινης ασφάλειας. Ως εκ τούτου, οι ακαδημαϊκές και οι κλινικές ανακαλύψεις δεν βρίσκονται σε συμφωνία μεταξύ τους. Αντιθέτως, το CAGE παρουσίασε αξιοσημείωτες δυνατότητες χρήσης. Έχει διερευνηθεί για δερματολογικές εφαρμογές στο εργαστήριο, καθώς και σε κλινικές δοκιμές, για τη ροδόχρου ακμή, η οποία είναι μια φλεγμονώδης ετερογενής δερματική νόσος που επηρεάζει εκατομμύρια ανθρώπους, ιδίως Καυκάσιους ενήλικες. Έχει ποικίλα συμπτώματα και εκδηλώσεις που καθιστούν τη διάγνωσή της δύσκολη. Η γέλη CAGE εφαρμόστηκε στη ροδόχρου ακμή του προσώπου σε 26 ασθενείς για μια ανοικτή φάση 12 εβδομάδων και παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της φλεγμονής. Η χρήση του CAGE για τη θεραπεία έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί σημαντική μείωση του αριθμού των φλεγμονωδών βλαβών, κλινικά.^{[28][35]}

1.10.11 Ιξώδες του CAGE με διαφορετική αναλογία νερού-CAGE

Προηγουμένως, έχει αναφερθεί ότι το ιξώδες άλλων IIs μειώνεται με την αύξηση της ποσότητας του νερού. Στο Γράφημα 1 παρουσιάζεται το ιξώδες των παρασκευασμένων δειγμάτων όταν διαφορετικές ποσότητες νερού αναμίχθηκαν με CAGE. Το ιξώδες του CAGE χωρίς καθόλου νερό (0 vol % νερό) ήταν υψηλό (908 mPa s) και μειώθηκε σταδιακά σε 102 mPa s όταν προστέθηκε 17 vol % νερό. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον ότι παρατηρήθηκε και πάλι υψηλό ιξώδες στο CAGE με 25 vol % νερό και στη συνέχεια μειώθηκε σχετικά αργά με 33-40 vol % νερό (δηλαδή 1155 mPa s για 25 vol % νερό, 645 mPa s για 33 vol % νερό και 471 mPa s για 40 vol % νερό). Τέλος, το ιξώδες του CAGE με περισσότερο από 50 vol % νερό μειώθηκε

εντελώς. Η εμφάνιση των παρασκευασμένων δειγμάτων ήταν επίσης διαφορετική. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το CAGE με 0 vol % νερό είχε ουσιαστικά σταθερό ιξώδες ανεξάρτητα από τον ρυθμό διάτμησης, όπως ένα Νευτώνειο ρευστό, ενώ το CAGE με 33 vol % νερό είχε τα χαρακτηριστικά ενός μη Νευτώνιου ρευστού με το ιξώδες του να μειώνεται ανάλογα με τον ρυθμό διάτμησης. Στην πραγματικότητα, το ιξώδες του νερού 25-40 vol % με χαμηλό ρυθμό διάτμησης ήταν μεγαλύτερο από 8000 mPa s (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).^[36]



Γράφημα 1: Ιξώδες μιγμάτων CAGE-νερού για διάφορες περιεκτικότητες σε νερό.^[36]

1.10.12 Αντιοξειδωτική δράση CAGE

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που μετριάζουν ή εξουδετερώνουν την επιβλαβή επίδραση των ελεύθερων ριζών. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι πολλά μονοκατιονικά ILs παρουσιάζουν δράση σάρωσης ριζών (RSA). Σε αρκετά πρόσφατη μελέτη συντέθηκαν ILs με βάση τη χολίνη (ανάμεσά τους και το CAGE), που περιέχουν ποικίλες αλκυλικές αλυσίδες και ελέγχθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση με τη χρήση της δοκιμασίας αναγωγής ριζών DPPH.

Η RSA των ILs υπολογίστηκε από τη μείωση της απορρόφησης. Στη συγκέντρωση των ILs (κάτω από 1 mM), δεν υπάρχει καμία ή αμελητέα επίδραση στην απορρόφηση DPPH στα 517 nm, επιβεβαιώνοντας ότι δεν υπάρχει RSA. Όλα τα ILs, σε συγκέντρωση 1 mM και άνω, αρχίζουν να εμφανίζουν RSA. Περαιτέρω, τα ILs με μικρό μήκος αλκυλικής αλυσίδας παρουσίασαν υψηλότερη δραστηριότητα σε σύγκριση με τα ILs με μεγαλύτερη αλυσίδα. Αυτό υποδηλώνει ότι η RSA αυξάνεται με τη μείωση του αριθμού των ανθράκων στον αλκυλικό υποκαταστάτη/αλυσίδα. Η RSA των ILs (5,6 mM) βρέθηκε να μειώνεται σχεδόν γραμμικά σε συνάρτηση με την αύξηση του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας. Η μείωση της RSA των ILs με μεγαλύτερες αλκυλοαλυσίδες μπορεί να οφείλεται στις ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και τη συσσωμάτωση αυτών των ILs, η οποία δεν παρατηρείται σε ILs με μικρές αλυσίδες. Παρόμοια αποτελέσματα για τα εξαρτώμενα από το μήκος της αλκυλικής

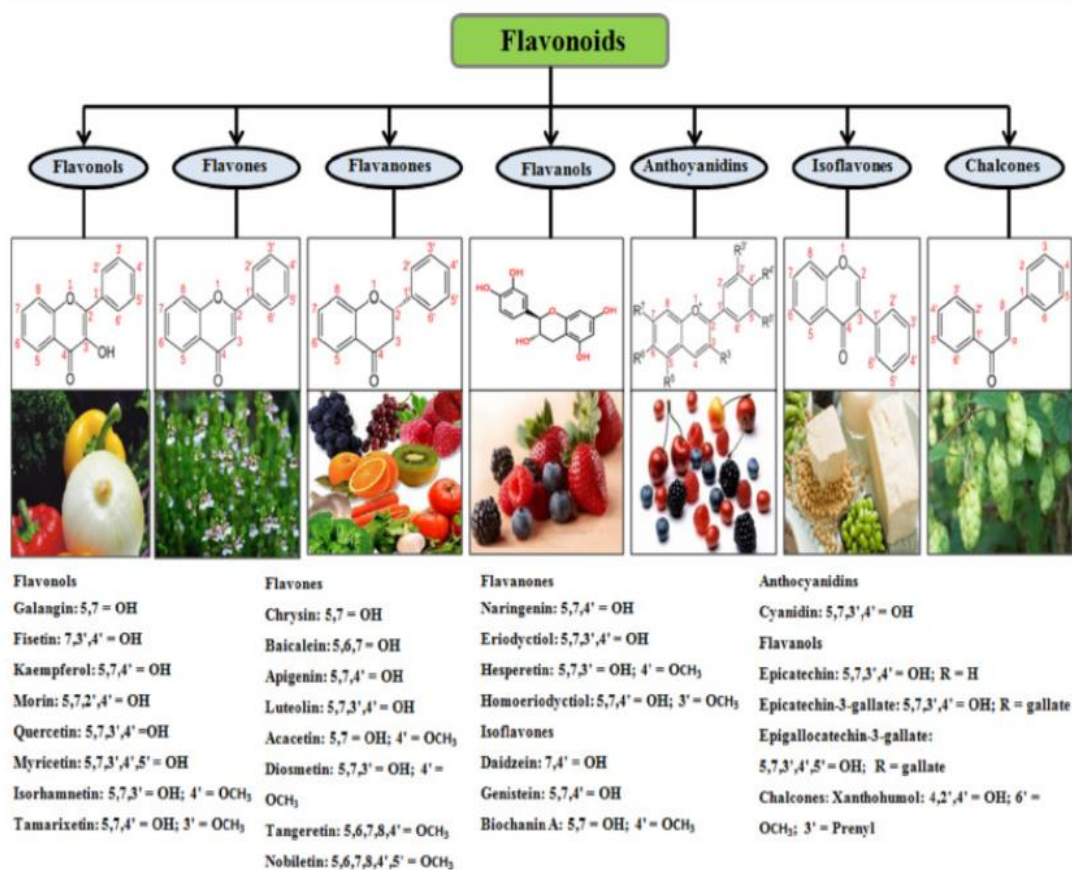
αλυσίδας IIs έχουν αναφερθεί για βιολογικές δραστηριότητες (αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές). Οι Ahmad et al. συνέθεσαν μια κατηγορία πρωτικών IIs με υψηλότερη αντιοξειδωτική συμπεριφορά από τα μητρικά τους οξέα. Σύμφωνα με την πρόβλεψή τους, τα συντιθέμενα Cho-IIs (με βάση τη χολίνη) μπορούν να δράσουν ως ενισχυτές αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων.

Συμπερασματικά, όλα τα συντιθέμενα IIs παρουσίασαν αντιοξειδωτική συμπεριφορά, αν και τα IIs με βραχεία αλυσίδα έδειξαν πιο αποτελεσματική αντιοξειδωτική δράση από τα IIs με μακρά αλυσίδα, γεγονός που τα καθιστά πολλά υποσχόμενα ως αντιοξειδωτικά ενισχυτικά.^[47]

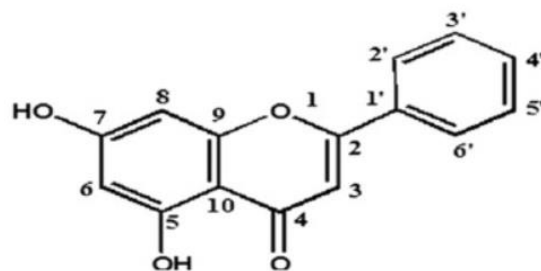
1.11 Χρυσίνη

Τα φλαβονοειδή είναι πανταχού παρόντες εξειδικευμένοι μεταβολίτες των φυτών που περιέχουν μεγάλες ομάδες πολυφαινολικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες παρουσιάζουν οφέλη για την ανθρώπινη υγεία λόγω των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περίπου 5000 διαφορετικά είδη φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή είναι φυσικές πολυφαινόλες με μοτίβα υδροξυλίωσης και υποκαταστάσεων που δίνουν διάφορες υποκατηγορίες, όπως φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες, φλαβονόλες, φλαβόνες, κατεχίνες (ή φλαβανόλες), ισοφλαβόνες, διυδροξυφλαβονόλες και χαλκόνες (Εικόνα 11). Ένα τέτοιο φλαβονοειδές που έχει λάβει σημαντική προσοχή είναι η χρυσίνη. Η χρυσίνη, η οποία έχει την πανταχού παρούσα φλαβονική «ραχοκοκαλιά» με 15 άνθρακες, είναι ένα από τα σημαντικότερα βιοδραστικά συστατικά διαφόρων φρούτων, λαχανικών, ακόμη και μανιταριών.^[15]

Η χρυσίνη έχει κοινή χημική δομή, η οποία αποτελείται από δύο συγχωνευμένους δακτυλίου, A και C, και έναν φαινυλικό δακτύλιο, B, συνδεδεμένο στη δεύτερη θέση του δακτυλίου C. Μοιράζεται την κοινή δομή της φλαβόνης, με μια πρόσθετη ομάδα υδροξυλίου στην 5η και 7η θέση του δακτυλίου A (Σχήμα 12). Η χρυσίνη μετατρέπεται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη.



Εικόνα 11: Κατηγορίες φλαβονοειδών [15]



Εικόνα 12: Δομή μορίου χρυσίνης [15]

Σε σύγκριση με τα άλλα φλαβονοειδή, η χρυσίνη είναι το λιγότερο μελετημένο φλαβονοειδές με φασματοσκοπικές τεχνικές. Η παρουσία των λειτουργικών ομάδων υδροξυλίου και της κετονομάδας μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό ισχυρών υπερμοριακών συνθέσεων, με συνδιαμορφωτές που έχουν συμπληρωματικές λειτουργικές ομάδες, προσφέροντας έτσι μια μεγάλη ευκαιρία για το σχεδιασμό διατροφικών συγκροστών της χρυσίνης.

1.11.1 Πηγές χρυσίνης

Η χρυσίνη είναι ένα διαιτητικό φυτοχημικό που υπάρχει σε αφθονία σε πολλά φυτικά εκχυλίσματα, όπως η πρόπολη, το μπλε λουλούδι του πάθους (*Passiflora caerulea*) και το μέλι, τα οποία έχουν μεγάλη οικονομική αξία και φαρμακευτικό αντίκτυπο.^[15]

1.11.2 Γενικές ιδιότητες флаβονοειδών

Πρόσφατα, διάφορες μελέτες *in vitro* και *in vivo* έχουν δείξει ότι επιλεγμένα флаβονοειδή έχουν πολλαπλές βιολογικές δραστηριότητες, όπως αντικαρκινική δράση, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντιαλλεργική, αντιγηραντική, αντιυπερτασική, αντι-αγγειογενετική, αντι-ικκή, αντι-αθηρογενετική, αντιβακτηριακή, αντιδιαβητική, νευροπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική, νεφροπροστατευτική και θετική επίδραση στο αναπαραγωγικό σύστημα. Επιπλέον, υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι πολλά флаβονοειδή παρουσιάζουν διάφορες βιολογικές επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα.^[16]

1.11.3 Θεραπευτικές ιδιότητες χρυσίνης

Σε αντίθεση με άλλα флаβονοειδή, τα θεραπευτικά οφέλη της χρυσίνης παραμένουν νεοσύστατα στην τρέχουσα βιβλιογραφία λόγω της περιορισμένης βιοδιαθεσιμότητας και απορρόφησής της. Επιπλέον, η χρυσίνη έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι είναι ισχυρός αναστολέας της αρωματάσης και της ενεργοποίησης του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) σε μοντέλα λανθάνουσας λοίμωξης. Υπάρχουν ολοένα και περισσότερες ενδείξεις για τα δυνητικά οφέλη της χρυσίνης ως φαρμακολογικού παράγοντα. Επιπλέον, η χρυσίνη παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση και χημειοπροληπτική δράση κατά του καρκίνου, μέσω της επαγωγής της απόπτωσης σε ποικίλους τύπους κυττάρων ανθρώπου και αρουραίου.^{[16][17]}

Αντικαρκινική δράση της χρυσίνης

Ο καρκίνος, ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας παγκοσμίως, είναι μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη μη φυσιολογικών κυττάρων που εισβάλλουν και κάνουν μεταστάσεις σε άλλα μέρη του σώματος. Στην αρχαιότητα, υπήρξαν αξιοσημείωτες εξελίξεις στην κατανόηση της μοριακής βιολογίας του καρκίνου και στην ανάπτυξη αντικαρκινικών θεραπειών. Αρκετές μελέτες έχουν αποκαλύψει μια συσχέτιση μεταξύ διαιτητικών φυτοχημικών ουσιών και πρόληψης του καρκίνου. Τα συσσωρευμένα ερευνητικά στοιχεία δείχνουν ότι πολλά φυτοχημικά έχουν αντικαρκινική δράση με χαμηλές ανεπιθύμητες ενέργειες και τοξικότητα, γεγονός που τα καθιστά ασφαλή για ανθρώπινη χρήση. Το ενδιαφέρον για τα флаβονοειδή προέρχεται από τα αποτελέσματα

επιδημιολογικών μελετών, οι οποίες δείχνουν ότι η αυξημένη ποσότητα κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών συνδέεται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων τύπων καρκίνου. Η χορήγηση χρυσίνης βελτίωσε την κατάσταση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και των αντιοξειδωτικών, η οποία ρυθμίζει την ομοιόσταση της οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής κατάστασης κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης. Η χρυσίνη αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου μέσω της απόπτωσης που σχετίζεται με την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch1, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ο πρωταρχικός μηχανισμός δράσης της χρυσίνης συνίσταται στη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης και στη μείωση της φλεγμονής. ^{[16][18]}

Κατά τη διάρκεια μιας μελέτης *in vivo*, η θεραπεία με χρυσίνη (50 mg/kg) παρουσίασε δόσοεξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων σε κύτταρα μελανώματος B16F10 σε ποντίκια BALB/c προκαλώντας τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και την απόπτωση. Επιπλέον, ανέστειλε την ανάπτυξη του όγκου του μελανώματος κατά 60% μετά από 14 ημέρες θεραπείας σε σύγκριση με τον έλεγχο που ανέστειλε το 71%. Επιπλέον, η κυτταροτοξική δραστηριότητα των μακροφάγων, των CTL και των NK αυξήθηκε με τη χορήγηση χρυσίνης, σε κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου Caco-2 και SW480, η νανοενθυλάκωση της χρυσίνης βελτίωσε την παροχή αυτών των φυτοχημικών ουσιών που ανέστειλαν σημαντικά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, ενώ μείωσε την έκφραση του γονιδίου hTERT μέσω της αυξημένης διαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας αυτών των θεραπευτικών παραγόντων. ^{18]}

Έχει αναφερθεί ότι η χρυσίνη έχει αντικαρκινική δράση κατά του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) μέσω πολλαπλών μονοπατιών. Κατά τη θεραπεία με χρυσίνη, το VDAC-1 σε συνδυασμό με την εξακινάση-2 (HK-2) στα μιτοχόνδρια μειώθηκε σημαντικά μεταφέροντας το Βαχ στα μιτοχόνδρια από το κυτταρόπλασμα και ενθάρρυνε την απόπτωση των κυττάρων. ^[18]

Ηπατοπροστατευτική δράση

Η χρυσίνη παρουσιάζει υποσχόμενες ηπατοπροστατευτικές και αντιυπερλιπιδαιμικές επιδράσεις, οι οποίες αποδεικνύονται από τα μειωμένα επίπεδα τριγλυκεριδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων, ολικής χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων, λιποπρωτεΐνης-C χαμηλής πυκνότητας και λιποπρωτεΐνης-C πολύ χαμηλής πυκνότητας και τα αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης-C υψηλής πυκνότητας στο πλάσμα και στους ιστούς αρουραίων. Η ηπατοπροστατευτική δράση της χρυσίνης διαμεσολαβείται μέσω του μετατρεπτικού ενζύμου TNF-α, καθώς η χρυσίνη μειώνει την παραγωγή διαλυτού TNF-α αναστέλλοντας τη δραστηριότητά του. ^[19]

Καρδιοπροστατευτική δράση

Προηγούμενες εκθέσεις συνιστούν νέους στόχους για την πρόληψη και τη θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων. Η χρυσίνη βελτίωσε σημαντικά τη βλάβη του μυοκαρδίου και ο ευεργετικός μηχανισμός δράσης της χρυσίνης εξηγήθηκε από την ενεργοποίηση του υποδοχέα-γ (PPAR-γ) που ενεργοποιείται από τον πολλαπλασιαστή-υπεροξισώματος, ο

οποίος κατά συνέπεια μετρίασε το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονώδη και αποπτωτική απόκριση που προκαλούνται από τα προϊόντα τελικής γλυκοποίησης (AGE)/RAGE. Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες παρείχαν τις πρωταρχικές αποδείξεις ότι η χρυσίνη ανακουφίζει αισθητά την αναστολή της δραστηριότητας του PTP που προκαλείται από τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF) και το H₂O₂, και πιθανώς επηρεάζει τη γλουταθειόνη/οξειδοαναγωγική ουσία στο σύστημα επανενεργοποίησης για την επανενεργοποίηση του PTP, οδηγώντας στην αποφωσφορλίωση του ενεργοποιημένου PDGFR και των πρωτεϊνικών ενζύμων του.^[20]

Νεφροπροστατευτική δράση

Η υπερβολική παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) προκαλεί την εξάντληση των κυτταρικών αντιοξειδωτικών δραστηριοτήτων λόγω της βλάβης του DNA που σχετίζεται με τη νεφροτοξικότητα. Η χρυσίνη αποτρέπει αποτελεσματικά τον κατακερματισμό του DNA στη νεφροτοξικότητα. Η μείωση της ενδογενούς βλάβης μπορεί να υποδηλώνει την ενισχυμένη προστασία της χρυσίνης προς το DNA από την επίθεση ROS και/ή τα αυξημένα ποσοστά επιδιόρθωσης προς τη βλάβη του DNA. Αυτό δικαιολογεί την υπόθεση ότι η νεφροτοξικότητα συνδέεται στενά με την αυξημένη παραγωγή ROS, που οδηγεί στη μείωση του αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού. Μια προηγούμενη μελέτη κατέδειξε ότι τα μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνών ορού, ο GFR και η ανάπτυξη πρωτεϊνουρίας σε διαβητικούς αρουραίους υποδεικνύουν σαφώς την ανάπτυξη διαβητικής νεφροπάθειας. Αντίθετα, η χρυσίνη βελτίωσε την ανάπτυξη πρωτεϊνουρίας και ενίσχυσε το επίπεδο κάθαρσης κρεατινίνης, ρυθμίζοντας έτσι το επίπεδο GFR, γεγονός που υποδηλώνει ότι η χρυσίνη έχει αντινεφροπαθητική δράση. Η χρυσίνη αποτρέπει την εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας σε αρουραίους με διαβήτη τύπου 2 που προκλήθηκε από HFD/STZ, μέσω των αντιφλεγμονωδών επιδράσεων της στους νεφρούς, στοχεύοντας ιδιαίτερα στην οδό TNF-α. Η νεφροπροστατευτική δράση της χρυσίνης ενδεχομένως καταστέλλει το μονοπάτι του TNF-α.^{[21][22]}

Αντιδιαβητική δράση

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια ομάδα μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία, η οποία οφείλεται σε ελαττώματα είτε στην έκκριση είτε στη δράση της ινσουλίνης και περιστασιακά και στα δύο. Η χρυσίνη μετρίασε τον ΣΔ σε αρουραίους με υψηλή σε λιπαρά δίαιτα/στρεπτοζοτοκίνη (HFD/STZ) - επαγόμενο διαβήτη τύπου 2, αποκαθιστώντας τη νεφρική λειτουργία και παθολογία. Επιπλέον, η μελέτη αυτή υπέδειξε ότι η νεφροπροστατευτική δράση της χρυσίνης μπορεί να σχετίζεται με την αναστολή της έκφρασης του TNF-α. Ως εκ τούτου, η χρυσίνη μπορεί να είναι χρήσιμη ως ο πιο αποτελεσματικός θεραπευτικός παράγοντας για τη θεραπεία του ΣΔ.^[16]

Ανθρώπινα οφέλη και τοξικότητα

Η χρυσίνη είναι γνωστή ως φυτική ένωση που ενισχύει την τεστοστερόνη. Έχει πολύ καλούς μηχανισμούς δράσης, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι θα μπορούσε να ενισχύσει την τεστοστερόνη. Στους ανθρώπους, 500 mg χρυσίνης δεν σχετίζονται με πολλές

ανεπιθύμητες ενέργειες. Οξείες δόσεις 400 mg χρυσίνης δεν εμφανίζουν παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο. Αν και χαμηλές δόσεις φλαβονοειδών υπάρχουν στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου, η πρόσληψη υψηλότερων δόσεων μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα. Συνιστώνται ημερήσιες δόσεις χρυσίνης 0,5-3 g και μπορούν να αγοραστούν από καταστήματα υγιεινής διατροφής. Ωστόσο, η χρυσίνη προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα του ήπατος της πέστροφας και αναστέλλει την *de novo* σύνθεση του DNA, οδηγώντας σε μειωμένο αριθμό κυττάρων. Η κυτταροτοξικότητα λόγω της χρυσίνης έχει αποδοθεί στην παρουσία δραστηριότητας που μοιάζει με εκείνη της υπεροξειδάσης στα ηπατοκύτταρα, η οποία οδηγεί στην οξείδωση της χρυσίνης, σχηματίζοντας έτσι τοξικά προϊόντα. Η μυελοπεροξειδάση και η τοποϊσομεράση II μπορεί να είναι υπεύθυνες για την τοξικότητα που προκαλείται από τα διαιτητικά φλαβονοειδή.^{[16][23]}

1.11.4 Μεταβολισμός της χρυσίνης

Μια *in vivo* μελέτη σε ανθρώπους μετά την από του στόματος χορήγηση χρυσίνης (400 mg) έδειξε ότι πρόκειται για μια ένωση με χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, η οποία εξαρτάται κυρίως από τον γρήγορο μεταβολισμό στο γαστρεντερικό σύστημα. Για την αναζήτηση των μεταβολικών οδών των φυσικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν μικροβιακοί και ενζυμικοί μετασχηματισμοί. Η παραλαβή φλαβονοειδών παραγώγων φαρμακευτικής σημασίας μέσω βιομετασχηματισμού είναι μια ευρέως γνωστή μέθοδος. Οι τροποποιήσεις του κύριου σκελετού των φλαβονοειδών επηρεάζουν έντονα τη βιολογική τους δραστηριότητα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι βιολογικές μέθοδοι σύνθεσης είναι ο μόνος δυνατός τρόπος για την επίτευξη ενώσεων, οι οποίες είναι πολύ δύσκολο να συντεθούν με χημικές μεθόδους.^[24]

1.11.5 Επίδραση της χρυσίνης στις παρενέργειες που σχετίζονται με τη φαρμακοθεραπεία

Λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης των μεταβολιτών της χρυσίνης (κυρίως της θεικής χρυσίνης-7) με τις λευκωματίνες του ανθρώπινου ορού (HAS), η πρόσληψη χρυσίνης με τα τρόφιμα μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες δέσμευσης των λευκωμάτων ορισμένων φαρμάκων. Με αυτόν τον τρόπο, επηρεάζει τη φαρμακοκινητική, τη βιολογική δραστηριότητα και τον χρόνο ημιζωής ενός φαρμάκου, καθώς η ποσότητα ενός ελεύθερου φαρμάκου στο αίμα (μη συνδεδεμένου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος) είναι αυτή που έχει θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η μιτομυκίνη C, μέσω αλληλεπίδρασης με βιολογικά μόρια, μπορούν να προκαλέσουν γενετική βλάβη σε υγιή κύτταρα, για παράδειγμα στο ήπαρ, τους νεφρούς ή το μυελό των οστών. Επιπλέον, μπορούν να αυξήσουν τη δραστηριότητα των ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών ενζύμων και να αυξήσουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Εν τω μεταξύ, η χορήγηση χρυσίνης σε δόση 40

mg kg⁻¹, 24 ώρες πριν από τη θεραπεία με μιτομυκίνη C, προκάλεσε υποχώρηση της γονοτοξικής επίδρασης, η οποία επίσης προέκυψε εν μέρει από την υψηλή αντιοξειδωτική δράση της χρυσίνης.

Επί του παρόντος, διεξάγονται έρευνες για τη χρήση της χρυσίνης σε συνδυασμένη θεραπεία, ώστε να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα χημειοθεραπευτικών όπως η δοσεταξέλη, η σισπλατίνη και η καμπτοθεκίνη. Επιπλέον, η χρυσίνη ρυθμίζει τις μη φυσιολογικές μεταβολές στις ενζυμικές δραστηριότητες που προκαλούνται από ευρέως χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η κυκλοφωσφαμίδη. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της μελέτης σχετικά με την επίδραση της χρυσίνης στη ρύθμιση των ενζύμων του μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης (που παίζει καθοριστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων) και των ενζύμων του συστήματος της ανηγμένης γλουταθειόνης και της θειοροδεξίνης, τα οποία συμμετέχουν στην ενδομοριακή απομάκρυνση των ROS.^[24]

1.11.6 Καινοτόμοι τρόποι χορήγησης της χρυσίνης

Επειδή η χρυσίνη με τη μορφή αγκυκόνης είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό, έχουν διεξαχθεί μελέτες *in vivo* για τη βελτίωση της απορρόφησής της με τη χρήση διαφόρων φορέων. Επιβεβαιώθηκε ότι τα σύμπλοκα της χρυσίνης με μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη, τα οποία ελήφθησαν με λυοφιλοποίηση, ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικά για την ενίσχυση της διαπερατότητας της χρυσίνης μέσω των μονοστρωμάτων Caco₂ και δεν ήταν κυτταροτοξικά για τα καρκινικά κύτταρα. Επίσης, τα σύμπλοκα κυκλοδεξτρίνης της χρυσίνης που περιείχαν β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD), υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HPBCD) και σουλφοβουτυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (SBECD) μετά από 30 λεπτά επώασης δεν ήταν τοξικά για τα κύτταρα Caco₂ σε συγκέντρωση έως 100 μM, ενώ στη συγκέντρωση των 200 μM η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε κάτω από 80%. Υπάρχουν επίσης προσπάθειες σύνθεσης μικροσωματιδίων χρυσίνης-πολυβινυλοπυρρολιδόνης με ενθυλάκωση με τη χρήση της διαδικασίας υπερκρίσιμου αντιδιαλύτη (SAS), προκειμένου να αυξηθεί η θεραπευτική αποτελεσματικότητα στη θεραπεία του καρκίνου. Οι πιο πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι τα συστήματα αυτά έχουν υψηλότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι της κυτταρικής σειράς καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 σε σύγκριση με τη χρυσίνη, γεγονός που αποδίδεται στην καλύτερη διαλυτότητά τους υπό φυσιολογικές συνθήκες. Οι νανοκάψουλες χρυσίνης με βάση το πολυγαλακτικό-γλυκολικό οξύ (PLGA) μπορούν να βρουν εφαρμογή και ως αποτελεσματικοί αντιγλυκαιμικοί και αντιυπερλιπιδαιμικοί παράγοντες.^[24]

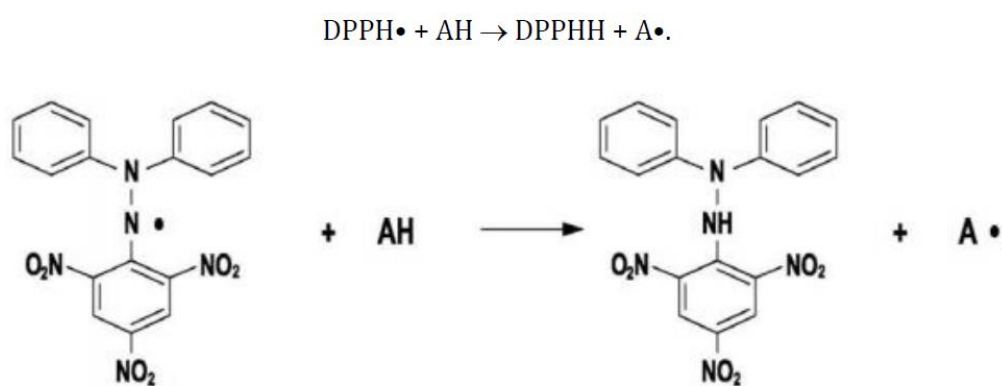
1.11.7 Αντιοξειδωτική δράση χρυσίνης

Έχει αποκαλυφθεί ότι η χρυσίνη έχει πολλές φαρμακολογικές δράσεις όπως αντιοξειδωτική και αντικαρκινική. Έχει μια προληπτική επίδραση στον καρκίνο που προκαλείται χημικά, καθώς και σε μοντέλα όγκων ξеноμοσχεύματος, προκαλώντας τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών και αποτοξινωτικών ενζύμων.

Η χρυσίνη έχει αναφερθεί ότι εκτελεί ισχυρές συμπλοκοποιητικές δραστηριότητες λόγω της παρουσίας της ομάδας -OH στον άνθρακα 5. Αναφορές σχετικά με την αντιοξειδωτική ισχύ διαφόρων φλαβονοειδών έχουν καταδείξει τη σημασία της κατανομής και της ποσότητας των ομάδων -OH. Γενικά, οι αντιοξειδωτικές δραστηριότητες των πολυφαινόλων εξαρτώνται από την υδροξυλίωση του δακτυλίου Β. Ωστόσο, οι ομάδες μετα-OH του δακτυλίου Α στις θέσεις 5 και 7 συμμετέχουν με δευτερεύοντα ρόλο στην αντιοξειδωτική ισχύ της χρυσίνης.^[46]

1.12 Δοκιμή DPPH

Η δοκιμή DPPH είναι μια συνηθισμένη τεχνική και αποτελεί την πρότυπη χρωματομετρική μέθοδο που εφαρμόζεται σε εργαστήρια για τον προσδιορισμό της δυνατότητας σάρωσης ελευθέρων ριζών, τόσο καθαρών φαινολικών ενώσεων όσο και φυτικών εκχυλισμάτων και άλλων συστημάτων, γιατί είναι γρήγορη, εύκολη και οικονομική. Μετρά την ικανότητα μιας ένωσης να δράσει ως σαρωτής ελευθέρων ριζών ή δότης υδρογόνου (Σχήμα 13). Τα αποτελέσματα συνήθως συγκρίνονται με την ικανότητα σάρωσης ενός γνωστού αντιοξειδωτικού.



Εικόνα 13: Αντίδραση αναγωγής ρίζας DPPH από αντιοξειδωτική ουσία.^[38]

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του χρώματος αλκοολικού διαλύματος DPPH, από βαθύ ιώδες σε ανοιχτό κίτρινο. Η δοκιμή DPPH είναι φασματοφωτομετρική και συνήθως πραγματοποιείται σε micro-plate 96 κυψελίδων, εντός των οποίων διαλύματα αντιοξειδωτικού διαφόρων συγκεντρώσεων προστίθενται σε αλκοολικό διάλυμα DPPH

καθορισμένης συγκέντρωσης. Τα συστήματα αφήνονται προς επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα μετράται η απορρόφηση του DPPH στα 515nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η DPPH Radical Scavenging Activity (RSA) (%) υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{DPPH RSA\%} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} * 100 \quad (1)$$

όπου A_c η απορρόφηση του διαλύματος control (50% DPPH, 50% διαλύτης, απουσία αντιοξειδωτικού) και A_s η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος (DPPH και αντιοξειδωτικό π.χ. εγκλεισμός ή καθαρή ουσία).

Η ικανότητα σάρωσης ριζών εκφράζεται μέσω του δείκτη IC_{50} (50% inhibitory concentration), που ορίζεται ως η δόση αντιοξειδωτικού που απαιτείται για την ελάττωση κατά 50% της απορρόφησης του DPPH. Υψηλότερη τιμή IC_{50} αντιστοιχεί σε χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Η κινητική συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών ενώσεων μπορεί να εκτιμηθεί με βάση το χρόνο κατανάλωσης του 50% της ρίζας του DPPH. Όταν αυτός είναι μικρότερος από 5min, η κινητική θεωρείται γρήγορη, όταν κυμαίνεται στο εύρος 5-30min η κινητική έχει μέτρια ταχύτητα, και είναι αργή όταν ο χρόνος αυτός είναι μεγαλύτερος από 30min.^{[38][39][40]}

1.13 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια συνήθως χαρακτηρίζονται στη βιβλιογραφία με βάση την κατανομή μεγέθους, τη μορφολογία, τις επιφανειακές ιδιότητες, τη σταθερότητα και το φάρμακο-πολυμερές. Οι διάφορες τεχνικές που εμπλέκονται στο φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων συνοψίζονται στον πίνακα 1.^[52]

Πίνακας 1 :Τεχνικές χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων^[52]

Τεχνικές	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που αναλύονται
Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM)	Μέγεθος και κατανομή μεγέθους Σχήμα Δομή Συσώρευση Επιφανειακές ιδιότητες (τροποποιημένο AFM)
Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC)	Φυσικοχημική κατάσταση και πιθανή αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου και του πολυμερούς
Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) Φασματοσκοπία φθορισμού	Υδροδυναμική κατανομή μεγέθους Κρίσιμη συγκέντρωση σύνδεσης (CAC) Περιεκτικότητα σε φάρμακο Απελευθέρωση φαρμάκου in vitro Υγρό υψηλής απόδοσης

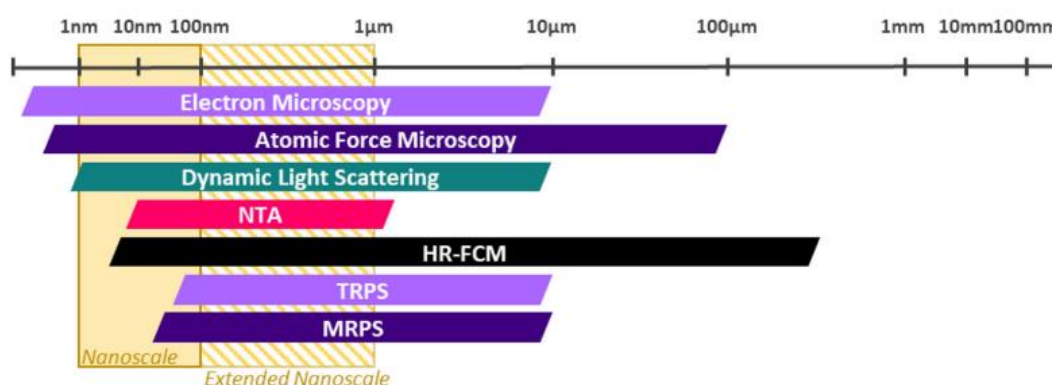
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	Περιεκτικότητα σε φάρμακα Αποδέσμευση φαρμάκου in vitro
Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	Δομή και διαμόρφωση των βιοσυζευγμάτων Ανάλυση λειτουργικών ομάδων
Φασματομετρία μάζας (MS)	Μοριακό βάρος Σύνθεση Δομή Επιφανειακές ιδιότητες (MS δευτερογενών ιόντων)
Οπτική σάρωση εγγύς πεδίου μικροσκοπίας (NSOM)	Μέγεθος και σχήμα των νανοϋλικών
Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR)	Δομή Σύνθεση Καθαρότητα Μεταβολή διαμόρφωσης
Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)	Μέγεθος και κατανομή μεγέθους Σχήμα Συσώρευση
Μικροσκοπία σάρωσης σήραγγας (STM)	Μέγεθος και κατανομή μεγέθους Σχήμα Συσώρευση
Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM)	Μέγεθος και κατανομή μεγέθους Ετερογένεια σχήματος Συσώρευση
Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ (XPS) Ανάλυση Νανοδομημάτων NTA	Στοιχειακή και χημική σύνθεση σε στην επιφάνεια Μέγεθος Συγκέντρωση Υδροδυναμική διάμετρος
Δυναμικό ζήτα	Σταθερότητα σε σχέση με το επιφανειακό φορτίο

Όλες οι παραπάνω τεχνικές εμφανίζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των βασικότερων και πιο διαδεδομένων τεχνικών.

Πίνακας 2 :Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τεχνικών για χαρακτηρισμό νανοσωματιδίων

Τεχνική	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
AFM Ατομική ανάλυση	Μορφολογία/ επιφάνεια τραχύτητα Προετοιμασία δείγματος	Ακριβής εξοπλισμός Ειδική κατάρτιση και εμπειρογνωμοσύνη Ιδιαίτερα χρονοβόρα
DLS	Γρήγορη Εύκολη χρήση Σχετικά οικονομική Υψηλή απόδοση	Χαμηλή ανάλυση σε πολυδιάσπαρτα δείγματα Τάση υπερδιαστασιολόγησης των σωματιδίων λόγω της προσέγγισης του Rayleigh του σκεδαζόμενου φωτός
NTA	Εύκολη χρήση Υψηλή απόδοση	Μεροληψία δεδομένων ανάλογα με τις ρυθμίσεις του χρήστη Εξαρτάται από τον δείκτη διάθλασης Χαμηλή ανάλυση σε υψηλά συμπυκνωμένα Πολυδιάσπαρτα δείγματα λόγω του φαινομένου του Rayleigh

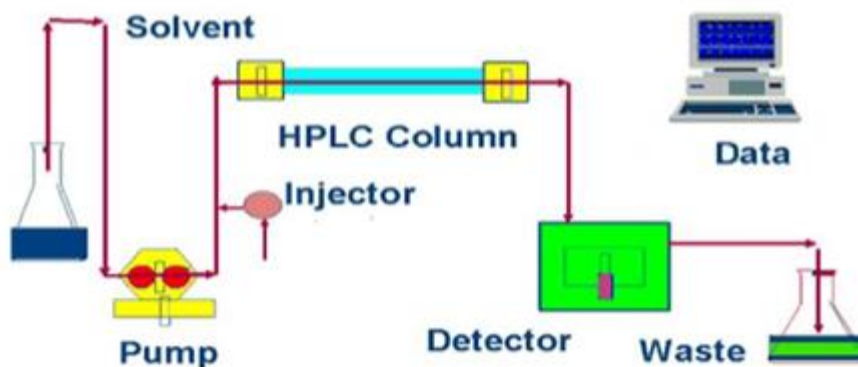
Το μέγεθος των νανοσωματιδίων για κάθε τεχνική χαρακτηρισμού παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 14 :Περιοχές μεγέθους για την ανάλυση σωματιδίων των συζητούμενων τεχνικών^[52]

1.13.1 Υγρή χρωματογραφία (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) προήλθε από την κλασική χρωματογραφία στήλης και αποτελεί σήμερα ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της αναλυτικής χημείας. Στη σύγχρονη φαρμακευτική και όχι μόνο βιομηχανία, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι το σημαντικότερο και αναπόσπαστο αναλυτικό εργαλείο που εφαρμόζεται σε όλα τα στάδια της ανακάλυψης, ανάπτυξης και παραγωγής φαρμάκων, υλικών κλπ. Η HPLC είναι η μέθοδος που επιλέγεται για τον έλεγχο της καθαρότητας νέων χημικών οντοτήτων, την παρακολούθηση των μεταβολών των αντιδράσεων στις συνθετικές διαδικασίες ή την αναβάθμιση της κλίμακας, την αξιολόγηση νέων σκευασμάτων και τον έλεγχο/διασφάλιση της ποιότητας των τελικών προϊόντων. Ο στόχος της μεθόδου HPLC είναι να προσπαθήσει να διαχωρίσει και να ποσοτικοποιήσει το κύριο φάρμακο ή υλικό, τυχόν προσμίξεις της αντίδρασης, όλα τα διαθέσιμα συνθετικά ενδιάμεσα προϊόντα και τυχόν αποικοδομητές. Η HPLC είναι η πιο ακριβής αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του φαρμακευτικού προϊόντος και για τον προσδιορισμό της σταθερότητας του προϊόντος. Η αρχή της HPLC είναι ότι το διάλυμα του δείγματος εγχέεται σε μια στήλη πορώδους υλικού (στατική φάση) και η υγρή φάση (κινητή φάση) αντλείται σε υψηλότερη πίεση μέσω της στήλης. Η αρχή του διαχωρισμού που ακολουθείται είναι η προσρόφηση της διαλυμένης ουσίας στη σταθερή φάση με βάση τη συγγενείά της προς τη σταθερή φάση. (Σχήμα 15).^[48]



Εικόνα 15 : Διάγραμμα ροής HPLC ^[48]

1.13.1.1 Σημαντικά στάδια για την τεχνική αυτή

Η επιλογή χρωματογραφικής στήλης

Η στήλη είναι φυσικά το αρχικό και κεντρικό κομμάτι ενός χρωματογράφου. Μια κατάλληλα επιλεγμένη στήλη μπορεί να παράγει έναν καλό χρωματογραφικό διαχωρισμό που παρέχει ακριβή και αξιόπιστη ανάλυση. Μια ακατάλληλα χρησιμοποιούμενη στήλη μπορεί συχνά να

δημιουργήσει σύγχυση, ανεπαρκή και φτωχό διαχωρισμό που μπορεί να οδηγήσει σε αποτελέσματα που είναι άκυρα ή πολύπλοκα στην ερμηνεία.

Η επιλογή χρωματογραφικής λειτουργίας

Οι χρωματογραφικές λειτουργίες ορίζονται με βάση το μοριακό βάρος και την πολικότητα του αναλύτη. Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RPC) αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τρόπο για μικρά οργανικά μόρια. Οι ιοντιζόμενες ενώσεις (οξέα και βάσεις) διαχωρίζονται συχνά με RPC με ρυθμιστικές κινητές φάσεις (για να διατηρούνται οι αναλυτές σε μη ιονισμένη κατάσταση) ή με αντιδραστήρια αντιστοίχισης ιόντων.

Επιλογή ανιχνευτή και μήκους κύματος

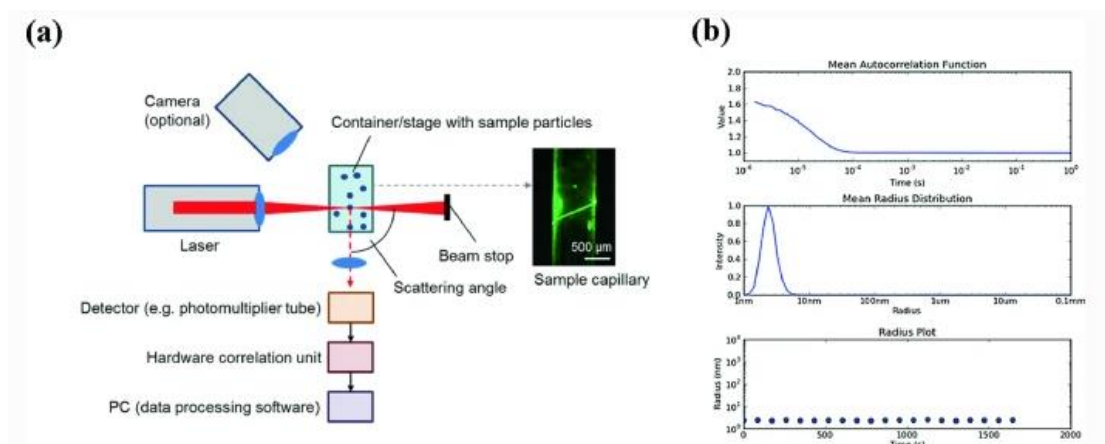
Μετά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, ο αναλύτης ενδιαφέροντος ανιχνεύεται με τη χρήση κατάλληλων ανιχνευτών. Ορισμένοι εμπορικοί ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην ΑΕ είναι: ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), ανιχνευτές φθορισμού, ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές, ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (RI) και ανιχνευτές φασματομετρίας μάζας (MS). Η επιλογή του ανιχνευτή εξαρτάται από το δείγμα και τον σκοπό της ανάλυσης. Σε περίπτωση ανάλυσης πολλαπλών συστατικών, τα φάσματα απορρόφησης μπορεί να έχουν μετατοπιστεί σε μεγαλύτερα ή μικρότερα μήκη κύματος σε σύγκριση με τη μητρική ένωση. Επομένως, τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας του αναλύτη-στόχου και των προσμίξεων πρέπει να λαμβάνονται και να επικαλύπτονται μεταξύ τους και τα φάσματα πρέπει να κανονικοποιούνται λόγω των διαφορετικών ποσοτήτων που υπάρχουν στο μείγμα. Πρέπει να επιλεγεί ένα μήκος κύματος έτσι ώστε να μπορεί να ληφθεί επαρκής απόκριση για τους περισσότερους αναλυτές.^[48]

Οι εξελίξεις στις αναλυτικές στρατηγικές της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), οι οποίες καθοδηγούνται από διάφορες μεταβλητές, παρέχουν μεγάλο όγκο δεδομένων κατά τη διάρκεια των αναλυτικών μετρήσεων. Αν και η HPLC είναι μια ευέλικτη τεχνική διαχωρισμού με ευρύ φάσμα εφαρμογών, η διαδικασία είναι μερικές φορές κρίσιμη λόγω του μεγάλου αριθμού μεταβλητών της, οι οποίες πρέπει να ρυθμίζονται κατάλληλα πριν από κάθε εκτέλεση. Κατά συνέπεια, προκύπτει η ανάγκη για βαθύτερη κατανόηση αυτών των μεθόδων. Τα χημειομετρικά εργαλεία με την κατάλληλη στατιστική ανάλυση έχουν γίνει δημοφιλή, λαμβάνοντας υπόψη πολλαπλά πλεονεκτήματα, δηλαδή τη μείωση του αριθμού των πειραμάτων και τη χαμηλότερη κατανάλωση αντιδραστηρίων και λιγότερη εργαστηριακή εργασία. Επιπλέον, η βελτιστοποίηση των μεθόδων HPLC περιλαμβάνει πολύπλοκες διαδικασίες, δεδομένου ότι, πολλές μεταβλητές (pH κινητής φάσης, συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, ρυθμός ροής, θερμοκρασία στήλης, μήκος κύματος ανιχνευτή κ.λπ.) πρέπει να ελέγχονται ταυτόχρονα για την επίτευξη των επιθυμητών διαχωρισμών.^[49]

1.13.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Αν εστιάσει ένα λέιζερ στα διαλυμένα σωματίδια και αναλυθεί το σκεδαζόμενο φως θα προσδιοριστεί το μέγεθός τους. Αυτή η καθιερωμένη αρχή χρησιμοποιείται στη Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS), ή αλλιώς φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων, η οποία είναι μια ευρέως διαδεδομένη και εξαιρετικά προσαρμόσιμη αναλυτική μέθοδος που εφαρμόζεται σε διάφορους τομείς των επιστημών της ζωής και των υλικών, καθώς και σε βιομηχανικές διαδικασίες ελέγχου ποιότητας.

Οι διακυμάνσεις της ελαστικής σκέδασης του φωτός με λέιζερ που οφείλονται στην ατομική κίνηση Brown των σωματιδίων σε έναν διαλύτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων σε πραγματικό χρόνο. Η DLS χρησιμοποιεί συνήθως μη επεμβατικό ορατό φως λέιζερ που εστιάζεται σε ένα διάλυμα δείγματος, εναιώρημα, γαλάκτωμα ή αεροζόλ μέσα σε ένα δοχείο δείγματος, συνήθως μια κυψελίδα ή ένα τριχοειδές. Εκτός αυτού, για μια τυπική συσκευή DLS απαιτούνται μερικά γενικότερα εξαρτήματα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 16.



Εικόνα 16 :Διάταξη σκέδασης φωτός. Το φως που σκεδάζεται από τα σωματίδια με την πάροδο του χρόνου σε γωνία σκέδασης θ εστιάζεται σε ανιχνευτή ή σε καλώδιο οπτικών ινών συνδεδεμένο με ανιχνευτή για περαιτέρω επεξεργασία δεδομένων σε μεταγενέστερο στάδιο. [50]

Γενικά, όλα τα είδη σωματιδίων σκεδάζουν τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα προς όλες τις κατευθύνσεις, ανάλογα με το μέγεθός τους ιστροπικά ή ανιστροπικά. Το φως του λέιζερ που σκεδάζεται από τα σωματίδια μέσα σε ένα μικρό εστιακό όγκο ενός δείγματος DLS καταγράφεται συνεχώς και ποσοτικοποιείται από έναν ανιχνευτή καταμέτρησης φωτονίων που είναι τοποθετημένος σε συγκεκριμένη γωνία. Εάν δεν εμποδίζεται από άλλους γεωμετρικούς περιορισμούς, μια γωνία 90° μπορεί να είναι κατάλληλη για την πειραματική διάταξη. Ο αριθμός των φωτονίων που προσπίπτουν στον ανιχνευτή, ο οποίος μπορεί να είναι ένας σωλήνας φωτοπολλαπλασιαστή, αυξομειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτό εξηγείται από την κίνηση κατά Brown των σωματιδίων μέσα και γύρω από τον όγκο του δείγματος που βρίσκεται στην εστίαση του λέιζερ, η οποία έχει ως αποτέλεσμα

χαρακτηριστικά διαστήματα διακύμανσης της συνιστώσας του ηλεκτρικού πεδίου του σκεδαζόμενου φωτός που εξαρτώνται από το μέγεθος.

Το πρότυπο έντασης της σκέδασης συσχετίζεται με τον εαυτό του (αυτοσυσχέτιση) μετά από μικρά χρονικά διαστήματα καθυστέρησης (τ) για να παρακολουθείται η συνεχής μείωση της συσχέτισης. Ανάλογα με το πόσο γρήγορα διαχέονται τα σωματίδια, οι χρονικές σταθερές μείωσης της συσχέτισης, οι οποίες προκύπτουν από την εκθετική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης (ACF), είναι ατομικά διαφορετικές. Οι χρονικές σταθερές των μικρών σωματιδίων είναι μικρότερες, σε συμφωνία με την εξάρτηση της ταχύτητας διάχυσης από τη μάζα των σωματιδίων. Η ACF μπορεί να εκτιμηθεί με τον αλγόριθμο CONTIN, ο οποίος επιτρέπει την προσαρμογή ακόμη και μιας πολύπλοκης μείωσης της συσχέτισης σε πολυδιάσπαρτα διαλύματα για τον υπολογισμό των αντίστοιχων σταθερών διάχυσης (D) και την επεξεργασία των δεδομένων. Δεδομένου ότι για τις περισσότερες μετρήσεις η θερμοκρασία T διατηρείται σταθερή και το ιξώδες η του διαλύματος του δείγματος είναι γνωστό ή μπορεί να προσδιοριστεί σχετικά εύκολα, αυτή η σταθερά διάχυσης D μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής ακτίνας r_h ενός αντίστοιχου σφαιρικού σωματιδίου, σύμφωνα με την εξίσωση Stokes-Einstein.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} \quad (1)$$

Η σχέση Stokes-Einstein μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή των μετρούμενων συντελεστών διάχυσης στην δυναμική ακτίνα r_h που είναι το μέγεθος μιας σφαίρας που έχει την ίδια συμπεριφορά διάχυσης. Οι μόνες παράμετροι που απαιτούνται σε αυτή την εξίσωση είναι η απόλυτη θερμοκρασία T , η παγκόσμια σταθερά Boltzmann k_B και το ιξώδες η του ρυθμιστικού διαλύματος. Στην πράξη, οι κύριες παράμετροι που ενδιαφέρουν, κατά την εκτέλεση πειραμάτων DLS, είναι η θερμοκρασία, ο δείκτης διάθλασης και το ιξώδες.^[51]

Σε αντίθεση με μεθόδους όπως η φασματοσκοπία Raman, η DLS βασίζεται στην ελαστική ηλεκτρομαγνητική σκέδαση των διασκορπιζόμενων σωματιδίων. Η συνιστώσα του ηλεκτρικού πεδίου των φωτεινών κυμάτων λέιζερ αλληλεπιδρά με τα μόρια του δείγματος προκαλώντας ταλαντευόμενα (σημειακή πηγή) ηλεκτρικά δίπολα εντός του μορίου στην ίδια συχνότητα, με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός. Το φως σκεδάζεται σφαιρικά προς όλες τις κατευθύνσεις, διατηρώντας σχεδόν σταθερή την ενέργεια των φωτονίων. Τα περισσότερα δείγματα που ενδιαφέρουν έναν βιοχημικό, όπως οι πρωτεΐνες σε διάλυμα, είναι πολύ μικρότερα από το μήκος κύματος του εφαρμοζόμενου λέιζερ DLS ($<0,1\lambda$), επιτρέποντας τη διείσδυση του φωτός και την ιστροπική σκέδαση σύμφωνα με τους νόμους της σκέδασης Rayleigh που πήρε το όνομά του από τον Βρετανό φυσικό λόρδο Rayleigh.

Η ικανότητα της DLS να προσδιορίζει κατανομές μεγέθους σωματιδίων σε ένα ευρύ φάσμα μεγεθών και να συγκρίνει κατά προσέγγιση την ποσότητα των σωματιδίων σε διαφορετικά δείγματα μέσω της έντασης της σκέδασης ανοίγει εφαρμογές για μια ποικιλία διαφορετικών δειγμάτων. Περαιτέρω, έμμεσα είναι επίσης δυνατός ο προσδιορισμός του ιξώδους του διαλύματος που περιέχει ένα δείγμα με γνωστή υδροδυναμική ακτίνα r_h , η οποία

μετατοπίζεται σε υψηλότερη ή χαμηλότερη τιμή r_h ανάλογα με τη διαφορά ιξώδους σύμφωνα με την εξίσωση Stokes-Einstein.

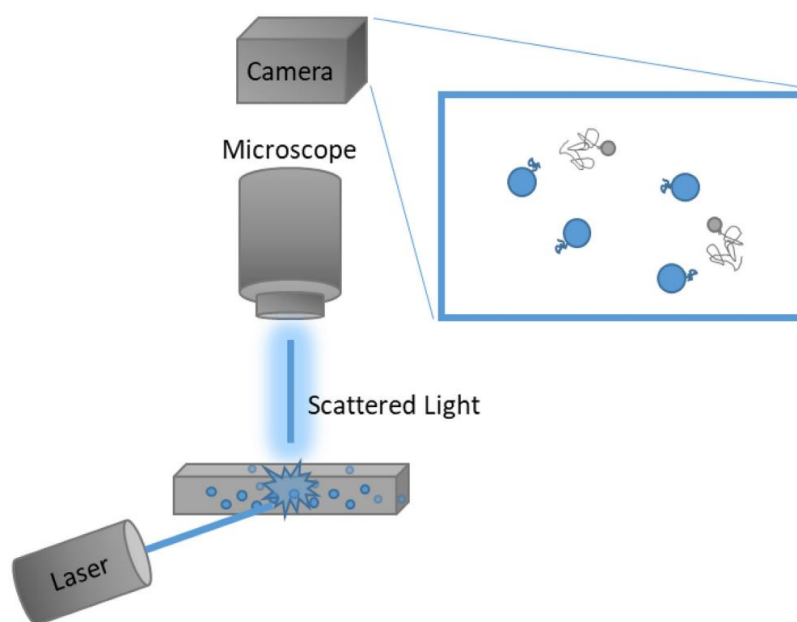
Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων πρέπει να απομακρυνθούν ακόμη και μικρές ποσότητες τεχνητών μεγάλων περιβαλλοντικών σωματιδίων λόγω των ενοχλητικών ιδιοτήτων σκέδασης που παρουσιάζουν, δηλαδή λόγω της "θωράκισης" της ασθενέστερης σκέδασης των μικρότερων σωματιδίων και της περιορισμένης ανάλυσης μεγέθους σε ένα τυπικό πείραμα DLS. Δίπλα σε άλλες οπτικές παραμέτρους αυτά τα περιβαλλοντικά σωματίδια εμποδίζουν επίσης τον χαρακτηρισμό σωματιδίων μεγαλύτερων από περίπου 1 μm . Συνήθως τα διαλύματα των δειγμάτων απλώς φιλτράρονται ή φυγοκεντρίζονται κατά τη στιγμή του πειράματος ή κλασματοποιούνται ανάλογα με το μέγεθός τους με χρωματογραφικές μεθόδους. Επίσης, η εκτεταμένη βελτιστοποίηση των προσθέτων του διαλύματος ή η υπερφυγοκέντρωση βοηθά συνήθως στην ελαχιστοποίηση της πολυδιασποράς και της ανεπιθύμητης διεύρυνσης των κορυφών.^[50]

1.13.3 Ανάλυση Παρακολούθησης Νανοσωματιδίων (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA)

Μια άλλη αναδυόμενη τεχνική που χρησιμοποιεί τη Stokes - Einstein είναι η Ανάλυση Παρακολούθησης Νανοσωματιδίων (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA). Η τεχνική αυτή συνδυάζει τη μικροσκοπία σκέδασης φωτός με λέιζερ με μια κάμερα συσκευής συζευγμένου φορτίου, η οποία επιτρέπει την οπτικοποίηση και την καταγραφή μεμονωμένων νανοσωματιδίων που κινούνται με κίνηση Μπράουν σε διάλυμα. Μπορούν στη συνέχεια να προσδιοριστούν οι κατανομές μεγέθους και οι συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων. Παρόλο που η NTA είναι χρονοβόρα και απαιτεί κάποιες δεξιότητες για την προσαρμογή των ρυθμίσεων του λογισμικού, ένα σημαντικό πλεονέκτημα έναντι της DLS είναι η δυνατότητα ανάλυσης πολλαπλών πληθυσμών μεγέθους με μεγαλύτερη ακρίβεια.^[52]

Η ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (NTA) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, των κυστιδίων, των εξωσωμάτων και των πρωτεϊνών. Η NTA διαφέρει από την DLS στον τρόπο ανίχνευσης του σκεδαζόμενου φωτός. Η NTA χρησιμοποιεί δέσμη λέιζερ για να φωτίσει τα σωματίδια και το σκεδαζόμενο φως απεικονίζεται εύκολα με ένα συμβατικό μικροσκόπιο εξοπλισμένο με αντικειμενικό φακό 20x. Η σωματιδιακή κίνηση, δηλαδή το σκεδαζόμενο φως, καταγράφεται στη συνέχεια με κάμερα CCD ή CMOS, τοποθετημένη σε γωνία 90° γωνία με το επίπεδο ακτινοβολίας. Η κάμερα λειτουργεί σε 30 καρέ ανά δευτερόλεπτο (fps), καταγράφοντας ένα αρχείο βίντεο των σωματιδίων που κινούνται κάτω από κίνηση Brown. Το λογισμικό παρακολουθεί πολλά σωματίδια μεμονωμένα και χρησιμοποιώντας την εξίσωση Stokes-Einstein υπολογίζει τις υδροδυναμικές διαμέτρους τους (Εικόνα 18). Δεδομένου ότι η NTA είναι σε θέση να παρακολουθεί μεμονωμένα σωματίδια, μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση των σωματιδίων σε ένα δείγμα. Ωστόσο, αυτό απαιτεί βαθμονόμηση με

πρότυπα γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης. Αναφέρεται ότι η NTA μπορεί να προσδιορίσει το μέγεθος σωματιδίων μεταξύ 10 και 1000 nm σε ένα εύρος συγκέντρωσης από $1E+06$ έως $1E+09$ σωματίδια ml^{-1} . Ωστόσο, αυτό εξαρτάται από το δείγμα και τη διαμόρφωση του συστήματος. Για δείγματα, όπου ο δείκτης διάθλασης (RI) του σωματιδίου είναι κοντά στον RI του ηλεκτρολύτη στον οποίο αιωρείται, η ανάλυση ανίχνευσης διακυβεύεται, με αποτέλεσμα περιορισμένο εύρος ανάλυσης μεγέθους και αναξιόπιστα προσδιορισμό της συγκέντρωσης. Όπως και η DLS, η NTA έχει επίσης περιορισμένο εύρος ανάλυσης για πολυδιάσπαρτα δείγματα λόγω της προσέγγισης του Rayleigh, καθιστώντας δύσκολη την ανίχνευση και την παρακολούθηση μικρών σωματιδίων.^[53]



Εικόνα 17 :Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας της NTA ^[53]

Η κίνηση Brown εμφανίζεται σε τρεις διαστάσεις, αλλά η NTA παρατηρεί την κίνηση μόνο σε δύο διαστάσεις. Ωστόσο, το γεγονός ότι η τρισδιάστατη κίνηση Brown παρακολουθείται μόνο σε δύο διαστάσεις εξηγείται με τη χρήση της ακόλουθης παραλλαγής της εξίσωσης Stokes-Einstein. Είναι δυνατόν να προσδιοριστεί το D από τη μέτρηση της μέσης τετραγωνικής μετατόπισης ενός σωματιδίου σε μία, δύο ή τρεις διαστάσεις.

$$\begin{array}{ccc} \overline{(x^2)} = \frac{2TK_Bt}{3\Pi\eta d} & \overline{(x, y)^2} = \frac{4TK_Bt}{3\Pi\eta d} & \overline{(x, y, z)^2} = \frac{2TK_Bt}{\Pi\eta d} \\ \text{a} & \text{b} & \text{c} \end{array}$$

Εικόνα 18: Παραλλαγές της εξίσωσης Stokes-Einstein^[54]

Ένα κρίσιμο πλεονέκτημα που έχει η NTA έναντι άλλων τεχνικών μέτρησης είναι ότι δεν είναι <<προκατειλημμένη>> ως προς τα μεγαλύτερα σωματίδια ή συσσωματώματα. Το λογισμικό βασίζεται στην παρακολούθηση μεμονωμένων σωματιδίων, ενώ οι τυπικές τεχνικές DLS

εμφανίζουν έντονη <<προκατάληψη>> ως προς τα μεγαλύτερα σωματίδια που υπάρχουν στο δείγμα. Συνεπώς, η NTA επιτρέπει την ανίχνευση δευτερευουσών κορυφών, οι οποίες ενδέχεται να μην είναι ανιχνεύσιμες ή επιλύσιμες με τη χρήση άλλων παραδοσιακών μετρήσεων.^[54]

Το πλεονέκτημα της δυνατότητας ταυτόχρονης μέτρησης δύο ανεξάρτητων παραμέτρων, όπως η σωματιδιακή ένταση σκέδασης και η διάμετρος σωματιδίου (από τη δυναμική συμπεριφορά), μπορεί να αποδειχθεί πολύτιμο για την ανάλυση μειγμάτων διαφορετικών τύπων σωματιδίων (π.χ. διάκριση μεταξύ ανόργανων και πολυμερών σωματιδίων του ίδιου διαμέτρου). Ομοίως, μικρές διαφορές στο μέγεθος των σωματιδίων εντός ενός πληθυσμού μπορούν να επιλυθούν με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια από ό,τι θα επιτυγχάνονταν με άλλες τεχνικές σκέδασης φωτός σε σύνολο.^[54]

Οι μετρήσεις μεγέθους που λαμβάνονται με NTA είναι γενικά ακριβείς (εντός 5% του αναμενόμενου μεγέθους), εάν χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες ρυθμίσεις λήψης και ανάλυσης βίντεο. Πιθανές αιτίες σφάλματος είναι η ανακριβής μέτρηση της θερμοκρασίας, η εσφαλμένη εκτίμηση του ιξώδους και οι εξωτερικοί κραδασμοί. Η συνεχής παρακολούθηση της θερμοκρασίας με σωστά βαθμονομημένο ψηφιακό θερμόμετρο είναι απαραίτητη για κάθε μέτρηση (αυτό εκτελείται αυτόματα σε αρκετά μοντέλα). Η προεπιλεγμένη ρύθμιση ιξώδους στο NTA είναι αυτή του νερού και, καθώς τα περισσότερα δείγματα αραιώνονται πολλές φορές σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα, αυτό είναι γενικά κατάλληλο. Η πιο πρόσφατη έκδοση λογισμικού εμφανίζει μια προειδοποίηση εάν υπάρχει υποψία δόνησης και μπορεί να διορθώσει μικρές σταθερές δονήσεις. Πιθανές πηγές μεταβλητότητας στις μετρήσεις απόλυτης συγκέντρωσης NTA περιλαμβάνουν τον τύπο της κάμερας, το μήκος κύματος του λέιζερ, το βάθος της δέσμης λέιζερ, την καθαρότητα/φθορά της επίπεδης οπτικής επιφάνειας από μεταλλοποιημένο γυαλί, τη διάρκεια των μετρήσεων, την οπτική ευθυγράμμιση, τους κραδασμούς και την επάρκεια του χειριστή. Αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν επίσης την ανάλυση μεγέθους που διαφέρει μεταξύ των οργάνων και εξαρτάται επίσης σε μεγάλο βαθμό από τον δείκτη διάθλασης των σωματιδίων που μελετώνται.^[55]

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη ενός καινοτόμου μη τοξικού νανοσυστήματος μεταφοράς φαρμακευτικής ουσίας με στόχο την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς της, μέσω του εγκλωβισμού της σε πράσινους διαλύτες. Συγκεκριμένα, η βιοδραστική ένωση που δεν εμφανίζει ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητα, λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της, είναι η χρυσίνη. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιείται το ιοντικό υγρό choline geranate (CAGE), που συντίθεται από φυσικά συστατικά σε δύο μοριακές αναλογίες (1:1 και 1:2), ενώ σε υδατικά διαλύματα δημιουργεί μικκύλια, μέσα στα οποία εγκλείεται η χρυσίνη για να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητά της και κατά συνέπεια η βιοδιαθεσιμότητά της. Προσδιορίζεται φασματομετρικά η απόδοση εγκλεισμού της χρυσίνης στα ιοντικά υγρά για διάφορες τιμές ποσοστού φόρτωσης (drug loading). Τα προκύπτοντα νανοσυστήματα αξιολογούνται ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με δοκιμή DPPH και ακολουθεί χαρακτηρισμός των μικκυλίων ως προς το μέγεθός τους και τη σταθερότητα της διασποράς τους, μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και Ανάλυσης Παρακολούθησης Νανοσωματιδίων (NTA).

2.2 Όργανα και αντιδραστήρια

Πίνακας 3: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν

Εργαστηριακό όργανο-συσκευή και μοντέλο

Ζυγός ακριβείας (έως 110g), Explorer, OHAUS

Ζυγός ακριβείας (έως 2g), M2P, Sartorius

Αναδευτήρας τύπου Vortex, ZX4, Velp

Λουτρό υπερήχων, 2210 Ultrasonic Bath, Branson

Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, V-770 UV-Vis/NIR, Jasco

Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, Molecular Devices SpectraMax 250 Microplate UV/Vis Reader

Πεχάμετρο, Metrohm 744

Dynamic Light Scattering (DLS), Malvern Panalytical Zetasizer Nano ZS

Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη εστία, Witeg MSH-20A

Φίλτρο, Branchia Nonsterile Syringe Filters, Pore: 0.22µm

Εκκολαπτήριο (Incubator), Gallenkamp

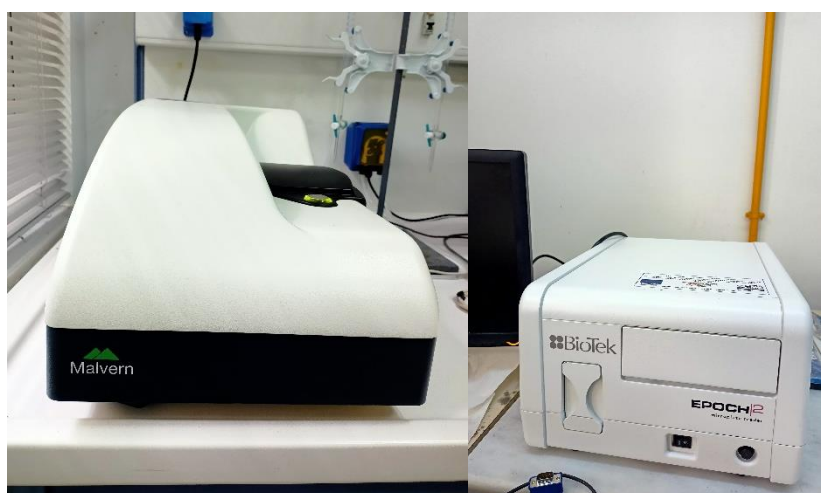
Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), Malvern Panalytical NanoSight NS300

Υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης (HPLC), Prominence i LC-2030C 3D Plus

Λυοφιλοποιητής, Lablyo Mini Frozen In Time

Πίνακας 4 :Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιδραστήριο	Χημικός Τύπος	Προμηθευτής
Υπερκάθαρο-απεσταγμένο-απιονισμένο νερό	H ₂ O	-
Αιθανόλη	C ₂ H ₅ OH	Sigma – Aldrich
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	C ₁₈ H ₁₃ N ₅ O ₆	Aldrich
Γερανικό οξύ (98%)	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	Alfa Aesar
Όξινη ανθρακική χολίνη (υδατικό διάλυμα 80% v/v)	C ₅ H ₁₄ NO .HCO ₃	Sigma – Aldrich
Χρυσίνη (98%)	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	Alfa Aesar
Μονόξινο φωσφορικό κάλιο/Φωσφορικό δικάλιο	K ₂ HPO ₄	Penta
Δισόξινο φωσφορικό Κάλιο/Φωσφορικό μονοκάλιο	KH ₂ PO ₄	Penta
Dimethylsulfoxide	C ₂ H ₆ OS	Fisher Chemical
Μεθανόλη (HPLC grade)	CH ₃ OH	Fisher Chemical



Εικόνα 19: Από αριστερά προς τα δεξιά, η συσκευή DLS του εργαστηρίου Γενικής Χημείας και η συσκευή UV-reader του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας

2.3 Παρασκευή διαλύματος Buffer pH=7,44

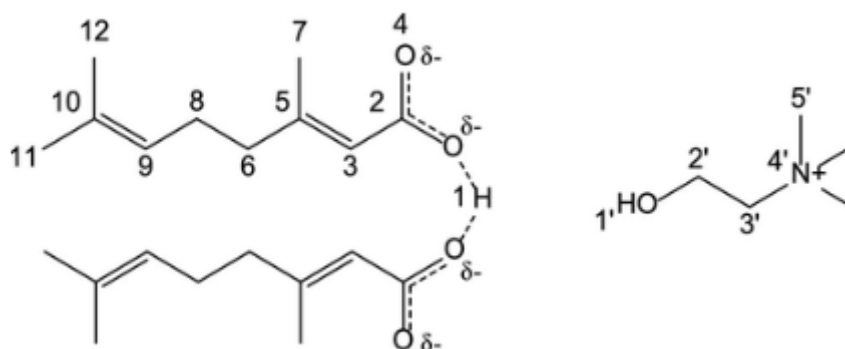
Παρασκευάζεται ένα υδατικό διάλυμα το οποίο θα προσομοιάζει τις συνθήκες των φυσιολογικών υγρών του ανθρώπινου σώματος. 1,74g όξινου φωσφορικού καλίου διαλύονται σε 100mL υπερκάθαρο νερό, οπότε προκύπτει βασικό διάλυμα με pH=9,59. 2,07g δισόξινου φωσφορικού καλίου διαλύονται σε 150mL υπερκάθαρου νερού και έτσι προκύπτει

ένα όξινο διάλυμα. Το όξινο διάλυμα προστίθεται στάγδην στο βασικό, ενώ το pH του διαλύματος παρακολουθείται με πεχάμετρο, μέχρις ότου το pH να γίνει ίσο με 7,44. Το διάλυμα αναδεύεται σε όλη τη διαδικασία με μια γυάλινη ράβδο. Στο τέλος, λαμβάνεται το διάλυμα Buffer με όγκο περίπου 150mL και pH=7,44.

2.4 Σύνθεση πράσινων διαλυτών

2.4.1 Σύνθεση CAGE 1:1

Το CAGE 1:1 είναι το αμιγώς ιοντικό υγρό. Σε 1g γερανικού οξέος (5,9438 mmol οξέος) προστίθενται στάγδην 1,049mL υδατικού διαλύματος όξινης ανθρακικής χολίνης (80% κατά βάρος) (5,9438 mmol χολίνης). Οι ποσότητες αυτές υπολογίζονται ώστε η γραμμομοριακή αναλογία να είναι 1:1 ανάμεσα στα αρχικά συστατικά. Κατά την ανάμιξη, το μίγμα αναδεύεται και τελείται η αντίδραση μεταφοράς πρωτονίου με σχηματισμό νερού και διοξειδίου του άνθρακα υπό μορφή φυσαλλίδων. Γίνεται προσθήκη της χολίνης στο γερανικό οξύ (και όχι το αντίστροφο) ώστε να αποφεύγεται ο έντονος αφρισμός του μίγματος. Χρησιμοποιείται παγόλουτρο, επειδή η αντίδραση σχηματισμού είναι εξώθερμη. Το μίγμα αφήνεται σε ανάδευση και όταν πια δεν παράγονται φυσαλλίδες CO₂, τότε η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Αν παρ' όλα αυτά παρατηρηθεί έντονος αφρισμός που δεν υποχωρεί εύκολα, προστίθεται στο vial 0,5mL καθαρής αιθανόλης. Στη συνέχεια, το προκύπτον ιοντικό υγρό οδηγείται σε λυοφιλίωση (freeze-drying) για να απομακρυνθεί το περιεχόμενο νερό. Η αποθήκευση γίνεται σε ξηραντήρα για να μην τελείται προσρόφηση υγρασίας.

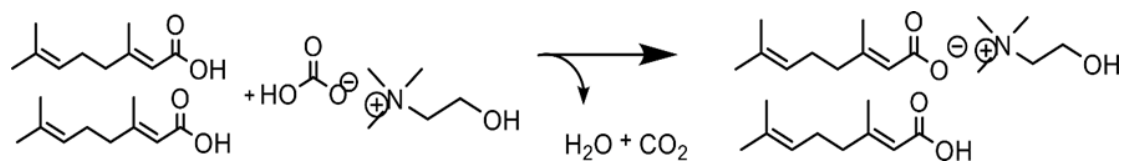


Εικόνα 20: Μοριακή δομή γερανικού οξέος και χολίνης προς σχηματισμό cage 1:1^[36]

2.4.2 Σύνθεση CAGE 1:2

Η διαδικασία είναι η ίδια με το CAGE 1:1 και το μόνο που αλλάζει είναι οι ποσότητες των αντιδραστηρίων. Σε 1,02g γερανικού οξέος (6,06 mmol) προστίθενται 0,524mL όξινης

ανθρακικής χολίνης (80% κατά βάρος) (3,031 mmol) και η τελική γραμμομοριακή αναλογία είναι 2:1 αντίστοιχα (σχήμα 21 και εικόνα 22).



Εικόνα 21: Αντίδραση σχηματισμού CAGE 1:2^[27]



Εικόνα 22: Διαδικασία σχηματισμού CAGE 1:1 και CAGE 1:2 και τελικά προϊόντα

2.5 Μελέτη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:1

Γίνεται μελέτη της διαλυτότητας της βιοδραστικής ουσίας χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα με pH=7,44 παρουσία του CAGE και προκύπτει η σχετική καμπύλη διαλυτότητας.

Αρχικά δημιουργείται ένα stock διάλυμα του CAGE 1:1 με συγκέντρωση 900mM. Για αυτό το σκοπό ζυγίζονται στο ζυγό ακριβείας 879,9 mg CAGE 1:1 (Mr=272,12 g/mL) και προστίθενται 3,6mL διαλύματος Buffer. Χρησιμοποιείται το vortex για ομογενοποίηση. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το stock αυτό με τη σταθερή συγκέντρωση, δημιουργούνται 7 stock διαφορετικών συγκεντρώσεων CAGE 1:1 όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Ο τελικός όγκος προκύπτει 1mL.

Πίνακας 5: Δημιουργία 7 διαφορετικών stock CAGE 1:1

Συγκέντρωση Stock	mL Buffer	mL αρχικού Stock (900mM)
0 mM	1,0000	0,0000
150 mM	0,8335	0,1665
300 mM	0,6667	0,3330
450 mM	0,5000	0,5000
600 mM	0,3335	0,6665
750 mM	0,1670	0,8330
900 mM	0,0000	1,0000

Μετά τη δημιουργία των παραπάνω stock, χρησιμοποιείται το vortex για ομογενοποίηση. Ζυγίζονται 50mg χρυσίνης στο ζυγό ακριβείας και προστίθενται σε κάθε stock. Τα 7 δείγματα με τη χρυσίνη τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37 °C στις 70 rpm (ήπια ανάδευση) για 48 ώρες και υπό συνθήκες σκότους.

Μετά από 48 ώρες, λαμβάνονται τα δείγματα από τον επωαστήρα και παρατηρείται η ύπαρξη ιζήματος, καθώς η χρυσίνη είναι σε περίσσεια. Για αυτό λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό με μία σύριγγα από κάθε δείγμα και φιλτράρεται με φίλτρα 0,22μm, για να αφαιρεθούν τυχαίως αιωρούμενα σωματίδια χρυσίνης που θα επηρεάσουν την ακρίβεια μέτρησης του φασματοφωτόμετρου, αλλά και επειδή ο σκοπός είναι να μετρηθεί η περιεκτικότητα σε διαλυμένη χρυσίνη μόνο.

Τα φιλτραρισμένα stock οδηγούνται στο φασματοφωτόμετρο UV-vis, όπου μετράται η απορρόφηση της χρυσίνης στα 270nm, μετά τις κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων με το διάλυμα buffer. Με βάση τα αποτελέσματα, υπολογίζεται η συγκέντρωση της διαλυμένης χρυσίνης στα αρχικά δείγματα και δημιουργείται η καμπύλη διαλυτότητας της χρυσίνης.



Εικόνα 23: Stock διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:1 μετά τη διαδικασία επώασης

2.6 Μελέτη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:2

Παρασκευάζεται το αρχικό stock CAGE 1:2 συγκέντρωσης 900mM. Για τη δημιουργία του ζυγίζονται 1,4 g CAGE 1:2 ($M_r=440,32$ g/mL) και προστίθενται 3,6mL Buffer. Στη συνέχεια, η διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς ίδια με τη μελέτη διαλυτότητας με CAGE 1:1. Με βάση τα αποτελέσματα δημιουργείται και η καμπύλη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:2.



Εικόνα 24: Δημιουργία αραιώσεων των stock διαλυτότητας για μέτρηση στο UV-vis



Εικόνα 25: Stock διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:2 μετά τη διαδικασία επώασης.

2.7 Προσδιορισμός της απόδοσης εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1

Δημιουργούνται εγκλεισμοί της χρυσίνης στο CAGE 1:1 με αναλογία νερού-CAGE 5:1 για να υπάρχει η σιγουριά της δημιουργίας μικκυλίων. Πιο συγκεκριμένα, ποσότητα χρυσίνης προστίθεται σε CAGE στις αναλογίες (drug loading) 1mg/g (δηλαδή 1mg χρυσίνης σε 1g CAGE), 5mg/g και 20mg/g. Το μίγμα αναδεύεται έντονα ώστε να ομογενοποιηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό και στη συνέχεια προστίθεται στο σύστημα η κατάλληλη ποσότητα υπερκάθαρου νερού, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αναλογία 5:1.

Τα μίγματα οδηγούνται για απλή ανάδευση στο vortex και στη συνέχεια αφήνονται προς ανάδευση για 2 μέρες σε συνθήκες σκότους. Οι εγκλεισμοί παρασκευάζονται δύο φορές, για μελέτη επαναληψιμότητας.

Μετά το πέρας των 48h, ζυγίζονται από κάθε εγκλεισμό 50μL και σε αυτά προστίθενται 500μL καθαρής αιθανόλης. Όλα τα δείγματα τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων χωρίς θέρμανση για 45 λεπτά, με σκοπό να «σπάσουν» τα μικκύλια και να απελευθερωθεί η όποια χρυσίνη έχει εγκλειστεί. Ανά 15 λεπτά αφαιρούνται από το λουτρό επειδή αυξάνεται η θερμοκρασία κατά τη διαδικασία και πρέπει να αποφευχθεί η υπερθέρμανση. Μετά το λουτρό υπερήχων, τα δείγματα φιλτράρονται με φίλτρο 0,22μm και στα φιλτραρισμένα πλέον δείγματα γίνονται αραιώσεις για να μετρηθούν στο φασματοφωτόμετρο και να βρεθεί η περιεκτικότητά τους σε χρυσίνη. Οι αραιώσεις στο UV γίνονται με αιθανόλη, ενώ πάλι μετρώνται σε fixed

wavelength 270nm. Όλη αυτή η διαδικασία εκτελείται εις διπλούν για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας.

Ακολούθως, γίνεται αναγωγή της συγκέντρωσης της χρυσίνης στους αρχικούς εγκλεισμούς. Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται η απόδοση εγκλεισμού (encapsulation efficiency, EE%) μέσω του τύπου:

$$\% \text{Απόδοση Εγκλεισμού} = \frac{\text{Μάζα χρυσίνης που εγκλείστηκε (mg)}}{\text{Αρχική χρυσίνη προς εγκλεισμό (mg)}} * 100 \quad (2)$$



Εικόνα 26: Δημιουργία εγκλεισμών 5mg/g, 20mg/g με CAGE 1:1



Εικόνα 27: Δημιουργία εγκλεισμών 1mg/g, 5mg/g, 20mg/g με CAGE 1:1

2.8 Προσδιορισμός της απόδοσης εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:2

Όπως και στην περίπτωση του CAGE 1:1, δημιουργούνται εγκλεισμοί συγκεκριμένης συγκέντρωσης (drug loading) σε χρυσίνη (1mg/g και 20mg/g) και με αναλογία νερού-CAGE 5:1, που είναι ικανή για δημιουργία μικκυλίων, στα οποία θα εγκλωβιστεί η χρυσίνη.^{[31][36]}

Μετά τη δημιουργία των εγκλεισμών αυτών, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τον προσδιορισμό της απόδοσης του εγκλεισμού στο CAGE 1:1.

2.9 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 με χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης (HPLC)

Σε τρεις εγκλεισμούς χρυσίνης σε CAGE 1:1 (1mg/g, 5mg/g, 20mg/g) χρησιμοποιείται η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης για να βρεθεί η συγκέντρωση της χρυσίνης που έχει εγκλειστεί. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει πρώτα να δημιουργηθεί μια καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης για τη μέθοδο HPLC. Για αυτό το λόγο παρασκευάζεται ένα αρχικό stock της χρυσίνης και ακολουθούν αρκετά δείγματα με αραιώσεις της. Συγκεκριμένα, ζυγίζεται 1mg χρυσίνης στο ζυγό ακριβείας και προστίθεται 1mL dimethyl sulfoxide HPLC grade. Ακολουθεί vortex για ομογενοποίηση. Στη συνέχεια γίνονται οι εξής αραιώσεις:

- 3 δείγματα που περιέχουν 100μL stock χρυσίνης και 900μL φιλτραρισμένης μεθανόλης HPLC grade
- 3 δείγματα που περιέχουν 80μL stock χρυσίνης και 920μL φιλτραρισμένης μεθανόλης HPLC grade
- 3 δείγματα που περιέχουν 60μL stock χρυσίνης και 940μL φιλτραρισμένης μεθανόλης HPLC grade
- 3 δείγματα που περιέχουν 40μL stock χρυσίνης και 960μL φιλτραρισμένης μεθανόλης HPLC grade

Τα δείγματα αυτά τοποθετούνται στη συσκευή της HPLC και εφαρμόζεται μέθοδος με τις εξής συνθήκες^[56]:

Πίνακας 6 :Συνθήκες μεθόδου HPLC

Συνθήκη μεθόδου	Τιμή παραμέτρου
Κινητή φάση	Μεθανόλη:νερό 85:15
Ρυθμός ροής (Flow rate)	1ml/min
Όγκος δειγματοληψίας	20μL
Θερμοκρασία	Θερμοκρασία περιβάλλοντος
Τύπος έκλουσης	Ισοκρατική
Χρόνος ολοκλήρωσης	15min
Χρόνος έκλουσης (Retention time)	4,57±0,12min

Αφού δημιουργηθεί η απαραίτητη καμπύλη αναφοράς, προετοιμάζονται τα δείγματα των 3 εγκλεισμών που θα εισαχθούν στην HPLC. Για τους 3 εγκλεισμούς 1mg/g, 5mg/g, 20mg/g σε CAGE 1:1 ακολουθείται η διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω (Παράγραφος 2.8) μέχρι τη δημιουργία των φιλτραρισμένων stock. Από τα φιλτραρισμένα stock λαμβάνονται 280μL για κάθε εγκλεισμό και σε αυτά προστίθενται 720μL φιλτραρισμένης μεθανόλης HPLC grade. Τοποθετούνται στην HPLC για μέτρηση με τις παραπάνω συνθήκες λειτουργίας.

2.10 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης χρυσίνης, CAGE 1:1, CAGE 1:2 και εγκλεισμών με μέθοδο DPPH

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας των δειγμάτων να ανάγουν τη ρίζα DPPH. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, η ρίζα DPPH• (2,2-δι-(4-tert-οκτυλφαινυλο)-1-πυκρλυδραζίλιο) είναι ιδιαίτερα δραστική, αλληλεπιδρά με αντιοξειδωτικές ενώσεις και ανάγεται. Η αναγωγή της ρίζας μεταφράζεται και σε αλλαγή χρώματος του διαλύματος από μωβ (βαθύ ιώδες) προς κίτρινο και μετράται με το φασματοφωτόμετρο UV-Vis Microplate-Reader.

Αρχικά, ζυγίζονται 5mg της ρίζας DPPH και διαλύονται σε αιθανόλη σε τελικό όγκο διαλύματος 50mL. Η ρίζα είναι φωτοευαίσθητη οπότε φυλάσσεται σε απόλυτα σκοτεινό μέρος και παρασκευάζεται τη μέρα των μετρήσεων, για να αποφευχθεί η αναγωγή που προκύπτει με τη φύλαξη αρκετών ωρών.

Στη συνέχεια δημιουργούνται τα stock διαλύματα, των οποίων η αντιοξειδωτική δράση θα μελετηθεί.

Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης:

- της ελεύθερης χρυσίνης δημιουργείται το Stock συγκέντρωσης 3mg χρυσίνης/mL αιθανόλης
- για το CAGE 1:1 : 100μL/mL αιθανόλης
- για τον εγκλεισμό της χρυσίνης σε CAGE 1:1 (5mg/g): 714μL εγκλεισμού /mL αιθανόλης
- για το CAGE 1:2 : 25μL CAGE 1:2 /ml αιθανόλης
- για τον εγκλεισμό σε CAGE 1:2 συγκέντρωσης (1mg/g): 500μL εγκλεισμού /mL αιθανόλης
- για τον εγκλεισμό σε CAGE 1:2 συγκέντρωσης (20mg/g): 300μL εγκλεισμού /mL αιθανόλης

Στη συνέχεια, από τα παραπάνω stock διαλύματα συγκέντρωσης C₁, παρασκευάζονται με αιθανόλη διαλύματα συγκεντρώσεων 0,8C₁, 0,6C₁, 0,4C₁ και 0,2C₁ απευθείας στο plate. Όλα

τα προκύπτοντα διαλύματα έχουν όγκο 100μL και έπειτα σε όλα προστίθενται και 100μL διαλύματος ρίζας DPPH. Επίσης, παρασκευάζονται και τα τυφλά δείγματα που αποτελούνται αποκλειστικά από 200μL διαλύματος DPPH, αποκλειστικά από 200μL αιθανόλης (blank) και από διάλυμα κατ' όγκου σύστασης 50% αιθανόλης και 50% διαλύματος DPPH (control) και τελικό όγκο 200μL. Το plate αφήνεται σε μέρος χωρίς φως να επωαστεί για χρόνους 15min, 30min και 60min και λαμβάνονται μετρήσεις απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 515nm.

Ο τρόπος πλήρωσης του plate με τα Stock και τα τυφλά διαλύματα φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 28):

πίνακας σε μL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
DPPH	200	200	0	0	100	100	100					
EtOH	0	0	200	200	100	100	100					
Stock	0	0	0	0	0	0	0					
B												
DPPH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
EtOH	0	0	20	20	40	40	60	60	80	80		
Stock	100	100	80	80	60	60	40	40	20	20		
C												
DPPH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
EtOH	0	0	20	20	40	40	60	60	80	80		
Stock	100	100	80	80	60	60	40	40	20	20		
D												
DPPH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
EtOH	0	0	20	20	40	40	60	60	80	80		
Stock	100	100	80	80	60	60	40	40	20	20		
E												
DPPH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
EtOH	0	0	20	20	40	40	60	60	80	80		
Stock	100	100	80	80	60	60	40	40	20	20		
F												
DPPH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
EtOH	0	0	20	20	40	40	60	60	80	80		
Stock	100	100	80	80	60	60	40	40	20	20		

Εικόνα 28: Τρόπος πλήρωσης του plate

Μετά τη λήψη των τιμών απορρόφησης, υπολογίζεται η % αναστολή (αναγωγή) της ρίζας για κάθε συγκέντρωση δείγματος και σχεδιάζεται το διάγραμμα της επί τοις εκατό αναστολής της ρίζας συναρτήσει της συγκέντρωσης. Η ποσοστιαία αναγωγή προκύπτει από την εξίσωση:

$$\%Inhibition = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} * 100 \quad (3)$$

όπου $A_{control}$ η τιμή απορρόφησης του διαλύματος 50% κατ' όγκο αιθανόλη και 50% κατ' όγκο διαλύματος DPPH και A_{sample} η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων.

Η προκύπτουσα γραφική παράσταση είναι ευθεία γραμμή με θετική κλίση της μορφής:

$$\%Inhibition = a * C + b \quad (4)$$

Ο δείκτης IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση διαλύματος αντιοξειδωτικού που απαιτείται για 50% μείωση της απορρόφησης της ρίζας DPPH (δηλαδή 50% inhibition). Επομένως, η εξίσωση (4) μετατρέπεται ως εξής:

$$50 = a * IC_{50} + b \rightarrow IC_{50} = \frac{50-b}{a} \quad (5)$$

όπου a η κλίση και b η αποτέμνουσα της ευθείας, που προκύπτουν γραφικά.

2.11 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων ιοντικών υγρών και εγκλεισμών

2.11.1 Χαρακτηρισμός με τη μέθοδο DLS

Ο προσδιορισμός του μεγέθους (μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου), του δείκτη πολυδιασποράς PDI (κατανομή μεγέθους) και του ζ-δυναμικού των διασπορών των μικκυλίων γίνεται μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Λαμβάνονται 10μL από τα δείγματα CAGE 1:1, CAGE 1:2, εγκλεισμών με CAGE 1:1 1mg/g, 5mg/g, 20mg/g, εγκλεισμών με CAGE 1:2 1mg/g και 20mg/g, αραιώνονται με 20mL υπερκάθαρο νερό και αναδεύονται για πολύ μικρό χρονικό διάστημα με Vortex προκειμένου να γίνει η ανάμιξη και να επιτευχθεί καλύτερη διασπορά των σωματιδίων. Με χρήση σύριγγας προστίθεται το εκάστοτε δείγμα στην κυψελίδα τύπου U (DTS1070) μέχρι την πλήρη διαβροχή των ηλεκτροδίων της και εν τέλει, εισάγεται στο όργανο Zetasizer Nano ZS. Με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού και των αρχείων SOP (Standard Operating Procedure) λαμβάνονται οι μετρήσεις του μεγέθους των νανοσωματιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού.

Για το μέγεθος σωματιδίων και το δείκτη πολυδιασποράς τελούνται 6 σαρώσεις (μετρήσεις) και για το ζ-δυναμικό 3 σαρώσεις. Λαμβάνεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και υπολογίζεται η τυπική απόκλιση.

2.11.2 Χαρακτηρισμός με τη μέθοδο NTA

Λαμβάνονται 10μL από τα δείγματα του παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7: Δείγματα που χαρακτηρίστηκαν με τη μέθοδο NTA

CAGE 1:1

CAGE 1:1 εγκλεισμός 1mg/g

CAGE 1:1 εγκλεισμός 5mg/g

CAGE 1:1 εγκλεισμός 20mg/g

**Υπερκείμενο υγρό από μελέτη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:1 του
δείγματος συγκέντρωσης 300mM**

**Υπερκείμενο υγρό από μελέτη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:1 του
δείγματος συγκέντρωσης 450mM**

**Υπερκείμενο υγρό από μελέτη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE 1:1 του
δείγματος συγκέντρωσης 600mM**

CAGE 1:2

CAGE 1:2 εγκλεισμός 1mg/g

CAGE 1:2 εγκλεισμός 20mg/g

Τα 10 μL των παραπάνω δειγμάτων αραιώνονται σε 20 mL υπερκάθαρο νερό. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex. Στη συνέχεια λαμβάνονται μερικά mL με μια σύριγγα και τοποθετούνται στη συσκευή NS300, που εκτελεί Ανάλυση Παρακολούθησης Νανοσωματιδίων (NTA). Η συσκευή πιέζει αυτόματα το άκρο της σύριγγας ώστε να απελευθερώσει κάθε φορά την ποσότητα που χρειάζεται να περάσει από την κάμερα της συσκευής με ρυθμό 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού λαμβάνονται οι μετρήσεις, ενώ είναι στη διακριτική ευχέρεια του χρήστη να κάνει λήψη των εικόνων που χρειάζεται από τα πολλά σχετικά γραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση.

Με τη μέθοδο NTA, όπως έχει προαναφερθεί, υπάρχει η δυνατότητα προσδιορισμού της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων. Επίσης, είναι δυνατή η απεικόνισή τους, αφού ανιχνεύει την κίνηση Brown. Τέλος, προσδιορίζεται η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων.

3.Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Μελέτη διαλυτότητας χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE 1:1 και CAGE 1:2

Η χρυσίνη είναι μία πολύ ισχυρή ιστοπροστατευτική και αντικαρκινική ένωση. Οι ποικίλες ιδιότητές της, όπως έχουν αναπτυχθεί στο Θεωρητικό Μέρος (Παράγραφος 1.11), την κατατάσσουν ως ένα πολύ ισχυρό φάρμακο για διάφορες ασθένειες, με τη χρήση της σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η αξιοποίησή της, όμως, παρουσιάζει αρκετά εμπόδια λόγω της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητάς της. Ο λόγος είναι πως είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό. Γίνονται πλέον προσπάθειες εύρεσης νέων ουσιών που μπορούν να διαλύσουν σε υψηλές συγκεντρώσεις τη χρυσίνη, καθώς και δημιουργίας φορέων που να αυξάνουν τη διαλυτότητα και κατά συνέπεια τη βιοδιαθεσιμότητά της στο νερό.

Προς αυτή την κατεύθυνση κινείται το συγκεκριμένο κομμάτι της εργασίας. Χρησιμοποιούνται τα CAGE 1:1 και CAGE 1:2 ως νέοι καινοτόμοι πράσινοι διαλύτες με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση για τη διάλυση της χρυσίνης σε υδατικό μέσο^[58]

Διαλυτότητα και καμπύλη αναφοράς

Όπως έγινε γνωστό η χρυσίνη είναι αδιάλυτη στο νερό. Ο ανθρώπινος οργανισμός, όμως, αποτελείται κατά βάση από νερό και, εάν η χρυσίνη δεν μπορεί να διαλυθεί σε αυτό, τότε ο ανθρώπινος οργανισμός αδυνατεί να την αξιοποιήσει και μαζί τις ισχυρές θεραπευτικές της ιδιότητες. Σε παλαιότερες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η χρήση κυκλοδεξτρινών και PLGA έχουν αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητα της χρυσίνης, όμως οι περισσότερες έρευνες έχουν διεξαχθεί *in vivo*.^[24]

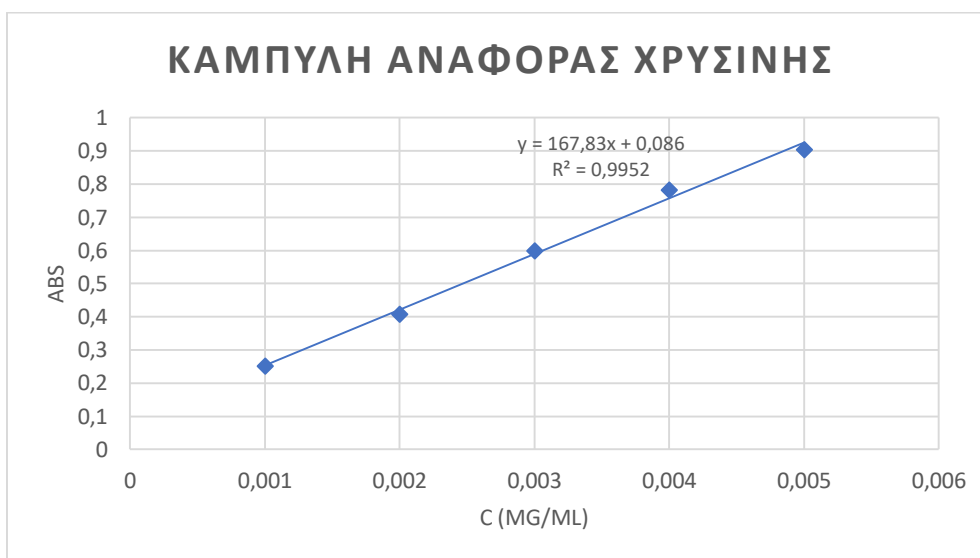
Στη συγκεκριμένη μελέτη δημιουργούνται υπέρκορα διαλύματα χρυσίνης και αυτό που αλλάζει σε κάθε διάλυμα είναι η συγκέντρωση σε CAGE 1:1 και σε CAGE 1:2. Με αυτό τον τρόπο θα αποδειχθεί αν αυξάνοντας την περιεκτικότητα ενός υδατικού διαλύματος σε CAGE (είτε το 1:1 είτε το 1:2) θα αυξηθεί η διαλυτότητα της χρυσίνης σε αυτό.

3.1.1 Καμπύλη αναφοράς για διαλυτότητα χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE 1:1

Η συγκέντρωση της χρυσίνης που φαίνεται στην καμπύλη αναφοράς που δημιουργήθηκε αποτελεί τη συγκέντρωση της διαλυτοποιημένης χρυσίνης. Αυτό επιτυγχάνεται με το φιλτράρισμα των δειγμάτων, καθώς απομακρύνεται τυχόν ίζημα ή αιωρούμενα σωματίδια χρυσίνης. Οι μετρήσεις των δειγμάτων γίνονται στο φασματοφωτόμετρο σε σταθερό μήκος κύματος στα 270nm, καθώς από βιβλιογραφία είναι το μήκος κύματος που απορροφά η χρυσίνη.^[59] Δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην πειραματική μελέτη της διάλυσης της χρυσίνης,

καθώς είναι ιδιαίτερα χρωστική σαν ένωση και απαιτούνται διαδοχικές αραιώσεις που ενδεχομένως να αυξάνουν το σφάλμα των μετρήσεων. Γι' αυτό ο χειριστής είναι ιδιαίτερα προσεκτικός και οι μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο επαναλαμβάνονται αρκετές φορές.

Όταν τα δείγματα με τις πολλαπλές αραιώσεις μετρώνται στο UV, χρησιμοποιείται η παρακάτω πρότυπη καμπύλη αναφοράς ώστε να μετατραπεί η απορρόφηση σε συγκέντρωση της χρυσίνης και συγκεκριμένα σε μονάδες mg/mL.

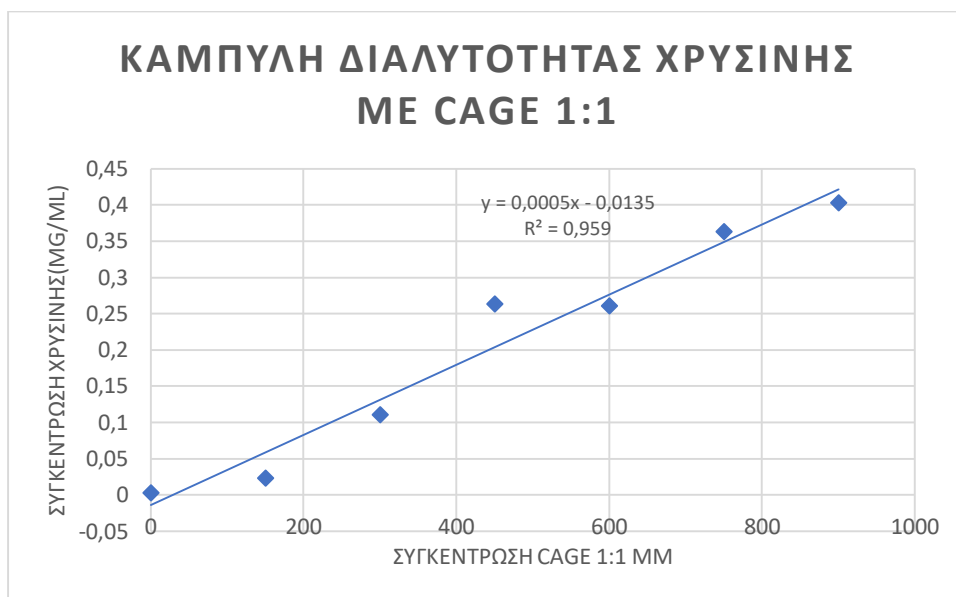


Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης στα 270nm

Επομένως με βάση την εξίσωση:

$$y = 167,83 * x + 0,086 (6)$$

όπου y η απορρόφηση της χρυσίνης στα 270 nm και x η συγκέντρωση της χρυσίνης στο μετρώμενο δείγμα σε mg/mL, μετατρέπεται η κάθε τιμή απορρόφησης που λαμβάνεται στο UV σε συγκέντρωση της διαλυτοποιημένης χρυσίνης. Στη συνέχεια με βάση τις αραιώσεις που έχουν γίνει και με διαδοχικό νόμο αραιώσης ($C1 * V1 = C2 * V2$) υπολογίζεται η συγκέντρωση της διαλυμένης χρυσίνης στα φιλτραρισμένα αρχικά δείγματα. Έτσι προκύπτει η παρακάτω καμπύλη διαλυτότητας της χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα pH=7,44 παρουσία CAGE 1:1.



Γράφημα 3: Γραφική αναπαράσταση της συγκέντρωσης της διαλυτοποιημένης χρυσίνης συναρτήσει των συγκεντρώσεων των υδατικών διαλυμάτων σε CAGE (1:1) . Καμπύλη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE (1:1).

Συνεπώς, η καμπύλη διαλυτότητας της χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE 1:1 έχει τη μορφή:

$$y = 0,0005 * x - 0,0135 \quad R^2 = 0,959 \quad (7)$$

όπου y η συγκέντρωση της διαλυμένης χρυσίνης σε mg/mL και x η συγκέντρωση CAGE 1:1 σε mM.

Η προσαρμογή της καμπύλης είναι αρκετά καλή, όπως φαίνεται από το $R^2 > 0,90$.

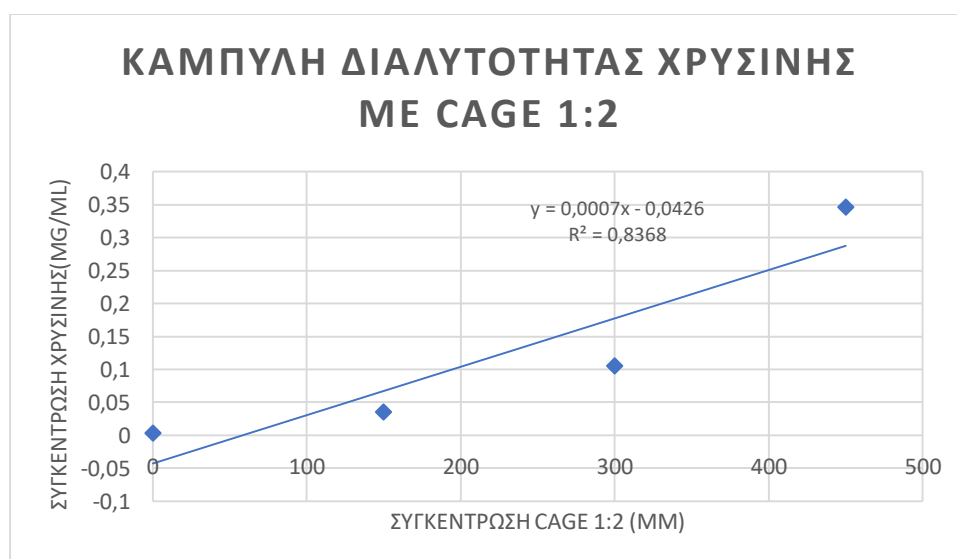
Όπως προαναφέρθηκε, η εξίσωση που προέκυψε υποδεικνύει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του CAGE 1:1 στα δείγματα και της συγκέντρωσης της διαλυτοποιημένης χρυσίνης. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε πως όσο μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε CAGE 1:1 έχει το υδατικό διάλυμα buffer, τόσο αυξάνεται η ικανότητά του να διαλυτοποιεί τη χρυσίνη. Η διαλυτοποίηση της χρυσίνης αναμένεται να οδηγεί σε αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς της.

Στην περίπτωση που συγκριθεί η συγκέντρωση της διαλυτοποιημένης χρυσίνης στο δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 0 mM (βρέθηκε 0,003 mg/mL) με τη συγκέντρωση της διαλυτοποιημένης χρυσίνης στο δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 900 mM, εξάγεται το συμπέρασμα ότι στο 2^ο δείγμα η συγκέντρωση της διαλυτοποιημένης χρυσίνης είναι 134 φορές μεγαλύτερη. Όπως προαναφέρθηκε, το δείγμα 0 mM σε CAGE 1:1 είναι ουσιαστικά μόνο το υδατικό διάλυμα Buffer. Άρα, αποδείχθηκε πως το CAGE 1:1 αυξάνει τη διαλυτότητα της χρυσίνης κατά 134 φορές συγκριτικά με το υδατικό μέσο. Σχετικά με το ποσοστό της διαλυτοποιημένης χρυσίνης, αποδεικνύεται ότι από τα 50mg που προστέθηκαν σε όλα τα δείγματα, η μέγιστη ποσότητα που διαλυτοποιήθηκε (στο δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 900 mM) είναι 0,4032mg, δηλαδή το 0,8% της αρχικής ποσότητας σε χρυσίνη.

3.1.2 Καμπύλη αναφοράς για διαλυτότητα χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE 1:2

Η διαδικασία που ακολουθείται για την κατασκευή της καμπύλης διαλυτότητας της χρυσίνης με CAGE 1:2 είναι ίδια με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω για την καμπύλη διαλυτότητας με CAGE 1:1. Συγκεκριμένα, γίνεται μέτρηση των κατάλληλα αραιωμένων φιλτραρισμένων δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο και καταγράφεται η απορρόφηση στα 270nm. Χρησιμοποιείται η καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης για να μετατραπεί η μετρούμενη απορρόφηση σε συγκέντρωση της διαλυτοποιημένης χρυσίνης στα δείγματα, σε μονάδες συγκέντρωσης mg/mL.

Η καμπύλη διαλυτότητας της χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα buffer pH=7,44 παρουσία CAGE 1:2, όπως προκύπτει μετά από τους απαραίτητους υπολογισμούς, είναι η ακόλουθη:



Γράφημα 4: Γραφική αναπαράσταση της συγκέντρωσης της διαλυτοποιημένης χρυσίνης συναρτήσει των συγκεντρώσεων των υδατικών διαλυμάτων σε CAGE (1:2). Καμπύλη διαλυτότητας χρυσίνης με CAGE (1:2).

Συνεπώς, η καμπύλη διαλυτότητας της χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE 1:2 έχει τη μορφή:

$$y = 0,0007 * x - 0,0426 \quad R^2 = 0,8368 \quad (8)$$

όπου y η συγκέντρωση της διαλυμένης χρυσίνης σε mg/mL και x η συγκέντρωση του CAGE 1:2 σε mM στο εκάστοτε δείγμα.

Η προσαρμογή της εξίσωσης στην καμπύλη θεωρείται μέτρια αλλά εντός των αποδεκτών ορίων για τη συγκεκριμένη έρευνα. Αποδεικνύεται η γραμμική σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωση του CAGE 1:2 και στη συγκέντρωση της χρυσίνης που διαλυτοποιείται. Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε CAGE 1:2 τόσο αυξάνεται και η διαλυτότητα της χρυσίνης. Το συμπέρασμα αυτό είναι αρκετά ενθαρρυντικό, καθώς η αύξηση της διαλυτότητας της χρυσίνης που επιτεύχθηκε αναμένεται να αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητά της. Επομένως, το

CAGE 1:2 αποτελεί και αυτό υποψήφιο φορέα για τη χορήγηση της χρυσίνης στον ανθρώπινο οργανισμό.

Αξίζει να γίνει μια σύγκριση ανάμεσα στα δείγματα με συγκεντρώσεις CAGE 1:2 0 mM (βρέθηκε 0,003 mg/mL) (ουσιαστικά υδατικό διάλυμα) και 900 mM. Η συγκέντρωση της διαλυτοποιημένης χρυσίνης στο δεύτερο δείγμα βρέθηκε 192 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το υδατικό διάλυμα. Σχετικά με το ποσοστό της διαλυτοποιημένης χρυσίνης αποδεικνύεται ότι από τα 50mg που προστέθηκαν σε όλα τα δείγματα, η μέγιστη ποσότητα που διαλυτοποιήθηκε (στο δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:2 900mM) είναι 0,58mg, δηλαδή το 1,16% της αρχικής ποσότητας σε χρυσίνη.

3.1.3 Συμπεράσματα Διαδικασίας

Γενικά, για να μπορεί να αξιοποιηθεί η χρυσίνη για βιολογική χρήση πρέπει η συγκέντρωσή της σε υδατικό μέσο να είναι της τάξης των μM . Από τις μετρήσεις φαίνεται πως η χρυσίνη είναι αρχικά αδιάλυτη σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με $\text{pH}=7,44$ και μετά από επώαση δύο ημερών στους 37°C , δηλαδή σε συνθήκες που προσομοιάζουν του ανθρώπινου οργανισμού. Αυτό αποδεικνύει για ακόμη μία φορά πως η χρυσίνη είναι μη βιοδιαθέσιμη και ο ανθρώπινος οργανισμός δε δύναται να αξιοποιήσει τις ευεργετικές της ιδιότητες. Παρόλα αυτά, με την προσθήκη CAGE (1:1) και CAGE (1:2) η υδατοδιαλυτότητα της χρυσίνης αυξάνεται και μάλιστα φτάνει τα $0,59 \frac{\text{mg χρυσίνης}}{\text{mL ρυθμιστικού δ/τος}}$ στην περίπτωση του CAGE (1:2) όταν η περιεκτικότητα σε CAGE (1:2) είναι $0,24 \frac{\% \text{CAGE}}{\text{mL ρυθμιστικού δ/τος}}$ (900mM). Η υδατοδιαλυτότητα της, δηλαδή, μπορεί να αυξηθεί κατά τουλάχιστον 192 φορές για τη συγκεκριμένη περιεκτικότητα CAGE (1:2). Αυτό σημαίνει ότι η χρυσίνη βρίσκεται σε συγκέντρωση της επιθυμητής, πλέον, τάξης μεγέθους και μπορεί να αξιοποιηθεί για βιολογική δραστηριότητα από τον οργανισμό.

Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι τα CAGE (1:1) και CAGE (1:2) είναι ικανά να αυξήσουν την υδατοδιαλυτότητα και κατά συνέπεια, τη βιοδιαθεσιμότητα της χρυσίνης σε ενδεχόμενη χρήση στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό το εύρημα είναι πολύ σημαντικό, καθώς καθιστά την χρυσίνη δυνητικά βιοδιαθέσιμη και τις φαρμακευτικές της ιδιότητες αξιοποιήσιμες για την καταπολέμηση ασθενειών.

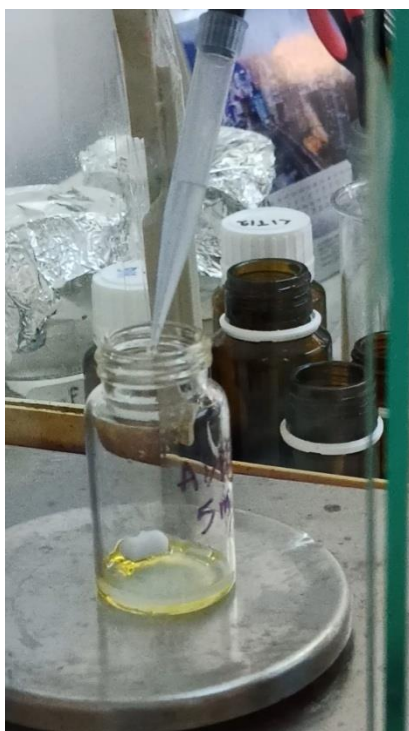
Τα CAGE (1:1) και CAGE (1:2) σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν είναι τοξικά, αλλά είναι αντιμικροβιακά. Βέβαια σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι κυτταροτοξικά.^[60] Επομένως, είναι δυνατός ο συνδυασμός της χρυσίνης με τα CAGE (1:1) και CAGE (1:2), ώστε να στοχεύουν συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα και να τα θανατώνουν με την υψηλή αντιοξειδωτική και αντικαρκινική τους δράση.

Αξίζει όμως να παρατηρηθεί ότι η διαλυτότητα της χρυσίνης στο υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE (1:2) είναι αρκετά μεγαλύτερη από τη διαλυτότητά της στο υδατικό διάλυμα παρουσία

CAGE (1:1). Για αυτό ίσως με τη μέχρι τώρα μελέτη το ιδανικότερο μέσο χορήγησης να είναι το CAGE (1:2). Όμως, αυτό θα διαπιστωθεί και από περαιτέρω μελέτες.

3.2 Σχηματισμός μικκυλίων CAGE 1:1 και CAGE 1:2 και εγκλεισμός χρυσίνης σε αυτά

Για τη μελέτη εγκλεισμού της χρυσίνης στα CAGE (1:1) και CAGE (1:2) δημιουργούνται δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (drug loadings) σε χρυσίνη. Για το CAGE (1:1) δημιουργούνται δείγματα 3 συγκεντρώσεων (1mg/g, 5mg/g, 20mg/g), ενώ για το CAGE (1:2) δημιουργούνται δείγματα 2 συγκεντρώσεων, των δύο ακραίων τιμών 1mg/g και 20mg/g. Για τη δημιουργία των εγκλεισμών αρχικά προστίθεται υπερκάθαρο νερό στο εκάστοτε σύστημα χρυσίνης-CAGE. Κατά την πρώτη επαφή του CAGE με το νερό παρατηρείται μια θολερότητα που πιθανό να οφείλεται στη δημιουργία λαμέλων (lamellar phase)(Εικόνα 29).^[36] Οι λαμέλες είναι το πρώτο στάδιο της διαδικασίας δημιουργίας μικκυλίων. Τα μικκύλια (micellar phase) σχηματίζονται όταν η περιεκτικότητα του νερού στο σύστημα υπερβεί μια κρίσιμη τιμή (66% για το CAGE 1:2).^{[31][36]} Τα συστήματα των μικκυλίων έπειτα υφίστανται 48ωρη ανάδευση στο σκοτάδι ώστε να ολοκληρωθεί ο εγκλεισμός.



Εικόνα 29: Οπτική παρατήρηση της προσθήκης υπερκάθαρου νερού σε σύστημα CAGE 1:1-χρυσίνης. Η θολερότητα υποδεικνύει το σχηματισμό λαμέλων.

3.3 Απόδοση εγκλεισμού χρυσίνης σε CAGE 1:1 και CAGE 1:2 με μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis

Όπως προαναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος, η ανάλυση των δειγμάτων για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού έγινε με δύο μεθόδους: (α) με μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 270nm στο φασματοφωτόμετρο και (β) με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Οπτικά παρατηρείται ότι υπάρχει, μια θολερότητα σε όλα τα δείγματα εγκλεισμών, εκτός από τον εγκλεισμό συγκέντρωσης 1mg/g. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρότερο βαθμό φόρτωσης του συστήματος σε χρυσίνη. Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται οι αποδόσεις εγκλεισμού της χρυσίνης στο CAGE (1:1) και CAGE (1:2).

Πίνακας 8: Αποδόσεις εγκλεισμού για τα δείγματα εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1

CAGE 1:1	
Συγκέντρωση εγκλεισμού	Απόδοση εγκλεισμού (%)
1mg/g	33,0±3,5
5mg/g	66,9±4,6
20mg/g	89,4±2,9

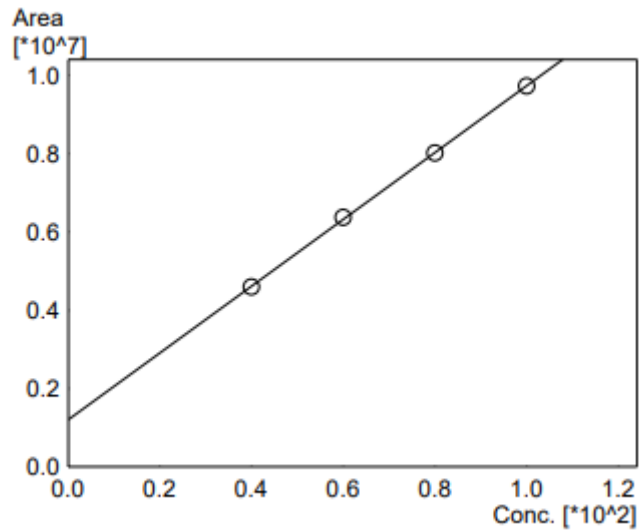
Πίνακας 9: Αποδόσεις εγκλεισμού για τα δείγματα εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:2

CAGE 1:2	
Συγκέντρωση εγκλεισμού	Απόδοση εγκλεισμού (%)
1mg/g	32,0±3,6
20mg/g	27,0±4,7

Φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα πως ο εγκλεισμός της χρυσίνης στο CAGE 1:1 εμφανίζει ικανοποιητικές αποδόσεις στα περισσότερα δείγματα, ενώ ο εγκλεισμός της χρυσίνης στο CAGE 1:2 δεν δίνει υψηλές τιμές απόδοσης. Στο CAGE 1:1 παρατηρείται ότι η αύξηση του drug loading συνεπάγεται αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού, ενώ στο CAGE 1:2 παρατηρείται μικρή μείωση.

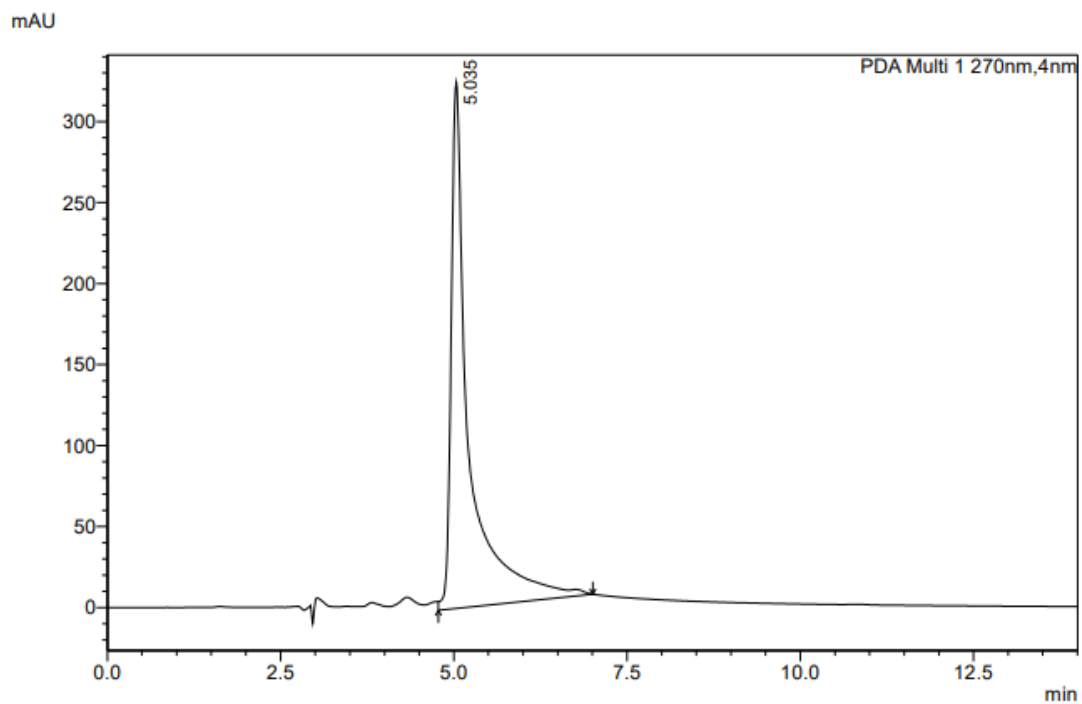
3.4 Απόδοση εγκλεισμού χρυσίνης σε CAGE 1:1 με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Όπως είχε αναφερθεί στο πειραματικό μέρος (Παράγραφος 2.9), για να μετρηθεί η συγκέντρωση της εγκλεισμένης χρυσίνης στα δείγματα με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας, απαιτείται η δημιουργία καμπύλης αναφοράς. Κάνοντας τις προαναφερθείσες αραιώσεις της χρυσίνης (Παράγραφος 2.9) προκύπτει το ακόλουθο διάγραμμα που απεικονίζει την καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης στην HPLC.



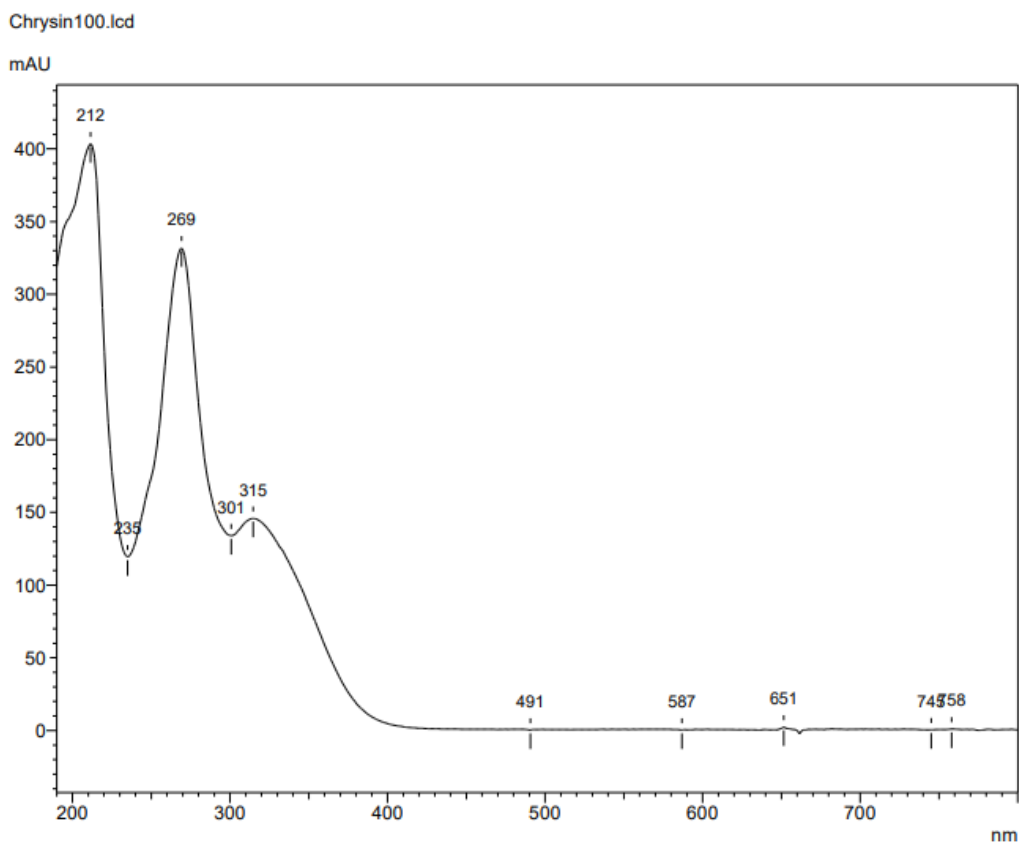
Γράφημα 5: Καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης στην HPLC

Το αρχικό Stock της χρυσίνης μετρήθηκε με τη μέθοδο HPLC και προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα.



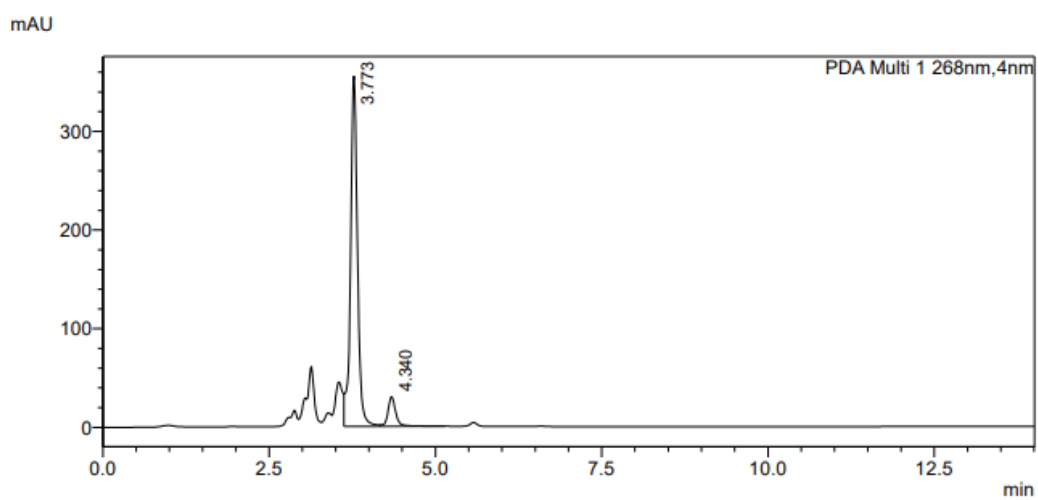
Γράφημα 6: Χρωματογράφημα της χρυσίνης από τη στήλη της HPLC

Από το παραπάνω διάγραμμα λαμβάνεται η πληροφορία ότι ο χρόνος έκλουσης της χρυσίνης στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι περίπου 4 λεπτά. Επίσης, έχει ληφθεί και το UV διάγραμμα του αρχικού Stock χρυσίνης όπως το μετρά η μέθοδος HPLC.

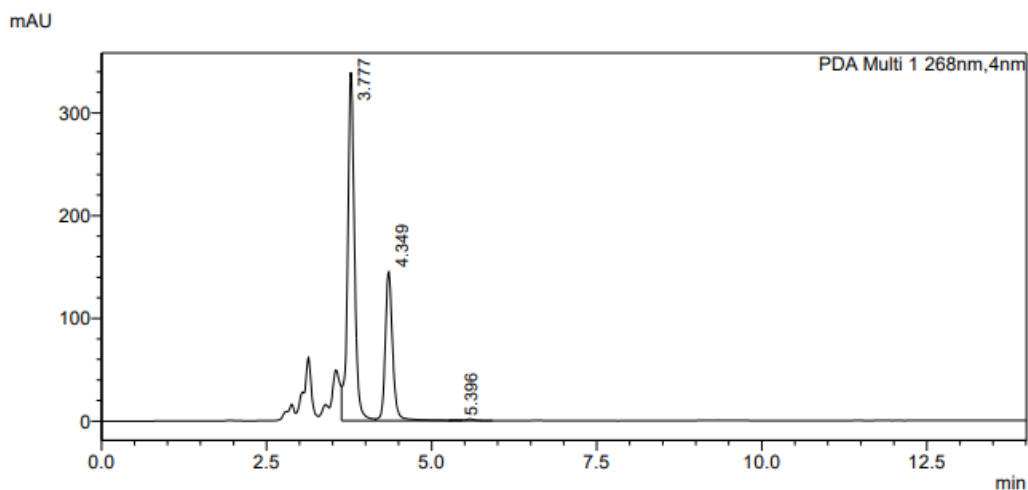


Γράφημα 7: Γραφική απεικόνιση της απορρόφησης της καθαρής χρυσίνης σε φάσμα UV από συσκευή της HPLC

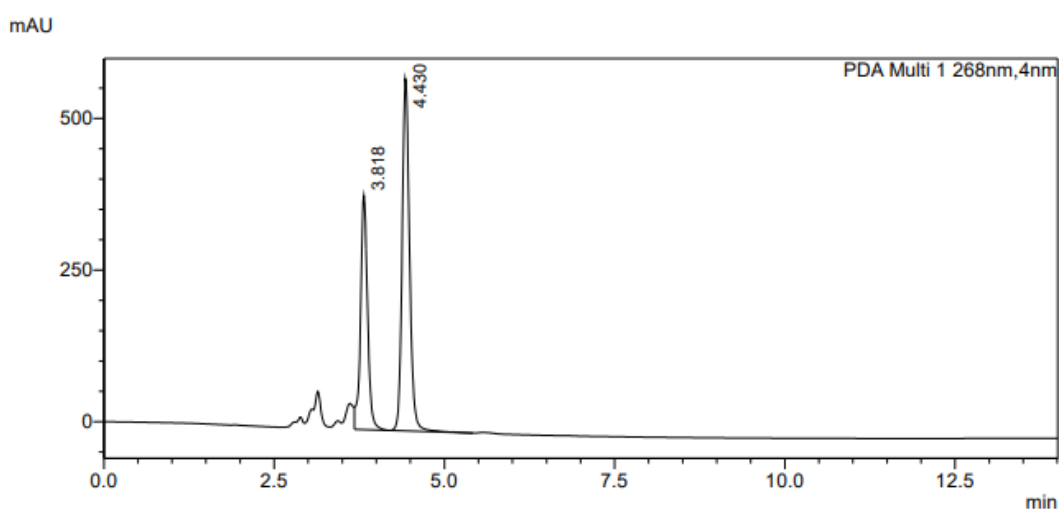
Με τη μέθοδο της HPLC αναλύονται οι εγκλεισμοί της χρυσίνης σε CAGE 1:1 με συγκεντρώσεις 1mg/g, 5mg/g, 20mg/g. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Γράφημα 8:Χρωματογράφημα εγκλεισμού συγκέντρωσης 1mg/g



Γράφημα 9:Χρωματογράφημα εγκλεισμού συγκέντρωσης 5mg/g



Γράφημα 10 :Χρωματογράφημα εγκλεισμού συγκέντρωσης 20mg/g

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται κοντά στα 4 λεπτά να αναγνωρίζεται η ένωση της χρυσίνης, ενώ μικρότερες προηγούμενες κορυφές πιθανότατα να αποτυπώνουν την ύπαρξη ελάχιστων μικκυλίων CAGE 1:1-νερού που διαπέρασαν το φίλτρο κατά την προετοιμασία του δείγματος, ή άλλων προσμίξεων.

Η μέθοδος της HPLC χρησιμοποιεί την καμπύλη αναφοράς που δημιουργήθηκε για να υπολογίσει τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε χρυσίνη. Με βάση την υπολογιζόμενη συγκέντρωση και λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις που έχουν γίνει, υπολογίζεται η απόδοση εγκλεισμού για τα τρία δείγματα εγκλεισμών.

Πίνακας 10: Απόδοση εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 με τη μέθοδο HPLC

CAGE 1:1	
Συγκέντρωση εγκλεισμού	Απόδοση εγκλεισμού (%)
1mg/g	27,0
5mg/g	47,0
20mg/g	46,0

Παρατηρείται ότι οι αποδόσεις είναι αρκετά χαμηλές και όχι ικανοποιητικές. Παρατηρείται βέβαια ότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (drug loadings) η απόδοση εγκλεισμού αυξάνεται.

3.5 Διαφορά στις αποδόσεις εγκλεισμού με τις μεθόδους φασματοσκοπίας και υγρής χρωματογραφίας

Από την παραπάνω ανάλυση είναι ξεκάθαρο ότι η απόδοση εγκλεισμού που προκύπτει από τη μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων μέσω της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού είναι διαφορετική από την απόδοση εγκλεισμού που υπολογίζεται από τη συγκέντρωση χρυσίνης που προσδιορίζει η μέθοδος HPLC για κάθε δείγμα. Το σφάλμα ανάμεσα στις αποδόσεις για κάθε δείγμα με τη χρήση των δύο μεθόδων είναι αρκετά υψηλό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 11: Συγκριτική αποτύπωση των αποδόσεων εγκλεισμού για ίδια δείγματα με τις μεθόδους UV-Vis και HPLC.

CAGE 1:1			
Συγκέντρωση εγκλεισμού	Απόδοση εγκλεισμού (%) UV-Vis	Απόδοση εγκλεισμού (%) HPLC	Σφάλμα (%)
1mg/g	33,0	27,0	18
5mg/g	66,9	47,0	29
20mg/g	89,4	46,0	48

Το σφάλμα στα αποτελέσματα των δύο μεθόδων δεν είναι αμελητέο. Αν και οι δύο μέθοδοι έχουν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους, θα θεωρηθούν ακριβέστερα τα αποτελέσματα της μεθόδου HPLC. Όπως προαναφέρθηκε, κατά την προετοιμασία των δειγμάτων διαπερνούν το φίλτρο κάποια μικκύλια CAGE 1:1-νερού, τα οποία απορροφούν και αυτά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος στη μέθοδο UV-Vis. Ο ανιχνευτής του μηχανήματος UV-Vis δε διαχωρίζει το σύστημα των μικκυλίων από τη σκέτη χρυσίνη με αποτέλεσμα να παρουσιάζει μια νέα απορρόφηση όλου του συστήματος. Στη μέθοδο HPLC, διαχωρίζονται τα μικκύλια από την καθαρή χρυσίνη στη χρωματογραφική στήλη (για αυτό εμφανίζονται και διαφορετικοί χρόνοι έκλουσης).

3.5.1 Συμπεράσματα διαδικασίας

Σε προηγούμενη μελέτη (Παράγραφος 3.1) αποδείχθηκε η αύξηση της διαλυτότητας της χρυσίνης με τη χρήση των πράσινων διαλυτών CAGE 1:1 και CAGE 1:2. Αυτό ήταν αρκετά σημαντικό βήμα για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς της και ανοίγει το δρόμο για την περαιτέρω μελέτη τέτοιων συστημάτων. Το επόμενο βήμα είναι η προσπάθεια εγκλεισμού της χρυσίνης στα μικκύλια που δημιουργεί το CAGE με το νερό, ώστε να επιτευχθεί η διαδερμική χορήγησή της στον ανθρώπινο οργανισμό. Η μελέτη της απόδοσης εγκλεισμού

είναι καθοριστική για το αν μια φαρμακευτική δραστική ουσία μπορεί να μεταφερθεί επιτυχώς από ένα σύστημα μεταφοράς και σε επόμενο στάδιο να γίνει μελέτη αποδέσμευσής της. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δεν καθίσταται ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, καθώς οι αποδόσεις εγκλεισμού σε αρκετά δείγματα είναι χαμηλές (<70%), ενώ κρίνονται μη επαναλήψιμες.

3.6 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων με τη μέθοδο DLS

Είναι γνωστό πως το CAGE 1:1 και το CAGE 1:2 σχηματίζουν μικκύλια στην νανοκλίμακα. [36] Εδώ, μελετώνται οι διασπορές των μικκυλίων των δύο αυτών διαλυτών, καθώς και των συστημάτων εγκλεισμού της χρυσίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (drug loadings) ως προς τη σταθερότητά τους, την ομοιομορφία τους και το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Συγκεκριμένα, το μέγεθος μετράται με τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου, η ομοιομορφία στην κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων με τον προσδιορισμό του δείκτη πολυδιασποράς PDI και η σταθερότητα του συστήματος μέσω του ζ-δυναμικού. Οι μέσες τιμές των παραπάνω μεγεθών μαζί με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις για κάθε δείγμα εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα του DLS για τα δείγματα εγκλεισμών

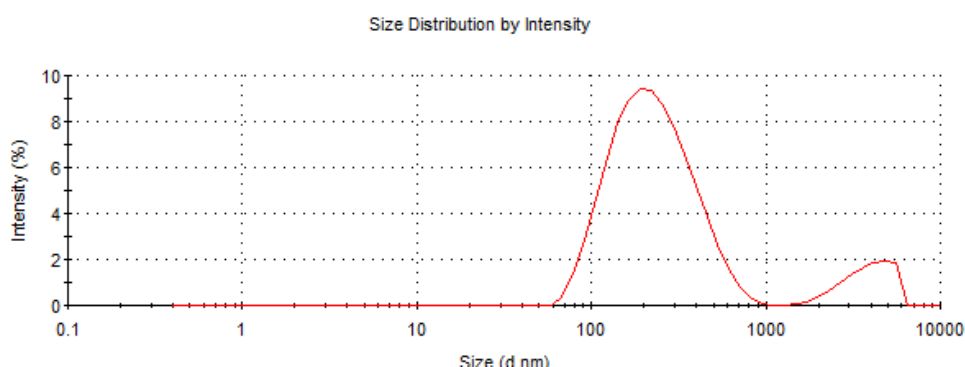
Δείγμα	Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	Z-δυναμικό (mV)
CAGE 1:1	406,5±25,5	0,425±0,030	-43,8±9,7
CAGE 1:2	202,0±6,0	0,334±0,006	-37,3±1,4
Εγκλεισμός με CAGE 1:1 1mg/g	333,8±57,5	0,798±0,170	14,3±1,5
Εγκλεισμός με CAGE 1:1 5mg/g	1256,0 ±921,0	0,980 ±0,020	25,3±8,7
Εγκλεισμός με CAGE 1:1 20mg/g	1003,5±115,0	0,660±0,040	-33,8±1,3
Εγκλεισμός με CAGE 1:2 1mg/g	231,7±7,9	0,301±0,010	19,4±2,9
Εγκλεισμός με CAGE 1:2 20mg/g	1176,0 ±178,0	0,656±0,050	-38,3±2,7

Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου που είναι κοντά στα 1000nm και κυρίως <1000nm υποδεικνύουν ότι όντως τα σωματίδια ανήκουν στην νανοκλίμακα. Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) δείχνει την κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Ιδανικά θα

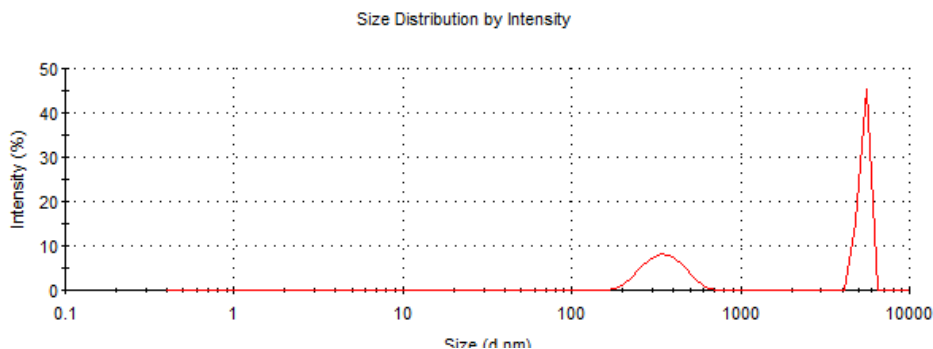
έπρεπε τα συστήματα να έχουν κατανομή Gauss. Αυτό επιτυγχάνεται με έναν δείκτη πολυδιασποράς $<0,2$. Όμως, μια μέτρια προς καλή κατανομή εμφανίζουν και τα δείγματα όπου ο δείκτης πολυδιασποράς είναι $<0,4$. Όταν τα νανοσωματίδια διασπείρονται σε ένα υγρό μέσο, τότε αποκτούν θετικό ή αρνητικό φορτίο ανάλογα με το φορτίο των ομάδων του σωματιδίου και των προσροφημένων ιόντων του μέσου διασποράς. Σε αυτό το πλαίσιο ορίζεται το ζ-δυναμικό. Όσο μεγαλύτερη η κατ' απόλυτο τιμή του ζ-δυναμικού μιας διασποράς σωματιδίων, τόσο μεγαλύτερες είναι οι απώσεις που δημιουργούνται μεταξύ των σωματιδίων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η τάση για συσσωμάτωση, διατηρώντας την ομοιομορφία και το μέγεθος των σωματιδίων. Επομένως, το ζ-δυναμικό αποτελεί μέτρο της σταθερότητας του συστήματος σωματιδίων και μέσου διασποράς. Τιμές ζ-δυναμικού μεγαλύτερες από 30mV, κατά απόλυτη τιμή, δηλώνουν σταθερές διασπορές. Στα δείγματα εγκλεισμών που περιλαμβάνουν και CAGE και χρυσίνη είναι ενδιαφέρον να παρατηρηθεί η αλλαγή του προσήμου του ζ-δυναμικού, καθώς δείχνει την πορεία του εγκλεισμού στα μικκύλια.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι τα συστήματα βρίσκονται στη νανοκλίμακα αφού οι περισσότερες ο υδροδυναμικές διάμετροι είναι κοντά στα 1000 nm. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι στα συστήματα με CAGE 1:2, το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι αρκετά μικρότερο συγκριτικά με τα συστήματα του CAGE 1:1. Επιπροσθέτως, όσο μεγαλύτερη είναι η φόρτωση του συστήματος και των δύο CAGE με χρυσίνη, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση (drug loading) του εγκλεισμού σε χρυσίνη, τόσο αυξάνεται το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Το μέγεθος των σωματιδίων που έχουν εγκλεισμένη χρυσίνη έχει αυξηθεί αρκετά σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα CAGE (χωρίς εγκλεισμένη χρυσίνη) και αυτό αποτελεί μία ένδειξη ότι έχει εγκλειστεί βιοδραστική ουσία σε αυτά.

Ο δείκτης πολυδιασποράς των συστημάτων με CAGE 1:2 είναι στα επιθυμητά όρια για μέτρια προς καλή διασπορά, ενώ τα συστήματα με CAGE 1:1 δεν έχουν καλή ομοιομορφία στην κατανομή των μεγεθών των νανοσωματιδίων τους.



Γράφημα 11: Μία εκ των επιμέρους σαρώσεων DLS για το μέγεθος των σωματιδίων του εγκλεισμού με CAGE 1:2 και συγκέντρωση 1mg/g (εμφανής η καλή ομοιομορφία)

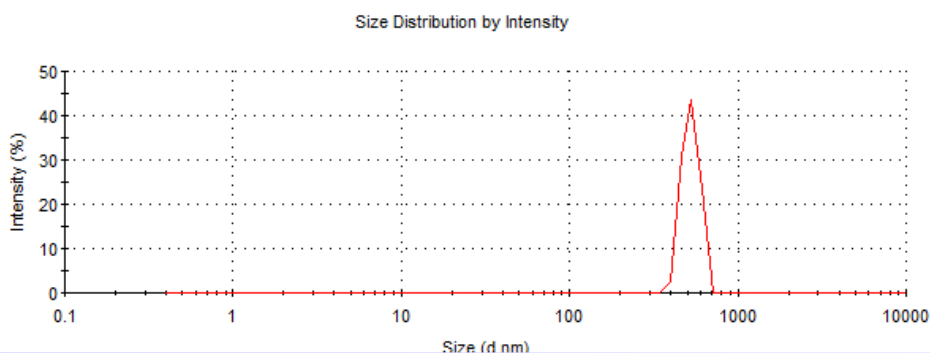


Γράφημα 12:Μία εκ των επιμέρους σαρώσεων DLS για το μέγεθος των σωματιδίων του εγκλεισμού με CAGE 1:1 και συγκέντρωση 5mg/g (εμφανής η κακή ομοιομορφία)

Όσα δείγματα εμφανίζουν χαμηλό δείκτη πολυδιασποράς θεωρείται ότι τείνουν στα όρια της μονοδιασποράς.

Όσον αφορά στο ζ-δυναμικό των δειγμάτων, τα περισσότερα δείγματα εμφανίζουν απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού κοντά στα 30mV, γεγονός αρκετά ενθαρρυντικό. Σχεδόν όλες οι διασπορές είναι αρκετά σταθερές και δύσκολα εμφανίζουν συσσωματώματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα από αυτά τα δείγματα (και ειδικά τα δείγματα εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:1) είχαν παραμείνει σε συνθήκες συντήρησης για αρκετό καιρό (1 μήνα περίπου) πριν το χαρακτηρισμό τους με τη μέθοδο DLS. Για το σκοπό αυτό, πριν τη μέτρησή τους, εισάγονται σε λουτρό υπερήχων για 10min, προκειμένου να «σπάσουν» τυχόν συσσωματώματα που έχουν σχηματιστεί με την πάροδο του χρόνου.

Το πρόσημο του ζ-δυναμικού των δειγμάτων αξίζει να αναλυθεί περαιτέρω. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, τα δείγματα CAGE χωρίς χρυσίνη έχουν αρνητικό πρόσημο στο ζ-δυναμικό τους. Για τους εγκλεισμούς όμως συμβαίνει το εξής παράδοξο: οι εγκλεισμοί με CAGE 1:1 και με CAGE 1:2 με συγκέντρωση 1mg/g και ο εγκλεισμός με CAGE 1:1 συγκέντρωσης 5mg/g, εμφανίζουν θετικό πρόσημο στο ζ-δυναμικό τους, ενώ οι υπόλοιποι εγκλεισμοί εμφανίζουν αρνητικό πρόσημο, όπως και τα δείγματα CAGE απουσία χρυσίνης. Πιθανότατα στα δείγματα με θετικό πρόσημο ζ-δυναμικού, η χρυσίνη να έχει βγει έξω από τα μικκύλια του CAGE και να τα έχει επικαλύψει, όντας προσροφημένη σε αυτά.



Γράφημα 13 :Μία εκ των επιμέρους σαρώσεων DLS για το ζ-δυναμικό των σωματιδίων του εγκλεισμού με CAGE 1:2 και συγκέντρωση 20mg/g.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων με τη μέθοδο DLS επιβεβαιώνουν τις μέχρι τώρα διεξαχθείσες μελέτες και κρίνονται ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για την περαιτέρω μελέτη τέτοιων συστημάτων. Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι συγκριτικά μεταξύ των συστημάτων εγκλεισμών των δύο CAGE, το CAGE 1:2 παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα και από άποψη μεγέθους νανοσωματιδίων αλλά και από την πλευρά της σταθερότητας των συστημάτων.

3.7 Χαρακτηρισμός σωματιδίων με τη μέθοδο NTA

Μέσω της Ανάλυσης Παρακολούθησης Νανοσωματιδίων (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) προσδιορίζεται η μέση υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων, μέγεθος απαραίτητο για την εκτίμηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Επιπλέον, η μέθοδος υπολογίζει την τιμή της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων. Όμως, το σημαντικότερο είναι ότι απεικονίζεται η κίνηση των σωματιδίων και η πυκνότητά τους σε πραγματικό χρόνο. Η κίνηση που εκτελούν τα σωματίδια ονομάζεται κίνηση Brown. Τα διαγράμματα που προκύπτουν με την εφαρμογή της μεθόδου απεικονίζουν την συγκέντρωση των σωματιδίων σε συνάρτηση με το μέγεθός τους.

Στη συγκεκριμένη μελέτη έχουν χαρακτηριστεί, εκτός από τα δείγματα CAGE χωρίς βιοδραστική ένωση, οι εγκλεισμοί της χρυσίνης σε CAGE, αλλά και δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων από τη μελέτη διαλυτότητας. Τα τελευταία μελετήθηκαν για να βρεθεί αν σχηματίζονται μικκύλια στα συγκεκριμένα δείγματα και αν με την αύξηση της συγκέντρωσης σε CAGE υπάρχει μεταβολή στο πλήθος ή στο μέγεθος των σωματιδίων.

Παρακάτω θα αναλυθεί κάθε δείγμα ξεχωριστά.

3.7.1 Μελέτη του δείγματος CAGE 1:1

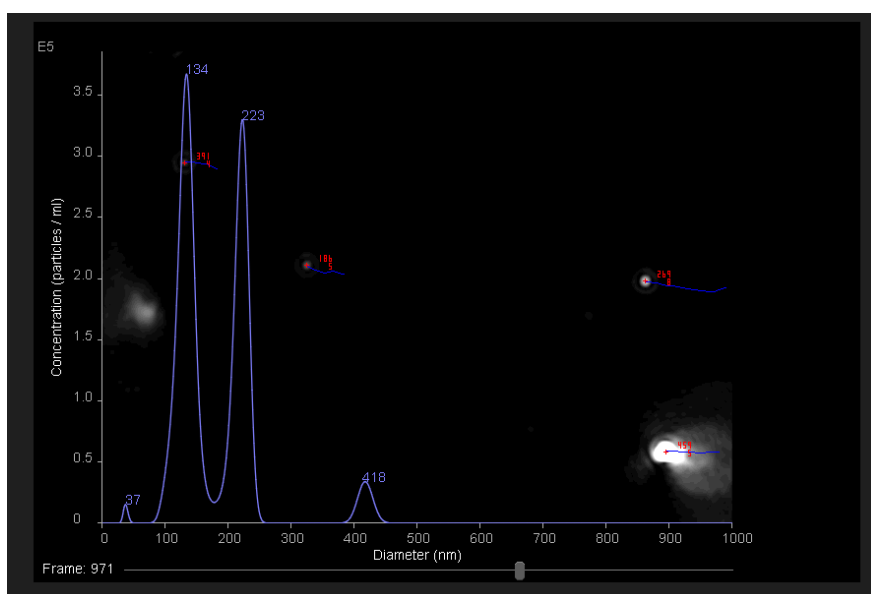
Το δείγμα CAGE 1:1 (χωρίς εγκλεισμένη χρυσίνη) αραιώνεται με υπερκάρθαρο νερό στην αναλογία που αναφέρεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος (Παράγραφος 2.11.2). Λαμβάνονται διαγράμματα συγκέντρωσης – μεγέθους, βίντεο με την κίνηση Brown των σωματιδίων, καθώς και αναλυτική αναφορά με τις τιμές συγκέντρωσης, υδροδυναμικής διαμέτρου, μαζί με τις αντίστοιχες υπολογιζόμενες τυπικές αποκλίσεις. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα μεγέθη που προσδιορίζονται από τη μέθοδο NTA.

Πίνακας 13: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων CAGE 1:1.

Μετρούμενο μέγεθος	Τιμή
Μέση υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων	182,4±4,3nm
Συγκέντρωση σωματιδίων	1,68*10 ⁷ ±0,07*10 ⁷ σωματίδια/mL

Με βάση τις τιμές του παραπάνω πίνακα, τα σωματίδια ανήκουν στην νανοκλίμακα εφόσον η υδροδυναμική διάμετρος είναι <1000nm. Παρατηρείται μάλιστα ότι η τιμή της υδροδυναμικής διαμέτρου είναι εξαιρετικά μικρή (<200nm), γεγονός εξαιρετικά ενθαρρυντικό. Το μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι επιθυμητό στις περιπτώσεις που αυτά χρησιμοποιούνται ως νανοφορείς φαρμακευτικής ουσίας για διαδερμική χορήγηση, διότι το μικρό τους μέγεθος εξασφαλίζει την διόδο από την κεράτινη στοιβάδα του δέρματος.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα που προκύπτουν από τις σαρώσεις της μεθόδου. Να σημειωθεί ότι η μέθοδος εκτελεί πολλαπλές σαρώσεις στα δείγματα και τις εμφανίζει κάθε φορά σε πραγματικό χρόνο. Ο χειριστής διαλέγει κάποιες από αυτές προς αποθήκευση. Συνήθως επιλέγονται διαγράμματα που εμφανίζουν κανονικές κατανομές.



Γράφημα 14:Στιγμιαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων CAGE 1:1 και του μεγέθους τους

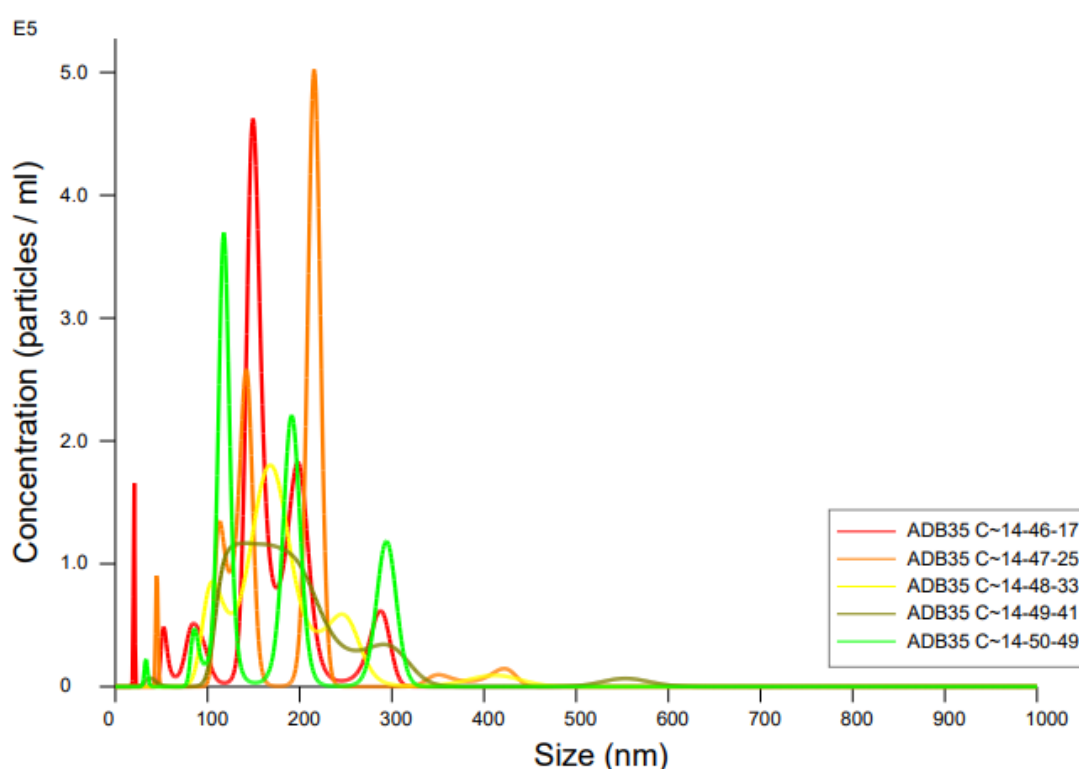


Εικόνα 30:Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων CAGE 1:1

Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζεται η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων συναρτήσει της υδροδυναμικής τους διαμέτρου μια χρονική στιγμή. Στο μαύρο φόντο του γραφήματος

απεικονίζονται με άσπρο χρώμα τα εκάστοτε νανοσωματίδια που τη δεδομένη στιγμή περνούν μπροστά από την κάμερα της συσκευής (frame).

Όπως είναι φανερό από το γράφημα, υπάρχουν στιγμιαία δύο ομάδες νανοσωματιδίων σε υψηλές συγκεντρώσεις που εμφανίζουν κανονική Γκαουσιανή κατανομή και έχουν μικρό μέγεθος (κοντά στα 200nm). Τα νανοσωματίδια που έχουν μεγαλύτερο μέγεθος (κοντά στα 400 nm) είναι χαμηλών συγκεντρώσεων.



Γράφημα 15: Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος CAGE 1:1.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται το σύνολο των σαρώσεων του δείγματος. Ως επί το πλείστον οι συγκεντρώσεις είναι υψηλές σε μικρού μεγέθους σωματίδια, ωστόσο παρατηρείται μεγάλος αριθμός ομάδων σωματιδίων διαφορετικών μεγεθών, που υποδηλώνεται από το μεγάλο πλήθος κορυφών. Σχεδόν μηδενικές είναι οι συγκεντρώσεις για σωματίδια μεγέθους >500nm.

3.7.2 Μελέτη του δείγματος CAGE 1:2

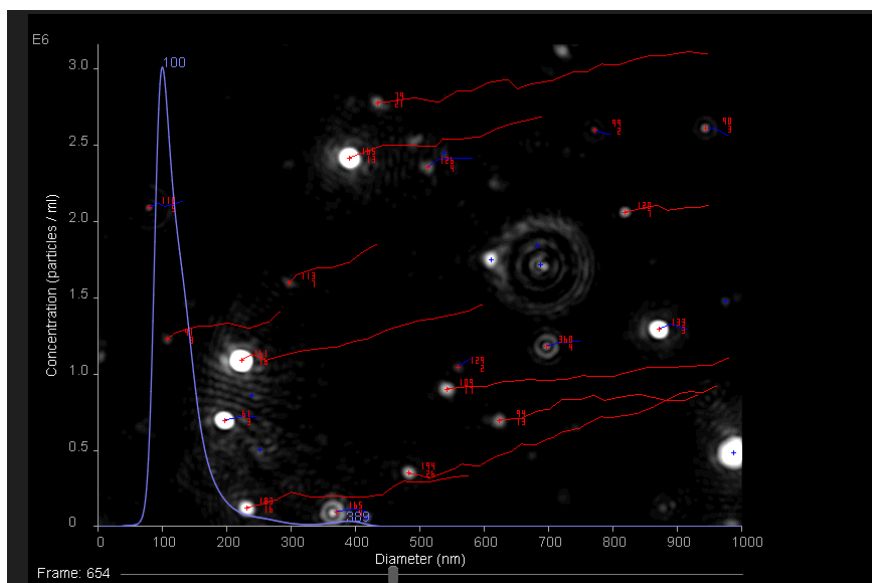
Κατά αντιστοιχία με το CAGE 1:1, μελετάται η διασπορά των μικκυλίων του CAGE 1:2 και προκύπτουν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Πίνακας 14: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων CAGE 1:2.

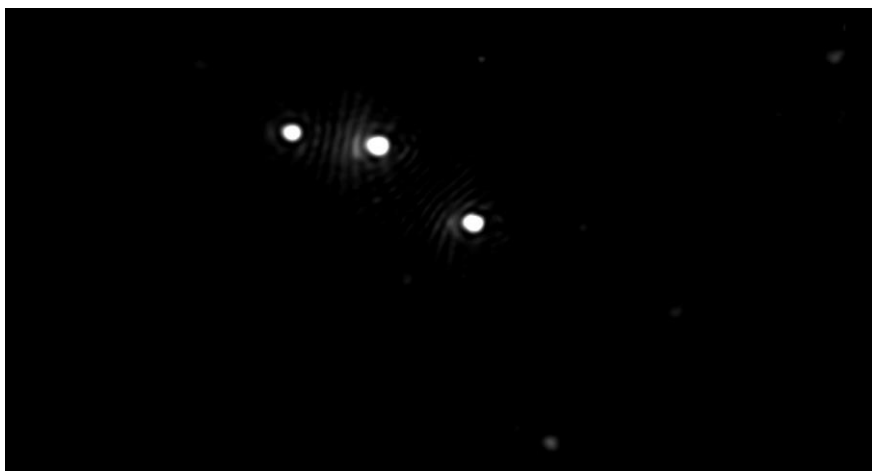
Μετρούμενο μέγεθος	Τιμή
Μέση υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων	123,8±0,4nm
Συγκέντρωση σωματιδίων	1,89*10 ⁸ ± 0,06 * 10 ⁸ σωματίδια/mL

Η μέση υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων είναι αρκετά μικρή και υποδεικνύει την ύπαρξη νανοσωματιδίων (αφού διάμετρος <1000nm). Η απόκλιση είναι μικρότερη από του CAGE 1:1 όπως και το μέγεθος των νανοσωματιδίων.

Η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων είναι μεγαλύτερη από εκείνη του CAGE 1:1.

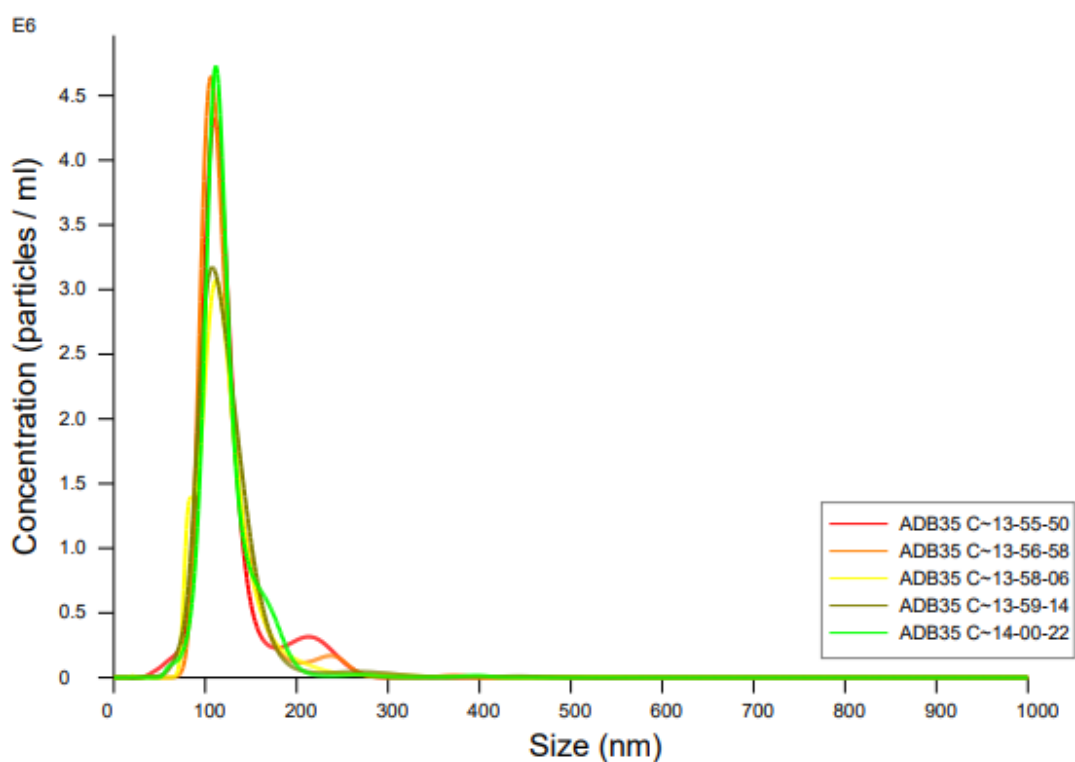


Γράφημα 16:Στιγμαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων CAGE 1:2 και του μεγέθους τους



Εικόνα 31:Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων CAGE 1:2.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι, τη δεδομένη χρονική στιγμή, υπάρχουν νανοσωματίδια μικρού μεγέθους (100nm) σε μεγάλες συγκεντρώσεις και μια πολύ μικρή ομάδα μεγαλύτερων σωματιδίων, σε μηδαμινή συγκέντρωση.



Γράφημα 17: Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος CAGE 1:2.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα από όλες τις σαρώσεις του οργάνου, λαμβάνονται ως επί το πλείστον Γκαουσιανές κατανομές με υψηλές συγκεντρώσεις μικρού μεγέθους νανοσωματιδίων (λίγο παραπάνω από 100nm). Αμελητέα είναι η συγκέντρωση των σωματιδίων με διάμετρο μεγαλύτερη από 300nm. Οι κατανομές αυτές είναι αρκετά καλύτερες από του CAGE 1:1 τόσο στην ομοιομορφία, όσο και στην επαναληψιμότητα. Δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός διαφορετικών «οικογενειών» νανοσωματιδίων, όπως στο CAGE 1:1.

3.7.3 Μελέτη δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 σε συγκέντρωση 5mg/g

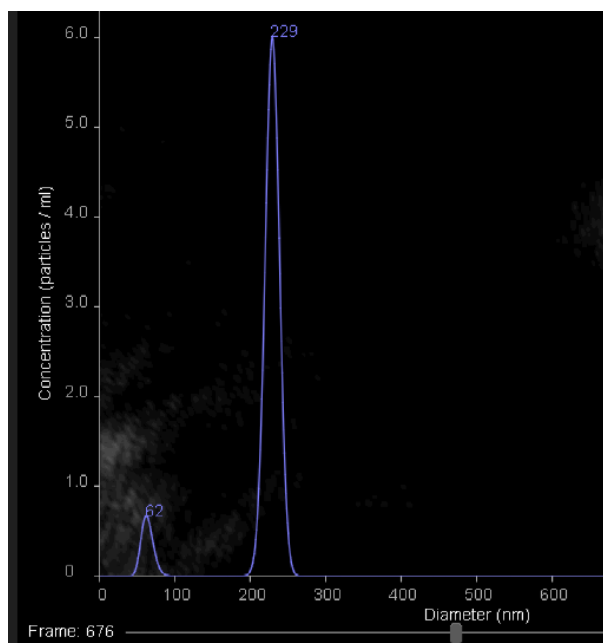
Στον παρακάτω πίνακα περιλαμβάνονται οι μετρήσεις που ελήφθησαν για το δείγμα της εγκλεισμένης χρυσίνης σε CAGE 1:1, σε συγκέντρωση 5mg/g.

Πίνακας 15: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων εγκλεισμού χρυσίνης σε CAGE 1:1 5mg/g.

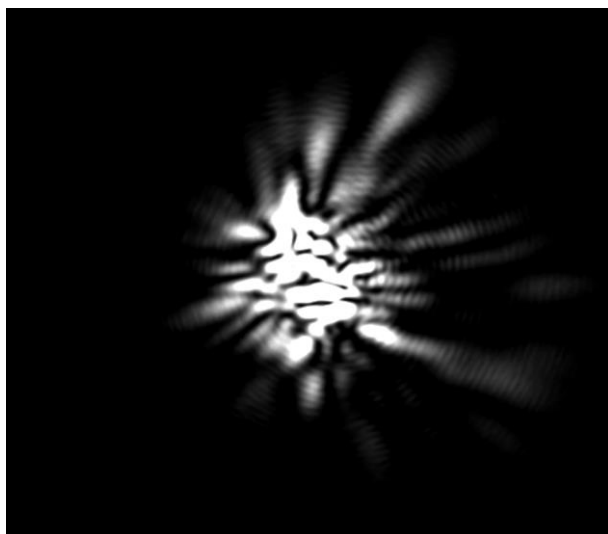
Μετρούμενο μέγεθος	Τιμή
Μέση υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων	171,9±35,7 nm
Συγκέντρωση σωματιδίων	2,64*10 ⁶ ± 0,32 * 10 ⁶ σωματίδια/mL

Από τις τιμές του παραπάνω πίνακα εξάγεται το συμπέρασμα ότι το μέσο μέγεθος των σωματιδίων είναι <1000nm και άρα με ασφάλεια αναφερόμαστε σε νανοσωματίδια. Η μέση υδροδυναμική διάμετρός τους είναι μικρότερη της μέσης διαμέτρου των νανοσωματιδίων του CAGE 1:1 απουσία χρυσίνης. Δεδομένου ότι στα δημιουργούμενα νανοσωματίδια έχει εγκλειστεί ποσότητα χρυσίνης, το μέγεθός τους αναμένεται να είναι μεγαλύτερο από αυτό των «κενών» μικκυλίων του CAGE 1:1. Το παρόν αποτέλεσμα δείχνει ότι όντως έχει εγκλειστεί μικρό ποσοστό χρυσίνης, γεγονός που επαληθεύεται και από τη μελέτη απόδοσης εγκλεισμού που παρουσιάστηκε παραπάνω (Παράγραφος 3.3).

Η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων κρίνεται μέσα στα όρια της επιθυμητής και παρόμοια με την συγκέντρωση των νανοσωματιδίων του CAGE 1:1.

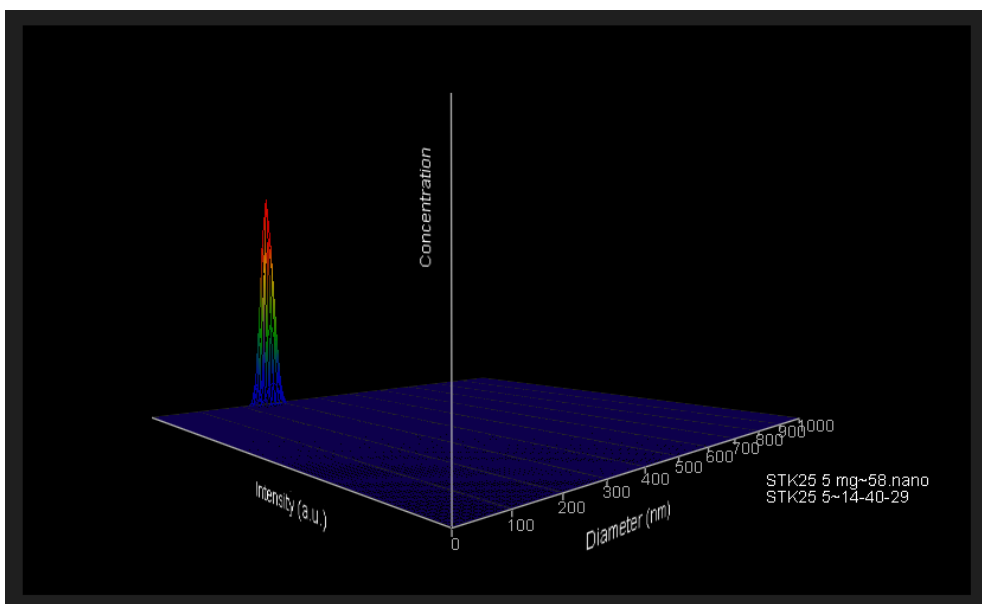


Γράφημα 18:Στιγμαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 5mg/g και του μεγέθους τους

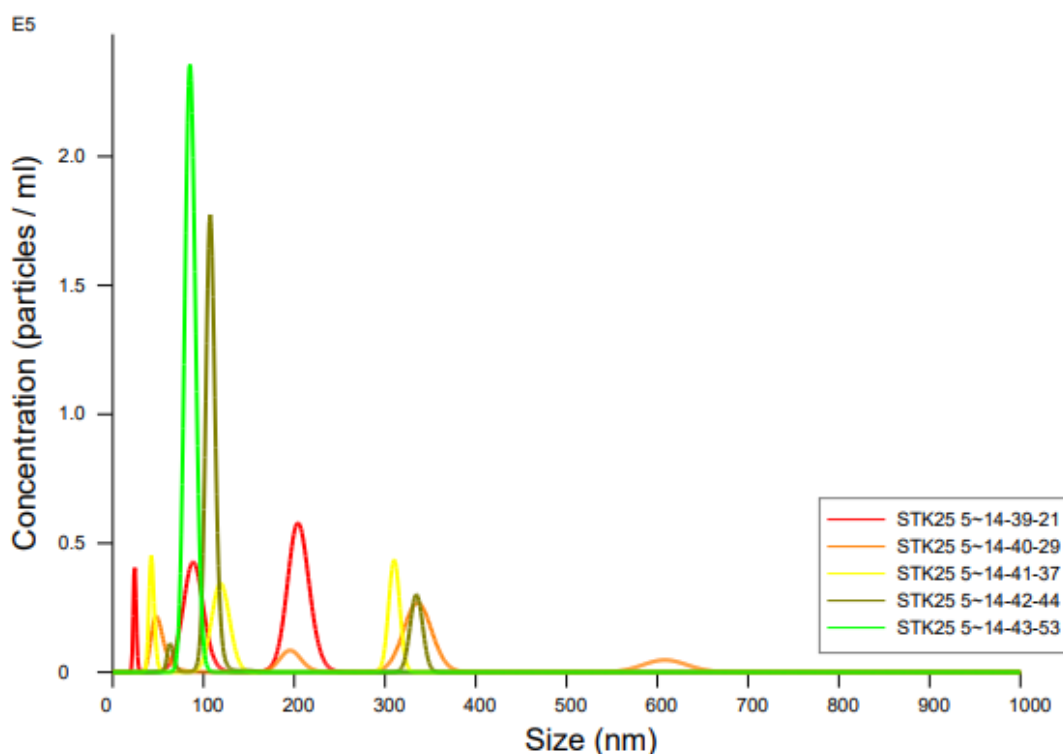


Εικόνα 32:Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 5mg/g.

Από το παραπάνω διάγραμμα είναι φανερό ότι στιγμιαία υπάρχουν κανονικές κατανομές νανοσωματιδίων, μεγέθους 62nm και 229nm, σε χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση αντίστοιχα. Όσον αφορά στο αντίστοιχο στιγμιότυπο οθόνης, το παρατηρούμενο σωματίδιο είναι ογκώδες, γεγονός που αποδίδεται τόσο στην εγκλεισμένη χρυσίνη, όσο και στη χρυσίνη που ενδεχομένως έχει προσροφηθεί στην επιφάνεια του μικκυλίου, εξωτερικά από αυτό.



Γράφημα 19:Στιγμιαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 5mg/g, του μεγέθους τους και της έντασης, σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D).



Γράφημα 20: Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μέγεθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος εγκλεισμού CAGE 1:1 5mg/g.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται το σύνολο των σαρώσεων του δείγματος. Δεν παρατηρείται ομοιομορφία στο μέγεθος, ούτε κρίνεται συνολικά κανονική η κατανομή των νανοσωματιδίων. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές «οικογένειες» σωματιδίων, όπως φαίνεται από τις πολυάριθμες κορυφές. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον άνισο εγκλεισμό της χρυσίνης στα μικκύλια. Κάποια μικκύλια περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα εγκλεισμένης χρυσίνης, ενώ άλλα μικρότερη.

3.7.4 Μελέτη δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 σε συγκέντρωση 1mg/g

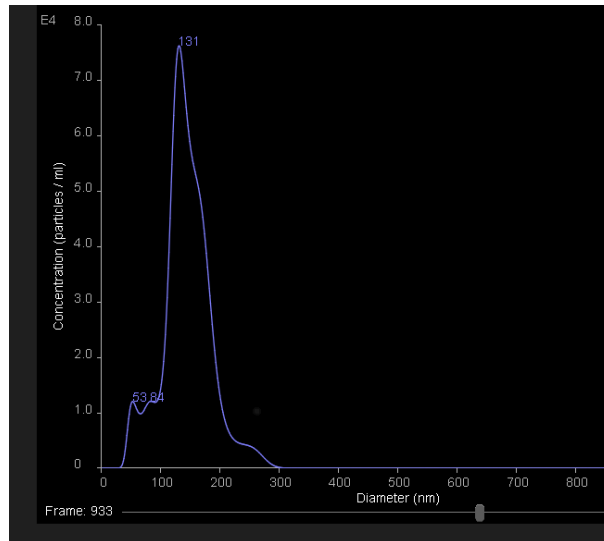
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις που ελήφθησαν για το δείγμα της εγκλεισμένης χρυσίνης σε CAGE 1:1, σε συγκέντρωση 1mg/g.

Πίνακας 16: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων εγκλεισμού χρυσίνης σε CAGE 1:1 1mg/g.

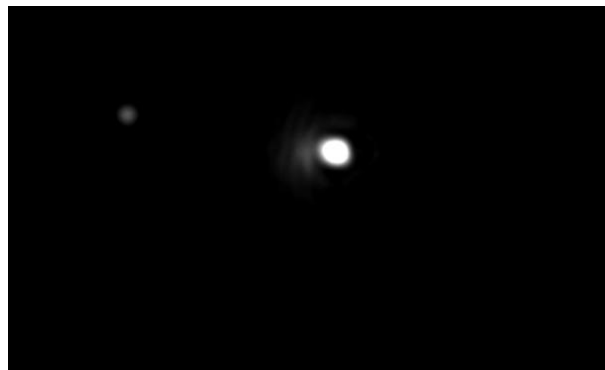
Μετρούμενο μέγεθος	Τιμή
Μέση υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων	180,2±14,2 nm
Συγκέντρωση σωματιδίων	6,03 * 10 ⁶ ± 0,76 * 10 ⁶ σωματίδια/mL

Και σε αυτό το δείγμα το μέγεθος ανήκει στη νανοκλίμακα καθώς η μέση υδροδυναμική διάμετρος είναι <1000nm. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων δε διαφέρει πολύ από το

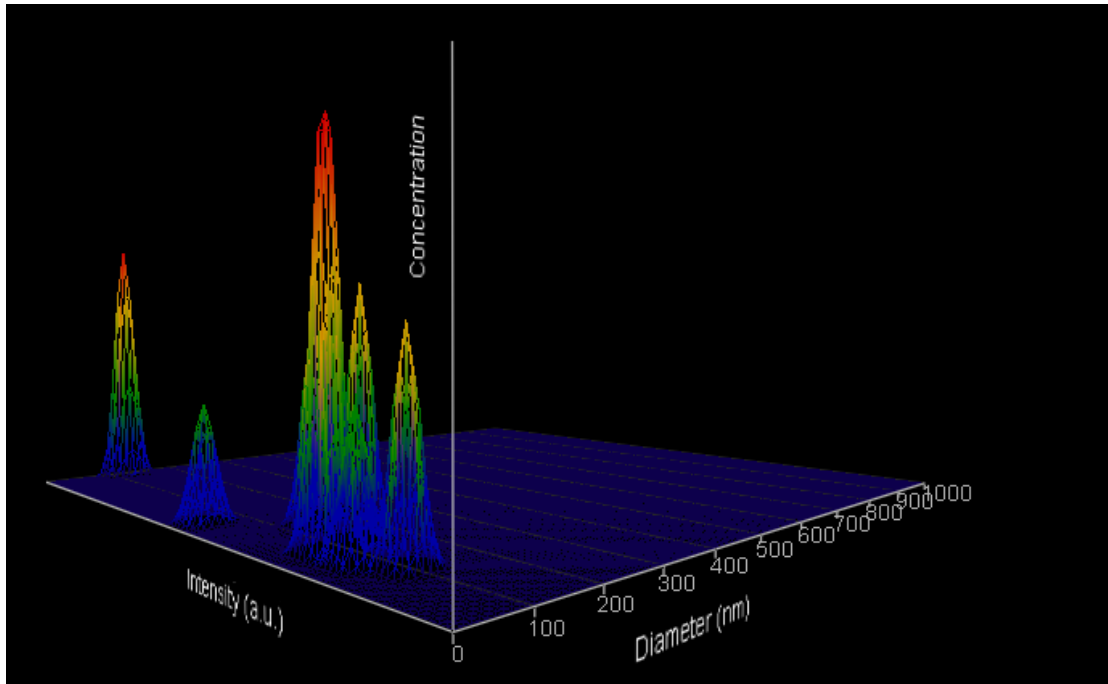
μέγεθος των νανοσωματιδίων του σκέτου CAGE 1:1. Η συγκέντρωση κρίνεται στα επιθυμητά όρια.



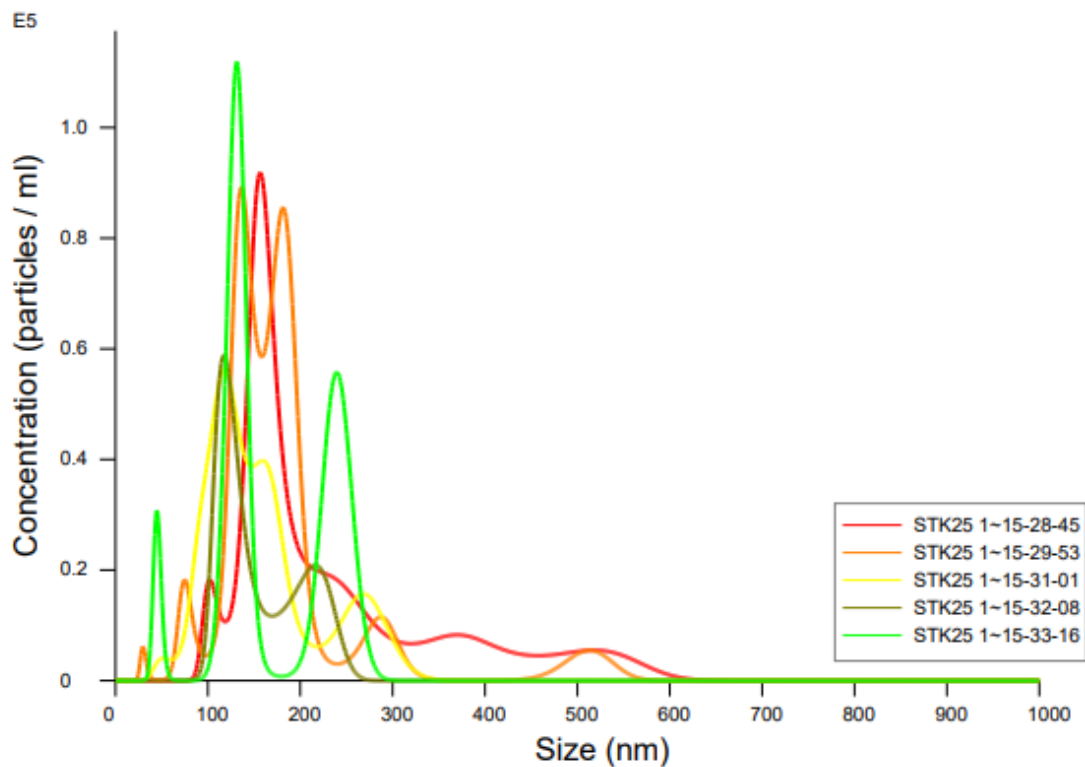
Γράφημα 21: Στιγμαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 1mg/g και του μεγέθους τους



Εικόνα 33: Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 1mg/g.



Γράφημα 22:Στιγμαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 1mg/g, του μεγέθους τους και της έντασης, σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D).



Γράφημα 23:Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος εγκλεισμού CAGE 1:1 1mg/g.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται το σύνολο των σαρώσεων του δείγματος και για μία ακόμη φορά παρατηρείται πλήθος διαφορετικών ομάδων σωματιδίων, πιθανότατα λόγω του

μη ομοιόμορφου εγκλεισμού της βιοδραστικής ουσίας στα μικκύλια, καθώς και της πιθανής επιφανειακής προσρόφησης της χρυσίνης σε αυτά. Στο συγκεκριμένο δείγμα εμφανίζονται και σωματίδια μεγέθους >500nm.

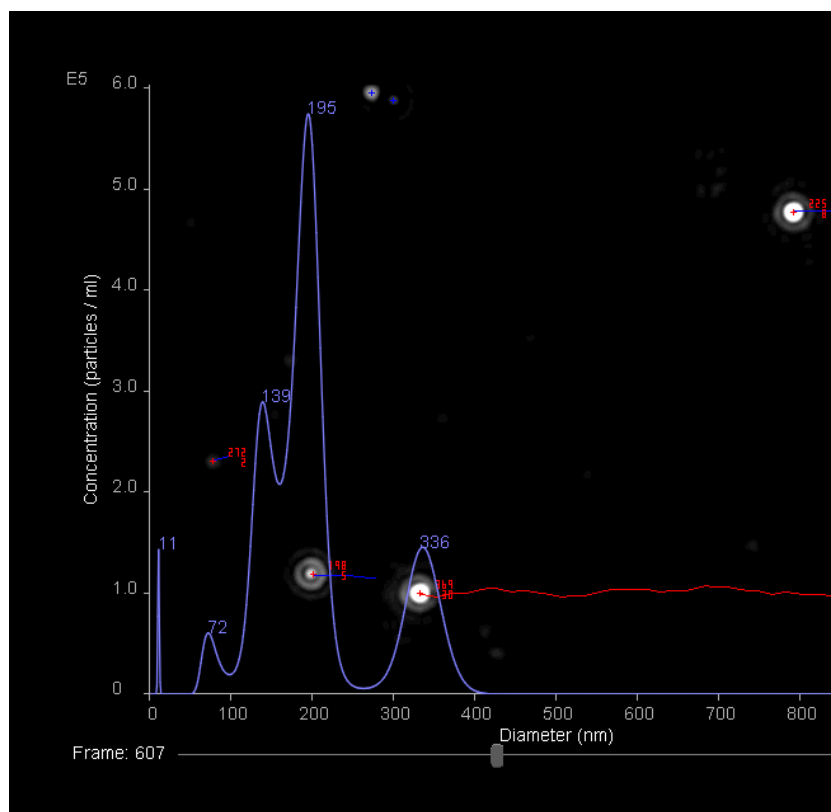
3.7.5 Μελέτη του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:1 σε συγκέντρωση 20 mg/g

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα

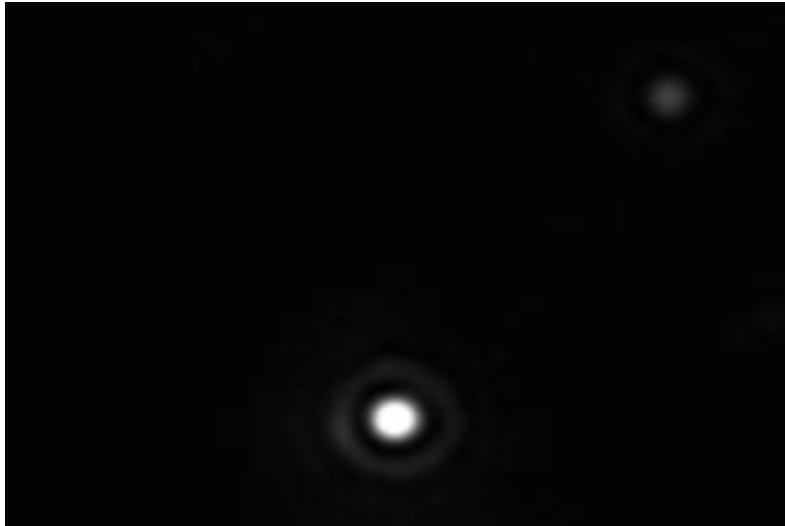
Πίνακας 17: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 20 mg/g.

Μετρούμενο μέγεθος	Τιμή
Μέση υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων	148,6±18,0 nm
Συγκέντρωση σωματιδίων	4,37 * 10 ⁷ ± 1,51 * 10 ⁷ σωματίδια/mL

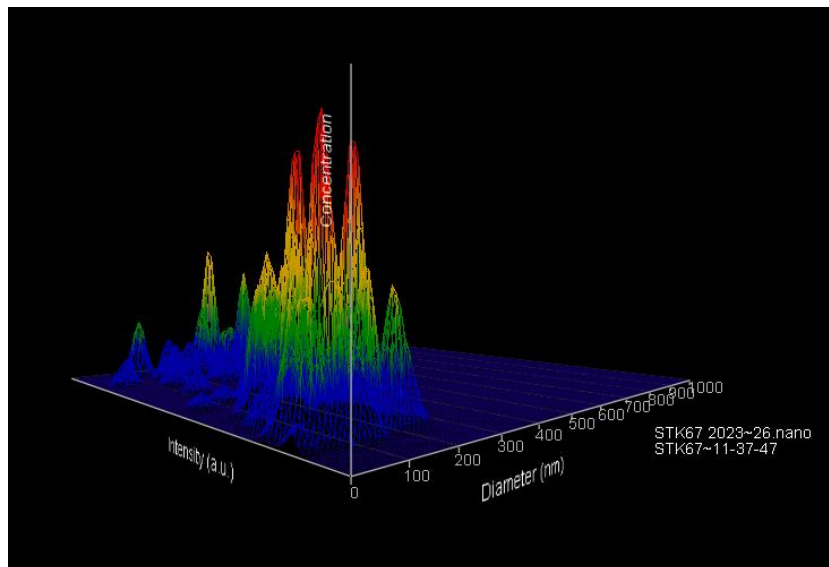
Η μέση υπολογιζόμενη υδροδυναμική διάμετρος είναι μικρότερη από 1000 nm , άρα τα σωματίδια θεωρούνται νανοσωματίδια. Η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων είναι στα επιθυμητά όρια.



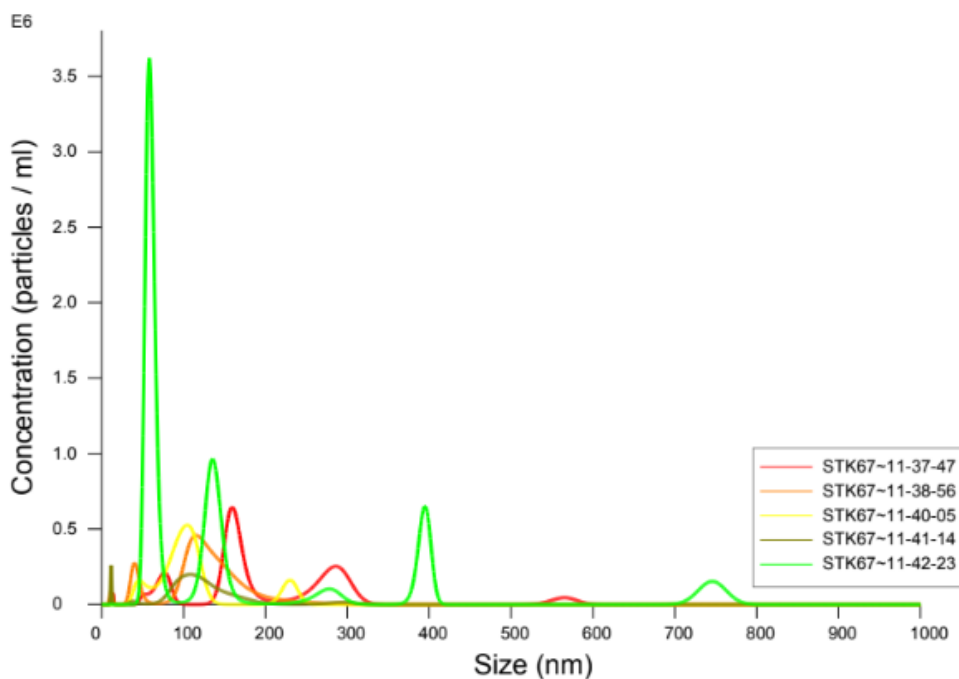
Γράφημα 24: Στιγμαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 20mg/g και του μεγέθους τους



Εικόνα 34: Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 20 mg/g



Γράφημα 25: Στιγμαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:1 20mg/g, του μεγέθους τους και της έντασης, σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D).



Γράφημα 26: Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος εγκλεισμού CAGE 1:1 20mg/g.

Από το παραπάνω διάγραμμα που απεικονίζει το σύνολο των σαρώσεων στο δείγμα, διαπιστώνεται ξανά η έλλειψη μονοδιασποράς, πιθανώς λόγω του μη ομοιόμορφου εγκλεισμού της βιοδραστικής στα μικκύλια και μάλιστα σε υψηλή αναλογία φόρτωσης.

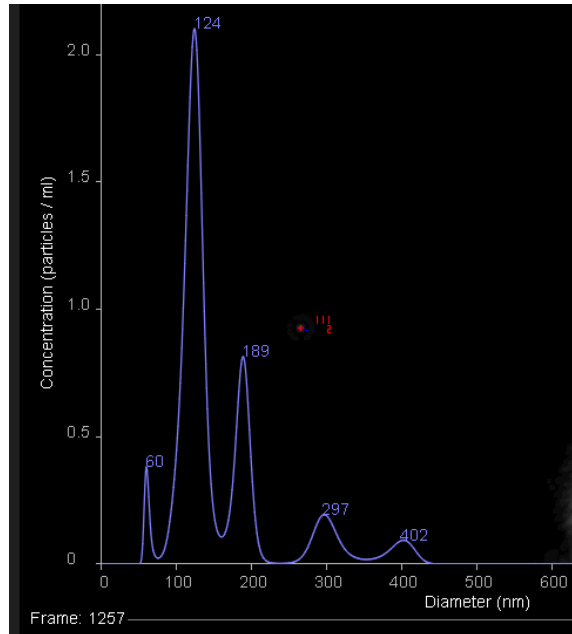
3.7.6 Μελέτη δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:2 σε συγκέντρωση 1mg/g

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 18: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 1mg/g.

Μετρούμενο μέγεθος	Τιμή
Μέση υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων	175,9±14,6 nm
Συγκέντρωση σωματιδίων	$1,01 * 10^7 \pm 0,08 * 10^7$ σωματίδια/mL

Το υπολογιζόμενο μέσο μέγεθος των σωματιδίων είναι στα όρια της νανοκλίμακας. Η υδροδυναμική διάμετρος είναι μεγαλύτερη εκείνη των νανοσωματιδίων του CAGE 1:2, γεγονός που δείχνει ότι η χρυσίνη που εγκλωβίστηκε στα μικκύλια αύξησε το μέγεθός τους. Η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων έχει την αναμενόμενη τάξη μεγέθους.

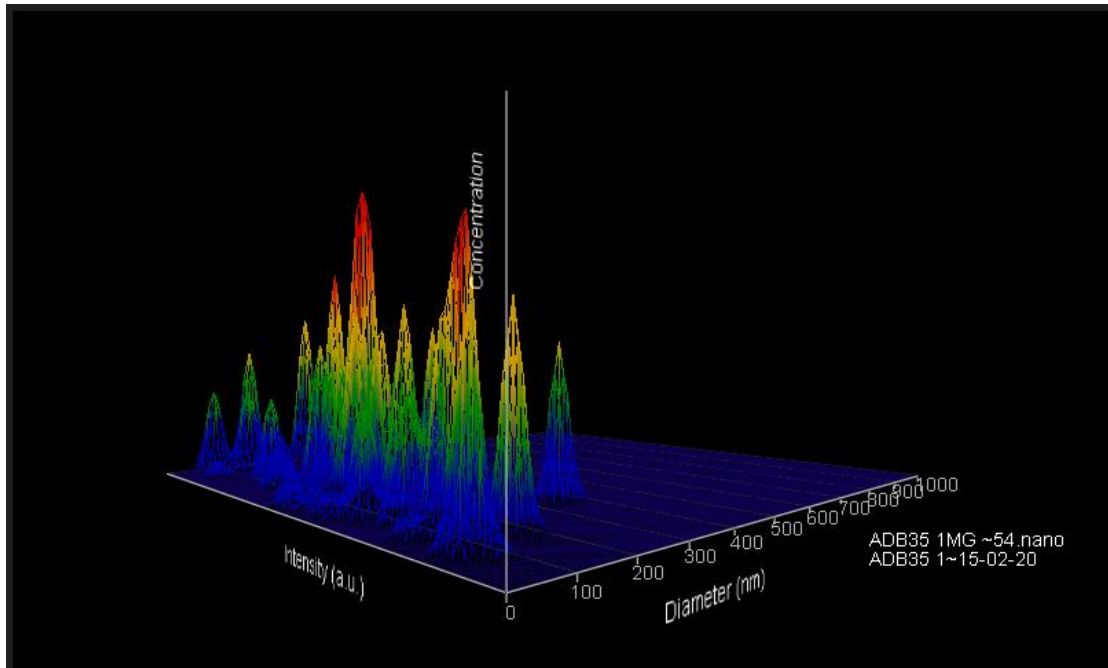


Γράφημα 27:Στιγμιαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 1mg/g και του μεγέθους τους

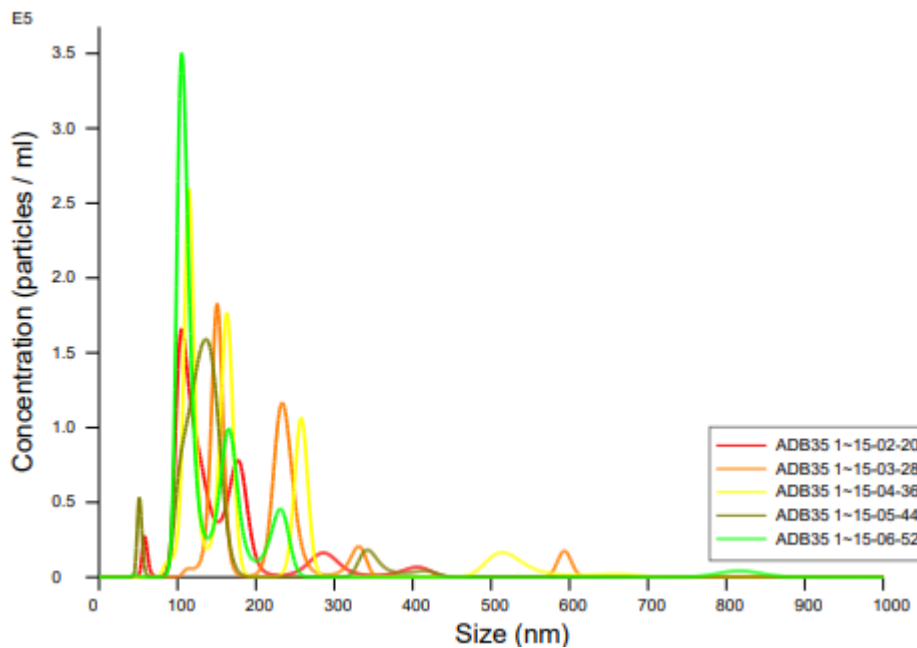


Εικόνα 35: Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 1mg/g.

Από το παραπάνω γράφημα φαίνεται ότι υπάρχει μια πολυδιασπορά στα νανοσωματίδια και δεν υπάρχει μία κανονική κατανομή. Όπως και στη μελέτη των προηγούμενων εγκλεισμών, αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η χρυσίνη δεν εγκλείεται ομοιόμορφα σε όλα τα μικκύλια. Όμως, ακόμα και έτσι, τα νανοσωματίδια που βρίσκονται στην υψηλότερη συγκέντρωση έχουν σχετικά μικρό μέγεθος (λίγο μεγαλύτερο από 100nm).



Γράφημα 28:Στιγμαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 1mg/g, του μεγέθους τους και της έντασης, σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D).



Γράφημα 29: Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος εγκλεισμού CAGE 1:2 1mg/g.

Από το παραπάνω διάγραμμα που απεικονίζει το σύνολο των σαρώσεων στο δείγμα συμπεραίνεται η έλλειψη μονοδιασποράς και κανονικών κατανομών. Αρκετά διαφορετική κατανομή από το CAGE 1:2 απουσία χρυσίνης, αλλά στα πλαίσια του αναμενόμενου, καθώς είναι μικκύλια με πιθανώς ανομοιόμορφα εγκλεισμένη φαρμακευτική ουσία.

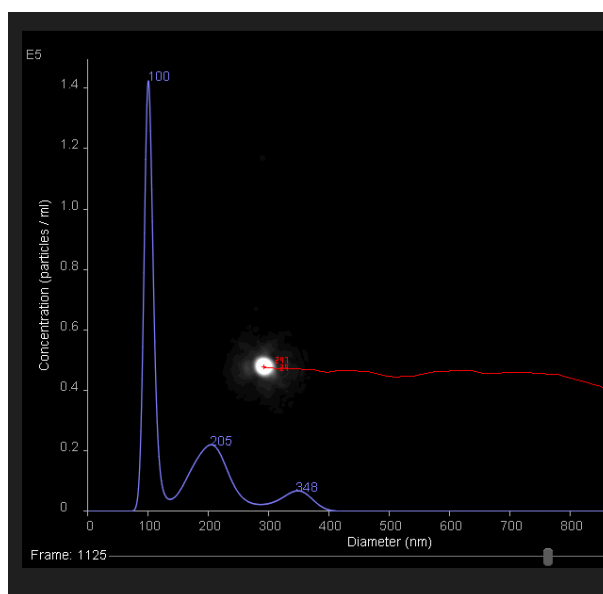
3.7.7 Μελέτη δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης σε CAGE 1:2 σε συγκέντρωση 20mg/g

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα υπολογιζόμενα μεγέθη.

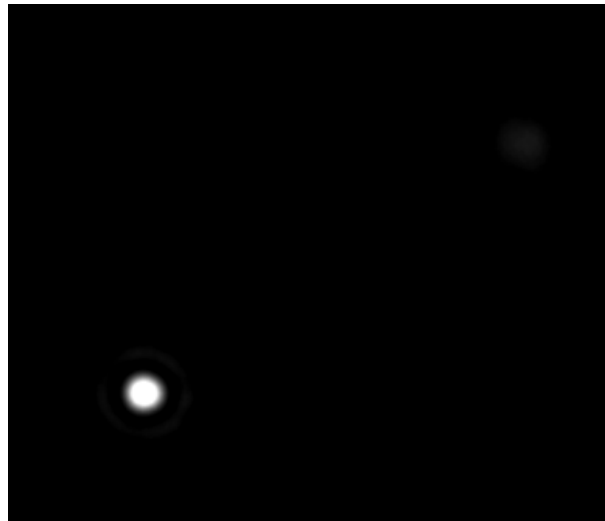
Πίνακας 19: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 20mg/g.

Μετρούμενο μέγεθος	Τιμή
Μέση υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων	169,6±6,9 nm
Συγκέντρωση σωματιδίων	7,79 * 10 ⁶ ± 1,28 * 10 ⁶ σωματίδια/mL

Όπως φαίνεται από τις τιμές του παρακάτω πίνακα, η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων είναι <1000nm γεγονός που παραπέμπει σε νανοσωματίδια. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι μεγαλύτερο του CAGE 1:2 απουσία χρυσίνης, όπως είναι αναμενόμενο, όμως είναι μικρότερο ελαφρώς του δείγματος εγκλεισμού συγκέντρωσης 1mg/g. Η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων είναι υψηλή και στα επιθυμητά όρια.

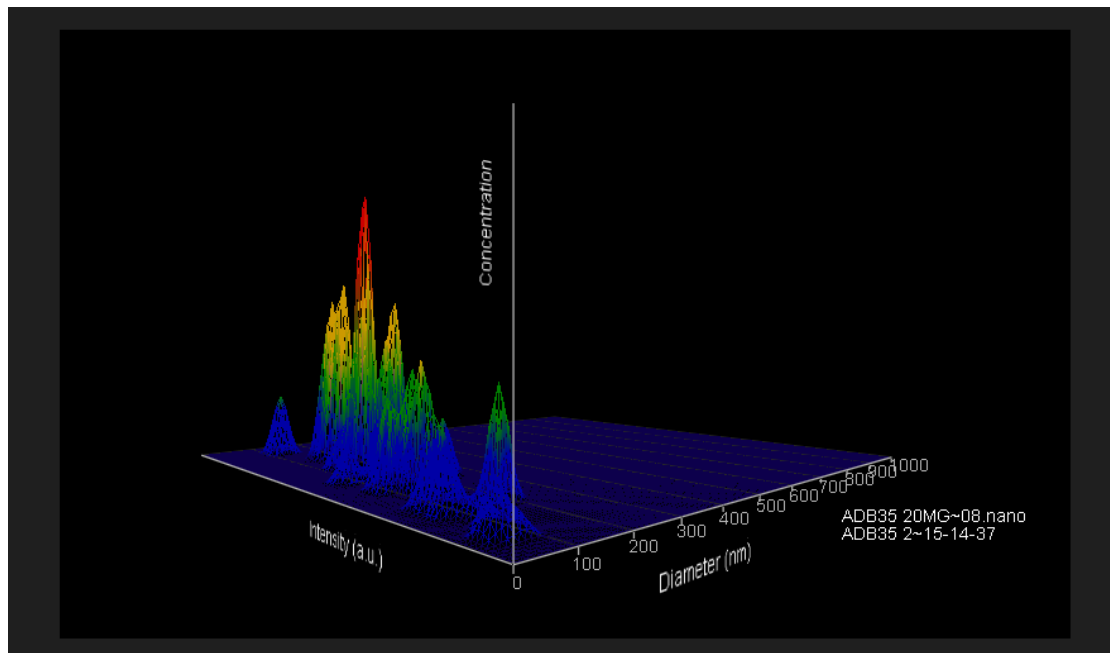


Γράφημα 30:Στιγμαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 20mg/g και του μεγέθους τους.

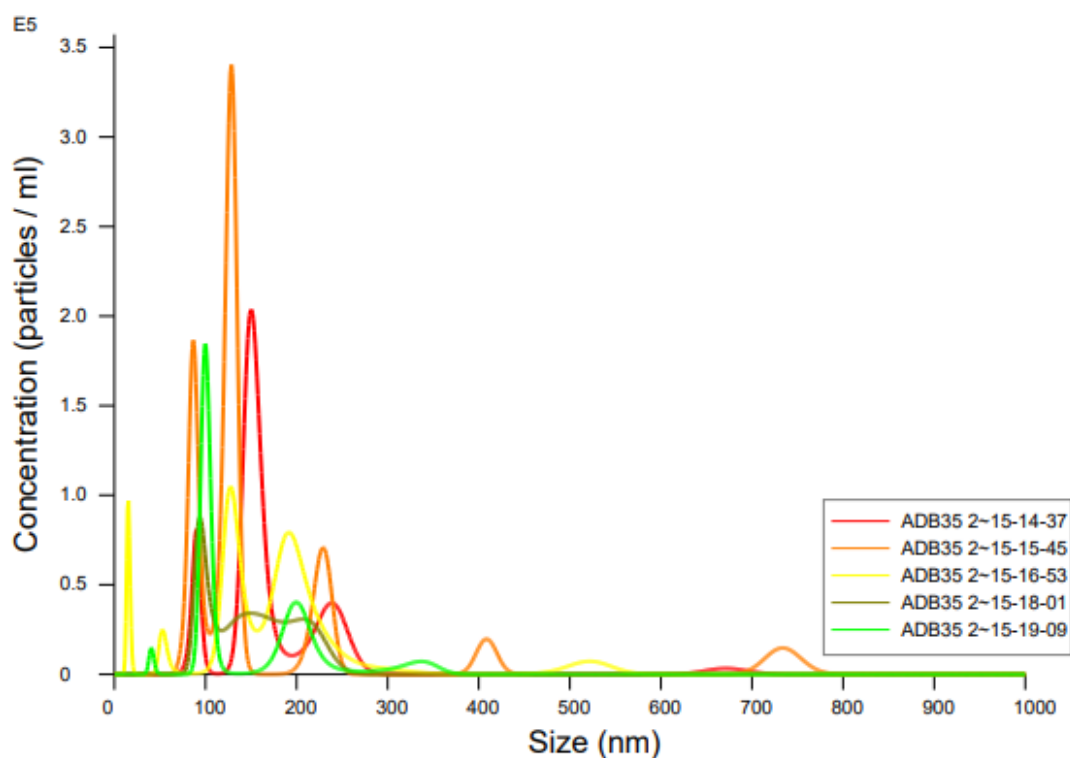


Εικόνα 36:Στιγμιότυπο από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 20mg/g

Από το παραπάνω γράφημα είναι φανερό ότι υπάρχει ικανή συγκέντρωση μεγαλύτερων νανοσωματιδίων και δεν υπάρχει κανονική κατανομή. Στο συγκεκριμένο δείγμα εγκλεισμού η αναλογία χρυσίνης-CAGE είναι μεγαλύτερη από τους προαναφερθέντες εγκλεισμούς και άρα είναι πιο πιθανό να μην έχει εγκλειστεί ομοιόμορφα στα μικκύλια η χρυσίνη, λόγω υπερβολικής φόρτωσης του συστήματος σε βιοδραστική ουσία.



Γράφημα 31:Στιγμαία γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων εγκλεισμού CAGE 1:2 20mg/g, του μεγέθους τους και της έντασης, σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D).



Γράφημα 32: Συγκεντρωτικό διάγραμμα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων του δείγματος εγκλεισμού CAGE 1:2 20mg/g.

Από το παραπάνω διάγραμμα που απεικονίζει το σύνολο των σαρώσεων στο δείγμα, διαπιστώνεται ξανά η έλλειψη μονοδιασποράς, σε αντίθεση με την κατανομή του CAGE 1:2 χωρίς εγκλεισμένη χρυσίνη, πιθανώς λόγω του μη ομοιόμορφου εγκλεισμού της βιοδραστικής στα μικκύλια και μάλιστα σε υψηλή αναλογία φόρτωσης.

3.7.8 Μελέτη δειγμάτων από τον προσδιορισμό της διαλυτότητας της χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία CAGE 1:1

Εξετάζονται τρία δείγματα από τη μελέτη διαλυτότητας (Παράγραφος 2.5) της χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα buffer pH=7,44 παρουσία CAGE 1:1. Συγκεκριμένα, μελετώνται τα υπερκείμενα φιλτραρισμένα υγρά των μιγμάτων συγκέντρωσης σε CAGE 1:1 300mM, 450mM και 600mM. Τα αποτελέσματα για τα 3 δείγματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 20: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων στο δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 300mM

Μετρούμενο μέγεθος	Τιμή
Μέση υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων	162,0±12,7nm
Συγκέντρωση σωματιδίων	8,97 * 10 ⁶ ± 2,20 * 10 ⁶ σωματίδια/mL

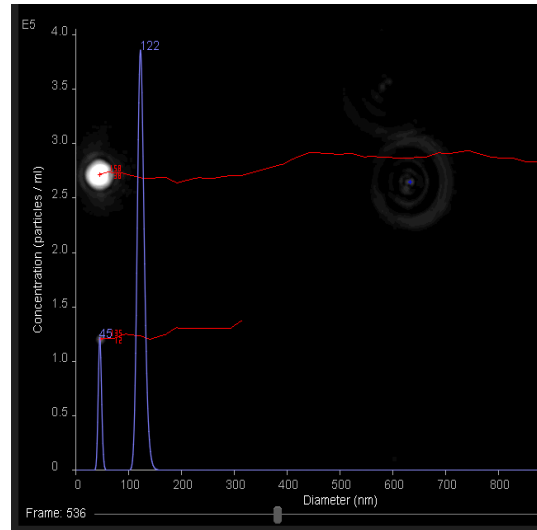
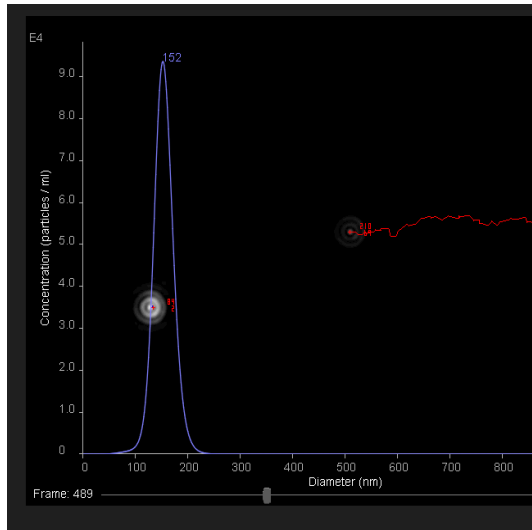
Πίνακας 21: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων στο δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 450mM

Μετρούμενο μέγεθος	Τιμή
Μέση υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων	182,3±47,3nm
Συγκέντρωση σωματιδίων	2,34 * 10 ⁶ ± 0,72 * 10 ⁶ σωματίδια/mL

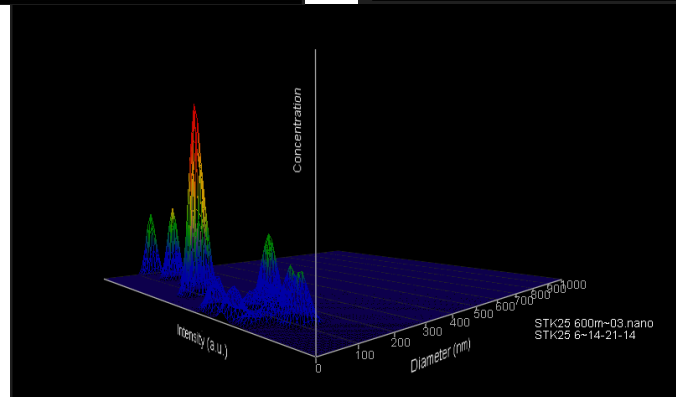
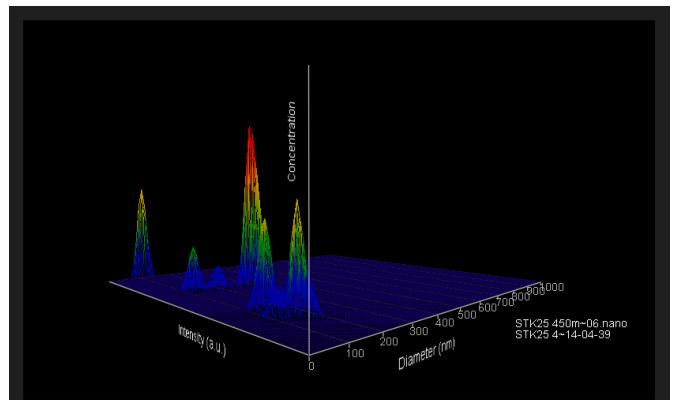
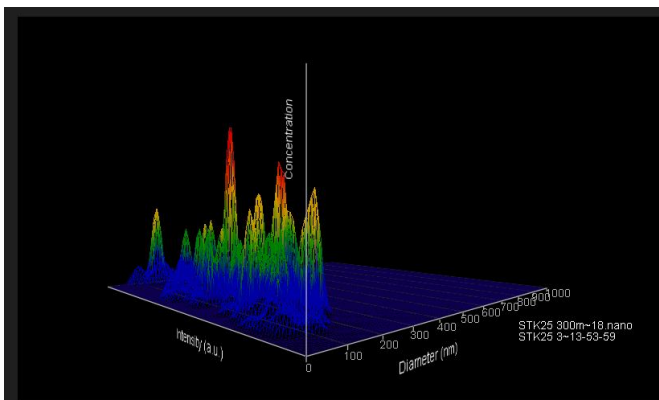
Πίνακας 22: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και συγκέντρωσης νανοσωματιδίων στο δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 600mM

Μετρούμενο μέγεθος	Τιμή
Μέση υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων	120,0±56,9nm
Συγκέντρωση σωματιδίων	1,16 * 10 ⁶ ± 0,69 * 10 ⁶ σωματίδια/mL

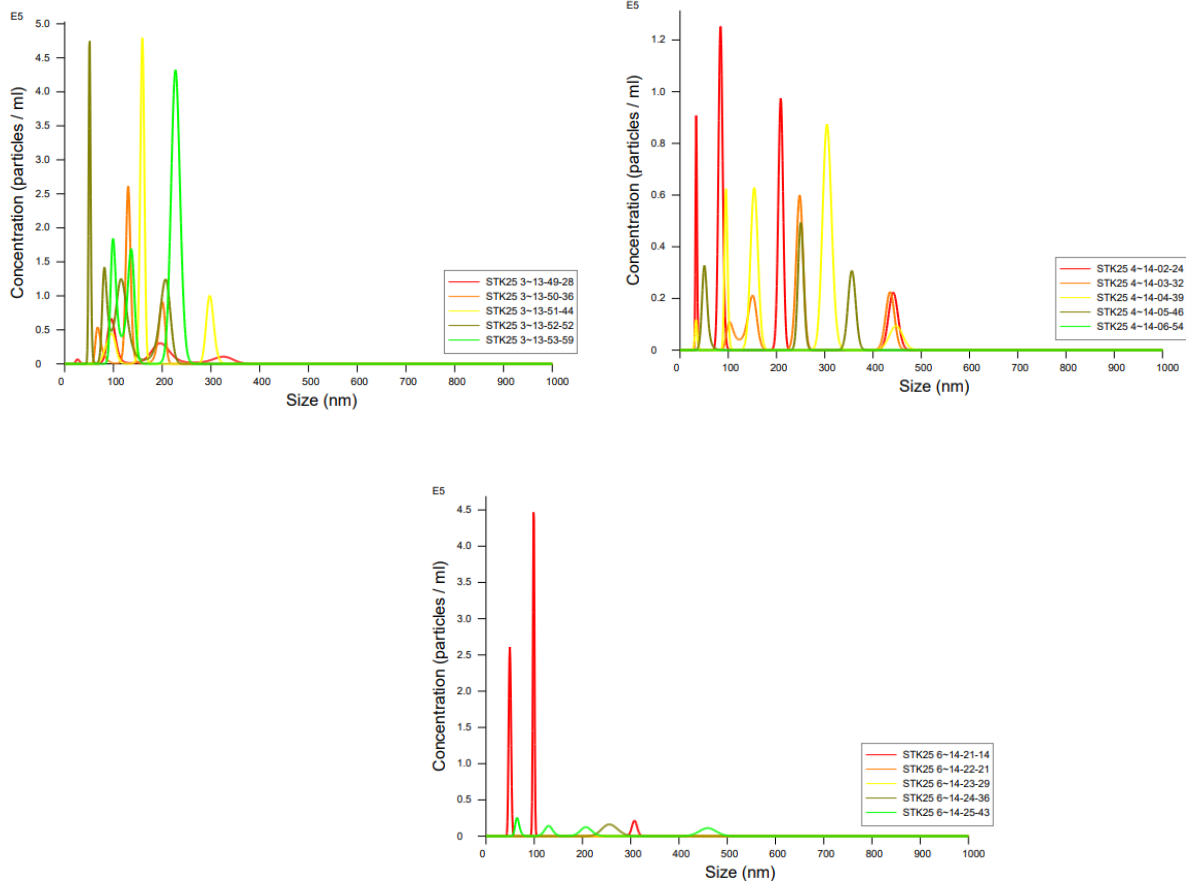
Από τους παραπάνω πίνακες είναι φανερό ότι έχουν σχηματιστεί νανοσωματίδια στα δείγματα από τη μελέτη διαλυτότητας, αφού η υδροδυναμική διάμετρος είναι μικρότερη από 1000nm. Συμπεραίνεται ότι τα νανοσωματίδια είναι τα μικκύλια που σχηματίζει το CAGE 1:1 με το υδατικό διάλυμα buffer. Σε όλα τα δείγματα η τιμή της υδροδυναμικής διαμέτρου των νανοσωματιδίων είναι παρόμοια με αυτή του σκέτου CAGE 1:1, οπότε εξάγεται το συμπέρασμα ότι δεν έχει εγκλειστεί μεγάλη ποσότητα χρυσίνης στα δείγματα αυτά. Μια πιθανή αιτιολογία για το φαινόμενο αυτό είναι οι διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης στις δύο περιπτώσεις: στη μελέτη διαλυτότητας τα δείγματα ανακινούνται εντός του επωαστήρα, δηλαδή δε λαμβάνει χώρα έντονη ανάδευση, ενώ στον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού γίνεται έντονη ανάδευση των συστημάτων μαγνητικά, που πιθανώς ευνοεί τον εγκλεισμό μεγαλύτερης ποσότητας χρυσίνης. Αξίζει να παρατηρηθεί ότι τη μέγιστη υδροδυναμική διάμετρο την έχει το δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 450mM. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει ότι από μια συγκέντρωση CAGE και πάνω η χρυσίνη δεν εγκλείεται σε μεγαλύτερο ποσοστό.



Γράφημα 33: Στιγμαϊά γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων της μελέτης διαλυτότητας και του μεγέθους τους (αριστερά: συγκέντρωση CAGE 1:1 300mM, δεξιά: συγκέντρωση 600mM)



Γράφημα 34: Στιγμαϊά γραφική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων της μελέτης διαλυτότητας, του μεγέθους τους και της έντασης σε σχήμα τριών διαστάσεων (3D) (από πάνω και αριστερά: συγκέντρωση 300mM, 450mM, 600mM σε CAGE 1:1)



Γράφημα 35: Συγκεντρωτικά διαγράμματα της συσχέτισης συγκέντρωσης-μεγέθους των νανοσωματιδίων των σαρώσεων των δειγμάτων της μελέτης διαλυτότητας (από πάνω και αριστερά: συγκέντρωση 300mM, 450mM, 600mM σε CAGE 1:1).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, τα δείγματα δεν εμφανίζουν μονοδιασπορά ούτε κανονικές κατανομές, διότι σε κάποια μικκύλια έχει εγκλωβιστεί χρυσίνη και σε κάθε ένα από αυτά πιθανότατα υπάρχει διαφορετική ποσότητα αυτής. Παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση μικρών νανοσωματιδίων σε όλα τα δείγματα. Το δείγμα με συγκέντρωση CAGE 1:1 600mM πλησιάζει περισσότερο σε μοντέλο μονοδιασποράς όπως φαίνεται από το διάγραμμα συνολικών σαρώσεων, όπου παρατηρούνται δύο κύριες αιχμηρές κορυφές, δηλαδή δύο «οικογένειες» νανοσωματιδίων.

3.8 Συγκριτική συζήτηση αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων (DLS και NTA)

Παραπάνω συζητήθηκαν τα αποτελέσματα της εφαρμογής των μεθόδων DLS, NTA σε ομάδες δειγμάτων, και παρουσιάζονται συγκριτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 23: Συγκριτική μελέτη αποτελεσμάτων για το μέγεθος των νανοσωματιδίων από τις μελέτες DLS και NTA.

Δείγμα	Υδροδυναμική διάμετρος με DLS (nm)	Υδροδυναμική διάμετρος με NTA (nm)
CAGE 1:1	406,5	182,4
CAGE 1:2	202,1	123,8
Εγκλεισμός σε CAGE 1:1 με συγκέντρωση 1mg/g	333,8	180,2
Εγκλεισμός σε CAGE 1:1 με συγκέντρωση 5mg/g	1256,0	175,9
Εγκλεισμός σε CAGE 1:1 με συγκέντρωση 20mg/g	1003,5	148,6
Εγκλεισμός σε CAGE 1:2 με συγκέντρωση 1mg/g	231,8	175,9
Εγκλεισμός σε CAGE 1:2 με συγκέντρωση 20mg/g	1176,0	169,6

Παρατηρείται ότι στην περίπτωση του CAGE 1:1, καθώς αυξάνεται η φόρτωση της χρυσίνης στο σύστημα, μειώνεται το μέγεθος των νανοσωματιδίων ενώ στην περίπτωση του CAGE 1:2 παρατηρείται ότι τα μικκύλια που περιέχουν εγκλεισμένη χρυσίνη είναι αισθητά μεγαλύτερα από τα μικκύλια του καθαρού CAGE 1:2. Όσο αυξάνεται το ποσοστό φόρτωσης, παρατηρείται ελαφριά μείωση.

Από τις τιμές του παραπάνω πίνακα είναι φανερό ότι με τη μέθοδο DLS η υδροδυναμική διάμετρος υπολογίζεται κατά πολύ μεγαλύτερη από την υδροδυναμική διάμετρο που προκύπτει με τη μέθοδο NTA. Σε όλα τα δείγματα η διαφορά στην υδροδυναμική διάμετρο δεν είναι αμελητέα. Υπάρχουν συγκεκριμένοι λόγοι που εμφανίζεται αυτή η διαφορά.

Αρχικά, η μέθοδος DLS είναι μια γρήγορη, απλή, μη καταστρεπτική μέθοδος για τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων. Όμως, η μέθοδος αυτή είναι πιο ακριβής σε σφαιρικά σωματίδια. Σε μη σφαιρικά σωματίδια ή σε περιπτώσεις πολυδιασποράς σωματιδίων, η DLS τείνει να υπερεκτιμά τα μεγέθη των νανοσωματιδίων. Αυτό συμβαίνει επειδή τα μεγαλύτερα σωματίδια διασκορπίζονται εντονότερα και ανιχνεύονται κατά προτίμηση από την DLS σε σχέση με τα μικρότερα, δεδομένου ότι η επίδραση της έντασης και της σκέδασης εξαρτάται από το μέγεθος και όχι από τον αριθμό των σωματιδίων με παρόμοια διάμετρο. Επομένως, σε περιπτώσεις πολυδιασποράς παρουσιάζει κατανομές προς μεγαλύτερα μεγέθη.^[57]

Στην NTA, από την άλλη, η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων δεν εξαρτάται από το σκεδαζόμενο φως, οπότε επιτρέπει ακριβή και επαναλήψιμο προσδιορισμό της

συγκέντρωσης και του μεγέθους των μη σφαιρικών νανοσωματιδίων. Επιπλέον, η NTA παρέχει μεγαλύτερη ακρίβεια σε εύρος μεγέθους 10-2000nm, επειδή βασίζεται στην παρακολούθηση μεμονωμένων σωματιδίων. Για αυτό το λόγο κρίνεται η πλέον κατάλληλη εκ των δύο για τον ακριβή προσδιορισμό του μεγέθους πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και νανοσωματιδίων χορήγησης φαρμάκων.^[57]

3.9 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH

Τόσο για τα CAGE 1:1, CAGE 1:2, την ελεύθερη χρυσίνη, όσο και για τους εγκλεισμούς της χρυσίνης και στα δύο CAGE, διεξήχθη μελέτη για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης τους και πιο συγκεκριμένα της ικανότητάς τους να σαρώνουν και να ανάγουν τις ελεύθερες ρίζες DPPH. Η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων αξιολογείται με βάση τον δείκτη IC₅₀. Για κάθε δείγμα που αξιολογήθηκε ως προς την αντιοξειδωτική του δράση σχεδιάζονται τα γραφήματα της επί τοις εκατό αναστολής (σάρωσης) της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος, για τους τρεις χρόνους επώασης των δειγμάτων, δεκαπέντε λεπτά, μισή και μία ώρα. Τα γραφήματα αυτά βρίσκονται συγκεντρωμένα στο Παράρτημα. Σε κάθε διάγραμμα, έχει επιλεγθεί ως γραμμή τάσης μία ευθεία (linear trendline) και εμφανίζεται η εξίσωση αυτής μαζί με το συντελεστή προσδιορισμού R², ο οποίος εκφράζει την ποιότητα της προσαρμογής των πειραματικών σημείων στο γραμμικό μοντέλο. Η σχέση υπολογισμού της % αναστολής είναι η:

$$\% \text{Inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} * 100 \quad (9)$$

όπου A_{control} η τιμή απορρόφησης του διαλύματος 50% κατ' όγκο αιθανόλη και 50% κατ' όγκο διαλύματος DPPH και A_{sample} η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων.

Η προκύπτουσα γραφική παράσταση είναι ευθεία γραμμή με θετική κλίση της μορφής:

$$\% \text{Inhibition} = a * C + b \quad (10)$$

Ο δείκτης IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση διαλύματος αντιοξειδωτικού που απαιτείται για 50% μείωση της απορρόφησης της ρίζας DPPH (δηλαδή 50% inhibition). Επομένως, η εξίσωση (4) μετατρέπεται ως εξής:

$$50 = a * IC_{50} + b \rightarrow IC_{50} = \frac{50-b}{a} \quad (11)$$

όπου a η κλίση και b η αποτέμνουσα της ευθείας, που προκύπτουν γραφικά

Σημειώνεται εδώ ότι, κατά τη δημιουργία των γραφημάτων αυτών, επιβεβαιώθηκε με κατάλληλες δοκιμές ότι η καλύτερη γραμμή τάσης (αυτή με το υψηλότερο R²) είναι η ευθεία, επομένως μπορεί να θεωρηθεί με ασφάλεια ότι η συσχέτιση ανάμεσα στην % σάρωση της ρίζας DPPH από τα δείγματα και στη συγκέντρωση των δειγμάτων αυτών είναι γραμμική. Τονίζεται ότι η αρχική συγκέντρωση C₁ των stock διαλυμάτων σε κάθε περίπτωση δείγματος,

έχει επίσης προκύψει μετά από δοκιμές. Καθοριστικός παράγοντας για την ποιότητα των μετρήσεων είναι το ιξώδες των διαλυμάτων, που επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση C₁. Υψηλό ιξώδες δειγμάτων συνεπάγεται κακή επαναληψιμότητα, έλλειψη γραμμικότητας και αντίθετη τάση από την επιθυμητή.

Η τάση, όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, δείχνει πως η αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος ενός δείγματος οδηγεί σε αύξηση της % σάρωσης της ρίζας DPPH, όπως αναμένεται. Όσο πυκνότερο είναι το μετρούμενο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ριζών DPPH που ανάγονται από τα αντιοξειδωτικά.

Ακολούθως, παρατίθεται πίνακας με τις τιμές του δείκτη IC₅₀ που έχουν υπολογιστεί γραφικά από τα σχετικά διαγράμματα.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα δοκιμής DPPH στα νανοσυστήματα.

Δείγμα	IC ₅₀ 15min (mg /mL ΕΤΟΗ)	IC ₅₀ 30min (mg/mL ΕΤΟΗ)	IC ₅₀ 60min (mg/mL ΕΤΟΗ)
Χρυσίνη	14,8	18,4	18,3
CAGE 1:1	270,0	160,5	130,3
Εγκλεισμός χρυσίνης σε CAGE 1:1 σε συγκέντρωση 5mg/g	1270,0	1316,0	1185,0
CAGE 1:2	44,1	41,7	38,4
Εγκλεισμός χρυσίνης σε CAGE 1:2 σε συγκέντρωση 1mg/g	637,8	502,4	417,5
Εγκλεισμός χρυσίνης σε CAGE 1:2 σε συγκέντρωση 20mg/g	448,8	390,0	342,8

Για να μπορέσει μια ουσία να χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτική με τη συγκεκριμένη μέθοδο, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από χαμηλό IC₅₀. Αξίζει να αναφερθεί ότι, ανάμεσα στην τιμή του IC₅₀ δείγματος που έχει υποστεί επώαση σε σκοτεινό χώρο για μισή ώρα πριν τη μέτρηση, και στην τιμή του IC₅₀ του ίδιου δείγματος που αντιστοιχεί σε χρόνο επώασης μία ώρα, η διαφορά που παρατηρείται είναι αισθητή. Πιο συγκεκριμένα, η πάροδος μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος μέχρι τη στιγμή της μέτρησης της απορρόφησης του DPPH στα δείγματα, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής του IC₅₀ για το ίδιο δείγμα. Και αυτό το φαινόμενο είναι λογικό, δεδομένου ότι, όσο περισσότερος χρόνος περνά και τα αντιοξειδωτικά των δειγμάτων σαρώνουν τις ρίζες του DPPH, στο σταθερό όγκο των διαλυμάτων η ποσότητα των ριζών (και άρα η συγκέντρωσή τους) ελαττώνεται σημαντικά. Δηλαδή, η ίδια περιεκτικότητα διαλύματος σε αντιοξειδωτικό επιτυγχάνει μεγαλύτερη επί

τοις εκατό σάρωση, όταν ο χρόνος επώασης είναι μεγαλύτερος και, κατ' επέκταση, για να σαρωθεί το 50% της αρχικής ποσότητας των ριζών DPPH, απαιτείται μικρότερη περιεκτικότητα διαλύματος σε αντιοξειδωτικό. Μια πιθανή εξήγηση για αυτήν την παρατήρηση θα μπορούσε να είναι η παρουσία στα δείγματα μεγάλων μορίων (όπως της χρυσίνης) τα οποία χρειάζονται περισσότερο χρόνο μέχρις ότου αποδεσμευτούν από τα μικκύλια και δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι, ούτε τα CAGE αλλά ούτε οι εγκλεισμοί τους έχουν καλή αντιοξειδωτική δράση. Η χρυσίνη εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση καθώς το δείγμα της που μελετήθηκε έχει αρκετά χαμηλό IC₅₀.

Το CAGE 1:2 εμφανίζει μέτρια αντιοξειδωτική δράση, ενώ το CAGE 1:1 είναι λιγότερο αντιοξειδωτικό από το CAGE 1:2.

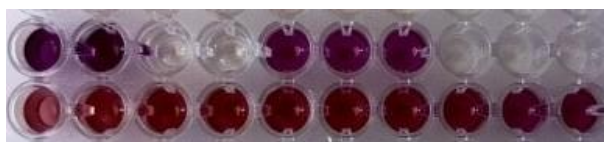
Οι εγκλεισμοί τόσο με CAGE 1:1 όσο και με CAGE 1:2 φαίνεται να μην εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση κατά DPPH. Αξίζει να αναφερθεί ότι εμφανίζουν χειρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα αντίστοιχα αρχικά συστατικά τους (ιοντικό υγρό και χρυσίνη) συστατικά τους, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο εγκλεισμός της χρυσίνης στα CAGE 1:1 και CAGE 1:2 αναστέλλει την όποια αντιοξειδωτική της ικανότητα.

3.10 Οπτική παρατήρηση της σάρωσης των ριζών DPPH από τα νανοσυστήματα

Το αιθανολικό διάλυμα που περιέχει τη ρίζα DPPH διαθέτει ένα σκούρο μωβ χρώμα. Από την άλλη, τα διαλύματα των ιοντικών υγρών, των εγκλεισμών και της χρυσίνης που δημιουργούνται είναι ως επί το πλείστον άχρωμα με έναν ελαφρύ πρασινοκίτρινο χρωματισμό (ανάλογα τη συγκέντρωση) που ωφείλεται τόσο στο CAGE όσο και στη χρυσίνη.

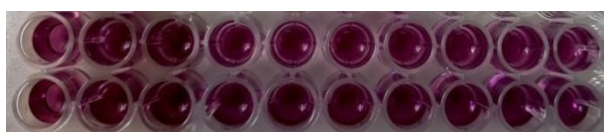
Όταν ένα διάλυμα διαθέτει αντιοξειδωτική ικανότητα, αναμένεται να μετατρέψει το μωβ χρώμα της ρίζας σε κίτρινο, δηλώνοντας έτσι ότι οι ρίζες έχουν αναχθεί.

Η ακόλουθη εικόνα παριστάνει δύο σειρές του micro-plate. Στη δεύτερη έχουν τοποθετηθεί δείγματα του CAGE 1:1 απουσία χρυσίνης. Στις δύο πρώτες θέσεις της δεύτερης σειράς υπάρχουν διαλύματα που αποτελούνται από 100 μl stock διαλύματος και 100 μl διαλύματος DPPH, στις δύο επόμενες 100 μl DPPH έχουν προστεθεί σε 80 μl stock διαλύματος και 20 μl αιθανόλης κ.ο.κ., όπως προβλέπεται από την πειραματική διαδικασία (Παράγραφος 2.10). Η πρώτη σειρά δειγμάτων του plate είναι τα δείγματα σκέτου DPPH και δείγματα DPPH-ΕΤΟΗ (control). Όπως φαίνεται, λοιπόν, στην εικόνα, υπάρχει μια διαβάθμιση του χρώματος αλλά δεν είναι ούτε ξεκάθαρη ούτε έντονη, όπως είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι το CAGE 1:1 δεν έχει αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση κατά DPPH.



Εικόνα 37: Δείγματα του CAGE 1:1 σε micro-plate, σε σειρά μειούμενης συγκέντρωσης, μετά από χρόνο επώασης 15 min.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται δύο σειρές του micro-plate, στις οποίες έχουν τοποθετηθεί δείγματα του εγκλεισμού με CAGE 1:1 συγκέντρωσης 5mg/g. Στις δύο πρώτες θέσεις της σειράς υπάρχουν διαλύματα που αποτελούνται από 100 μl stock διαλύματος και 100 μl διαλύματος DPPH, στις δύο επόμενες 100 μl DPPH έχουν προστεθεί σε 80 μl stock διαλύματος και 20 μl αιθανόλης κ.ο.κ. όπως παραπάνω.



Εικόνα 38: Δείγματα των εγκλεισμών με CAGE 1:1 συγκέντρωσης 5mg/g σε micro-plate, σε σειρά μειούμενης συγκέντρωσης, μετά από χρόνο επώασης 15 min

Όπως είναι εμφανές, δεν υπάρχει σχεδόν καμία χρωματική αλλαγή, γεγονός που κάνει φανερή την απουσία αντιοξειδωτικής δράσης, όπως άλλωστε προέκυψε (Παράγραφος 3.9). Ακόμα και σε υψηλότερους χρόνους επώασης, η αντιοξειδωτική δράση του συγκεκριμένου εγκλεισμού είναι πολύ ασθενής,

4.Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τον αρχικό στόχο της παρούσας εργασίας επετεύχθη η ανάπτυξη ενός νανοσυστήματος μεταφοράς μιας φαρμακευτικής ουσίας με τη χρήση πράσινων διαλυτών. Συγκεκριμένα, η φαρμακευτική ουσία είναι η χρυσίνη που εμφανίζει αποτελεσματική αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση. Για να επωφεληθεί η σύγχρονη ιατρική από τις εξέχουσες ιδιότητές της θα πρέπει να υπερνικηθεί ένα μεγάλο εμπόδιο: το γεγονός ότι η χρυσίνη έχει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, λόγω της υδροφοβικότητάς της. Η μελέτη αυτή στοχεύει στην αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, με τον εγκλεισμό της χρυσίνης σε δύο «πράσινους» διαλύτες, το CAGE 1:1 και το CAGE 1:2.

Το CAGE 1:1 είναι ένα καθαρά ιοντικό υγρό και εμφανίζει όλες τις προαναφερθείσες ιδιότητες (Παράγραφος 2.10) ενός ιοντικού υγρού. Το CAGE 1:2 όμως περιέχει ένα επιπλέον μέρος γερανικού οξέος συγκριτικά με το CAGE 1:1 και δεν αποτελεί καθαρό ιοντικό υγρό, αλλά μάλλον ένα υβρίδιο μεταξύ ιοντικού υγρού και βαθέως ευτηκτικού διαλύτη. Εμφανίζει τις ιδιότητες και των δύο κατηγοριών.

Αρχικά, διεξάγεται μελέτη διαλυτότητας της χρυσίνης σε υδατικό μέσο παρουσία των πράσινων διαλυτών CAGE 1:1 και CAGE 1:2. Αποδείχθηκε ότι η διαλυτότητα της χρυσίνης σε υδατικά διαλύματα αυξήθηκε με την προσθήκη των ιοντικών υγρών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιεκτικότητά της σε υδατικό διάλυμα (διάλυμα Buffer pH=7,44) σχετίζεται γραμμικά με την περιεκτικότητά του υδατικού διαλύματος στα ιοντικά υγρά. Η συγκεκριμένη μελέτη απέδειξε ότι το CAGE 1:1 αυξάνει την διαλυτότητα της χρυσίνης κατά 134 φορές στο υδατικό μέσο, ενώ το CAGE 1:2 αυξάνει την διαλυτότητά της κατά 192 φορές.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός της χρυσίνης στα παραπάνω ιοντικά υγρά σε συγκεντρώσεις (drug loading) 1mg/g, 5mg/g και 20mg/g για το CAGE 1:1 και 1mg/g, 20mg/g για το CAGE 1:2. Παρατηρήθηκε και οπτικά η δημιουργία λαμέλων (lamellar phase) πριν την δημιουργία των μικκυλίων (micellar phase) των ιοντικών υγρών στο νερό. Η μελέτη αυτή δίνει χαμηλές αποδόσεις εγκλεισμού (encapsulation efficiency) στις περιπτώσεις και των δύο ιοντικών υγρών. Συγκεκριμένα, για το CAGE 1:1 οι αποδόσεις εγκλεισμού κυμαίνονται μεταξύ 33% και 89%. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι όσο αυξάνεται το drug loading, τόσο αυξάνεται η απόδοση εγκλεισμού. Για το CAGE 1:2, οι αποδόσεις εγκλεισμού κυμαίνονται στο εύρος 27% με 32%, ενώ εδώ παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται το drug loading, μειώνεται ελαφρώς η απόδοση εγκλεισμού.

Επιπροσθέτως, χαρακτηρίστηκαν τα νανοσωματίδια που δημιουργήθηκαν ως προς το μέγεθος και τη σταθερότητα της διασποράς τους, με τις μεθόδους DLS και NTA. Από τα αποτελέσματα της μελέτης με τη μέθοδο DLS παρατηρήθηκε ότι το CAGE 1:2 δημιουργεί μικρότερα μικκύλια στα υδατικά διαλύματα συγκριτικά με τα μικκύλια που δημιουργεί το CAGE 1:1. Συγκεκριμένα, τα μικκύλια που δημιουργεί το CAGE 1:2 έχουν μέση υδροδυναμική διάμετρο 202,1 nm, ενώ τα μικκύλια του CAGE 1:1 406,5 nm. Επιπλέον, τα συστήματα καθαρού CAGE 1:2-υδατικού μέσου παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιομορφία συγκριτικά με

τα συστήματα CAGE 1:1-υδατικού μέσου, που είναι εμφανίζουν πολυδιασπορά σε μεγαλύτερο βαθμό. Όσον αφορά στη μελέτη των συστημάτων εγκλεισμού της χρυσίνης στα μικκύλια των δύο πράσινων διαλυτών, εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

1. Τα συστήματα εγκλεισμών της χρυσίνης και στους δύο διαλύτες εμφάνιζαν έντονη πολυδιασπορά.
2. Τόσο τα συστήματα του CAGE 1:1 όσο και τα συστήματα του CAGE 1:2 χαρακτηρίζονται από σταθερότητα, καθώς η τιμή του ζ-δυναμικού είναι κοντά στα 30 mV και άρα εμφανίζουν μικρή τάση συσσωματώσεων.
3. Το μέγεθος των μικκυλίων σε όλα τα νανοσυστήματα είναι αρκετά μικρό και ανήκει στη νανοκλίμακα (εύρος 123 με 182 nm στη μέτρηση με μέθοδο NTA) για εύκολη διέλευση από την κεράτινη στοιβάδα του δέρματος. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι είναι κατάλληλα για διαδερμική χορήγηση.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης αντιοξειδωτικής δράσης κατά DPPH εξάγεται το συμπέρασμα ότι ούτε οι εγκλεισμοί της χρυσίνης, αλλά ούτε και τα ιοντικά υγρά εμφανίζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση. Το πιο αντιοξειδωτικό από όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν είναι η χρυσίνη με δείκτη IC_{50} 14,8mg/ml και στη συνέχεια το CAGE 1:2 με δείκτη IC_{50} 44,1mg/ml. Σημαντική είναι η παρατήρηση πως οι εγκλεισμοί της χρυσίνης στα ιοντικά υγρά εμφανίζουν ασθενέστερη αντιοξειδωτική δράση από την ελεύθερη χρυσίνη. Συνεπώς ο εγκλεισμός της δεν έχει ευεργετική δράση για την εμφάνιση της αντιοξειδωτικής της ικανότητας, τουλάχιστον *in vitro* και κατά DPPH.

Από τα παραπάνω εύκολα εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο εγκλεισμός της χρυσίνης στα CAGE 1:1 και CAGE 1:2 αποτελεί πιθανή λύση στο πρόβλημα της υδροφοβικότητας της χρυσίνης. Αυξάνει σε ικανοποιητικό βαθμό τη διαλυτότητά της σε υδατικά διαλύματα και δημιουργεί νανοσυστήματα με μέγεθος ικανό για διαδερματική χρήση.

5.Προτάσεις για το μέλλον

Η παρούσα εργασία δίνει ενθαρρυντικά αποτελέσματα για περαιτέρω μελέτη των συστημάτων που πραγματεύεται. Λόγω του ότι υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών για τα ιοντικά αυτά υγρά (και ιδιαίτερα για το CAGE 1:1) ως φορέων βιοδραστικών ενώσεων, θα χρειαστεί να διεξαχθεί περισσότερη έρευνα για την ανάπτυξη φαρμακευτικού σκευάσματος με βάση τα ιοντικά αυτά υγρά. Σε αυτό το πλαίσιο λοιπόν θα ήταν καλό να εκπονηθεί μια μελέτη κυτταροτοξικότητας των νανοσυστημάτων, καθώς προορίζονται για βιολογική χρήση. Επιπλέον, θα χρειαστεί να γίνει μελέτη *in vitro* του προφίλ αποδέσμευσης και της διαδερμικής διαπερατότητάς τους με κάθετα κελιά διάχυσης (Franz diffusion cells). Στη συνέχεια, θα μπορούσε να αξιολογηθεί αντιοξειδωτική δράση αυτών των συστημάτων με άλλες τεχνικές εκτός της μεθόδου DPPH. Σημαντικό βήμα θα ήταν ο δομικός χαρακτηρισμός των μικκυλιακών συστημάτων εγκλεισμών με τη μέθοδο NMR. Επίσης, αφού τα συστήματα αυτά μελετώνται ως πιθανά συστήματα χορήγησης φαρμακευτικών ουσιών, επιβάλλεται να εξεταστεί η σταθερότητά τους σε βάθος χρόνου και σε συνθήκες αποθήκευσης για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί τα αρχικά βήματα για την ανάπτυξη νέων μεθόδων χορήγησης φαρμάκων, η οποία, παρά τα προβλήματα που εμφανίζει, μπορεί μελλοντικά να αποτελέσει μια καινοτομία στον τομέα της φαρμακευτικής νανοτεχνολογίας.

6.Βιβλιογραφία

- 1) Rizvi, S.A.A. and Saleh, A.M. (2018) "Applications of nanoparticle systems in Drug Delivery Technology," *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(1), pp. 64–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>.
- 2) Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK, (2012) "Drug delivery systems: An updated review", *Int J Pharm Investig*, 2(1),pp.2-11. doi: 10.4103/2230-973X.96920. PMID: 23071954; PMCID: PMC3465154.
- 3) Sahoo, S.K. and Labhasetwar, V., (2003) "Nanotech approaches to drug delivery and imaging," *Drug Discovery Today*, 8(24), pp. 1112–1120. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(03\)02903-9](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(03)02903-9).
- 4) Chong Li, Jiancheng Wang, Yiguang Wang, Huile Gao, Gang Wei, Yongzhuo Huang, Haijun Yu, Yong Gan, Yongjun Wang, Lin Mei, Huabing Chen, Haiyan Hu, Zhiping Zhang, YiguangJin, (2019) "Recent progress in drug delivery", *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Volume 9, Issue 6, pp. 1145-1162, ISSN 2211-3835,<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.08.003>.
- 5) Aaron C. Anselmo, Samir Mitragotri, (2014) "An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems", *Journal of Controlled Release*, Volume 190, pp. 15-28, ISSN 0168-3659,<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.053>
- 6) Kholoud M.M. Abou El-Nour, Ala'a Eftaiha, Abdulrhman Al-Warthan, Reda A.A. Ammar, (2010) "Synthesis and applications of silver nanoparticles,Arabian Journal of Chemistry", Volume 3, Issue 3, pp.135-140, ISSN18785352,<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.008>.
- 7) Jianxiang Zhang, Peter X. Ma, (2013) "Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 65, Issue 9, pp. 1215-1233, ISSN 0169-409X,<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.001>.
- 8) Kumari A, Singla R, Guliani A, Yadav SK., (2014) "Nanoencapsulation for drug delivery", *EXCLI J*.13: pp.265-286. PMID: 26417260; PMCID: PMC4464443.
- 9) Catarina Pinto Reis, Ronald J. Neufeld, António J. Ribeiro, Francisco Veiga,(2006) "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Volume 2, Issue 1, pp. 8-21, ISSN 1549-9634,<https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>.
- 10) Zhigang Lei*, Biaohua Chen, Yoon-Mo Koo, (2017) "An introduction to ionic liquids" *Fundamentals of Ionic Liquids*, pp. 1–25. Available at: <https://doi.org/10.1002/9783527340033.ch1>.
- 11) Ohno, H., (2007) "Functional design of ionic liquids," *ChemInform*, 38(8), pp.1-17. Available at: <https://doi.org/10.1002/chin.200708227>.
- 12) Smith, Emma L., Abbott, Andrew P., Ryder, Karl S, (2014) "Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications", *Chemical Reviews*, 114 (21), 11060-11082, pp.135-207.

- 13) Hansen, Benworth B., Spittle, Stephanie, Chen, Brian, Poe, Derrick, Zhang, Yong, Klein, Jeffrey M., Horton, Alexandre, Adhikari, Laxmi, Zelovich, Tamar, Doherty, Brian W., Gurkan, Burcu, Maginn, Edward J., Ragauskas, Arthur, Dadmun, Mark, Zawodzinski, Thomas A., Baker, Gary A., Tuckerman, Mark E., (2021) "Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications", pp. 1232-1285 doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00385
- 14) Tomé, L.I.N. et al. (2018) "Deep eutectic solvents for the production and application of New Materials," *Applied Materials Today*, 10, pp. 30–50. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.11.005>.
- 15) Renuka Mani, Vijayakumar Natesan, (2018) "Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action", *Phytochemistry*, Volume 145, pp. 187-196, ISSN 0031-9422, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.016>.
- 16) Majid Zeinali, Seyed Abdolrahim Rezaee, Hossein Hosseinzadeh, (2017) "An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 92, pp. 998-1009, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.003>.
- 17) Shvendar Reddy Kasala, Lakshmi Narendra Bodduluru, Rajaram Mohanrao Madana, Athira K. V, Ranadeep Gogoi, Chandana C Barua, (2015) "Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives", *Toxicology Letters*, Volume 233, Issue 2, pp. 214-225, ISSN 0378-4274, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.01.008>.
- 18) Saima Naz, Muhammad Imran, Abdur Rauf, Ilkay Erdogan Orhan, Mohammad Ali Shariati, lahtisham-Ul-Haq, Iqra Yasmin, Muhammad Shahbaz, Tahira Batool Qaisrani, Zafar Ali Shah, Sergey Plygun, Mojtaba Heydari, (2019) "Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties", *Life Sciences*, Volume 235, pp. 235-239 ISSN 00243205, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116797>.
- 19) Hermenean, T. Mariasiu, I. Navarro-González, J. Vegara-Meseguer, E. Miutescu, S. Chakraborty, H. Perez-Sanchez, (2017) "Hepatoprotective activity of chrysin is mediated through TNF- α in chemically-induced acute liver damage: an in vivo study and molecular modeling", *Exp. Ther. Med.*, 13, pp. 1671-1680.
- 20) N. Rani, S. Bharti, J. Bhatia, T.C. Nag, R. Ray, D.S. Arya (2016) "Chrysin, a PPAR- γ agonist improves myocardial injury in diabetic rats through inhibiting AGE-RAGE mediated oxidative stress and inflammation", *Chem. Biol. Interact.*, 250, pp. 59-67.
- 21) S. Sultana, K. Verma, R. Khan (2012) "Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress", *J. Pharm. Pharmacol.*, 64, pp. 872-881.
- 22) M. Premalatha, C.S. Parameswari (2012) "Renoprotective effect of chrysin (5,7 dihydroxy flavone) in streptozotocin induced diabetic nephropathy in rats", *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 4, pp. 241-247.
- 23) P.A. Tsuji, T. Walle, (2008) "Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line", *Chem. Biol. Interact.*, 171, pp. 185-209.

- 24) Stompor-Gorący, M.; Bajek-Bil, A.; Machaczka, M.,(2021) "Chrysin: Perspectives on Contemporary Status and Future Possibilities as Pro-Health Agent", *Nutrients* , 13, pp.20-38. <https://doi.org/10.3390/nu13062038>.
- 25) Xiaodan Li, Nannan Ma, Lijing Zhang, Guixia Ling, Peng Zhang, (2022) "Applications of choline-based ionic liquids in drug delivery",*International Journal of Pharmaceutics*,Volume 612,121366,ISSN 0378-5173,<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121366>.
- 26) Steven H. Zeisel , Marie A. Caudill, (2010)"Choline, *Advances in Nutrition*", Volume 1, Issue 1, pp. 46–48, <https://doi.org/10.3945/an.110.1010>
- 27) Takeda, J. et al., (2021) "Structural evaluation of the choline and geranic acid/water complex by SAXS and NMR analyses", *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(2), pp. 595–604. doi:10.1021/acsbomaterials.0c01324.
- 28) Riaz, M. et al. (2022) "An overview of biomedical applications of Choline Geranate (CAGE): A major breakthrough in Drug Delivery," *RSC Advances*, 12(40), pp. 25977–25991. Available at: <https://doi.org/10.1039/d2ra03882j>.
- 29) Chowdhury, M.R., Nurunnabi, M. and Goto, M. ,(2021) "Design principles for ionic liquids in Drug Delivery Systems," *Application of Ionic Liquids in Drug Delivery*, pp. 1–12. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-16-4365-1_1.
- 30) Boscaroli, R. et al., (2021) "Performance of choline geranate deep eutectic solvent as transdermal permeation enhancer: An in vitro skin histological study," *Pharmaceutics*, 13(4), p. 540. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040540>.
- 31) Eden E. L. Tanner, Kathryn M. Piston, Huilin Ma, Kelly N. Ibsen, Shikha Nangia, and Samir Mitragotri, (2019) "The influence of water on choline-based ionic liquids" *ACS Biomaterials Science&Engineering* , 5 (7), 3645-3653 .Availableat: <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b00243.s001>.
- 32) Eden E. L. Tanner, Kathryn M. Piston, Huilin Ma, Kelly N. Ibsen, Shikha Nangia, and Samir Mitragotri, (2019)"The influence of water on choline-based ionic liquids and CAGE" *ACS Biomaterials Science&Engineering* , 5 (7),3645-3653.Available at: <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b00243.s001>.
- 33) C. Agatemor, T. D. Brown, Y. Gao, N. Ohmori, K. N. Ibsen and S. Mitragotri, Choline- (2021)"Geranate Deep Eutectic Solvent Improves Stability and Half-Life of Glucagon-Like Peptide-1", *Adv. Ther.*, 4, 2000180 pp.250-255.
- 34) A. N. Hernandez, R. Boscaroli, V. M. Balcão and M. M. Vila, (2021) "Transdermal Permeation of Caffeine Aided by Ionic Liquids: Potential for Enhanced Treatment of Cellulite", *AAPS PharmSciTech*, 22, pp. 1–9.
- 35) J. Ko, A. Mandal, S. Dhawan, M. Shevachman, S. Mitragotri and N. Joshi, (2021) "Clinical translation of choline and geranic acid deep eutectic solvent", *Bioeng. Transl. Med.*, 6, e10191

- 36) Takeda, J. *et al.* (2021) "Structural evaluation of the choline and geranic acid/water complex by SAXS and NMR analyses," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(2), pp. 595–604. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01324>.
- 37) Riaz, M. *et al.* (2022) "An overview of biomedical applications of Choline Geranate (CAGE): A major breakthrough in Drug Delivery," *RSC Advances*, 12(40), pp. 25977–25991. Available at: <https://doi.org/10.1039/d2ra03882j>.
- 38) Boly, R., Lamkami, T., Lompo, M., Dubois, J., & Guissou, I. P., (2016) "DPPH Free Radical Scavenging Activity of Two Extracts from *Agelanthusdoneifolius* (Loranthaceae) Leaves", *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 9 (1), 29-34.
- 39) Rajan, M., Prabhavathy, A., & Ramesh, U. ,(2015) "Natural Deep Eutectic Solvent Extraction Media for *Zingiber officinale* Roscoe: The Study of Chemical Compositions, Antioxidants and Antimicrobial Activities", *The Natural Products Journal*, 5 (1), pp.3-13.
- 40) Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.-E., Abdelly, C., & Magné, C., (2012) " Ultrasound-Assisted Extraction: Effect of Extraction Time and Solvent Power on the Levels of Polyphenols and Antioxidant Activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae Shoots", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (2), pp.243-249.
- 41) Hsieh, Y.-H., Li, Y., Pan, Z., Chen, Z., Lu, J., Yuan, J., *et al.*, (2019)" Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger", *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104915,pp 1-15.
- 42) El Kantar, S., N. Rajha, H., Boussetta, N., Vorobiev, E., G. Maroun, R., & Louka, N., (2019) "Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol", *Food Chemistry*, 295, pp.165-171.
- 43) Kwon, G.S. and Okano, T., (1996) "Polymeric micelles as new drug carriers," *Advanced Drug Delivery Reviews*, 21(2), pp. 107–116. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(96\)00401-2](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(96)00401-2).
- 44) Y Chevalier and T Zemb Auvray, L.,(1994) "The structure of microemulsions: Experiments," *Partially Ordered Systems*, Rep. Prog. Phys. 53 279 pp. 347–393. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8389-5_7.
- 45) Justyna Płotka-Wasyłka, Miguel de la Guardia, Vasil Andrich, Mária Vilková, (2020) "Deep eutectic solvents vs ionic liquids: Similarities and differences", *Microchemical Journal*, Volume 159,105539,ISSN0026-265X,Available at: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105539>.
- 46) Deldar, Y. *et al.*, (2017) "An *in vitro* examination of the antioxidant, cytoprotective and anti-inflammatory properties of chrysin-loaded nanofibrous mats for potential wound healing applications," *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(4), pp. 706–716. Available at: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1337022>.
- 47) Bhat, A.R. *et al.* (2022) "Aggregation, wettability and radical scavenging activity of choline based ionic liquids in aqueous solution," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and*

Engineering Aspects, 650, pp. 129-388. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129388>.

48) Ami R Patel¹, Dr. V G Patel ,(2017) "RP-HPLC method development and validation for the analysis of pharmaceutical drug" ,*International Journal of Science and Research (IJSR)*, 6(7), pp. 1318–1320. Available at: <https://doi.org/10.21275/art20175544>.

49) Sahu, P.K. *et al.*,(2018) "An overview of experimental designs in HPLC method development and validation," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, pp. 590–611. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006>.

50) Khadijah A. Altammar S.I.: SPRINGER NATURE.,(2023) "A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges", *Journal: Frontiers in Microbiology*, Volume 14DOI: 10.3389/fmicb.2023.1155622.

51) Nobbmann, U. *et al.*, (2007) "Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies", *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 24(1), pp. 117–128. doi:10.1080/02648725.2007.10648095.

52) Crucho, C.I.C. and Barros, M.T. (2017) "Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods", *Materials Science and Engineering: C*, 80, pp. 771–784. doi:10.1016/j.msec.2017.06.004.

53) Rozo, A.J. *et al.* (2020) "Biophysical analysis of lipidic nanoparticles", *Methods*, 180, pp. 45–55. doi:10.1016/j.ymeth.2020.05.001.

54) Hole, P. *et al.* (2013) "Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)", *Journal of Nanoparticle Research*, 15(12). doi:10.1007/s11051-013-2101-8.

55) Gardiner, C. *et al.* (2013) "Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis", *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1), p. 19671. doi:10.3402/jev.v2i0.19671.

56) GARG, A., AGRAWAL, G.P. and K., S. (2019) "Development and validation of reversed phase HPLC-PDA method for the quantification of Chrysin in solid lipid nanoparticles", *International Journal of Applied Pharmaceutics*, pp. 324–328. doi:10.22159/ijap.2019v11i5.33904.

57) Amaro-Gahete, J. *et al.*, (2019) "A comparative study of particle size distribution of graphene nanosheets synthesized by an ultrasound-assisted method", *Nanomaterials*, 9(2), p. 152. doi:10.3390/nano9020152.

58) Ibsen, K.N. *et al.*, (2018) "Mechanism of antibacterial activity of choline-based ionic liquids (cage)", *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(7), pp. 2370–2379. doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00486.

- 59) Nikolovska-Čoleska et al. ,(1996) "First and second derivative spectrophotometric determination of flavonoids chrysin and quercetin", *Analytical Letters*, 29(1), pp. 97–115. doi:10.1080/00032719608000395.
- 60) Zakrewsky, M. et al. (2016) "Choline and geranate deep eutectic solvent as a broad-spectrum antiseptic agent for preventive and therapeutic applications", *Advanced Healthcare Materials*, 5(11), pp. 1282–1289. doi:10.1002/adhm.201600086.
- 61) Tamar L. Greaves and Calum J. (2008) "Drummond,Protic imidazolium cation-based ionic liquids show unexpected interfacial properties", *Chemical Reviews* 108 (1), pp.206-237, doi:10.1021/acs.langmuir.0c01257.s001.
- 62) Singh, S.K. and Savoy, A.W. (2020) "Ionic liquids synthesis and applications: An overview", *Journal of Molecular Liquids*, 297, p. 112038. doi:10.1016/j.molliq.2019.112038.
- 63) Τα γραφήματα στο graphical abstract δημιουργήθηκαν μέσω της εφαρμογής mind the graph.
- 64) Για την παρουσίαση της βιβλιογραφίας χρησιμοποιήθηκε η δωρεάν έκδοση του site : cite this for me και επιλέχθηκε η μορφή Harvard.

6.1 Βιβλιογραφία Σχημάτων

Εικόνα 1: Sahoo, S.K. and Labhasetwar, V. (2003) "Nanotech approaches to drug delivery and imaging," *Drug Discovery Today*, 8(24), pp. 1112–1120. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(03\)02903-9](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(03)02903-9).

Εικόνα 2: Jianxiang Zhang, Peter X. Ma, (2013)"Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective",*Advanced Drug Delivery Reviews*,Volume 65, Issue 9,pp. 1215-1233,ISSN 0169-409X,<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.001>.

Εικόνα 3: Smith, Emma L.,Abbott, Andrew P.Ryder, Karl S (2014)"Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications", *Chemical Reviews* 2014 114 (21), 11060-11082,pp.135-207.

Εικόνα 4: Riaz, M. et al. (2022) "An overview of biomedical applications of Choline Geranate (CAGE): A major breakthrough in Drug Delivery," *RSC Advances*, 12(40), pp. 25977–25991. Available at :<https://doi.org/10.1039/d2ra03882j>.

Εικόνες 5,7,8,9,10: Riaz, M. et al. (2022) "An overview of biomedical applications of Choline Geranate (CAGE): A major breakthrough in Drug Delivery," *RSC Advances*, 12(40), pp. 25977–25991. Available at: <https://doi.org/10.1039/d2ra03882j>.

Εικόνα 6: Chowdhury, M.R., Nurunnabi, M. and Goto, M. (2021) "Design principles for ionic liquids in Drug Delivery Systems," *Application of Ionic Liquids in Drug Delivery*, pp. 1–12. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-16-4365-1_1.

Εικόνες 11,12: Renuka Mani, Vijayakumar Natesan,(2018)"Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action",*Phytochemistry*,Volume 145,pp. 187-196,ISSN 0031-9422,<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.016>

Εικόνα 13: Boly, R., Lamkami, T., Lompo, M., Dubois, J., & Guissou, I. P. (2016)"DPPH Free Radical Scavenging Activity of Two Extracts from *Agelanthusdodoneifolius* (Loranthaceae) Leaves", *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 9 (1), 29-34.

Εικόνα 14: Crucho, C.I.C. and Barros, M.T. (2017) 'Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods', *Materials Science and Engineering: C*, 80, pp. 771–784. doi:10.1016/j.msec.2017.06.004.

Εικόνα 15: Ami R Patel¹, Dr. V G Patel (2017) "RP-HPLC method development and validation for the analysis of pharmaceutical drug" ,*International Journal of Science and Research (IJSR)*, 6(7), pp. 1318–1320. Available at: <https://doi.org/10.21275/art20175544>.

Εικόνες 16: Khadijah A. Altammar S.I.: SPRINGER NATURE., (2023) "A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges", *Journal: Frontiers in Microbiology*, Volume 14DOI: 10.3389/fmicb.2023.1155622.

Εικόνα 17: Roza, A.J. *et al.* ,(2020) "Biophysical analysis of lipidic nanoparticles", *Methods*, 180, pp. 45–55. doi:10.1016/j.ymeth.2020.05.001.

Εικόνα 18: Hole, P. *et al.* ,(2013) "Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)", *Journal of Nanoparticle Research*, 15(12). doi:10.1007/s11051-013-2101-8.

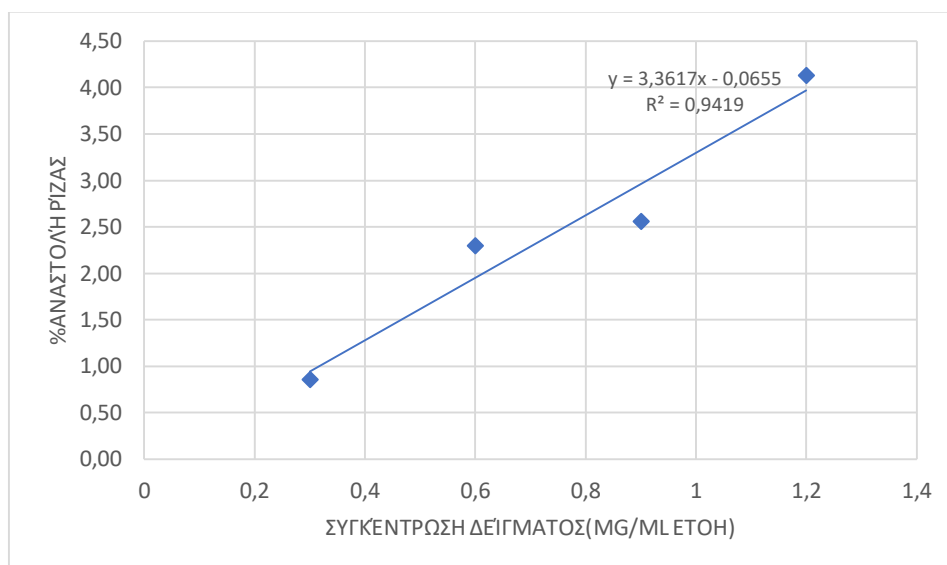
Εικόνα 20: Takeda, J. *et al.*, (2021) "Structural evaluation of the choline and geranic acid/water complex by SAXS and NMR analyses," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(2), pp. 595–604. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.0c01324>.

Εικόνα 21: Takeda, J. *et al.* ,(2021) 'Structural evaluation of the choline and geranic acid/water complex by SAXS and NMR analyses', *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(2), pp. 595–604. doi:10.1021/acsbmaterials.0c01324.

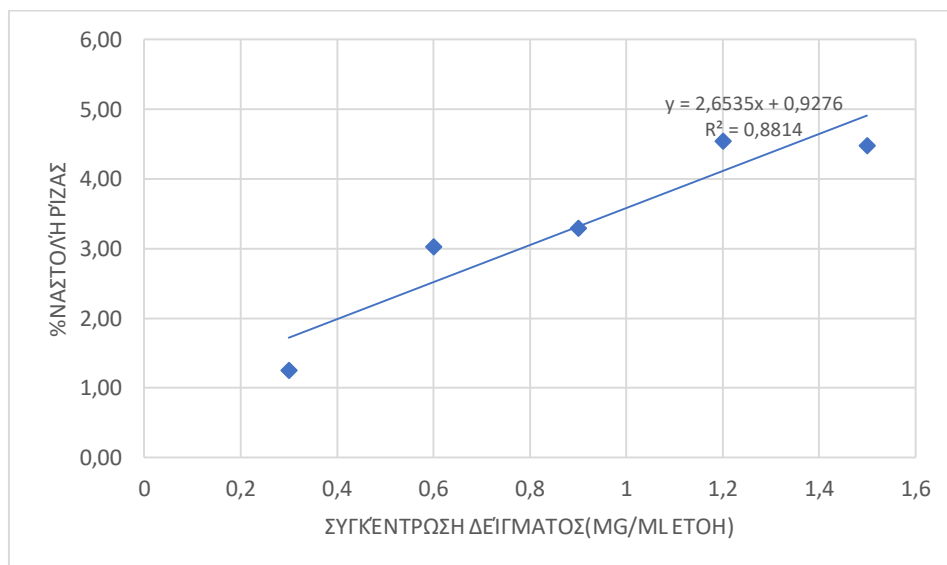
Υπόλοιπες εικόνες : Οι εικόνες που δεν αναφέρεται η βιβλιογραφία τους παραπάνω λήφθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

7. Παράρτημα

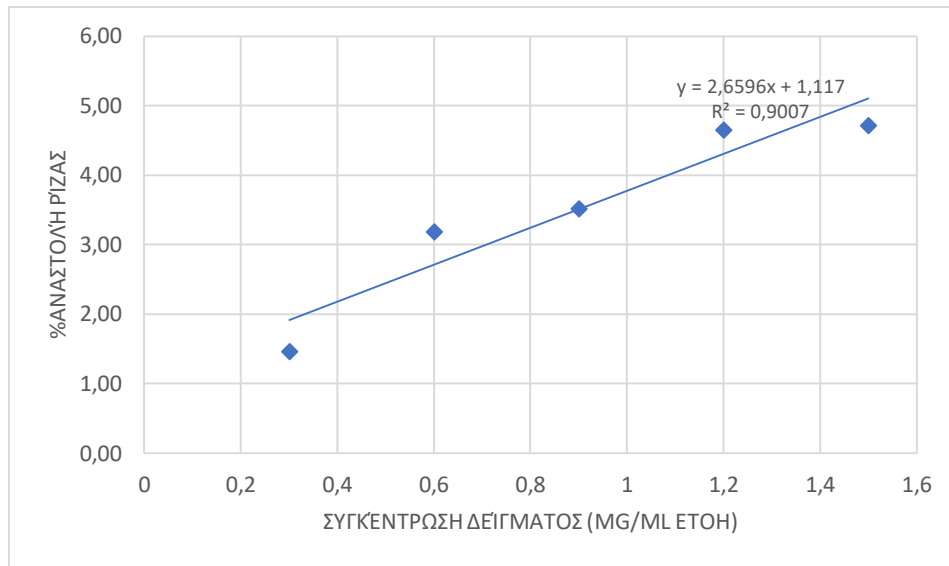
Γράφημα 36 :Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος Chrysin και χρόνο επώασης 15 min



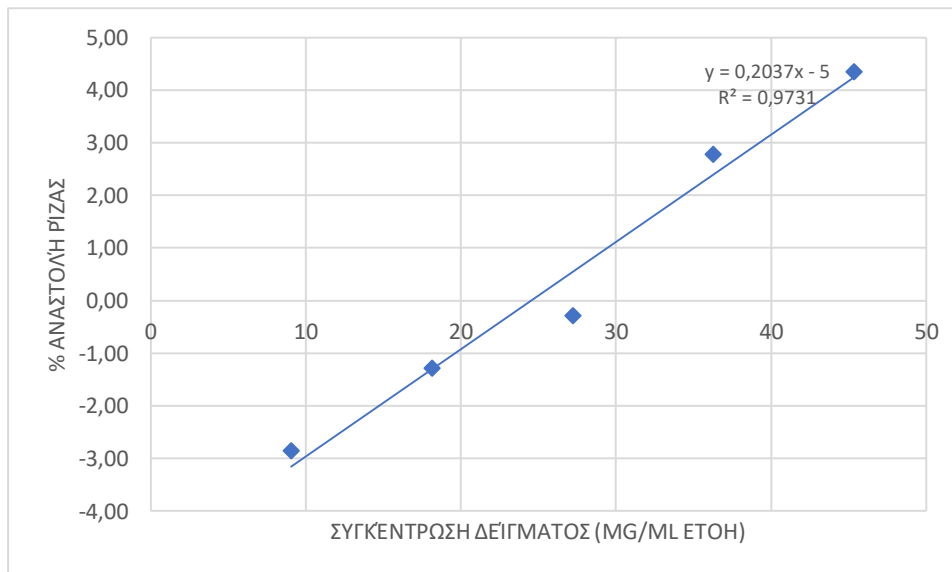
Γράφημα 37: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος Chrysin και χρόνο επώασης 30 min



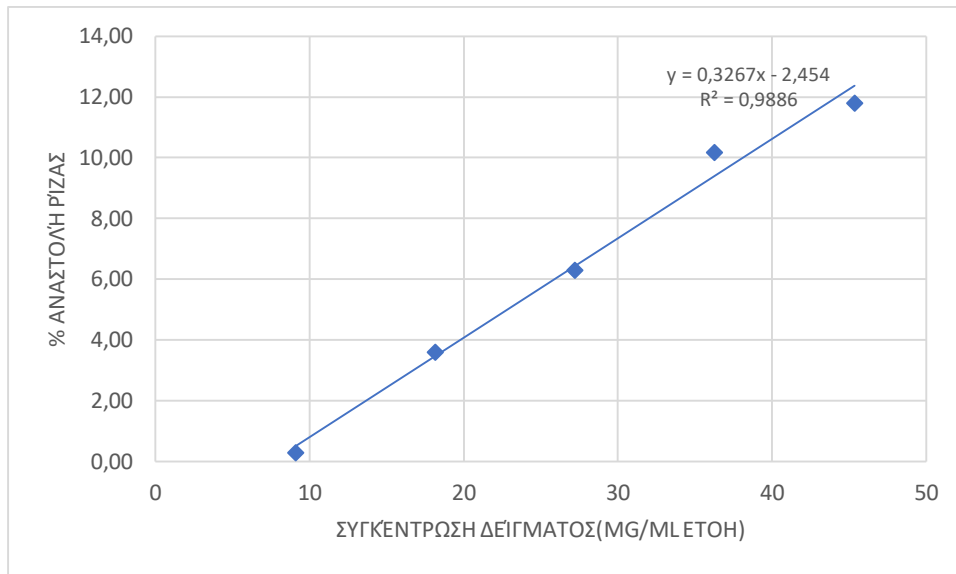
Γράφημα 38: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος Chrysin και χρόνο επώασης 60min



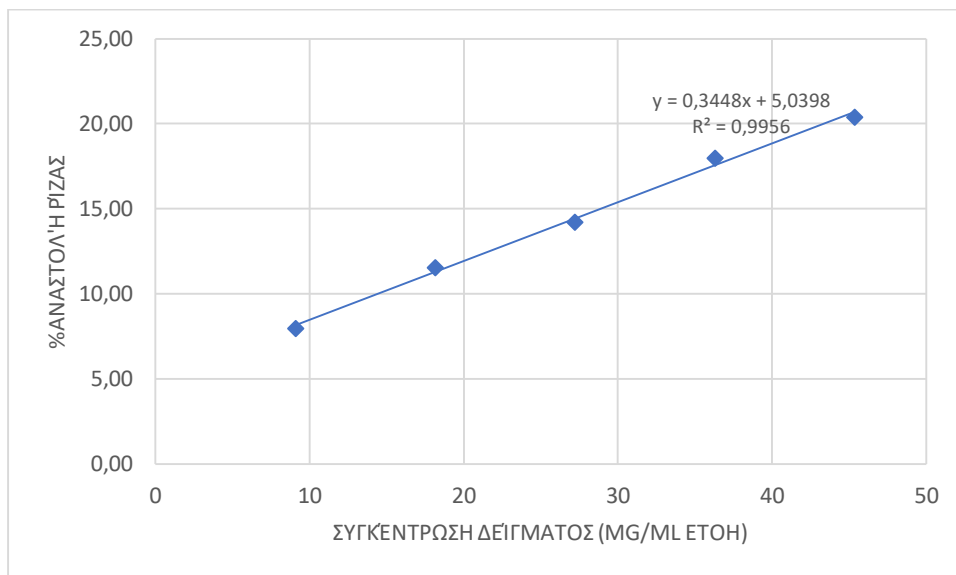
Γράφημα 39: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 15min



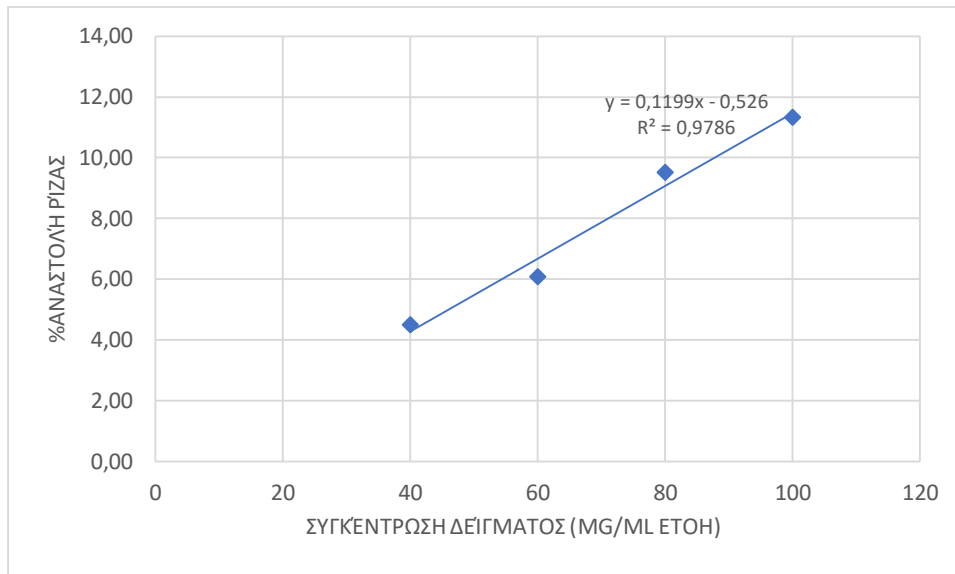
Γράφημα 40 :Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 30min



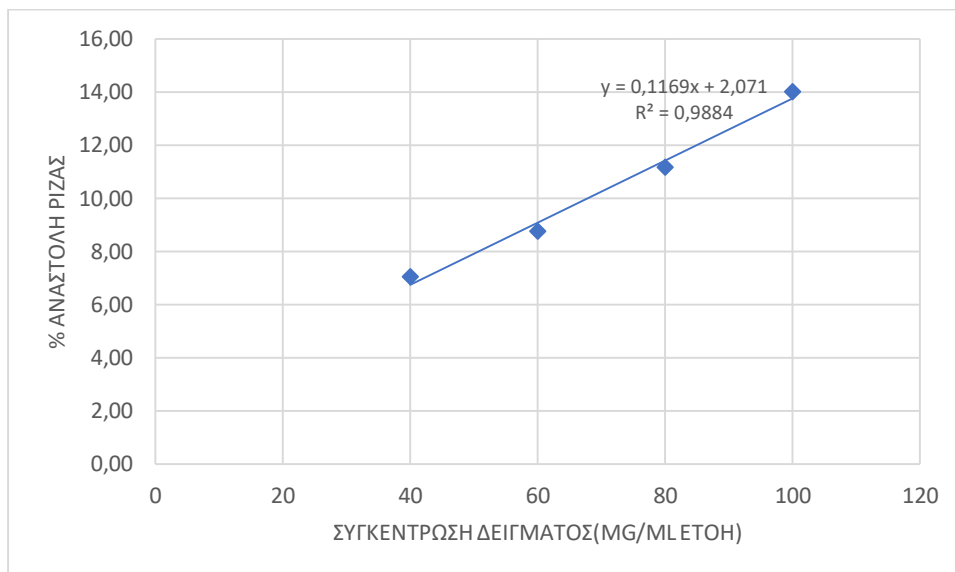
Γράφημα 41 :Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 60min



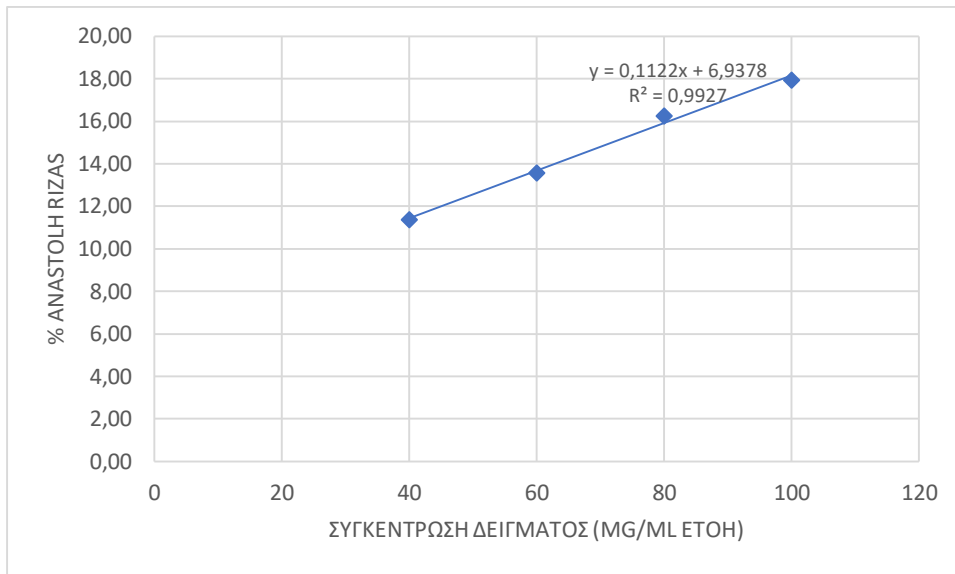
Γράφημα 42: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 15min



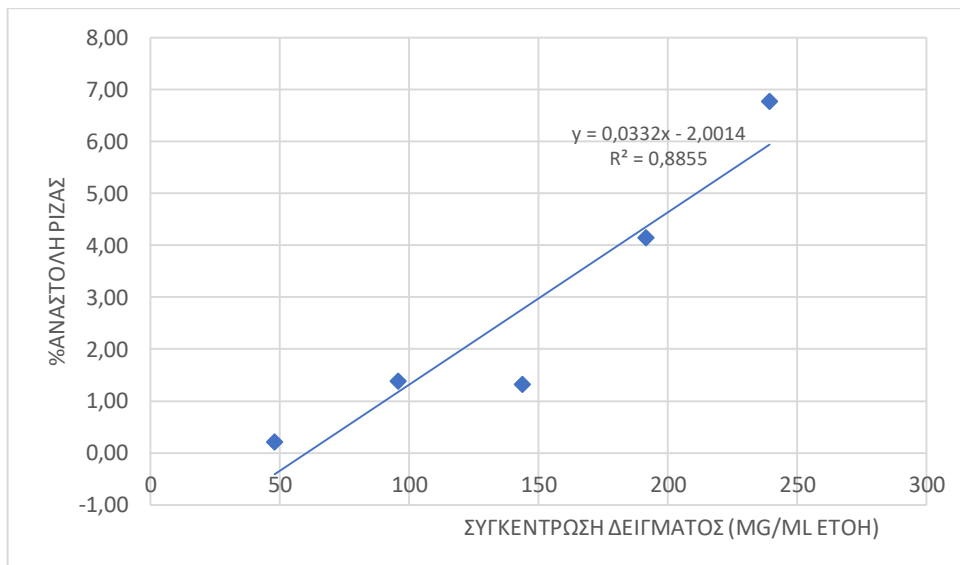
Γράφημα 43 :Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 30min



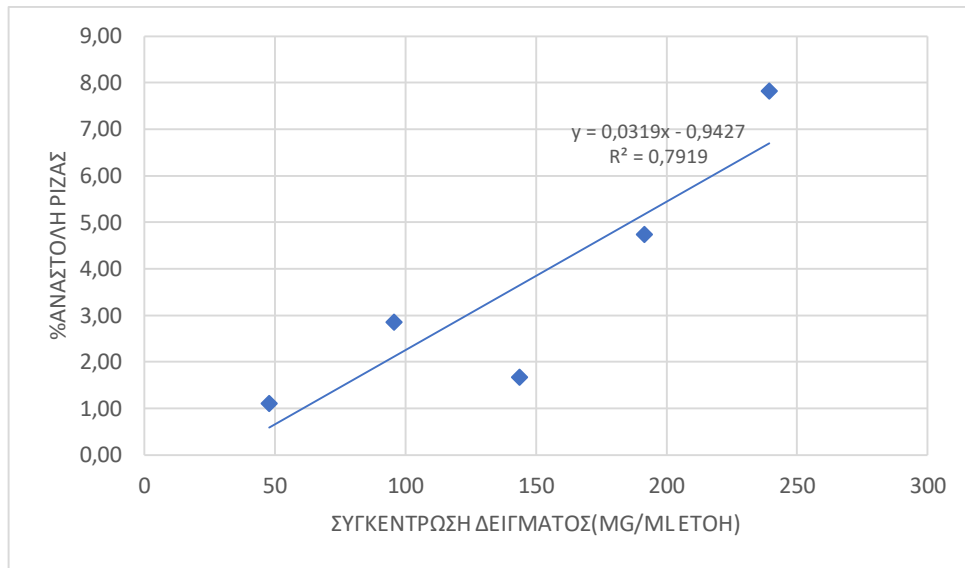
Γράφημα 44: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:1 και χρόνο επώασης 60min



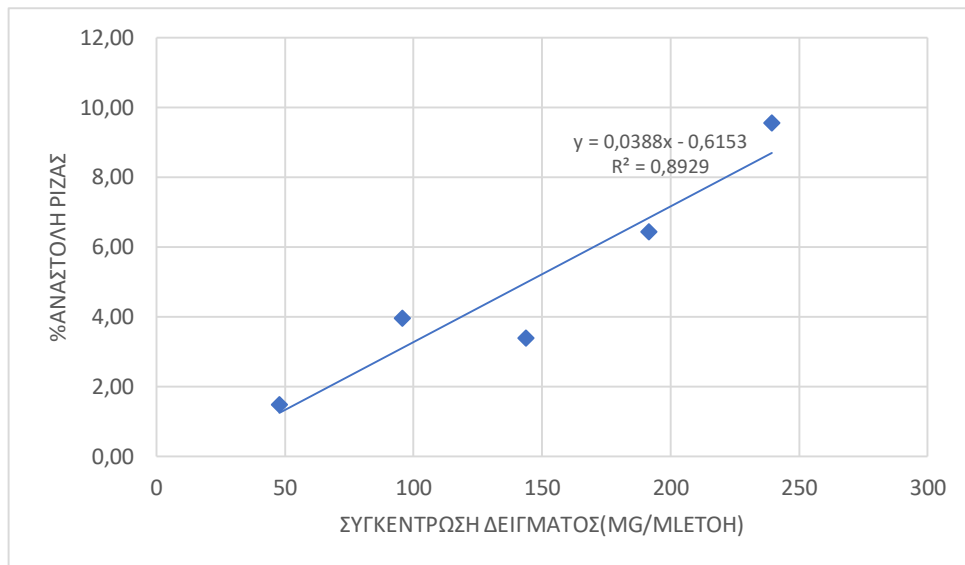
Γράφημα 45: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:1 συγκέντρωσης 5mg/g και χρόνο επώασης 15min



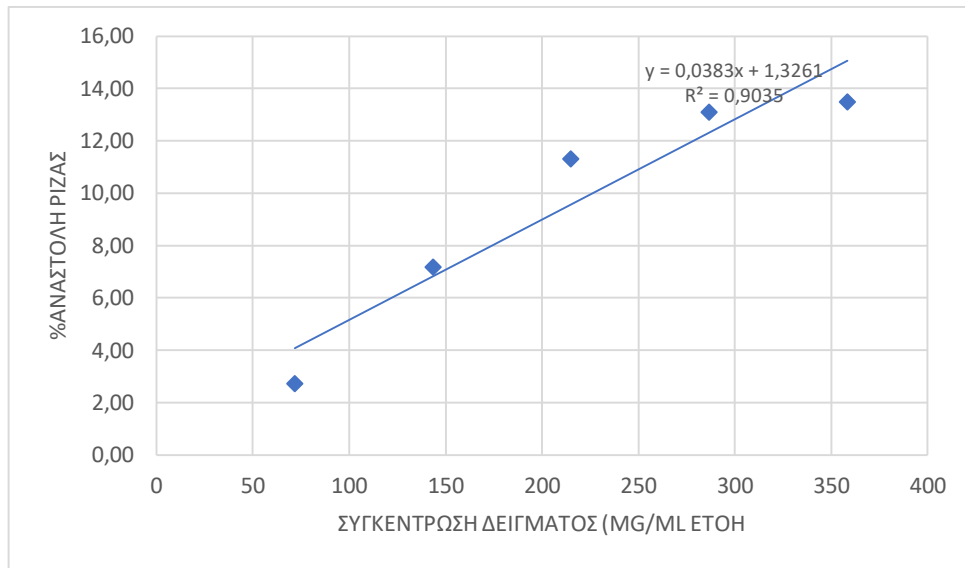
Γράφημα 46: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:1 συγκέντρωσης 5mg/g και χρόνο επώασης 30min



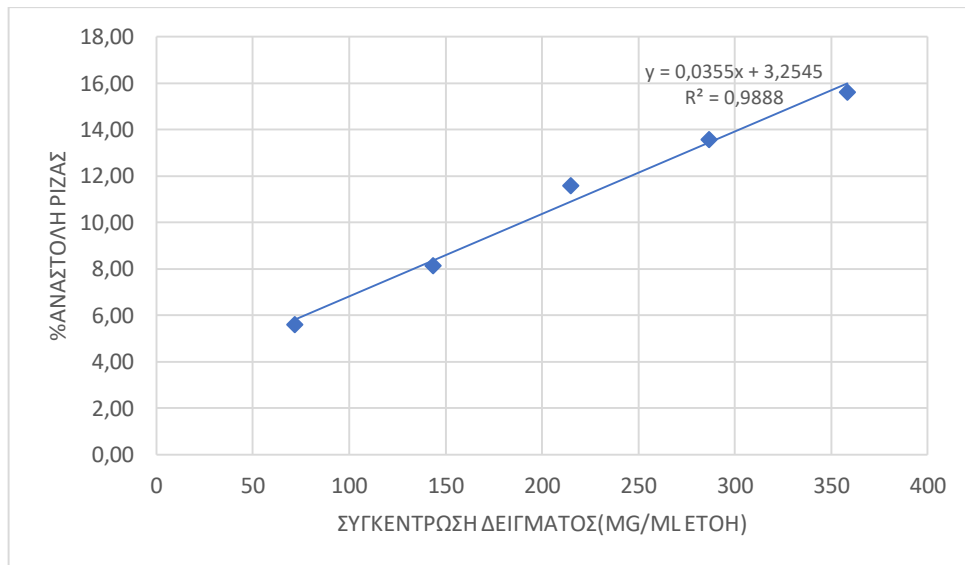
Γράφημα 47 :Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:1 συγκέντρωσης 5mg/g και χρόνο επώασης 60 min



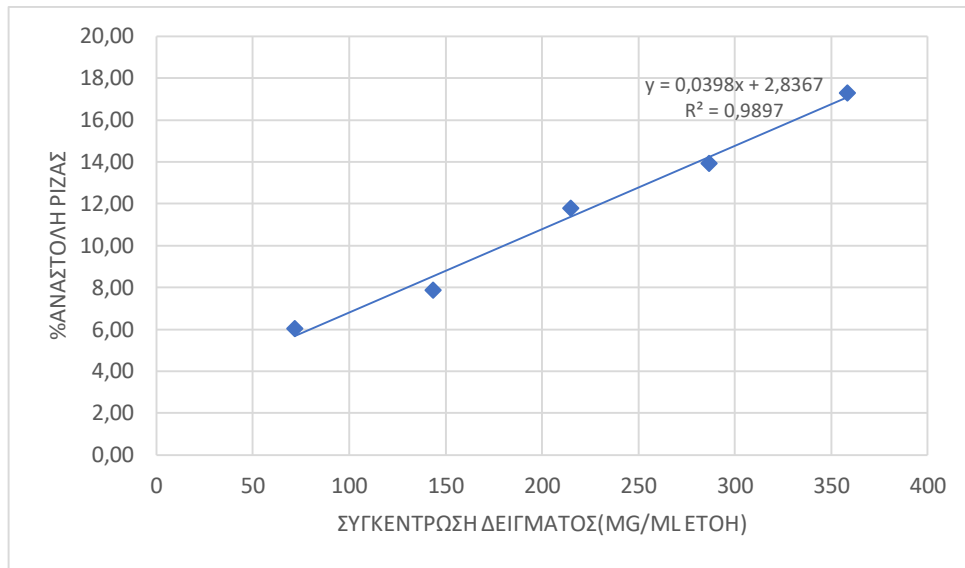
Γράφημα 48: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:1 συγκέντρωσης 5mg/g και χρόνο επώασης 15min



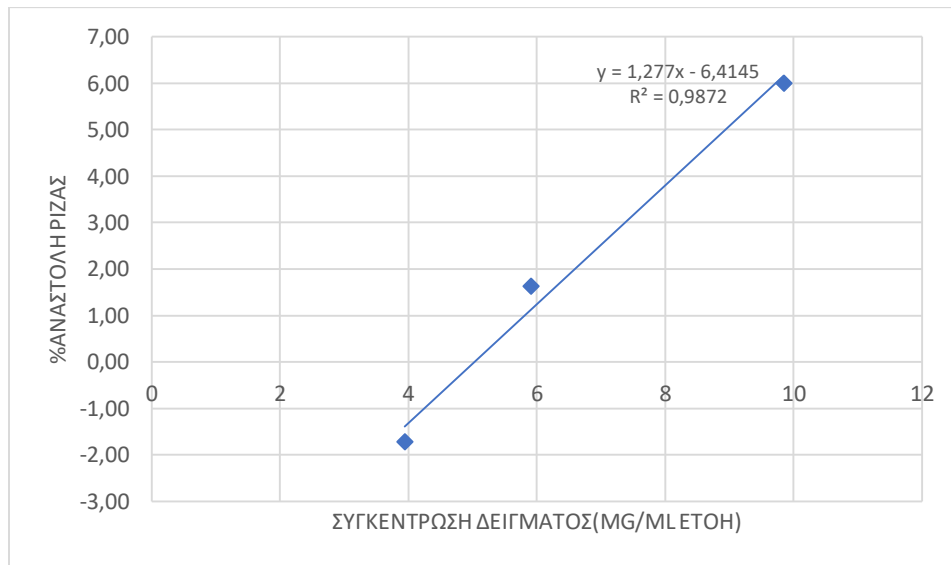
Γράφημα 49: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:1 συγκέντρωσης 5mg/g και χρόνο επώασης 30min



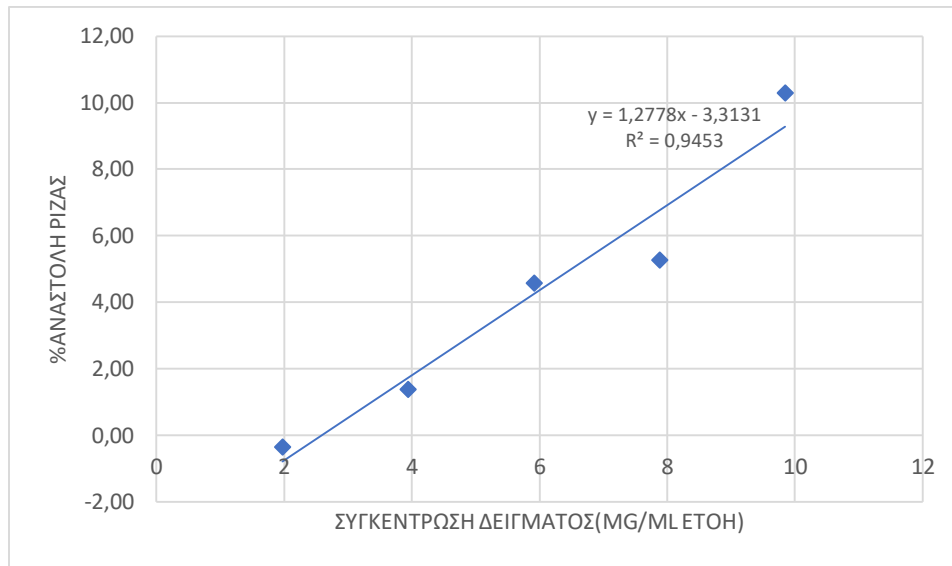
Γράφημα 50 : Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:1 συγκέντρωσης 5mg/g και χρόνο επώασης 60min



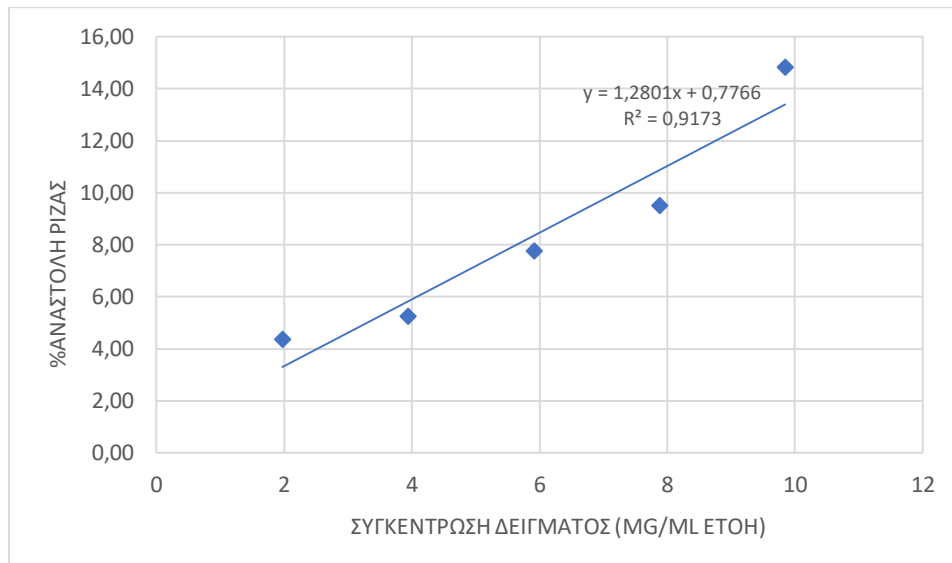
Γράφημα 51: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:2 και χρόνο επώασης 15min



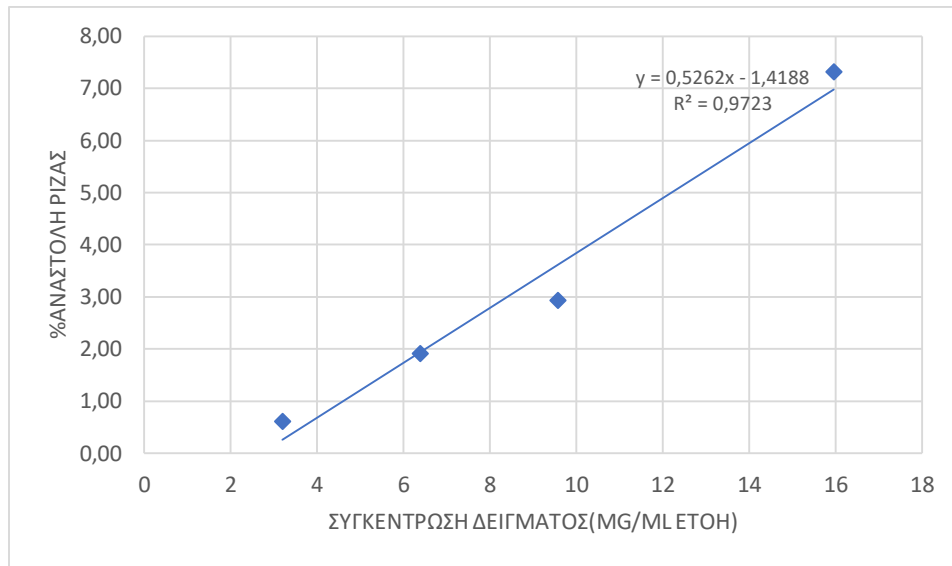
Γράφημα 52: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:2 και χρόνο επώασης 30min



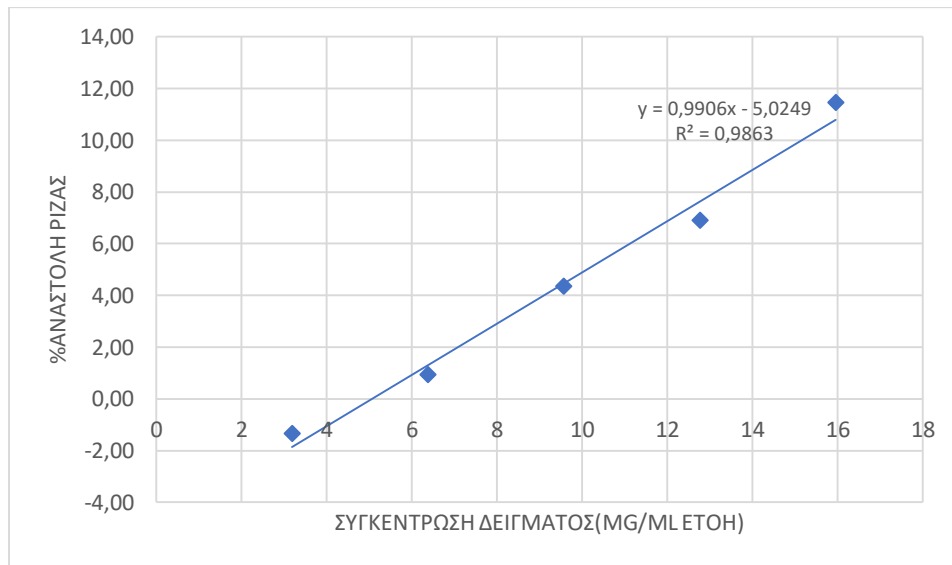
Γράφημα 53: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:2 και χρόνο επώασης 60min



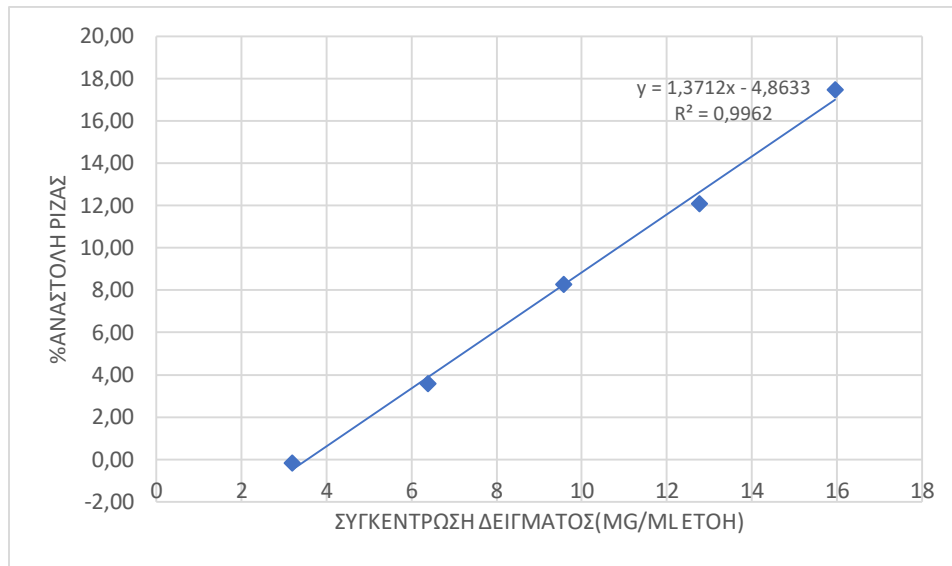
Γράφημα 54 :Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:2 και χρόνο επώασης 15min



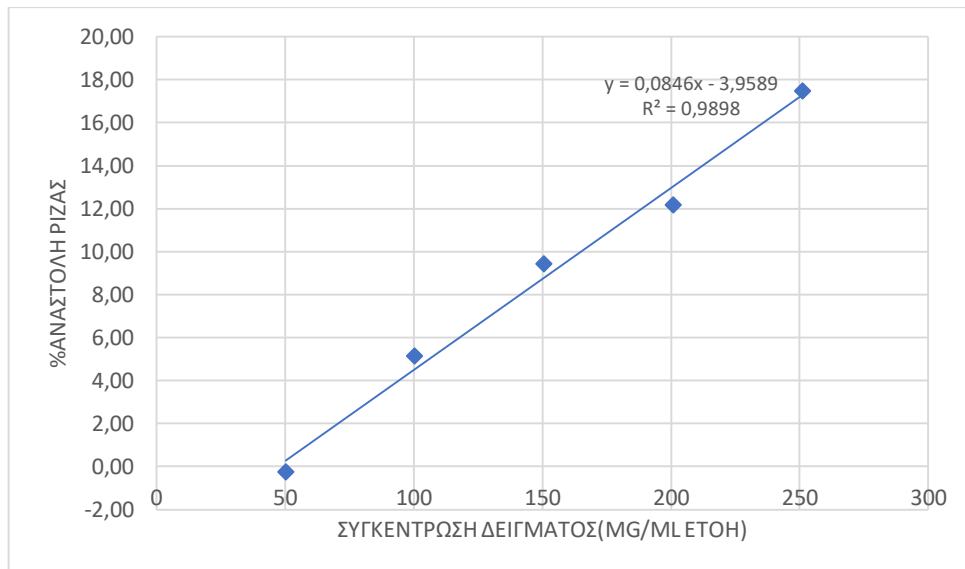
Γράφημα 55 :Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:2 και χρόνο επώασης 30min



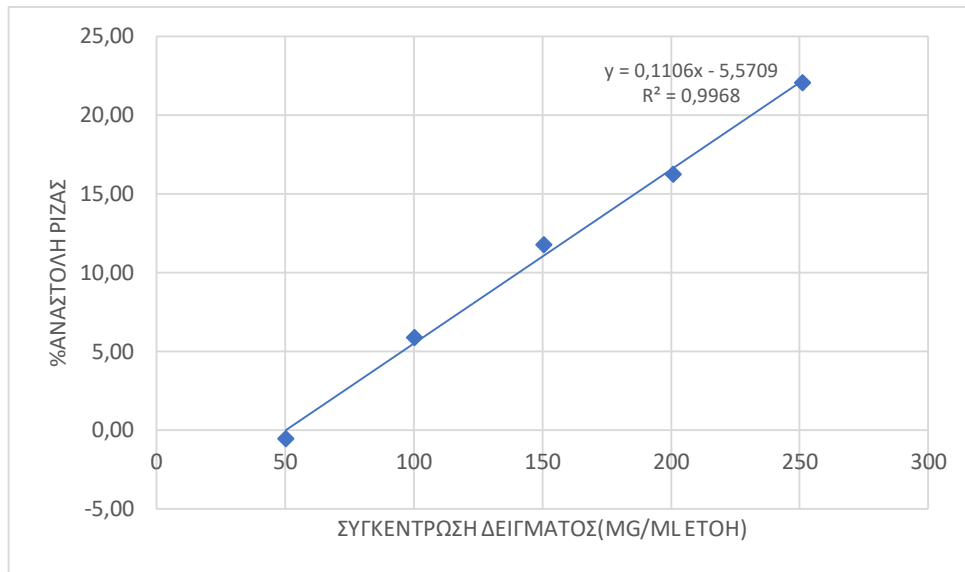
Γράφημα 56: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος CAGE 1:2 και χρόνο επώασης 60min



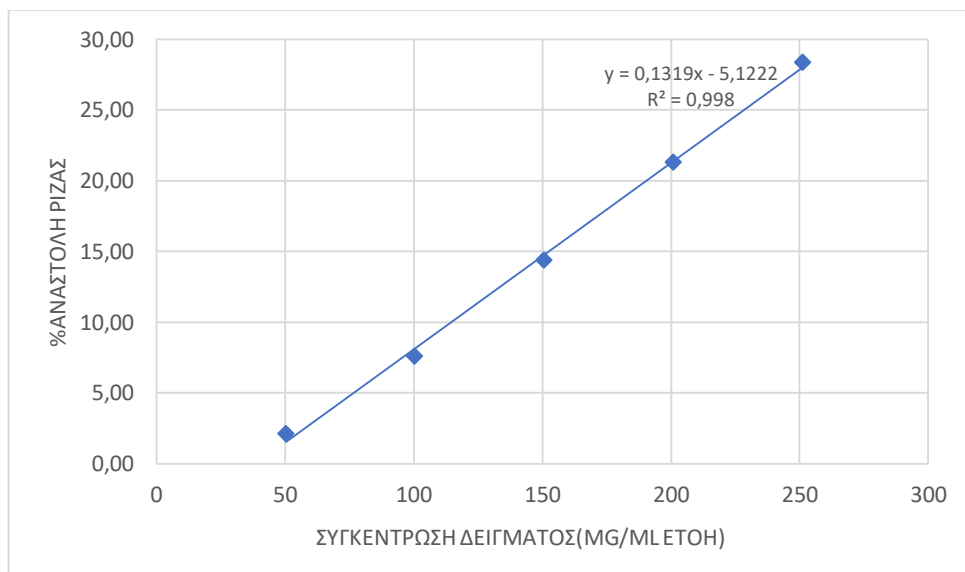
Γράφημα 57: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:2 συγκέντρωσης 1mg/g και χρόνο επώασης 15min



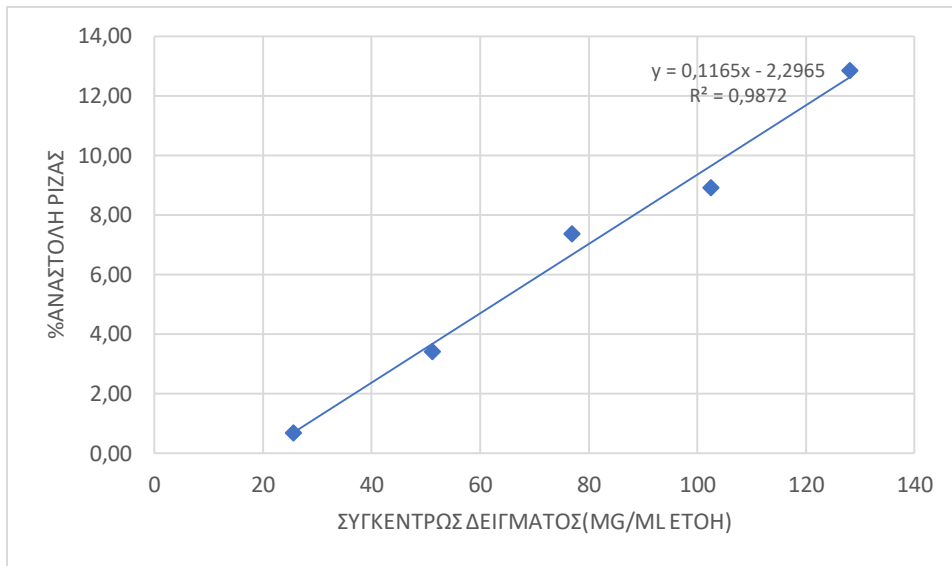
Γράφημα 58: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:2 συγκέντρωσης 1mg/g και χρόνο επώασης 30min



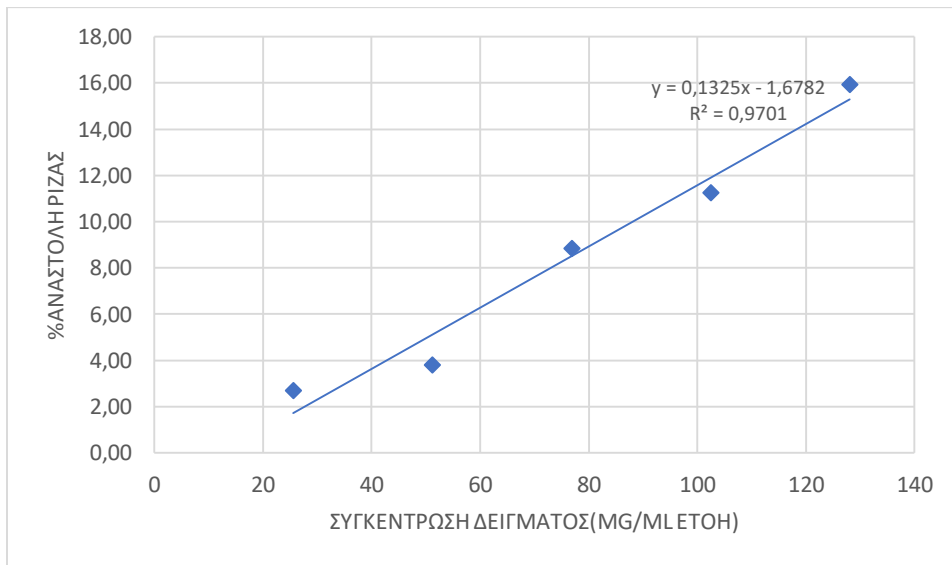
Γράφημα 59: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:2 συγκέντρωσης 1mg/g και χρόνο επώασης 60min



Γράφημα 60: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:2 συγκέντρωσης 20mg/g και χρόνο επώασης 15min



Γράφημα 61: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:2 συγκέντρωσης 20mg/g και χρόνο επώασης 30min



Γράφημα 62: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH της συγκέντρωσης διαλύματος του δείγματος εγκλεισμού της χρυσίνης με CAGE 1:2 συγκέντρωσης 20mg/g και χρόνο επώασης 60min

