



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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

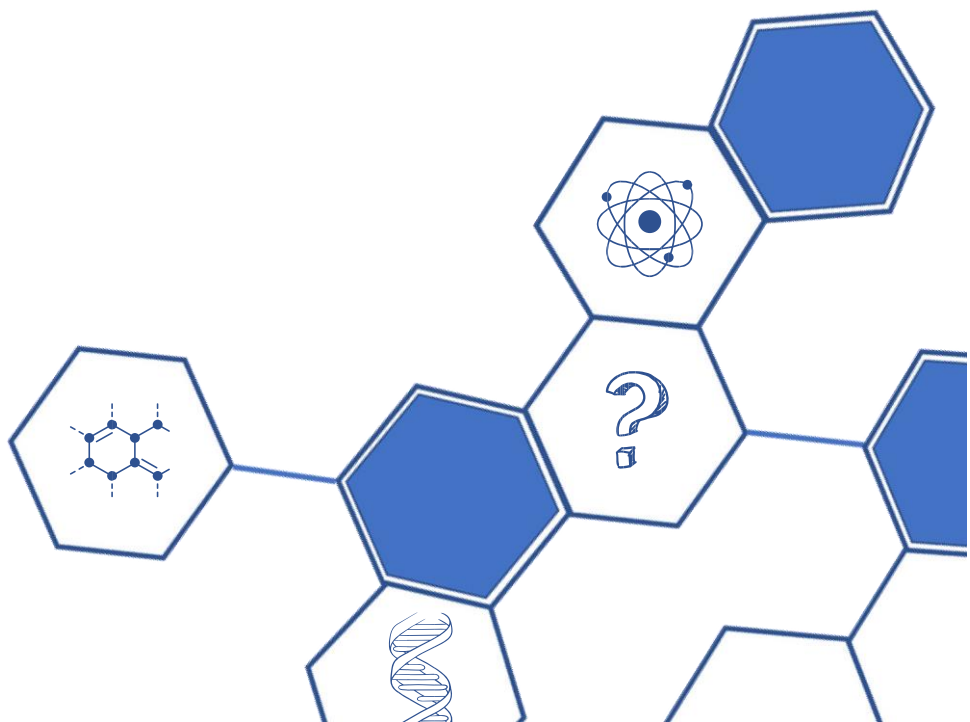
**Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πράσινων
διεργασιών εγκλωβισμού νέων αντηλιακών
φίλτρων σε νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς**

Μαριάννα- Φανουρία Μητσιώνη

Επιβλέπουσα:

Αναστασία Δέτση, Καθηγήτρια
ΕΜΠ

Αθήνα 2023



Στην αδερφή μου, Ναταλία

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε.Μ.Π., Δρ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023.

Αυτή η εργασία σηματοδοτεί το τέλος ενός πενταετούς κύκλου σπουδών και επιστημονικής κατάρτισης. Παρόλο που ένα όμορφο ταξίδι ολοκληρώνεται οι αναμνήσεις που αποκόμισα καθώς και οι άνθρωποι που γνώρισα θα με κάνουν να θυμάμαι αυτά τα χρόνια για πάντα. Είμαι τυχερή να έχω δίπλα μου φίλους (συναδέλφους και μη) και αγαπημένους μου ανθρώπους που πάντα με στήριζαν και συνεχίζουν να με στηρίζουν. Τόσο στα προηγούμενα χρόνια όσο και κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διπλωματικής εργασίας δεν θα μπορούσα να τα είχα καταφέρει χωρίς αυτούς και γι' αυτό θα ήθελα να τους ευχαριστήσω.

Αρχικά, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ από καρδιάς στην Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Δρ. Αναστασία Δέτση που για δύο χρόνια λειτούργησε πραγματικά σαν μέντορας. Με δίδαξε ακόμα και από τα αρχικά προπτυχιακά μου χρόνια πως λειτουργεί η έρευνα και η επιστήμη καθώς και πώς οφείλει κάποιος να την χρησιμοποιεί για το κοινό καλό και θα αποτελεί πάντα έναν άνθρωπο που θαυμάζω για το ήθος της και την ποιότητά της ως εκπαιδευτικός.

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

Επιπλέον, οφείλω ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. και κυρίως στην Ιωάννα Πιττερού, υποψήφια διδάκτορα και πλέον καλή μου φίλη, για την άρτια συνεργασία μας. Η κατάρτιση της, το επιστημονικό της υπόβαθρο και η εμπειρία της συντέλεσαν στη δημιουργία ενός άψογου κλίματος και αξέχαστων αναμνήσεων. Θα είναι πάντα μεγάλη μου τιμή που συνεργάστηκα μαζί της. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ανδρομάχη Τζάνη, την Ιωάννα Κωστοπούλου και την Στέλλα Καλαφατέλη. Χωρίς την βοήθειά τους το αποτέλεσμα της διπλωματικής μου εργασίας δεν θα ήταν το ίδιο.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών, την εταιρεία Cellco Chemical SA και το Ερευνητικό Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία - HemQcR του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής για την ανιδιοτελή παροχή του εργαστηριακού τους εξοπλισμού. Η συμβολή τους ήταν καθοριστική και τους ευχαριστώ βαθύτατα που μου επέτρεψαν να αξιοποιήσω τις εγκαταστάσεις τους για την πραγματοποίηση ορισμένων μετρήσεων.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αδερφή μου οι οποίοι ήταν πάντα δίπλα μου και με υποστήριζαν με κάθε τρόπο. Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου και τους αγαπημένους μου για το πόσο όμορφα κάνανε όλα αυτά τα χρόνια για μένα. Γέμισαν τις σπουδές μου με υπέροχες αναμνήσεις και συζητήσεις οι οποίες μου έχουν μείνει για πάντα στο μυαλό. Σας ευχαριστώ λοιπόν Ζωή, Ναταλία, Ισμήνη, Μαρία, Αγγελική, Χάρη, Θανάση, Ανδρέα, Πέτρο για όλα αυτά που μου έχετε προσφέρει. Είμαι τυχερή που σας γνωρίζω και ελπίζω όσο διαφορετικά μονοπάτια και να διαλέξουμε στην ζωή να συνεχίσουμε να δημιουργούμε όμορφες αναμνήσεις παρέα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι υπεύθυνη για οξείες και χρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο δέρμα. Τα τελευταία χρόνια, έχει αποδειχθεί πως διάφορα φαινορικά οξέα, όπως παράγωγα του κινναμμωμικού και του φερουλικού οξέος, προλαμβάνουν κάποιες από τις επιπτώσεις αυτές. Όμως, τα παραπάνω παράγωγα απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία ως επί το πλείστον στην περιοχή UVB, ενώ χαρακτηρίζονται από μικρή διαλυτότητα στο νερό και οι μέγιστες συγκεντρώσεις τους στα καλλυντικά προϊόντα είναι περιορισμένες λόγω παρενεργειών. Για αυτό και η ανάγκη ανάπτυξης καινοτόμων αντηλιακών φίλτρων ευρέως φάσματος, τα οποία να προστατεύουν τόσο από τη UVB όσο και από τη UVA ακτινοβολία, και να είναι κατάλληλα για επιδερμική χρήση κρίνεται επιτακτική.

Αρχικός λοιπόν στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η χημική σύνθεση ενός αντηλιακού φίλτρου ευρέως φάσματος που να εμφανίζει καλή φωτοπροστατευτική δράση έναντι της UVA και UVB ακτινοβολίας και να είναι ασφαλές. Επιθυμητή ήταν επίσης και η καλή αντιοξειδωτική δράση, αφού η ένωση προορίζεται για χρήση στο δέρμα. Με γνώμονα την δομή του γνωστού αντηλιακού φίλτρου OMC, παράχθηκε ο 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικού (E)-οκτυλεστέρας, μέσω της εστεροποίησης Steglich, ο οποίος αποτελεί παράγωγο του φερουλικού οξέος. Μετά από αξιολόγηση της φωτοπροστατευτικής του δράσης, εμφάνισε καλή προστασία κατά της UVB ακτινοβολίας και χαρακτηρίστηκε ως αντηλιακό φίλτρο «καλής UVA προστασίας». Επιπλέον, εμφάνισε υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Όμως, η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και η ανάγκη για την παρατεταμένη εφαρμογή και τροποποιημένη αποδέσμευση του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου στο δέρμα, οδήγησε στην ανάγκη εγκλωβισμού του σε νανοσύστημα μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών με στόχο την βελτίωση των ιδιοτήτων του. Ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση λιπιδικών νανοσωματιδίων δεύτερης γενιάς τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένη βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα και χαμηλή τοξικότητα, ενώ ταυτόχρονα παρέχουν τη δυνατότητα τροποποιημένης αποδέσμευσης της βιοδραστικής ένωσης.

Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μίας πράσινης διεργασίας εγκλωβισμού του χημικά συντιθέμενου αντηλιακού φίλτρου σε νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς και η επικάλυψή τους με διάλυμα χιτοζάνης και φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES) βεταΐνης – γαλακτικού οξέος (Bet:LA) (1:2). Η μέθοδος παρασκευής των νανοσωματιδίων επιλέχθηκε να είναι η γαλακτωματοποίηση με εξάτμιση του διαλύτη, ενώ πραγματοποιήθηκε και η χρήση υπερήχων σαν τεχνική υψηλής ενέργειας κατά τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων. Η ύπαρξη του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη στο διάλυμα επικάλυψης κρίθηκε απαραίτητη για την διάλυση της χιτοζάνης και για την ενίσχυση της φωτοπροστατευτικής δράσης.

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού πραγματοποιήθηκε μέσω πειραματικού σχεδιασμού Box Behnken με επιλεγμένες ανεξάρτητες μεταβλητές να είναι ο χρόνος εφαρμογής υπερήχων στα νανοσωματίδια κατά τον σχηματισμό τους (min), η περιεκτικότητα του διαλύματος επικάλυψης σε NaDES (% v/v) και το ποσοστό φόρτωσης του αντηλιακού φίλτρου στα νανοσωματίδια (% w/wDL). Οι αποκρίσεις που εξετάστηκαν

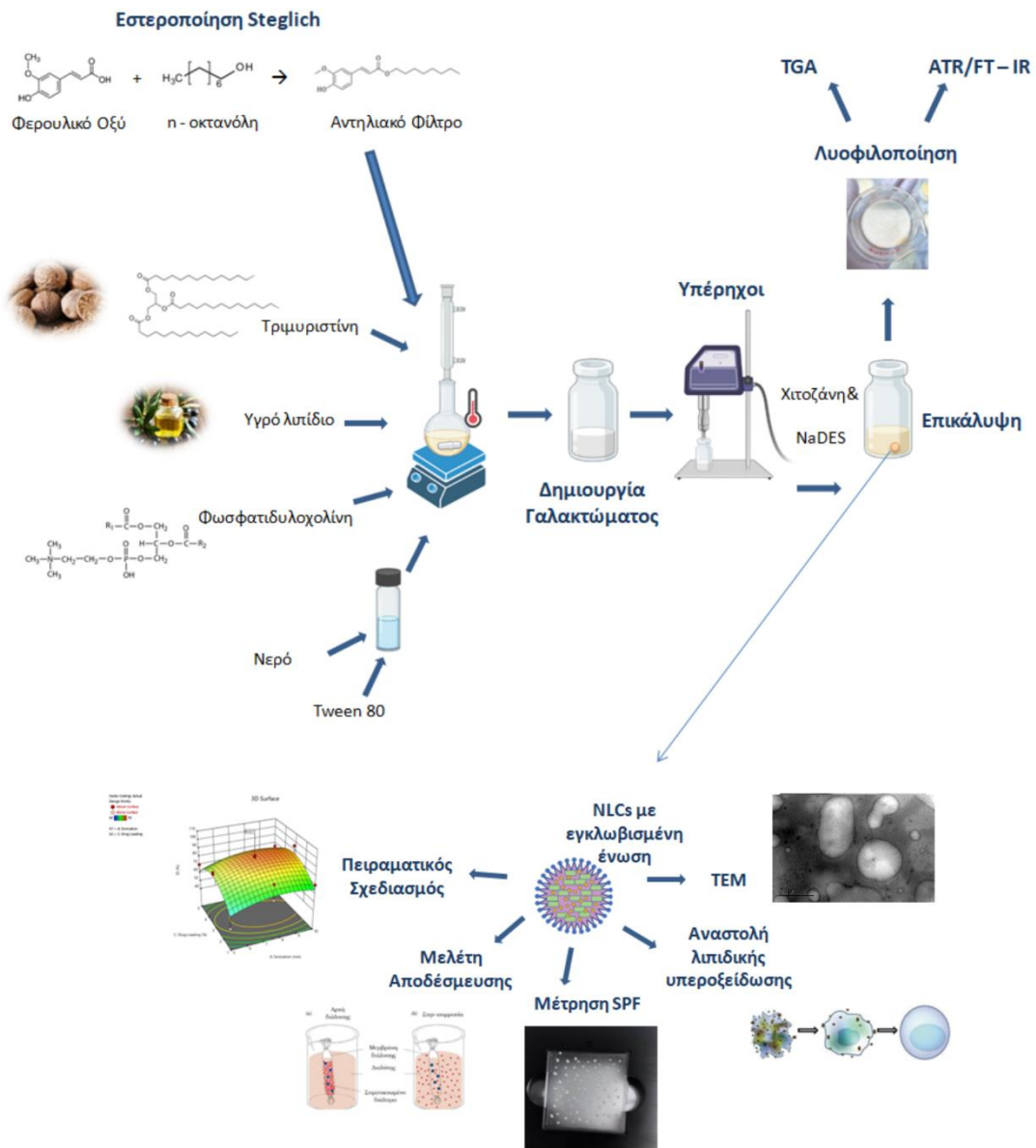
είναι το μέγεθος των παραγόμενων νανοσυστημάτων και η απόδοση εγκλωβισμού του αντηλιακού φίλτρου.

Τα βέλτιστα νανοσυστήματα εμφάνισαν μέγεθος 117.0 ± 5 nm, αποδεκτό δείκτη πολυδιασποράς, υψηλή τιμή ζ-δυναμικού και η απόδοση εγκλωβισμού κρίνεται επίσης υψηλή και είναι ίση με 78%. Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ακόμη ως προς τα δομικά χαρακτηριστικά τους (ATR/FT – IR), ως προς τις θερμικές τους ιδιότητες (TGA) και ως προς τη μορφολογία τους (TEM), ενώ παράλληλα μελετήθηκε *in vitro* η αποδέσμευση του αντηλιακού φίλτρου σε συνθήκες προσομοίωσης του ανθρώπινου δέρματος.

Μετά την βελτιστοποίηση της διεργασίας, πραγματοποιήθηκε ο εγκλωβισμός δύο ακόμα χημικά συντιθέμενων εστέρων, παράγωγων του φερουλικού οξέος, που παρουσιάζουν πολύ καλή προστασία έναντι της UVA και της UVB ακτινοβολίας, με τις βέλτιστες συνθήκες. Οι διασπορές των νανοσωματιδίων, όπου είχαν εγκλωβιστεί τα τρία αντηλιακά φίλτρα, αξιολογήθηκαν ως προς τις φωτοπροστατευτικές τους ιδιότητες και τα απελευθερωμένα από τα σωματίδια αντηλιακά φίλτρα αξιολογήθηκαν *in vitro* ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την λιπιδική υπεροξειδωση.

Επιστημονική περιοχή: Φαρμακευτική Χημεία, Πράσινη χημεία, Πράσινη Νανοτεχνολογία

Λέξεις Κλειδιά: αντηλιακά φίλτρα, SPF, νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς, χιτοζάνη, φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες



Εικόνα 1: Γραφική Περίληψη

ABSTRACT

Ultraviolet radiation is responsible for acute and temporary adverse effects on the skin. Recently, various phenolic acids, such as cinnamic and ferulic acid derivatives, have been shown to prevent some of the above. Nevertheless, those derivatives absorb ultraviolet radiation mostly in the UVB range, while they are characterized by low solubility in water and their maximum concentrations in cosmetic products are limited due to side effects. This is the reason why the need to develop innovative broad-spectrum sun filters, that protect the skin from both UVB and UVA radiation, and are suitable for epidermal use is considered imperative.

Therefore, the initial goal of this work was the chemical synthesis of a safe broad-spectrum sunscreen filter that exhibits good photoprotective action against UVA and UVB radiation. Good antioxidant activity was also desirable, since the compound is intended for use on the skin. Based on the structure of the well-known OMC sunscreen filter, the 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (E)-octyl ester was produced, through Steglich esterification, which is a derivative of ferulic acid. After the evaluation of its photoprotective action, the filter showed good protective action against UVB radiation and was classified as a "moderate UVA protection" sunscreen filter. In addition, it presented high antioxidant activity against lipid peroxidation.

However, the low water solubility and the need for prolonged application and release of the sunscreen filter on the skin, led to its encapsulation in a nanosystem that can transport bioactive substances, aiming to improve its properties. The use of second generation lipid nanoparticles is very interesting because these nanosystems are characterized by increased biocompatibility, biodegradability and low toxicity, while at the same time providing the possibility of modified release of the bioactive compound.

Therefore, the development and optimization of a green process of the encapsulation of the chemically synthesized sunscreen in nanostructured lipid nanocarriers and coating them with a solution of chitosan and the natural deep eutectic solvent (NaDES) betaine – lactic acid (Bet:LA) (1:2) was carried out. The method of preparation of the nanoparticles was chosen to be the emulsification with evaporation of the solvent. The use of a high energy technique during the formation of the nanoparticles was also important, thus the use of ultrasounds. The existence of the deep eutectic solvent in the coating solution was considered necessary for the dissolution of chitosan and for enhancing the photoprotective action.

The optimization of the process was carried out through a Box Behnken experimental design with selected independent variables being the time of ultrasound application to the nanoparticles during their formation (min), the NaDES content of the coating solution (% v/v) and the loading percentage of the sunscreen filter in nanoparticles (% w/w DL). The responses of interest were the size of the produced nanoparticles and the encapsulation efficiency of the sunscreen.

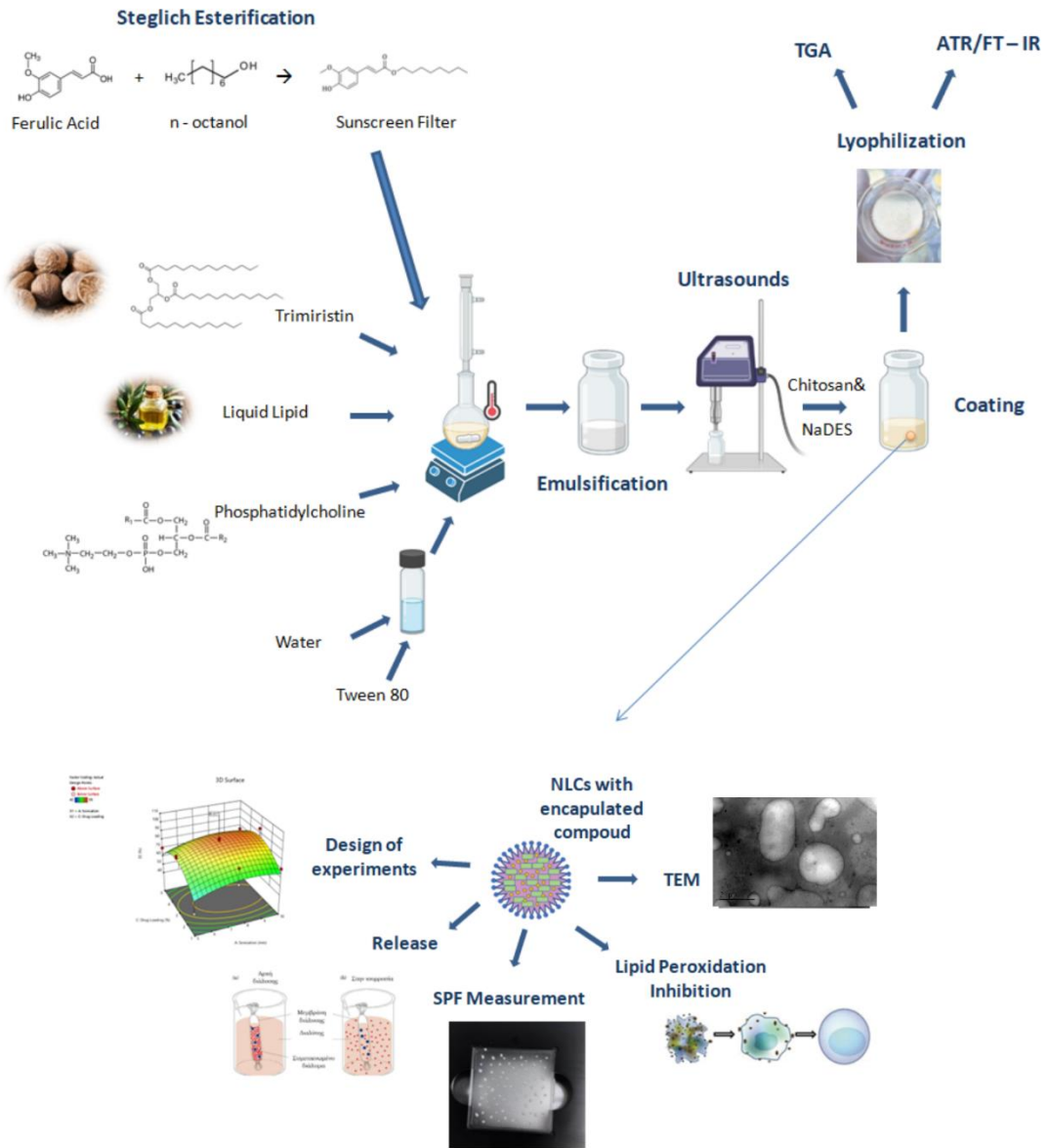
The optimal nanonanoparticles presented a size of 117.0 ± 5 nm, an acceptable polydispersity index, a high ζ -potential value and the entrapment efficiency of the filter is also judged to be high and is equal to 78%. The nanoparticles were further characterized in

terms of their structural characteristics (ATR/FT – IR), in terms of their thermal properties (TGA) and in terms of their morphology (TEM), while at the same time the release of the sunscreen filter was studied *in vitro* in conditions that simulate the human skin.

After the optimization of the processes, the encapsulation of two other chemically synthesized esters, derivatives of ferulic acid, which present very good protective action against UVA and UVB radiation, was carried out under optimal conditions. The nanoparticle dispersions, in which the three sunscreen filters were encapsulated, were evaluated for their photoprotective properties, and the released compounds from the particles were evaluated *in vitro* for their ability to inhibit lipid peroxidation.

Scientific area: Medicinal Chemistry, Green Chemistry, Green Nanotechnology

Keywords: sunscreens, SPF, nanostructured lipid nanocarriers, chitosan, natural deep eutectic solvents



Εικόνα 2: Graphical Abstract

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	10
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
1.1 Φωτογήρανση και Αντηλιακά φίλτρα	16
1.1.1 Εισαγωγή – Ιστορική Αναδρομή.....	16
1.1.2 Υπεριώδης ακτινοβολία	17
1.1.3 Φωτογήρανση και κίνδυνοι για το δέρμα	18
1.1.4 Αντηλιακά φίλτρα.....	19
1.1.5 Αντηλιακά Σκευάσματα.....	23
1.1.6 Παράγοντας αντηλιακής προστασίας (SPF)	25
1.1.7 Δείκτες προστασίας έναντι της UVA ακτινοβολίας.....	27
1.1.8 Φαινολικά οξέα και Φωτοπροστατευτική δράση.....	28
1.1.9 Εστεροποίηση Steglich	30
1.2 Νανοτεχνολογία και νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων	31
1.2.1 Εισαγωγή στη νανοτεχνολογία	31
1.2.2 Νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων	33
1.2.3 Νανωσωματίδια Στερεών Λιπιδίων (SNLs).....	38
1.2.4 Νανοδομημένοι Λιπιδικοί φορείς (NLCs).....	39
1.2.4.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα Νανοδομημένων Λιπιδικών Φορέων	42
1.2.4.2 Μέθοδοι παρασκευής Νανοδομημένων Λιπιδικών Φορέων.....	43
1.2.4.3 Στερεά και υγρά λιπίδια.....	45
1.3 Μηχανισμοί αποδέσμευσης δραστικών ενώσεων από νανοφορείς.....	47
1.3.1 Είδη Μηχανισμών Αποδέσμευσης.....	48
1.3.2 Μαθηματικά μοντέλα για την αποδέσμευση των βιοδραστικών ουσιών από τα νανοσυστήματα.....	51
1.3.3 Αποδέσμευση Βιοδραστικών ουσιών από τα NLCs	53
1.4 Πράσινη Χημεία και Πράσινη Νανοτεχνολογία	54
1.4.1 Πράσινη Χημεία.....	54
1.4.2 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες – Deep Eutectic Solvents (DESS).....	57
1.4.3 Πράσινη Νανοτεχνολογία	59

1.5	Επικάλυψη νανοσωματιδίων με Χιτοζάνη	62
1.6	Αναλυτικές μέθοδοι	64
1.6.1	Μέθοδοι για την ταυτοποίηση των ενώσεων.....	64
1.6.1.1	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	64
1.6.1.2	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Φουριέ (FTIR).....	66
1.6.2	Χαρακτηρισμός νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων	67
1.6.2.1	Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	67
1.6.2.2	Ανάλυση Ανίχνευσης Σωματιδίων (NTA)	70
1.6.3	Μέθοδοι αξιολόγησης των θερμικών ιδιοτήτων	71
1.6.3.1	Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (DSC).....	71
1.6.3.2	Θερμοβαρουμετρική Ανάλυση (TGA)	72
1.6.4	Μέθοδος αξιολόγησης μορφολογίας – Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης (TEM)	73
1.6.5	Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης- AAPH.....	73
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	75
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	77
2.1	Σύνθεση αντηλιακών φίλτρων	77
2.1.1	Αντιδραστήρια για τη σύνθεση του αντηλιακού φίλτρου	77
2.1.2	Μεθοδολογία σύνθεσης του αντηλιακού φίλτρου.....	78
2.2	Σύνθεση και επικάλυψη των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων	82
2.2.1	Αντιδραστήρια για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων	82
2.2.2	Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων	83
2.2.3	Σύνθεση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη.....	83
2.2.4	Απομόνωση τριμυριστίνης από εμπορικό μοσχοκάρυδο.....	84
2.2.5	Σύνθεση των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων (NLCs)	85
2.2.5.1	Σύνθεση των νανοσωματιδίων	85
2.2.5.2	Επικάλυψη των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων	88
2.3	Χαρακτηρισμός και αξιολόγηση των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων	89
2.3.1	Χαρακτηρισμός μεγέθους σωματιδίων με την μέθοδο Nanoparticle Tracking Analysis	89
2.3.2	Χαρακτηρισμός μεγέθους, κατανομής και ζ-δυναμικού σωματιδίων με την μέθοδο Dynamic Light Scattering.....	91
2.3.3	Υπολογισμός αποδόσεων εγκλωβισμού	92
2.4	Μελέτη της <i>in vitro</i> αποδέσμευσης των αντηλιακών φίλτρων.....	96

2.5 Αξιολόγηση αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης με AAPH.....	98
2.6 Μέτρηση του δείκτη αντηλιακής προστασίας SPF	100
2.7 Προετοιμασία δειγμάτων για μετρήσεις TEM	104
2.8 Αξιολόγηση των θερμικών ιδιοτήτων με TGA.....	104
2.9 Δομικός χαρακτηρισμός με ATR/FT-IR	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	106
3.1 Φασματοσκοπική Μελέτη ¹ H-NMR των εστέρων 1b και 1c	106
3.2 Προκαταρκτικά πειράματα για την διεργασία του εγκλωβισμού	108
3.2.1 Μελέτη ζ-δυναμικού πριν και μετά την επικάλυψη των σωματιδίων	108
3.2.2 Επιλογή του κατάλληλου υγρού λιπιδίου.....	109
3.2.3 Οριοθέτηση των ανεξάρτητων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού	111
3.3 Πειραματικός σχεδιασμός.....	112
3.3.1 Προτεινόμενα πειράματα για τον πειραματικό σχεδιασμό	112
3.3.2 Αποτελέσματα πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού	113
3.3.3 Αποτελέσματα της μεθόδου DLS για το μέγεθος και την κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων	114
3.3.4 Σύγκριση απόδοσης εγκλωβισμού υπολογισμένη με έμμεσο και με άμεσο τρόπο	116
3.3.5 Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων (μεγέθους σωματιδίων και απόδοσης εγκλωβισμού)	117
3.3.5.1 Μοντέλο πρόβλεψης του μεγέθους των σωματιδίων.....	117
3.3.5.2 Μοντέλο πρόβλεψης της απόδοσης εγκλωβισμού της βιοδραστικής ένωσης	122
3.3.5.3 Συσχετίσεις για το ζ-δυναμικό	127
3.3.6 Βελτιστοποίηση.....	129
3.4 Αξιολόγηση Αντηλιακής Προστασίας μέσω του παράγοντα SPF και του λc	132
3.4.1 Αξιολόγηση του εστέρα 1c και των αντίστοιχων διασπορών	133
3.4.2 Αξιολόγηση του εστέρα 2c και των αντίστοιχων διασπορών	134
3.4.3 Αξιολόγηση του εστέρα 3c και των αντίστοιχων διασπορών	135
3.5 Αξιολόγηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των αντηλιακών φίλτρων και των αποδεσμευμένων από τα σωματίδια αντηλιακών φίλτρων.....	136
3.6 Μελέτη αποδέσμευσης <i>in vitro</i> του εστέρα 1c από τα βέλτιστα νανοσυστήματα	138
3.7 Μελέτη δομής των βέλτιστων νανοσυστημάτων μέσω ATR/FT – IR.....	140
3.8 Μελέτη θερμικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων με TGA.....	142
3.9 Μελέτη της μορφολογίας των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με TEM	144
3.10 Μελέτη σταθερότητας έναντι της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων.....	146
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	148

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	152
ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ.....	153
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	154
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	169
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ.....	169
ΕΙΚΟΝΕΣ.....	171
ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΣΤΕΡΩΝ 2c ΚΑΙ 3c	172
ΕΥΡΕΤΗΡΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	174
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	175
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	176
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	178

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride	2,2'-αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)διυδροχλωρίο
Bet	Betain	Βεταΐνη
CDCl ₃ -d ₁	Deuterated chloroform	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CS	Chitosan	Χιτοζάνη
DCM	Dichloromethane	Διχλωρομεθάνιο
DL	Drug Loading	Φόρτωση Φαρμάκου
DLS	Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
DMAP	Dimethyl-amino pyridine	Διμεθυλο-αμινο πυριδίνη
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλο σουλφοξειδίο
DSC	Differential Scanning Calorimetry	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης
FT-IR	Furier Transform Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier
LA	Lactic Acid	Γαλακτικό οξύ
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
NaDES	Natural Deep Eutectic Solvent	Φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης
NaOH	Sodium hydroxide	Υδροξειδίο του Νατρίου
NLCs	Nanostructured Lipid Carriers	Νανοδομημένοι Λιπιδικοί Φορείς
NMR	Nuclear Magnetic Reasonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis	Ανάλυση Ανίχνευσης Νανοσωματιδίων
PDI	Polydiversity Index	Δείκτης Πολυδιασποράς
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου
SLNs	Solid Lipid Nanoparticles	Λιπιδικοί Νανοφορείς
SPF	Sun Protection Factor	Δείκτης Ηλιακής Προστασίας
ST	Sonication Time	Χρόνος Υπερήχων
TEM	Transmission Electron Microscopy	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης

TGA	Thermogravimetric Analysis	Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση
THF	Tetrahydrofurane	Τετραυδροφουράνιο
TLC	Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας
UV	Ultraviolet	Υπεριώδης
UV-Vis	Ultraviolet–visible spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Φωτογήρανση και Αντηλιακά φίλτρα

1.1.1 Εισαγωγή – Ιστορική Αναδρομή

Τα φίλτρα αντηλιακής προστασίας είναι τα συστατικά των αντηλιακών σκευασμάτων που προσδίδουν ιδιότητες έναντι των αρνητικών επιπτώσεων της ηλιακής ακτινοβολίας και πιο συγκεκριμένα της υπεριώδους ηλιακής ακτινοβολίας (UV). Από την ανακάλυψη του πρώτου φίλτρου προστασίας κατά της UV ακτινοβολίας, σχεδόν 30 φίλτρα έχουν γίνει εμπορικά διαθέσιμα. Με τα χρόνια, η καινοτομία και οι μεταβολές στις ρυθμιστικές διατάξεις έχουν οδηγήσει στη χρήση τους από τη βιομηχανία καλλυντικών.

Η επιβλαβής επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας ήταν γνωστή σε πολλούς αρχαίους πολιτισμούς και, κατά συνέπεια, οι άνθρωποι προσπάθησαν από νωρίς να αποφύγουν τη φωτοεπαγόμενη βλάβη του δέρματος. Οι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν φυσικά εκχυλίσματα όπως αμυγδαλέλαιο, σκόνη ασβεστίτη και άργιλο, ρύζι και γιασεμί λόγω των φωτοπροστατευτικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Οι αρχαίοι Έλληνες προστάτευαν τους εαυτούς τους με λάδια και άμμο που περιείχαν μεταλλικά στοιχεία κατά τη διάρκεια της άσκησης, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αργότερα και στην Ινδία για ιατρικούς σκοπούς.

Πειραματικές μελέτες σχετικά με τις βλαβερές συνέπειες της UV ακτινοβολίας στο δέρμα ξεκίνησαν στις αρχές του 1800. Είκοσι χρόνια αργότερα, το Everard Home ερεύνησε την ικανότητα μιας ομάδας ουσιών να απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία. Η οξινισμένηθειική κινίνη (AQS) ήταν η πρώτη ένωση που αποδείχθηκε ότι μειώνει τα ηλιακά εγκαύματα που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία. Μετά από αυτό, ο Friedrich Hammer, το 1891, ενσωμάτωσε το AQS σε λοσιόν και δημιούργησε το πρώτο αντηλιακό. Η ανάπτυξη των φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας προχώρησε και, το 1894, οι Paul Unna και Dubreuilh επιβεβαίωσαν ότι ορισμένες δερματικές διαταραχές, όπως το ερύθημα και ο καρκίνος του δέρματος, σχετίζονται με την υπερβολική έκθεση στο ηλιακό φως χωρίς προστασία. Με αυτά τα στοιχεία οι Hausser και Vahler ξεκίνησαν την έρευνά τους στον τομέα αυτό, με αποκορύφωμα το 1928 με τη δημιουργία του πρώτου σκευάσματος που προσφέρει προστασία κατά της ακτινοβολίας UVB, ένα γαλάκτωμα που περιέχει κινναμικό βενζυλεστέρα και σαλικυλικό βενζύλιο (Geoffrey et al., 2019).

Παρά όλες αυτές τις προόδους, το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο αντηλιακό κυκλοφόρησε μόλις το 1935 και αποτέλεσε δημιούργημα του Eugene Shueller, του ιδρυτή της L'Oréal. Αυτό το αντηλιακό ονομαζόταν «Ambre Solaire» και περιείχε αλικυλικό βενζύλιο, το ίδιο αντηλιακό φίλτρο που υπάρχει στη σύνθεση των Hausser και Vahler. Στη δεκαετία του 1940, το π-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA) και τα παράγωγά του μελετήθηκαν, και αποδείχτηκε ότι είναι πιο αποτελεσματικά, ειδικά τα παράγωγα του μόνο και διαλκυλεστέρα PABA. Με τα χρόνια, αναπτύχθηκαν άλλες μεθοδολογίες για να αποδειχθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια των αντηλιακών φίλτρων. Το PABA επιβεβαιώθηκε ότι είναι φωτοασταθές και προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις. Περαιτέρω έρευνα επιβεβαίωσε και τις τοξικές του επιπτώσεις, με αποκορύφωμα την απαγόρευσή του στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2008. Το 1969, οι επικίνδυνες επιπτώσεις της ακτινοβολίας UVA για το δέρμα έγιναν πιο εμφανείς. Τα πρώτα διαθέσιμα φίλτρα προστασίας από την UVA ήταν παράγωγα βενζοφαινόνης. Το

1980, μόνο το 1% των ευρωπαϊκών αντηλιακών περιείχαν αυτή την ουσία, αν και το ποσοστό αυτό είχε αυξηθεί στο 35% δέκα χρόνια αργότερα (Jesus et al., 2022).

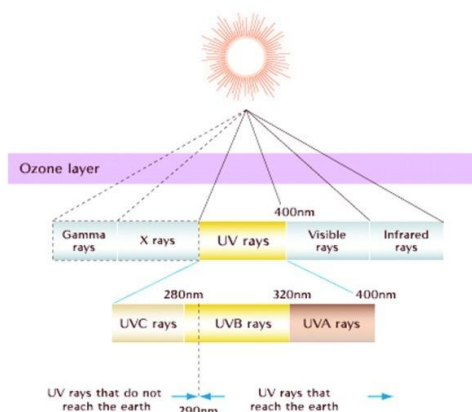
Με την πάροδο των ετών, σημειώθηκαν ορισμένες αλλαγές στη λίστα των ευρωπαϊκά εγκεκριμένων φίλτρων κατά της UV ακτινοβολίας, συμπεριλαμβανομένων τόσο των εγκρίσεων όσο και των αποσύρσεων. Το 2015, η ΕΕ αφαίρεσε την 3-βενζυλιδενική καμφορά από τον κατάλογο των εγκεκριμένων φίλτρων υπεριώδους ακτινοβολίας λόγω της τοξικότητάς της στους θαλάσσιους οργανισμούς. Αντίθετα, το ZnO εγκρίθηκε το επόμενο έτος (2016) σαν αποδεκτό αντηλιακό φίλτρο. Επιπλέον, σημειώθηκε ότι η αποτελεσματικότητα των αντηλιακών σκευασμάτων θα πρέπει να ελέγχεται με τυποποιημένες μεθόδους, δηλαδή οδηγίες ISO που περιλαμβάνουν μεθόδους *in vivo* για τον προσδιορισμό του δείκτη SPF, *in vitro* και *in vivo* για την αξιολόγηση της προστασίας κατά της UVA, καθώς και αξιολόγηση της αντοχής του προϊόντος στο νερό (Jesus et al., 2022).

1.1.2 Υπεριώδης ακτινοβολία

Η ηλιακή υπεριώδης ακτινοβολία είναι μία μορφή μη ιονίζουσας ακτινοβολίας και μπορεί να διακριθεί στη UVA ακτινοβολία (320-400nm), στη UVB ακτινοβολία (280-320nm) και την UVC ακτινοβολία (190-280nm). Άρα στο φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας η υπεριώδης ακτινοβολία βρίσκεται ανάμεσα στο ορατό φως και την ακτινοβολία γ. Αποδεδειγμένα το ατμοσφαιρικό όζον απορροφά αποτελεσματικά την UVC ακτινοβολία εμποδίζοντας τη από να φτάσει στην επιφάνεια της γης και να έχει κάποια βιολογική επίδραση στους ζωντανούς οργανισμούς. Αντίθετα, η UVA και η UVB ακτινοβολία αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό του ηλιακής ακτινοβολίας που φτάνει στην επιφάνεια της γης, με τη UVA να αποτελεί το 90-95% ενώ τη UVB να αποτελεί το 5-10% (Guan et al., 2021).

Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία του περιβάλλοντος ποικίλλει ανάλογα με την γεωγραφική θέση και με την ένταση του ηλιακού φωτός σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία στη Γη. Δεδομένου ότι η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να ανακλάται, να διασκορπίζεται αλλά και να παρεμποδίζεται από τα σωματίδια της ατμόσφαιρας, η δόση υπεριώδους ακτινοβολίας που υπάρχει σε κάθε περιβάλλον εξαρτάται από την ποσότητα των αέριων στρωμάτων που πρέπει να διαπεράσει, καθιστώντας τις δόσεις υπεριώδους ακτινοβολίας υψηλότερες πλησιέστερα στον Ισημερινό (όπου το ηλιακό φως χτυπά τη Γη πιο άμεσα), σε μεγαλύτερα υψόμετρα και σε συνθήκες ελάχιστης νέφωσης ή σωματιδιακής κάλυψης (Qureshi et al., n.d.).

Ιστορικά, οι άνθρωποι έχουν εκτεθεί στην υπεριώδη ακτινοβολία κυρίως μέσω της επαγγελματικής τους απασχόλησης υπό την επίδραση του ηλιακού φωτός. Παρόλα αυτά, η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία για λόγους ψυχαγωγίας έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια λόγω των υπαίθριων δραστηριοτήτων αναψυχής και του σκόπικου μαυρίσματος για καλλυντικούς σκοπούς. Η προσωπική δόση των υπεριωδών ακτίνων που λαμβάνει ένας άνθρωπος εξαρτάται όχι μόνο από την ισχύ της ηλιακής ακτινοβολίας, αλλά και από τον χρόνο που εκτίθεται στην υπεριώδη ακτινοβολία για επαγγελματικούς ή ψυχαγωγικούς λόγους και τη χρήση προστατευτικών ενδυμάτων και αντηλιακών σκευασμάτων (D’Orazio et al., 2013).



Εικόνα 3: Η υπεριώδης ακτινοβολία στο φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

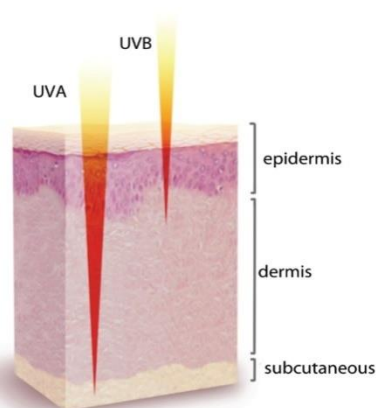
1.1.3 Φωτογήρανση και κίνδυνοι για το δέρμα

Η γήρανση είναι μια διαδικασία προοδευτικής μείωσης της μέγιστης λειτουργίας και της ανάπλασης όλων των οργάνων του σώματος, συμπεριλαμβανομένου του δέρματος. Η φωτογήρανση είναι η υπέρθεση της χρόνιας βλάβης που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία (UV) στην εγγενή γήρανση και ευθύνεται για τις περισσότερες αλλαγές που σχετίζονται με το δέρμα (Yaar & Gilchrest, 2007). Έχει αποδειχθεί ότι περίπου το 80% της γήρανσης του δέρματος στο πρόσωπο μπορεί να αποδοθεί στην έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV) (Guan et al., 2021).

Οι μηχανισμοί για την πρόκληση της φωτογήρανσης στο δέρμα ποικίλουν, με πιο σημαντικούς να είναι η παραγωγή ROS (Reactive Oxygen Species) που προκαλούν οξειδωτικό στρες και επηρεάζουν την μεταβίβαση πληροφοριών δια μέσω των κυτταρικών μεμβρανών (Yaar & Gilchrest, 2007), η καταστροφή των μιτοχονδρίων και του DNA λόγω μεγάλου οξειδωτικού στρες (Brand et al., 2018) και η οξείδωση των πρωτεϊνών στα ανώτερα στρώματα της επιδερμίδας (Sander et al., n.d.). Το δέρμα που έχει υποστεί φωτοφθορές από το οξειδωτικό στρες, εμφανίζει μεταβλητό επιδερμικό πάχος, μειωμένη ελαστικότητα και παραμόρφωση, μειωμένο ή και κατεστραμμένο κολλαγόνο, αυξημένες μεταλλοπρωτεϊνάσες και έκταση των αγγείων (Yaar & Gilchrest, 2007).

Παρόλα αυτά, δεν έχουν όλα τα είδη υπεριώδους ακτινοβολίας την ίδια επίδραση στο δέρμα και δεν προκαλούν τις ίδιες φθορές στην επιδερμίδα. Σύμφωνα με μελέτες σε ιστούς που υποβλήθηκαν σε διαφορετικού τύπου έκθεση, το δέρμα που εκτέθηκε σε UVA και UVB ακτινοβολία παρουσίαζε σημαντικά διαφορετικά χαρακτηριστικά. Η ποσότητα της ακτινοβολίας UVA στο ηλιακό φως ξεπερνά την ποσότητα της UVB κατά 10 έως 100 φορές, όμως η UVB ακτινοβολία φαίνεται να παρουσιάζει πιο μεγάλη ενεργητικότητα. Πιο συγκεκριμένα, ιστοί που εκτέθηκαν σε UVA ακτινοβολία παρουσίασαν αύξηση της σκληρότητας και διάσπαση, καθώς και αποδιοργάνωση των ινών κολλαγόνου, γεγονός που υποδηλώνει την αλλοίωση του δέρματος. Αντίθετα, οι ιστοί που εκτέθηκαν σε UVB ακτινοβολία εμφάνισαν μεταβολές μόνο σε επιφανειακό επίπεδο, καθώς σε αυτό το σημείο απορροφάται το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας αυτού του είδους. Συμπερασματικά, η UVA ακτινοβολία διεισδύει βαθύτερα από την UVB και προκαλεί βλάβη τόσο στην

επιδερμίδα όσο και σε βαθύτερα στρώματα του δέρματος. Αντίθετα, η UVB ακτινοβολία είναι υπεύθυνη για πιο σοβαρές βλάβες στο δέρμα, με οξεία ερυθματογόνο και μακροπρόθεσμη καρκινογόνο δράση, προκαλώντας φωτογήρανση και μεταλλαξιγόνο βλάβη στα νουκλεϊκά οξέα. Από αυτή την άποψη, οι UVA και UVB έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και προκαλούν αποκλίνουσες αποκρίσεις στο δέρμα (Rittié & Fisher, 2015; Wang et al., 2019).



Εικόνα 4: Διαφορετικά επίπεδα διείσδυσης της UVA και UVB ακτινοβολίας στις στιβάδες του δέρματος

υποδόριας στιβάδας (Martin-Gorgojo et al., 2021).

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4**, το μεγαλύτερο μέρος (70%) της UVB απορροφάται ή διασκορπίζεται από την κεράτινη στιβάδα. Το 20% της UVB φτάνει στα ζωντανά κύτταρα στην επιδερμική ακανθώδη στιβάδα και το 10% στο επιφανειακό δέρμα. Η UVA ακτινοβολία και το ορατό φως φιλτράρονται λιγότερο από την κεράτινη στιβάδα, αλλά μετά την απορρόφηση από τη μελανίνη, το 30% της UVA

φτάνει τα βασικά κύτταρα της επιδερμίδας και το 20% φτάνει στο δικτυωτό χόριο. Ένα τοις εκατό της UVA ακτινοβολίας διεισδύει μέχρι τα όρια της

Εκτός όμως από τη φωτογήρανση, η υπεριώδης ακτινοβολία αποτελεί κίνδυνο για τη δημόσια υγεία επειδή είναι υπεύθυνη και για άλλες οξείες ή χρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο δέρμα όπως δερματικά εγκαύματα, φωτοδερματώσεις, ανοσοκαταστολή και καρκινογένεση του δέρματος (Guan et al., 2021).

1.1.4 Αντηλιακά φίλτρα

Η κύρια λειτουργία ενός αντηλιακού προϊόντος είναι να προστατεύει το δέρμα από τις βλαβερές συνέπειες της ηλιακής ακτινοβολίας UV. Για την παροχή αυτής της προστασίας, τα αντηλιακά προϊόντα περιέχουν αντηλιακά ενεργά συστατικά. Αυτά τα υλικά απορροφούν, αντανακλούν ή διασκορπίζουν την υπεριώδη ακτινοβολία που προσπίπτει στο δέρμα, παρεμποδίζοντας την προτού μπορέσει να διεισδύσει στο δέρμα και να βλάψει βασικά συστατικά του δέρματος όπως το DNA, το κολλαγόνο, την ελαστίνη και τα λιπίδια (Tanner, 2006).

Οι πιο συνηθισμένοι τύποι αντηλιακών που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι τα τοπικά σκευάσματα, που περιέχουν φυσικά και χημικά αντηλιακά φίλτρα. Διάφοροι παράγοντες με τη μορφή αντιοξειδωτικών, βιταμινών και μετάλλων, μελετώνται ή χρησιμοποιούνται επίσης ως πιθανοί φωτοπροστατευτικοί παράγοντες. Οι κύριοι στόχοι των αντηλιακών είναι τόσο η προστασία από την ακτινοβολία UVB και την ακτινοβολία UVA μεγάλου μήκους κύματος αλλά και ο περιορισμός των ROS, η ενεργοποίηση συστημάτων κυτταρικής επιδιόρθωσης, συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης του DNA (Hassan et al., 2013).

Λόγω της ευκολίας στην χρήση τους, τα τοπικά αντηλιακά είναι το πιο κοινό φωτοπροστατευτικό μέτρο. Τα τοπικά αντηλιακά περιλαμβάνουν τις ακόλουθες κατηγορίες φίλτρων:

- i) Αυτά που αντανακλούν ή διασκορπίζουν φωτόνια UV (φυσικά αντηλιακά),
- ii) Αυτά που τα απορροφούν, εμποδίζοντας την επίδρασή τους στα κύτταρα του δέρματος (χημικά αντηλιακά),
- iii) Παρασκευάσματα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Άρα η κυριότερη διάκριση μεταξύ των αντηλιακών φίλτρων είναι με βάση τον μηχανισμό με τον οποίο προστατεύουν το δέρμα:

Φυσικά ή ανόργανα αντηλιακά φίλτρα:

Γενικά, ένα ανόργανο ή φυσικό αντηλιακό δρα ως φράγμα, αντανακλώντας το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας. Το φως που πέφτει σε ανόργανα σωματίδια ανακατευθύνεται, ανακλάται προς τα πίσω ή διαχέεται με διαφορετικούς τρόπους. Τα πιο κοινά παραδείγματα αυτού του τύπου φίλτρων είναι το οξείδιο του ψευδαργύρου (ZnO) και το διοξείδιο του τιτανίου (TiO₂). Ανάλογα με το μέγεθος του σωματιδίου, η προστασία μπορεί να προκύψει όχι μόνο μέσω ανάκλασης. Όταν αυτά τα φίλτρα είναι σε μικροϊονισμένη μορφή, μπορούν επίσης να δράσουν με τον μηχανισμό της περίθλαση και της διασποράς του φωτός.

Τα ανόργανα φίλτρα είναι σπάνιο να παρουσιάσουν κάποια αλλεργική ευαισθησία και έχουν υψηλή φωτοσταθερότητα, καθιστώντας τα ιδιαίτερα σημαντικά για τη δημιουργία παιδικών προϊόντων, για καθημερινή χρήση και για άτομα με ευαίσθητο δέρμα. Ωστόσο, η ανακλαστική τους ιδιότητα μπορεί να προκαλέσει υπερβολική λάμψη και υπόλευκη όψη, περιορίζοντας την αποκλειστική χρήση τους σε παρασκευάσματα λόγω της χαμηλής αποδοχής τέτοιου είδους καλλυντικών. Ένας τρόπος για να λυθεί αυτό το πρόβλημα είναι η προσθήκη χρωστικής ουσίας οξειδίου του σιδήρου στα προϊόντα, παρέχοντας ένα χρωματισμό σαν βάση μακιγιάζ που γίνεται αποδεκτό από τις γυναίκες.

Τα αντηλιακά με ανόργανα φίλτρα έχουν βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια, μέσω της ανάπτυξης μικροϊονισμένων μορφών διοξειδίου του τιτανίου και οξειδίου του ψευδαργύρου ή τη χρήση πολυμερών για την ενθυλάκωσή τους και τον εγκλωβισμό τους. Με τη χρήση της παραπάνω μεθόδου, το μέγεθος των σωματιδίων μειώνεται στο 50-90% του αρχικού μεγέθους, καθιστώντας δυνατή την ανάπτυξη σκευασμάτων που γίνονται διαφανή μετά την εφαρμογή, και κατ' επέκταση είναι πιο αποδεκτά για καλλυντική χρήση. Το μέγεθος των σωματιδίων των ανόργανων φίλτρων είναι, επομένως, καθοριστικός παράγοντας της επίδρασής τους. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων, τόσο καλύτερη είναι η κάλυψη του δέρματος και, κατά συνέπεια, τόσο καλύτερη είναι η αντανάκλαση. Όμως έχει αποδειχτεί ότι το αντίθετο συμβαίνει με τη διάθλαση, επομένως, η ανάκλαση και η διάθλαση είναι δύο αντιστρόφως ανάλογα μεγέθη.

Η αποτελεσματικότητα των ανόργανων φίλτρων, λοιπόν, σχετίζεται με το μέγεθος και τη διασπορά των σωματιδίων τους. Μπορούν να καλυφθούν με σιλικόνη, πυρίτιο, οξείδιο του

αργιλίου, στεατικό οξύ ή στεατικό αλουμίνιο, ώστε να βελτιωθεί η διασπορά τους, να αποφευχθεί η συσσωμάτωση σωματιδίων και να αλλάξει η ρεολογία του γαλακτώματος. Το διοξείδιο του τιτανίου, για παράδειγμα, μπορεί να συνδυαστεί με την αβοβενζόνη μόνο όταν καλύπτεται με πυρίτιο και διμεθικόνη. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι μόνο ανόργανα φίλτρα με σωματίδια μεγαλύτερα από 200nm είναι ικανά να αντανακλούν στην περιοχή του ορατού φωτός (Nichols & Katiyar, 2010; Schalka et al., 2017).

Χημικά ή οργανικά αντηλιακά φίλτρα:

Τα οργανικά ή χημικά φίλτρα είναι μόρια ικανά να απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία και να τη μετατρέπουν σε ακτινοβολία αβλαβή για τον άνθρωπο. Όσον αφορά τη διαλυτότητα, μπορεί να είναι υδροδιαλυτά ή λιποδιαλυτά. Τα χημικά αντηλιακά είναι συνήθως οργανικές αρωματικές ενώσεις, συζευγμένες με μία ομάδα καρβονυλίου. Σε σχέση με τον μηχανισμό δράσης τους, τα μόρια των χημικών φίλτρων που περιέχονται στα αντηλιακά έχουν πολυάριθμους διπλούς δεσμούς στη διαμόρφωσή τους, είτε στον δακτύλιο βενζολίου είτε στη γραμμική αλυσίδα, επιτρέποντας σε πολλά από τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε τροχιές χαμηλότερης ενέργειας να απορροφούν την προσπίπτουσα υπεριώδη ακτινοβολία και να μεταπηδήσουν σε τροχιές υψηλότερης ενέργειας. Με αυτό τον τρόπο, η ακτινοβολία υψηλής ενέργειας και τα μικρά μήκη κύματος που είναι εξαιρετικά επιβλαβή για τον άνθρωπο, μετατρέπονται σε ακτινοβολίες χαμηλής ενέργειας και μεγάλα μήκη κύματος.

Η ενέργεια που απορροφάται από ένα μόριο απελευθερώνεται όταν αυτό επιστρέφει στην κατάσταση ηρεμίας. Επιπλέον, η απελευθέρωσή της συμβαίνει με τη μορφή φθορίζοντος ή φωσφορίζοντος φωτός και θερμότητας, ικανό να αποσυντεθεί και να σχηματίσει προϊόντα. Επομένως, ένα αντηλιακό απορροφά τη βλαβερή ενέργεια και τη μετατρέπει σε ενεργειακές μορφές που δεν βλάπτουν το δέρμα. Σε αντίθεση με τα ανόργανα φίλτρα, σε αυτή την περίπτωση υπάρχει πιθανότητα ανάπτυξης κάποιας αλλεργικής ευαισθησίας. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα φίλτρα εμφανίζουν χαμηλότερη φωτοσταθερότητα, ανάλογα με τη χημική τους δομή και τον συνδυασμό των συστατικών της φόρμουλας τους. Η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας μπορεί να ενεργοποιεί τα οργανικά αντηλιακά και κατά συνέπεια να αλληλεπιδράσουν με τα μόρια του δέρματος, προκαλώντας ανεπιθύμητες δερματικές αντιδράσεις όπως δερματίτιδα ή αντιδράσεις φωτοευαισθησίας. Επομένως, τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στη χρήση φυσικών προϊόντων με στόχο την υψηλότερη ανθεκτικότητά τους και τις αμελητέες περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Συνήθως, τα αντηλιακά του εμπορίου περιέχουν ένα συνδυασμό ανόργανων και οργανικών φίλτρων ώστε να επεκταθεί το φάσμα φωτοπροστασίας (UVA και UVB), να αξιοποιηθούν συνεργιστικές ιδιότητες και ελαχιστοποιηθούν οι δυσμενείς επιπτώσεις ενός συγκεκριμένου συστατικού (Schalka et al., 2017).

Μία επιπλέον διάκριση η οποία πραγματοποιείται στα οργανικά αντηλιακά φίλτρα είναι με βάση το είδος της ακτινοβολίας από την οποία προστατεύουν το δέρμα. Υπάρχουν οι ενώσεις που προστατεύουν μόνο από τη UVA ή τη UVB ακτινοβολία, αλλά τα τελευταία

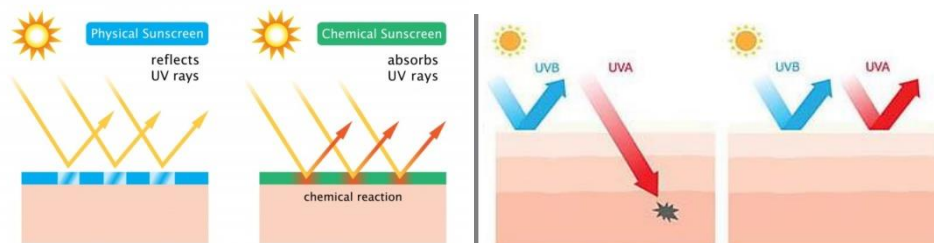
χρόνια αναπτύσσονται φίλτρα «ευρέως φάσματος», δηλαδή αντηλιακά φίλτρα που προστατεύουν από όλο το φάσμα της UV ακτινοβολίας. Οι κύριες χημικές ενώσεις που προσφέρουν πρόληψη της UVA, κατά της UVB και φίλτρα «ευρέως φάσματος» παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 (Hassan et al., 2013; López-Hortas et al., 2020).

Πίνακας 1: Τα πιο συνήθη χρησιμοποιούμενα οργανικά φίλτρα και η διάκρισή τους

UVA φίλτρα	UVB φίλτρα	Φίλτρα «ευρέως φάσματος»
Βενζοφαινόνες <ul style="list-style-type: none"> • Οξυβενζόνη • Σουλισοβενζόνη • Διοξυβενζόνη 	Παράγωγα ΡΑΒΑ <ul style="list-style-type: none"> • 4-αμινοβενζοϊκόξύ • ΡΑΒΑ 	Ecamsule
Αβοβενζόνη	Κιναμικά <ul style="list-style-type: none"> • Octinoxate • Cinoxate 	Silatriazole
Parsol 1789	Σαλικυλικά <ul style="list-style-type: none"> • Octisalate • Homosalate • Τρολαμίνη 	Bemotrizinol
Μεραδιμάτη	Άλλα <ul style="list-style-type: none"> • Octocrylene • Ενσουλιζόλη • Ενιαζολόνη 	Bisoctriol
Ανθρανιλικά <ul style="list-style-type: none"> • Μαραδιμικά 		

Παρασκευάσματα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες:

Τα αντιοξειδωτικά προστίθενται συνήθως σε εμπορικά αντηλιακά παρασκευάσματα για τη μείωση της φωτο-οξειδωτικής βλάβης που προκύπτει από την παραγωγή ROS που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία, παρέχοντας ένα είδος αντηλιακής φωτοπροστασίας και συμπληρώνοντας τα φωτοπροστατευτικά αποτελέσματα των αντηλιακών. Τέτοιου είδους σκευάσματα περιλαμβάνουν αρκετές καλά χαρακτηρισμένες βιταμίνες, συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών C, E και β-καροτίνης. Αυτές οι ουσίες γενικά βοηθούν με την αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινογόνο δράση τους (Abiola et al., 2020; Pinnell, 2003).



Εικόνα 5: Διαφορά στο μηχανισμό προστασίας μεταξύ φυσικών και τα χημικών φίλτρων (αριστερά), Διαφορά στο μηχανισμό προστασίας μεταξύ UVB φίλτρων και φίλτρων «ευρέως φάσματος» (δεξιά)

1.1.5 Αντηλιακά Σκευάσματα

Γενικά, η διαμόρφωση ενός νέου αντηλιακού προϊόντος μπορεί να περιγραφεί ως μια σειρά τεσσάρων βασικών βημάτων: (i) καθορισμός στόχων σχεδιασμού προϊόντος, (ii) επιλογή του ενεργού συστήματος αντηλιακού, (iii) επιλογή/διαμόρφωση του προϊόντος-οδηγού και (iv) βελτιστοποίηση του προϊόντος. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας τεσσάρων βημάτων είναι ένα βελτιστοποιημένο αντηλιακό προϊόν που οι άνθρωποι θα χρησιμοποιούν τακτικά και σωστά. Ο πρωταρχικός στόχος ενός ειδικού στη σύνθεση ενός προϊόντος θα πρέπει να είναι η ανάπτυξη ενός σκευάσματος το οποίο να σχηματίζει ένα συνεχές φιλμ στο δέρμα (Tanner, 2006).

Τα οργανικά αντηλιακά παρασκευάζονται ως λοσιόν και ελαφριές αλοιφές. Κατά την εφαρμογή, σχηματίζουν ένα λεπτό φιλμ στην επιφάνεια του δέρματος που παρέχει προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία. Άλλα σκευάσματα περιλαμβάνουν έλαια, πηκτές, γαλακτώματα, μους (ρευστά γαλακτώματα), αερολύματα και σκόνες. Τα ανόργανα αντηλιακά είναι πιο δύσκολο να ενσωματωθούν σε τελικό προϊόν λόγω της σωματιδιακής τους φύσης. Παραδοσιακά, παρασκευάζονταν ως κρέμες που είναι κολλώδεις, λιπαρές και δυσάρεστες στη χρήση. Η μετατροπή ή ο εγκλεισμός τους όμως σε νανοσωματίδια έχει επιτρέψει την δημιουργία σκευασμάτων σε μορφή σπρέι που σχηματίζουν ένα ημιδιαφανές στρώμα στο δέρμα που παρέχει. Επί του παρόντος, δεν έχουν εγκριθεί για καταχώριση νανομορφοποιημένα σκευάσματα αντηλιακών που χρησιμοποιούνται μέσω ψεκασμού, λόγω ανησυχιών για την ασφάλεια, καθώς αυτά τα νανοσωματίδια ενδέχεται να εισπνευστούν και επομένως να προκαλέσουν τοξικότητα σε σύστημα του οργανισμού. Τα φυσικά αντηλιακά φίλτρα σκευάζονται ως πάστες, γαλακτώματα, σπρέι και αλοιφές. Οι προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν μηχανική σωματιδίων, όπως ο εγκλωβισμός ή η ενσωμάτωση, γίνονται για να αυξηθεί η αισθητική αξία των προϊόντων (Nesseem, 2011).

Πολλά σύγχρονα προϊόντα προσωπικής φροντίδας ή αντηλιακά περιέχουν συστατικά με μέγεθος νανοκλίμακας, συμπεριλαμβανομένων νανοσωματιδίων στο εύρος 1–100nm σε διάμετρο. Αυτό το μέγεθος είναι χαρακτηριστικό όταν πρόκειται για νανοσωματίδια τύπου TiO_2 . Όμως, όταν χρησιμοποιούνται νανοφορείς όπως τα νανοσώματα, τα νιοσώματα, τα λιποσώματα και τα λιπιδικά σωματίδια το επιτρεπόμενο εύρος μεγέθους αυξάνεται στα 50–5.000nm. Το συγκεκριμένα σωματίδια αποτελούνται από παραδοσιακά καλλυντικά υλικά και χρησιμοποιούνται κυρίως για την προστασία των ευαίσθητων στο φως ή στο οξυγόνο δραστικών συστατικών. Για αυτό και το μέγεθός τους θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 100nm ώστε να μπορούν να διεισδύουν στο δέρμα για να απελευθερώνουν την εγκλωβισμένη ένωση αλλά να μην φτάνουν στην κυκλοφορία του δέρματος και να έχουν τοξικές παρενέργειες (Nohynek & Dufour, 2012).

Η ασφάλεια και η ευκολία του χρήστη είναι πρωταρχικοί παράγοντες κατά τον σχεδιασμό ενός προϊόντος και καθοδηγούν την προσέγγιση της ανάπτυξής του. Οποιαδήποτε ουσία που μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό του δέρματος και πιθανά αλλεργιογόνα πρέπει να αποφεύγεται. Όπως και άλλα προϊόντα που προορίζονται για χρήση στο δέρμα, η σύνθεση απαιτεί τη συμπερίληψη σταθεροποιητικών παραγόντων για την προώθηση της προσρόφησης της δραστικής ουσίας από το δέρμα καθώς και ενός κατάλληλου φορέα εντός του οποίου να διασπείρεται η δραστική ουσία. Τα διπλώματα ευρεσιτεχνίας

διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διαδικασία ανάπτυξης και πρέπει να ληφθούν προσεκτικά υπόψη πριν ξεκινήσει η ανάπτυξη προϊόντων (Geoffrey et al., 2019).

Μεταξύ των προκλήσεων και των ανησυχιών που σχετίζονται με τα τοπικά αντηλιακά σκευάσματα περιλαμβάνεται η φωτοσταθερότητα των οργανικών φίλτρων, η διεύρυνση του φάσματος και των παραμέτρων αποτελεσματικότητας, η ενσωμάτωση ενεργών συστατικών, η βελτίωση των καλλυντικών και αισθητηριακών πτυχών του προϊόντος, ο προσδιορισμός και η εξατομίκευση των «οχημάτων» μεταφοράς των δραστικών ουσιών. Για την ιδανική σύνθεση ενός αντηλιακού προϊόντος θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πτυχές όπως η αποτελεσματικότητα για την προβλεπόμενη χρήση, το εύρος του φάσματος προστασίας (UVA και UVB), η ασφάλεια και η ανεκτικότητα για τοπική χρήση, η σταθερότητα, η απουσία λεκέδων στα ρούχα, το ευχάριστο άρωμα, η αντοχή στο νερό, η εύκολη εναπόθεση στο δέρμα, ο υψηλός συντελεστής απόσβεσης και το προσιτό κόστος. Τα αντηλιακά σκευάσματα περιλαμβάνουν τόσο τους κύριους αντηλιακούς παράγοντες, αλλά και έκδοχα ειδικά για τον τύπο της σκευάσματος, συμπεριλαμβανομένου ενός κατάλληλου διαλύτη ή συστημάτων μεταφοράς της δραστικής ουσίας. Η επιλογή των εκδόχων καθορίζεται από την προβλεπόμενη χρήση και τη φυσικοχημική φύση των συστατικών (Geoffrey et al., 2019; Nesseem, 2011; Tanner, 2006).

Τα πιο κοινά αντηλιακά φίλτρα που χρησιμοποιούνται είναι το διοξείδιο τιτανίου, το οξείδιο ψευδαργύρου, σαν φυσικά φίλτρα και αβοβενζόνη, βενζοφαινόνη 8, οκτοκυκλόνιο και οξυβενζόνη, σαν χημικά φίλτρα. Για να επιτευχθεί διαφορετικό ποσοστό αντηλιακής προστασίας κάθε φορά, μπορεί να προσαρμόζεται η ποσότητα του δραστικού συστατικού. Η Lademan και η ομάδα της δημιούργησαν ένα προϊόν με έναν συνδυασμό οργανικών και ανόργανων φίλτρων και έδειξαν την αυξημένη αποτελεσματικότητα των προϊόντων που περιέχουν και τα δύο είδη φίλτρων σε σύγκριση με εκείνα που περιέχουν μόνο οργανικά ή φυσικά φίλτρα (Lademann et al., 2005).

Ένα ορθολογικά σχεδιασμένο και ανεπτυγμένο προϊόν ενισχύει τη συμμόρφωση των χρηστών ενώ παρέχει την απαραίτητη προστασία έναντι της βλάβης του δέρματος που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία (S. Xu et al., 2016). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η υιοθέτηση της έννοιας Quality by Design (QbD) έχει υποστηριχθεί από κορυφαίες ρυθμιστικές αρχές. Η υιοθέτηση αυτής της προσέγγισης περιλαμβάνει έναν σχολαστικό επιστημονικό σχεδιασμό του προϊόντος, προσεκτική επιλογή υλικών και παραμέτρων στην διαδικασία της σύνθεσης για να διασφαλιστεί η επίτευξη ενός προκαθορισμένου προφίλ όσον αφορά την ποιότητα του προϊόντος (Mishra et al., 2018). Ο παρασκευαστής αναπτύσσει ένα Προφίλ Προϊόντος Στόχου Ποιότητας (QTTP) και καθορίζει τα επιθυμητά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά απόδοσης του αντηλιακού. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο καθορισμός των κρίσιμων χαρακτηριστικών υλικών (CMA) και των παραμέτρων διεργασίας που απαιτούνται για την επίτευξη του QTTP (Fukuda et al., 2018).

Η αξιολόγηση κινδύνου διενεργείται σε περιπτώσεις που ενδέχεται να εμποδίσουν την επίτευξη της επιθυμητής ποιότητας του προϊόντος και λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα για την αντιμετώπιση αυτών των πιθανών κινδύνων. Για να συμπληρωθεί η επίτευξη της επιθυμητής ποιότητας προϊόντος, η χρήση εργαλείων σχεδιασμού πειραμάτων (DoE) θα

μπορούσε να είναι ένας πολύτιμος οδηγός για τη βελτιστοποίηση των επιθυμητών ιδιοτήτων των αντηλιακών (Peres et al., 2017).

Τα αντηλιακά προϊόντα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τη βάση τους. Δηλαδή εάν είναι με βάση το νερό, το λάδι, γαλακτώματα με βάση αιθανόλη/έλαιο ή γαλακτώματα που περιέχουν τόσο υδάτινες όσο και ελαιώδεις φάσεις, καθώς και από το αν είναι λεπτά, παχιά ή ακόμα και στερεά.

- Τα προϊόντα με βάση μία ελαιώδη φάση κυμαίνονται από λεπτά έλαια και ελαιώδη σπρέι έως παχύρρευστα τζελ και αλοιφές αλλά και στερεά σκευάσματα σε μορφή στικ. Η μόνη διαφορά μεταξύ αυτών των διάφορων μορφών προϊόντων έγκειται στο είδος του λαδιού που χρησιμοποιείται, στην ποσότητά του και στην ποσότητα των ηηκτικών παραγόντων που προστίθεται.
- Τα προϊόντα με βάση το νερό είναι ουσιαστικά ανύπαρκτα στην αγορά, κυρίως λόγω του περιορισμένου αριθμού υδατοδιαλυτών ενεργών αντηλιακών συστατικών και της κακής αντοχής στο νερό και τον ιδρώτα αυτών των σκευασμάτων.
- Σε αντίθεση με το νερό, η αιθανόλη είναι αναμίξιμη με τα περισσότερα από τα λιπαρά ή ελαιοδιαλυτά αντηλιακά ενεργά συστατικά. Επιπλέον η αιθανόλη εξατμίζεται γρήγορα, μειώνοντας έτσι την ποσότητα του υπολειμματικού υλικού που μένει στο δέρμα και βελτιώνοντας την αίσθηση του προϊόντος στο δέρμα. Άρα, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων της αιθανόλης, τα αντηλιακά προϊόντα με βάση την αιθανόλη μπορούν να ξεπεράσουν πολλά από τα προβλήματα που σχετίζονται με τα αντηλιακά σκευάσματα με βάση το έλαιο και το νερό. Ωστόσο τα προϊόντα με βάση την αιθανόλη μπορεί να είναι ξηρά και ελαφρώς ερεθιστικά στο δέρμα.
- Τα προϊόντα με βάση το γαλακτώμα, δηλαδή αντηλιακές λοσιόν και κρέμες, είναι η πιο κοινή μορφή προϊόντος στην αγορά. Όσον αφορά τη σύνθεση της φόρμουλας, αυτές οι λοσιόν και οι κρέμες είναι γαλακτώματα, ή σταθεροποιημένες διασπορές ενός υγρού σε άλλο υγρό, με τη βασική διαφορά να είναι το ιξώδες. Το βασικό πρόβλημα με αυτή τη μορφή αντηλιακών προϊόντων είναι η σταθεροποίησή τους. Οι δύο κύριες προκλήσεις στη σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων είναι να επιτραπεί η διασπορά των σταγόνων διεσπαρμένης φάσης στην συνεχή φάση και να αποτραπεί η κατακόρυφη κίνηση των διασκορπισμένων σταγόνων υπό την επίδραση της βαρύτητας λόγω της διαφοράς στις πυκνότητες των φάσεων του γαλακτώματος (Nash et al., 2006; Tanner, 2006).

1.1.6 Παράγοντας αντηλιακής προστασίας (SPF)

Όπως είναι προφανές μετά την ανάπτυξη ενός αντηλιακού σκευάσματος, απαιτείται φυσικοχημικός και μικροβιολογικός χαρακτηρισμός του τελικού προϊόντος για να διαπιστωθεί η συμμόρφωσή του με τις απαιτούμενες ποιοτικές παραμέτρους. Οι συγκεκριμένες δοκιμές περιλαμβάνουν την οπτική ανάλυση, τον έλεγχο σταθερότητας, τον προσδιορισμό του pH, τον προσδιορισμό της αντοχής στο νερό και τη μικροβιολογική αξιολόγηση του προϊόντος. Ο πιο σημαντικός ίσως παράγοντας που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα ενός σκευάσματος είναι ο προσδιορισμός του Δείκτη Ηλιακής Προστασίας (SPF).

Ο παράγοντας προστασίας από τον ήλιο αναφέρεται στην ικανότητα ενός αντηλιακού να αποτρέπει την ανάπτυξη ερυθήματος κατά την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (Mbang et al., 2014). Ο δείκτης SPF μπορεί να οριστεί, όπως προτάθηκε από τον FDA το 1978, ως ο αριθμητικός λόγος μεταξύ της ελάχιστης ερυθματικής δόσης (ΕΔΕ) του προστατευμένου από αντηλιακό σκεύασμα δέρματος, σε ποσότητα 2mg/cm², ως προς την ελάχιστη ερυθματώδη δόση του απροστάτευτου δέρματος, μια μαθηματική σχέση που μπορεί να είναι παριστάνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$SPF = \frac{ΕΔΕ \text{ σε προστατευμένο δέρμα}}{ΕΔΕ \text{ σε μη προστατευμένο δέρμα}}$$

Η τιμή SPF προσδιορίζεται κυρίως χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις *in vivo*, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιεί ηλεκτροφωτομετρικές μεθόδους *in vitro* καθώς και *in silico* μεθόδους που χρησιμοποιούν υπολογιστικά μοντέλα για την πρόβλεψη της τιμής SPF (Osterwalder & Herzog, 2009). Παραδοσιακά, η *in vitro* δοκιμή για τον προσδιορισμό του SPF χρησιμοποιεί αποκομμένο δέρμα από πτώματα ή πειραματόζωα. Το SPF μπορεί επίσης να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρικές μεθόδους (Dutra et al., 2004; Mbang et al., 2014; Nobre & Fonseca, 2016).

Σήμερα, προτείνεται κυρίως η χρήση εθελοντών ανθρώπων για τον προσδιορισμό του SPF *in vivo*. Το αντηλιακό εφαρμόζεται προσεκτικά στους εθελοντές σε ποσότητα 2 mg/cm² και αφήνεται να στεγνώσει σταδιακά. Οι περιοχές του δέρματος που χρησιμοποιούνται σε αυτού του είδους τις δοκιμές συνήθως είναι το κάτω μέρος της πλάτης, και ειδικά οι περιοχές που δεν έχουν πρόσφατη έκθεση σε αντηλιακά. Απαιτείται, επιπλέον, να γίνεται προσεκτική επιλογή των εθελοντών με την προϋπόθεση ότι δεν θα έπρεπε να έχουν εκτεθεί στον ήλιο ή να έχουν μαυρίσει για τουλάχιστον 90 ημέρες πριν από την αξιολόγηση. Άλλες βασικές απαιτήσεις για την επιλογή εθελοντών είναι η έλλειψη ευαισθησίας στο δέρμα (D’Orazio et al., 2013; Moyal, 2008). Άλλα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού εθελοντών ακολουθούν τις οδηγίες για κλινικές δοκιμές (BayerInc, 2009). Λεπτομερείς οδηγίες για τον προσδιορισμό του SPF *in vivo* περιγράφονται στη Διεθνή Μέθοδο Δοκιμής Αντηλιακής Προστασίας (ISO, 2010).

Παρά τα όσα αναφέρονται πιο πάνω για τον προσδιορισμό του δείκτη ηλιοπροστασίας, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία τάση αποφυγής χρήσης πειραματόζωων σε μελέτες για προϊόντα κοσμετολογίας. Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει ισχυρή *in vitro* και *in vivo* συσχέτιση του δείκτη SPF, επομένως αποτρέπεται η ανάγκη για μελέτες σε ζώα (Dimitrovska Cvetkovska et al., 2017). Για αυτό το λόγο έχουν αναπτύξει τεχνικές *in vitro* για τον προσδιορισμό του SPF. Δύο προσεγγίσεις έχουν επικυρωθεί:

- Μέθοδοι στις οποίες πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης ή της μετάδοσης της υπεριώδους ακτινοβολίας μέσω φιλμ αντηλιακών προϊόντων σε πλάκες ή μεμβράνες χαλαζία (Dutra et al., 2004).
- Μέθοδοι στις οποίες τα χαρακτηριστικά απορρόφησης των αντηλιακών παραγόντων προσδιορίζονται με βάση φασματοφωτομετρική ανάλυση (Walters et al., 1997).

Οι δοκιμές είναι σχετικά φθηνές και γρήγορες στη διεξαγωγή τους (Sudhahar & Balasubramanian, 2013). Σε αυτή την περίπτωση το SPF σχετίζεται με την απορρόφηση σύμφωνα με τον τύπο:

$$A = -\log_{10}\left(\frac{1}{SPF}\right) = \log_{10}(SPF)$$

Η τιμή του SPF του αντηλιακού προϊόντος που πρέπει συγκεκριμένο άτομο καθορίζεται από τη δραστηριότητα του χρήστη σε εξωτερικούς χώρους και την ευαισθησία του στα ηλιακά εγκαύματα, καθώς και την περιοχή στην οποία βρίσκεται (Autier et al., n.d.; D’Orazio et al., 2013). Υψηλότερο SPF σημαίνει υψηλότερη αποτελεσματικότητα. Τα αντηλιακά υψηλού δείκτη προστασίας περιέχουν σχεδόν πάντα ένα φυσικό φίλτρο και τουλάχιστον δύο οργανικά φίλτρα, το ένα με βέλτιστο έλεγχο για μήκη κύματος UVB και το άλλο για τη UVA ακτινοβολία (Schalka et al., 2017).

Δεδομένου ότι η UVB ακτινοβολία είναι περίπου 1000 φορές πιο ερυθματογόνος σε σύγκριση με την UVA, ο δείκτης SPF αποτελεί σε μεγάλο βαθμό ένα μέτρο προστασίας έναντι των UVB ακτίνων (Rai et al., 2012a). Τα αντηλιακά προϊόντα ταξινομούνται σύμφωνα με τις τιμές του δείκτη SPF τους ως εξής (Stevanato et al., 2014):

- SPF = 2-11: «προϊόντα χαμηλής αντηλιακής προστασίας»
- SPF = 12-30: «προϊόντα μέτριας αντηλιακής προστασίας»
- SPF > 30: «προϊόντα υψηλής αντηλιακής προστασίας»

1.1.7 Δείκτες προστασίας έναντι της UVA ακτινοβολίας

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η UVA ακτινοβολία προκαλεί στο δέρμα βλάβες εξαιτίας των ROS που μπορεί να οδηγήσουν στην πρόωμη γήρανσή του αλλά και στον καρκίνο. Η προστασία σε αυτό το εύρος υποδηλώνεται με τον ισχυρισμό «αντηλιακά ευρέως φάσματος», δεδομένου ότι η UVA ακτινοβολία διεισδύει βαθύτερα από την UVB. Για να αξιολογηθεί ένα αντηλιακό, χρειάζονται δύο μέθοδοι, η *in vivo* μέτρηση του SPF και η *in vitro* μέτρηση του κρίσιμου μήκους κύματος (λ_c). Το κρίσιμο μήκος κύματος παρέχει ένα αξιόπιστο μέτρο του εύρους της ικανότητας φασματικής απορρόφησης ενός προϊόντος και ορίζεται ως το μήκος κύματος στο οποίο το ολοκλήρωμα της καμπύλης απορρόφησης είναι το 90% της συνολικής ολοκληρωμένης περιοχής του φάσματος μεταξύ 290 και 400nm. Οι ερευνητές έχουν προτείνει ένα κρίσιμο μήκος κύματος ≥ 370 nm ώστε ένα προϊόν να μπορεί εξασφαλίζει ευρεία προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία (Nash et al., 2006; Thompson et al., 2021).

Το 1994 η ομάδα του B.L. Diffey πρότειναν την βαθμολόγηση των αντηλιακών από 0 έως 4 αστέρια ανάλογα με το κρίσιμο μήκος κύματος στο οποίο απορροφούν τα μόρια ώστε να κατατάσσονται και η κατηγοριοποίηση τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 (Diffey, 1994):

Πίνακας 2: Αξιολόγηση αντηλιακών φίλτρων ανάλογα με το κρίσιμο μήκος κύματος που απορροφούν

Κρίσιμο μήκος κύματος (λ_c)	Βαθμολογία ευρέως φάσματος	Χαρακτηρισμός
$\lambda_c < 325$	0	χαμηλή UVA προστασία

$325 < \lambda_c < 335$	1	μέτρια UVA προστασία
$335 < \lambda_c < 350$	2	καλή UVA προστασία
$350 < \lambda_c < 370$	3	ανώτερη UVA προστασία
$\lambda_c > 370$	4	μέγιστη UVA προστασία

Επιπλέον, η προστασία που μπορεί να παρέχει ένα αντηλιακό φίλτρο έναντι της UVA ακτινοβολίας υπολογίζεται και από τον λόγο της μέσης απορρόφησης της UVA προς τη μέση απορρόφηση της UVB ακτινοβολίας (UVA/UVB) (S. Q. Wang et al., 2008). Το 1991 η εταιρεία «Boots the Chemist Ltd» εισήγαγε ένα σύστημα αξιολόγησης της προστασίας έναντι της UVA ακτινοβολίας (UVA Star Rating system), σύμφωνα με την τιμή του λόγου UVA/UVB, ως εξής (Moyal, 2008; Stevanato et al., 2014):

Πίνακας 3: Αξιολόγηση αντηλιακών φίλτρων ανάλογα με το λόγο απορρόφησης UVA και UVB ακτινοβολίας

Λόγος απορροφήσεων	UVA Star Rating	Χαρακτηρισμός
$UVA/UVB < 0,2$	0	χαμηλή UVA προστασία
$0,21 < UVA/UVB < 0,40$	1	μέτρια UVA προστασία
$0,41 < UVA/UVB < 0,60$	2	καλή UVA προστασία
$0,61 < UVA/UVB < 0,80$	3	ανώτερη UVA προστασία
$UVA/UVB > 0,8$	4	μέγιστη UVA προστασία

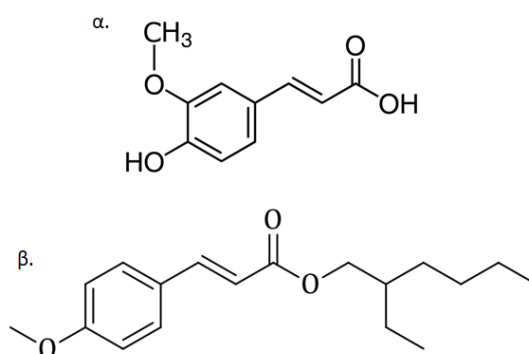
1.1.8 Φαινολικά οξέα και Φωτοπροστατευτική δράση

Τα φαινολικά οξέα είναι η πιο σημαντική κατηγορία βιοδραστικών χημικών ουσιών που ομαδοποιούνται κάτω από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν σε διάφορες φυτικές πηγές όπως φρούτα, λαχανικά, μπαχαρικά, δημητριακά και ποτά και κατανέμονται σε διάφορα μέρη των φυτών. Είναι οι αρωματικοί δευτερογενείς μεταβολίτες, που διαθέτουν μία λειτουργική ομάδα καρβοξυλικού οξέος και μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες υποκατηγορίες: τα παράγωγα του κινναμμωμικού και τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος. Προσδίδουν χρώμα, γεύση, στυφότητα και σκληρότητα, χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στα τυπικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Τα φαινολικά οξέα έχουν τεράστιο ενδιαφέρον χάρη στα τεράστια διατροφικά οφέλη για την υγεία και τις ιδιότητές τους όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, ανοσορυθμιστικές, αντιαλλεργικές, αντιμικροβιακές, αντιθρομβωτικές, καρδιοπροστατευτικές αντικαρκινικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες. Διάφορα φαινολικά οξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργικά πρόσθετα σε προϊόντα για τη διατήρηση του χρώματος, την καθυστέρηση της μικροβιακής ανάπτυξης και την αναστολή της οξειδωσης των λιπιδίων και άλλα (Rashmi & Negi, 2020).

Τα τελευταία χρόνια, έχει αποδειχθεί πως διάφορα φαινολικά οξέα, και κυρίως παράγωγα υδροξυ-κινναμμωμικού οξέος, όπως είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ, προλαμβάνουν το ερύθημα που προκαλείται από την UVB ακτινοβολία *in vivo* και *in vitro* και μειώνουν την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Πιο συγκεκριμένα, ερευνητές έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα του φερουλικού οξέος έναντι των βλαβερών επιπτώσεων της υπεριώδους ακτινοβολίας, όπως το ερύθημα, η φωτογήρανση και ο καρκίνος του δέρματος. Δοκιμές έχουν δείξει ότι η ενσωμάτωση

φερουλικού οξέος σε τοπικά αντηλιακά σκευάσματα που περιέχουν βιταμίνες αύξησε τη χημική σταθερότητα των βιταμινών και επίσης ενίσχυσε τη φωτοπροστατευτική δράση, μειώνοντας τα επίπεδα του ερυθρήματος και της απόπτωσης των κερατοκυττάρων (Oresajo et al., 2008; Saija et al., 2000). Ένα άλλο παράγωγο του κινναμωμικού οξέος που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία σαν φίλτρο υπεριώδους ακτινοβολίας σε καλλυντικά προϊόντα είναι ο 2-αιθυλο-εξυλεστέρας του 4-μεθοξυ-κινναμωμικού οξέος (γνωστός ως octinoxate ή octylmethoxycinnamate – OMC). Ωστόσο, κατά τη χρήση του, υπήρξαν ορισμένα μειονεκτήματα όπως κακή φωτοσταθερότητα και ισχυρή διαπερατότητα. Σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές, μεγάλη ποσότητα OMC θα μπορούσε να συσσωρευθεί στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος μετά την επικάλυψη στις επιφανειακές περιοχές. Τέλος, το OMC μπορεί είναι ικανό να αναστείλει τη δραστηριότητα της δεϊωδινάσης, να προκαλέσει μορφολογικές αλλαγές στις ωοθήκες των αρουραίων και να επηρεάσει την έκκριση οιστρογόνων, την αναπαραγωγική ανάπτυξη και το νευρικό σύστημα των απογόνων αρουραίων (C. Xu et al., 2021).



Σχήμα 1: Χημικές δομές παραγώνων του κινναμωμικού οξέος που εμφανίζουν αντηλιακή δράση κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας. α) Φερουλικό οξύ, β) OMC

Πρόσφατα, έχουν γίνει προσπάθειες για την ανάπτυξη ορισμένων πιο αποτελεσματικών και ασφαλών αντηλιακών παραγόντων, μειώνοντας τον τοξικολογικό κίνδυνο από τη διαδερμική απορρόφηση. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος, έχουν εφαρμοστεί πολλές στρατηγικές για την πρόληψη της φωτοφθοράς στο δέρμα και η πιο συνηθισμένη είναι η προσπάθεια σύνθεσης αναλόγων των παραπάνω αντηλιακών φίλτρων, τα οποία είναι πιο ασφαλή και επιδεικνύουν προστασία ευρέως φάσματος.

Η ερευνητική ομάδα των Dos Santos et. al. παρουσίασε τη σύνθεση μιας νέας σειράς υβριδικών παραγόντων για χρήση σε αντηλιακά σκευάσματα, που αποτελούνται από τις δομικές μονάδες ευρέως χρησιμοποιούμενων φίλτρων, όπως η αβοβενζόνη και το OMC, και γνωστών αντιοξειδωτικών παραγόντων, όπως η ρεσβερατρόλη. Τελικά, δύο από τα παράγωγα του OMC αξιολογήθηκαν ως νέα φίλτρα ευρέως φάσματος. Σύμφωνα με τους ερευνητές, τα υβριδικά παράγωγα με αντιοξειδωτική δράση αποτελούν νέες πρωτότυπες ενώσεις που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε αντηλιακά σκευάσματα (Reis et al., 2014).

Ταυτόχρονα, άλλη ερευνητική ομάδα διερεύνησε τέσσερις κατηγορίες ενώσεων φυσικής προέλευσης, βιταμίνες, πολυφαινόλες, καροτενοειδή και αμινοξέα, ως ασφαλή και

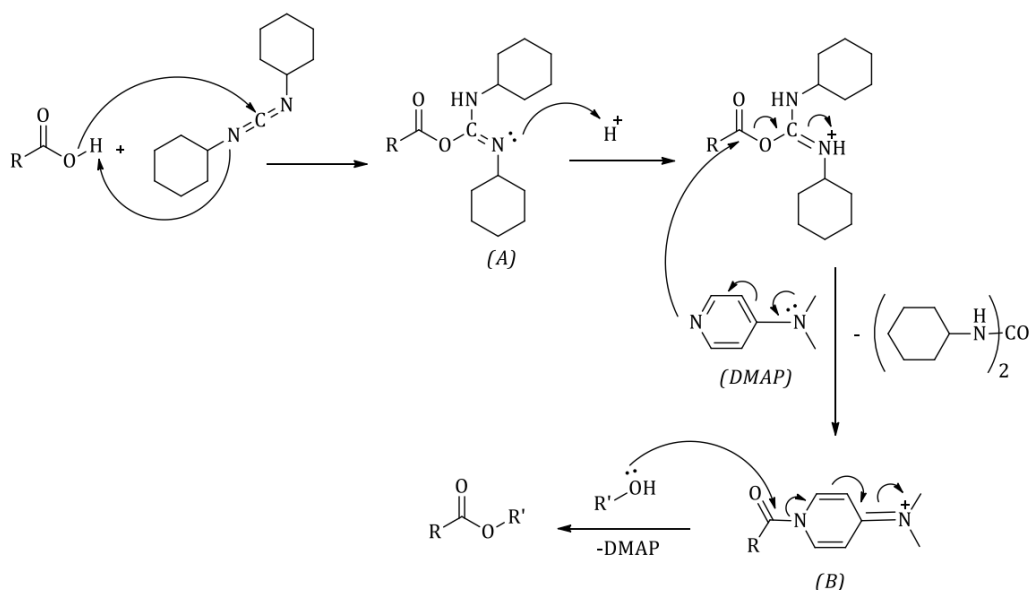
αποτελεσματικά UV φίλτρα για χρήση σε τοπικά αντηλιακά σκευάσματα. Τελικά, διαπιστώθηκε πως το φερούλικό οξύ και ο αιθυλεστέρας του φερούλικού οξέος επιδεικνύουν σημαντική ικανότητα απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας και χαμηλότερα επίπεδα κινδύνου σε σύγκριση με ενεργά αντηλιακά συστατικά που χρησιμοποιούνται (Thompson et al., 2021).

1.1.9 Εστεροποίηση Steglich

Το 1978, οι Wolfgang Steglich και Bernhard Neises ανέφεραν για πρώτη φορά μια εναλλακτική διαδικασία εστεροποίησης χρησιμοποιώντας τον παράγοντα σύζευξης αμιδίου N,N'-Δικυκλο-εξυλο-καρβοδιμύδιο (DCC) και τον οργανοκαταλύτη 4-διμεθυλο-αμινοπυριδίνη (DMAP). Αυτή η μέθοδος προήλθε από διαδικασίες σύζευξης αμιδίου όπου το DCC χρησιμοποιούταν ως αποτελεσματικός παράγοντας σύζευξης. Η εστεροποίηση Steglich πραγματοποιείται κάτω από ήπιες συνθήκες όπως θερμοκρασία περιβάλλοντος, συχνά ουδέτερο pH, και μπορεί να προσφέρει ένα ευρύ φάσμα εστέρων που περιέχουν ιδιαίτερες υποκαταστάτες όπως ασταθή οξέα, ή στερεοχημικά παρεμποδισμένες ομάδες.

Το DMAP είναι ιδιαίτερα πιο πυρηνόφιλο από τις αλκοόλες, για αυτό και απαιτούνται καταλυτικές ποσότητες DMAP για αυτού του είδους της εστεροποίησης. Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του οξέος από το DCC, προς σχηματισμό της N-ακυλοουρίας, η οποία προκύπτει από μία 1,3-αναδιάταξη του ενδιάμεσου O-ακυλίου κι έτσι δεν μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω με την αλκοόλη. Επομένως, για τη σύνθεση του εστέρα απαιτείται η προσθήκη DMAP ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο σχηματισμός του μη παραγωγικού υποπροϊόντος μετανάστευσης του ακυλίου, το οποίο είναι ανταγωνιστικό με την πυρηνόφιλη «επίθεση» της αλκοόλης στο ενδιάμεσο της N-ακυλοουρίας. Αυτό συμβαίνει επειδή ο σχηματισμός υποπροϊόντων της ενδομοριακής μετανάστευσης ακυλίου είναι αργός σε σύγκριση με την πυρηνόφιλη «επίθεση» των αμινομάδων.

Παρόλα αυτά, στην εστεροποίηση Steglich συνήθως χρησιμοποιούνται διαλύτες και αντιδραστήρια που δεν είναι ιδανικά από την άποψη της προστασίας του περιβάλλοντος, της υγείας και της ασφάλειας. Στη σύνθεση εστέρων μέσω μεθόδων τύπου Steglich οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι τα DCM, DMF, THF και CH₃CN. Επιπλέον, τα αντιδραστήρια σύζευξης που χρησιμοποιούνται συνήθως, όπως το DCC και το DIC, θεωρούνται προβληματικά από τους οδηγούς επιλογής αντιδραστηρίων GlaxoSmithKline (GSK). Για παράδειγμα, το DIC είναι τοξικό όταν εισπνέεται. Η ανάπτυξη ενός οδηγού επιλογής διαλύτη-αντιδραστηρίου για το σχηματισμό εστέρων που θα τονίζει ασφαλέστερες, πιο βιώσιμες εναλλακτικές λύσεις, θα ήταν σημαντική και πολύ χρήσιμη τόσο για τον ακαδημαϊκό κόσμο όσο και για τη βιομηχανία (Diirr et al., 1974; Jordan et al., 2021).



Σχήμα 2: Μηχανισμός της αντίδρασης «Εστεροποίηση Steglich»

1.2 Νανοτεχνολογία και νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων

1.2.1 Εισαγωγή στη νανοτεχνολογία

Η νανοτεχνολογία είναι το διεπιστημονικό πεδίο που αφορά στην ανάπτυξη και την χρήση των υλικών με τα οποία μπορούν να παρασκευαστούν συσκευές και προϊόντα τα οποία έχουν διαστάσεις της τάξης του δισεκατομμυριοστού του μέτρου. Τα νανοσωματίδια και τα νανοϋλικά παρουσιάζουν νέες ιδιότητες που είναι συνάρτηση των διαστάσεων τους. Τα τελευταία τριάντα χρόνια η παρουσία της νανοτεχνολογίας σε πολλά πεδία επιστημών, όπως της Φυσικής, της Χημείας, της Βιολογίας, των Μαθηματικών αλλά και των Κοινωνικών Επιστημών, έχει επηρεάσει την εξέλιξη τους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ιδιότητες της ύλης σε νανοδιαστάση είναι διαφορετικές και σχετίζονται με την αυξανόμενη αναλογία συνολικής επιφάνειας των σωματιδίων ως προς τον όγκο τους. Επίσης, τα διεπιφανειακά φαινόμενα και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νανοσωματιδίων που σχετίζονται όχι με το ευκλείδειο σχήμα τους αλλά με τη μορφολογία τους, δημιουργούν νέες και μοναδικές ιδιότητες στα νανοϋλικά. Αυτές τις ιδιότητες, οι οποίες μπορούν να μελετηθούν με τα υπάρχοντα επιστημονικά εργαλεία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διάφορες δραστηριότητες στην καθημερινή ζωή, αλλά και στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προϊόντων και προϊόντων προστασίας, όπως εμβόλια ή αντηλιακά σκευάσματα. Τα νανοϋλικά μπορεί να είναι συσκευές ή συστήματα, υπερμοριακές δομές, σύμπλοκα ή σύνθετα υλικά.

Η Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία αφορά σε θεραπευτικά προϊόντα όπου τα σωματίδια έχουν διαστάσεις από μερικές δεκάδες νανόμετρα έως το όριο των 1000 νανομέτρων. Παρόλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι ο όρος αυτός είναι δυναμικός και μεγαλύτερη σημασία έχει η δράση και τα επιφανειακά φαινόμενα που εμφανίζονται σε κάθε περίπτωση. Υπάρχουν πολλές κατηγορίες νανοσωματιδίων τα οποία χρησιμοποιούνται στη θεραπευτική των νόσων και σε προϊόντα κοσμετολογίας ή και σε εμβόλια για την

προστασία από νοσογόνους παράγοντες. Γενικά, η έρευνα για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων έχει δύο κατευθύνσεις. Η πρώτη είναι η εύρεση και η μελέτη νέων βιοδραστικών μορίων και η δεύτερη είναι η μορφοποίηση των βιοδραστικών μορίων με επιστημονικά τεκμηριωμένα, ασφαλή και αποτελεσματική τεχνολογία. Καθώς η έρευνα στρέφεται σε μεγάλο βαθμό στη βελτίωση της δράσης γνωστών βιοδραστικών μορίων μέσω της χρήσης νέων φαρμακοτεχνολογικών μορφών, η νανοτεχνολογία μπορεί να ανοίξει νέους δρόμους σε αυτό τον τομέα.

Γενικά, οι μέθοδοι παραγωγής όλων των νανοσωματιδίων διακρίνονται σε δύο πολύ μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη είναι η «από πάνω προς τα κάτω (Top down technology)» μέθοδος, στην οποία αφητηρία αποτελεί ένα bulk υλικό από το οποίο δημιουργούνται τα νανοσωματίδια. Πρόκειται και για τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται περισσότερο στη βιομηχανία σήμερα. Η δεύτερη κατηγορία ονομάζεται «από κάτω προς τα επάνω (Bottom up technology)». Σε αυτή την περίπτωση η δημιουργία των νανοσωματιδίων ξεκινάει από πολλαπλούς μικρούς πυρήνες, μόρια ή άτομα, τα οποία στη συνέχεια συσσωματώνονται μέχρι να δημιουργηθούν σωματίδια με το επιθυμητό μέγεθος.

Τα νανοσωματίδια λόγω του πολύ μικρού μεγέθους, αλλά και της μεγάλης επιφάνειας τους σε σχέση με τον όγκο τους, έχουν αυξημένη αποτελεσματικότητα και βιοσυμβατότητα με τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού μεταφέροντας θεραπευτικά μόρια ή συμμετέχοντας στη διάγνωση των νόσων. Η βελτίωση της διαλυτότητας των βιοδραστικών μορίων, η μείωση της τοξικότητας τους, η στοχευμένη θεραπεία και άλλα πλεονεκτήματα προσφέρονται από τα νανοσωματίδια με εγκλωβισμένα θεραπευτικά μόρια.

Η Νανοτεχνολογία μπορεί να έχει πολλές εφαρμογές σε διαφορετικούς τομείς. Οι πιο σημαντικές επικεντρώνονται στους τομείς της νανοϊατρικής, των επιστημών ζωής και υγείας και στον τομέα των υλικών, τομείς που αναλύονται στη συνέχεια. Υπάρχουν όμως και παραδείγματα εφαρμογών στον τομέα της πληροφορίας, της ηλεκτρονικής, της αποθήκευσης ενέργειας, της οικονομίας, της αυτοκίνησης, της ανάπτυξης και της ανακάλυψης νέων τεχνικών και στον τομέα της ένδυσης.

Στον τομέα των επιστημών ζωής, υγείας και ιατρικής, η νανοτεχνολογία βρίσκει εφαρμογές στην απεικόνιση και στη διαγνωστική και έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας νέας γενιάς διαγνωστικών εργαλείων τα οποία έχουν μικρό μέγεθος, απαιτούν μικρή ποσότητα δείγματος και παρέχουν σε σύντομο διάστημα ακριβή δεδομένα. Επιπλέον, αναπτύσσονται πολυλειτουργικές ιατρικές συσκευές με απώτερο στόχο την ελαχιστοποίηση του μεγέθους των στοιχείων που εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό ούτως ώστε να εξασφαλίζεται η όσο το δυνατόν πιο ανώδυνη χρήση τους, αλλά και να επιτυγχάνεται η αύξηση της βιοσυμβατότητας τους με τον ανθρώπινο οργανισμό. Ακόμα, καταγράφεται η ανάπτυξη ουσιών που είναι ικανές να διακρίνουν μοριακές αλλαγές και να προβλέπουν μεταλλαγή των προκαρκινικών κυττάρων σε καρκινικά. Τέλος, δημιουργούνται ερευνητικά εργαλεία που δίνουν την δυνατότητα στους ερευνητές να εντοπίζουν άμεσα νέους στόχους και να προβλέπουν την αντίσταση στα φάρμακα.

Μία άλλη σπουδαία εφαρμογή είναι η ελεγχόμενη αποδέσμευση βιοδραστικών μορίων. Η πρόοδος στην ελεγχόμενη αποδέσμευση των βιοδραστικών μορίων σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη συνθετικών νανοσυστημάτων για τη στοχευμένη απόδοση πολύπλοκων ως προς

τη δομή θεραπευτικών μορίων και βιομορίων. Οι κύριοι στόχοι της Νανοφαρμακευτικής στα πλαίσια της ελεγχόμενης αποδέσμευσης βιοδραστικών μορίων είναι η μεγιστοποίηση της βιοδιαθεσιμότητας και της αποτελεσματικότητάς τους. Ο έλεγχος της Φαρμακοκινητικής και της Φαρμακοδυναμικής τους, ο έλεγχος και η καταστολή της ανεπιθύμητης τοξικότητας και της ανοσογονικότητας, η μικρή διαλυτότητα τους, η γρήγορη αποικοδόμηση και απομάκρυνση τους από τον οργανισμό και η αδυναμία τους να διαπεράσουν τα βιολογικά εμπόδια, βελτιώνονται συνεχώς και αυξάνεται η αποτελεσματικότητα τέτοιων συστημάτων (*Pharmaceutical Nanotechnology Costas Demetzos Fundamentals and Practical Applications*, n.d.).

1.2.2 Νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει όλο και πιο εμφανές ότι η ανάπτυξη νέων φαρμάκων από μόνη της δεν αρκεί για να διασφαλίσει την πρόοδο στη φαρμακευτική θεραπεία. Τα πειραματικά δεδομένα που λαμβάνονται *in vitro* ακολουθούνται πολύ συχνά από απογοητευτικά αποτελέσματα *in vivo*. Οι κύριοι λόγοι για την αδυναμία ορισμένων θεραπειών περιλαμβάνουν:

- Ανεπαρκής συγκέντρωση φαρμάκου λόγω κακής απορρόφησης, γρήγορου μεταβολισμού και αποβολής (π.χ. πεπτίδια, πρωτεΐνες).
- Κατανομή φαρμάκου σε άλλους ιστούς σε συνδυασμό με υψηλή τοξικότητα φαρμάκων (π.χ. αντικαρκινικά φάρμακα)
- Κακή διαλυτότητα φαρμάκου που αποκλείει την ένεση υδατικού διαλύματος φαρμάκου
- Υψηλές διακυμάνσεις των επιπέδων στο πλάσμα λόγω της απρόβλεπτης βιοδιαθεσιμότητας μετά από χορήγηση από το στόμα, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης της τροφής στα επίπεδα στο πλάσμα (π.χ. κυκλοσπορίνη)

Μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων περιλαμβάνει την ανάπτυξη κατάλληλων συστημάτων-φορέων φαρμάκων. Τα νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποτελούν μικροκολλοειδείς δομές της κλίμακας των 10 έως 1000nm και η χρήση τους ως προς την ελεγχόμενη και στοχευμένη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών αλλά και μεγαλομορίων όπως νουκλεϊκά οξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες ή ορμόνες, έχει φέρει επανάσταση στον χώρο της επιστήμης. Η συμβολή των νανοσωματιδίων στον εγκλεισμό ευαίσθητων χημικών ουσιών είναι σημαντική εφόσον έτσι διαφυλάσσονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων από διάφορες εξωγενείς ή ενδογενείς συνθήκες όπως η επίδραση του pH, η ενζυμική υδρόλυση, η φαγοκυττάρωση, η θερμική υποβάθμιση και η φωτοξείδωση. Ο εγκλεισμός υδρόφοβων ή υδρόφιλων φαρμάκων που εμφανίζουν μειωμένη βιοσυμβατότητα, μέσα σε νανοσωματιδιακές δομές οδηγεί αφενός στην αποτελεσματικότερη μεταφορά τους στον οργανισμό (βελτίωση του φαρμακοκινητικού προφίλ) και αφετέρου ελαττώνει την τοξικότητά τους.

Τα νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων εμφανίζουν πολλαπλά πλεονεκτήματα στα οποία συγκαταλέγονται η δυνατότητα τροποποίησης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φαρμακευτικών ουσιών, η στοχευμένη μεταφορά τους σε ιστούς-στόχους, η ελεγχόμενη ή τροποποιημένη αποδέσμευσή τους και η βελτιωμένη διαθεσιμότητά τους. Επιπλέον, Το μέγεθος νανοκλίμακας παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των νανοσωματιδίων και

την αλληλεπίδρασή τους με τις βιολογικές μεμβράνες. Ο εγκλωβισμός των βιοδραστικών μορίων έχει ως αποτέλεσμα την προστασία και τη σταθεροποίηση τους τόσο μέσα στη συσκευασία ενός τελικού προϊόντος όσο και κατά τη μεταφορά τους εντός του οργανισμού. Τέλος, η συγκάλυψη ανεπιθύμητων ιδιοτήτων της δραστικής ουσίας όπως είναι η οσμή ή η γεύση μπορεί να επιτευχθεί ή να βελτιωθεί με τη χρήση κατάλληλων νανοφορέων (*Pharmaceutical Nanotechnology Costas Demetzos Fundamentals and Practical Applications*, n.d.).

Η επιλογή του κατάλληλου φορέα εγκλεισμού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως οι φαρμακοχημικές ιδιότητες της βιοδραστικής ένωσης, το επιθυμητό προφίλ απελευθέρωσης της, ο επιθυμητός στόχος δράσης αλλά και το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων. Όταν πρόκειται για την χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών εντός του οργανισμού, θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν και ο μηχανισμός στόχευσης του φαρμάκου, η οδός χορήγησής του και η απαιτούμενη δόση (Heinz et al., 2017).

Τα διάφορα, λοιπόν, συστήματα φορέων φαρμάκων μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα συστήματα διαλυτών μακρομοριακών φορέων και τα συστήματα κολλοειδών και σωματιδιακών φορέων. Τα συστήματα διαλυτών μακρομοριακών φορέων φαρμάκων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα αντισώματα, τα πολυμερή, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες, χρησιμοποιούνται με στόχο την προαγωγή της στοχευμένης δράσης των φαρμάκων. Σε αυτά τα συστήματα το φάρμακο είναι συζευγμένο με τον φορέα. Πλεονεκτούν έναντι των συστημάτων σωματιδιακών φορέων χάρη στο μικρό τους μέγεθος που τα διευκολύνει να μετακινούνται έξω από τη συστηματική κυκλοφορία. Ο χρόνος ημιζωής των φορέων αυτών στο πλάσμα εξαρτάται από το μοριακό βάρος, την ιοντική φύση και την αλληλεπίδραση τους με άλλα βιολογικά συστατικά στην κυκλοφορία. Το βασικό μειονέκτημά τους έναντι του σωματιδιακού τύπου φορέων έγκειται στο ότι μπορούν να μεταφέρουν μικρότερη ποσότητα φαρμάκου.

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

Δενδριμερή:

Τα δενδριμερή είναι συνθετικά πολυμερή που αποτελούνται από διακλαδισμένους επαναλαμβανόμενους κλάδους που αναδύονται από ένα κεντρικό πυρήνα. Διαθέτουν μεγάλο αριθμό εκτεθειμένων ανιονικών, ουδέτερων ή κατιονικών τερματικών μονάδων στην εξωτερική τους επιφάνεια, γεγονός που τους προσδίδει την δυνατότητα να εγκλωβίζουν υδρόφιλες ή υδρόφοβες ενώσεις. Το μέγεθός του κυμαίνεται από 1 έως 100

ηται είναι ακτινικά συμμετρικά, σφαιρικά, μονοδιασπαρμένα και ομοιογενή. Λόγω του μεγέθους τους, τα δένδριμερή χρησιμοποιούνται στη νανοϊατρική έρευνα. Βρέθηκε ότι είναι χρήσιμα ως συστήματα διανομής ή φορείς για φάρμακα και γονίδια, αλλά μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα δένδριμερή έχουν και αυτόνομη ιατρική χρήση, κυρίως λόγω των αντιμυκητιακών, αντιβακτηριακών και κυτταροτοξικών ιδιοτήτων τους. Τα οφέλη πολλών φαρμάκων δεν μπορούν να αξιοποιηθούν λόγω της κακής διαλυτότητας, της τοξικότητας ή των προβλημάτων σταθερότητάς τους. Η χρήση δένδριμερών ως φορείς αυτών των ενώσεων μπορεί να λύσει αυτά τα προβλήματα, βελτιώνοντας έτσι τις κλινικές τους εφαρμογές (Mendes et al., 2017).

Τα δένδριμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκου με παθητική στόχευση με μία επικάλυψη από πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) επιτυγχάνοντας την αύξηση του χρόνου ημιζωής τους στην κυκλοφορία του αίματος είτε με ενεργητική στόχευση προσθέτοντας ομάδες στόχευσης. Όσον αφορά τα φάρμακα, αυτά μπορούν είτε να συνδεθούν ομοιοπολικά στη δομή των δένδριμερών είτε να διαλυτοποιηθούν εντός της υδρόφοβης δομής τους (Căta et al., 2023).

Στερεά Πολυμερικά νανοσωματίδια:

Τα στερεά πολυμερικά νανοσωματίδια (PNPs) παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας μια μεγάλη ποικιλία είτε φυσικών είτε συνθετικών πολυμερών. Οι ευεργετικές πτυχές των πολυμερικών υλικών στις αντικαρκινικές θεραπείες περιλαμβάνουν υψηλή βιοσυμβατότητα, βιοαποδομησιμότητα και ελεγχόμενες ιδιότητες όπως το σχήμα, το μέγεθος και το δυναμικό επιφανείας. Η χρήση των PNP ως φορέων φαρμάκων συνήθως βελτιώνει τη σταθερότητα των θεραπευτικών παραγόντων, παρατείνει την κυκλοφορία του αίματος και αυξάνει την αποτελεσματικότητα της διέλευσης των βιολογικών μεμβρανών. Τα περισσότερο μελετημένα είναι τα βιοδιασπώμενα πολυμερή όπως τα πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) (Poly(lactic acid), PLA), το πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό οξύ) (poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), η πολυ(καπρολακτάνη) (Polycaprolactone, PCL) και οι πολυσακχαρίτες (ιδιαίτερα η χιτοζάνη).

Οι δύο τύποι PNP που κυριαρχούν στις βιοϊατρικές εφαρμογές είναι οι νανοσφαίρες και οι νανοκάψουλες. Οι νανοσφαίρες είναι συστήματα συμπαγούς πολυμερούς μήτρας, ενώ οι νανοκάψουλες αποτελούνται από ένα διασυνδεδεμένο πολυμερικό κέλυφος (περίπου 5 nm) που περιβάλλει ένα κενό εσωτερικό. Και οι δύο μορφές μπορούν να έχουν έναν ενεργό παράγοντα φορτωμένο είτε στο εσωτερικό των NPs είτε στην επιφάνεια. Άλλοι υποτύποι περιλαμβάνουν πολυμεροσώματα, πολυμερικούς νανοπηκτές και άλλα. Τα νανοσυστήματα που χρησιμοποιούνται για τη χορήγηση φαρμάκων ποικίλλουν σε μέγεθος, από αρκετά nm έως αρκετές εκατοντάδες nm. Ωστόσο, το προτιμώμενο εύρος θεωρείται μεταξύ 10 και 200 nm, ανάλογα με την εφαρμογή. Το ίδιο ισχύει για το σχήμα (σφαιρικό/επιμηκές) και το φορτίο (αρνητικό/ουδέτερο/θετικό) των νανοσωματιδίων – η προτίμηση έγκειται στην εφαρμογή (Bigaj-Józefowska & Grzeškowiak, 2022).

Στερεά Πρωτεϊνικά Σωματίδια:

Ως θεραπευτικοί παράγοντες, οι πρωτεΐνες αξιοποιούν πολλές εγγενείς ιδιότητες όπως η επιλεκτικότητα, η ανοχή στο περιβάλλον του ανθρώπινου οργανισμού, η ικανότητα

ανασυνδυασμού και, τουλάχιστον στην περίπτωση των ανθρώπινων πρωτεϊνών, χαρακτηρίζονται από ταχύτερες διαδικασίες ρυθμιστικής έγκρισης. Όχι μόνο οι συζυγείς πρωτεΐνες, τα μονοκλωνικά αντισώματα ή τα ένζυμα, αλλά και τα στερεά πρωτεϊνικά σωματίδια διαθέτουν αυτά τα πλεονεκτήματα. Τα σωματίδια αυτά έχουν το πλεονέκτημα ότι παρουσιάζουν χαρακτηριστικά τόσο των πρωτεϊνών, όπως η εγγενής λειτουργία, η ειδικότητα, ο υψηλός βαθμός ευελιξίας τροποποίησης, ενώ ταυτόχρονα αξιοποιούν τα πλεονεκτήματα των νανοσωματιδίων: ελεγχόμενη απελευθέρωση, βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα και σταθερότητα. Ενώ τα PNP δεν έχουν διερευνηθεί εκτενώς σε σύγκριση με άλλους νανοφορείς, η ιδέα της χρήσης πρωτεϊνών ως μεταφορέων φαρμακευτικών ουσιών δεν είναι νέα.

Γενικά, η ιδέα ενός ιδανικού νανοφορέα είναι ένας φυσικός ιός. Οι ιοί είναι δομικά διατεταγμένοι και μπορούν να απελευθερώσουν φορτίο μέσω ελεγχόμενων μηχανισμών, οι οποίοι καθιερώθηκαν μέσω της εξέλιξης. Κατά συνέπεια, αυτό επέτρεψε στους ιούς να διαπερνούν αποτελεσματικά τους βιολογικούς φραγμούς, να επιτυγχάνουν υψηλά επίπεδα εξειδίκευσης σε στοχευμένα κύτταρα-ξενιστές, ακόμη και να αποφεύγουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Χρησιμοποιώντας ιούς ως έμπνευση για οχήματα χορήγησης φαρμάκων, κατασκευασμένοι ιικοί φορείς όπως φακοϊοί και αδενοϊοί έχουν βρει εφαρμογές στη γονιδιακή θεραπεία που κυμαίνονται από καρκίνο έως μολυσματικές και φλεγμονώδεις ασθένειες. Παρόλα αυτά, τροποποιημένα στερεά πρωτεϊνικά σωματίδια έχουν πλεονεκτήματα έναντι των ιικών φορέων, όπως χαμηλότερες ανοσολογικές αποκρίσεις. Τα πρωτεϊνικά νανοσωματίδια μπορούν να παραχθούν από διάφορες πηγές πρωτεϊνών (από φυτό έως ορό) και έχουν αξιοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές που κυμαίνονται από τη βιοτεχνολογία έως τις βιομηχανίες τροφίμων. Υπάρχει κλινικά διαθέσιμο ένα σύστημα το οποίο βασίζεται στην αλβουμίνη (Habibi et al., 2022).

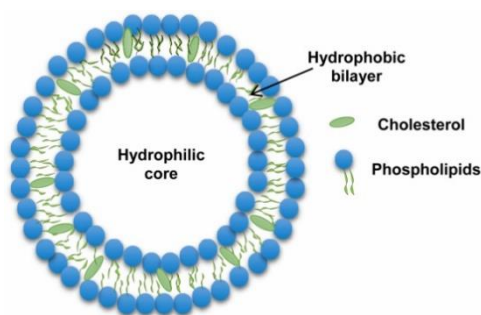
Ωστόσο, στη χρήση των πρωτεϊνικών νανοσωματιδίων υπεισέρχονται και κάποιες ανησυχίες που αφορούν την ετερογένεια των πρωτεϊνών, οι οποίες ως φυσικά πολυμερή αποτελούν μίγματα διαφορετικών μοριακών βαρών που μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορές στα χαρακτηριστικά του προϊόντος και στις μεταβλητές από παρτίδα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

Μικκύλια:

Τα μικκύλια, δηλαδή τα κολλοειδή συσσωματώματα που σχηματίζονται σε διάλυμα λόγω της αυτοοργάνωσης αμφίφιλων πολυμερών, αντιπροσωπεύουν ένα καινοτόμο εργαλείο για την αντιμετώπιση πολλών ζητημάτων που σχετίζονται με τη χορήγηση φαρμάκων, από τη χαμηλή υδατοδιαλυτότητα έως την κακή διαπερατότητα του φαρμάκου σε βιολογικούς φραγμούς. Σε σχέση με άλλους νανοφορείς, τα πολυμερή μικκύλια παρουσιάζουν γενικά μικρότερο μέγεθος, ευκολότερες διαδικασίες προετοιμασίας και αποστείρωσης και καλές ιδιότητες διαλυτοποίησης, που δυστυχώς συνδέονται με χαμηλότερη σταθερότητα στα βιολογικά υγρά και πιο περίπλοκο χαρακτηρισμό (Ghezzi et al., 2021).

Κινητήριος δύναμη για τον σχηματισμό των μυκυλλίων αποτελεί ο συνδυασμός διαμοριακών δυνάμεων, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι υδρόφοβες και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις και οι δεσμοί υδρογόνου. Το μικρό τους μέγεθος και η κολλοειδής σταθερότητα οδηγούν στην αποφυγή της σωματιδιακής συσσωμάτωσης. Τα μικύλλια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά των φαρμάκων με περιορισμένη διαλυτότητα και μπορούν να παρασκευαστούν από επιφανειοδραστικές ουσίες και πολυμερή κατά συστάδες. Τα πολυμερικά μικύλλια είναι γενικά πιο σταθερά από τα επιφανειοδραστικά μικύλλια και μπορούν να έχουν μια υδρόφιλη επικάλυψη ώστε να τους προσδίδονται «αόρατες» ιδιότητες. Επίσης, ομάδες στόχευσης μπορούν, να συζευχθούν στην επιφάνεια των μικυλλίων(Pharmaceutical Nanotechnology Costas Demetzos Fundamentals and Practical Applications, n.d.).

Λιποσώματα και κυστίδια επιφανειοδραστικών ουσιών:



Εικόνα 6: Δομικά στοιχεία Λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα και είναι τεχνητά κυστίδια τα οποία αποτελούνται από ένα ή περισσότερα στρώματα διπλοστιβάδων λιπιδίων, τα οποία περικλείουν ένα υδάτινο πυρήνα. Τα λιποσώματα είναι τα μικρότερα σφαιρικά κυστίδια, ανήκουν στην κλίμακα του νάνο (10^{-9} m) και μπορούν να σχηματιστούν από φυσικά λιπίδια και χοληστερόλη. Σχηματίζονται

αυθόρμητα όταν γίνει διασπορά σε υδατικό μέσο. Συνήθως αποτελούνται από φωσφολιπίδια, των οποίων η μητρική ένωση είναι το φωσφατιδικό οξύ, όπως άλλωστε και των υπολοίπων γλυκεροφωσφολιπιδίων, το οποίο αποτελεί συστατικό όμοιο των κυτταρικών μεμβρανών του ανθρώπινου σώματος. Το πιο γνωστό και ευρέως χρησιμοποιούμενο φωσφολιπίδιο είναι η φωσφατυδιλοχολίνη. Τα φωσφολιπίδια περιλαμβάνουν ένα πολικό και ένα μη πολικό τμήμα, (υδρόφιλη κεφαλή και υδρόφοβη ουρά)αποτελούμενο από λιπαρές ακυλομάδες, οι οποίες συνδέονται με μια ομάδα γλυκερόλης ή σφιγγοσίνης και μια νιτρο-ομάδα στον κλάδο της κεφαλής. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες κεφαλών: κατιονικές, ανιονικές και ουδέτερες. Η κατιονική κεφαλή βοηθάει στην προσέλκυση του λιποσώματος από τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες. Η ανιονική κεφαλή περιέχει φωσφατιδυλοσερίνη, ενώ η ουδέτερη, περιέχει χοληστερόλη, η οποία βελτιώνει τη φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων(Nsairat et al., 2022).

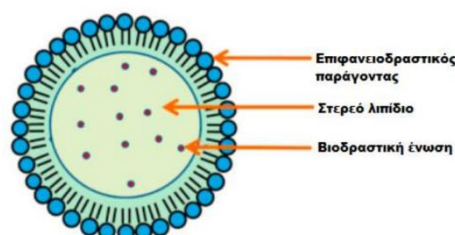
Η χοληστερόλη οδηγεί σε αύξηση της τάξης της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη μείωση της ευκαμψίας της και επομένως στην αύξηση της σταθερότητας των σωματιδίων. Όσον αφορά την ουρά, αποτελείται από δύο είδη λιπαρών υδρογονανθρακικών αλυσίδων και χοληστερόλη, ενώ επηρεάζει τον όγκο της υδρόφοβης κοιλότητας και συνεπώς τη δομή των λιποσωμάτων. Τα λιπίδια συγκρατούνται μέσω εστερικών δεσμών, μεταξύ του υδρόφιλου-υδρόφοβου άκρου. Υπάρχουν και περιπτώσεις αιθερικών δεσμών, όπου τα λιποσώματα έχουν αυξημένη απόδοση επιμόλυνσης, ενώ η αυξημένη σταθερότητα τους οδηγεί και σε αύξηση της κυτταροτοξικότητάς τους. Στον αντίποδα λιποσώματα τα οποία συγκρατούνται μέσω αμιδικών ή εστερικών δεσμών παρουσιάζουν μειωμένη κυτταροτοξικότητα. Η

προσθήκη βοηθητικών λιπιδίων δρα συνεργιστικά στη σταθεροποίηση των μεμβρανών (Anderson & Omri, 2004).

1.2.3 Νανοσωματίδια Στερεών Λιπιδίων (SNLs)

Τα SNLs θεωρούνται η πρώτη γενιά λιπιδικών νανοσωματιδίων με στερεή μήτρα. Αναπτύχθηκαν για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1990 και έχουν προσελκύσει σημαντική ερευνητική προσοχή λόγω των συνδυαστικών πλεονεκτημάτων τους. Τα SNLs αποτελούνται από φυσιολογικά βιοσυμβατά έκδοχα και έχουν στερεές μήτρες που μπορούν να προστατεύσουν αποτελεσματικά εγκλωβισμένες βιοδραστικές. Τέτοιου είδους νανοσωματίδια διαμορφώνονται με λιπίδια ή μείγματα λιπιδίων που βρίσκονται σε στερεή κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου ή στη θερμοκρασία του σώματος. Αρκετοί τύποι στερεών λιπιδίων είναι τα κύρια συστατικά των SNLs, συμπεριλαμβανομένων των λιπαρών οξέων, όπως το στεατικό οξύ και το παλμιτικό οξύ, τριγλυκερίδια, όπως τριστεαρίνη και τριπαλμιτίνη. Άλλα συστατικά μπορεί να είναι κηροί, όπως παλμιτικός κετυλεστέρας και στεροειδή όπως η χοληστερόλη. Αυτά τα λιπίδια είναι φυσικές ουσίες που είναι ταξινομημένες στην κατηγορία των Γενικά Αναγνωρισμένων ως Ασφαλή (GRAS) (A. K. Jain & Thareja, 2019).

Τα SNLs αποτελούνται από ένα στερεό λιπόφιλο λιπιδικό πυρήνα που περιβάλλεται από μια στοιβάδα αμφίφιλων (επιφανειοδραστικών) μορίων και έχουν μέγεθος από 50 έως 1000nm (Εικόνα 7). Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας σταθεροποιεί τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, μειώνοντας την επιφανειακή τάση μεταξύ της υδατικής και της λιπιδικής φάσης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι οι Poloxamer 407, Span 60 και Tween 80. Τα SNLs χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μεταφορά βιοδραστικών ενώσεων με αντιοξειδωτικό και φωτοπροστατευτικό χαρακτήρα και αντιγηραντική δράση σε καλλυντικές εφαρμογές καθώς βοηθούν στην μεταφορά των ουσιών δια μέσω του φραγμού του δέρματος (Kaul et al., 2018).



Εικόνα 7: Δομή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με εγκλωβισμένη βιοδραστική ένωση

Η παρασκευή των SNLs είναι φθηνή και η ανακλιμάκωση της διεργασίας είναι εφικτή. Εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα κατά την παραμονή τους, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει μεγάλο εύρος λιπιδίων που είναι διαθέσιμο για την παρασκευή τους και την τροποποίηση της κινητικής απελευθέρωσης της εγκλεισμένης ουσίας. Στο εσωτερικό τους μπορούν να εγκλωβιστούν τόσο υδρόφιλα όσο και υδρόφοβα μόρια, ενώ προσφέρουν τα πλεονεκτήματα της χαμηλής τοξικότητας, της σταθερότητας και της ελεγχόμενης απελευθέρωσης.

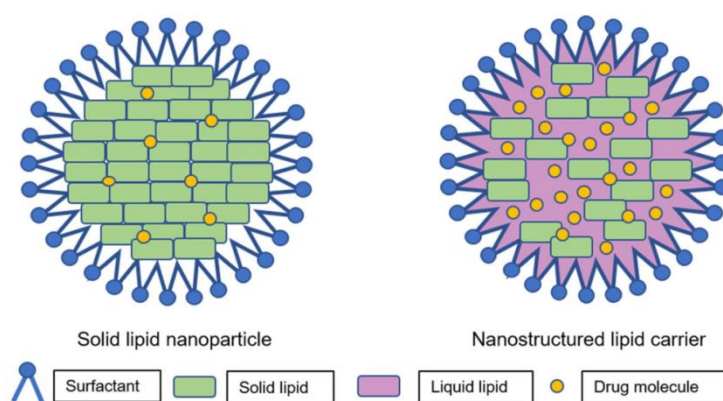
Η χρήση νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (SNLs) εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα για την επίτευξη ελεγχόμενης απελευθέρωσης μίας βιοδραστικής ένωσης. Η ελεγχόμενη

απελευθέρωση φαρμάκου επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας στερεά λιπίδια αντί για υγρά λιπίδια, καθώς η κινητικότητα του φαρμάκου είναι σημαντικά χαμηλότερη στη στερεά λιπιδική μήτρα σε σύγκριση με μια σταγόνα ελαίου (Mishra et al., 2018).

1.2.4 Νανοδομημένοι Λιπιδικοί φορείς (NLCs)

Οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς (NLCs) είναι νέες φαρμακευτικές συνθέσεις που αποτελούνται από φυσικά και βιοσυμβατά λιπίδια, τασιενεργά και επιφανειοδραστικές ουσίες. Με την πάροδο του χρόνου, ως λιπιδικός νανοφορέας δεύτερης γενιάς, το NLCs εμφανίστηκε ως εναλλακτική λύση στα νανοσωματίδια πρώτης γενιάς. Τα NLCs κατέχουν εξέχουσα δυνατότητα στην αγορά φαρμακευτικών και καλλυντικών λόγω των εκτεταμένων ευεργετικών επιδράσεων όπως η ενυδάτωση του δέρματος, η απόφραξη, η ενίσχυση της βιοδιαθεσιμότητας και η στοχευμένη αποδέσμευση στο δέρμα. Τα βασικά χαρακτηριστικά των NLCs που τα καθιστούν ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα χορήγησης φαρμάκων είναι η ευκολία προετοιμασίας, η βιοσυμβατότητα, η δυνατότητα αύξησης της κλίμακας παρασκευής, η μη τοξικότητα, η αποδοτικότερη φόρτωση φαρμάκων και η σταθερότητα (Chauhan et al., 2020).

Οι νανοδομημένοι φορείς λιπιδίων (NLCs) αναδύονται σταδιακά ως η δεύτερη γενιά λιπιδικών νανοσωματιδίων για να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα της πρώτης γενιάς, δηλαδή των SLNs. Για την παρασκευή των NLCs χρησιμοποιούνται βιοαποδομήσιμα και συμβατά λιπίδια (στερεά και υγρά) και γαλακτωματοποιητές. Η ενσωμάτωση υγρών λιπιδίων (ελαίων) στη δομή, προκαλεί δομικές ατέλειες στην αρχική διάταξη των στερεών λιπιδίων (Εικόνα 8). Το γεγονός αυτό οδηγεί σε μια λιγότερο διατεταγμένη κρυσταλλική δομή, η οποία αποτρέπει τη διαρροή και παρέχει υψηλές αποδόσεις φόρτωσης του φαρμάκου στο φορέα (P. Jain et al., 2017; López-García & Ganem-Rondero, 2015). Τα τελευταία χρόνια, τα NLCs έχουν κερδίσει την προσοχή των ερευνητών ως εναλλακτική λύση για τα SLNs, πολυμερή νανοσωματίδια, γαλακτώματα, μικροσωματίδια, λιποσώματα. Αυτοί οι νανοφορείς έχουν μεγάλη χρησιμότητα καθώς δίνουν τη δυνατότητα εγκλωβισμού τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων φαρμάκων (Jaiswal et al., 2016).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της διαφοράς στη δομή των SLNs (αριστερά) και των NLCs (δεξιά) (Subramaniam et al., 2020)

Η δημιουργία των NLCs δεν είναι δύσκολη υπόθεση, αλλά η βελτιστοποίηση τους είναι απαραίτητη για την παραγωγή NLCs με όσο το δυνατό καλύτερα χαρακτηριστικά. Ένας βελτιστοποιημένος νανοφορέας θα πρέπει να διαθέτει χαρακτηριστικά όπως η φαινομενική

διαλυτότητα στο βιολογικό περιβάλλον, ο μεγάλος χρόνος ημιζωής, η βιοσυμβατότητα, η δυνατότητα προστασίας του φαρμάκου, η ικανότητα δέσμευσης σε περιοχές στόχους και η απλή ενδοκυτταρική διείσδυση (Pathak & Thassu, n.d.). Αυτά τα χαρακτηριστικά διασφαλίζουν ότι το ενθυλακωμένο φάρμακο μπορεί να μεταφερθεί από έναν βιοσυμβατό φορέα μέσω ενός υδατικού περιβάλλοντος χωρίς την αποικοδόμηση του για παρατεταμένη περίοδο. Οι διασπορές των νανοσωματιδίων, θα πρέπει να παρουσιάζουν αυτά τα χαρακτηριστικά *in vivo* με αποτελεσματικό τρόπο. Επομένως, μετρήσιμα χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος σωματιδίων, ο δείκτης πολυδιασποράς, το ζ-δυναμικό, η αποτελεσματικότητα εγκλωβισμού, ο μηχανισμός απελευθέρωσης φαρμάκου και η σταθερότητα αποθήκευσης μελετώνται εκτενώς *in vitro* (Subramaniam et al., 2020).

Τα NLCs έχουν αναδειχθεί ως ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα φορέα για την παροχή φαρμακευτικών προϊόντων μέσω της στοματικής, παρεντερικής, οφθαλμικής, πνευμονικής, τοπικής και διαδερμικής οδού. Τα NLCs έχουν αξιοποιηθεί επίσης στη στόχευση του εγκεφάλου, τη χημειοθεραπεία, τη γονιδιακή θεραπεία, τη βιομηχανία τροφίμων και την παράδοση καλλυντικών και διατροφικών προϊόντων.

Η από του στόματος οδός χορήγησης είναι η πιο προτιμητέα οδός επειδή είναι ανώδυνη, μη επεμβατική, η χορήγησης ακριβούς δόσης είναι εύκολη, για αυτό το λόγο και η συμμόρφωση των ασθενών καταγράφεται σε έναν πολύ μεγάλο βαθμό. Η χρήση των NLCs μπορεί να οδηγήσει στην περαιτέρω βελτίωση της χορήγησης φαρμάκων από αυτή την οδό. Τα NLCs βρίσκουν εφαρμογή στην χορήγηση αδιάλυτων φαρμάκων ή αυτών που καταστρέφονται εύκολα από πεπτικά ένζυμα όπως αντιβιοτικά και ένζυμα για χορήγηση από το στόμα. Τα σωματίδια αυτά, μπορούν να απορροφηθούν και μέσω του λεμφικού συστήματος. Επιπλέον, τα σωματίδια ελεγχόμενης απελευθέρωσης μπορούν να επιβραδύνουν την αποικοδόμηση και την αποβολή του φαρμάκου, ενισχύοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα του στο επιθυμητό σημείο (Elmowafy & Al-Sanea, 2021).

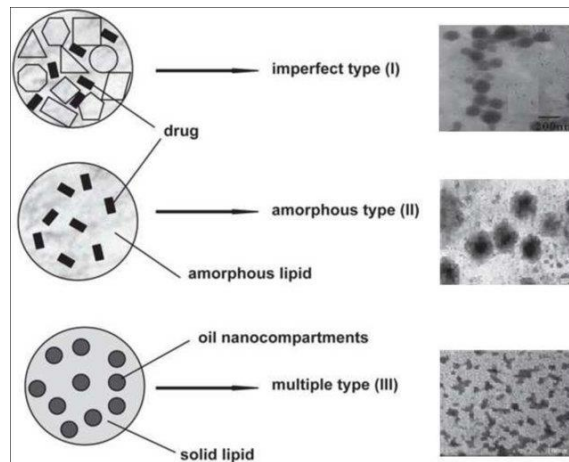
Τα NLCs έχουν μελετηθεί επίσης και σαν νανοδομές που χρησιμοποιούνται σε συστήματα διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων. Το μικρό μέγεθος των σωματιδίων μπορεί να αξιοποιηθεί και να σχηματίσει ένα λεπτό φιλμ πάνω στο δέρμα, έτσι ώστε τα φάρμακα που είναι εγκλωβισμένα στα NLCs να μην αποσυντίθεται χημικά με μεγάλο ρυθμό. Ταυτόχρονα, τα νανοσωματίδια έχουν την ικανότητα να ελέγχουν την απελευθέρωση του φαρμάκου, να προστατεύουν το δέρμα και αποτρέπουν την ατροφία του δέρματος από την επανειλημμένη λήψη του φαρμάκου (Joshi et al., 2008; Junyaprasert et al., 2009).

Μελέτες στα συστήματα χορήγησης ενέσιμων φαρμάκων έχουν δείξει ότι τα NLCs που παρασκευάζεται σε κolloειδές διάλυμα ή σε μορφή λυοφιλοποιημένης σκόνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ενδοφλέβια ένεση για την επίτευξη παρατεταμένης απελευθέρωσης και την παράταση του χρόνου παραμονής του φαρμάκου στο κυκλοφορικό σύστημα ή στο σημείο στόχο (Z. Zhang et al., 2008). Τέλος, τα NLCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς μεταφοράς γονιδίων. Γενικά, πραγματοποιείται η διάκριση των φορέων μεταφοράς γονιδίων σε δύο κατηγορίες: τους ιικούς φορείς και τους μη ιικούς φορείς. Ο ιικοί φορείς μπορούν να μεταφέρουν αποτελεσματικά γονίδια, αλλά η ανοσολογία του φορέα, η ογκογένεση, η περιορισμένη ποσότητα DNA που μπορεί να μεταφερθεί και το υψηλότερο κόστος περιορίζουν την εφαρμογή τους. Λύση σε αυτό το πρόβλημα μπορούν να δώσουν τα

NLCs σαν ένας μη ικός φορέας. Οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς όχι μόνο ξεπερνούν τις παραπάνω ελλείψεις των ικών φορέων, αλλά μπορούν επίσης να αποστειρωθούν και να λυοφιλοποιηθούν και να παρέχουν υψηλή σταθερότητα (Yue et al., 2010).

Ανάλογα με τη θέση των τμημάτων όπου ενσωματώνεται η βιοδραστική ένωση στα NLCs, έχουν προταθεί τρεις τύποι μορφολογικών μοντέλων:

- NLC τύπου I (μοντέλο ατελούς κρυστάλλου): Τα NLCs αυτού του τύπου αποτελούνται από μια εξαιρετικά αδιάτακτη μήτρα με πολλά κενά και χώρους που μπορούν να φιλοξενήσουν περισσότερα μόρια βιοδραστικής ένωσης σε άμορφες συστάδες. Αυτές οι ατέλειες στην κρυσταλλική δομή οφείλονται στην ανάμειξη στερεών λιπιδίων με επαρκή ποσότητα υγρών λιπιδίων (έλαια). Λόγω του ποικίλου μήκους της αλυσίδας των λιπαρών οξέων και του μείγματος μονο-, δι- και τριακυλογλυκερολών, η μήτρα των NLCs δεν είναι σε θέση να σχηματίσει μια καλά διατεταγμένη δομή. Η ανάμειξη διαφορετικών λιπιδίων αυξάνει την ικανότητα εγκλωβισμού του φαρμάκου, ωστόσο αυτό το μοντέλο προσφέρει την μικρότερη απόδοση εγκλωβισμού (Selvamuthukumar & Velmurugan, 2012).
- NLC τύπου II (άμορφο μοντέλο): Τα NLCs άμορφου μοντέλου διαμορφώνεται με την ανάμειξη λιπιδίων με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται της διαφυγής της βιοδραστικής ένωσης λόγω της διαδικασίας κρυστάλλωσης. Ειδικά λιπίδια σχηματίζουν στερεά αλλά μη κρυσταλλικά σωματίδια. Η λιπιδική μήτρα βρίσκεται σε ομοιογενή άμορφη κατάσταση (Selvamuthukumar & Velmurugan, 2012; Shah et al., n.d.).
- NLC τύπου III (πολλαπλού τύπου): Τα πολλαπλού τύπου NLCs είναι σωματίδια τύπου λαδιού/λιπιδίου/νερού. Οι λιπόφιλες βιοδραστικές ουσίες εμφανίζουν υψηλότερη διαλυτότητα στα υγρά λιπίδια από ότι στα στερεά. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη των NLCs πολλαπλού τύπου, χρησιμοποιώντας υψηλή περιεκτικότητα υγρών λιπιδίων. Τα τμήματα ελαίου, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, διασπείρονται αποτελεσματικά στη λιπιδική μήτρα. Η προσθήκη λαδιού, πέρα από τη διαλυτότητά της λιπόφιλης βιοδραστικής ουσίας, προκαλεί και τον διαχωρισμό φάσεων σχηματίζοντας μικρά νανοδιαμερίσματα λαδιού που περικλείονται στη στερεά μήτρα. Το μοντέλο τύπου III προσφέρει πλεονεκτήματα όπως υψηλή απόδοση εγκλωβισμού της βιοδραστικής ουσίας, ελεγχόμενη απελευθέρωση της και ελαχιστοποιημένη διαφυγή από το φορέα (Selvamuthukumar & Velmurugan, 2012; Shah et al., n.d.).



Εικόνα 9: Διάκριση των NLCs ανάλογα με την μορφολογία τους (Assistant Professor, 2018)

1.2.4.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα Νανοδομημένων Λιπιδικών Φορέων

Οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς παρουσιάζουν ποικίλα πλεονεκτήματα έναντι άλλων φορέων αλλά και λίγα μειονεκτήματα. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα συνοψίζονται ακολούθως (Jaiswal et al., 2016; Kaur et al., 2021; Naseri et al., 2015).

Πλεονεκτήματα

- Ευκολία προετοιμασίας και κλιμάκωσης της διεργασίας
- Αποφυγή χρήσης οργανικών διαλυτών
- Χρήση βιοαποικοδομήσιμων και βιοσυμβατών λιπιδίων
- Αύξηση της σταθερότητας των φαρμάκων
- Πιο εύκολη λήψη ρυθμιστικής έγκρισης
- Δυνατότητες φόρτωσης τόσο λιπόφιλων όσο και υδρόφιλων φαρμάκων
- Έλεγχος και στοχευμένη απελευθέρωση φαρμάκου
- Πιο προσιτή παραγωγή (λιγότερο ακριβή από τους φορείς που βασίζονται σε πολυμερή/επιφανειοδραστικά)
- Αποτροπή ή ελαχιστοποίηση της απελευθέρωσης του φαρμάκου κατά την αποθήκευση
- Αυξημένη ικανότητα φόρτωσης για ορισμένα φάρμακα και πολύ υψηλές αποδόσεις εγκλωβισμού
- Ύπαρξη λιγότερου νερού στη διασπορά
- Καλύτερη φυσική σταθερότητα
- Αύξηση της ενυδάτωσης και της ελαστικότητας του δέρματος
- Το μικρό μέγεθος εξασφαλίζει στενή επαφή με την κεράτινη στοιβάδα

Μειονεκτήματα

- Κυτταροτοξικές επιδράσεις που σχετίζονται με τη φύση της λιπιδικής μήτρας και τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων
- Εμφάνιση ερεθισμού λόγω των επιφανειοδραστικών ουσιών

- Η εφαρμογή και η αποτελεσματικότητα στην περίπτωση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών φαρμάκων και συστημάτων διανομής γονιδίων δεν έχει μελετηθεί ακόμα εκτεταμένα.
- Σταθερότητα Λιπιδίων

1.2.4.2 Μέθοδοι παρασκευής Νανοδομημένων Λιπιδικών Φορέων

Υπάρχουν μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των NLCs. Με βάση την απαιτούμενη ενέργεια, οι μέθοδοι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις τύπους: τις τεχνικές που απαιτούν υψηλά ποσά ενέργειας, τις τεχνικές που απαιτούν χαμηλά ποσά ενέργειας και τις τεχνικές που απαιτούν πολύ χαμηλά ποσά ενέργεια.

Υπάρχουν πολλές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή NLCs όπου απαιτείται υψηλή εισροή ενέργειας, όπως η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (HPH), ομογενοποίηση/υπερήχηση υψηλών στροφών, τεχνικές που απαιτούν την χρήση υπερκρίσιμων υγρών και μεθόδους με βάση τα μικροκύματα. Οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας που θα αναλυθούν στην παρούσα εργασία είναι:

- Θερμή ομογενοποίηση: Κατά τη διάρκεια αυτής της μεθόδου, το φάρμακο προστίθεται στο τηγμένο μίγμα λιπιδίων το οποίο διασπείρεται σε θερμαινόμενο υδατικό διάλυμα επιφανειοδραστικής ουσίας, χρησιμοποιώντας ανάδευση υψηλής ταχύτητας. Το προγαλάκτωμα ομογενοποιείται περαιτέρω μέσω ομογενοποίησης υψηλής πίεσης. Τα NLCs σχηματίζονται μόλις τα ληφθέντα νανογαλακτώματα ανακρυσταλλωθούν σε θερμοκρασία δωματίου. Ορισμένα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η θερμική αποδόμηση των θερμοευαίσθητων ενεργών ουσιών, η μείωση της ισχύος γαλακτωματοποίησης ορισμένων επιφανειοδραστικών σε υψηλότερες θερμοκρασίες και η χαμηλή απόδοση ενθυλάκωσης του φαρμάκου καθώς μπορεί να κατανεμηθεί τόσο στο λιπιδικό όσο και στο υδατικό επιφανειοδραστικό διάλυμα, καθώς και η υψηλή θερμοκρασία προάγει τη διαφυγή του φαρμάκου στην υδατική φάση (Üner, 2006).
- Ψυχρή ομογενοποίηση: Σε αυτή τη μέθοδο, το τηγμένο μίγμα λιπιδίων με το φάρμακο στερεοποιείται με ταχεία ψύξη υπό την επίδραση υγρού αζώτου ή ξηρού πάγου. Στη συνέχεια, διασπείρεται σε ψυχρό υδατικό επιφανειοδραστικό διάλυμα. Η λαμβανόμενη διασπορά τελικώς επεξεργάζεται με ομογενοποιητή υψηλής πίεσης. Αυτή η τεχνική ξεπερνά τα μειονεκτήματα των θερμών μεθόδων ομογενοποίησης, λόγω της αποφυγής θέρμανσης των φαρμάκων και των τασισενεργών. Επιπροσθέτως, μέσω του ελέγχου της διαδικασίας της κρυστάλλωσης υπάρχει η δυνατότητα λήψης μίας επιθυμητής κρυσταλλικής δομής. Από την άλλη πλευρά, τα παραγόμενα σωματίδια μπορεί να παρουσιάζουν υψηλότερα μεγέθη και ετερογένεια σε σύγκριση με τη μέθοδο θερμής ομογενοποίησης (del Pozo-Rodríguez et al., 2009).
- Ομογενοποίηση υψηλών στροφών: Σε αυτή τη μέθοδο, λιπόφιλο φάρμακο διαλύεται ή διασπείρεται σε τηγμένο μίγμα στερεού λιπιδίου/υγρού λιπιδίου. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι 10°C πάνω από το σημείο τήξης του στερεού λιπιδίου για να αποφεύγεται η ανακρυστάλλωση. Το υδατικό

επιφανειοδραστικό διάλυμα της ίδιας θερμοκρασίας προστίθεται σε λιπιδική φάση και σχηματίζεται προ-μικρογαλάκτωμα υπό την επίδραση του αναδευτήρα υψηλής ταχύτητας. Το προ-γαλάκτωμα ομογενοποιείται περαιτέρω χρησιμοποιώντας ομογενοποιητές υψηλής διάτμησης και ακολουθεί η επεξεργασία με υπερήχους (Duong et al., 2020).

Από τις μεθόδους που απαιτούν χαμηλά ποσά ενέργειας, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες και προτιμητέες είναι:

- Μέθοδος του Μικρογαλακτώματος: Η μέθοδος περιλαμβάνει την αραιώση ενός μικρογαλακτώματος σε ένα ψυχρό υδατικό διάλυμα, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό νανογαλακτώματος και τον επακόλουθο σχηματισμό NLCs με λιπιδική καθίζηση. Εν συντομία, ένα φάρμακο διαλύεται σε τετηγμένα λιπίδια σε θερμοκρασία πάνω από το σημείο τήξης των λιπιδίων και στη συνέχεια προστίθεται μια υδατική φάση που περιέχει νερό και επιφανειοδραστικό (προθερμασμένο στην ίδια θερμοκρασία) υπό ήπια ανάδευση για να σχηματιστεί ένα διαφανές και θερμοδυναμικά σταθερό μικρογαλάκτωμα. Στη συνέχεια, το μικρογαλάκτωμα χύνεται σε ψυχρό υδατικό διάλυμα (2–10 °C) υπό ήπια μηχανική ανάμειξη. Τυπικά, ο όγκος της ψυχρής υδατικής φάσης είναι 25 έως 50 φορές μεγαλύτερος από αυτόν του θερμού γαλακτώματος. Κατά την αραιώση, σχηματίζεται ένα νανογαλάκτωμα και τα λιπίδια κρυσταλλώνονται αμέσως για να σχηματίσουν τα NLCs (Duong et al., 2020).
- Μέθοδος του διπλού γαλακτώματος: Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, ένα φάρμακο και ένας σταθεροποιητής διαλύονται σε ένα υδατικό διάλυμα και στη συνέχεια γαλακτωματοποιούνται σε μια μη αναμίξιμη με το νερό οργανική φάση που περιέχει λιπίδια ή σε τηγμένα λιπίδια, χωρίς την ύπαρξη διαλυτών. Αυτά τα πρωτογενή γαλακτώματα διασπείρονται σε μια υδατική φάση που περιέχει έναν υδρόφιλο γαλακτωματοποιητή για να σχηματίσουν γαλάκτωμα νερού/ελαίου/νερού (w/o/w). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, λαμβάνονται διασπορές με NLCs λόγω της κατακρήμνισης των λιπιδίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι για αυτή τη μέθοδο, ο σταθεροποιητής ουσιαστικά αποτρέπει την κατανομή του φαρμάκου στην εξωτερική υδατική φάση κατά την εξάτμιση του διαλύτη (Gallarate et al., 2009; Mazur et al., 2019).

Από τις μεθόδους που χρειάζονται πολύ χαμηλά ποσά ενέργειας έως καθόλου ενέργεια για την δημιουργία των NLCs, αναλύονται οι εξής:

- Μέθοδος γαλακτωματοποίησης-διάχυσης διαλύτη: Η μέθοδος γαλακτωματοποίησης-διάχυσης διαλυτών χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή πολυμερών νανοφορέων. Παρόλα αυτά το 2003, η ομάδα του Trotta et. Αιχρησιμοποίησαν αυτή τη μέθοδο πρώτη φορά για να δημιουργήσουν διασπορές με SLNs και NLCs. Αυτή η μέθοδος γενικά πραγματοποιείται με τη χρήση οργανικών διαλυτών που είναι μερικώς αναμίξιμοι με νερό, όπως ο οξικός μεθυλεστέρας, ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οξικός ισοπροπυλεστέρας, η βενζυλική αλκοόλη και ο γαλακτικός βουτυλεστέρας. Αρχικά, ο οργανικός διαλύτης και το νερό είναι αμοιβαία κορεσμένα μεταξύ τους για να επιτευχθεί η αρχική θερμοδυναμική

ισορροπία και των δύο φάσεων. Τα λιπίδια και οι βιοδραστικές ουσίες διαλύονται στον κορεσμένο με νερό διαλύτη, ο οποίος στη συνέχεια γαλακτωματοποιείται στην υδατική φάση (το νερό που είναι κορεσμένο με το διαλύτη περιέχει και τον σταθεροποιητή) υπό ανάδευση για να σχηματιστεί ένα γαλάκτωμα ελαίου μέσα σε νερό (o/w). Το γαλάκτωμα αραιώνεται με νερό (αναλογία όγκου από 1:5 έως 1:10) για να επιτραπεί η διάχυση του διαλύτη στη συνεχή φάση. Τα SLNs και τα NLCs σχηματίζονται αυθόρμητα λόγω της καθίζησης των λιπιδίων και ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται με λυοφιλοποίηση ή απόσταξη υπό κενό (Gallarate et al., 2009).

- Μέθοδος γαλακτώματος-εξάτμισης διαλύτη: Σε αυτή την τεχνική, η δραστική ουσία καθώς και τα λιπίδια διαλύονται σε μη αναμίξιμο με νερό διαλύτη. Το προκύπτον διάλυμα στη συνέχεια γαλακτωματοποιείται με υδατικό διάλυμα τασιενεργού. Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό συνεχή ανάδευση με αποτέλεσμα τον σχηματισμό NLCs. Καθώς δεν υπάρχει θερμότητα, αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για ευαίσθητες στη θερμότητα βιοδραστικές ενώσεις. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η τοξικότητα που σχετίζεται με υπολείμματα διαλύτη και τα αραιωμένα σωματίδια λόγω της ανεπαρκούς διαλυτότητας των λιπιδίων στους διαλύτες που χρησιμοποιούνται (Shahgaldian et al., 2003).
- Μέθοδος έγχυσης διαλύτη: σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, τα λιπίδια και τα φάρμακα διαλύονται σε έναν αναμίξιμο με νερό διαλύτη (π.χ., μεθανόλη, αιθανόλη, ισοπροπανόλη ή ακετόνη) ή ένα μίγμα διαλυτών που αναμιγνύεται με το νερό. Η υδατική φάση συνήθως παρασκευάζεται με την προσθήκη ενός γαλακτωματοποιητή ή ενός μίγματος γαλακτωματοποιητή σε νερό ή σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Η οργανική φάση στη συνέχεια εγχέεται γρήγορα στην υδατική φάση υπό συνεχή μηχανική ανάδευση χρησιμοποιώντας μια βελόνα (S. Das & Chaudhury, 2011).

1.2.4.3 Στερεά και υγρά λιπίδια

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα NLCs αποτελούνται από λιπιδική φάση, υδατική φάση και επιφανειοδραστικές ουσίες. Ωστόσο, η επιλογή των συστατικών και οι αναλογίες τους μπορεί να επηρεάσει ιδιαίτερα την τελική συμπεριφορά του συστήματος που αναπτύσσεται. Όσον αφορά τη λιπιδική φάση, αποτελείται από μια ατελή στερεή λιπιδική μήτρα που παρασκευάζεται με ανάμειξη στερεών και υγρών λιπιδίων. Υπάρχουν διάφοροι τύποι λιπιδίων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία των NLCs όπως τριγλυκερίδια, μερικά γλυκερίδια, λιπαρά οξέα, στεροειδή και κεριά. Τα έλαια (υγρά λιπίδια) και τα λίπη περιέχουν μείγματα μονο-, δι- και τριγλυκεριδίων λιπαρών οξέων διαφορετικού μήκους αλυσίδας και βαθμού ακόρεστου (Haus, 2007; Souto & Müller, 2010).

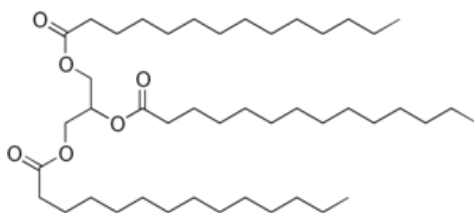
Γενικά, η επιλογή των λιπιδίων βασίζεται στη φυσικοχημική τους δομή, τη διαλυτότητα της βιοδραστικής ένωσης σε αυτά και την αναμιξιμότητα μεταξύ στερεού και υγρού λιπιδίου. Αρχικά, τα λιπίδια που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να ανήκουν στην κατηγορία «Γενικά Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή (GRAS)». Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ουσίες ή μικροοργανισμοί οι οποίοι δεν θα μπορούσαν να έχουν σημαντικές τοξικές επιδράσεις σε μία συγκεκριμένη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση. Δεύτερον, η φυσικοχημική δομή είναι αυτή που καθορίζει και την κατάσταση του λιπιδίου σε θερμοκρασία δωματίου. Ακόμα,

πριν από την παρασκευή των NLCs, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η διαλυτότητα του δραστικής ένωσης στα λιπίδια. Εάν η βιοδραστική ουσία δεν εμφανίζει προτίμηση για διάλυση στον πυρήνα των λιπιδίων, τότε θα προσκολληθεί στην επιφάνεια των σωματιδίων ή θα ενσωματωθεί σε μικκύλια στην υδατική φάση και ως εκ τούτου ο εγκλωβισμός και η φόρτωση της στο φορέα θα είναι πολύ χαμηλή. Τέλος, δεν είναι πάντα εφικτή η συμβατότητα μεταξύ στερεού λιπιδίου και υγρού, κάτι που με τη σειρά του απαιτεί μελέτη αναμίξεως με έλεγχο της μακροσκοπικής ομοιογένειας/διαχωρισμού λιπιδικής φάσης κάτω από το σημείο τήξης των λιπιδίων. Το διάλυμα των τηγμένων λιπιδίων πρέπει να είναι μονοφασικό (Doktoronová et al., 2010).

Στη συνέχεια, γίνεται λόγος για τα στερεά και τα υγρά λιπίδια που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας:

Στερεό Λιπίδιο: Τριμυριστίνη

Η τριμυριστίνη (Σχήμα 3) είναι τριεστέρας της γλυκερόλης με μυριστικό οξύ (δεκατετρανοϊκό οξύ) απαντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο μοσχοκάρυδο. Περίπου το 75% κατά βάρος του βουτύρου από το μοσχοκάρυδο είναι τριμυριστίνη (το βούτυρο αποτελεί περίπου 30-40% του αποξηραμένου πυρήνα του μοσχοκάρυδου). Η τριμυριστίνη ανήκει στην τάξη των ενώσεων που είναι γνωστές ως λίπη ή τριγλυκερίδια. Τα λίπη είναι τριεστέρες της γλυκερόλης (ή γλυκερίνης) με κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα (καρβοξυλικά οξέα με περισσότερα από 12 άτομα άνθρακα).



Σχήμα 3: Χημική δομή του στερεού λιπιδίου

Η τριμυριστίνη χρησιμοποιείται ως λιπαντικό ή και συντηρητικό σε φαρμακευτικά και βρώσιμα σκευάσματα όπως φαρμακευτικά δισκία, ζαχαρωτά και άλλα. Η τριμυριστίνη χρησιμοποιείται επίσης ως φορέας δραστικών φαρμακευτικών ουσιών σε λιπιδικά νανοσωματίδια ή νανοδομημένου λιπιδικούς φορείς αλλά και ως ενυδατικός παράγοντας σε καλλυντικά σκευάσματα (Naguib et al., 2014).

Υγρό Λιπίδιο I: Έλαιο αμυγδάλου

Τα αμύγδαλα και το λάδι που παράγουν έχουν πολλές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της αντιφλεγμονώδους δράσης και τόνωσης του ανοσοποιητικού. Μελέτες δείχνουν ότι το αμυγδαλέλαιο έχει εμφανίσει πιθανή ευεργετική επίδραση στη αντιμετώπιση του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου και έχουν πραγματοποιηθεί συσχετίσεις με μειώσεις στη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (Davis & Iwahashi, n.d.). Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί πιθανά καρδιαγγειακά οφέλη καθώς το αμυγδαλέλαιο αυξάνει τα επίπεδα της λεγόμενης «καλής χοληστερόλης», των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), ενώ μειώνει τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Jenkins et al., 2002)

Το έλαιο αμυγδάλου έχει χρησιμοποιηθεί για τα πολυάριθμα οφέλη του τόσο για την υγεία, όσο και για λόγους κοσμετολογίας από τους αρχαίους πολιτισμούς της Ινδίας, της Κίνας και της Ελλάδας. Το αμυγδαλέλαιο χρησιμοποιείται σήμερα από αισθητικούς και αρωματοθεραπευτές για τις πολλές φυσικές μαλακτικές και αναζωογονητικές του ιδιότητες. Στην πρακτική της αρωματοθεραπείας, το αμυγδαλέλαιο είναι εξαιρετικά δημοφιλές και περιζήτητο κυρίως για την πλούσια συγκέντρωση ελαϊκού και λινολεϊκού, βασικών λιπαρών οξέων. Το αμυγδαλέλαιο χρησιμοποιείται και στη βιομηχανία καλλυντικών για τις διεισδυτικές, ενυδατικές και αναπλαστικές του ιδιότητες (Kodad & Socias I Company, 2008).

Υγρό Λιπίδιο II: Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο χρησιμοποιείται συνήθως ως λάδι σαλάτας και στη μαγειρική. Το ελαιόλαδο προέρχεται από ελιές που καλλιεργούνται στην περιοχή της Μεσογείου. Στη φαρμακοβιομηχανία, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως όχημα για ενέσιμα εναιωρήματα και τοπικά ως καταπραϋντικό και μαλακτικό σε κρέμες ή αλοιφές. Το ελαιόλαδο, όταν καταναλώνεται με μέτρο, συχνά προωθείται ως καλύτερο λάδι για τη βελτίωση του προφίλ λιπιδίων στις καρδιαγγειακές παθήσεις λόγω του υψηλότερου ποσοστού μονοακόρεστων λιπαρών σε σχέση με άλλα συνήθη φυτικά έλαια.

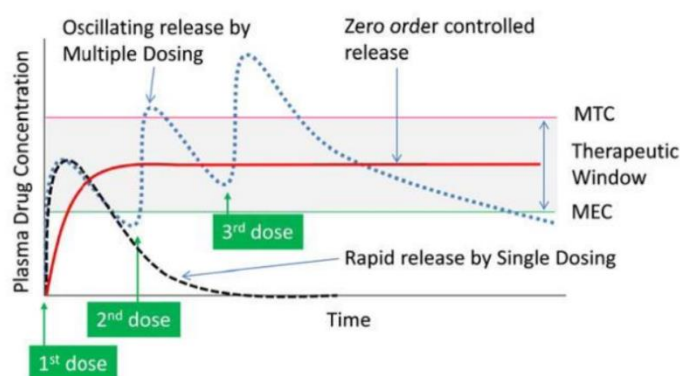
Αρκετές επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η τήρηση της μεσογειακής διατροφής βελτιώνει τη γνωστική λειτουργία και επιβραδύνει την εξέλιξη κάποιων παθήσεων. Η καθημερινή κατανάλωση έξτρα παρθένου ελαιόλαδου είναι ένα από τα χαρακτηριστικά στοιχεία μιας μεσογειακής διατροφής. Η διαιτητική κατανάλωση του ελαιόλαδου κυμαίνεται από 40 έως 50 g/ημέρα με την υψηλότερη ημερήσια πρόσληψη στους Έλληνες. Σύμφωνα με τους ευρωπαϊκούς κανονισμούς, το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο ορίζεται ως ένα ελαιόλαδο υψηλής ποιότητας που λαμβάνεται από την πρώτη έκθλιψη του καρπού της ελιάς με καθαρά μηχανικά μέσα. Η σύνθεση του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου είναι κυρίως κλάσμα γλυκερόλης (~95%) και κλάσμα μη γλυκερόλης (~5%). Το κλάσμα γλυκερόλης είναι πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ το κλάσμα μη γλυκερίνης περιέχει φαινολικές ενώσεις που ευθύνονται για την αντοχή του ελαιόλαδου στην οξειδωτική τάγγιση. Έχει υπολογιστεί ότι η συνολική περιεκτικότητα του ελαιόλαδο σε φαινολικά είναι περίπου 500mg/kg και περιλαμβάνει περισσότερες από 30 χημικές ουσίες που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες, όπως εστέρες, οξέα και πτητικές ενώσεις (Qosa et al., 2015).

1.3 Μηχανισμοί αποδέσμευσης δραστικών ενώσεων από νανοφορείς

Τα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων επειδή προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως βελτιωμένη διαλυτότητα φαρμάκου, στοχευμένη παροχή και ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου. Ο μηχανισμός απελευθέρωσης του φαρμάκου από τα νανοσωματίδια μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του νανοσωματιδίου, το φάρμακο που χορηγείται, τον ιστό ή τον κύτταρο στόχο.

Το κύριο μέλημα στον έλεγχο του φαρμακοκινητικού προφίλ ενός φαρμάκου είναι η ανάγκη διατήρησης του επιπέδου του στην κυκλοφορία του αίματος εντός του αποδεκτού θεραπευτικού εύρους. Δηλαδή, μεταξύ της ελάχιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης (MEC) και της ελάχιστης τοξικής συγκέντρωσης (MTC). Συγκεκριμένα, όταν ένα φάρμακο

χορηγείται σε μία μόνο μεγάλη δόση, το επίπεδο του φαρμάκου αυξάνεται πάνω από το MTC, προκαλώντας τοξικές παρενέργειες και στη συνέχεια πέφτει γρήγορα κάτω από το MEC (Εικόνα 10). Αντίθετα, όταν χορηγείται σε πολλαπλές δόσεις και με καθορισμένο χρονικό διάστημα μεταξύ των δόσεων, μπορεί να μειωθεί η διακύμανση των επιπέδων του φαρμάκου στο πλάσμα του αίματος. Το πρόβλημα σε αυτή την περίπτωση έγκειται στην πιθανή μη συμμόρφωση του ασθενούς με πολλαπλές χορηγήσεις φαρμάκων. Σε αυτό το σημείο, τα νανοσωματίδια απελευθέρωσης φαρμάκου έχουν ένα πλεονέκτημα, καθώς παρέχουν τη δυνατότητα τροποποιημένης (παρατεταμένης ή ελεγχόμενης) απελευθέρωσης φαρμάκου επιτυγχάνοντας μια συγκεκριμένη συγκέντρωση φαρμάκου στο πλάσμα εντός του θεραπευτικού εύρους, η οποία παραμένει σταθερή για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Συχνά, επιδιώκεται επίσης ένας σταθερός ρυθμός απελευθέρωσης φαρμάκου (προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου μηδενικής τάξης) (J. H. Lee & Yeo, 2015a).



Εικόνα 10: Τα προφίλ της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα

1.3.1 Είδη Μηχανισμών Αποδέσμευσης

Στη συνέχεια, αναλύονται ορισμένες κατηγορίες συστημάτων τροποποιημένης αποδέσμευσης φαρμάκων, με βάση τον μηχανισμό αποδέσμευσής τους:

Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας ελέγχεται από τη διάχυσή της διαμέσου του πολυμερούς (Diffusion-Controlled Devices):

Ένας από τους πιο συνηθισμένους μηχανισμούς απελευθέρωσης φαρμάκων από νανοσωματίδια είναι η διάχυση. Η διάχυση είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα μόρια του φαρμάκου απελευθερώνονται μετακινούμενα μέσω της μήτρας των νανοσωματιδίων στον περιβάλλοντα ιστό ή στο περιβάλλον υγρό. Αυτή η παθητική διαδικασία συμβαίνει λόγω της διαφοράς της συγκέντρωσης μεταξύ της μήτρας νανοσωματιδίων και του εξωτερικού περιβάλλοντος. Τα μόρια του φαρμάκου μετακινούνται μέχρι να εξισωθεί η βαθμίδα συγκέντρωσης. Ο ρυθμός διάχυσης μπορεί να ελεγχθεί αλλάζοντας το μέγεθος και την επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Τα μικρότερα νανοσωματίδια έχουν υψηλότερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, γεγονός που αυξάνει τον ρυθμό διάχυσης. Επιπλέον, η επιφάνεια μπορεί να αυξηθεί με τη χρήση πορωδών νανοσωματιδίων, τα οποία μπορούν να ενισχύσουν τον ρυθμό διάχυσης ακόμη

περισσότερο. Επομένως, ο έλεγχος του μεγέθους και της επιφάνειας των νανοσωματιδίων μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την κινητική απελευθέρωσης του φαρμάκου.

Εκτός από το μέγεθος και την επιφάνεια των νανοσωματιδίων, οι χημικές ιδιότητες του φαρμάκου που χορηγείται μπορούν να επηρεάσουν τον ρυθμό διάχυσης. Τα υδρόφοβα φάρμακα μπορεί να διαχέονται πιο αργά από τα υδρόφιλα φάρμακα λόγω της τάσης τους να προσροφούνται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Για να ενισχυθεί η απελευθέρωση του φαρμάκου, οι υδρόφοβες βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να ενσωματωθούν σε αμφίφιλα νανοσωματίδια, τα οποία έχουν ένα υδρόφιλο εξωτερικό κέλυφος και έναν υδρόφοβο πυρήνα. Αυτός ο σχεδιασμός όχι μόνο ενισχύει την απελευθέρωση του φαρμάκου αλλά επίσης προστατεύει το φάρμακο από την υποβάθμιση στην κυκλοφορία του αίματος(Tiwari et al., 2012).

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

Ένας εξίσου διαδεδομένος μηχανισμός αποδέσμευσης είναι η αποδόμηση και έχει προσελκύσει σημαντική προσοχή λόγω της ικανότητάς της να παρέχει ελεγχόμενη και παρατεταμένη απελευθέρωση φαρμάκου για παρατεταμένη περίοδο. Η απελευθέρωση φαρμάκου με βάση την αποδόμηση περιλαμβάνει τη διάσπαση των νανοσωματιδίων με την πάροδο του χρόνου, οδηγώντας στην απελευθέρωση των μορίων της βιοδραστικής ένωσης. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω χημικής ή ενζυμικής αποικοδόμησης της μήτρας των νανοσωματιδίων και ο ρυθμός αποικοδόμησης μπορεί να ελεγχθεί αλλάζοντας τη σύνθεση του νανοσωματιδίου. Βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή όπως το πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) (PLGA) χρησιμοποιούνται συνήθως στο σχεδιασμό συστημάτων χορήγησης φαρμάκων, καθώς μπορούν να προσαρμοστούν ώστε να αποικοδομούνται σε μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο, οδηγώντας σε παρατεταμένη απελευθέρωση φαρμάκου με ελεγχόμενο τρόπο.

Τα νανοσωματίδια με βάση το PLGA έχουν μελετηθεί εκτενώς για τις δυνατότητές τους στην χορήγηση φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης της χορήγησης αντικαρκινικών φαρμάκων, αντιβιοτικών και πρωτεϊνικών φαρμάκων. Σε μια μελέτη από τον Kuoetal., τα νανοσωματίδια με βάση το PLGA φορτωμένα με το αντικαρκινικό φάρμακο πακλιταξέλη αποδείχθηκε ότι παρουσιάζουν παρατεταμένη απελευθέρωση φαρμάκου και βελτιωμένη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τα συμβατικά σκευάσματα. Τα νανοσωματίδια σχεδιάστηκαν για να αποικοδομούνται σε μια συγκεκριμένη περίοδο, οδηγώντας σε παρατεταμένη απελευθέρωση του φαρμάκου και βελτιωμένη αποτελεσματικότητα. Μια άλλη μελέτη των Dai et al. κατέδειξε τη δυνατότητα των νανοσωματιδίων που βασίζονται σε PLGA για παρατεταμένη απελευθέρωση αντιβιοτικών στη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων (R. A. Jain et al., n.d.; Tegos et al., 2006).

Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας ελέγχεται από τη διείσδυση του διαλύτη εντός του συστήματος (Solvent-Controlled Devices)

Σε αυτά τα συστήματα, η δραστική ουσία τυπικά διαλύεται ή διασπείρεται σε μια μήτρα που είναι αδιάλυτη στο νερό ή σε βιολογικά υγρά. Όταν το σύστημα έρχεται σε επαφή με έναν διαλύτη, όπως νερό ή σωματικά υγρά, ο διαλύτης διεισδύει στη μήτρα του

πολυμερούς, προκαλώντας τη διόγκωσή του και την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας. Ο ρυθμός απελευθέρωσης από τέτοιου είδους συστήματα χορήγησης φαρμάκου μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ιδιοτήτων της μήτρας, της διαλυτότητας της δραστικής ουσίας και της σύνθεσης του διαλύτη. Η μήτρα των νανοσωματιδίων μπορεί να σχεδιαστεί ώστε να έχει διαφορετικές ιδιότητες, όπως πυκνότητα και υδροφοβικότητα, που μπορούν να επηρεάσουν τον ρυθμό διείσδυσης του διαλύτη και, επομένως, τον ρυθμό απελευθέρωσης του φαρμάκου. Η διαλυτότητα της δραστικής ουσίας στον διαλύτη μπορεί επίσης να επηρεάσει τον ρυθμό απελευθέρωσης, καθώς μια πιο ευδιάλυτη ουσία θα απελευθερωθεί πιο γρήγορα.

Συστήματα χορήγησης φαρμάκων ελεγχόμενα από διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί σε ποικίλες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της χορήγησης βιοδραστικών ενώσεων για τη θεραπεία του καρκίνου, τη διαχείριση του πόνου και την αντισύλληψη. Συνολικά, τα ελεγχόμενα με διαλύτες συστήματα χορήγησης φαρμάκων είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων, προσφέροντας αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά συστήματα χορήγησης. Με τη ρύθμιση των ιδιοτήτων της μήτρας και της διαλυτότητας της δραστικής ουσίας, ο ρυθμός απελευθέρωσης του φαρμάκου μπορεί να προσαρμοστεί για να καλύψει συγκεκριμένες θεραπευτικές ανάγκες (R. A. Jain et al., n.d.; J. H. Lee & Yeo, 2015b).

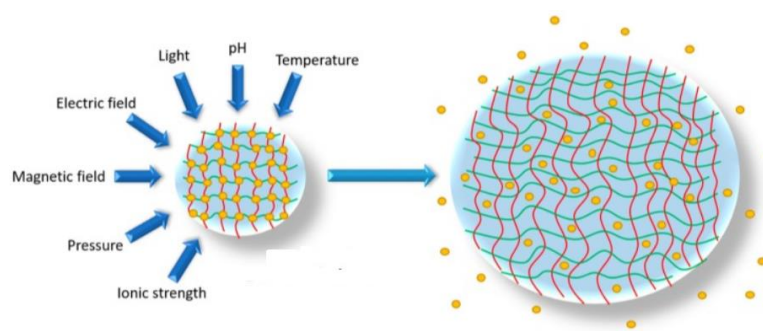
Συστήματα όπου η αποδέσμευση του φαρμάκου ελέγχεται από ερεθίσματα (Stimuli – controlled release)

Τα ελεγχόμενα από ερεθίσματα συστήματα χορήγησης φαρμάκων είναι ένας τύπος νανοσυστημάτων όπου η απελευθέρωση του φαρμάκου πραγματοποιείται ως απόκριση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα όπως η θερμοκρασία, το pH, το φως, το μαγνητικό πεδίο ή η ενζυμική δραστηριότητα. Αυτά τα συστήματα έχουν σχεδιαστεί για να απελευθερώνουν φάρμακα σε συγκεκριμένο χρόνο και σε συγκεκριμένο στόχο, με αποτέλεσμα την ενισχυμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και μειωμένες παρενέργειες.

Ένα παράδειγμα ενός ελεγχόμενου από ερεθίσματα συστήματος χορήγησης φαρμάκων είναι τα ευαίσθητα στο pH νανοσωματίδια. Αυτά τα νανοσωματίδια έχουν σχεδιαστεί για να απελευθερώνουν φάρμακα ως απόκριση σε αλλαγές στο pH, όπως αυτές που συμβαίνουν σε καρκινικούς ιστούς. Όταν τα νανοσωματίδια εκτίθενται στο περιβάλλον χαμηλότερου pH ενός όγκου, υφίστανται μια δομική αλλαγή που οδηγεί στην απελευθέρωση του ωφέλιμου φορτίου του φαρμάκου. Ένα άλλο παράδειγμα ενός συστήματος χορήγησης φαρμάκων ελεγχόμενων από ερεθίσματα είναι τα νανοσωματίδια που ανταποκρίνονται στο φως. Αυτά τα νανοσωματίδια περιέχουν φωτοανταποκρινόμενα μόρια που μπορούν να ενεργοποιηθούν από συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ωφέλιμου φορτίου του φαρμάκου. Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί για τη χορήγηση φαρμάκων σε συγκεκριμένες θέσεις στο σώμα, όπως όγκους ή άλλους άρρωστους ιστούς.

Τα ελεγχόμενα από ερεθίσματα συστήματα χορήγησης φαρμάκων έχουν τη δυνατότητα να φέρουν επανάσταση στη χορήγηση, προσφέροντας ενισχυμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και μειωμένες παρενέργειες. Αυτά τα συστήματα αποτελούν

αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας, με νέες εξελίξεις και καινοτομίες να εμφανίζονται τακτικά (Kalaydina et al., 2018; Tiwari et al., 2012).



Εικόνα 11: Παραδείγματα εξωτερικών ερεθισμάτων που μπορούν να προκαλέσουν την αποδέσμευση μίας βιοδραστικής ένωσης από έναν νανοφορέα (Harrison,2018)

1.3.2 Μαθηματικά μοντέλα για την αποδέσμευση των βιοδραστικών ουσιών από τα νανοσυστήματα

Η αποδέσμευση των βιοδραστικών ουσιών από τα νανοσυστήματα είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς, όπως η διάχυση, η διάβρωση και η υποβάθμιση της μήτρας του φορέα. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα για την πρόβλεψη της απελευθέρωσης φαρμάκων από τα νανοσυστήματα ως συνάρτηση του χρόνου. Τα κύρια κινητικά μοντέλα θα αναπτυχθούν εν συντομία παρακάτω:

Μοντέλο κινητικής μηδενικής τάξης

Το μοντέλο κινητικής μηδενικής τάξης υποθέτει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης της βιοδραστικής ένωσης παραμένει σταθερός με την πάροδο του χρόνου, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο εσωτερικό του νανοσυστήματος. Αυτό το μοντέλο χρησιμοποιείται συχνά για συστήματα χορήγησης φαρμάκων που έχουν υψηλή ικανότητα φόρτωσης φαρμάκων και προφίλ παρατεταμένης αποδέσμευσης. Το μοντέλο κινητικής μηδενικής τάξης μπορεί να εκφραστεί με τη μαθηματική εξίσωση:

$$\frac{dC}{dt} = -k_0$$

Όπου C είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που παραμένει στο εσωτερικό του νανοφορέα τη στιγμή t , k_0 είναι η σταθερά ρυθμού μηδενικής τάξης και ο λόγος dC/dt είναι ο ρυθμός απελευθέρωσης φαρμάκου.

Το μοντέλο κινητικής μηδενικής τάξης χρησιμοποιείται ευρέως για το σχεδιασμό νανοσυστημάτων για τη χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών με ελεγχόμενη αποδέσμευση για ουσίες με στενούς θεραπευτικούς δείκτες ή με απαίτηση υψηλής δόσης. Το μοντέλο υποθέτει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση του φαρμάκου, επομένως ο ρυθμός απελευθέρωσης παραμένει σταθερός με την πάροδο του χρόνου. Η εξίσωση δείχνει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης φαρμάκου είναι ανάλογος με τη σταθερά ρυθμού μηδενικής τάξης (k_0), η οποία αντιπροσωπεύει τον εγγενή ρυθμό απελευθέρωσης των μορίων του φαρμάκου από το νανοσύστημα. Ο ρυθμός

απελευθέρωσης μπορεί να προσαρμοστεί μεταβάλλοντας τη σταθερά ρυθμού μηδενικής τάξης, η οποία επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η χημική φύση του φαρμάκου, οι ιδιότητες της μήτρας του φορέα και το μέγεθος της.

Μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης

Το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης υποθέτει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης φαρμάκου είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του φαρμάκου που παραμένει στο εσωτερικό του νανοσυστήματος. Αυτό το μοντέλο χρησιμοποιείται συχνά για συστήματα χορήγησης φαρμάκων που έχουν περιορισμένη ικανότητα φόρτωσης φαρμάκου και προφίλ εκρηκτικής απελευθέρωσης. Το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης μπορεί να εκφραστεί ως εξής:

$$\frac{dC}{dt} = -k_1 C$$

Όπου C είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που παραμένει στο εσωτερικό του νανοσυστήματος τη στιγμή t , k_1 είναι η σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξης και dC/dt είναι ο ρυθμός απελευθέρωσης του φαρμάκου.

Το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης χρησιμοποιείται ευρέως για το σχεδιασμό νανοσυστημάτων για δραστικές ουσίες με υψηλή διαλυτότητα και απαίτηση χαμηλής δόσης. Το μοντέλο υποθέτει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του φαρμάκου, επομένως ο ρυθμός απελευθέρωσης μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Η εξίσωση δείχνει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης του φαρμάκου είναι ανάλογος με τη σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξης (k_1), η οποία αντιπροσωπεύει τον ρυθμό των μορίων του φαρμάκου που εγκαταλείπουν το νανοσύστημα και μεταβαίνουν στο εξωτερικό περιβάλλον ανά μονάδα συγκέντρωσης φαρμάκου. Ο ρυθμός απελευθέρωσης μπορεί να ελεγχθεί διαμορφώνοντας τη σταθερά ρυθμού πρώτης τάξης, η οποία επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η χημική φύση του φαρμάκου, οι ιδιότητες της μήτρας του φορέα και το μέγεθος του νανοφορέα.

Μοντέλο Higuchi

Το μοντέλο Higuchi υποθέτει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης του φαρμάκου είναι ανάλογος με την τετραγωνική ρίζα του χρόνου. Αυτό το μοντέλο χρησιμοποιείται συχνά για συστήματα χορήγησης φαρμάκων που έχουν δομή μήτρας και το προφίλ απελευθέρωσης της φαρμακευτικής ουσίας ελέγχεται από τη διάχυση. Το μοντέλο Higuchi μπορεί να εκφραστεί με τη μαθηματική εξίσωση:

$$Q = k_h t^{1/2}$$

Όπου Q είναι η ποσότητα του φαρμάκου που απελευθερώνεται από το νανοσύστημα τη στιγμή t , k_h είναι η σταθερά του ρυθμού Higuchi και $t^{1/2}$ είναι η τετραγωνική ρίζα του χρόνου.

Το μοντέλο Higuchi χρησιμοποιείται ευρέως για το σχεδιασμό νανοσυστημάτων που προορίζονται για τον εγκλωβισμό φαρμακευτικών ουσιών που απαιτούν προφίλ παρατεταμένης αποδέσμευσης. Το μοντέλο υποθέτει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης είναι

ανάλογος με την τετραγωνική ρίζα του χρόνου, επομένως ο ρυθμός απελευθέρωσης μειώνεται με την πάροδο του χρόνου.

Λοιπά μοντέλα

Εκτός από τα μοντέλα που αναφέρονται παραπάνω, υπάρχουν και άλλα μοντέλα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της απελευθέρωσης φαρμάκων από τα νανοσυστήματα. Για παράδειγμα, το μοντέλο Korsmeyer-Peppas χρησιμοποιείται ευρέως για να περιγράψει την απελευθέρωση φαρμακευτικών ουσιών από πολυμερικά νανοσυστήματα. Αυτό το μοντέλο υποθέτει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης φαρμάκου σχετίζεται με την ποσότητα του φαρμάκου που έχει απελευθερωθεί από το νανοσύστημα και μπορεί να εκφραστεί ως:

$$\frac{M}{M_{\infty}} = k t^n$$

Όπου M είναι η ποσότητα φαρμάκου που απελευθερώνεται τη στιγμή t , M_{∞} είναι η συνολική ποσότητα φαρμάκου στο νανοσύστημα, k είναι η σταθερά ρυθμού Korsmeyer-Peppas και n είναι ο εκθέτης απελευθέρωσης.

Το μοντέλο Korsmeyer-Peppas χρησιμοποιείται ευρέως για το σχεδιασμό νανοσυστημάτων που έχουν σαν στόχο να παρουσιάσουν ένα προφίλ παρατεταμένης αποδέσμευσης. Το μοντέλο υποθέτει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης σχετίζεται με την ποσότητα του φαρμάκου που έχει απελευθερωθεί από το νανοσύστημα, επομένως ο ρυθμός απελευθέρωσης μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Σύμφωνα με την εξίσωση, η ποσότητα του φαρμάκου που απελευθερώνεται από το νανοσύστημα είναι ανάλογη με τη σταθερά ρυθμού Korsmeyer-Peppas (k) και τον εκθέτη απελευθέρωσης (n).

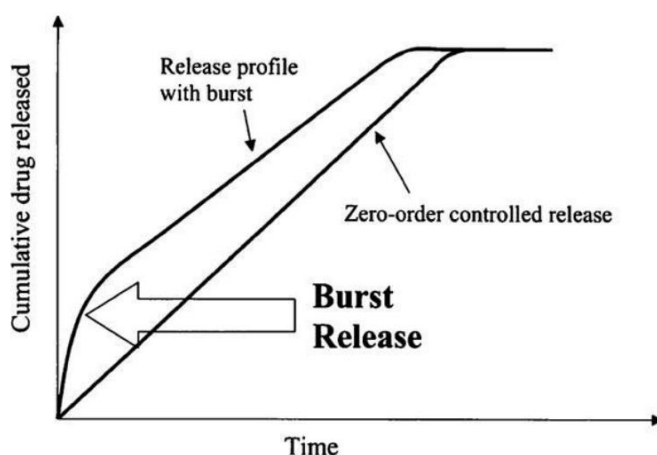
Ένα άλλο μοντέλο που χρησιμοποιείται ευρέως για την πρόβλεψη της απελευθέρωσης φαρμάκων από τα νανοσυστήματα είναι το μοντέλο Weibull. Αυτό το μοντέλο υποθέτει ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης μίας φαρμακευτικής ουσίας σχετίζεται με τη αθροιστική ποσότητα φαρμάκου που έχει απελευθερωθεί από το νανοσύστημα (Miricioiu et al., 2019).

1.3.3 Αποδέσμευση Βιοδραστικών ουσιών από τα NLCs

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω τα NLCs αποτελούν ένα σύστημα που ενθυλακώνει μία βιοδραστική ένωση σε ένα μείγμα στερεού και υγρού λιπιδίου. Στα NLCs, η ικανότητα διαλυτοποίησης του φαρμάκου αυξάνεται λόγω του υγρού ελαίου. Έτσι, αυτό το σύστημα εμφανίζει χαρακτηριστικά ελεγχόμενης απελευθέρωσης με το πλεονέκτημα της υψηλής απόδοσης εγκλωβισμού μίας φαρμακευτικής ουσίας. Συγκεκριμένα, οι ατελείς και άμορφοι τύποι NLCs παρέχουν μεγαλύτερη ευελιξία για την επίτευξη μιας επιθυμητής παρατεταμένης απελευθέρωσης. Τα NLCs με περισσότερες ατέλειες στην κρυσταλλική δομή, παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας ένα μείγμα στερεού λιπιδίου και διαφορετικών υγρών λιπιδίων. Αυτές οι ατέλειες συμβάλλουν στη βελτίωση της φόρτωσης του φαρμάκου και στη μείωση της απελευθέρωσης του φαρμάκου κατά την αποθήκευση. Ως εκ τούτου, τα NLCs που είναι νανοσωματίδια λιπιδίων ή κολλοειδείς φορείς έχουν διερευνηθεί ως πιθανό όχημα τοπικής χορήγησης. Έχει αναφερθεί ότι τα NLCs προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά τοπικά προϊόντα λόγω της ικανότητάς τους να παρατείνουν την

απελευθέρωση του φαρμάκου, να μετριάζουν τον ερεθισμό του δέρματος και να προστατεύουν το φάρμακο από πιθανή αποικοδόμηση. Επιπλέον, η υψηλή ειδική επιφάνεια των σωματιδίων εξασφαλίζει εξαιρετική επαφή με το προσβεβλημένο σημείο στο δέρμα, διευκολύνοντας τη μεταφορά του φαρμάκου πιο αποτελεσματικά (Son et al., 2017).

Τα NLCs παρουσιάζουν ένα μοτίβο απελευθέρωσης φαρμάκου που αποτελείται από δύο στάδια: ένα αρχικό προφίλ απότομης απελευθέρωσης (burst effect), ακολουθούμενο από μια παρατεταμένη απελευθέρωση με σταθερό ρυθμό. Το εξωτερικό στρώμα των νανοσωματιδίων που αποτελείται από το στερεό λιπίδιο, προκαλεί μια αρχική γρήγορη απελευθέρωση. Σε αντίθεση με τα SLNs, το εξωτερικό στρώμα των NLCs, όπου υπάρχει άφθονο υγρό λιπίδιο, μπορεί να διαλύσει περισσότερα λιπόφιλα φάρμακα. Έτσι, μια σημαντική ποσότητα του φαρμάκου μπορεί εύκολα να φορτωθεί στο εξωτερικό κέλυφος και να απελευθερωθεί με διάχυση ή διάβρωση της μήτρας. Μετά από αυτήν την αρχική ταχεία απελευθέρωση, εμφανίζεται αργή απελευθέρωση από τον πυρήνα. Η ενδιαφέρουσα πτυχή των NLCs είναι ότι είναι δυνατό να δημιουργηθεί ένα προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου σε σχέση με την περιεκτικότητα τους σε έλαιο (Junyaprasert et al., 2009; Souto & Müller, 2010).



Εικόνα 12: Απεικόνιση της αρχικής απότομης απελευθέρωσης της βιοδραστικής ένωσης από τους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς

1.4 Πράσινη Χημεία και Πράσινη Νανοτεχνολογία

1.4.1 Πράσινη Χημεία

Η πράσινη χημεία είναι ένας κλάδος της χημείας που επικεντρώνεται στην ανάπτυξη χημικών διεργασιών και προϊόντων που ελαχιστοποιούν τη χρήση και την παραγωγή επικίνδυνων ουσιών. Στοχεύει στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη χημικών προϊόντων που είναι φιλικά προς το περιβάλλον, οικονομικά βιώσιμα και διέπονται από την αίσθηση της κοινωνικής ευθύνης. Υπάρχουν δώδεκα βασικές αρχές της πράσινης χημείας, οι οποίες χρησιμεύουν ως κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό χημικών διεργασιών και προϊόντων που είναι πιο βιώσιμα. Οι αρχές περιλαμβάνουν την ελαχιστοποίηση των αποβλήτων, τη χρήση ασφαλέστερων χημικών ουσιών και διαλυτών, τη χρήση

ανανεώσιμων πρώτων υλών και τον σχεδιασμό χημικών προϊόντων που είναι εγγενώς ασφαλέστερα (Mutlu & Barner, 2022; Ncube et al., 2023; Warner et al., 2004).

- Πρόληψη: είναι η αρχή που εστιάζει εξαρχής στην πρόληψη της δημιουργίας αποβλήτων, αντί στην επεξεργασία ή τη διάθεσή τους μετά τη δημιουργία τους. Η πρόληψη μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση διαδικασιών που χαρακτηρίζονται από μεγάλες αποδόσεις, τη χρήση ανανεώσιμων πόρων και το σχεδιασμό προϊόντων που είναι ανθεκτικά και μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν ή να ανακυκλωθούν.
- Οικονομία ατόμων: είναι η αρχή που εστιάζει στη μεγιστοποίηση της χρήσης όλων των ατόμων σε μια χημική αντίδραση, ελαχιστοποιώντας τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα. Η οικονομία ατόμων μπορεί να επιτευχθεί σχεδιάζοντας αντιδράσεις που είναι επιλεκτικές, αποτελεσματικές και παράγουν ελάχιστα απόβλητα.
- Λιγότερο επικίνδυνες συνθετικές οδοί: αυτή η αρχή εστιάζει στη χρήση ασφαλέστερων και λιγότερο τοξικών χημικών ουσιών στις χημικές αντιδράσεις. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση πράσινων διαλυτών, καταλυτών και αντιδραστηρίων, καθώς και με τη χρήση βιοαποικοδομήσιμων και μη τοξικών υλικών.
- Σχεδιασμός ασφαλέστερων χημικών προϊόντων: η πράσινη χημεία εστιάζει επίσης στο σχεδιασμό χημικών προϊόντων που είναι εγγενώς ασφαλέστερα για την ανθρώπινη υγεία και για το περιβάλλον. Για αυτό και έχει ως στόχο τη χρήση μη τοξικών, βιοαποδομήσιμων και ανανεώσιμων υλικών, καθώς και με την αποφυγή επικίνδυνων χημικών ουσιών στη διαδικασία σχεδιασμού.
- Ασφαλέστεροι διαλύτες και αντιδραστήρια: η πέμπτη αρχή της πράσινης χημείας είναι η χρήση ασφαλέστερων διαλυτών και αντιδραστηρίων. Αυτή η αρχή περιλαμβάνει τη χρήση διαλυτών και άλλων βοηθητικών ουσιών και αντιδραστηρίων που είναι ασφαλέστερα όπως με τη χρήση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και ιοντικών υγρών.
- Σχεδιασμός για ενεργειακή απόδοση: οι χημικές αντιδράσεις και διεργασίες θα πρέπει να εκτελούνται κατά το δυνατόν σε συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης περιβάλλοντος και με φυσικά μέσα, π.χ. αποχρωματισμός ινών με το φως του ηλίου αντί με χλωρίνη ή υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλά και η πραγματοποίηση αντιδράσεων με χρήση τεχνικών υψηλής ενέργειας όπως τα μικροκύματα ή οι υπέρηχοι.
- Χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών: η χρήση των ανανεώσιμων πηγών ως πρώτων υλών σε χημικές διεργασίες είναι πρωταρχικός στόχος της πράσινης χημείας. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση βιομάζας, όπως η φυτική ύλη και τα γεωργικά απόβλητα, καθώς και η χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας όπως η ηλιακή και η αιολική ενέργεια.
- Ελαχιστοποίηση χημικών τροποποιήσεων: οι χημικές συνθέσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται χωρίς τη χρήση προστατευτικών ομάδων, όπου αυτό είναι δυνατό. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χημεία «click», όρος που αναφέρεται σε αντιδράσεις που χαρακτηρίζονται από υψηλές αποδόσεις, είναι απλές στην εκτέλεση, μπορούν να πραγματοποιηθούν σε διαλύτες που είναι φιλικό προς το περιβάλλον και δεν χρειάζονται πολλά στάδια επεξεργασίας.

- Κατάλυση: η ένατη αρχή της πράσινης χημείας είναι η χρήση της κατάλυσης. Αυτή η αρχή εστιάζει στη χρήση καταλυτών σε χημικές αντιδράσεις, οι οποίοι μπορούν να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης και να μειώσουν τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα. Οι καταλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μειώσουν την ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μικρές ποσότητες, μειώνοντας τη συνολική περιβαλλοντική επίπτωση μίας αντίδρασης.
- Σχεδιασμός για αποικοδόμηση: η πράσινη χημεία σήμερα προσπαθεί να επιτύχει ισορροπία μεταξύ της σταθερότητας των προϊόντων κατά τη διάρκεια παραμονής τους στο ράφι και κατά τις διάφορες φάσεις χρήσης τους και της βιοαποικοδόμησης τους όταν απορριφθούν στο περιβάλλον.
- Ανάλυση ρύπων σε πραγματικό χρόνο: πρόκειται για την ανάπτυξη μεθόδων χειρισμού και ελέγχου των χημικών διεργασιών όταν αυτές πραγματοποιούνται, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο, ώστε να προλαμβάνεται η παραγωγή επικίνδυνων ουσιών. Αυτό, μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση αισθητήρων, δηλαδή με τη χρήση in-line τεχνικών ελέγχου, ή με τη λήψη αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, δηλαδή με τη χρήση on-line τεχνικών ελέγχου.
- Ασφαλέστερες χημικές διεργασίες για την πρόληψη ατυχημάτων: εδώ περιλαμβάνονται δράσεις όπως η ελαχιστοποίηση της χρήσης τοξικών ουσιών, η αποφυγή μεταφοράς επικίνδυνων ουσιών και η παραγωγή τους στο εκάστοτε εργοστάσιο ή η πλήρης αντικατάστασή τους.

Οι αρχές της πράσινης χημείας παρέχουν ένα πλαίσιο για τον σχεδιασμό πιο βιώσιμων χημικών προϊόντων και διαδικασιών, αλλά είναι σημαντικό να υπάρχουν εργαλεία και δείκτες για την αξιολόγηση της εφαρμογής τους. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα εργαλεία για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των προϊόντων και των διεργασιών. Μερικά από τα πιο κοινά είναι:

- Εκτίμηση Κύκλου Ζωής (LCA): Η LCA είναι ένα εργαλείο που αξιολογεί τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις ενός προϊόντος ή μιας διαδικασίας σε ολόκληρο τον κύκλο ζωής του, από την εξόρυξη πρώτων υλών έως την απόρριψη του μετά τη χρήση. Αυτό το εργαλείο παρέχει μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων ενός προϊόντος ή μιας διαδικασίας και μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό περιοχών όπου μπορούν να γίνουν βελτιώσεις (S. G. Lee & Xu, 2005).
- The Twelve Principles of Green Chemistry Metrics: Αυτές οι μετρήσεις αναπτύχθηκαν από το ACS Green Chemistry Institute για να βοηθήσουν στη μέτρηση της εφαρμογής των δώδεκα αρχών της πράσινης χημείας. Παρέχουν έναν τυποποιημένο τρόπο αξιολόγησης της βιωσιμότητας των χημικών προϊόντων και διαδικασιών.
- Ο Πράσινος Δείκτης Χημείας (GCI): Ο GCI είναι ένα εργαλείο που αναπτύχθηκε από την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA) για την αξιολόγηση της περιβαλλοντικής απόδοσης των χημικών προϊόντων και διεργασιών. Περιλαμβάνει δείκτες για την τοξικότητα, τη χρήση ενέργειας, την παραγωγή αποβλήτων και άλλους παράγοντες.

- *The GreenScreen for Safer Chemicals*: Αυτό το εργαλείο αναπτύχθηκε από τον μη κερδοσκοπικό οργανισμό Clean Production Action για να αξιολογήσει το δυναμικό κινδύνου των χημικών και να εντοπίσει ασφαλέστερες εναλλακτικές λύσεις (Martínez et al., 2022).

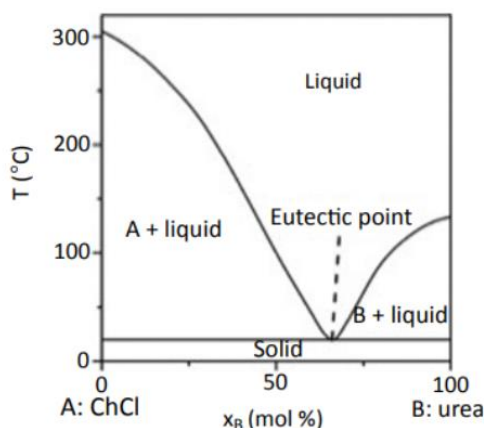
Ενώ η πράσινη χημεία έχει τη δυνατότητα να φέρει επανάσταση στη χημική βιομηχανία και να δημιουργήσει πιο βιώσιμα προϊόντα και διαδικασίες, ενέχει και περιορισμούς στην εφαρμογή της. Η ανάπτυξη και η εφαρμογή διαδικασιών και προϊόντων πράσινης χημείας μπορεί να είναι πιο ακριβή από τις παραδοσιακές μεθόδους. Γεγονός που μπορεί να δυσκολέψει τις εταιρείες να υιοθετήσουν αυτές τις πρακτικές, ειδικά εάν ανταγωνίζονται σε μια ευαίσθητη ως προς τις τιμές αγορά. Επιπλέον, η πράσινη χημεία απαιτεί εξειδικευμένη γνώση και εξειδίκευση για το σχεδιασμό και την εφαρμογή βιώσιμων διαδικασιών και προϊόντων. Πολλές εταιρείες μπορεί να μην διαθέτουν την τεχνογνωσία που απαιτείται για να κάνουν αυτή τη στροφή και μπορεί να χρειαστεί να επενδύσουν σε υπηρεσίες κατάρτισης ή συμβουλευτικών υπηρεσιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι υπάρχοντες κανονισμοί μπορούν να δημιουργήσουν εμπόδια στην υιοθέτηση της πράσινης χημείας. Για παράδειγμα, οι κανονισμοί που δίνουν προτεραιότητα στη χρήση ορισμένων χημικών ουσιών ή απαιτούν ορισμένες μεθόδους δοκιμών μπορεί να δυσκολέψουν τις εταιρείες να υιοθετήσουν νέες, πιο βιώσιμες πρακτικές (S. G. Lee & Xu, 2005; Marques & Machado, 2021).

Η πράσινη χημεία είναι μια σημαντική προσέγγιση για την ανάπτυξη πιο βιώσιμων χημικών προϊόντων και διαδικασιών. Δίνοντας προτεραιότητα στη χρήση ανανεώσιμων πηγών, σχεδιάζοντας ασφαλέστερα χημικά προϊόντα και ελαχιστοποιώντας τα απόβλητα, η πράσινη χημεία έχει τη δυνατότητα να μειώσει τον αντίκτυπο της χημικής βιομηχανίας στον άνθρωπο και το περιβάλλον. Ωστόσο, υπάρχουν επίσης προκλήσεις για την εφαρμογή της, συμπεριλαμβανομένου του κόστους, των ρυθμιστικών εμποδίων και της ανάγκης για εξειδικευμένη γνώση και εμπειρογνωμοσύνη. Καθώς η χημική βιομηχανία συνεχίζει να εξελίσσεται, είναι σημαντικό να δοθεί προτεραιότητα στη βιωσιμότητα και να ενσωματωθούν οι αρχές της πράσινης χημείας σε όλες τις πτυχές του σχεδιασμού και της σύνθεσης χημικών (Marques & Machado, 2021).

1.4.2 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες – Deep Eutectic Solvents (DESs)

Οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES) είναι μια κατηγορία ιοντικών υγρών που έχουν κερδίσει αυξανόμενη προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους και των πιθανών εφαρμογών τους σε διάφορους τομείς. Τα DES είναι μια νέα κατηγορία διαλυτών που σχηματίζονται από το συνδυασμό δύο ή περισσότερων στερεών ή υγρών ενώσεων που βρίσκονται σε ένα ευτηκτικό μείγμα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα DES σχηματίζονται από το συνδυασμό δύο ή περισσότερων συστατικών, συνήθως ενός δέκτη δεσμού υδρογόνου (HBA) και ενός δότη δεσμού υδρογόνου (HBD). Ένα DES έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών διαλυτών, όπως χαμηλή τοξικότητα, βιοαποδομησιμότητα, υψηλή θερμική σταθερότητα και ευκολία σύνθεσης. Έχουν αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση σε σχέση με τους παραδοσιακούς οργανικούς διαλύτες λόγω της χαμηλής τοξικότητάς τους, της βιοαποδομησιμότητας και της ικανότητας τους να ανακυκλώνονται.

Τα ευτηκτικά μείγματα είναι δυαδικά ή τριμερή μείγματα που έχουν χαμηλό σημείο τήξης. Όταν αυτά τα συστατικά αναμειγνύονται σε μια συγκεκριμένη αναλογία, σχηματίζουν ένα ευτηκτικό μείγμα, το οποίο έχει χαμηλότερο σημείο τήξης από οποιοδήποτε από τα επιμέρους συστατικά του. Τα DES μπορούν να σχηματιστούν από ένα ευρύ φάσμα συστατικών, συμπεριλαμβανομένων οργανικών οξέων, αμιδίων, αλκοολών και αλάτων (Q. Zhang et al., 2012).



Εικόνα 13: Παράδειγμα δημιουργίας του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη

Τα DES έχουν μια σειρά από μοναδικές ιδιότητες που τα καθιστούν ελκυστικά για μια ποικιλία εφαρμογών. Μερικές από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των DES είναι (Q. Zhang et al., 2012):

- Χαμηλή τοξικότητα: Τα DES αποτελούνται συνήθως από μη τοξικά συστατικά, τα οποία τα καθιστούν μια ασφαλέστερη εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών οργανικών διαλυτών. Είναι επίσης βιοδιασπώμενα, πράγμα που σημαίνει ότι μπορούν εύκολα να διασπαστούν σε αβλαβή συστατικά με φυσικές διαδικασίες.
- Υψηλή διαλυτότητα: Τα DES έχουν υψηλή διαλυτότητα για ένα ευρύ φάσμα οργανικών και ανόργανων ενώσεων, γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα για μια ποικιλία εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της εκχύλισης, του διαχωρισμού και της σύνθεσης.
- Χαμηλό ιξώδες: Τα DES έχουν χαμηλό ιξώδες, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για μια ποικιλία εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων των ηλεκτροχημικών εφαρμογών, καθώς και για τη σύνθεση πολυμερών και νανοσωματιδίων.
- Υψηλή αγωγιμότητα: Τα DES έχουν υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, η οποία τα καθιστά χρήσιμα για ηλεκτροχημικές εφαρμογές, όπως αποθήκευση και μετατροπή ενέργειας.

Τα DES έχουν ένα ευρύ φάσμα πιθανών εφαρμογών σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένης της χημείας, της επιστήμης των υλικών και της βιοτεχνολογίας. Μερικές από τις πιο υποσχόμενες εφαρμογές των DES είναι:

- Πράσινοι διαλύτες: Τα DES είναι μια πράσινη εναλλακτική στους παραδοσιακούς οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι είναι συχνά τοξικοί, μη βιοαποδομήσιμοι και μη ανανεώσιμοι. Τα DES μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικατάσταση των

παραδοσιακών διαλυτών σε ποικίλες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της εκχύλισης, του διαχωρισμού και της σύνθεσης (Yang et al., 2019).

- Χημική σύνθεση: Τα DES έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσο αντίδρασης για μια ποικιλία χημικών αντιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης της οξείδωσης, της αναγωγής και του πολυμερισμού. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως καταλύτης σε μια ποικιλία αντιδράσεων (Q. Zhang et al., 2012).
- Ηλεκτροχημεία: Τα DES έχουν υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, η οποία τα καθιστά χρήσιμα για ηλεκτροχημικές εφαρμογές, όπως αποθήκευση και μετατροπή ενέργειας. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως ηλεκτρολύτες σε μπαταρίες, υπερπυκνωτές και ηλιακές κυψέλες (Boldrini et al., 2022).
- Εκχύλιση και διαχωρισμός: Τα DES έχουν υψηλή διαλυτότητα για ένα ευρύ φάσμα οργανικών και ανόργανων ενώσεων, γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα για εφαρμογές εκχύλισης και διαχωρισμού. Έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από φυτά, καθώς και για τον διαχωρισμό μετάλλων από υδατικά διαλύματα (Li & Row, 2016; Tzani et al., 2021a).

Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιείται ο βαθώς ευτηκτικός διαλύτης που αποτελείται από βεταΐνη και γαλακτικό οξύ σε αναλογία 1:2. Ο βαθύς ευτηκτικός διαλύτης (DES) που αποτελείται από βεταΐνη και γαλακτικό οξύ σε αναλογία 1:2 είναι ένας πολλά υποσχόμενος νέος υποψήφιος στον τομέα των πράσινων διαλυτών. Αυτό το DES έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει μια σειρά από ενδιαφέρουσες ιδιότητες, όπως χαμηλή τοξικότητα, χαμηλή πτητικότητα, υψηλή θερμική σταθερότητα και υψηλή βιοδιασπασιμότητα.

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά αυτού του DES είναι η ικανότητά του να διαλύει ένα ευρύ φάσμα οργανικών και ανόργανων ενώσεων, καθιστώντας το έναν ευέλικτο διαλύτη για μια ποικιλία εφαρμογών σε διαδικασίες χημικής σύνθεσης και εκχύλισης. Έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό στην εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από φυσικές πηγές όπως φυτά και μύκητες, και στη σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων με ελεγχόμενο μέγεθος και σχήμα. Επιπλέον, αυτό το DES έχει βρεθεί ότι έχει υψηλή ικανότητα απορρόφησης διοξειδίου του άνθρακα, καθιστώντας το πιθανό υποψήφιο για εφαρμογές δέσμευσης και αποθήκευσης άνθρακα. Η ικανότητά του να διαλύει ακόμα και μια ποικιλία αερίων το καθιστά επίσης ελκυστική επιλογή για διαδικασίες διαχωρισμού αερίων.

Συνολικά, το DES που αποτελείται από βεταΐνη και γαλακτικό οξύ υπόσχεται πολλά για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών σε διάφορους τομείς της χημείας, συμπεριλαμβανομένης της πράσινης χημείας, της επιστήμης των υλικών και της περιβαλλοντικής επιστήμης. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τις ιδιότητες και τις πιθανές εφαρμογές αυτού του DES για την πλήρη διερεύνηση των δυνατοτήτων και των περιορισμών του (V. I. B. Castro et al., 2018).

1.4.3 Πράσινη Νανοτεχνολογία

Η πράσινη νανοτεχνολογία είναι η ενσωμάτωση των αρχών της πράσινης χημείας και των φιλικών προς το περιβάλλον πρακτικών στον τομέα της νανοτεχνολογίας. Περιλαμβάνει την ανάπτυξη βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον νανοϋλικών και νανοτεχνολογιών που

ελαχιστοποιούν τις αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Η εφαρμογή της πράσινης νανοτεχνολογίας έχει τη δυνατότητα να αντιμετωπίσει διάφορες περιβαλλοντικές και κοινωνικές προκλήσεις, όπως η εξοικονόμηση ενέργειας, ο έλεγχος της ρύπανσης και η αειφόρος ανάπτυξη.

Η πράσινη νανοτεχνολογία περιλαμβάνει ολόκληρο τον κύκλο ζωής των νανοϋλικών, από τη σύνθεσή τους έως τη διάθεσή τους στην αγορά και τη χρήση τους, και δίνει έμφαση στη χρήση ανανεώσιμων πόρων, μη τοξικών υλικών και αποτελεσματικών διαδικασιών παραγωγής. Οι αρχές της πράσινης χημείας, όπως η οικονομία ατόμων, η μείωση των αποβλήτων και η χρήση ασφαλέστερων διαλυτών, εφαρμόζονται στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη πράσινων νανοτεχνολογιών. Η χρήση πράσινων διαλυτών, όπως οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES), έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στην πράσινη νανοτεχνολογία λόγω της χαμηλής τοξικότητάς τους, της βιοδιασπασιμότητας και της συμβατότητάς τους με διάφορα νανοϋλικά.

Η εφαρμογή της πράσινης νανοτεχνολογίας έχει τεράστιες δυνατότητες σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένης της ενέργειας, της ιατρικής, της γεωργίας και της περιβαλλοντικής επιστήμης. Μερικές από τις βασικές εφαρμογές της πράσινης νανοτεχνολογίας είναι (*Pharmaceutical Nanotechnology Costas Demetzos Fundamentals and Practical Applications*, n.d.):

- Παραγωγή και Αποθήκευση Ενέργειας: η πράσινη νανοτεχνολογία έχει τη δυνατότητα να φέρει επανάσταση στον ενεργειακό τομέα αναπτύσσοντας αποδοτικά και φιλικά προς το περιβάλλον συστήματα παραγωγής και αποθήκευσης ενέργειας. Νανοϋλικά, όπως νανοσωλήνες άνθρακα, γραφένιο και νανοκρυσταλλικό πυρίτιο, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της απόδοσης των ηλιακών κυψελών, των κυψελών καυσίμου και των μπαταριών. Αυτά τα νανοϋλικά έχουν υψηλή επιφάνεια και ηλεκτρική αγωγιμότητα, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για ενεργειακές εφαρμογές.
- Έλεγχος και Περιορισμός Ρύπανσης: η πράσινη νανοτεχνολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και την αποκατάσταση περιβαλλοντικών ρύπων, όπως βάρεια μέταλλα, φυτοφάρμακα και οργανικές ενώσεις. Οι νανοαισθητήρες, βασισμένοι σε νανοϋλικά, όπως νανοσωλήνες άνθρακα και νανοσωματίδια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ρύπων στον αέρα, το νερό και το έδαφος. Τα νανοϋλικά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την αποκατάσταση των ρύπων μέσω προσρόφησης, φωτοκατάλυσης και βιοαποκατάστασης.
- Ιατρικές Εφαρμογές: η πράσινη νανοτεχνολογία μπορεί να φέρει επανάσταση στη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών. Τα νανοϋλικά, όπως οι κβαντικές κουκκίδες, τα νανοσωματίδια χρυσού και οι νανοσωλήνες άνθρακα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για απεικόνιση, χορήγηση φαρμάκων και μηχανική ιστών. Αυτά τα νανοϋλικά έχουν μοναδικές οπτικές, ηλεκτρονικές και μηχανικές ιδιότητες που ενδείκνυται για ιατρικές εφαρμογές.
- Γεωργικές Εφαρμογές: η πράσινη νανοτεχνολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον πρακτικών γεωργίας. Τα νανοϋλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παροχή θρεπτικών ουσιών και φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες, μειώνοντας την ανάγκη για επιβλαβείς χημικές

ουσίες. Οι νανοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση παρασίτων και ασθενειών στις καλλιέργειες, επιτρέποντας στοχευμένες και αποτελεσματικές θεραπείες. Τα νανοϋλικά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την αποκατάσταση του εδάφους και του νερού που έχουν μολυνθεί με γεωργικούς ρύπους.

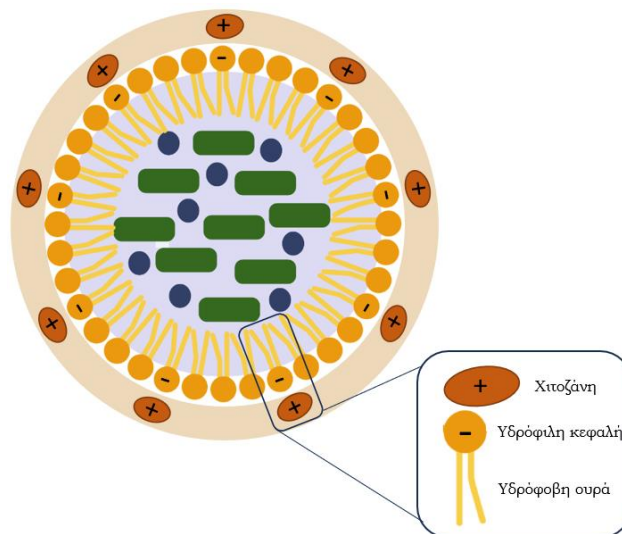
Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES) είναι ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα πράσινου διαλύτη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση και εφαρμογή νανοϋλικών. Οι ιδιότητες καθιστούν τα DES μια κατάλληλη εναλλακτική λύση για τους παραδοσιακούς διαλύτες και στον τομέα της νανοτεχνολογίας. Η χρήση των DES στην πράσινη νανοτεχνολογία έχει διερευνηθεί σε διάφορες εφαρμογές, όπως η σύνθεση νανοϋλικών, η νανοκατάλυση και η νανοαποκατάσταση. Ακολουθούν ορισμένα συγκεκριμένα παραδείγματα χρήσης τους:

- Σύνθεση Νανοϋλικών: τα DES έχουν χρησιμοποιηθεί ως πράσινοι διαλύτες για τη σύνθεση διαφόρων νανοϋλικών, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλικών νανοσωματιδίων, των νανοσωλήνων άνθρακα και των κβαντικών κουκκίδων. Το DES μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο ως αναγωγικοί παράγοντες όσο και ως παράγοντες κάλυψης στη σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων. Για παράδειγμα, ένα DES που αποτελείται από χλωριούχο χολίνη και γαλακτικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως πράσινος διαλύτης για τη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με χαμηλή τοξικότητα και καλή σταθερότητα (Chauhan et al., 2020). Τα DES έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως διαλύτες για τη σύνθεση νανοσωλήνων άνθρακα υψηλής καθαρότητας και χαμηλής τοξικότητας (Nam et al., 2023). Οι κβαντικές κουκκίδες μπορούν επίσης να συντεθούν χρησιμοποιώντας το DES ως σύστημα πράσινου διαλύτη (Guo et al., 2020).
- Νανοκατάλυση: Τα DES έχουν χρησιμοποιηθεί ως πράσινοι διαλύτες για την παρασκευή και εφαρμογή νανοκαταλυτών. Οι νανοκαταλύτες χρησιμοποιούνται σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές, όπως τα πετροχημικά, τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα χημικά. Τα DES έχουν χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για την παρασκευή νανοσωματιδίων χρυσού που στηρίζονται σε διοξειδίο του τιτανίου, το οποίο εμφάνισε υψηλή καταλυτική δράση στην οξείδωση των αλκοολών (N. Das et al., 2021; Zuo et al., 2016). Τα DES έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για τη σύνθεση νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου, που εμφάνισαν υψηλή καταλυτική δράση στη μείωση των οργανικών βαφών (Inaloo et al., 2018).
- Νανοαποκατάσταση: Τα DES έχουν χρησιμοποιηθεί ως πράσινοι διαλύτες για την αποκατάσταση περιβαλλοντικών ρύπων αξιοποιώντας και άλλα νανοϋλικά. Τα νανοϋλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προσρόφηση, την αποδόμηση και τον μετασχηματισμό των ρύπων στον αέρα, το νερό και το έδαφος. Τα DES έχουν χρησιμοποιηθεί ως συστήματα πράσινου διαλύτη για την παρασκευή νανοσωλήνων άνθρακα για την προσρόφηση βαρέων μετάλλων στο νερό (Yang et al., 2019). Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως διαλύτες για την παρασκευή νανοσωματιδίων διοξειδίου του τιτανίου για τη φωτοκαταλυτική αποδόμηση οργανικών ρύπων στο νερό (Fanali et al., 2021).

1.5 Επικάλυψη νανοσωματιδίων με Χιτοζάνη

Η επιφανειακή επικάλυψη αποτελεί ίσως τη σημαντικότερη διαδικασία στην παραγωγή νανοσυστημάτων για βιοϊατρικές εφαρμογές, είναι δηλαδή η διαδικασία της επένδυσης/επικάλυψης του πυρήνα του νανοσωματιδίου με κάποιο βιοσυμβατό υλικό, αλλά αυτό δεν σημαίνει κατ'ανάγκη ότι το τελικό νανοσωματίδιο που θα προκύψει θα είναι βιοσυμβατό. Οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως επιφανειακή επικάλυψη «τυλίγονται» γύρω από τον πυρήνα του νανοσωματιδίου και δημιουργούν ένα επιπλέον στρώμα, που καθιστά το νανοσωματίδιο «αόρατο» από το ανοσοποιητικό σύστημα. Γενικώς, τα υλικά επιφανειακής επικάλυψης των νανοσωματιδίων προσφέρουν πολλαπλά πλεονεκτήματα όπως:

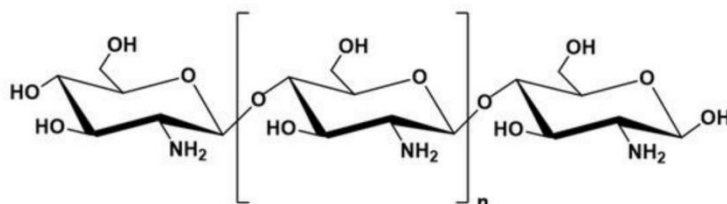
- Κολλοειδή σταθερότητα υπό φυσιολογικές συνθήκες
- Ενίσχυση της λειτουργικότητας
- Ιδιότητες αποφυγής οψωνοποίησης
- Αντίσταση στην φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα κύτταρα
- Μηχανική σταθερότητα
- Μεγάλους χρόνους ημίσειας ζωής
- Βιοαποικοδομησιμότητα
- Βιοσυμβατότητα
- Ενίσχυση αντοχής στην οξειδωση, όταν γίνεται λόγος για μαγνητικά σωματίδια



Εικόνα 14: Επικάλυψη νανοσωματιδίων με χιτοζάνη με τον μηχανισμό της επιφανειακής προσρόφησης λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων

Με την ανάπτυξη της Χημείας των Πολυμερών και της Συνθετικής Χημείας, τα τελευταία χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί πάρα πολλές ενώσεις ως υλικά επιφανειακής επικάλυψης. Οι πολυσακχαρίτες, δηλαδή μεγάλα μόρια υδατανθράκων αλυσιδωτής ή διακλαδωμένης μορφής (αποτελούμενα από πολλές ομάδες μονοσακχαριτών που ενώνονται μεταξύ τους με αντίδραση συμπύκνωσης), είναι εξαιρετικά βιοσυμβατοί και προσφέρουν πολλές δυνατότητες για την αποφυγή της φαγοκυττάρωσης, όμως είναι δομικά ασταθείς ενώσεις και μπορούν να διαλυθούν σε όξινα περιβάλλοντα (*Pharmaceutical Nanotechnology Costas Demetzos Fundamentals and Practical Applications, n.d.*).

Η χιτοζάνη είναι ένα βιοπολυμερές που προέρχεται από τη χιτίνη, ένα φυσικό πολυμερές που βρίσκεται στα κελύφη των καρκινοειδών όπως οι γαρίδες, τα καβούρια και οι αστακοί. Η χιτοζάνη παράγεται με την αποακετυλίωση της χιτίνης, μέσω της οποίας αφαιρούνται οι ομάδες ακετυλίου από τις πολυμερείς αλυσίδες. Αυτή η διαδικασία καταλήγει σε ένα θετικά φορτισμένο πολυμερές που έχει μια ποικιλία μοναδικών ιδιοτήτων και εφαρμογών.



Σχήμα 4: Χημική Δομή του πολυμερούς της Χιτοζάνης

Η χιτοζάνη εμφανίζει εξαρτώμενη από το pH διαλυτότητα. Είναι αδιάλυτη σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH, αλλά διαλύεται εύκολα σε όξινα διαλύματα, όπως υδροχλωρικό οξύ, οξικό οξύ ή κιτρικό οξύ. Η διαλυτότητα της χιτοζάνης σε όξινα μέσα οφείλεται στην πρωτονίωση των αμινομάδων της, η οποία δημιουργεί ένα θετικά φορτισμένο μόριο χιτοζάνης που μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα αρνητικά φορτισμένα μόρια οξέος. Αυτή η εξαρτώμενη από το pH διαλυτότητα της χιτοζάνης την καθιστά ιδανικό υλικό για διάφορες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της χορήγησης φαρμάκων, της επούλωσης πληγών και της μηχανικής ιστών. Το όξινο περιβάλλον στο στομάχι, για παράδειγμα, μπορεί να αξιοποιηθεί για την παροχή φαρμάκων ενθυλακωμένων σε νανοσωματίδια χιτοζάνης στο λεπτό έντερο, όπου το pH είναι ουδέτερο, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του φαρμάκου. Επιπλέον, η διαλυτότητα της χιτοζάνης σε όξινα διαλύματα επιτρέπει την εύκολη παρασκευή υλικών με βάση τη χιτοζάνη χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η ηλεκτροϊνοποίηση και η τρισδιάστατη εκτύπωση. Συνολικά, η εξαρτώμενη από το pH διαλυτότητα της χιτοζάνης είναι μια βασική ιδιότητα που έχει σημαντικές επιπτώσεις για τη χρήση της σε διάφορες εφαρμογές (Rinaudo, 2006).

Μία από τις βασικές ιδιότητες της χιτοζάνης είναι η βιοσυμβατότητά της, γεγονός που την καθιστά χρήσιμη για μια ποικιλία βιοϊατρικών εφαρμογών. Η χιτοζάνη είναι βιοδιασπώμενη και μη τοξική, για αυτό και είναι ελκυστική εναλλακτική λύση στα συνθετικά πολυμερή για τη χορήγηση φαρμάκων και τη μηχανική ιστών. Επιπλέον, η χιτοζάνη έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες, άρα είναι χρήσιμη για την επούλωση πληγών και την πρόληψη λοιμώξεων (Jafarnik et al., 2023).

Η χιτοζάνη είναι επίσης γνωστή για την ικανότητά της να σχηματίζει γέλες, μεμβράνες και επικαλύψεις, γεγονός που αξιοποιείται σε μια ποικιλία βιομηχανικών εφαρμογών. Για παράδειγμα, η χιτοζάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία συσκευασιών τροφίμων που είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον και έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες ή που συμβάλλουν στην παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων. Η χιτοζάνη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία συστημάτων καθαρισμού νερού, καθώς το πολυμερές μπορεί να συνδεθεί με βαρέα μέταλλα και άλλους ρύπους στο νερό, οδηγώντας στην εύκολη απομάκρυνσή τους.

Η χιτοζάνη έχει επίσης πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία καλλυντικών, ιδιαίτερα σε προϊόντα περιποίησης δέρματος. Έχει αποδειχθεί ότι έχει ποικίλα οφέλη για το δέρμα, συμπεριλαμβανομένων ενυδατικών, αντιφλεγμονωδών και επουλωτικών ιδιοτήτων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στη λειτουργία φραγμού του δέρματος, η οποία βοηθά στην προστασία του δέρματος από περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες και μπορεί να οδηγήσει σε μια πιο νεανική και υγιή εμφάνιση. Η χιτοζάνη έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε διάφορες συνθέσεις καλλυντικών, όπως κρέμες, λοσιόν και ορούς, για να ενισχύσει την αποτελεσματικότητά τους και να βελτιώσει την υφή τους. Συνολικά, η χιτοζάνη έχει μεγάλες δυνατότητες ως συστατικό σε καλλυντικά προϊόντα που στοχεύουν στη βελτίωση της υγείας και της εμφάνισης του δέρματος (Mohammed et al., 2017).

Τα τελευταία χρόνια, η χιτοζάνη έχει επίσης διερευνηθεί ως υλικό για χρήση στη νανοτεχνολογία. Τα νανοσωματίδια χιτοζάνης έχει αποδειχθεί ότι έχουν μια ποικιλία μοναδικών ιδιοτήτων, όπως μεγάλη επιφάνεια και βιοσυμβατότητα, που τα καθιστούν χρήσιμα για τη χορήγηση φαρμάκων, τη γονιδιακή θεραπεία και άλλες βιοϊατρικές εφαρμογές. Επιπλέον, τα νανοσωματίδια χιτοζάνης μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν με διάφορες λειτουργικές ομάδες, επιτρέποντας τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων και απεικόνιση.

Ένας πολλά υποσχόμενος τομέας έρευνας στη νανοτεχνολογία που βασίζεται στην χιτοζάνη είναι η ανάπτυξη θηρανοστικών νανοσωματιδίων, τα οποία είναι ικανά τόσο να παρέχουν κάποια φάρμακα όσο και να απεικονίζουν ιστούς. Για παράδειγμα, τα νανοσωματίδια χιτοζάνης που έχουν τροποποιηθεί με διάφορους παράγοντες απεικόνισης, όπως φθορίζουσες βαφές ή μαγνητικά νανοσωματίδια, επιτρέπουν την απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο της χορήγησης φαρμάκου και τη στόχευση ιστών. Επιπλέον, τα νανοσωματίδια χιτοζάνης μπορούν να λειτουργήσουν με διάφορα τμήματα στόχευσης, όπως αντισώματα ή πεπτίδια, για την επιλεκτική παροχή φαρμάκων σε συγκεκριμένους ιστούς ή κύτταρα (Jafarnik et al., 2023).

Συνολικά, η χιτοζάνη είναι ένα ευέλικτο βιοπολυμερές με ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών σε διάφορους τομείς όπως η ιατρική, η βιοτεχνολογία και η βιομηχανία. Οι μοναδικές του ιδιότητες και η βιοσυμβατότητά του κάνουν ιδιαίτερα ελκυστικό υλικό για ποικίλες βιοϊατρικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές. Επιπλέον, η χρήση της χιτοζάνης στη νανοτεχνολογία έχει ανοίξει νέους συναρπαστικούς δρόμους για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων και απεικόνιση.

1.6 Αναλυτικές μέθοδοι

1.6.1 Μέθοδοι για την ταυτοποίηση των ενώσεων

1.6.1.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της δομής και της δυναμικής των μορίων. Το NMR παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις χημικές και φυσικές ιδιότητες των μορίων αξιοποιώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των μαγνητικών πεδίων και των πυρήνων των ατόμων. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στην απορρόφηση και εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής

ακτινοβολίας στην περιοχή ραδιοσυχνοτήτων του φάσματος, η οποία χρησιμοποιείται για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τη χημική δομή του δείγματος.

Η βάση της φασματοσκοπίας NMR είναι το φαινόμενο του πυρηνικού σπιν, το οποίο προκύπτει από την παρουσία περιττού αριθμού πρωτονίων ή νετρονίων στον πυρήνα ενός ατόμου. Αυτοί οι πυρήνες έχουν μια εγγενή γωνιακή ορμή ή σπιν, η οποία μπορεί να προσανατολιστεί σε δύο πιθανές κατευθύνσεις σε σχέση με ένα μαγνητικό πεδίο: μπορεί να είναι είτε ευθυγραμμισμένη με το πεδίο ή με αντίθετη φορά από αυτό. Όταν ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο εφαρμόζεται σε ένα δείγμα που περιέχει τέτοιους πυρήνες, τα επίπεδα ενέργειας του πυρηνικού σπιν χωρίζονται στα δύο, με την κατάσταση υψηλότερης ενέργειας να έχει ελαφρώς υψηλότερη ενέργεια από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας. Η διαφορά στην ενέργεια μεταξύ των δύο καταστάσεων ονομάζεται διάσπαση Zeeman και είναι ανάλογη με την ισχύ του μαγνητικού πεδίου.

Κατά τη διάρκεια της φασματοσκοπίας NMR, ένα δείγμα τοποθετείται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο, που τυπικά κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες έως αρκετές χιλιάδες γκαους. Στη συνέχεια, εφαρμόζονται παλμοί ραδιοσυχνοτήτων στο δείγμα, αναγκάζοντας τους πυρήνες να απορροφούν ενέργεια και να μεταβαίνουν από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Μετά την απενεργοποίηση του παλμού, οι πυρήνες επιστρέφουν στην αρχική τους κατάσταση, απελευθερώνοντας την απορροφούμενη ενέργεια ως ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η συχνότητα της απορροφούμενης και εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι χαρακτηριστική για συγκεκριμένους πυρήνες του δείγματος και του χημικού περιβάλλοντος που τους περιβάλλει.

Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τα φάσματα NMR χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της μοριακής δομής, συμπεριλαμβανομένων των τύπων και του αριθμού των ατόμων που υπάρχουν στο μόριο, καθώς και της σύνδεσης και της χωρικής τους διάταξης. Μία από τις βασικές παραμέτρους στη φασματοσκοπία NMR είναι η χημική μετατόπιση (chemical shift), η οποία είναι η διαφορά στη συχνότητα συντονισμού μεταξύ ενός δεδομένου πυρήνα σε ένα μόριο και ενός προτύπου αναφοράς. Η χημική μετατόπιση εξαρτάται από την πυκνότητα των ηλεκτρονίων και το χημικό περιβάλλον που περιβάλλει τον πυρήνα, δίνοντας έτσι την δυνατότητα για αναγνώριση λειτουργικών ομάδων και άλλων δομικών χαρακτηριστικών.

Μια άλλη σημαντική παράμετρος στη φασματοσκοπία NMR είναι η σύζευξη, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ή περισσότερων πυρήνων σε ένα μόριο. Η σύζευξη μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την απόσταση και τη σύνδεση των ατόμων στο μόριο, καθώς και τις προτιμήσεις του μορίου όσον αφορά τη διαμόρφωσή του. Η σύζευξη μεταξύ πρωτονίων, για παράδειγμα, οδηγεί στη διάσπαση της κορυφής συντονισμού σε ένα πολλαπλάσιο αριθμό κορυφών, με τον αριθμό και το σχήμα των κορυφών να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό και τους τύπους των γειτονικών πρωτονίων.

Η φασματοσκοπία NMR είναι μια ευέλικτη τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ενός ευρέος φάσματος δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων μικρών μορίων, πολυμερών, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλούς τομείς

της χημείας, συμπεριλαμβανομένης της οργανικής χημείας, της βιοχημείας και της επιστήμης των υλικών, καθώς και σε πολλούς άλλους τομείς, όπως τα φαρμακευτικά προϊόντα, η επιστήμη των τροφίμων και η περιβαλλοντική ανάλυση (Kaliva & Vamvakaki, 2020; Mohamed et al., 2020)

Μερικές σημαντικές εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR περιλαμβάνουν:

- Προσδιορισμός της δομής μορίων: Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των δομών μικρών οργανικών μορίων, όπως φαρμακευτικές ουσίες, φυσικά προϊόντα και συνθετικές ενώσεις. Ο συνδυασμός πληροφοριών χημικής μετατόπισης και σύζευξης μπορεί να παρέχει μια πλήρη εικόνα της μοριακής δομής.
- Προσδιορισμός δομής πρωτεΐνης: Η φασματοσκοπία NMR είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της δομής και της δυναμικής των πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα. Με την ανάλυση των φασμάτων NMR διαφορετικών περιοχών μιας πρωτεΐνης, είναι δυνατό να προσδιοριστεί η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, καθώς και η δυναμική της διαμόρφωσης.
- Ποιοτικός έλεγχος φαρμακευτικών προϊόντων: Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται εκτενώς στη φαρμακευτική βιομηχανία για τη διασφάλιση της ποιότητας και της καθαρότητας των φαρμάκων. Το NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ακαθαρσιών σε δείγματα φαρμάκων, καθώς και για την επιβεβαίωση της ταυτότητας των δραστικών φαρμακευτικών συστατικών.
- Επιστήμη υλικών: Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται για τη μελέτη των ιδιοτήτων των υλικών, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης, της δομής και της δυναμικής τους. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τη μελέτη υλικών με πολύπλοκες δομές, όπως γυαλιά και πολυμερή.
- Μεταβολομική: Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται για τη μελέτη του μεταβολικού προφίλ βιολογικών δειγμάτων, όπως το αίμα και τα ούρα, προκειμένου να εντοπιστούν βιοδείκτες της νόσου και να παρακολουθηθούν οι επιπτώσεις των φαρμάκων και άλλων παρεμβάσεων (Elsayed et al., 2022).

Εκτός από την αναλυτική ισχύ της, η φασματοσκοπία NMR είναι επίσης μια μη καταστροφική τεχνική που απαιτεί μόνο μικρές ποσότητες δείγματος. Είναι επίσης σχετικά εύκολο στη χρήση, με πολλά εμπορικά όργανα διαθέσιμα για ανάλυση ρουτίνας.

1.6.1.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Φουριέ (FTIR)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρων μετασχηματισμού Fourier (FTIR) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση χημικών δειγμάτων. Η φασματοσκοπία FTIR παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο δόνησης των μορίων μετρώντας την απορρόφηση ή τη μετάδοση της υπέρυθρης ακτινοβολίας μέσω ενός δείγματος. Το προκύπτον φάσμα παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη χημική δομή και τις λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στο δείγμα.

Στη φασματοσκοπία FTIR, μια δέσμη υπέρυθρης ακτινοβολίας διέρχεται από ένα δείγμα και η ποσότητα της ακτινοβολίας που απορροφάται ή μεταδίδεται από το δείγμα μετράται ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Κάθε κορυφή στο φάσμα αντιστοιχεί σε έναν

συγκεκριμένο τρόπο δόνησης του μορίου. Η βάση της φασματοσκοπίας FTIR είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ της υπέρυθρης ακτινοβολίας και των μορίων στο δείγμα. Η υπέρυθρη ακτινοβολία απορροφάται από τα μόρια όταν η συχνότητα της ακτινοβολίας ταιριάζει με τη συχνότητα δόνησης του μορίου. Οι συχνότητες δόνησης ενός μορίου εξαρτώνται από τις μάζες των ατόμων στο μόριο και την ισχύ των χημικών δεσμών μεταξύ τους. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από ένα φάσμα FTIR χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των χημικών ειδών που υπάρχουν στο δείγμα, καθώς και για τον προσδιορισμό της χημικής δομής και των λειτουργικών ομάδων τους. Η φασματοσκοπία FTIR χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένης της χημείας, της βιολογίας, της ιατρικής και της επιστήμης των υλικών.

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας FTIR είναι η ευελιξία της. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ενός ευρέος φάσματος δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων στερεών, υγρών και αερίων, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση δειγμάτων σε διαφορετικές φυσικές καταστάσεις, όπως σκόνες, φιλμ και ίνες. Η φασματοσκοπία FTIR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των ιδιοτήτων πολύπλοκων μιγμάτων, όπως πολυμερών, πρωτεϊνών και βιολογικών ρευστών. Ένα άλλο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας FTIR είναι η ευαισθησία της. Είναι σε θέση να ανιχνεύει μικρές ποσότητες δείγματος, συνήθως στην περιοχή από μικρογραμμάρια έως χιλιοστόγραμμα. Η φασματοσκοπία FTIR είναι επίσης μια μη καταστροφική τεχνική που απαιτεί λίγη ή καθόλου προετοιμασία δείγματος, καθιστώντας την ένα πολύτιμο εργαλείο τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική ανάλυση.

Μία από τις βασικές εφαρμογές της φασματοσκοπίας FTIR είναι η αναγνώριση άγνωστων ενώσεων. Τα φάσματα FTIR είναι μοναδικά για κάθε ένωση, επιτρέποντας την ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων με βάση τα φασματικά χαρακτηριστικά τους. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην εγκληματολογική ανάλυση, όπου μπορεί να υπάρχουν άγνωστες ενώσεις σε ένα δείγμα, και στον ποιοτικό έλεγχο, όπου η καθαρότητα και η σύνθεση των δειγμάτων πρέπει να επαληθευτεί. Η φασματοσκοπία FTIR χρησιμοποιείται επίσης ευρέως στην ανάλυση πολυμερών και πλαστικών. Τα μοναδικά φασματικά χαρακτηριστικά διαφορετικών τύπων πολυμερών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό του πολυμερούς, καθώς και για την παρακολούθηση της ποιότητας και της καθαρότητας του πολυμερούς. Η φασματοσκοπία FTIR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των χημικών αντιδράσεων που εμπλέκονται στη σύνθεση και την αποικοδόμηση των πολυμερών, καθώς και για τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των υλικών που προκύπτουν (Albert, 2015; Edington et al., 2021; Veerasingam et al., 2021).

1.6.2 Χαρακτηρισμός νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων

1.6.2.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός, ή διαφορετικά φασματοσκοπία συσχέτισης ηλεκτρονίων, είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων, της κατανομής του μεγέθους (δείκτης πολυδιασποράς) και της σταθερότητάς τους. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη, απλή γρήγορη, επαναλήψιμη, και σχετικά οικονομική.

Προσδιορισμός μεγέθους και κατανομή μεγέθους:

Η δυναμική σκέδαση φωτός μπορεί να δώσει πληροφορίες για σωματίδια με διάμετρο από 5 μικρόμετρα έως μερικά νανόμετρα. Όσον αφορά τον προσδιορισμό του μεγέθους και της κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων, η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στον προσδιορισμό του συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων. Πιο αναλυτικά, μία μονοχρωματική ακτίνα λέιζερ, συγκεκριμένου μήκους κύματος, φωτοβολεί το δείγμα που βρίσκεται σε διασπορά μέσα στην κυψελίδα και τα διεσπαρμένα σωματίδια σκεδάζουν τμήμα της ακτινοβολίας αυτής. Όταν τα σωματίδια διασπείρονται σε ένα διάλυμα ακολουθούν την κίνηση Brown, εξαιτίας των θερμικά παρακείμενων συγκρούσεων μεταξύ των μορίων διαλύτη και των σωματιδίων. Η ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων εξαρτάται από το μέγεθός τους. Η κίνηση Brown των σωματιδίων έχει αποτέλεσμα την διακύμανση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα πειραματικά δεδομένα έντασης- χρόνου αξιοποιούνται με την με τη βοήθεια στατιστικών συναρτήσεων συσχέτισης. Υπάρχουν ποικίλες συναρτήσεις, ανάλογα με τη φύση του δείγματος, από τις οποίες υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης και τελικά με τη βοήθεια της εξίσωσης Stokes-Einstein υπολογίζεται η υδροδυναμική διάμετρος των διεσπαρμένων σωματιδίων (Joudeh & Linke, 2022).

$$\text{Εξίσωση Stokes-Einstein: } d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_T}$$

Όπου: k_B η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, η το ιξώδες του μέσου διασποράς, D_T συντελεστής διάχυσης.

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

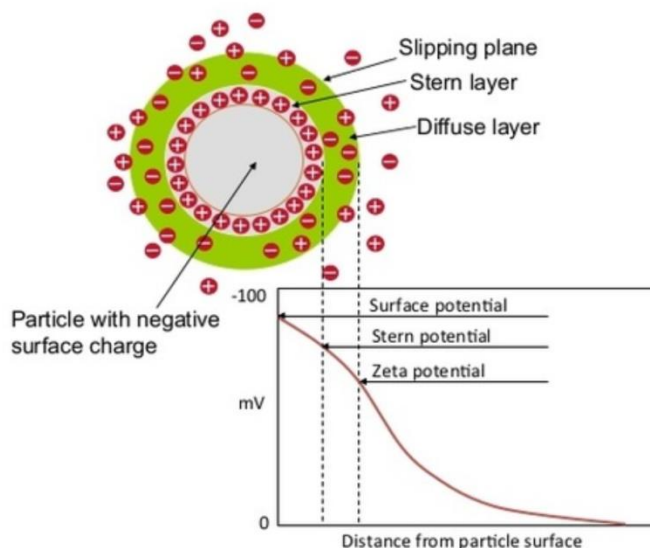
$$PDI = \left(\frac{\sigma}{D_h} \right)^2$$

Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) ορίζει το εύρος της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων. Στην πραγματικότητα, η τιμή του PDI μπορεί να κυμαίνεται από 0 έως 1, όπου τα κολλοειδή σωματίδια με PDI μικρότερα από 0.1 υποδηλώνουν μονοδισπαρμένα σωματίδια και οι τιμές μεγαλύτερες από 0.1 πολυδισπαρμένες κατανομές μεγέθους σωματιδίων. Ενώ τιμή του δείκτη πολυδιασποράς είναι αποδεκτή μέχρι και το 0.4 για νανοσωματίδια που προορίζονται για επιδερμική χρήση (Danaei et al., 2018; Raval et al., 2018).

Προσδιορισμός ζ-δυναμικού

Μέσα στο πλέγμα των καθαρών, κρυσταλλικών ιοντικών στερεών, τα θετικά και αρνητικά φορτία αντισταθμίζονται λόγω της ηλεκτρικής ουδετερότητας των καθαρών, μη ιοντισμένων ενώσεων. Στην επιφάνεια όμως ορισμένων φορτισμένων σωματιδίων ορισμένα φορτία παραμένουν χωρίς αντιστάθμιση και επομένως χάνεται η ηλεκτροουδετερότητα. Ως αποτέλεσμα, η επιφάνεια φορτίζεται. Το πρόσημο και το μέγεθος αυτού του φορτίου καθορίζονται από την πρόσληψη ιοντικών ειδών από τα διαλύματα και τις φυσικές ιδιότητες των διασπορών. Λαμβάνοντας υπόψη την πυκνότητα φορτίου γύρω από το φορτισμένο σωματίδιο, διακρίνονται δύο στρώματα, πρώτον το

στρώμα Stern, ακίνητο ως προς την επιφάνεια του σωματιδίου και αντίθετου φορτίου, και δεύτερον το κινητό διάχυτο στρώμα. Η διαφορά δυναμικού μεταξύ του εξωτερικού ορίου του στρώματος Stern και του χύμα διαλύματος αναφέρεται ως δυναμικό Stern. Το δυναμικό ζήτα (ζ) αντιστοιχεί στο ηλεκτροκινητικό δυναμικό που δημιουργείται στο επίπεδο ολίσθησης μεταξύ του Stern και των διάχυτων στρωμάτων και μπορεί να προσδιοριστεί έμμεσα με μια ποικιλία μεθόδων.



Εικόνα 15: Απεικόνιση των "στρωμάτων" των ιόντων γύρω από ένα νανοσωματίδιο

Όσον αφορά τον υπολογισμό του ζ-δυναμικού η αρχή λειτουργίας της μεθόδου DLS βασίζεται στην μέτρηση της κινητικότητας των σωματιδίων, παρουσία ηλεκτρικού πεδίου. Για την μέτρηση του ζ-δυναμικού χρησιμοποιούνται κατάλληλες κυψελίδες με ηλεκτρόδια. Πιο αναλυτικά, η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου αναγκάζει τα φορτισμένα σωματίδια να κινηθούν προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Η αυθόρμητη αυτή κίνηση των σωματιδίων δυσχεραίνεται από ιξώδεις δυνάμεις. Όταν οι δυνάμεις αυτές εξισορροπηθούν, τα σωματίδια κινούνται με σταθερή ταχύτητα. Η ταχύτητα των σωματιδίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο αναφέρεται και ως ηλεκτροφορητική κινητικότητα και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα μέσω της εξίσωσης Henry:

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

Όπου, u_E η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων, ε η διηλεκτρική σταθερά του μέσου διασποράς, z το z-δυναμικό των σωματιδίων, η το ιξώδες του μέσου διασποράς και η συνάρτηση $f(K_a)$ αποτελεί μία συνάρτηση η οποία παίρνει τιμή 1.5 για υδατικά διαλύματα και ονομάζεται προσέγγιση Smoluchowski και την τιμή 1 για μη πολικούς διαλύτες και αναφέρεται ως προσέγγιση Hückel (Carvalho et al., 2018).

Συγκέντρωση δείγματος:

Υψηλότερη συγκέντρωση νανοσωματιδίων έχει ως αποτέλεσμα την πολλαπλή σκέδαση φωτός διότι το διάσπαρτο φως από το ένα σωματίδιο αλληλεπιδρά με άλλα σωματίδια πριν

φθάσει στον ανιχνευτή και χάνει την έντασή του. Ως αποτέλεσμα το ληφθέν μέγεθος είναι μικρότερο. Η συσσωμάτωση συμβαίνει σε υψηλές συγκεντρώσεις εκτός αν χρησιμοποιούνται επιφανειοδραστικές ουσίες. Αντίθετα, η χρήση υπερβολικά αραιωμένων διαλυμάτων μπορεί να παράγει αρκετά διάσπαρτο φως για ανάλυση.

Επομένως είναι απαραίτητο να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση του δείγματος και να παραχθεί μία γενική κατευθυντήρια γραμμή για την ιδανική συγκέντρωση του δείγματος καθώς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με το όργανο (πχ όγκο σκέδασης, γωνία σκέδασης, ισχύ λέιζερ, ευαισθησία ανιχνευτή) και ιδιότητες υλικού (πχ μοριακό βάρος, συμπάγια σωματιδίων). Για παράδειγμα νανοσωματίδια είναι σφαιρικά και πιο συμπαγή διασκορπίζουν περισσότερο φως από λιγότερο συμπαγής δομές.

1.6.2.2 Ανάλυση Ανίχνευσης Σωματιδίων (NTA)

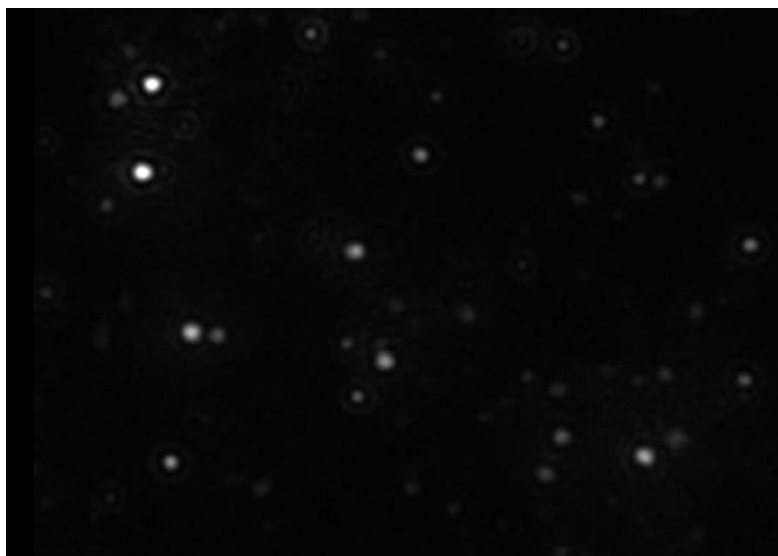
Η ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (NTA), η οποία κυκλοφόρησε για πρώτη φορά στο εμπόριο το 2006, είναι ένα καινοτόμο σύστημα για τον προσδιορισμό μεγέθους σωματιδίων από περίπου 30 έως 1.000 nm, με το κατώτερο όριο ανίχνευσης να εξαρτάται από τον δείκτη διάθλασης των νανοσωματιδίων. Αυτή η τεχνική συνδυάζει τη μικροσκοπία σκέδασης φωτός λέιζερ με μια κάμερα συζευγμένης φόρτισης (CCD), η οποία επιτρέπει την απεικόνιση και την καταγραφή των νανοσωματιδίων σε διάλυμα. Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων, ενδεικτικά, την ανίχνευση και παρακολούθηση κυστιδίων, εξωσωμάτων και ανδροτεϊνών. Η μέθοδος NTA χρησιμοποιεί την ίδια βασική αρχή με το DLS καθώς μετρά τις εξαρτώμενες από το χρόνο διακυμάνσεις μία ακτινοβολίας λέιζερ η οποία σκεδάζεται από σωματίδια που πραγματοποιούν κίνηση Brown, με στόχο να προσδιορίσει την υδροδυναμική τους ακτίνα. Εκεί που το NTA διαφέρει είναι το πώς ανιχνεύει το διάσπαρτο φως.

Το NTA χρησιμοποιεί μια δέσμη λέιζερ για να φωτίσει τα σωματίδια και το σκεδαζόμενο φως οπτικοποιείται εύκολα με ένα συμβατικό μικροσκόπιο εξοπλισμένο με αντικειμενικό φακό 20x. Η κίνηση των σωματιδίων, δηλαδή το σκεδαζόμενο φως, καταγράφεται στη συνέχεια με μια φωτοευαίσθητη συσκευή φορτισμένης σύζευξης (CCD) ή κάμερα CMOS, διατεταγμένη σε γωνία 90° ως προς το επίπεδο ακτινοβολίας. Η κάμερα λειτουργεί με 30 καρέ ανά δευτερόλεπτο (fps), καταγράφοντας ένα αρχείο βίντεο των σωματιδίων που κινούνται υπό την κίνηση Brown. Το λογισμικό παρακολουθεί πολλά σωματίδια ξεχωριστά και χρησιμοποιώντας την εξίσωση Stokes-Einstein υπολογίζει τις υδροδυναμικές τους διαμέτρους.

Καθώς μέσω της μεθόδου NTA καθίσταται δυνατή η παρακολούθηση μεμονωμένων σωματιδίων, μπορεί να υπολογιστεί και η συγκέντρωση των σωματιδίων σε ένα δείγμα. Ωστόσο, αυτό απαιτεί βαθμονόμηση με πρότυπα γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης. Το NTA αναφέρεται ότι μπορεί να ανιχνεύσει σε εύρος συγκεντρώσεων σωματιδίων 1E+06 έως 1E+09 mL⁻¹. Ωστόσο, αυτό εξαρτάται από τη διαμόρφωση του δείγματος και του συστήματος. Για δείγματα, όπου ο δείκτης διάθλασης (RI) του σωματιδίου είναι κοντά στο RI του ηλεκτρολύτη στον οποίο αιωρείται, η ανάλυση ανίχνευσης διακυβεύεται, με αποτέλεσμα περιορισμένο εύρος ανάλυσης και αναξιόπιστο προσδιορισμό συγκέντρωσης (Wright, 2012).

Μία από τις κύριες ανησυχίες για τη μέθοδο του DLS είναι η επίδραση που μπορεί να έχει στο αποτέλεσμα μια μικρή ποσότητα επιμολύνσεων ή μεγάλων σωματιδίων, όπως η σκόνη. Η τεχνική NTA βασίζεται στην παρακολούθηση μεμονωμένων σωματιδίων, ενώ το DLS μετρά έναν όγκο σωματιδίων χωρίς να υπάρχει η δυνατότητα αποκλεισμού τέτοιων μεγαλύτερων σωματιδίων που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα. Επομένως, η απόδοση του NTA αναμένεται να είναι λιγότερο ευαίσθητη από εκείνη του DLS στην παρουσία μικρών ποσοτήτων μεγαλύτερων σωματιδίων.

Το NTA περιλαμβάνει πολλά βήματα προσαρμογής του λογισμικού κατά τη λήψη και την ανάλυση του βίντεο, τα οποία είναι απαραίτητα για την απόκτηση ακριβέστερων αποτελεσμάτων μέτρησης. Η δυνατότητα επιλογής που δίνεται στον χειριστή μπορεί να θεωρηθεί μεγάλο πλεονέκτημα, αλλά επίσης εγείρει ανησυχίες. Ο χειριστής μπορεί εύκολα να επιλέξει ρυθμίσεις που αποκρύπτουν ή τονίζουν την παρουσία ορισμένων σωματιδίων. Αυτό το γεγονός καθιστά την ακρίβεια των αποτελεσμάτων να εξαρτώμενη από την ατομική κρίση και εμπειρία καθώς ο χρήστης μπορεί να προσαρμόζει την εστίαση και τη φωτεινότητα της εικόνας κατά την βιντεοσκόπηση. Για να ληφθούν ακριβή αποτελέσματα, θα πρέπει να αναζητείται διεξοδικά με το μικροσκόπιο η παρουσία όλων των κατηγοριών μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα, να βελτιστοποιούνται οι ρυθμίσεις του βίντεο για να καταγράφονται όλα αυτά τα προσδιορισμένα μεγέθη σωματιδίων και να προσαρμόζονται οι αναλυτικές ρυθμίσεις για την αμερόληπτη παρακολούθηση όλων των κινούμενων σωματιδίων που καταγράφονται από το βίντεο (Filipe et al., 2010).



Εικόνα 16: Εικόνα από κάμερα μικροσκοπίου που χρησιμοποιείται στη μέθοδο ανάλυσης NTA

1.6.3 Μέθοδοι αξιολόγησης των θερμικών ιδιοτήτων

1.6.3.1 Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (DSC)

Η θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC) είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική που μετρά τη διαφορά στη ροή θερμότητας μεταξύ ενός δείγματος και ενός υλικού αναφοράς ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ή του χρόνου. Το DSC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ενός ευρέος φάσματος θερμικών φαινομένων, συμπεριλαμβανομένης της τήξης και

της κρυστάλλωσης, θερμοκρασιών μετάπτωσης υάλου και κινητικής των χημικών αντιδράσεων.

Το DSC λειτουργεί θερμαίνοντας ένα δείγμα και ένα υλικό αναφοράς ταυτόχρονα και μετρώντας τη διαφορά στη ροή θερμότητας μεταξύ των δύο. Καθώς η θερμοκρασία του δείγματος αυξάνεται, η θερμοχωρητικότητα και η θερμική αγωγιμότητα του δείγματος και του υλικού αναφοράς θα διαφέρουν. Ως αποτέλεσμα, η ποσότητα θερμότητας που απαιτείται για να διατηρηθεί το δείγμα και το υλικό αναφοράς στην ίδια θερμοκρασία θα αλλάξει επίσης. Αυτές οι αλλαγές στη ροή θερμότητας μετρούνται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ή του χρόνου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απόκτηση μιας ποικιλίας θερμικών ιδιοτήτων του δείγματος.

Μία από τις πιο σημαντικές εφαρμογές του DSC είναι στη μελέτη των μεταπτώσεων φάσης. Για παράδειγμα, το DSC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του σημείου τήξης ενός υλικού μετρώντας την ενέργεια που απαιτείται για να ξεπεραστούν οι διαμοριακές δυνάμεις που συγκρατούν το στερεό μαζί. Ομοίως, το DSC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της θερμοκρασίας μετάπτωσης υάλου, η οποία είναι μια κρίσιμη παράμετρος για υλικά που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή και τα φαρμακευτικά προϊόντα. Το DSC μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της κινητικής των χημικών αντιδράσεων μετρώντας τη ροή θερμότητας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Αναλύοντας τα δεδομένα ροής θερμότητας ως συνάρτηση του χρόνου, είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ενέργειας ενεργοποίησης και της σταθεράς ταχύτητας της αντίδρασης (Leyva-Porras et al., 2020).

1.6.3.2 Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA)

Η Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA) είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της θερμικής σταθερότητας και της συμπεριφοράς αποσύνθεσης υλικών υπό ελεγχόμενες συνθήκες θέρμανσης. Αυτή η τεχνική έχει βρει πολλές εφαρμογές στην επιστήμη των υλικών, στα πολυμερή, στην κατάλυση και σε άλλους τομείς. Η μέθοδος TGA περιλαμβάνει τη μέτρηση της απώλειας ή της αύξησης του βάρους ενός δείγματος ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ή του χρόνου, ενώ αυτό υποβάλλεται σε ένα καθορισμένο πρόγραμμα μεταβολής της θερμοκρασίας. Το δείγμα τοποθετείται σε μια ειδική θήκη η οποία στη συνέχεια θερμαίνεται με ελεγχόμενο ρυθμό σε αδρανή ή ενεργή ατμόσφαιρα. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, το δείγμα υφίσταται διάφορα θερμικά φαινόμενα όπως τήξη, αποσύνθεση, εξάχνωση και εξάτμιση, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα απώλεια ή αύξηση βάρους. Η μεταβολή του βάρους μετριέται με μια εξαιρετικά ευαίσθητη ζυγαριά και τα δεδομένα καταγράφονται και αναλύονται.

Το TGA είναι μια ευέλικτη τεχνική που έχει βρει πολλές εφαρμογές σε διάφορους τομείς. Στην επιστήμη των υλικών, το TGA χρησιμοποιείται για τη μελέτη της θερμικής σταθερότητας και της συμπεριφοράς αποδόμησης υλικών όπως πολυμερή, σύνθετα υλικά, κεραμικά και μέταλλα. Στη βιομηχανία πολυμερών, το TGA χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της θερμικής σταθερότητας των πολυμερών, η οποία είναι κρίσιμη για την επεξεργασία και τις εφαρμογές τελικής χρήσης τους. Στη φαρμακευτική βιομηχανία, το TGA χρησιμοποιείται για τη μελέτη της θερμικής συμπεριφοράς φαρμάκων, εκδόχων και σκευασμάτων. Το

TGAαξιοποιείται επίσης στη μελέτη καταλυτικών αντιδράσεων, διεργασιών οξειδωσης και καύσης.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει αρκετές εξελίξεις στις τεχνικές οργάνων TGA και στον τρόπο με τον οποίο αναλύονται τα δεδομένα. Μία από τις βασικές εξελίξεις είναι η χρήση *micro* και *nano*-TGA, που επιτρέπει τη μέτρηση μεταβολών βάρους πολύ μικρών δειγμάτων. Μια άλλη πρόοδος είναι η χρήση συζευγμένων τεχνικών όπως το TGA-FTIR (Φασματοσκοπία Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier) και το TGA-MS (Φασματομετρία Μάζας), οι οποίες παρέχουν πληροφορίες για τα εκλυόμενα αέρια κατά τη διάρκεια θερμικών γεγονότων. Αυτές οι τεχνικές έχουν βρει πολλές εφαρμογές στη μελέτη πολυμερών, βιοϋλικών και νανοϋλικών (Loganathan et al., 2017; Saadatkhah et al., 2020).

1.6.4 Μέθοδος αξιολόγησης μορφολογίας – Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης (TEM)

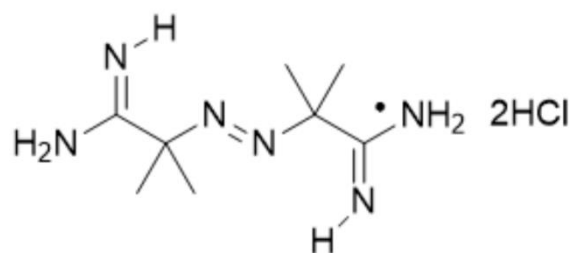
Η ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (TEM) είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιεί μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων για να εξετάσει τη δομή και τις ιδιότητες των υλικών σε νανοκλίμακα. Στο TEM, μια δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από ένα λεπτό στρώμα δείγματος και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ηλεκτρονίων και του δείγματος χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εικόνων και φασμάτων υψηλής ανάλυσης που αποκαλύπτουν λεπτομέρειες σχετικά με τη σύνθεση, τη κρυσταλλική δομή και τις ηλεκτρονικές ιδιότητες του υλικού.

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα του TEM είναι η ικανότητά του να επιτυγχάνει πολύ υψηλή χωρική ανάλυση, με τυπική ανάλυση 0,1nm. Αυτό το καθιστά απαραίτητο εργαλείο για τη μελέτη νανοϋλικών, όπου οι παραδοσιακές τεχνικές οπτικής μικροσκοπίας περιορίζονται από το όριο περίθλασης. Το TEM μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της εσωτερικής δομής βιολογικών δειγμάτων, όπως κύτταρα και ιστοί, και έχει γίνει ένα σημαντικό εργαλείο στον τομέα της δομικής βιολογίας.

Το TEM είναι σε θέση να παράγει μια ποικιλία λειτουργιών απεικόνισης, συμπεριλαμβανομένων φωτεινού πεδίου, σκοτεινού πεδίου και απεικόνισης υψηλής ανάλυσης. Στην απεικόνιση φωτεινού πεδίου, η εικόνα σχηματίζεται από τα ηλεκτρόνια που διέρχονται από το δείγμα χωρίς σκέδαση, ενώ στην απεικόνιση σκοτεινού πεδίου, η εικόνα σχηματίζεται από τα ηλεκτρόνια που διασκορπίζονται από το δείγμα. Η απεικόνιση υψηλής ανάλυσης μπορεί να αποκαλύψει λεπτομέρειες της κρυσταλλικής δομής, όπως τη θέση των μεμονωμένων ατόμων (De Jonge & Ross, 2011; Saka, n.d.).

1.6.5 Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης- AAPH

Η ένωση AAPH (2,2'- azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των χημικών μορίων. Ειδικότερα, η οξειδωση του λινολεϊκού οξέος που προκαλείται από την ένωση AAPH έχει αναπτυχθεί ως μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των ενώσεων που μελετώνται να παρεμποδίζουν αυτή την οξειδωση, με αποτέλεσμα να λαμβάνεται μια εικόνα σχετικά με το πόσο αποτελεσματικά μπορούν οι αντιοξειδωτικές ενώσεις να παρέχουν προστασία έναντι της οξειδωσης των λιπιδίων *in vitro*.



Σχήμα 5: Χημική Δομή του μορίου AAPH (2,2'- azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride)

Πιο συγκεκριμένα, το AAPH είναι μία ένωση η οποία επάγει την παραγωγή υπεροξειδίων διενίων, τα οποία αντιδρούν με το οξυγόνο και παράγουν άλλες ελεύθερες ρίζες οι οποίες προκαλούν την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος. Για να μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση μία ένωσης λοιπόν, αξιολογείται το ποσοστό κατά το οποίο μειώνει την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος από το AAPH στους 37°C. Η μετρήσεις πραγματοποιούνται με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου UV στα 234nm (Katorodi et al., 2021).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η χημική σύνθεση αντηλιακού φίλτρου ευρέως φάσματος και η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μίας πράσινης διεργασίας εγκλωβισμού του σε νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς (NLCs), επικαλυμμένους με διάλυμα χιτοζάνης και φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES).

Το αντηλιακό φίλτρο που συντέθηκε είναι ο εστέρας που προκύπτει από την αντίδραση του φερουλικού οξέος, παράγωγο του κινναμμωμικού οξέος, με την η-οκτανόλη. Ο σχεδιασμός του βασίστηκε στα ανάλογα του αντηλιακού φίλτρου OMC, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως σαν φίλτρο προστασίας κατά της UVB ακτινοβολίας. Η σύνθεση πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασης εστεροποίησης Steglich.

Τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλωβισμό του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου, είναι λιπιδικά σωματίδια δεύτερης γενιάς, δηλαδή αποτελούνται από ένα στερεό και ένα υγρό λιπίδιο. Στην παρούσα εργασία σαν στερεό λιπίδιο χρησιμοποιήθηκε η τριμυριστίνη, η οποία αποτελεί φυσικό προϊόν που απομονώνεται μέσω εκχύλισης από μοσχοκάρυδο. Δοκιμάστηκαν δύο υγρά λιπίδια, το ελαιόλαδο και το έλαιο αμυγδάλου, με στόχο την εύρεση του βέλτιστου για την δημιουργία των NLCs. Η επικάλυψη των NLCs πραγματοποιήθηκε με διάλυμα χιτοζάνης και NaDES, μέσω του μηχανισμού της επιφανειακής προσρόφησης λόγω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης. Επιλέχθηκε ο NaDES βεταΐνη και γαλακτικό οξύ σε γραμμομοριακή αναλογία (1:2) για το διάλυμα επικάλυψης.

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας του εγκλωβισμού πραγματοποιήθηκε μέσω πειραματικού σχεδιασμού Box Behnken δεκαπέντε πειραμάτων με χρήση του λογισμικού Design – Expert 12. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν ο χρόνος στον οποίο τα νανοσωματίδια υπόκεινται σε υπερήχους κατά τον σχηματισμό τους (sonication time), η περιεκτικότητα του διαλύματος επικάλυψης σε NaDES (% v/v NaDES Bet:LA (1:2)), και το ποσοστό φόρτισης του αντηλιακού φίλτρου σε σχέση με τη μάζα των λιπιδίων των νανοσωματιδίων (% w/w DL). Οι εξεταζόμενες αποκρίσεις (εξαρτημένες μεταβλητές) ήταν το μέγεθος των νανοσωματιδίων, καθώς και η απόδοση εγκλωβισμού σε αυτά. Εκτός όμως από τις εξαρτημένες μεταβλητές, για κάθε ένα από τα δεκαπέντε πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού αξιολογήθηκε και η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων ή δείκτης πολυδιασποράς (PDI), το επιφανειακό φορτίο (ζ – δυναμικό) και η απόδοση εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου.

Ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων νανοσυστημάτων ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους και το ζ – δυναμικό έλαβε χώρα μέσω της μεθόδου της Dynamic Light Scattering (DLS) και της μεθόδου Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), ενώ η απόδοση εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου προσδιορίστηκε είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο μέσω της φασματοσκοπίας ορατού – υπεριώδους (UV – Vis).

Έπειτα από τη βελτιστοποίηση της διεργασίας τα βέλτιστα νανοσυστήματα, στα οποία είχε εγκλωβιστεί το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο, μελετήθηκαν ως προς την αντηλιακή τους δράση μέσω της ενσωμάτωσής τους σε ήδη υπάρχον αντηλιακό σκευάσμα με στόχο την αξιολόγηση της αύξησης του παράγοντα SPF. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη *in vitro* της αποδέσμευσης του φίλτρου από τα νανοσωματίδια σε συνθήκες προσομοίωσης του ανθρωπίνου δέρματος, ενώ εξετάζεται *in vitro* και η ικανότητα της αποδεσμευμένης

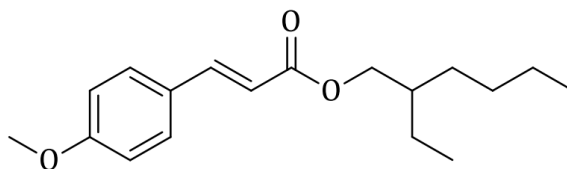
ένωσης να αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξείδωση που υποκινείται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH. Αξιολογήθηκαν, επίσης, οι θερμικές ιδιότητες των βέλτιστων νανοσωματιδίων, τα μορφολογικά και δομικά τους χαρακτηριστικά με τις μεθόδους TGA, TEM και AT/FT-IR αντίστοιχα. Μελετήθηκε η σταθερότητα των επικαλυμμένων και των μη επικαλυμμένων νανοδομημένων λιπιδικούς φορέων σε βάθος χρόνου.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο εγκλωβισμός δύο ακόμα χημικά συντιθέμενων εστέρων, παράγωγων του φερουλικού οξέος, που παρουσιάζουν πολύ καλή προστασία έναντι της UVA και της UVB ακτινοβολίας, με τις βέλτιστες συνθήκες. Οι διασπορές των νανοσωματιδίων, όπου είχαν εγκλωβιστεί τα συνθετικά αντηλιακά φίλτρα, αξιολογούνται ως προς τις φωτοπροστατευτικές τους ιδιότητες και εξετάζεται *in vitro* η αντιοξειδωτική δράση των απελευθερωμένων από τα νανοσωματίδια συνθετικών αντηλιακών φίλτρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

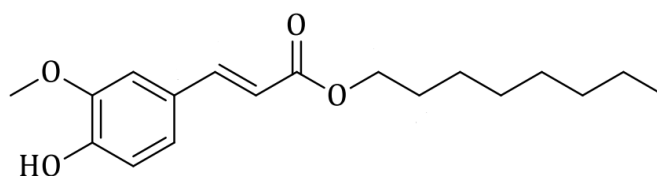
2.1 Σύνθεση αντηλιακών φίλτρων

Ο σχεδιασμός του αντηλιακού φίλτρου που συντέθηκε χημικά βασίστηκε στα ανάλογα του ευρέως εμπορικά χρησιμοποιούμενου φίλτρου OMC, το οποίο παρουσιάζει κατά κύριο λόγο προστασία κατά της UVB ακτινοβολίας (Σχήμα 6). Στόχος του σχεδιασμού αυτού, ήταν το αντηλιακό φίλτρο που θα συντεθεί να διατηρήσει την αντηλιακή δράση κατά της ακτινοβολίας UVB, αλλά ταυτόχρονα να αυξηθεί και η προστασία κατά την ακτινοβολίας UVA. Άρα, σκοπός ήταν η δημιουργία ενός αντηλιακού φίλτρου ευρέως φάσματος. Ταυτόχρονα, με την φωτοπροστατευτική δράση του μορίου, ήταν επιθυμητή και η ύπαρξη αντιοξειδωτικής δράσης. Με γνώμονα τα παραπάνω, το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο που συντέθηκε χημικά είναι ένας εστέρας του φερουλικού οξέος, καθώς έχει αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση. Η αλκοόλη, που επιλέχθηκε να αντιδράσει με το φερουλικό οξύ ώστε να προκύψει ο επιθυμητός εστέρας, είναι η n-οκτανόλη (Gilles et al., 2015; Lutjen et al., 2018).



Σχήμα 6: Δομή του αντηλιακού φίλτρου UVB, OctylMethoxyCinnamate (OMC)

Τελικά, στόχος ήταν η σύνθεση και ο εγκλωβισμός του 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικού (E)-οκτυλεστέρα (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρας, το αντηλιακό φίλτρο που συντέθηκε χημικά

2.1.1 Αντιδραστήρια για τη σύνθεση του αντηλιακού φίλτρου

Για την χημική σύνθεση του εστέρα χρειάστηκαν τρία στάδια: η αντίδραση προστασίας του υδροξυλίου του φερουλικού οξέος, η εστεροποίηση Steglich μεταξύ του προστατευμένου φερουλικού οξέος και της n-οκτανόλης και τέλος η αποπροστασία του υδροξυλίου και ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος. Για όλες τις παραπάνω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4:

Πίνακας 4: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για την σύνθεση του αντιηλιακού φίλτρου

Αντιδραστήριο	Χημικός τύπος	Προμηθευτής
Πυριδίνη	C_5H_5OH	SDS
Οξικός Ανυδρίτης	$C_4H_6O_3$	Merck
Φερούλικό οξύ	$C_{10}H_{10}O_4$	Fluka
Οκτανόλη	$C_8H_{18}O$	Fluka
Διχλωρομεθάνιο (DCM)	CH_2Cl_2	Fisher Scientific
Δικυκλο-εξυλο-καρβοδιμύδιο (DCC)	$C_{13}H_{22}N_2$	Fluka
Διμεθυλο-αμινο πυριδύνη (DMAP)	$C_7H_{10}N_2$	Aldrich
Τετραυδροφουράνιο (THF)	C_4H_8O	Fisher Scientific
Υδροχλωρίο (υδατικό διάλυμα 10%)	HCl	Riede-de Haen
Όξινο ανθρακικό νάτριο	$NaHCO_3$	Penta
Θεικό Νάτριο (άνυδρο)	Na_2SO_4	Penta
Διαιθυλαιθέρας	Et_2O	Fisher Scientific
Βορουδρίδιο του νατρίου	$NaBH_4$	Penta
Χλωριούχο Αμμώνιο (υδατικό)	NH_4Cl	Penta
Χλωριούχο Νάτριο (υδατικό)	$NaCl$	Penta

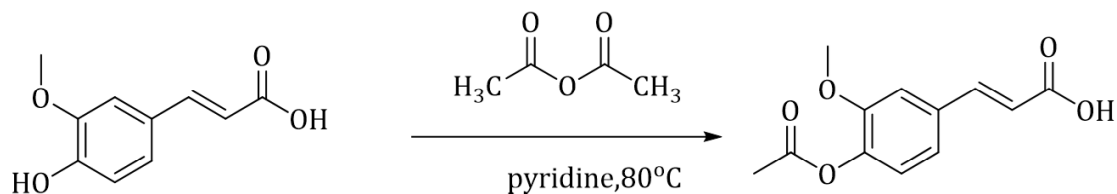
2.1.2 Μεθοδολογία σύνθεσης του αντιηλιακού φίλτρου

Για τη σύνθεση του εστέρα του φερούλικου οξέος με την n-οκτανόλη πραγματοποιήθηκε αρχικά η προστασία του υδροξυλίου του φερούλικου οξέος, στην συνέχεια η αντίδραση της εστεροποίησης Steglich, και τέλος η αποπροστασία του υδροξυλίου και ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος. Η εστεροποίηση Steglich χρησιμοποιήθηκε ως η βέλτιστη μέθοδος, λόγω των πολύ ήπιων πειραματικών της συνθηκών και του μη αντιστρεπτού της χαρακτήρα (Gilles et al., 2015; Jordan et al., 2021).

Σύνθεση της ένωσης (E)-3-(4-ακετοξυ-3-μεθοξυφαινυλ)ακρυλικό οξύ (**1a**), αντίδραση προστασίας:

Για την σύνθεση του ακετυλιωμένου φερούλικου οξέος (αντίδραση προστασίας), σε σφαιρική φιάλη διαλύονται 5.15 mmol (1g) trans-4-υδροξυ-3-μεθοξυ-κινναμωμικού οξέος (φερούλικού οξέος) σε 10.3 ml πυριδίνης και στην συνέχεια προστίθενται 10.3 mmol (970 μL) οξικού ανυδρίτη. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται για 24h στους 80°C με κάθετο ψυκτήρα και υπό αδρανείς συνθήκες αζώτου, ενώ η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα οξινίζεται υπό ψύξη, με αραιό υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου (HCl) 10%. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης (**1a**) παραλαμβάνεται με την μορφή λευκού χρώματος και χρησιμοποιείται στην επόμενη αντίδραση χωρίς διεργασία καθαρισμού.

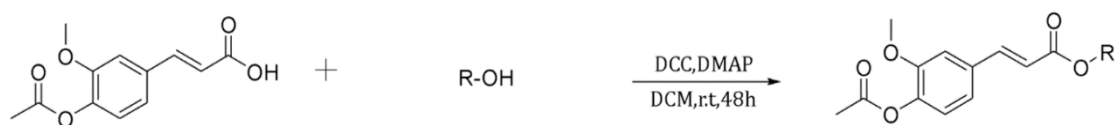
Απόδοση Αντίδρασης: **97%**



Σχήμα 8: Αντίδραση προστασίας του φερουλικού οξέος

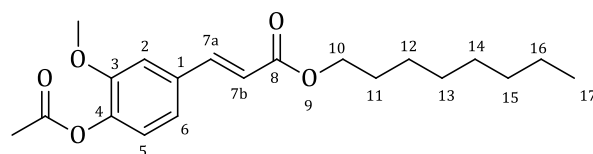
Γενική Μεθοδολογία A: Σύνθεση εστέρων φερουλικού οξέος μέσω της εστεροποίησης Steglich:

Για τη σύνθεση του εστέρα του φερουλικού οξέος μέσω αντίδρασης εστεροποίησης Steglich, σε σφαιρική φιάλη που περιέχει κατάλληλη ποσότητα διαλύτη ξηρού διχλωρομεθανίου (DCM), προστίθεται 1.1eq. του ακετυλιωμένου φερουλικού οξέος και 1eq. της επιθυμητής αλκοόλης. Στη συνέχεια, σε κωνική φιάλη σχηματίζεται διάλυμα που περιέχει ίδια ποσότητα διαλύτη ξηρού διχλωρομεθανίου (DCM), 1.2eq. N,N'-δικυκλοεξυλο καρβοδιιμιδίου (DCC) και καταλυτική ποσότητα διμεθυλ-αμινο-πυριδίνης (DMAP). Το διάλυμα αυτό προστίθεται στάγδην στη σφαιρική φιάλη και το τελικό μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 48h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό αδρανείς συνθήκες αζώτου. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία και υπό ψύξη για 24h, όπου παρατηρείται η καταβύθιση ενός ιζήματος, της δικυκλοεξυλουρίας, που αποτελεί ένα αδιάλυτο στο νερό και λευκού χρώματος παραπροϊόν της αντίδρασης. Το παραπροϊόν απομακρύνεται από το μίγμα μέσω διήθησης υπό κενό, και στη συνέχεια το διήθημα εκχυλίζεται δύο φορές με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl 10%) και μία φορά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO₃). Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο θειικό νάτριο (Na₂SO₄) και συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται σε μορφή στερεού λευκού χρώματος και λαμβάνει την επιθυμητή καθαρότητα μέσω χρωματογραφίας στήλης, σε σύστημα διαλυτών PE: EtOAc – 80 :20.



Σχήμα 9: Αντίδραση Steglich του προστατευμένου φερουλικού οξέος με αλκοόλη, (i) DCC, DMAP, ξηρό DCM, 48h και R'=octyl

Σύνθεση του 3-(4-ακετοξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρα (1b):



Η σύνθεση της ένωσης **1b** βασίζεται στη Γενική Μεθοδολογία A. Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει 13.8 ml ξηρού DCM προστίθενται 2.12 mmol (500 mg) του ακετυλο-φερουλικού οξέος **1a** και 1.9 mmol (0.30 ml) της n-οκτανόλης. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην διάλυμα που περιέχει 13.8 ml ξηρού DCM, 2.3 mmol (474.6 mg) DCC

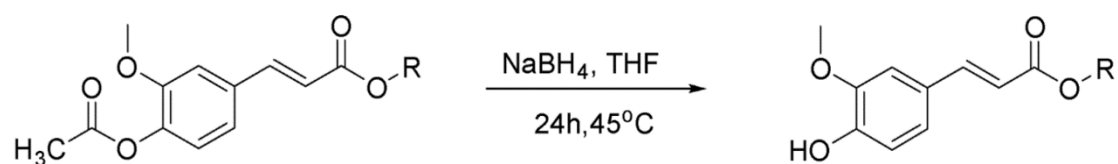
και 23 mg DMAP. Μετά το πέρας της αντίδρασης και της κατάλληλης επεξεργασίας του μίγματος, το τελικό προϊόν (**1b**) παραλαμβάνεται σε μορφή λευκού στερεού και σε υψηλή καθαρότητα.

Απόδοση αντίδρασης: **65%**. Σ.τ.: 85 – 88.9 °C

¹H-NMR (600MHz, CDCl₃-d₁) δ7.62 (d, J=16.2Hz, 1H, Ha), 7.10 (m, 2H, Ar-H), 7.04 (d, J=7.8Hz, 1H, Ar-H), 6.37 (d, J=15.6Hz, 1H, Hb), 4.19 (t, J=6.6Hz, 2H, H-10), 3.85 (s, 3H, -OCH₃), 2.31 (s, 3H, Ar-OCO-CH₃), 1.69 (quint, J=6.6Hz, 2H, H-11), 1.39 (quint, J=6.6Hz, 2H, H-12), 1.30 (m, 8H, H-13/H-14/H-15/H-16), 0.87 (t, J=6.6Hz, 3H, H-17)

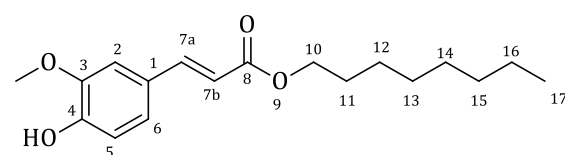
Γενική Μεθοδολογία Β: Σύνθεση αποπροστατευμένων εστέρων φερουλικού οξέος

Για την σύνθεση των αποπροστατευμένων εστέρων του φερουλικού οξέος, σε σφαιρική φιάλη που περιέχει κατάλληλη ποσότητα διαλύτη τετραϋδροφουρανίου (THF), προστίθεται αρχικά 1eq. του ακετυλοξυ-εστέρα και στη συνέχεια 5.4eq. βοροϋδριδίου του νατρίου (NaBH₄) για κάθε ακετυλοξυ-ομάδα που πρόκειται να απομακρυνθεί. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24h στους 45°C με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα και υπό αδρανείς συνθήκες αζώτου, ενώ η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας TLC. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθεται σε αυτό μικρή ποσότητα κορεσμένου υδατικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH₄Cl). Στη συνέχεια, το μίγμα εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα, όπου συλλέγεται η οργανική φάση, η οποία ακολούθως εκχυλίζεται δύο φορές με το υδατικό διάλυμα NH₄Cl και δύο φορές με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl). Η οργανική φάση τελικά ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο (Na₂SO₄) και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση, δίνοντας ένα ελαιώδες προϊόν υποκίτρινου χρώματος. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται στην επιθυμητή καθαρότητα και σε μορφή στερεού, ύστερα από καθαρισμό μέσω χρωματογραφικής στήλης σε σύστημα διαλυτών PE/EtOAc : 80/20.



Σχήμα 10: Αντίδραση αποπροστασίας των εστέρων του φερουλικού οξέος, (i) NaBH₄, THF, 24h, 450°C και R=octyl

Σύνθεση του 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρας (**1c**):



Η σύνθεση της ένωσης **1c** βασίζεται στη Γενική Μεθοδολογία Β. Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει 1.54 ml THF προστίθενται 0.3 mmol (107 mg) του ακετυλοξυ-εστέρα **1b** και στη συνέχεια 1.6 mmol (62.7 mg) NaBH₄. Μετά το πέρας της αντίδρασης και της κατάλληλης επεξεργασίας του μίγματος, το

τελικό προϊόν (**1c**) παραλαμβάνεται σε μορφή στερεού λευκού χρώματος και σε υψηλή καθαρότητα.

Απόδοση αντίδρασης: 30%.

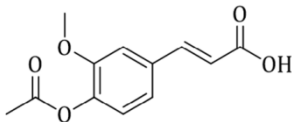
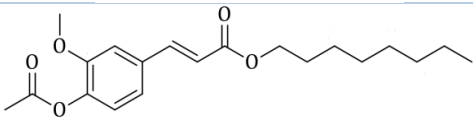
¹H-NMR (600MHz, CDCl₃-d₁) δ7.59 (d, *J*=15.6Hz, 1H, Ha), 7.06 (dd, *J*=8.4, 1.8Hz, 1H, H-6), 7.02 (d, *J*=1.8Hz, H-2), 6.90 (d, *J*=7.8Hz, 1H, H-5), 6.28 (d, *J*=15.6Hz, 1H, Hb), 5.90 (s, 1H, Ar-OH), 4.17 (t, *J*=7.2Hz, 2H, H-10), 3.91 (s, 3H, Ar-OCH₃), 1.68 (quint, *J*=7.2Hz, 2H, H-11), 1.38 (quint, *J*=6.6Hz, 2H, H-12), 1.29 (m, 8H, H-13/H-14/H-15/H-16), 0.87 (t, *J*=6.6Hz, 3H, H-17)

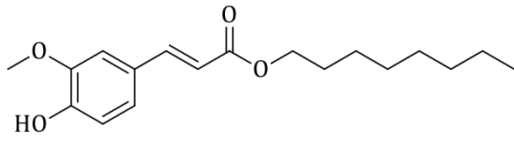
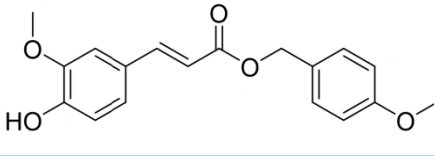
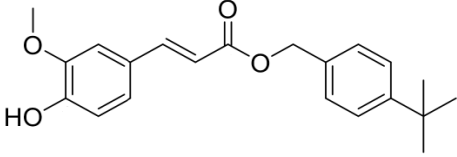


Εικόνα 17: Η ποσότητα του 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρα που συντέθηκε χημικά

Το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο που συντέθηκε με τις παραπάνω μεθοδολογίες, φίλτρο **1c**, στην συνέχεια εγκλωβίστηκε σε νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς με στοχο την βελτιστοποίηση της διεργασίας του εγκλωβισμού. Ακόμα, για τις ανάγκες της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε ο εγκλωβισμός και άλλων δύο συνθετικών αντηλιακών φίλτρων που συντέθηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Τα δύο νέα φίλτρα αποτελούν επίσης παράγωγα του φερουλικού οξέος. Αφετηρία για τη σύνθεση των δύο επιπλέον αντηλιακών φίλτρων που εγκλωβίστηκαν αποτέλεσε το μόριο **1a**, δηλαδή το προστατευμένο φερουλικό οξύ, και η σύνθεσή τους πραγματοποιήθηκε με βάση τις Γενικές Μεθοδολογίες Α και Β. Στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) παρουσιάζονται οι δομές και οι συμβολισμοί των συνθετικών ενώσεων, με τους οποίους θα αναφέρονται στη συνέχεια της διπλωματικής εργασίας.

Πίνακας 5: Συνθετικά μόρια και οι συμβολισμοί τους

Χημική Δομή	Ονομασία	Συμβολισμός
	(E)-3-(4-ακετοξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ	1a
	3-(4-ακετοξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρας	1b

	3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρας	1c
	4-μεθοξυβενζυλο (E)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο) ακρυλικός εστέρας	2c
	4-(tert-βουτυλο)βενζυλο (E)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο) ακρυλικός εστέρας	3c

Είναι διακριτό, από την χημική δομή, ότι το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο **2c** έχει προκύψει μέσω της αντίδρασης του ακετυλο-φερουλικού οξέος (**1a**) και της 4-μεθοξυ-βενζυλικής αλκοόλης και εν συνεχεία την αντίδραση αποπροστασίας του υδροξυλίου του φερουλικού οξέος. Αντίστοιχα, το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο **3c** έχει προκύψει μέσω της αντίδρασης του ακετυλο-φερουλικού οξέος (**1a**) και της 4-(τριτ.-βουτυλ)-βενζυλικής αλκοόλης και εν συνεχεία την αντίδραση αποπροστασίας του υδροξυλίου του φερουλικού οξέος.

2.2 Σύνθεση και επικάλυψη των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων

2.2.1 Αντιδραστήρια για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της παρασκευής και του χαρακτηρισμού των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με εγκλωβισμένο το αντηλιακό φίλτρο **1c** παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων

Αντιδραστήριο	Χημικός τύπος	Προμηθευτής
Μοσχοκάρυδο	-	-
Διαιθυλεθέρας	$(C_2H_5)_2O$	Fisher Scientific
Ακετόνη	C_3H_6O	Lachner
Ελαιόλαδο	-	-
Έλαιο αμυγδάλου	-	Zarbis
Αιθανόλη, 99.8%	C_2H_5OH	Sigma – Aldrich
Βεταΐνη (άνυδρη)	$C_5H_{11}NO_2$	Glentham Life Sciences
Φωσφατιδιλοχωλίνη (PC)	?	Sigma – Aldrich
Γαλακτικό οξύ, 80%	$C_3H_6O_3$	Labkem
Υπερκάθαρο νερό	C_2H_6OS	Fischer Scientific
Μεθανόλη	CH_4O	Carlo Ebra

Διχλωρομεθάνιο (DCM)	CH_2Cl_2	Fisher Scientific
Χιτοζάνη (χαμηλού μοριακού βάρους)	$(C_6H_{11}NO_4)_n$	Glentham Life Sciences
Polysorbate 80 (Tween 80)	$C_{64}H_{124}O_{26}$	Alfa Aesar
2,2' – αζωδισ – (2 – αμιδινοπροπάνο) – διϋδροχλωρίδιο (AAPH)	$C_8H_{20}Cl_2N_6$	Fluorochem

2.2.2 Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της παρασκευής και του χαρακτηρισμού των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με εγκλωβισμένο το αντηλιακό φίλτρο **1c** παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Χρησιμοποιούμενα όργανα για την παραγωγή και την αξιολόγηση των νανοσωματιδίων

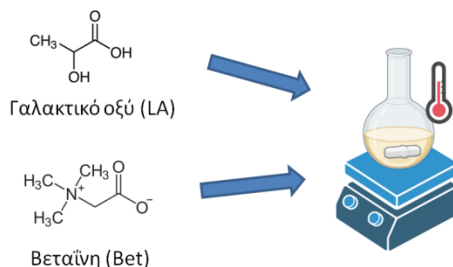
Όργανα-Συσκευές	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp	ZX4
Αντλία κενού	Edwards	RV-5
Ζυγός ακριβείας (έως 210 mg)	Kern	ADJ 200-4
Λουτρό υπερήχων	Branson	2210 Ultrasonic Bath
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη εστία	Witeg	MSH-20A
Περιστροφικός εξατμιστήρας	Buchi	Rotavapor® R-114
Φίλτρα	Branchia	Nonsterile Syringe Filters, Pore: 0.45 μ m & 0.22 μ m
Υπερφυγόκεντρος	ThermoScientific	Sorvall LYNX 6000 Super-speed Centrifuge
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Dynamic Light Scattering (DLS)	Malvern Panalytical	Zetasizer Nano ZS
Probe υπερήχων	Sonics and Materials Inc	Vibra cell
Incubator shaker	Gallenkamp	OTSHTD.EU1.C
Nanoparticle Tracking Analyzer	Malvern Panalytical	NanoSight NS300

2.2.3 Σύνθεση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη

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

- I. Προκείμενου να τηρείται η γραμμομοριακή αναλογία, ζυγίζονται 13.44 g υδατικού διαλύματος γαλακτικού οξέος (LA) 80% w/w (MB= 117.15) και 7 g άνυδρης βεταΐνης (Bet) (MB=90.08).

- II. Τα δύο αντιδραστήρια μεταφέρονται σε σφαιρική φιάλη των 100 ml. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση και θερμαινόμενη εστία.
- III. Αφήνεται υπό ήπια ανάδευση και θερμαίνεται στους 60°C για μία με δύο ώρες, έως ότου σχηματιστεί ένα ομοιογενές διάφανο ρευστό.



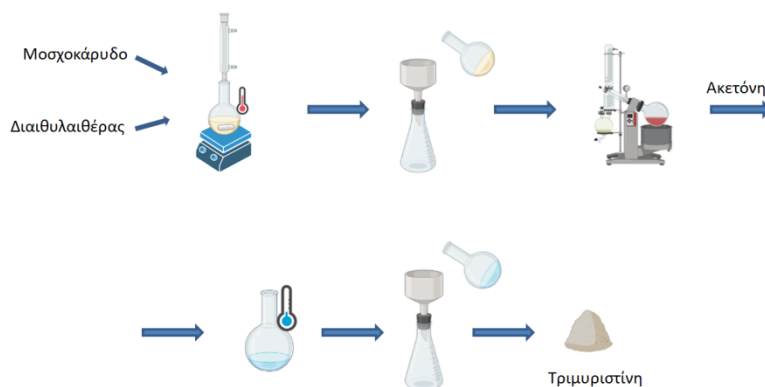
Εικόνα 18: Μέθοδος δημιουργίας του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη

2.2.4 Απομόνωση τριμυριστίνης από εμπορικό μοσχοκάρυδο

Η τριμυριστίνη αποτελεί το στερεό λιπίδιο που χρησιμοποιείται για την δημιουργία των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων στην παρούσα εργασία. Αποτελεί συστατικό του μοσχοκάρυδου για αυτό απομονώνεται μέσω εκχύλισης του.

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό της τριμυριστίνης ακολουθείται η εξής πειραματική διαδικασία:

- I. Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 20 g κονιοποιημένου μοσχοκάρυδου και 50-60 ml διαιθυλαιθέρα.
- II. Το μείγμα θερμαίνεται ήπια και υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο για χρονικό διάστημα μίας ώρας.
- III. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης ψύχεται, διηθείται συμβατικά και παραλαμβάνεται το διήθημα που περιέχει την τριμυριστίνη.
- IV. Το διήθημα προστίθεται σε σφαιρική φιάλη και οδηγείται προς εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό ελαττωμένη πίεση προκειμένου να απομακρυνθεί ο διαιθυλαιθέρας και να παραληφθεί η τριμυριστίνη, ακάθαρτη, ως στερεό.
- V. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί καθαρισμός της ακάθαρτης τριμυριστίνης, το στερεό περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης διαλύεται σε ακετόνη (1 ml ακετόνης για κάθε 50 mg ακάθαρτης τριμυριστίνης) υπό μαγνητική ανάδευση και στους 56°C.
- VI. Το θερμό διάλυμα που προκύπτει αφήνεται να κρυσώσει ώστε να πραγματοποιηθεί κρυστάλλωση της τριμυριστίνης, και στη συνέχεια διηθείται.
- VII. Τέλος, ακολουθεί μία ακόμα ανακρυστάλλωση του διηθήματος ώστε να ληφθεί τριμυριστίνη με μεγάλο βαθμό καθαρότητας.



Εικόνα 19: Πειραματική διαδικασία απομόνωση στερεού λιπιδίου από μοσχοκάρυδο

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Η θέρμανση στο στάδιο της εκχύλισης (Βήμα II) πρέπει να είναι ήπια λόγω του χαμηλού σημείου ζέσεως του διαθυλαιθέρα, καθώς σε περίπτωση έντονου βρασμού, οι ατμοί δεν θα υγροποιούταν επαρκώς στον ψυκτήρα της διάταξης.
- Κατά τον καθαρισμό της τριμυριστίνης με τη μέθοδο της ανακρυστάλλωσης (βήμα VI), το διάλυμα που έχει προκύψει διηθείται υπό κενό. Κατά τη διάρκεια της διήθησης, η σφαιρική ξεπλένεται δύο φορές με ακετόνη ώστε να ληφθεί όλη η ποσότητα την καθαρής τριμυριστίνης. Σε αυτό το σημείο, προτείνεται η ακετόνη που χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα να έχει τοποθετηθεί σε παγόλουτρο πριν την χρήση ώστε να έχει σχετικά χαμηλή θερμοκρασία. Σε διαφορετική περίπτωση, παρατηρείται η διάλυση της ποσότητας της τριμυριστίνης που έχει παραμείνει στη σφαιρική κατά την διήθηση και χάνεται σημαντική ποσότητα.

2.2.5 Σύνθεση των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων (NLCs)

2.2.5.1 Σύνθεση των νανοσωματιδίων

Το βασικό χαρακτηριστικών των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων, που τους ξεχωρίζει από άλλους λιπιδικούς φορείς, είναι η απαραίτητη χρήση τόσο στερεών όσο και υγρών λιπιδίων για τον σχηματισμό τους. Στην παρούσα εργασία, το στερεό λιπίδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι η τριμυριστίνη, ενώ αξιολογήθηκαν δύο υγρά λιπίδια, το ελαιόλαδο και το έλαιο αμυγδάλου. Σκοπός της δοκιμής δύο διαφορετικών υγρών λιπιδίων ήταν η παρατήρηση διαφορών στο μέγεθος και την απόδοση εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου αλλά και ο προσδιορισμός του βέλτιστου λιπιδίου για την πραγματοποίηση του πειραματικού σχεδιασμού μέσω του λογισμικού Design-Expert.

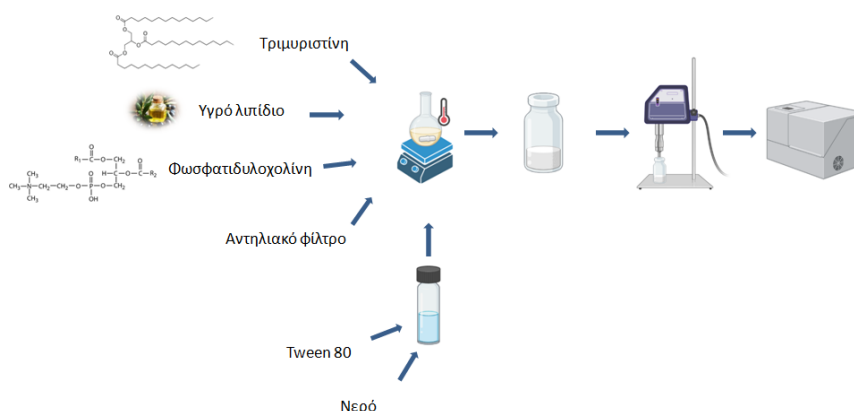
Η σύνθεση των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με εγκλωβισμένο το αντηλιακό φίλτρο, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη. Γενικά, η μέθοδος περιλαμβάνει την ανάμειξη μίας υδατικής και μία οργανικής φάσης με στόχο την δημιουργία γαλακτώματος. Στην συνέχεια, γίνεται χρήση υπερήχων στο γαλάκτωμα και τέλος ακολουθεί η εξάτμιση του διαλύτη.

Αρχικά, παρουσιάζεται η πειραματική η διαδικασία παρασκευής της υδατικής φάσης:

- I. Σε ένα vial 25 ml ζυγίζεται ποσότητα 100 mg του επιφανειοδραστικού παράγοντα Tween 80.
- II. Η ποσότητα του Tween 80 διαλύεται σε 10 ml υπερκάθαρου νερού.

Μετά την δημιουργία της υδατικής φάσης, παρασκευάζεται και η οργανική φάση και πραγματοποιείται η μέθοδος της γαλακτωματοποίησης άρα και ο τελικός σχηματισμός των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων. Η πειραματική μέθοδος που ακολουθείται είναι η εξής:

- I. Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml, προστίθεται ποσότητα 100 mg του στερεού λιπιδίου, δηλαδή της τριμυριστίνης.
- II. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση και θερμαινόμενη εστία, όπου και αφήνεται υπό έντονη ανάδευση και θέρμανση στους 70°C.
- III. Παράλληλα, σε ύαλο ωρολογίου ζυγίζεται ποσότητα 50 mg φωσφατιδυλοχολίνης.
- IV. Όταν η τριμυριστίνη έχει τηχθεί, προστίθεται η ποσότητα της προζυγισμένης φωσφατιδυλοχολίνης στη σφαιρική φιάλη και έπειτα προστίθεται ποσότητα αιθανόλης στάγδην μέχρι να τηχθεί και η φωσφατιδυλοχολίνη.
- V. Στη σφαιρική φιάλη προστίθεται 100 mg από το υγρό λιπίδιο και κατάλληλη ποσότητα του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου.
- VI. Τέλος, προστίθεται και η υδατική φάση που περιέχει το Tween 80.
- VII. Το διάλυμα αφήνεται στον μαγνητικό αναδευτήρα στην θερμαινόμενη εστία για μία ώρα.
- VIII. Ακολουθεί, υπερήχηση του διαλύματος με probe σε 30% Watt για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.
- IX. Ολονύκτια, παραμονή του γαλακτώματος σε επωαστήρα στους 25°C και 80 rpm.



Εικόνα 20: Πειραματική διαδικασία σύνθεσης των NLCs με εγκλωβισμένο αντηλιακό φίλτρο

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Πέρα από την ποσότητα του επιφανειοδραστικού, δεν αναφέρεται η ακριβής ποσότητα του προς εγκλεισμό αντηλιακού φίλτρου που προστίθεται. Αυτό συμβαίνει διότι σε κάθε πείραμα διαφέρει και υπολογίζεται με βάση τον

πειραματικό σχεδιασμό Box Behken, ο οποίος και θα αναλυθεί εκτενέστερα στην παράγραφο των αποτελεσμάτων.

- Το αντηλιακό φίλτρο που εγκλωβίζεται έχει την μορφή ενός ελαιώδους προϊόντος, γεγονός που καθιστά δύσκολο το χειρισμό και την ακριβή ζύγιση της ποσότητας που απαιτείται για κάθε πείραμα του πειραματικού σχεδιασμού. Για την διευκόλυνση των πειραμάτων λοιπόν, μέρος της ποσότητας του αντηλιακού φίλτρου που παράχθηκε διαλύθηκε σε μεθανόλη πολύ υψηλής καθαρότητας ώστε να υπάρχει ένα πυκνό stock γνωστής συγκέντρωσης. Οπότε, για κάθε πείραμα, λαμβάνονται ορισμένα ml από το stock διάλυμα, τα οποία αντιστοιχούν στην επιθυμητή ποσότητα του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου. Πιο συγκεκριμένα, 109.3 mg εστέρα του φερουλικού οξέος διαλύθηκαν σε 2.186 ml μεθανόλης ώστε το προκύπτον stock διάλυμα να έχει συγκέντρωση 50 mg/ml. Είναι σημαντικό, το stock διάλυμα να είναι αρκετά πυκνό ώστε να μην χρειάζεται να προστίθενται μεγάλοι όγκοι από αυτό στην υδατική φάση και να προκύψουν σφάλματα σε σχέση με την αναλογία της με την οργανική φάση κατά την δημιουργία του σχηματισμού των νανοσωματιδίων.
- Το υγρό λιπίδιο που αναφέρεται στο βήμα IV είναι είτε το ελαιόλαδο, είτε το έλαιο αμυγδάλου. Δοκιμάστηκαν και τα δύο υγρά λιπίδια και συγκρίθηκαν.
- Στα πρώτα στάδια της πειραματικής διαδικασίας το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης έχει διάφανο ή ελαφρώς υποκίτρινο χρώμα καθώς αποτελείται μόνο από την οργανική φάση. Όμως, στο βήμα που προστίθεται η υδατική φάση (βήμα VI) το διάλυμα θολώνει ακαριαία και αποκτά λευκό χρώμα, δηλαδή σχηματίζεται το γαλάκτωμα.
- Δεν αναφέρεται το ακριβές χρονικό διάστημα που το γαλάκτωμα υπόκεινται σε υπερήχους. Αυτό συμβαίνει διότι σε κάθε πείραμα διαφέρει και υπολογίζονται με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό Box Behken, ο οποίος και θα αναλυθεί εκτενέστερα στην παράγραφο των αποτελεσμάτων.
- Η ολονύκτια παραμονή του γαλακτώματος σε επωαστήρα στους 25°C έχει ως στόχο την εξάτμιση του διαλύτη, ενώ η ανακίνηση στα 80 rpm βοηθά ώστε να μην συσσωματώνονται τα νανοσωματίδια.
- Η χρησιμοποιούμενη δυναμικότητα του οργάνου κατά τη εφαρμογή υπερήχων με probe, καθώς και ο παρατεταμένος χρόνος χρήσης του, μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών τοπικά μέσα στο vial. Για αυτό το λόγο, το vial βυθίζεται σε παγόλουτρο κατά τη διάρκεια της εφαρμογής υπερήχων με probe.

Στην διάρκεια των πειραμάτων, χρειάστηκε να παρασκευαστούν και κενά (blank) δείγματα για σκοπούς σύγκρισης και για την διευκόλυνση της αξιολόγησης της αντηλιακής δράσης του συστήματος. Τα κενά (blank) νανοσωματίδια είναι αυτά τα νανοσωματίδια που δεν έχουν εγκλωβισμένη βιοδραστική ένωση, εν προκειμένω το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο. Για την παρασκευή τους ακολουθείται ακριβώς η ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για την παρασκευή των φορτισμένων με ένωση νανοσωματιδίων διαφέροντας μονάχα σε ένα σημείο. Πιο συγκεκριμένα, στα κενά δείγματα παραλείπεται η προσθήκη ποσότητας από το stock διάλυμα του αντηλιακού φίλτρου στην υδατική φάση.

2.2.5.2 Επικάλυψη των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων

Η επικάλυψη των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων πραγματοποιήθηκε με διάλυμα χιτοζάνης και NaDES, μέσω του μηχανισμού της επιφανειακής προσρόφησης λόγω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης. Ο μηχανισμός αυτός αξιοποιείται λόγω του διαφορετικού επιφανειακού φορτίου των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων σε σχέση με το φορτίο της χιτοζάνης. Ο NaDES που επιλέχθηκε και εξετάστηκε είναι ο Bet:LA σε γραμμομοριακή αναλογία (1:2). Η περιεκτικότητα της χιτοζάνης στο διάλυμα της επικάλυψης διατηρείται σταθερή σε όλα τα πειράματα και ίση με 0.3% w/v.

Για την δημιουργία του διαλύματος της επικάλυψης ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- I. Σε vial των 25 ml προστίθενται 20 ml υπερκάθαρου νερού.
- II. Προστίθενται κατάλληλη ποσότητα του NaDES.
- III. Προστίθενται 60 mg χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους.
- IV. Το διάλυμα αναδεύεται σε vortex μέχρι πλήρους διάλυσης της χιτοζάνης.
- V. Ακολουθεί φιλτράρισμα του διαλύματος χιτοζάνης με χρήση syringe filters πορώδους 0.45μm.



Εικόνα 21: Δημιουργία διαλύματος για την επικάλυψη των νανοσωματιδίων

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Το NaDES Bet:LA προσδίδει στο διάλυμα όξινο pH στο διάλυμα επικάλυψης, το οποίο είναι απαραίτητο για τη διαλυτοποίηση της χιτοζάνης.
- Δεν αναφέρεται το ακριβές ποσοστό % v/v της χιτοζάνης στο διάλυμα. Αυτό συμβαίνει διότι σε κάθε πείραμα διαφέρει και υπολογίζονται με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό Box Behken, ο οποίος και θα αναλυθεί εκτενέστερα στην παράγραφο των αποτελεσμάτων.
- Χρησιμοποιείται χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους ($\geq 90\%$), καθώς διαλύεται πιο εύκολα συγκριτικά με του υψηλότερου μοριακού βάρους.
- Απαιτείται το φιλτράρισμα του διαλύματος χιτοζάνης για την απομάκρυνση ακαθαρσιών, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος και την σταθερότητα των νανοσυστημάτων.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την επικάλυψη των νανοσωματιδίων είναι η εξής:

- I. Μετά την ολονύκτια παραμονή της διασποράς των νανοσωματιδίων στον επωαστήρα, το γαλάκτωμα οδηγείται για υπερφυγοκέντρωση στους 4°C, στα 4000 rpm για 20 λεπτά.

- II. Λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό και ογκομετράται.
- III. Μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και προστίθεται σε αυτό ο διπλάσιος όγκος διαλύματος επικάλυψης.
- IV. Ολονύκτια παραμονή της διασποράς σε επωαστήρα στους 25°C και 80 rpm.



Εικόνα 22: Πειραματική διαδικασία επικάλυψης των NLCs με διάλυμα χιτοζάνης και NaDES

Παρατηρήσεις/σχόλια:

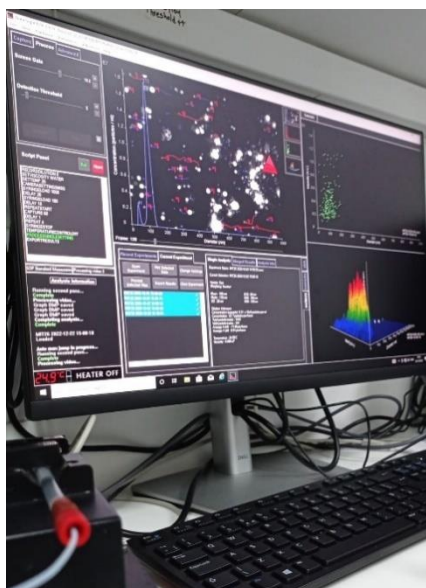
- Η υπερφυγοκέντρωση της αρχικής διασποράς πραγματοποιείται σε χαμηλές στροφές (4000 rpm). Αυτό σημαίνει ότι τα νανοσωματίδια λαμβάνονται με τη μορφή γαλακτώματος στο υπερκείμενο υγρό, ενώ το ίζημα που κατακάθεται είναι η περισσευούμενη ποσότητα των αντιδραστηρίων που δεν συμμετείχαν τελικά στο σχηματισμό, και κυρίως το στερεό λιπίδιο. Αν και συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό ώστε να πραγματοποιηθεί η επικάλυψη των νανοσωματιδίων, το ίζημα είναι εξίσου χρήσιμο και αποθηκεύεται καθώς μέσω αυτού πραγματοποιείται ο υπολογισμός απόδοσης εγκλεισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου με έμμεσο τρόπο.

2.3 Χαρακτηρισμός και αξιολόγηση των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων

2.3.1 Χαρακτηρισμός μεγέθους σωματιδίων με την μέθοδο Nanoparticle Tracking Analysis

Ένας από τους τρόπους που επιλέχθηκε να χαρακτηριστούν τόσο τα κενά (blank) νανοσωματίδια όσο και τα νανοσωματίδια στα οποία είχε εγκλειστεί το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο είναι η μέθοδος Nanoparticle Tracking Analysis με κύριο στόχο την αξιολόγηση του μεγέθους και της κατανομής του μεγέθους τους. Το μοντέλο του οργάνου που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται NanoSight NS300. Στην διάρκεια μίας μέτρησης κατά την συγκεκριμένη μέθοδο ένα αραιωμένο δείγμα νανοσωματιδίων διέρχεται από έναν ειδικό θάλαμο, ο οποίος διαπερνάται από μία δέσμη λέιζερ. Τα σωματίδια του δείγματος σκεδάζουν το φως και μέσω μία κάμερας γίνεται ορατή η κίνηση Brown την οποία πραγματοποιούν.

Η προετοιμασία των δειγμάτων για την παραπάνω ανάλυση περιλαμβάνει την υπερήχηση με probe του προς μελέτη δείγματος για 10min σε δυναμικότητα 30%. Στη συνέχεια, 5 ml από το δείγμα λαμβάνονται με πιπέτα και προστίθενται σε vial των 30ml, όπου και αραιώνεται με 15ml υπερκάθαρου νερού. Τέλος, το διάλυμα αναδεύεται σε αναδευτήρα τύπου vortex. Το αραιωμένο πλέον δείγμα λαμβάνεται με σύριγγα του 1ml και στη συνέχεια τοποθετείται στην ειδική αντλία ώστε να εξασφαλιστεί η σταθερή ροή του δείγματος μέσα στο θάλαμο ανάλυσης.



Εικόνα 23: Η εικόνα του λογισμικού κατά τη λήψη των μετρήσεων με τη μέθοδο NTA

Μέσω του λογισμικού του οργάνου λαμβάνονται μετρήσεις για το μέγεθος (από 10nm μέχρι 1000nm) του κάθε νανοσωματιδίου ξεχωριστά αλλά παρέχονται και πληροφορίες σχετικά με ολόκληρο τον πληθυσμό των νανοσωματιδίων, όπως η μέση υδροδυναμική διάμετρος και η τυπική της απόκλιση. Επιπλέον, παρέχονται πληροφορίες για την συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο δείγμα που μετράται κάθε φορά. Το λογισμικό πραγματοποιεί και επεξεργασία των παραπάνω μετρήσεων, προσφέροντας στο χρήστη διαγράμματα κατανομής του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε δύο και τρεις διαστάσεις. Ακόμα, αποθηκεύει στιγμιότυπα από την κάμερα κατά τη διέλευση των σωματιδίων από το θάλαμο σε μορφή εικόνων και δημιουργεί το διάγραμμα κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων που φαίνονται στο συγκεκριμένο στιγμιότυπο (Εικόνα 23). Τέλος,

καταγράφει σε video την διέλευση των σωματιδίων και το αποθηκεύει αυτόματα με τις υπόλοιπες μετρήσεις σε συγκεκριμένο αρχείο. Για κάθε δείγμα που διέρχεται από το θάλαμο ανάλυσης, το όργανο λαμβάνει πέντε με έξι διαφορετικές μετρήσεις και στιγμιότυπα και κατασκευάζει ένα διάγραμμα κατανομής του μεγέθους.

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Η μεγάλη αραιώση του δείγματος της διασποράς των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων έχει ως στόχο την μεγαλύτερη ομοιομορφία της διασποράς, η οποία οδηγεί και σε πιο ακριβείς μετρήσεις. Κρίνεται ως απαραίτητη για να μην επέρχεται κορεσμός στην κάμερα του οργάνου κατά τη διέλευση των νανοσωματιδίων από το θάλαμο των μετρήσεων λόγω του αυξημένου φωτός που σκεδάζεται από τα νανοσωματίδια.
- Πριν την μέτρηση κάθε δείγματος πραγματοποιείται η έκπλυση του θαλάμου μετρήσεων με υπερκάρθαρο νερό μέχρι να μην φαίνεται κανένα σωματίδιο στην κάμερα του οργάνου. Ο αυτόματος ρυθμιστής της ροής του δείγματος εξασφαλίζει πολύ γρήγορη διέλευση του δείγματος από το θάλαμο πριν την έναρξη λήψης των μετρήσεων ώστε να είναι σίγουρο πως από την κάμερα φαίνεται μόνο το προς μέτρηση δείγμα.
- Προτείνεται η αραιώση των 5μl του δείγματος που θα αναλυθεί να γίνει μόλις λίγα λεπτά πριν την μέτρηση. Επιπλέον, προτείνεται η χρήση του ίδιου υπαρκάθαρου νερού για όλα τα δείγματα.
- Οι ρυθμίσεις του οργάνου κατά την μέτρηση των δειγμάτων της παρούσας εργασίας ήταν:

Πίνακας 8: Ρυθμίσεις οργάνου στη μέθοδο NTA

Capture Settings	
Laser Type	Green

Number of frames	1498
Temperature	25°C
Viscosity	(Water) 0.9cP
Syringe Pump Speed	100

- Οι μετρήσεις για το μέγεθος και την κατανομή του μεγέθους πραγματοποιούνται με βάση ένα SOP (Standard Operating Procedure), ώστε το όργανο να χρησιμοποιεί προκαθορισμένες παραμέτρους, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι οι μετρήσεις που αφορούν τον ίδιο τύπο δείγματος γίνονται με συνεπή τρόπο. Για τις απαραίτητες μετρήσεις των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων χρησιμοποιήθηκε το SOP που ονομάζεται “Standard Measurement”.
- Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος πραγματοποιήθηκε τόσο για τους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς που είχαν επικάλυψη χιτοζάνης όσο και για αυτούς που δεν είχαν, γεγονός που δείχνει πως η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί είτε για θετικά φορτισμένα σωματίδια είτε για αρνητικά φορτισμένα σωματίδια.

2.3.2 Χαρακτηρισμός μεγέθους, κατανομής και ζ-δυναμικού σωματιδίων με την μέθοδο Dynamic Light Scattering

Στην συνέχεια, επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί και ο χαρακτηρισμός των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός, η οποία παρέχει πληροφορίες τόσο για το μέγεθος των νανοσωματιδίων και τον δείκτη πολυδιασποράς (PDI) τους, όσο και για το επιφανειακό τους φορτίο (ζ-δυναμικό). Το όργανο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται ZetaSizer.

Η προετοιμασία για την συγκεκριμένη ανάλυση περιλαμβάνει την υπερήχηση με probe του προς μελέτη δείγματος για 10min σε δυναμικότητα 30%. Στη συνέχεια, 5μl από το δείγμα λαμβάνονται με πιπέτα και προστίθενται σε vial των 30ml, όπου και αραιώνεται με 15ml υπερκάρου νερού. Τέλος, το διάλυμα αναδεύεται σε αναδευτήρα τύπου vortex. Στη συνέχεια, το αραιωμένο δείγμα λαμβάνεται με σύριγγα του 1ml και μεταφέρεται σε ειδική κυψελίδα τύπου Disposable capillary cell (DTS1070) μέχρι την ένδειξη μέγιστης πλήρωσης της κυψελίδας.

Αφού η κυψελίδα τοποθετηθεί στο όργανο πραγματοποιούνται δύο διαφορετικές μετρήσεις του δείγματος με διαφορετικά SOP κάθε φορά. Τα αποτελέσματα της πρώτης μέτρησης αφορούν την υδροδυναμική διάμετρο και τον δείκτη πολυδιασποράς των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων, ενώ η δεύτερη μέτρηση αφορά το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων. Σε κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις πραγματοποιούνται πολλαπλά σκαναρίσματα του δείγματος σε διαφορετικό σημείο της κυψελίδας ώστε να υπάρχει εικόνα για την ομοιομορφία του δείγματος και να προκύψουν αποτελέσματα μετά από σύντομη στατιστική ανάλυση των διαφόρων μετρήσεων. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται και μεγαλύτερη ακρίβεια.

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Και σε αυτή την περίπτωση η μεγάλη αραιώση του δείγματος της διασποράς των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων έχει ως στόχο την μεγαλύτερη ομοιομορφία της διασποράς, η οποία οδηγεί και σε πιο ακριβείς μετρήσεις. Σε αυτή τη μέθοδο, η

μεγάλη συγκέντρωση σωματιδίων μπορεί να προκαλέσει την επαναλαμβανόμενη σκέδαση της ίδιας ακτίνας και έτσι να προκληθεί αλλοίωση των αποτελεσμάτων και τα νανοσωματίδια να παρουσιάζονται τελικά μεγαλύτερα από ότι είναι στην πραγματικότητα.

- Στην μέθοδο DLS, η χρήση υπερκάθαρου νερού είναι πολύ σημαντική διότι εκτός από το ρόλο του σαν διαλύτη, εξασφαλίζει και την ορθή μέτρηση του ζ-δυναμικού. Το γεγονός αυτό συμβαίνει λόγω της απουσίας ιόντων και συνεπώς λόγω της χαμηλής αγωγιμότητας του.
- Όσον αφορά τα SOP που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μέθοδο, απαιτούν την συμπλήρωση πληροφοριών όπως ο δείκτης διάθλασης και το pH του μέσου διασποράς (στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιείται σαν διαλύτης το νερό με $n=1.3333$ και $pH=7$). Το laser που εκπέμπεται από το όργανο του DLS είναι συγκεκριμένου μήκους κύματος (εν προκειμένω 633 nm).
- Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι η μέθοδος εκτός από την προετοιμασία του προς μέτρηση δείγματος απαιτεί και την προθέρμανση του οργάνου για περίπου 20-30 λεπτά πριν την πρώτη μέτρηση παρόλο που οι μετρήσεις των δειγμάτων πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2.3.3 Υπολογισμός αποδόσεων εγκλωβισμού

Μία επίσης σημαντική παράμετρος που κρίθηκε ότι πρέπει να αξιολογηθεί στη συγκεκριμένη διεργασία είναι η απόδοση εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου στους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς. Η επίγνωση του ποσοστού εγκλωβισμού της βιοδραστικής ένωσης είναι απαραίτητη για το στάδιο της βελτιστοποίησης της διεργασίας. Η απόδοση εγκλωβισμού (Encapsulation Efficiency, EE) του κάθε συνθετικού αντηλιακού φίλτρου στους παραγόμενους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς υπολογίζεται μέσω της σχέσης:

$$EE\% = \frac{\text{Μάζα ένωσης που εγκλωβίστηκε}}{\text{Αρχική μάζα ένωσης προς εγκλωβισμό}} * 100\%$$

Για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλωβισμού, χρειάστηκε να δημιουργηθεί μία μέθοδος ποσοτικοποίησης και των τριών συνθετικών αντηλιακών φίλτρων (εστέρες **1c**, **2c** και **3c**) που εγκλωβίστηκαν σε νανοφορείς στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των εστέρων του φερουλικού οξέος στα επιθυμητά δείγματα επίλεχθηκε η αναλυτική μέθοδος φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis spectroscopy). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης, και κατ' επέκταση της μάζας, των ενώσεων βασίζεται στην απορρόφηση που παρουσιάζει ένα δείγμα όταν ακτινοβολείται με φως συγκεκριμένου μήκους κύματος.

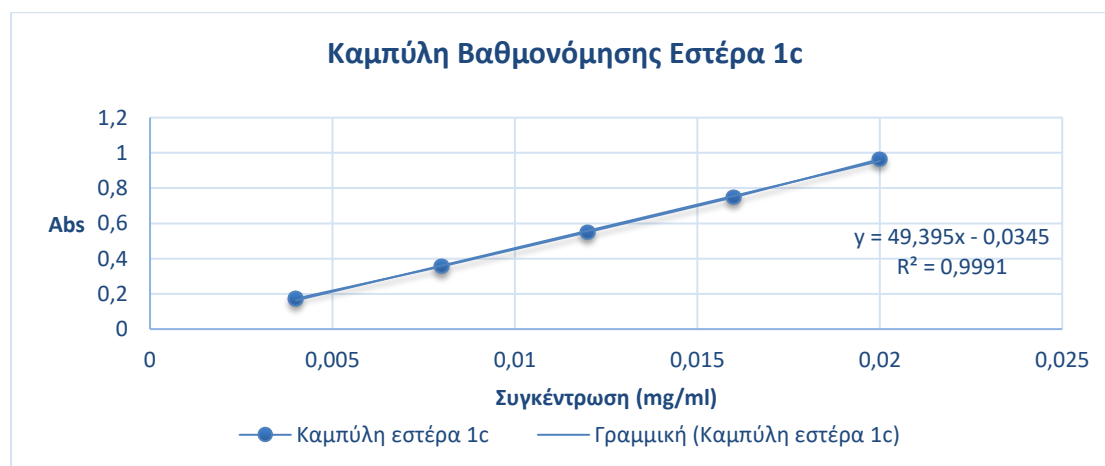
Για την διευκόλυνση των πειραμάτων προσδιορισμού της συγκέντρωσης των αντηλιακών φίλτρων, δημιουργήθηκε μία πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε μία από τις ενώσεις. Για την δημιουργία της καμπύλης, διαφορετικές ποσότητες του κάθε εστέρα διαλύθηκαν σε DCM ώστε να δημιουργηθούν πρότυπα διαλύματα με καθορισμένες συγκεντρώσεις. Στην συνέχεια, τα διαλύματα φωτομετρήθηκαν και καταγράφηκε η μέγιστη απορρόφηση. Με αυτό τον τρόπο, πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων με την απορρόφηση στο μήκος κύματος που απορροφά ο κάθε εστέρας.

Ακολουθεί πίνακας με τις απορροφήσεις (Abs) των παρασκευασμένων διαλυμάτων σε συνάρτηση με τις γνωστές συγκεντρώσεις (C) καθώς και η δημιουργία του αντίστοιχου διαγράμματος. Παρουσιάζονται και οι γραμμικές καμπύλες βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση όλων των δειγμάτων.

Για την ποσοτικοποίηση του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **1c**:

Πίνακας 9: Απορροφήσεις διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων του εστέρα **1c**

C(mg/ml)	Abs (325nm)
0.020	0.964058
0.016	0.748370
0.012	0.550914
0.0080	0.355138
0.0040	0.172781



Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης του εστέρα **1c**

Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων χαράζεται η βέλτιστη ευθεία στα πειραματικά δεδομένα, όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, η οποία παρουσιάζει συντελεστή γραμμικής συσχέτισης των δύο μεγεθών πολύ κοντά στη μονάδα ($R^2 = 0.9991$). Η εξίσωση της συσχέτισης της συγκέντρωσης των διαλυμάτων του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου με την απορρόφηση στα 325nm που εξάγεται είναι η εξής:

$$\text{Συγκέντρωση} = \frac{\text{Απορρόφηση} + 0,034}{49,39}$$

Με αντίστοιχο τρόπο δημιουργήθηκαν οι καμπύλες αναφοράς για την ποσοτικοποίηση των εστέρων **2c** και **3c** και εξάχθηκαν οι σχέσεις που συνδέουν την συγκέντρωσή τους σε ένα διάλυμα με την απορρόφηση στα 321nm. Οι καμπύλες βαθμονόμησης και οι εξισώσεις της συσχέτισης της συγκέντρωσης των διαλυμάτων του με την απορρόφηση παρατίθενται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.

Η απόδοση εγκλωβισμού των αντηλιακών φίλτρων που εγκλωβίζονται στους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς μπορεί να προσδιοριστεί τόσο με έμμεσο όσο και με άμεσο τρόπο. Και οι δύο μέθοδοι αναλύονται παρακάτω:

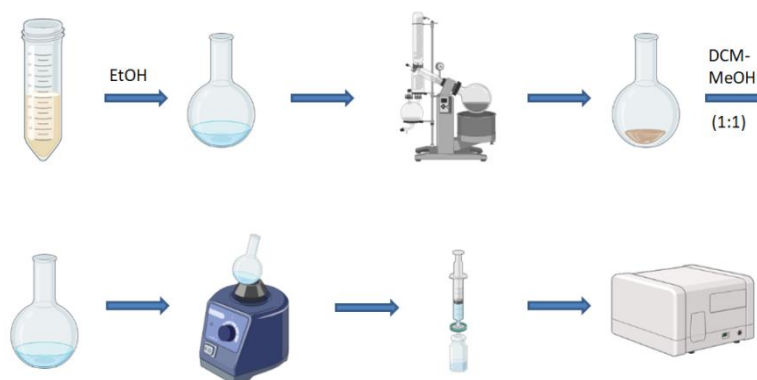
Υπολογισμός απόδοσης εγκλωβισμού με έμμεσο τρόπο:

Ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλωβισμού με έμμεσο τρόπο περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της μάζας του αντηλιακού φίλτρου που δεν έχει εγκλωβιστεί στους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς. Για τον προσδιορισμό της μάζας της ένωση που δεν εγκλωβίστηκε ακολουθείται η εξής πειραματική διαδικασία:

- I. Μετά την υπερφυγοκέντρηση της διασποράς των νανοσωματιδίων πριν επικαλυφθούν, το ίζημα που κατακάθεται είναι η περισσευούμενη ποσότητα των αντιδραστηρίων που δεν συμμετείχαν τελικά στο σχηματισμό της διασποράς, οπότε διαλύεται σε περίσσεια αιθανόλης υψηλής καθαρότητας και μεταφέρεται σε μία σφαιρική φιάλη των 50 ml.
- II. Ακολουθεί πλήρης εξάτμιση της αιθανόλης στον περιστροφικό αναδευτήρα rotary, υπό θέρμανση στους 40°C και υπό ελαττούμενη πίεση.
- III. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης επαναδιαλύεται σε 10 ml μείγματος διαλυτών διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη σε αναλογία 1:1. Το διάλυμα οδηγείται σε ανάδευση τύπου vortex μέχρι την πλήρη διάλυση των λιπιδίων και του εστέρα.
- IV. Το διάλυμα φιλτράρεται με χρήση φίλτρου Branchia 0.2 μm.
- V. Τέλος, το διάλυμα φωτομετράται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στο εύρος των 400-250 nm, και καταγράφεται η απορρόφηση του διαλύματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Τελικά, η απόδοση εγκλωβισμού υπολογίζεται από τον τύπο:

$$EE\% = \left(1 - \frac{\text{Μάζα ένωσης που δεν εγκλωβίστηκε}}{\text{Αρχική μάζα ένωσης προς εγκλωβισμό}} \right) * 100\%$$



Εικόνα 24: Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό της έμμεσης απόδοσης εγκλωβισμού

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος του ιζήματος είναι τριμυριστίνη η οποία δεν συμμετείχε στο σχηματισμό των νανοσωματιδίων καθώς κατά την δημιουργία

της διασποράς το στερεό λιπίδιο προστίθεται σε περίσσεια. Παρόλα αυτά σε όλα τα δείγματα εντοπίστηκε και ποσότητα του εστέρα που δεν είχε εγκλωβιστεί.

- Μετά την εξάτμιση της αιθανόλης, επιλέγεται μίγμα διαλυτών διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη για να επαναδιαλύσει το ίζημα ώστε να εξασφαλιστεί ότι θα διαλυθούν πλήρως και ο εστέρα αλλά και τα λιπίδια.
- Η μέγιστη απορρόφηση του διαλύματος αποτελεί τη μέγιστη απορρόφηση του εκάστοτε εστέρα που έχει επιλεγεί να ποσοτικοποιηθεί. Οπότε μέσω της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς που έχει παρουσιαστεί παραπάνω υπολογίζεται και η τελική ποσότητα σε mg του εστέρα που δεν έχει εγκλωβιστεί. Πρέπει να σημειωθεί, ότι το baseline κατά τη φωτομέτρηση πραγματοποιείται με το μίγμα διαλυτών διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη σε αναλογία 1:1.
- Κατά την φασματοφωτομετρία UV-Vis η απορρόφηση θα πρέπει να ξεπερνά την τιμή 1. Για αυτό και κάποια διαλύματα στα οποία υπήρχε μεγάλη ποσότητα εστέρα χρειάστηκαν επιπλέον αραιώση 1:2, η οποία φυσικά λαμβάνεται υπ' όψιν και στους τελικούς υπολογισμούς. Η συγκέντρωση του εστέρα που δεν εγκλωβίστηκε, όπως προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς του και την απορρόφηση του δείγματος του υπερκείμενου υγρού, μετατρέπεται σε μάζα μέσω του νόμου αραιώσης του Ostwald ($C_1V_1 = C_2V_2$).

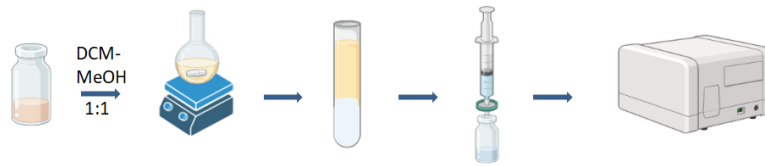
Υπολογισμός απόδοσης εγκλωβισμού με άμεσο τρόπο:

Ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλωβισμού με άμεσο τρόπο περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της μάζας του αντηλιακού φίλτρου που έχει εγκλωβιστεί στους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς. Σε αυτή την περίπτωση, η μέθοδος είναι καταστρεπτική. Δηλαδή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί η λύση των νανοσωματιδίων ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα του εστέρα που εγκλωβίζεται σε αυτά κάθε φορά. Για τον προσδιορισμό της μάζας της ένωση που εγκλωβίστηκε στους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς ακολουθείται η εξής πειραματική διαδικασία:

- I. Η επικαλυμμένη με διάλυμα CS-NaDES διασπορά των νανοσωματιδίων ογκομετράται και προστίθεται σε μία σφαιρική φιάλη των 50 ml.
- II. Στη σφαιρική φιάλη προστίθεται επίσης ο διπλάσιος όγκος μίγματος διαλυτών διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη σε αναλογία 1:1.
- III. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για περίπου 20 λεπτά και στη συνέχεια υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για μία ημέρα.
- IV. Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να δημιουργηθεί διφασικό μίγμα, όπου η κάτω φάση είναι διαυγής ενώ η πάνω φάση παρουσιάζει θολερότητα.
- V. Με σύριγγα του 1 ml λαμβάνεται με προσοχή η κάτω φάση και φιλτράρεται με χρήση φίλτρου Branchia 0.2 μm .
- VI. Πραγματοποιείται αραιώση 1:20 του δείγματος σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο.
- VI. Το αραιωμένο διάλυμα φωτομετράται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στο εύρος των 400-250nm, και καταγράφεται η απορρόφηση του διαλύματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Τελικά, η απόδοση εγκλωβισμού υπολογίζεται από τον τύπο:

$$EE\% = \left(\frac{\text{Μάζα ένωσης που εγκλείστηκε}}{\text{Αρχική μάζα ένωσης προς εγκλωβισμό}} \right) * 100\%$$



Εικόνα 25: Πειραματική διαδικασία υπολογισμού άμεσης απόδοσης εγκλωβισμού

Παρατηρήσεις/σχόλια:

- Επιλέγεται να πραγματοποιηθεί η λύση των νανοσωματιδίων με μίγμα διαλυτών διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη σε αναλογία 1:1, ώστε να εξασφαλιστεί ότι θα σπάσουν τα σωματίδια και θα διαλυθεί πλήρως ο εστέρας. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές υπολογισμού της απόδοσης με λύση των σωματιδίων μόνο με μεθανόλη. Ο προσδιορισμός όμως του εστέρα κατά τη φωτομέτρηση στην περίπτωση αυτή δεν ήταν δυνατός γιατί υπήρχε επικάλυψη της κορυφής απορρόφησης του εστέρα με την κορυφή απορρόφησης του NaDES.
- Για τον παραπάνω λόγο τελικά καταστρώθηκε η μεθοδολογία λύσης των νανοσωματιδίων με διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη και κατ'επέκταση η δημιουργία ενός διφασικού μίγματος στο οποίο το διχλωρομεθάνιο αποτελεί την κάτω φάση ενώ η πάνω φάση αποτελείται από μίγμα νερού-μεθανόλης. Στην κάτω φάση παραμένουν διαλυμένα τα λιπίδια και ο εστέρας, ενώ στην πάνω φάση παραμένει διαλυμένος ο NaDES. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει επικάλυψη των κορυφών.
- Σε αυτή την περίπτωση, το baseline κατά τη φωτομέτρηση γίνεται μόνο με διαλύτη διχλωρομεθάνιο, καθώς φωτομετράται μόνο η κάτω φάση. Η συγκέντρωση του εστέρα που εγκλωβίστηκε, όπως προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς του και την απορρόφηση του δείγματος του υπερκείμενου υγρού, μετατρέπεται σε μάζα μέσω του νόμου αραιώσης του Ostwald ($C_1V_1 = C_2V_2$). Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στους υπολογισμούς σε αυτό το σημείο. Μέσω της καμπύλης αναφοράς και λαμβάνοντας υπ' όψιν την αραιώση 1:20, υπολογίζεται η ποσότητα του εστέρα που είναι διαλυμένη στη κάτω φάση, δηλαδή στο διχλωρομεθάνιο. Αυτή η ποσότητα αντιστοιχεί και στην συνολική ποσότητα του εστέρα που υπήρχε αρχικά εγκλωβισμένη στα νανοσωματίδια, καθώς πραγματοποιήθηκε έλεγχος και αποδείχθηκε ότι όλη η ποσότητα του εστέρα διαλύεται στο διχλωρομεθάνιο.

2.4 Μελέτη της *in vitro* αποδέσμευσης των αντηλιακών φίλτρων

Η μελέτη της αποδέσμευσης των αντηλιακών φίλτρων είναι ένας ακόμα πολύ σημαντικός για την αξιολόγηση των νανοσυστημάτων. Η μαθηματική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης των αντηλιακών φίλτρων είναι εξίσου χρήσιμη για τον σχεδιασμό του τελικού προϊόντος. Για την πραγματοποίηση αυτού του στόχου επιλέχθηκε να

πραγματοποιηθεί η μεθοδολογία της μεμβράνης διαπίδυσης. Στην συγκεκριμένη μεθοδολογία, η διασπορά των νανοσωματιδίων, όπου είναι εγκλωβισμένο το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο, τοποθετείται στο εσωτερικό μίας μεμβράνης. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε κατάλληλα ρυθμισμένο υδατικό μέσο το οποίο προσομοιώνει τις συνθήκες του δέρματος. Δηλαδή, έχει pH ίσο με 5.5 και θερμοκρασία 32°C. Τέλος, παρακολουθείται η απελευθέρωση του αντηλιακού φίλτρου μέσω του προσδιορισμού της συγκέντρωσής του στο υδατικό μέσο.

Αρχικά, δημιουργείται το υδατικό μέσο, το οποίο προκύπτει από την ανάμειξη δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων, όπως περιγράφεται από την ακόλουθη πειραματική διαδικασία:

- I. 1.74 gr K_2HPO_4 διαλύονται σε 100 ml υπερκάθαρο νερό ώστε να δημιουργηθεί όξινο φωσφορικό διάλυμα συγκέντρωσης 0.98 M (Διάλυμα Δ₁).
- II. 2.07 gr KH_2PO_4 διαλύονται σε 150 ml υπερκάθαρο νερό ώστε να δημιουργηθεί δισόξινο φωσφορικό διάλυμα συγκέντρωσης 0.15 M (Διάλυμα Δ₂).
- III. Με πεχάμετρο ελέγχεται το pH του διαλύματος Δ₂.
- IV. Προστίθεται στάγδην όση ποσότητα από το διάλυμα Δ₁ απαιτείται ώστε το προκύπτον διάλυμα να έχει pH ίσο με 5.5 (Διάλυμα Δ₃).

Στη συνέχεια, στήνεται η απαιτούμενη διάταξη (Εικόνα 26) για την παρακολούθηση της απελευθέρωσης των αντηλιακών φίλτρων με τη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 26: Πειραματική διάταξης μελέτης της *in vitro* απελευθέρωσης των αντηλιακών φίλτρων σε υδατικό μέσο με τη χρήση μεμβράνης

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- I. 35 ml από το διάλυμα Δ₃ τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 50 ml.
- II. Το διάλυμα τοποθετείται σε θερμαινόμενη εστία στους 32°C με μαγνητική ανάδευση.
- III. Η προς μελέτη διασπορά των νανοσωματιδίων, όπου βρίσκεται εγκλωβισμένο το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο, τοποθετείται σε κατάλληλη μεμβράνη.
- IV. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται στο υδατικό μέσο.

- V. Ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνεται δείγμα 1 ml από το υδατικό μέσο όπου απελευθερώνεται το αντηλιακό φίλτρο και αντικαθίσταται από 1 ml του διαλύματος Δ₃.
- VI. Ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων σε συγκεκριμένα μήκη κύματος ώστε μέσω των καμπυλών αναφοράς να προσδιοριστεί η ποσότητα του αντηλιακού φίλτρου που έχει απελευθερωθεί σε κάθε χρονική στιγμή.

Η μαθηματική σχέση μέσω της οποίας προσδιορίζεται το ποσοστό απελευθέρωσης των αντηλιακών φίλτρων είναι:

$$Release = \left(\frac{Μάζα ένωσης που αποδεσμεύτηκε}{Αρχική μάζα εγκλωβισμένης ένωσης} \right) * 100\%$$

2.5 Αξιολόγηση αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης με AAPH

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των αντηλιακών φίλτρων που συντέθηκαν χημικά όσο και των αντηλιακών φίλτρων μετά την αποδέσμευση τους από τους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς, πραγματοποιείται μέσω της μελέτης της καταστολής της οξειδωσης του λινολεϊκού οξέος, η οποία επάγεται με υποκινητή το AAPH (2,2' – αζωδις – (2 – αμιδινοπροπάνο) – διϋδροχλωρίδιο).

Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων απαιτείται η δημιουργία έξι διαλυμάτων:

1. Διάλυμα NaOH: Συγκέντρωσης 1M
2. Borate Buffer: 309.2 mg βορικού οξέος προστίθενται σε 100 ml H₂O. Στη συνέχεια, προστίθεται 20 ml διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 1M μέχρι να διαλυθεί το βορικό οξύ. Το προκύπτον διάλυμα ογκομετράται και ρυθμίζεται με τη χρήση διαλυμάτων NaOH ή HCl ώστε να έχει τελικό pH=9. Συμπληρώνεται ποσότητα H₂O, μέχρι τελικού όγκου 200 ml. Άρα το συγκεκριμένο διάλυμα έχει συγκέντρωση 50mM σε βορικό οξύ και pH=9.
3. Phosphate buffer: Για τη δημιουργία αυτού του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα KH₂PO₄ συγκέντρωσης 0,0123M (διάλυμα Δ₅) και ένα διάλυμα K₂HPO₄ συγκέντρωσης 0.0377M (διάλυμα Δ₆). Αρχικά, 120ml από το Δ₅ και 120 ml από το Δ₆ αναμιγνύονται (τελικός όγκος 240ml). Το διάλυμα που προκύπτει ρυθμίζεται με διάλυμα NaOH ή διάλυμα HCl ώστε να έχει pH=5.5. Αφού πραγματοποιηθεί η ρύθμιση του pH, στο διάλυμα προστίθεται H₂O μέχρι τελικό όγκο 300 ml.
4. Διάλυμα του υποκινητή AAPH: 50 mg του υποκινητή AAPH (2,2' – αζωδις – (2 – αμιδινοπροπάνο) – διϋδροχλωρίδιο) προστίθενται σε 4.61 ml του phosphate buffer.
5. Τυφλό διάλυμα (Blank): Σε ένα vial των 30ml προστίθενται 2.5 ml υδατικού διαλύματος Tween 20 συγκέντρωσης 40mM. Στη συνέχεια προστίθεται 1.5 ml του διαλύματος NaOH και 21 ml από το Borate Buffer.
6. Διάλυμα Λινολεϊκού οξέος: Σε ένα vial των 30 ml προστίθενται 2.5 ml υδατικού διαλύματος Tween 20 συγκέντρωσης 40mM. Στο διάλυμα προστίθενται 125 μl λινολεϊκού οξέος υπό μαγνητική ανάδευση και παρατηρείται θόλωμα στο διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθεται 1.5 ml του διαλύματος NaOH ώστε να διαλυθεί το λινολεϊκό οξύ και 21 ml από το Borate Buffer.

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε σταθερό μήκος κύματος, 234 nm. Τόσο τα αντηλιακά φίλτρα που αξιολογήθηκαν αμέσως μετά την χημική τους σύνθεση, όσο και τα αντηλιακά φίλτρα που αξιολογήθηκαν μετά την μετά την απελευθέρωση τους από τα νανοσωματίδια, ήταν διαλυμένα σε διχλωρομεθάνιο (DCM) και η συγκέντρωση των δειγμάτων των αντηλιακών φίλτρων ήταν αυστηρά 10mM. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την λήψη των μετρήσεων παρουσιάζεται συνοπτικά παρακάτω:

I. Αρχικά, καταστρώνεται baseline, με στόχο την αφαίρεση των απορροφήσεων των διαφόρων χρησιμοποιούμενων buffer από τις επόμενες μετρήσεις. Έτσι, στην κυψελίδα του φασματόμετρου πλήρωσης 1.4 mL αναμιγνύονται :

- 1302 μ L από το phosphate buffer
- 14 μ L του διαλύτη στον οποίο θα βρίσκονται διαλυμένα τα αντηλιακά φίλτρα κατά τις μετρήσεις, δηλαδή σε DCM
- 14 μ L από το blank διάλυμα
- 70 μ L από το phosphate buffer

II. Έπειτα, μετράται η απορρόφηση του διαλύματος AAPH στα 234nm για χρόνο $t=0$ και $t = 1\text{min}$, ώστε να αφαιρεθεί από τις επόμενες μετρήσεις. Η κυψελίδα του οργάνου πληρώνεται με:

- 1302 μ L από το phosphate buffer
- 14 μ L DCM
- 14 μ L από το blank διάλυμα
- 70 μ L από το phosphate buffer

III. Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση του control δείγματος στα 234nm για χρόνο $t=0$ και $t=1\text{min}$, δηλαδή του δείγματος χωρίς την παρουσία πιθανού αντιοξειδωτικού. Η κυψελίδα του οργάνου πληρώνεται με:

- 1302 μ L από το phosphate buffer
- 14 μ L DCM
- 14 μ L από το διάλυμα λινολεϊκού οξέος
- 70 μ L από το phosphate buffer

IV. Τέλος, μετράται η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 234 nm για χρόνο $t = 0$ και $t = 1\text{min}$. Η κυψελίδα του οργάνου πληρώνεται με:

- 1302 μ L από το phosphate buffer
- 14 μ L του προς μελέτη δείγματος αντηλιακού φίλτρου συγκέντρωσης 10mM
- 14 μ L από το διάλυμα λινολεϊκού οξέος
- 70 μ L από το phosphate buffer

Τελικά, αφού έχουν λειφθεί οι μετρήσεις για το blank, το control και τα προς μελέτη δείγματα, το ποσοστό αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης για κάθε δείγμα υπολογίζεται από το τύπο:

$$\% \text{ Αναστολής} = \left(1 - \frac{\Delta A_{\text{αντηλιακού φίλτρου}}}{\Delta A_{\text{control}}} \right) * 100\%$$

Παρατηρήσεις/Σχόλια:

- Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών τοποθετείται πριν από κάθε μέτρηση σε επωαστήρα με ρυθμισμένη σταθερή θερμοκρασία στους 37°C, προκειμένου να παραμένει η θερμοκρασία του σταθερή στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος.
- Τα διαλύματα 4-6 θα πρέπει να δημιουργούνται το πολύ λίγες ώρες πριν τις μετρήσεις. Σε διαφορετική περίπτωση οι μετρήσεις δεν θεωρούνται αξιόπιστες.
- Θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στο διάλυμα 4 κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, καθώς το AAPH είναι φωτοευαίσθητο.

2.6 Μέτρηση του δείκτη αντηλιακής προστασίας SPF

Ο προσδιορισμός της φωτοπροστατευτικής ικανότητας των ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω μίας *in vitro* μελέτης στο φασματοφωτόμετρο SPF 290S Optometrics LLC, στις εγκαταστάσεις της εταιρείας Cellco Chemicals.

Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι να παρέχει μια *in vitro* μέτρηση του δείκτη SPF, προκειμένου να αξιολογηθεί η προστασία που παρέχεται από τα αντηλιακά σκευάσματα έναντι της UVB και UVA ακτινοβολίας. Η μέθοδος παρέχει *in vitro* αποτελέσματα, τα οποία φαίνονται να σχετίζονται ικανοποιητικά με τις επίσημες μεθόδους. Το τεστ βασίζεται στην αξιολόγηση της UV-διαπερατότητας μέσω ενός λεπτού υμενίου του αντηλιακού δείγματος, απλωμένου σε τραχύ υπόστρωμα, μετά την έκθεση σε ελεγχόμενη δόση UV ακτινοβολίας από καθορισμένη πηγή UV. Η *in vitro* μέθοδος πραγματοποιείται στο φασματοφωτόμετρο SPF-290S Optometrics LCC, που αποτελείται από 1) πηγή ακτινοβολίας, 2) σταθμό δειγματοληψίας, 3) μονοχρωμάτορα, 4) συλλέκτη ακτινοβολίας και 5) σύστημα ανίχνευσης. Το φασματοφωτόμετρο SPF 290S καλύπτει όλο το φάσμα UVB και UVA ακτινοβολίας, σαρώνοντας από τα 290 έως τα 400nm, συγκεντρώνοντας και αποθηκεύοντας δεδομένα με βήμα 1nm (Stanfield et al., 2010).

Το φασματοφωτόμετρο SPF-290S μετρά τη διαπερατότητα ενός δείγματος. Η διαπερατότητα ορίζεται ως ο λόγος της έντασης του φωτός που περνά μέσα από το δείγμα, προς την ένταση που προσκρούει σε αυτό, και εκφράζεται από τη σχέση:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν το ποσό της έντασης του φωτός που διαπερνά το δείγμα, μερικοί είναι περισσότερο ή λιγότερο σημαντικοί και εξαρτώνται, είτε από τα χαρακτηριστικά του δείγματος, είτε από τα χαρακτηριστικά του οργάνου. Οι τρεις παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η διαπερατότητα σε όλα τα δείγματα είναι: ο συντελεστής απορρόφησης, το πάχος ή το μήκος της διαδρομής και η συγκέντρωση του δείγματος. Τα κρίσιμα αυτά μεγέθη συνδέονται με τη σχέση των Lambert – Beer:

$$A = \varepsilon_{\lambda} J L$$

Όπου A είναι η απορρόφηση, ϵ_λ ο συντελεστής απορρόφησης, J η συγκέντρωση και L το μήκος της διαδρομής. Με την αντικατάσταση του A στη σχέση της διαπερατότητας, προκύπτει η σχέση που συνδέει την απορρόφηση με τη διαπερατότητα:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$

Και τελικά η διαπερατότητα μπορεί να εκφραστεί ως εξής:

$$T = \frac{1}{10^{\epsilon_\lambda J L}}$$

Προετοιμασία δειγμάτων:

Για την αξιολόγηση της φωτοπροστατευτικής δράσης των εστέρων σαν καθαρές ενώσεις μετά τη σύνθεσή τους, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 2.5% ως προς τον εκάστοτε εξεταζόμενο εστέρα στον κατάλληλο διαλύτη Dibutyl Adipate (Saboderm DBA). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει την ζυγισή σε γυάλινο σκεύος 25mg του εστέρα και την προσθήκη 975 mg του κατάλληλου διαλύτη.

Ακόμα, στόχος των μετρήσεων της παρούσας διπλωματικής ήταν να προσδιορίσει το ποσοστό της αύξησης του δείκτη SPF σε ένα ήδη υπάρχον αντηλιακό σκεύασμα μετά την προσθήκη των χημικά συνθετικών αντηλιακών φίλτρων που βρίσκονται εγκλωβισμένα στους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς. Το σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε μορφή λεπτόρευστης κρέμας και είχε αρχικά δείκτη SPF 15. Τα εμπορικά αντηλιακά που προϋπήρχαν στο σκεύασμα και οι αντίστοιχες περιεκτικότητές τους είναι:

Πίνακας 10: Αντηλιακά φίλτρα που προϋπάρχουν στο αντηλιακό σκεύασμα και η αντίστοιχη περιεκτικότητά τους

Αντηλιακό Φίλτρο	Περιεκτικότητα (% w/w)
Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate	4
Ethylhexyl Salicylate	5
Ethylhexyl Triazone	1.5
Octocrylene	3
Tris-Biphenyl Triazine	2

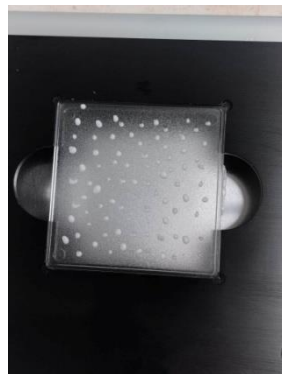
Για την μελέτη κάθε δείγματος, σε 5 gr εμπορικού αντηλιακού σκευάσματος προστέθηκε 500 μL από τη διασπορά του κάθε δείγματος:



Εικόνα 27: Εμπορικό αντηλιακό σκεύασμα με ενσωματωμένη τη διασπορά των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων όπου έχουν εγκλωβιστεί τα αντηλιακά φίλτρα

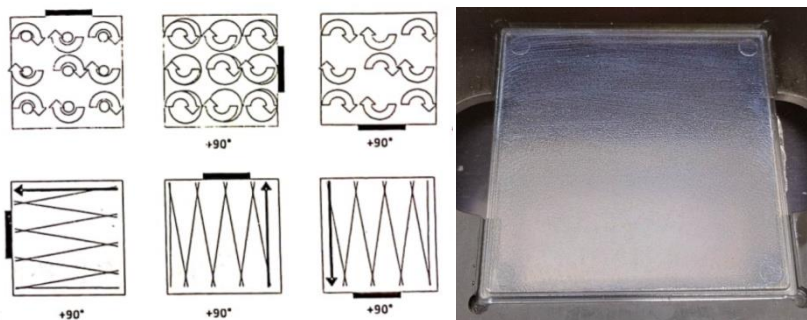
Μέτρηση δειγμάτων:

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται σαν υπόστρωμα κατάλληλες πλάκες από PMMA (Plexiglas, πολυμεθυλομεθακρυλικό μεθύλιο) με τη μία πλευρά τους να είναι τραχεία. Το υπόστρωμα πρέπει να είναι διαπερατό από τη UV ακτινοβολία, μη φθορίζον, φωτοσταθερό και αδρανές σε σχέση με όλα τα συστατικά που θα απλωθούν στην πλάκα. Αρχικά, 1.3g από κάθε δείγμα τοποθετούνται με τη βοήθεια σύριγγας σε μορφή κουκίδων ίσου όγκου σε όλη την επιφάνεια της πλάκας.



Εικόνα 28: Αρχική τοποθέτηση του δείγματος στην πλάκα

Μετά την εφαρμογή, το δείγμα απλώνεται όσο το δυνατόν γρηγορότερα σε όλη την έκταση της επιφάνεια της πλάκας με την άκρη του δαχτύλου με συγκεκριμένες κινήσεις. Αρχικά, το αντηλιακό απλώνεται σε όλη την έκταση για 30sec με μεγάλες κυκλικές κινήσεις χωρίς να ασκείται πίεση. Στη συνέχεια, γίνεται επάλειψη του δείγματος στην τραχεία επιφάνεια χρησιμοποιώντας πίεση και κάνοντας γραμμικές κινήσεις για άλλα 30sec.



Εικόνα 29: Οδηγίες για τις καθορισμένες κινήσεις ώστε το δείγμα να απλωθεί ομοιόμορφα στο υπόστρωμα (αριστερά) και η τελική μορφή του προς μέτρηση δείγματος (δεξιά)

Το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 15min σε σκοτεινό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να διευκολυνθεί η δημιουργία ενός πρότυπου σταθεροποιημένου φιλμ.

Για την βαθμονόμηση του οργάνου χρησιμοποιείται ως δείγμα αναφοράς η γλυκερίνη, η οποία τοποθετείται σε διαφορετικά σημεία στην τραχεία επιφάνεια της πλάκας, χωρίς να επηρεάζεται από την κατανομή. Η ποσότητα της γλυκερίνης που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι ικανή να καλύψει ολόκληρη την επιφάνεια (προσεγγιστικά 15 μl για πλάκα 50x50 mm).

Μέτρηση του παράγοντα αντηλιακής προστασίας των δειγμάτων:

Αφού πραγματοποιηθεί η προετοιμασία του δείγματος, η πλάκα τοποθετείται στο φωτισμένο μέρος της συσκευής (Εικόνα 30). Κατά τη διάρκεια της μέτρησης, η οποία διαρκεί περίπου 5-7min, η πλάκα κινείται και η συσκευή σαρώνει εννέα διαφορετικές περιοχές στην επιφάνεια της από τα 290 έως τα 400nm με βήμα 1nm, εμφανίζοντας διάγραμμα με δέκα διαφορετικές καμπύλες. Οι καμπύλες αυτές στον οριζόντιο άξονα έχουν το κρίσιμο μήκος κύματος, ενώ στον κατακόρυφο το δείκτη MPF (Monochromatic Protection Factor). Οι εννέα από τις καμπύλες αντιστοιχούν στα εννέα διαφορετικά σκαναρίσματα, ενώ η δέκατη είναι ο μέσος όρος αυτών, εξαλείφοντας τον θόρυβο κατά τη μέτρηση.



Εικόνα 30: Εικόνα οργάνου κατά την μέτρηση του παράγοντα της αντηλιακής προστασίας SPF

Ο μονοχρωματικός δείκτης προστασίας MPF προσδιορίζεται για κάθε μήκος κύματος και είναι αντιστρόφως ανάλογος της διαπερατότητας του δείγματος, δηλαδή:

$$MPF_{\lambda} = \frac{1}{T_{\lambda}}$$

Επιπλέον, ο λόγος UVA/UVB υπολογίζεται από το μαθηματικό τύπο:

$$\frac{UVA}{UVB} = \frac{\int_{320}^{400} \log_{10} MPF_{\lambda} d\lambda}{\int_{320}^{400} d\lambda} \frac{\int_{290}^{320} \log_{10} MPF_{\lambda} d\lambda}{\int_{290}^{320} d\lambda}$$

Όπου $d\lambda$ είναι 1nm. Όσο ο λόγος UVA/UVB τείνει προς την μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προστασία του αντηλιακού φίλτρου έναντι της UVA ακτινοβολίας.

Τέλος, ως κρίσιμο μήκος κύματος ($\lambda_{critical}$, λ_c) ορίζεται το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο 90% του ολοκληρώματος, δηλαδή στο 90% του εμβαδού της καμπύλης απορρόφησης από 290 έως 400nm (90% Area Under the Curve, AUC). Το κρίσιμο μήκος κύματος υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\frac{\int_{290}^{\lambda_c} \log_{10} MPF_{\lambda} d\lambda}{\int_{290}^{400} \log_{10} MPF_{\lambda} d\lambda} = 0.9$$

2.7 Προετοιμασία δειγμάτων για μετρήσεις TEM

Η ανάλυση για την μελέτη της μορφολογίας των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης JEOL JEM-2100 LaB6 υψηλής ανάλυσης (HRTEM), που λειτουργεί στα 200kV. Τα δείγματα υπό διερεύνηση εναιωρήθηκαν σε απιονισμένο νερό και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με υπερήχους για να διασπαστούν τα συσσωματωμένα σωματίδια. Μια σταγόνα από το εναιώρημα στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε ένα πλέγμα χαλκού επικαλυμμένο με άνθρακα 300 mesh και στεγνώσει υπό την επίδραση αέρα όλη κατά την διάρκεια μιας νύχτα.

2.8 Αξιολόγηση των θερμικών ιδιοτήτων με TGA

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το θερμοζυγιστήριο συστήματος TGA/DSC 1 STARe (Mettler Toledo, Columbus, OH, ΗΠΑ). Και τα δείγματα θερμάνθηκαν από 25°C στους 600°C, ακολουθώντας ρυθμό θέρμανσης 10°C/min υπό ροή N₂ (10 mL/min).

2.9 Δομικός χαρακτηρισμός με ATR/FT-IR

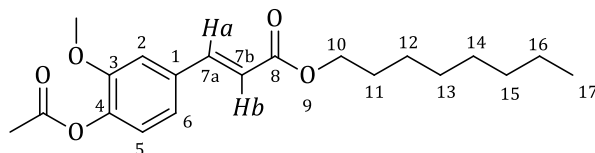
Η φασματοσκοπία FTIR πραγματοποιήθηκε σε φασματόμετρο JASCO FT-IR 4200 σε λειτουργία αποσβένουσα ολικής ανάκλασης (ATR), στην περιοχή από 4000 έως 400 cm. Η λειτουργία της τεχνικής ATR βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης (total internal reflection), το οποίο συμβαίνει όταν μία δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας (με υψηλότερο δείκτη διάθλασης, n_1) σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας (με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, n_2). Στα ATR εξαρτήματα χρησιμοποιείται ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης ένας διαφανής κρύσταλλος στην

υπέρυθρη ακτινοβολία με υψηλό δείκτη διάθλασης, πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο υφίσταται πολλαπλές ολικές ανακλάσεις στον κρύσταλλο, με αποτέλεσμα να διέρχεται από το δείγμα πολλές φορές, από το οποίο και απορροφάται. Η ATR/FT – IR φασματοσκοπία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μη καταστρεπτικές και πιο ευέλικτες μεθόδους, η οποία παρέχει φάσματα πολύ υψηλής ποιότητας για μία πολύ μεγάλη ποικιλία υλικών. Το βασικό πλεονέκτημα της ATR/FT-IR μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαιτεί οποιαδήποτε επεξεργασία του δείγματος ή ομογενοποίησή του για το σχηματισμό δισκίου με σκόνη *KBr*, παρά μόνο μία απειροελάχιστη ποσότητα δείγματος που τοποθετείται σε επαφή με τον κρύσταλλο ως έχει.

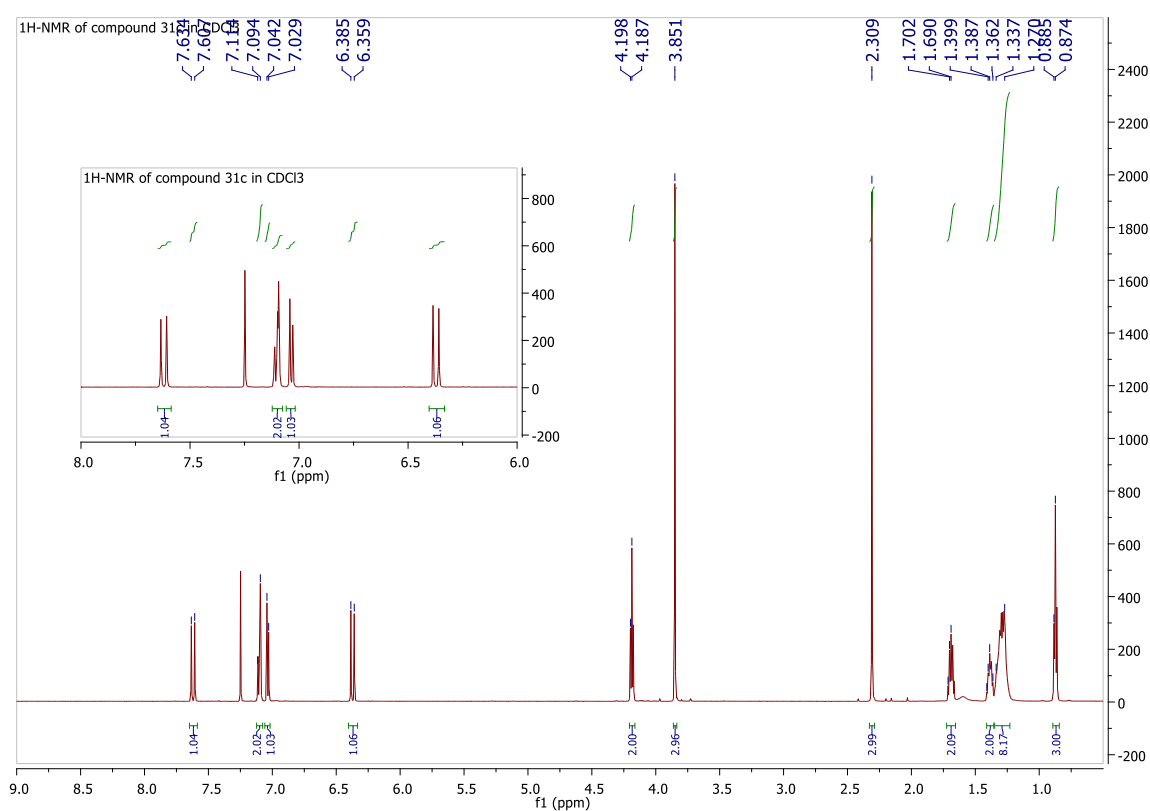
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Φασματοσκοπική Μελέτη $^1\text{H-NMR}$ των εστέρων **1b** και **1c**

Στην Εικόνα 31 παρουσιάζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) της ένωσης **1b** (Σχήμα 11) σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($\text{CDCl}_3\text{-d}_1$), ως χαρακτηριστικό παράδειγμα εστέρα του φερουλικού οξέος, που συντέθηκε σύμφωνα με τη Γενική Μεθοδολογία Α.



Σχήμα 11: 3-(4-ακετοξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρας (**1b**)



Εικόνα 31: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) του εστέρα **1b**

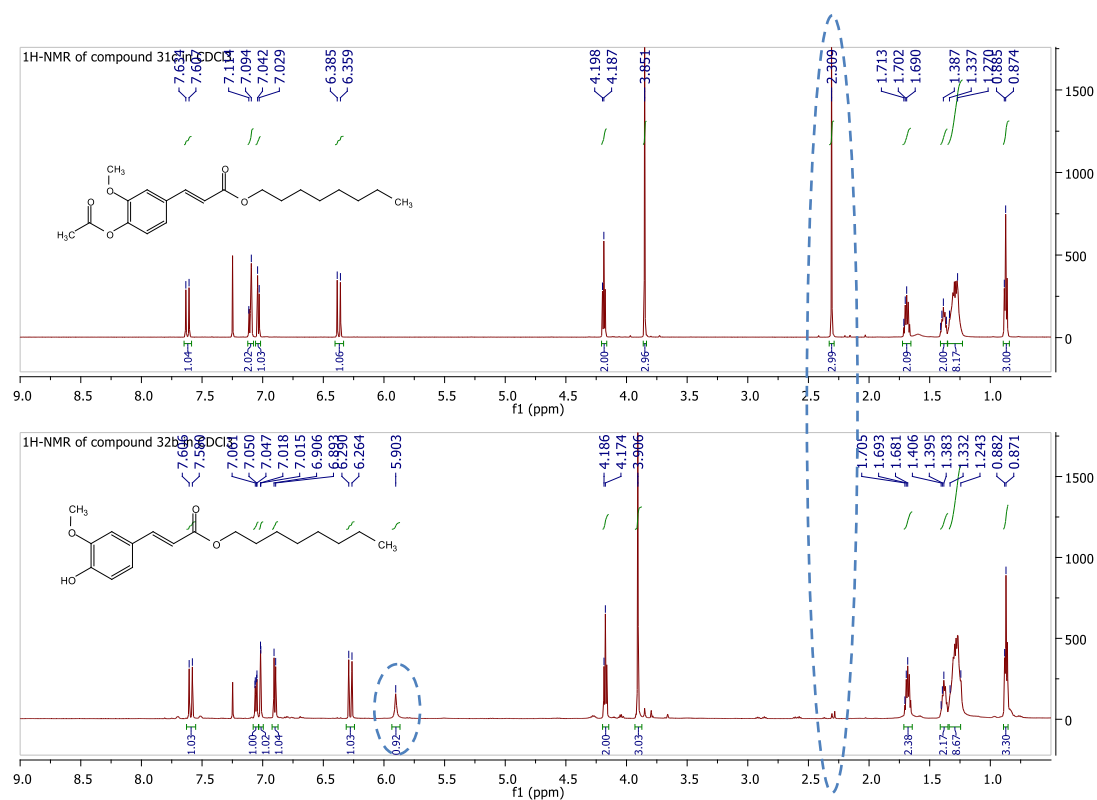
Στην αρωματική και βινυλική περιοχή του φάσματος, σε εύρος χημικών μετατοπίσεων από 8.0 έως 6.0 ppm εμφανίζονται τα πιο «αποθωρακισμένα» πρωτόνια της ένωσης. Πιο συγκεκριμένα, στα 7.62 και 6.37 ppm εντοπίζονται δύο διπλές κορυφές με σταθερές σύζευξης 16.2 και 15.6 Hz αντίστοιχα, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδίδονται στα πρωτόνια Ha και Hb αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας έτσι την trans-γεωμετρία του διπλού δεσμού.

Επιπλέον, στην ίδια περιοχή του φάσματος απορροφούν τα τρία αρωματικά πρωτόνια της ένωσης, μέσω μιας πολλαπλής κορυφής στα 7.10 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια

και μιας διπλής κορυφή με σταθερά σύζευξης 7.8 Hz στα 7.04 ppm, που ολοκληρώνει για ένα αρωματικό πρωτόνιο.

Συνεχίζοντας προς τα υψηλότερα πεδία, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος και συγκεκριμένα στα 4.19 ppm εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αποδίδεται σε αυτά του μεθυλενίου της θέσης C-10. Το σήμα αυτό επιβεβαιώνει τον επιτυχή σχηματισμό του εστέρα. Έπειτα, στα 3.85 ppm παρουσιάζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τα τρία πρωτόνια του μεθοξυ-υποκαταστάτη της θέσης C-3 του αρωματικού δακτυλίου.

Στη συνέχεια, στα υψηλά πεδία του φάσματος εμφανίζεται μια απλή κορυφή στα 2.31 ppm που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αποδίδεται σε αυτά της ακετυλοξυ-ομάδας της θέσης C-4 του αρωματικού δακτυλίου. Τα πιο «θωρακισμένα» πρωτόνια της ένωσης αντιστοιχούν σε αυτά της αλειφατικής αλυσίδας και εντοπίζονται μεταξύ 1.8 και 0.8 ppm. Ειδικότερα, εμφανίζονται δύο πενταπλές κορυφές στα 1.69 και 1.39 ppm που αποδίδονται στα μεθυλένια C-11 και C-12 αντίστοιχα, μια πολλαπλή κορυφή στα 1.30 ppm που ολοκληρώνει για τα οκτώ πρωτόνια των θέσεων C-13/14/15/16 και τέλος μια τριπλή κορυφή στα 0.87 ppm που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια αποδίδεται στο μεθύλιο της θέσης C-17.



Εικόνα 32: Σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) των εστέρων **1b** και **1c**

Στην Εικόνα 32 παρουσιάζονται και συγκρίνονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) των εστέρων **1b** και **1c**, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής τροποποίηση του εστέρα

(1b) προς το αντίστοιχο υδροξυ-παράγωγο του (1c). Συγκεκριμένα, η αποπροστασία της ένωσης 1b αποδεικνύεται σε δύο σημεία:

- Στην παρουσία μιας ευρείας απλής κορυφής στα 5.90 ppm του φάσματος της ένωσης 1c (κάτω φάσμα), η οποία αποδίδεται στο αρωματικό υδροξύλιο της θέσης C-4 της τροποποιημένης δομής, και η οποία απουσιάζει από το φάσμα του ακετυλοξυ-παραγώγου 1b (πάνω φάσμα).
- Στην απουσία της απλής κορυφής στα υψηλά πεδία του φάσματος του υδροξυ-εστέρα 1c, η οποία εμφανίζεται στα 2.31 ppm στο φάσμα του προστατευμένου παραγώγου 1b και αποδίδεται στο μεθύλιο του ακετυλοξυ-υποκαταστάτη της θέσης C-4 του αρωματικού δακτυλίου.

3.2 Προκαταρκτικά πειράματα για την διεργασία του εγκλωβισμού

Για την βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού του αντηλιακού φίλτρου 1c στους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς, οι μεταβλητές που επιλέχθηκε να μελετηθούν σαν ανεξάρτητες είναι:

- 1) Ο χρόνος που οι διασπορές των νανοσωματιδίων εκτίθενται σε υπερήχους κατά το σχηματισμό των νανοσωματιδίων (Sonication Time, ST)
- 2) Το ποσοστό % v/v του NaDES το διάλυμα χιτοζάνης που χρησιμοποιείται για την επικάλυψη των νανοσωματιδίων
- 3) Το ποσοστό % w/w του προς εγκλωβισμό αντηλιακού φίλτρου που προστίθεται κάθε φορά στη διασπορά των νανοσωματιδίων (Drug Loading, DL).

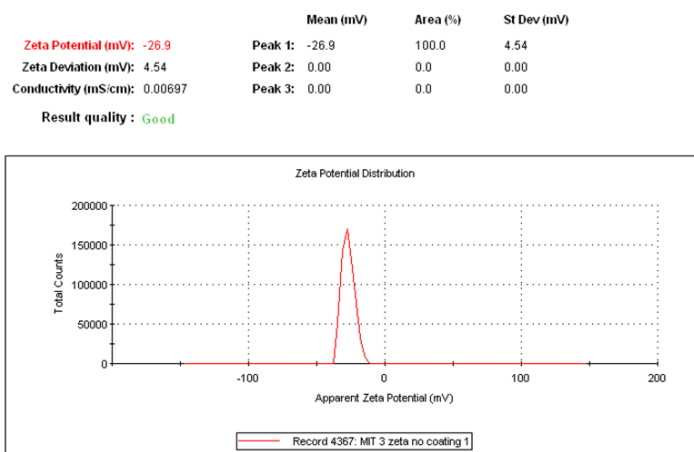
Επιπλέον, μελετήθηκαν δύο διαφορετικά υγρά λιπίδια, το ελαιόλαδο και το έλαιο αμυγδάλου, με στόχο τον προσδιορισμό των διαφορών στο μέγεθος των νανοσωματιδίων αλλά και στην απόδοση εγκλωβισμού των συνθετικών αντηλιακών φίλτρων. Τα προκαταρκτικά πειράματα για τη διεργασία του εγκλωβισμού αφορούσαν τη δοκιμή των υγρών λιπιδίων, με στόχο τον προσδιορισμό του βελτίστου για το σχηματισμό των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων. Ακόμα, μέσα από τα προκαταρκτικά πειράματα προσδιορίστηκαν τα ανώτερα και τα κατώτερα όρια των ανεξάρτητων μεταβλητών που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας.

3.2.1 Μελέτη ζ-δυναμικού πριν και μετά την επικάλυψη των σωματιδίων

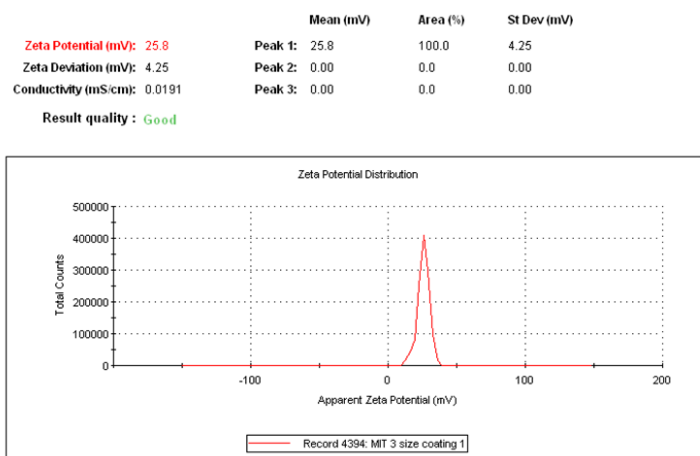
Άλλη μία παράμετρος που μελετήθηκε στα προκαταρκτικά πειράματα ήταν η μεταβολή του ζ-δυναμικού τις διασποράς των νανοσωματιδίων πριν και μετά την επικάλυψη τους με χιτοζάνη. Ο μηχανισμός με τον οποίο επικαλύπτονται οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς είναι η φυσική προσρόφηση της χιτοζάνης στα νανοσωματίδια λόγω διαφοράς του ηλεκτρικού φορτίου της χιτοζάνης σε σχέση με το επικαφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα, οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς στους οποίους έχει εγκλωβιστεί ένα από τα συνθετικά αντηλιακά φίλτρα αναμένεται να έχουν αρνητικό ζ-δυναμικό. Καθώς, λοιπόν, η χιτοζάνη είναι ένα θετικά φορτισμένο βιοπολυμερές, όταν

προστίθεται στη διασπορά των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων προσοφάται στην επιφάνειά τους και δημιουργεί ένα στρώμα επικάλυψης (Rabelo et al., 2018).

Για την επαλήθευση της υπόθεσης αυτής, δημιουργήθηκε μία διαπορά νανοδομημένων λιπιδικών φορέων και μετρήθηκε με τη μέθοδο Dynamic Light Scattering (DLS) το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων πριν και μετά την επικάλυψή τους με διάλυμα DES 4% v/v και χιτοζάνης 0.3% w/v. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο [Διάγραμμα 2](#) και στο [Διάγραμμα 3](#).



Διάγραμμα 2: ζ-δυναμικό για νανοσωματίδια που δεν είναι επικαλυμμένα με χιτοζάνη



Διάγραμμα 3: ζ-δυναμικό για νανοσωματίδια που είναι επικαλυμμένα με χιτοζάνη

Τα νανοσωματίδια τα οποία δεν είναι επικαλυμμένα με χιτοζάνη παρουσιάζουν αρνητικό ζ-δυναμικό με μία ενδεικτική τιμή να είναι -26.9 mV. Αντίθετα τα νανοσωματίδια που είναι επικαλυμμένα με χιτοζάνη έχουν θετικό ζ-δυναμικό με μία ενδεικτική τιμή να είναι το 25.8 mV. Η τιμή αυτή προσεγγίζει το 30 mV, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επικάλυψη είναι επιτυχημένη και τα σωματίδια παρουσιάζουν σταθερότητα (S. A. Lee et al., 2017).

3.2.2 Επιλογή του κατάλληλου υγρού λιπιδίου

Το στερεό λιπίδιο, δηλαδή η τριμυριστίνη, που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων διατηρήθηκε ίδιο για όλα τα πειράματα που

πραγματοποιήθηκαν. Δοκιμάστηκαν, όμως, δύο διαφορετικά υγρά λιπίδια, το ελαιόλαδο και το έλαιο αμυγδάλου.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν επτά προκαταρκτικά πειράματα για κάθε ένα από τα υγρά λιπίδια. Τα δύο από τα επτά πειράματα αποτέλεσαν «τυφλά» πειράματα, δηλαδή δεν προστέθηκε ποσότητα βιοδραστικής ένωσης στη διασπορά. Ενώ στα άλλα πέντε πειράματα, πραγματοποιήθηκε ο εγκλωβισμός του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **1c**. Το ποσοστό φόρτωσης κυμαίνονταν από 1 έως 3% w/w. Ο χρόνος στον οποίο εκτέθηκαν οι διασπορές των σωματιδίων σε υπερήχους επιλέχθηκε να διατηρηθεί σταθερός και ίσος με 7.5 min, ώστε να μην επηρεαστεί το μέγεθος των σωματιδίων από αυτή την παράμετρο. Τέλος, το ποσοστό % v/v του NaDES στο διάλυμα χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη των σωματιδίων κυμαίνονταν από 2 έως 6% v/v (Bashiri et al., 2020; Rabelo et al., 2018).

Τα προκαταρκτικά πειράματα για κάθε υγρό λιπίδιο αξιολογήθηκαν ως προς το μέγεθος των σωματιδίων και την απόδοση εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου, υπολογισμένη με έμμεσο τρόπο. Επιπλέον, μετρήθηκε και το ζ-δυναμικό των διασπορών ώστε να εξασφαλιστεί ότι η επικάλυψη των νανοσωματιδίων ήταν επιτυχημένη ανεξάρτητα από το είδος του υγρού λιπιδίου που χρησιμοποιήθηκε. Τα αποτελέσματα τόσο για τα προκαταρκτικά πειράματα με το ελαιόλαδο όσο και με το έλαιο αμυγδάλου παρατίθενται στον Πίνακα 11 και στον Πίνακα 12.

Πίνακας 11: Συνθήκες και αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων για τα νανοσωματίδια με υγρό λιπίδιο το ελαιόλαδο

Πείραμα	Συνθήκες			Αποτελέσματα		
	ST (min)	NaDES (%)	DL (%)	Size (nm)	ζ-potential (mV)	EE (%)
1	7.5	4	Blank	109.9	21.6	-
2	7.5	4	Blank	132.3	11.7	-
3	7.5	6	1	183.2	24.3	96%
4	7.5	4	3	151.3	6.3	99%
5	7.5	4	3	154.7	24.5	96%
6	7.5	4	3	146.3	6.7	98%
7	7.5	6	3	112.5	21.1	97%
			MO:	141.5	21.1	98%
			TA:	25.7	8.1	0.013

Πίνακας 12: Συνθήκες και αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων για τα νανοσωματίδια με υγρό λιπίδιο το έλαιο αμυγδάλου

Πείραμα	Συνθήκες			Αποτελέσματα		
	ST (min)	NaDES (%)	DL (%)	Size (nm)	ζ-potential (mV)	EE (%)
1	7.5	4	Blank	126.4	-21.9	-
2	7.5	4	Blank	146.3	34.7	-
3	7.5	6	1	155.0	30.7	98%
4	7.5	2	1	136.6	35.0	98%
5	7.5	4	3	188.7	20.1	90%

6	7.5	4	3	155.3	19.7	98%
7	7.5	4	3	205.5	36.3	91%
			MO:	159.1	30.8	98%
			TA:	28.3	20.6	0.041

Μετά από σύγκριση των παραπάνω αποτελεσμάτων φαίνεται ότι τα σωματίδια με υγρό λιπίδιο το ελαιόλαδο παρουσιάζουν κατά μέσο όρο μέγεθος 141.5 nm με τυπική απόκλιση 25.7 nm, έναντι των νανοσωματιδίων με υγρό λιπίδιο το έλαιο αμυγδάλου που παρουσιάζουν κατά μέσο όρο μέγεθος 159.1 nm με τυπική απόκλιση τα 28.3 nm. Όσον αφορά το ζ-δυναμικό, παρατηρείται ότι και στις δύο περιπτώσεις τα σωματίδια έχουν επικαλυφθεί επιτυχώς, καθώς οι τιμές είναι θετικές. Εξάιρεση αποτελεί το πρώτο πείραμα από τη σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων με υγρό λιπίδιο το έλαιο αμυγδάλου που φαίνεται ότι η επικάλυψη δεν έχει πραγματοποιηθεί σωστά. Αν και κατά μέσο όρο το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων με υγρό λιπίδιο το έλαιο αμυγδάλου είναι μεγαλύτερο, η τυπική απόκλιση φαίνεται να είναι μικρότερη στην περίπτωση των νανοσωματιδίων με υγρό λιπίδιο το ελαιόλαδο. Τέλος, όσον αφορά την απόδοση εγκλωβισμού του αντηλιακού φίλτρου, ο μέσος όρος και στις δύο περιπτώσεις είναι 98%, αλλά η τυπική απόκλιση στην περίπτωση των νανοσωματιδίων με υγρό λιπίδιο το ελαιόλαδο είναι εμφανώς μικρότερη. Επιπλέον, σημειώνεται ότι οι διασπορές με διαφορετικό λιπίδιο δεν παρουσίασαν κάποια ιδιαίτερη διαφορά οπτικά (Εικόνα 33).



Εικόνα 33: Σύγκριση διασποράς NLCs με ελαιόλαδο (αριστερά) και με έλαιο αμυγδάλου (δεξιά)

Συμπερασματικά, οι διασπορές στις οποίες χρησιμοποιήθηκε το ελαιόλαδο σαν υγρό λιπίδιο εμφάνισαν καλύτερα χαρακτηριστικά και οδήγησαν στην απόφαση της χρήσης του ελαιόλαδου στον πειραματικό σχεδιασμό.

3.2.3 Οριοθέτηση των ανεξάρτητων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού

Με βάση τα δεκατέσσερα προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, οριοθετήθηκαν και οι ανεξάρτητες μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη και τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού. Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος που οι διασπορές εκτίθενται σε υπερήχους κατά τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων επιλέχθηκε να κυμαίνεται από 5 έως 10min ώστε να διασπώνται πιθανά συσσωματώματα αλλά να μην επηρεάζεται η απόδοση εγκλωβισμού (S. Das & Chaudhury, 2011). Το ποσοστό % v/v του NaDES στα διαλύματα χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη κυμαίνεται από

2 έως 6%, γιατί όπως φάνηκε και από τα προκαταρκτικά πειράματα, αυτές οι ποσότητες NaDES είναι αρκετές ώστε και να διαλυθεί η χιτοζάνη και να πραγματοποιηθεί η επικάλυψη. Τέλος, το ποσοστό % w/w της φόρτωσης του αντηλιακού φίλτρου επιλέχθηκε να κυμαίνεται από 1 έως 5% καθώς ήταν επιθυμητό να παρουσιαστούν μεγαλύτερες διαφορές στην απόδοση εγκλωβισμού από αυτές που λήφθηκαν στα προκαταρκτικά πειράματα (Jansook et al., 2018).

Άρα, ο τρόπος με τον οποίο οριοθετήθηκαν οι ανεξάρτητες μεταβλητές και τα κεντρικά σημεία αυτών φαίνεται στον Πίνακας 13.

Πίνακας 13: Τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών που εξετάζονται στον πειραματικό σχεδιασμό

Μεταβλητή	Όνομα	Μονάδες	Ελάχιστο	Μέγιστο	ΜΟ	ΤΑ
A	Sonication Time	min	5	10	7.5	1.89
B	NaDES	%	2	6	4	1.51
C	Drug Loading	%	1	5	3	1.51

3.3 Πειραματικός σχεδιασμός

3.3.1 Προτεινόμενα πειράματα για τον πειραματικό σχεδιασμό

Η παρούσα μελέτη έχει ως απώτερο σκοπό τη βελτιστοποίηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων, της απόδοσης εγκλωβισμού και του ζ-δυναμικού των διασπορών μετά την επικάλυψη των νανοσωματιδίων με τη διάλυμα NaDES-CS. Οπότε, συνολικά οι ανεξάρτητες και οι εξαρτημένες μεταβλητές του πειραματικού σχεδιασμού διαφαίνονται στον Πίνακας 14.

Πίνακας 14: Υπό μελέτη παράμετροι με στόχο τη βελτιστοποίηση των αποκρίσεων

Παράμετροι (ανεξάρτητες μεταβλητές)	Αποκρίσεις (εξαρτημένες μεταβλητές)
Sonication Time (ST)	Μέγεθος Νανοσωματιδίων
NaDES (%)	ζ - δυναμικό
Drug Loading (DL)	Απόδοση εγκλωβισμού

Για τον υπολογισμό των αναλογιών και την κατάστρωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Design Expert, όπου και πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός Box Behken. Μετά τον καθορισμό των τιμών των άνω και κάτω ορίων των ανεξάρτητων μεταβλητών, το χρησιμοποιούμενο λογισμικό πρόγραμμα προτείνει την πραγματοποίηση ορισμένων πειραμάτων για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **1c** στους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς. Ο αριθμός των πειραμάτων N που απαιτούνται για την ανάπτυξη του σχεδιασμού αυτού δίνεται από τη σχέση:

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

Όπου k είναι το πλήθος των ανεξάρτητων μεταβλητών και C_0 το πλήθος των επαναλήψεων του κεντρικού σημείου, δηλαδή του πειράματος στο οποίο οι ανεξάρτητες μεταβλητές θα έχουν την κεντρική του τιμή. Στην παρούσα μελέτη, οι ανεξάρτητες μεταβλητές είναι τρεις,

ενώ το κεντρικό σημείο επιλέχθηκε να επαναληφθεί τρεις φορές. Οπότε, ο συνολικός αριθμός πειραμάτων που πρότεινε το λογισμικό είναι 15 και οι αντίστοιχες πειραματικές συνθήκες παρουσιάζονται στον Πίνακας 15.

Πίνακας 15: Τα 15 πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού που προτάθηκαν από το λογισμικό

Πείραμα	Συνθήκες		
	ST (min)	NaDES (%)	DL (%)
Run 1	7.5	4	3
Run 2	7.5	6	1
Run 3	7.5	4	3
Run 4	7.5	4	3
Run 5	5	6	3
Run 6	10	2	3
Run 7	7.5	2	5
Run 8	7.5	2	1
Run 9	5	2	3
Run 10	10	4	5
Run 11	5	4	5
Run 12	7.5	6	5
Run 13	10	6	3
Run 14	10	4	1
Run 15	5	4	1

3.3.2 Αποτελέσματα πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού

Τα αποτελέσματα με τις τιμές των αποκρίσεων για τα εκτελεσμένα δεκαπέντε πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού συνοψίζονται στον Πίνακας 16.

Πίνακας 16: Οι τιμές των αποκρίσεων για τα δεκαπέντε εκτελεσμένα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού

Πείραμα	Συνθήκες			Αποτελέσματα		
	ST (min)	NaDES (%)	DL (%)	Size (nm)	ζ-potential (mV)	EE _(αμ) (%)
Run 1	7.5	4	3	154.7	24.5	90
Run 2	7.5	6	1	183.2	24.3	81
Run 3	7.5	4	3	151.3	6.3	91
Run 4	7.5	4	3	146.3	6.3	92
Run 5	5	6	3	112.5	21.1	80
Run 6	10	2	3	112.2	19.8	95
Run 7	7.5	2	5	119.3	19.7	67
Run 8	7.5	2	1	129.8	25.7	63
Run 9	5	2	3	134.8	17.2	82
Run 10	10	4	5	116.0	24.8	76
Run 11	5	4	5	111.6	19.5	70
Run 12	7.5	6	5	123.1	22.9	66
Run 13	10	6	3	131.2	18.9	66
Run 14	10	4	1	141.5	25.4	70

Run 15	5	4	1	130.4	21.1	42
--------	---	---	---	-------	------	----

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι τιμές για το μέγεθος των σωματιδίων έχουν ληφθεί με τη μέθοδο Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) και όχι με τη μέθοδο Dynamic Light Scattering (DLS), καθώς κρίθηκαν πιο αξιόπιστες και ενδεικτικές. Μεγαλύτερη ανάλυση για την διαφορά των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων πραγματοποιείται παρακάτω. Ο σχηματισμός των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με υγρό λιπίδιο το ελαιόλαδο κρίνεται επιτυχής και τα μεγέθη αυτών κυμαίνονται από 111.6 (Run 11) μέχρι 183.2 nm (Run 2). Παρατηρείται μία τάση των σωματιδίων να έχουν μικρότερο μέγεθος σε συνθήκες όπου η φόρτωση του αντηλιακού φίλτρου είναι υψηλή και ο χρόνος που τα σωματίδια εκτίθενται σε υπερήχους μεγάλος.

Οι τιμές του ζ-δυναμικού που λήφθηκαν με τη μέθοδο του DLS είναι όλες θετικές, γεγονός που υποδηλώνει την επιτυχημένη επικάλυψη των νανοσωματιδίων με χιτοζάνη και στα δεκαπέντε πειράματα. Η ψηλότερη τιμή του ζ-δυναμικού είναι 25.7 mV (Run 8), ενώ οι χαμηλότερες είναι 6.3 mV (Run 3 και 4). Στην δεύτερη περίπτωση, αν και η επικάλυψη έχει πραγματοποιηθεί δεν είναι αρκετά σταθερή καθώς δεν προσεγγίζει την τιμή 30 mV. Ενδεικτικά διαγράμματα κατανομής του μεγέθους και ζ – δυναμικού των παραγόμενων νανοσυστημάτων από τα δεκαπέντε πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού παρατίθενται στο [ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ](#).

Τέλος, όπως φαίνεται στον πίνακα των αποτελεσμάτων, σαν τρίτη απόκριση παρουσιάζεται η απόδοση εγκλωβισμού των αντηλιακών φίλτρων στα νανοσωματίδια, υπολογισμένη με άμεσο τρόπο και όχι με έμμεσο. Το γεγονός αυτό συμβαίνει επειδή οι τιμές των αποδόσεων που μετρήθηκαν με έμμεσο τρόπο ήταν πολύ υψηλές και πολύ κοντινές μεταξύ τους, πάνω από 90%, και έτσι δεν υπήρχε η δυνατότητα εξαγωγής κάποιου μοντέλου. Μεγαλύτερη ανάλυση για την διαφορά των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων προσδιορισμού της απόδοσης εγκλωβισμού πραγματοποιείται παρακάτω. Ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλωβισμού των αντηλιακών φίλτρων με άμεσο τρόπο πραγματοποιείται αφού διασπαστούν τα σωματίδια και είναι πιο ακριβής. Οι τιμές των αποδόσεων εγκλωβισμού, υπολογισμένων με άμεσο τρόπο, διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους, με την ψηλότερη να είναι 95% (Run 6), ενώ την χαμηλότερη να είναι 42% (Run 15). Παρατηρείται μία τάση η απόδοση εγκλωβισμού να έχει υψηλότερη τιμή για μεσαία προς μεγάλα ποσοστά φόρτωσης του αντηλιακού φίλτρου όπως 3 ή 5%.

3.3.3 Αποτελέσματα της μεθόδου DLS για το μέγεθος και την κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων

Αν και στις αποκρίσεις του πειραματικού σχεδιασμού σημειώνονται τα μεγέθη των νανοσωματιδίων που λαμβάνονται με τη μέθοδο NTA, πραγματοποιήθηκε και μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων με τη μέθοδο DLS. Επιπλέον, μέσω της μεθόδου DLS λήφθηκαν και δεδομένα για τον δείκτη πολυδιασποράς PDI, ο οποίος είναι ενδεικτικός για την κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Τα δεδομένα που λήφθηκαν για τα δεκαπέντε πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού είναι:

Πίνακας 17: Αποτελέσματα για το μέγεθος και το δείκτη πολυδιασποράς από τη μέθοδο DLS

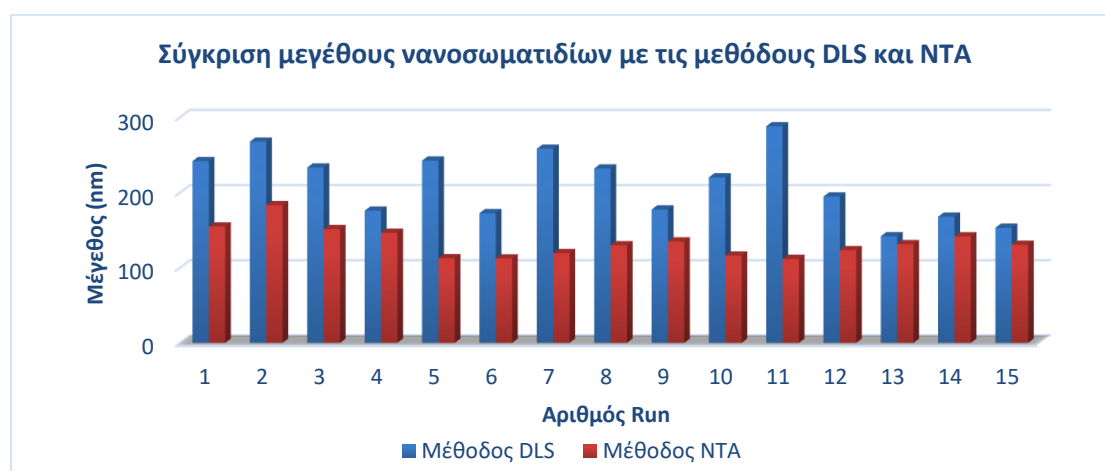
Πείραμα	Συνθήκες			Αποτελέσματα DLS	
	ST (min)	NaDES (%)	DL (%)	Size (nm)	PDI
Run 1	7.5	4	3	241.7	0.557
Run 2	7.5	6	1	267.6	0.343
Run 3	7.5	4	3	233.2	0.298
Run 4	7.5	4	3	175.8	0.317
Run 5	5	6	3	242.4	0.342
Run 6	10	2	3	172.4	0.426
Run 7	7.5	2	5	258.1	0.315
Run 8	7.5	2	1	231.9	0.298
Run 9	5	2	3	177.3	0.304
Run 10	10	4	5	220.0	0.313
Run 11	5	4	5	288.0	0.149
Run 12	7.5	6	5	194.6	0.284
Run 13	10	6	3	141.7	0.474
Run 14	10	4	1	167.7	0.337
Run 15	5	4	1	153.0	0.395

Όσον αφορά το δείκτη πολυδιασποράς PDI, η χαμηλότερη τιμή φαίνεται να είναι 0.149 (Run 11), ενώ η ψηλότερη 0.557 (Run 1). Ο μέσος όρος του δείκτη πολυδιασποράς είναι ίσος με την τιμή 0.317, ο οποίος και θεωρείται αποδεκτός, και η τυπική απόκλιση υπολογίζεται ίση με 0.093. Με τη μέθοδο DLS το μέγεθος των νανοσωματιδίων διαφέρει σε σχέση με τη μέθοδο NTA. Πραγματοποιείται σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18: Σύγκριση αποτελεσμάτων για το μέγεθος των νανοσωματιδίων των μεθόδων DLS και NTA

Πείραμα	Συνθήκες			Αποτελέσματα		
	ST(min)	NaDES(%)	DL(%)	Size DLS(nm)	Size NTA(nm)	Deviation(nm)
Run 1	7.5	4	3	241.7	154.7	61.5
Run 2	7.5	6	1	267.6	183.2	59.7
Run 3	7.5	4	3	233.2	151.3	57.9
Run 4	7.5	4	3	175.8	146.3	20.9
Run 5	5	6	3	242.4	112.5	91.9
Run 6	10	2	3	172.4	112.2	42.6
Run 7	7.5	2	5	258.1	119.3	98.1
Run 8	7.5	2	1	231.9	129.8	72.2
Run 9	5	2	3	177.3	134.8	30.1
Run 10	10	4	5	220.0	116.0	73.5
Run 11	5	4	5	288.0	111.6	124.7
Run 12	7.5	6	5	194.6	123.1	50.6
Run 13	10	6	3	141.7	131.2	7.4
Run 14	10	4	1	167.7	141.5	18.5
Run 15	5	4	1	153.0	130.4	16.0

Παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου DLS και της μεθόδου NTA σε σχέση με το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Το μέγεθος των σωματιδίων φαίνεται σταθερά μεγαλύτερο με τη μέθοδο του DLS, όπως άλλωστε έχουν υποδείξει και οι Wilson και Green. Η μεγαλύτερη διαφορά στο μέγεθος παρατηρείται στο Run 11 και είναι ίση με 124.7 nm. Αντίθετα, η μικρότερη διαφορά παρατηρείται στο Run 13 και είναι ίση με 7.4 nm. Το μέσο μέγεθος των σωματιδίων όπως αυτό υπολογίζεται με τη μέθοδο NTA είναι 130.4 nm \pm 19.8 nm, ενώ με τη μέθοδο DLS είναι 220 nm \pm 45.1 nm. Καθώς το όργανο της μεθόδου NTA είναι πιο σύγχρονο και τα δεδομένα που λαμβάνονται είναι περισσότερα, αποφασίστηκε ότι για τις ανάγκες του πειραματικού σχεδιασμού, η βελτιστοποίηση της διεργασίας θα βασιστεί στη συγκεκριμένη μέθοδο (Wilson & Green, 2017).



Διάγραμμα 4: Διαγραμματική αναπαράσταση της διαφορά μεταξύ του μεγέθους των νανοσωματιδίων που λήφθηκε από τις μεθόδους DLS και NTA

3.3.4 Σύγκριση απόδοσης εγκλωβισμού υπολογισμένη με έμμεσο και με άμεσο τρόπο

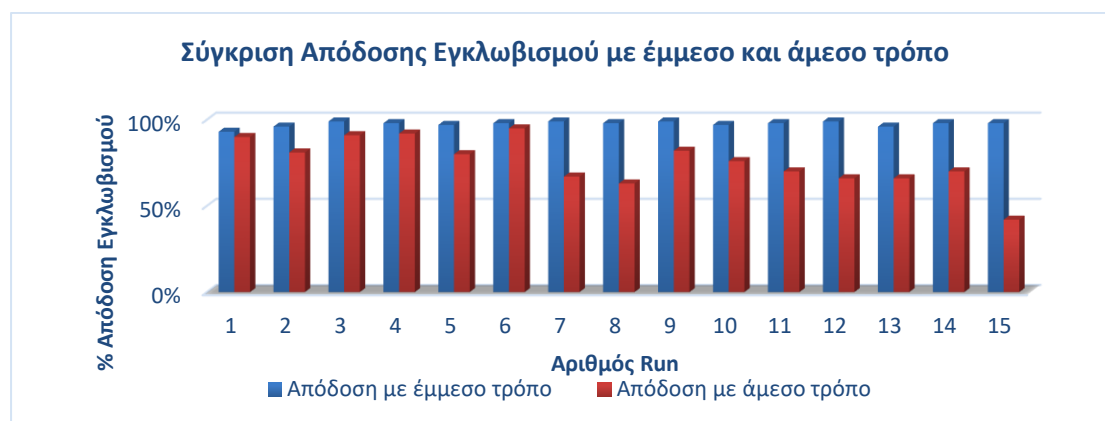
Η απόδοση εγκλωβισμού υπολογίστηκε τόσο με έμμεσο όσο και με άμεσο τρόπο και για τα δεκαπέντε πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού. Η ανάγκη για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλωβισμού και με άμεσο τρόπο προέκυψε λόγω της μεγάλης ομοιότητας των τιμών της απόδοσης εγκλωβισμού όταν αυτή υπολογίζεται με έμμεσο τρόπο σε όλα τα πειράματα. Το γεγονός αυτό δυσκόλεψε την βελτιστοποίηση της διεργασίας. Όταν υπολογίστηκε η απόδοση εγκλωβισμού και με άμεσο τρόπο παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις στις τιμές. Ανάλογη συμπεριφορά, έχει παρατηρηθεί και σε αντίστοιχες μελέτες στην βιβλιογραφία (Esposito et al., 2015).

Πίνακας 19: Διαφορά μεταξύ των τιμών της απόδοσης εγκλωβισμού, υπολογιζόμενη με άμεσο και έμμεσο τρόπο, κατά τον πειραματικό σχεδιασμό

Πείραμα	Συνθήκες			Αποτελέσματα	
	ST (min)	NaDES (%)	DL (%)	EE _(αμ) (%)	EE _(εμ) (%)
Run 1	7.5	4	3	90	93
Run 2	7.5	6	1	81	96
Run 3	7.5	4	3	91	99
Run 4	7.5	4	3	92	98

Run 5	5	6	3	80	97
Run 6	10	2	3	95	98
Run 7	7.5	2	5	67	99
Run 8	7.5	2	1	63	98
Run 9	5	2	3	82	99
Run 10	10	4	5	76	97
Run 11	5	4	5	70	98
Run 12	7.5	6	5	66	99
Run 13	10	6	3	66	96
Run 14	10	4	1	70	98
Run 15	5	4	1	42	98

Πιο συγκεκριμένα, ο μέσος όρος της απόδοσης εγκλωβισμού που υπολογίστηκε με άμεσο τρόπο είναι 76% ενώ ο μέσος όρος της απόδοσης εγκλωβισμού που υπολογίστηκε με έμμεσο τρόπο είναι 98%. Η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων φαίνεται να παρουσιάζεται στο Run 15, και είναι ίση με 56%. Αντίθετα, η μικρότερη διαφορά είναι 6% (Run 6). Φαίνεται πως η απόδοση του εγκλωβισμού που υπολογίστηκε με έμμεσο τρόπο είναι πολύ ψηλότερη από την άμεση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην διαδικασία υπολογισμού των δύο αποδόσεων. Η άμεση απόδοση κρίνεται ότι είναι πιο ακριβής και αξιόπιστη και παρέχει μία πληρέστερη εικόνα για την πραγματική τιμή της απόδοσης εγκλωβισμού καθώς υπολογίζεται μετά τη λύση των σωματιδίων (S. Das & Chaudhury, 2011; Esposito et al., 2015; Rabelo et al., 2018). Ακολουθεί η διαγραμματική απεικόνιση της διαφοράς μεταξύ των αποδόσεων εγκλωβισμού των δύο μεθόδων (Διάγραμμα 5).

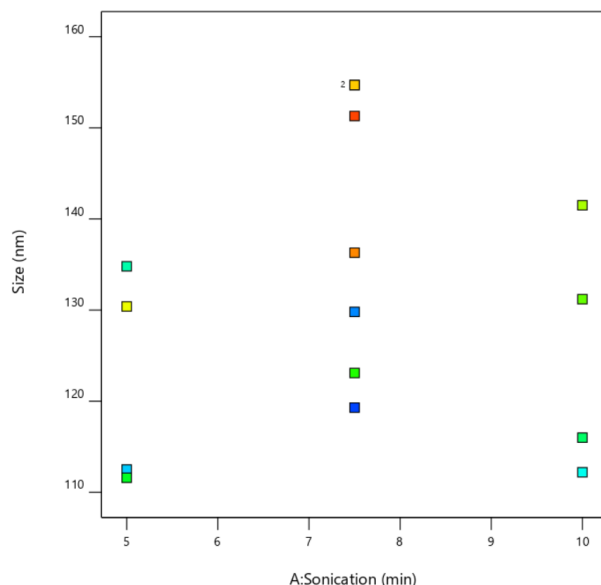


Διάγραμμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της διαφοράς μεταξύ της έμμεσης και της άμεσης απόδοσης εγκλωβισμού

3.3.5 Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων (μεγέθους σωματιδίων και απόδοσης εγκλωβισμού)

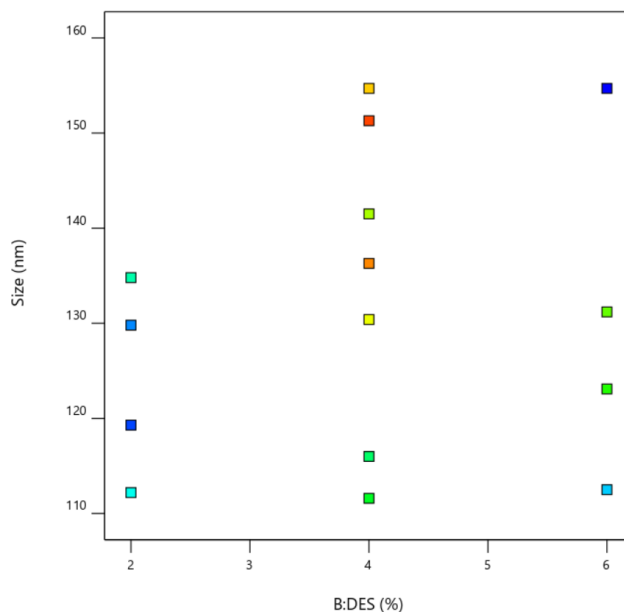
3.3.5.1 Μοντέλο πρόβλεψης του μεγέθους των σωματιδίων

Αρχικά, είναι σημαντικό να εξεταστεί η επιμέρους επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο μέγεθος των νανοσωματιδίων.



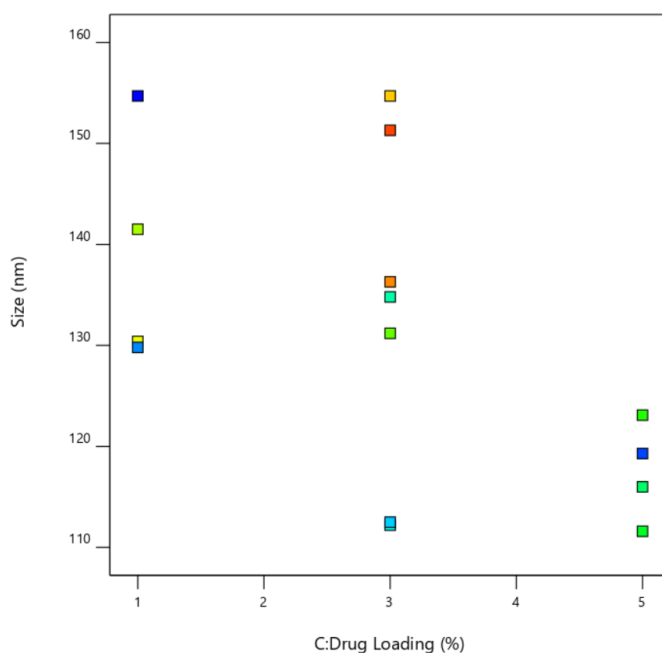
Διάγραμμα 6: Συσχέτιση του μεγέθους των νανοσωματιδίων με το χρόνο εφαρμογής υπερήχων

Παρατηρείται πως για τις ακραίες τιμές του χρόνου υπερήχων (Διάγραμμα 6), δηλαδή για τα 5 και τα 10 min, επιτυγχάνεται μικρότερο μέγεθος νανοσωματιδίων. Το γεγονός αυτό είναι λογικό όσον αφορά το πάνω άκρο του χρόνου καθώς όσο περισσότερη ώρα εφαρμόζονται υπερήχοι στη διασπορά κατά τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων τόσο αναμένεται να διασπώνται τα συσσωματώματα. Άρα, η μέση υδροδυναμική διάμετρος των νανοσωματιδίων αναμένεται να είναι μικρότερη. Το γεγονός ότι το επιθυμητό μέγεθος των νανοσωματιδίων επιτυγχάνεται και με την εφαρμογή υπερήχων μόνο για 5 min είναι πολύ θετικό και φαίνεται ότι ο βέλτιστος χρόνος εφαρμογής υπερήχων θα κριθεί και από τις άλλες παραμέτρους (S. Das & Chaudhury, 2011; Zafar et al., 2022).



Διάγραμμα 7: Συσχέτιση του μεγέθους των νανοσωματιδίων με την περιεκτικότητα του διαλύματος επικάλυψης σε NaDES

Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 7, χαμηλότερα μεγέθη νανοσωματιδίων επιτυγχάνονται για την κατώτερη τιμή της περιεκτικότητας του NaDES στο διάγραμμα της επικάλυψης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η ποσότητα του NaDES στο διάγραμμα της επικάλυψης είναι απαραίτητη για τη διάλυση της χιτοζάνης αλλά η περίσσεια του οδηγεί στο σχηματισμό μεγαλύτερων σωματιδίων ή ενισχύει την συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων. Άρα, η περιεκτικότητα 2-4 % v/v σε NaDES κρίνεται αρκετή για την διάλυση της χιτοζάνης και είναι εκείνη που προσφέρει τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά το μέγεθος των νανοσωματιδίων.



Διάγραμμα 8: Συσχέτιση του μεγέθους των νανοσωματιδίων με το ποσοστό φόρτωσης της ένωσης

Από το Διάγραμμα 8 εξάγεται το συμπέρασμα πως η αύξηση της φόρτωσης του αντηλιακού φίλτρου στα νανοσωματίδια προκαλεί μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Αντίθετα, όταν η φόρτωση της βιοδραστικής ένωσης βρίσκεται στο κάτω όριο, παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων (Jansook et al., 2018).

Με βάση τα παραπάνω, για την ελαχιστοποίηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων είναι επιθυμητές οι ακραίες τιμές του χρόνου εφαρμογής υπερήχων, μια χαμηλή περιεκτικότητα σε NaDES του διαλύματος επικάλυψης και μεγάλο ποσοστό φόρτωσης της βιοδραστικής ένωσης.

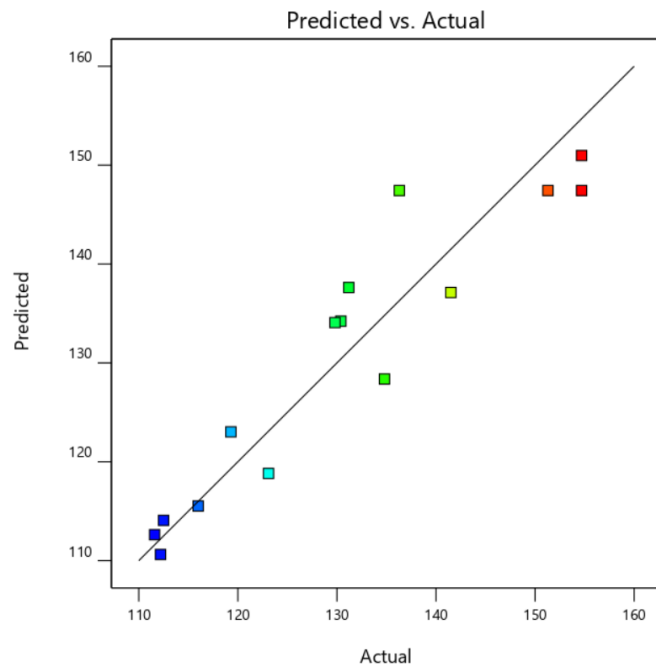
Για τη μελέτη και την πρόβλεψη του μεγέθους των σωματιδίων και την εξαγωγή των απαιτούμενων εξισώσεων επιλέγεται το τετραγωνικό μοντέλο, «Quadratic». Η αρχική μορφή της εξίσωσης περιέχει τους όρους A,B,C,AB,BC,AC,A², B² και C², όπου με A, B και C συμβολίζονται οι ανεξάρτητες μεταβλητές. Με A συμβολίζεται ο χρόνος που εφαρμόζονται υπερήχοι στις διασπορές (min), με B η περιεκτικότητα του διαλύματος της χιτοζάνης που χρησιμοποιείται για επικάλυψη σε NaDES (% v/v) και με C το ποσοστό φόρτωσης της βιοδραστικής ένωσης στα σωματίδια (% w/w). Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου εξετάζεται μέσω της στατιστικής ανάλυσης ANOVA η σημαντικότητα των ανεξάρτητων

μεταβλητών και των πεπλεγμένων όρων τους. Τελικά, από τη γενική μορφή της εξίσωσης αφαιρούνται σταδιακά όροι με υψηλές τιμές p-value (>0.05), καθώς δεν είναι στατιστικά σημαντικοί (not significant) και μπορεί να επηρεάζουν αρνητικά την προσαρμογή του μοντέλου. Πιο συγκεκριμένα, χρειάστηκε να αφαιρεθεί ο όρος AC ώστε να υπάρξει στατιστική σημαντικότητα. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακας 20.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα ANOVA για το τετραγωνικό μοντέλο που περιγράφει την πρώτη απόκριση (το μέγεθος των ναοσωματιδίων)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	2805.77	8	350.72	5.56	0.0254	significant
A-ST	16.82	1	16.82	0.2666	0.6241	
B-NaDES	80.64	1	80.64	1.28	0.3014	
C-DL	933.12	1	933.12	14.79	0.0085	
AB	426.42	1	426.42	6.76	0.0407	
BC	111.30	1	111.30	1.76	0.2324	
A ²	922.23	1	922.23	14.62	0.0087	
B ²	296.04	1	296.04	4.69	0.0735	
C ²	168.44	1	168.44	2.67	0,1534	
Residual	378.58	6	63.10			
Lack of Fit	186.87	4	46.72	0.4874	0.7563	not significant
Pure Error	191.71	2	95.85			
Cor Total	3184.35	14				

Το μοντέλο, που προκύπτει, είναι σημαντικό, αφού έχει p-value ίση με 0.0254 (<0.05) και F-value ίση με 5.56 (2.54% πιθανότητα αυτή η τιμή να είναι αποτέλεσμα θορύβου). Η F-value της έλλειψης προσαρμογής (Lack of fit) έχει τιμή 0.4874, που σημαίνει πως μια μη προσαρμογή στο μοντέλο θα οφείλεται κατά 75.63% σε θόρυβο. Ακόμη, η προσαρμογή των πειραματικών τιμών του μεγέθους των ναοσωματιδίων στο επιλεγμένο μοντέλο κρίνεται πολύ καλή παρουσιάζοντας συντελεστή γραμμικής συσχέτισης με τιμή κοντά στη μονάδα και συγκεκριμένα 0.8811. Αυτή η καλή προσαρμογή αποδεικνύεται και στο παρακάτω διάγραμμα, όπου απεικονίζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές ληφθείσες τιμές του μεγέθους από τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού. Όμως, οι ευρεθείσες τιμές παρουσιάζουν κάποιες αποκλίσεις από τις προβλεπόμενες από το μοντέλο (Διάγραμμα 9).



Διάγραμμα 9: Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών για το μέγεθος των νανοσωματιδίων

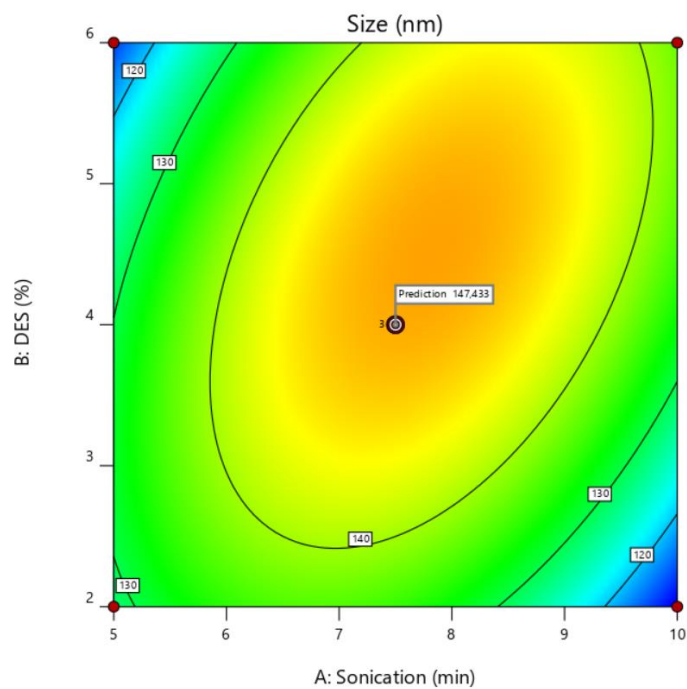
Το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει το μέγεθος των νανοσωματιδίων (δηλαδή την πρώτη απόκριση) σε σχέση με τις ανεξάρτητες μεταβλητές (με χρήση των συμβόλων A,B,C) είναι το ακόλουθο.

$$Size = 147.43 + 1.45 A + 3.17 B - 10.80 C + 10.33 AB - 5.27 BC - 15.80 A^2 - 8.95 B^2 - 6.75 C^2$$

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 111,6 154,7

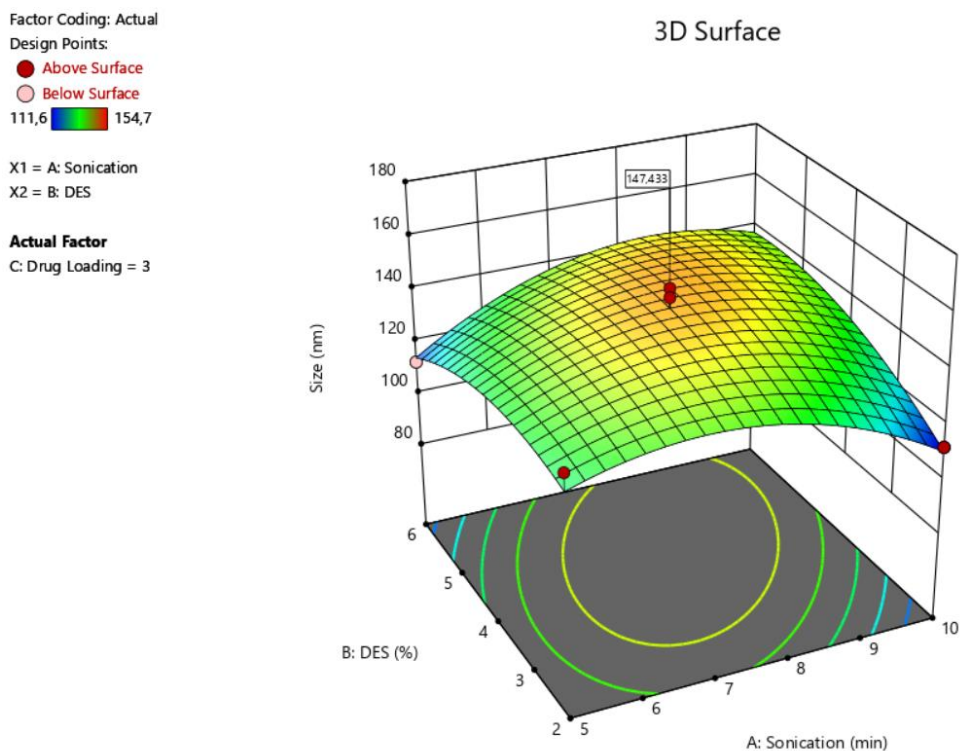
Size (nm) = 136,3
 Std # 13 Run # 14
 X1 = A: Sonication = 7,5
 X2 = B: DES = 4

Actual Factor
 C: Drug Loading = 3



Διάγραμμα 10: Δισδιάστατη απεικόνιση της συσχέτισης του μεγέθους των νανοσωματιδίων με τον χρόνο που εφαρμόζονται υπέρηχοι και την περιεκτικότητα του NaDES

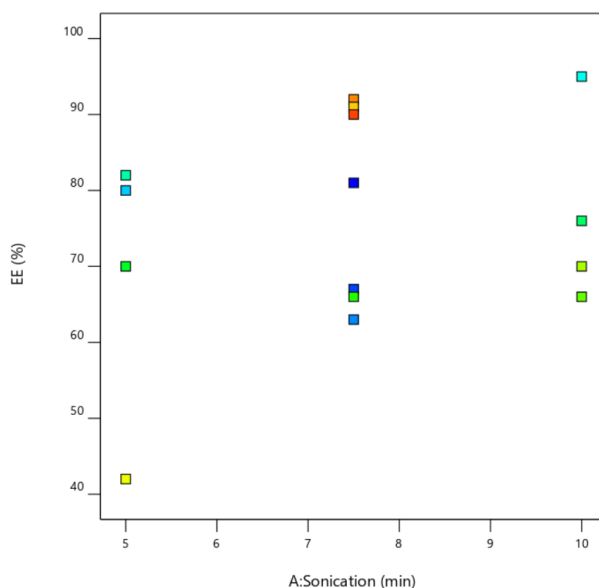
Το Διάγραμμα 10 επιτρέπει τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων για συγκεκριμένο ποσοστό φόρτωσης της βιοδραστικής ένωσης DL=3% w/w. Παραδείγματος χάριν το σημείο (ST=7.5 min, DES= 4% v/v), αναμένεται να δημιουργήσει σωματίδια μεγέθους 147.4 nm έναντι των ευρεθέντων τιμών: 154.7, 151.3, 146.3 nm, αποκλίνοντας από το μέσο όρο κατά 2.9%. Με τις τιμές 151.3 και 146.3 παρουσιάζει σχετικά καλή πρόβλεψη, ενώ με την τιμή 154.7 να αποκλίνει αρκετά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και σε τρισδιάστατο διάγραμμα (Διάγραμμα 11).



Διάγραμμα 11: Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES και ST με το μέγεθος των νανοσωματιδίων

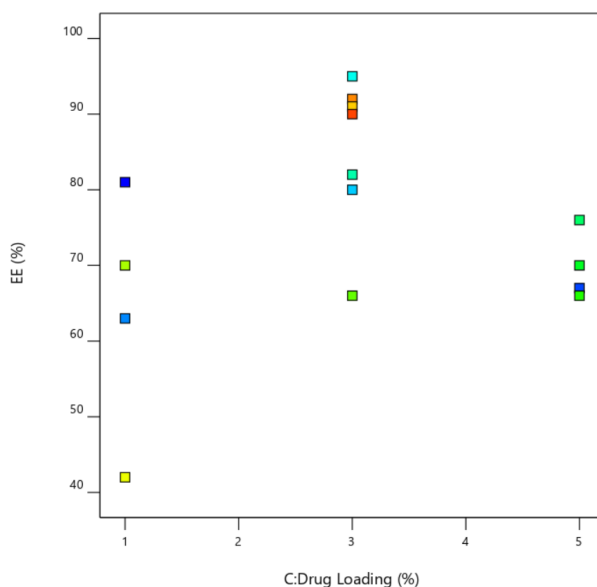
3.3.5.2 Μοντέλο πρόβλεψης της απόδοσης εγκλωβισμού της βιοδραστικής ένωσης

Αφού μελετήθηκε η πρόβλεψη του μεγέθους των νανοσωματιδίων, απαιτείται και η μελέτη της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών στην απόδοση εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **1c**.



Διάγραμμα 12: Συσχέτιση της απόδοσης εγκλωβισμού με τον χρόνο υπερήχων

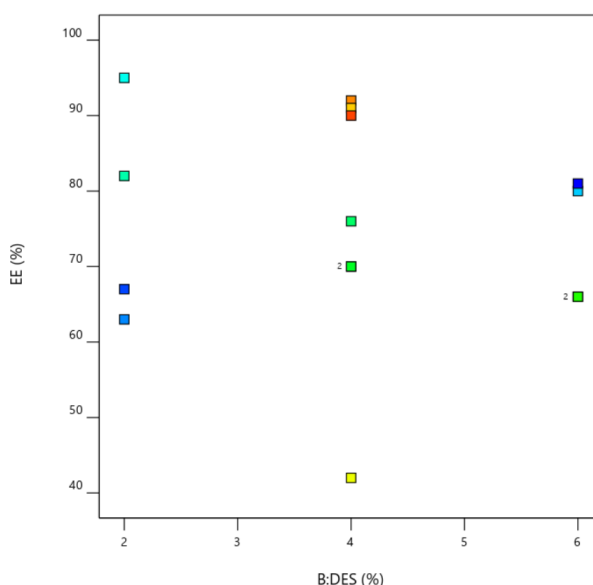
Με βάση το [Διάγραμμα 12](#), διαπιστώνεται ότι για τις μεσαίες προς τις υψηλότερες τιμές του χρόνου υπερήχων επιτυγχάνονται και υψηλότερα ποσοστά της απόδοσης εγκλωβισμού του αντηλιακού φίλτρου. Οι μεγαλύτεροι χρόνοι εφαρμογής υπερήχων έχουν σαν αποτέλεσμα την διάσπαση των συσσωματωμάτων των νανοσωματιδίων. Η παρουσία πολλαπλών και μικρότερων νανοσωματιδίων οδηγεί στον αποδοτικότερο εγκλωβισμό του αντηλιακού φίλτρου, σε αντίθεση με την ύπαρξη μεγάλων συσσωματωμάτων που προκύπτουν όταν εφαρμόζονται υπέρηχοι για μικρότερο χρονικό διάστημα (S. Das & Chaudhury, 2011).



Διάγραμμα 13: Συσχέτιση της απόδοσης εγκλωβισμού με το ποσοστό (w/w) φόρτωσης του αντηλιακού φίλτρου

Όπως είναι εμφανές, το ποσοστό (% w/w) φόρτωσης του αντηλιακού φίλτρου στους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς έχει μεγάλη επίδραση στην απόδοση εγκλωβισμού που υπολογίζεται με άμεσο τρόπο. Παρατηρείται ότι για μεσαίες τιμές του % Drug Loading,

δηλαδή για DL=3% w/w, επιτυγχάνονται οι μεγαλύτερες αποδόσεις εγκλωβισμού. Στις ακραίες τιμές, δηλαδή για DL=1 και 5 %w/w, οι αποδόσεις εγκλωβισμού φαίνεται να είναι χαμηλότερες αλλά χωρίς να παρουσιάζουν μεγάλη απόκλιση μεταξύ τους.



Διάγραμμα 14: Συσχέτιση της απόδοσης εγκλωβισμού με το ποσοστό (% v/v) περιεκτικότητας του διαλύματος επικάλυψης σε DES

Όπως είναι αναμενόμενο, η περιεκτικότητα (% v/v) του διαλύματος επικάλυψης σε NaDES δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την άμεση απόδοση εγκλωβισμού καθώς το διάλυμα της επικάλυψης προστίθεται στη διασπορά μετά την ολονύχτια παραμονή της σε επωαστήρα. Πρακτικά, η επικάλυψη γίνεται αφού τα νανοσωματίδια έχουν σχηματιστεί και το αντηλιακό φίλτρο έχει εγκλωβιστεί. Όμως, παρατηρείται μία ελάχιστη αύξηση της άμεσης απόδοσης εγκλωβισμού όταν η περιεκτικότητα τους DES είναι 4 ή 2 % v/v. Το γεγονός αυτό μπορεί να είναι και τυχαίο καθώς, όπως φαίνεται και στη δημιουργία του αντίστοιχου μοντέλου πρόβλεψης, δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο μεγεθών.

Με βάση τα παραπάνω, για την μεγιστοποίηση της απόδοσης εγκλωβισμού είναι επιθυμητοί οι μεγάλοι χρόνοι εφαρμογής υπερήχων, το μεσαίο ποσοστό φόρτωσης της βιοδραστικής ουσίας, ενώ η περιεκτικότητα του διαλύματος επικάλυψης σε NaDES δεν φαίνεται να παίζει ιδιαίτερο ρόλο.

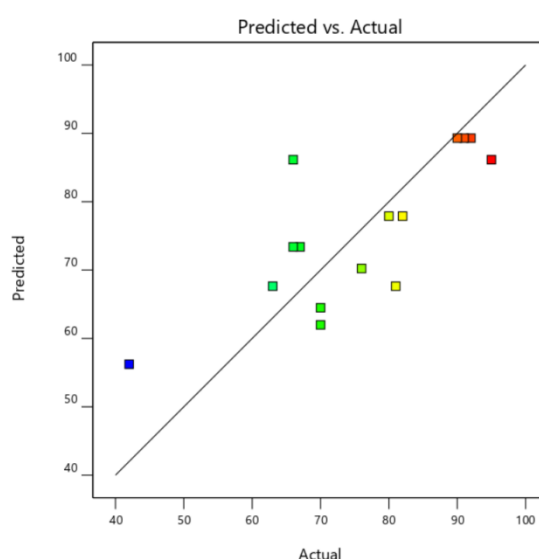
Για τη μελέτη και την πρόβλεψη της απόδοσης εγκλωβισμού και την εξαγωγή των απαιτούμενων εξισώσεων επιλέγεται το τετραγωνικό μοντέλο, «Quadratic». Η αρχική μορφή της εξίσωσης περιέχει τους όρους A,B,C,AB,BC,AC,A²,B² και C², όπου με A, B και C συμβολίζονται οι ανεξάρτητες μεταβλητές. Με A συμβολίζεται ο χρόνος που εφαρμόζονται υπερήχοι στις διασπορές (min), με B η περιεκτικότητα του διαλύματος της χιτοζάνης που χρησιμοποιείται για επικάλυψη σε NaDES (% v/v) και με C το ποσοστό φόρτωσης της βιοδραστικής ένωσης στα σωματίδια (% w/w). Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου εξετάζεται μέσω της στατιστικής ανάλυσης ANOVA η σημαντικότητα των ανεξάρτητων μεταβλητών και των πεπλεγμένων όρων τους. Τελικά, από τη γενική μορφή της εξίσωσης αφαιρούνται σταδιακά όροι με υψηλές τιμές p-value (> 0.05), καθώς δεν είναι στατιστικά σημαντικοί (not significant) και μπορεί να επηρεάζουν αρνητικά την προσαρμογή του

μοντέλου. Πιο συγκεκριμένα, επειδή δεν μπόρεσε να βρεθεί στατιστικά σημαντικό μοντέλο το οποίο να εμπεριέχει την περιεκτικότητα του NaDES στο διάλυμα επικάλυψης, επιλέγεται η συγκεκριμένη ανεξάρτητη μεταβλητή να αγνοηθεί με την εντολή “Ignore”. Με αυτό τον τρόπο το μοντέλο που εξάγεται βασίζεται στις μεταβλητές A και C. Επιπλέον, για να επιτευχθεί p-value μικρότερο από 0.05 αφαιρείται και ο όρος AC. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA για την δεύτερη απόκριση, τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακας 21.

Πίνακας 21: Αποτελέσματα ANOVA για το τετραγωνικό μοντέλο που περιγράφει την δεύτερη απόκριση (την απόδοση εγκλωβισμού)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1645.43	4	411.36	3.60	0.045	sagnificant
A-ST	136.13	1	136.13	1.19	0.3006	
C-DL	66.131	1	66.131	0.5789	0.4643	
A ²	197.31	1	197.31	1.73	0.2181	
C ²	1311.17	1	1311.17	11.48	0.0069	
Residual	1142.17	10	114.22			
Lack of Fit	555.17	4	138.79	1.42	0,3337	not sagnificant
Pure Error	587.00	6	97.83			
Cor Total	2787.60	14				

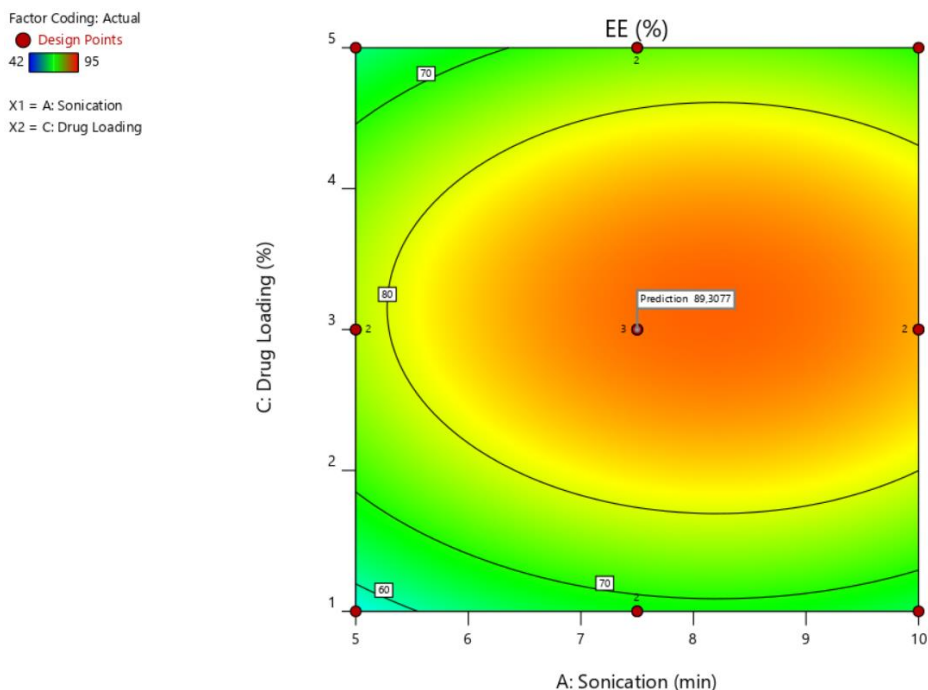
Το μοντέλο, που προκύπτει, είναι σημαντικό, αφού έχει p-value ίση με 0.0456 (<0.05) και F-value ίση με 3.6 (4.46% πιθανότητα αυτή η τιμή να είναι αποτέλεσμα θορύβου). Η F-value της έλλειψης προσαρμογής (Lack of fit) έχει τιμή 1.42, που σημαίνει πως μια μη προσαρμογή στο μοντέλο θα οφείλεται κατά 33.37% σε θόρυβο. Η προσαρμογή των πειραματικών τιμών της απόδοσης εγκλωβισμού στο επιλεγμένο μοντέλο κρίνεται μέτρια παρουσιάζοντας συντελεστή γραμμικής συσχέτισης με τιμή 0.5903. Οι ευρεθείσες τιμές παρουσιάζουν κάποιες αποκλίσεις από τις προβλεπόμενες από το μοντέλο.



Διάγραμμα 15: Συσχέτιση πραγματικών με προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών για την δεύτερη απόκριση (την απόδοση εγκλωβισμού)

Το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει την απόδοση εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **1c** (δηλαδή την δεύτερη απόκριση) σε σχέση με τις ανεξάρτητες μεταβλητές (με χρήση των συμβόλων A και C) είναι το ακόλουθο.

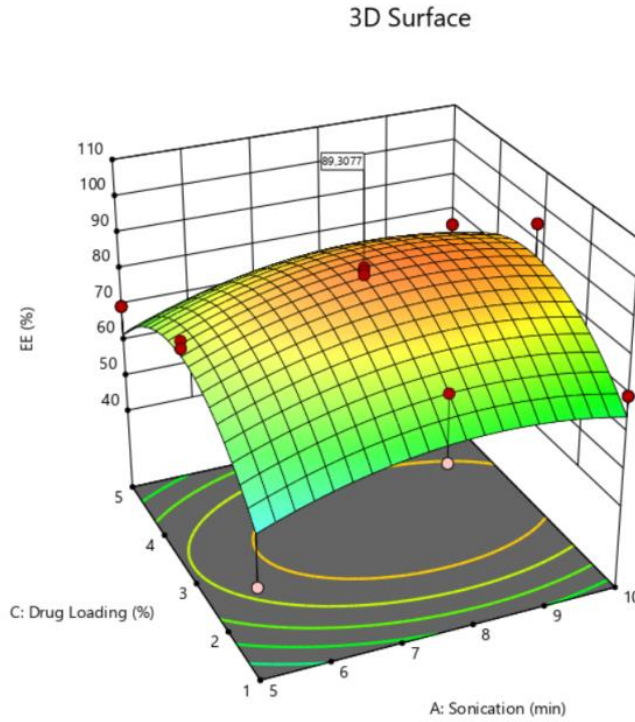
$$EE\% = 89.31 + 4.12 A + 2.88 C - 7.29 A^2 - 18.79 C^2$$



Διάγραμμα 16: Δισδιάστατη απεικόνιση της συσχέτισης της απόδοσης εγκλωβισμού με τον χρόνο που εφαρμόζονται υπέρηχοι και τον χρόνο εφαρμογής υπερήχων

Το **Διάγραμμα 16** επιτρέπει τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων για συγκεκριμένο ποσοστό περιεκτικότητας του NaDES στο διάλυμα χιτοζάνης που προορίζεται για επικάλυψη NaDES=4% v/v. Παραδείγματος χάριν το σημείο (ST=7.5 min, DL= 3% v/v), αναμένεται η απόδοση εγκλωβισμού να είναι 89.3% έναντι των ευρεθέντων τιμών: 91%, 90%, 92%, αποκλίνοντας από το μέσο όρο κατά 1.7%. Με τις τιμές 90% και 91% παρουσιάζει σχετικά καλή πρόβλεψη, ενώ με την τιμή 92% να αποκλίνει περισσότερο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και σε τρισδιάστατο διάγραμμα (**Διάγραμμα 17**).

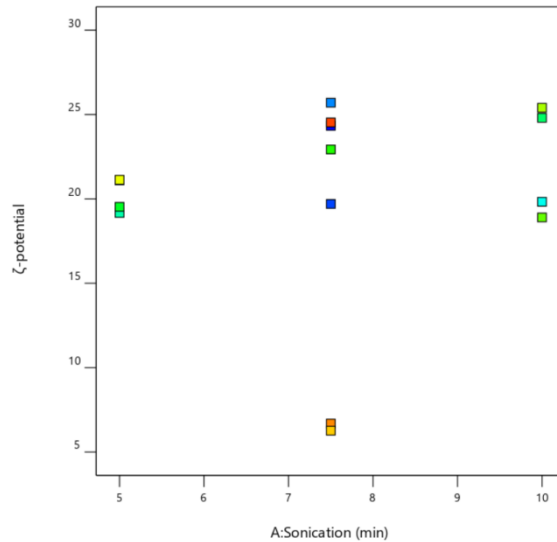
Factor Coding: Actual
 Design Points:
 ● Above Surface
 ○ Below Surface
 42 95
 X1 = A: Sonication
 X2 = C: Drug Loading



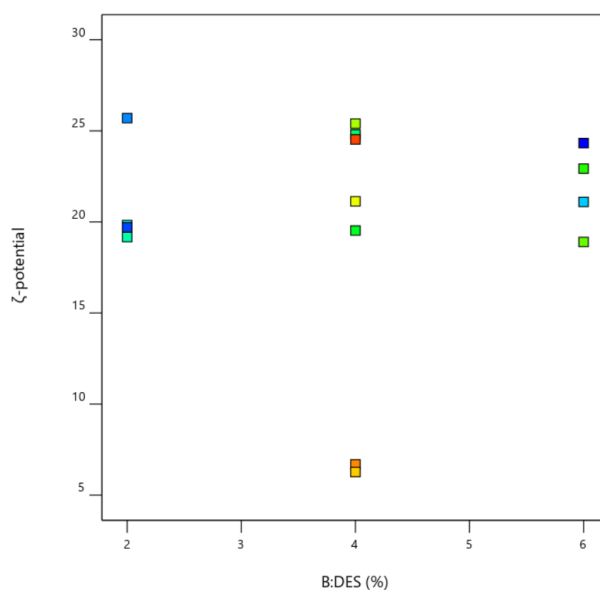
Διάγραμμα 17: Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης ST, DL με το μέγεθος των νανοσωματιδίων

3.3.5.3 Συσχετίσεις για το ζ-δυναμικό

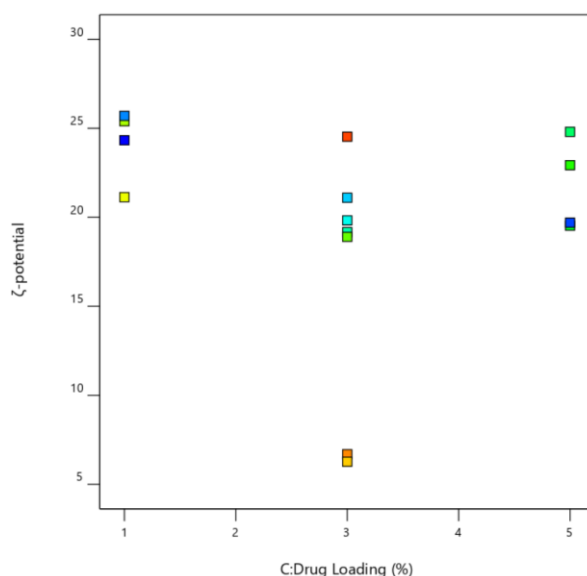
Τέλος, απαιτείται και η μελέτη της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών στο ζ-δυναμικό της επιφάνειας των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων.



Διάγραμμα 18: Συσχέτιση του ζ-δυναμικού με τον χρόνο που οι διασπορές εκτίθενται σε υπερήχους



Διάγραμμα 19: Συσχέτιση του ζ-δυναμικού με το ποσοστό (% v/v) περιεκτικότητας του διαλύματος επικάλυψης σε NaDES



Διάγραμμα 20: Συσχέτιση του ζ-δυναμικού με το ποσοστό (w/w) φόρτωσης του αντηλιακού φίλτρου

Από τα Διάγραμμα 18, Διάγραμμα 19, Διάγραμμα 20 φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα μεταξύ του ζ-δυναμικού και των τριών ανεξάρτητων καθώς οι τιμές του ζ-δυναμικού είναι πολύ κοντινές μεταξύ τους και δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφοροποιήσεις. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι για να επιτευχθεί η επικάλυψη των σωματιδίων αρκεί η χιτοζάνη να είναι πλήρως διαλυτοποιημένη. Η επικάλυψη είναι επιτυχημένη σε όλα τα πειράματα καθώς το ζ-δυναμικό έχει θετικές τιμές. Για αυτό το λόγο, δεν είναι δυνατή η εξαγωγή κάποιου προβλεπτικού μοντέλου για την τιμή του ζ-δυναμικού. Επιλέγεται το ζ-δυναμικό να προβλέπεται μόνο από τον μέσο όρο των τιμών του ζ-δυναμικού που λήφθηκαν από τα 15 πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού. Ο μέσος όρος του ζ-δυναμικού στα 15 πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού είναι 21.1 mV.

Πίνακας 22: Αποτελέσματα για τον μέσο όρο της απόκρισης του ζ-δυναμικού

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0,00	0				
Residual	502.94	14	35.92			
Lack of Fit	285.65	12	23.80	0,2191	0.9664	not significant
Pure Error	217.29	2	108.64			
Cor Total						

3.3.6 Βελτιστοποίηση

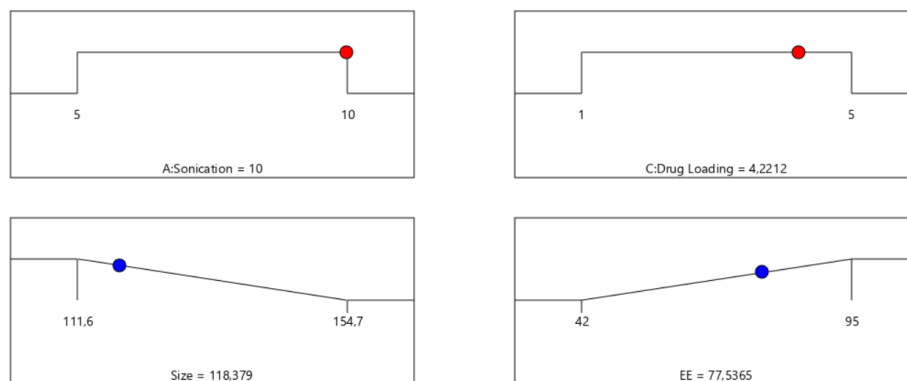
Η βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων γίνεται με γνώμονα την ελαχιστοποίηση του μεγέθους και τη μεγιστοποίηση της άμεσης απόδοσης εγκλωβισμού (EE%). Η παραπάνω ανάλυση για την εξαγωγή μοντέλων πρόβλεψης των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι για υψηλότερες τιμές του ST τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Επιπλέον, για μεγαλύτερες τιμές του ST και για μεσαίες τιμές του DL παρατηρείται μεγιστοποίηση της απόδοσης εγκλωβισμού του αντηλιακού φίλτρου στον νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς. Όσον αφορά το ζ-δυναμικό, δεν θα μπορούσε να συμπεριληφθεί στη βελτιστοποίηση της διεργασίας, καθώς δεν είναι δυνατό να προβλεφθεί η ακριβής τιμή του με βάση τα προτεινόμενα μοντέλα. Τέλος, εάν και υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας του NaDES στο διάλυμα επικάλυψης και του μεγέθους των νανοσωματιδίων, επιλέγεται να μην συμπεριληφθεί στην διαδικασία της βελτιστοποίησης καθώς δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την απόδοση εγκλωβισμού.

Άρα, η διαδικασία της βελτιστοποίησης γίνεται προσδιορίζοντας την τιμή δύο ανεξάρτητων μεταβλητών, του ST και του DL με στόχο την βελτιστοποίηση δύο ανεξάρτητων μεταβλητών, του μεγέθους των νανοσωματιδίων και της άμεσης απόδοσης εγκλωβισμού του αντηλιακού φίλτρου. Αρχικά, ορίζονται το εύρος των τιμών των ανεξάρτητων και των εξαρτημένων μεταβλητών και το κριτήριο βελτιστοποίησης, όπως φαίνονται στον Πίνακας 23:

Πίνακας 23: Όρια τιμών των ανεξάρτητων και των εξαρτημένων μεταβλητών σε συνδυασμό με τα κριτήρια βελτιστοποίησης

	Lower Limit	Upper Limit	Criteria
A: ST (min)	5	10	-
C: DL (%)	1	5	-
Size (nm)	111.6	154.7	Minimize
EE (%)	42	95	Maximize

Με βάση την στατιστική ανάλυση που προηγήθηκε και τα προβλεπτικά μοντέλα που προέκυψαν, η διεργασία εγκλωβισμού του αντηλιακού φίλτρου στα νανοσωματίδια βελτιστοποιείται όταν ο χρόνος εφαρμογής υπερήχων είναι μέγιστος, δηλαδή 10min, και η φόρτωση του αντηλιακού είναι 4.22% w/w. Υπό αυτές τις συνθήκες, το μέγεθος των νανοσωματιδίων αναμένεται να είναι περίπου 118.4 nm ενώ η άμεση απόδοση εγκλωβισμού αναμένεται να είναι 77.5% (Σχήμα 12).



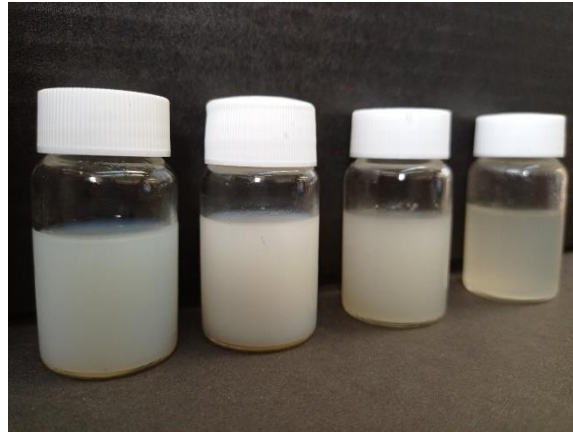
Σχήμα 12: Βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών (κόκκινο) και οι αναμενόμενες αποκρίσεις τους (μπλε)

Επόμενος στόχος είναι η επιβεβαίωση του μοντέλου (confirmation), δηλαδή η επαλήθευση των προβλεπόμενων τιμών των αποκρίσεων για τις προκύπτουσες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών μετά τη βελτιστοποίηση της διεργασίας. Για την πραγματοποίηση της επιβεβαίωσης (confirmation) των βέλτιστων τιμών, συντέθηκαν τρεις νέες διασπορές νανοσωματιδίων με τις βέλτιστες συνθήκες. Εφόσον δεν λήφθηκε βέλτιστη τιμή για την περιεκτικότητα του NaDES στο διάλυμα επικάλυψης, επιλέχθηκε να είναι 4% v/v καθώς από τις συσχετίσεις στην παράγραφο 3.3.5.1 Μοντέλο πρόβλεψης του μεγέθους των σωματιδίων είναι προφανές ότι για μεσαίες προς χαμηλές περιεκτικότητες το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι μικρότερο. Δεν επιλέχθηκε τιμή μικρότερη του 4% v/v διότι το ίδιο το NaDES Βεταΐνη-Γαλακτικό οξύ (1:2) παρουσιάζει από μόνο του μικρή αντηλιακή δράση, η οποία είναι επιθυμητή στην παρούσα εργασία.

Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των διασπορών που σχηματίστηκαν κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες παρουσιάζονται στον Πίνακα 24. Όπως φαίνεται, ο μέσος όρος του μεγέθους των νανοσωματιδίων είναι 117.0 nm με τυπική απόκλιση 5.0 nm, άρα πολύ κοντά στην προβλεπόμενη τιμή του μοντέλου. Ο μέσος όρος της άμεσης απόδοσης εγκλωβισμού είναι 78.7% , τιμή η οποία διαφέρει ελάχιστα από την πρόβλεψη του μοντέλου. Όμως, η τιμή της τυπικής απόκλισης στην περίπτωση αυτή είναι ίση με 23%.

Πίνακας 24: Αξιολόγηση διασπορών για τις βέλτιστες συνθήκες

Πείραμα	Συνθήκες			Αποτελέσματα	
	ST (min)	NaDES (%)	DL (%)	Size (nm)	EE (%)
Run 1	10	4	4.22	114.1	92.6
Run 2	10	4	4.22	122.8	91.9
Run 3	10	4	4.22	114.0	51.5



Εικόνα 34: Βέλτιστες Διασπορές νανοσωματιδίων με βάση το μοντέλο

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 25), λοιπόν, συμπεραίνεται πως η επιβεβαίωση του μοντέλου είναι επιτυχής, καθώς οι μέσες τιμές των αποκρίσεων των τριών εκτελεσμένων πειραμάτων σύμφωνα με τις βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών είναι εντός των ορίων των προβλεπόμενων τιμών τους για ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι το μοντέλο βελτιστοποιείται για τις προτεινόμενες τιμές του Σχήμα 12.

Πίνακας 25: Επιβεβαίωση του μοντέλου για διάστημα εμπιστοσύνης 95%

Confirmation								
Two-sided	Confidence = 95%							
Response	Predicted Mean	Predicted Median	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Date Mean	95% PI high
Size	119.402	119.402	11.371	3	9.0561	99.2236	116.667	139.58
EE	80.8948	80.8948	10.6872	3	8.51158	61.9298	78.6667	99.8598

Μετά την επιβεβαίωση του μοντέλου πραγματοποιήθηκε ο εγκλωβισμός των συνθετικών αντηλιακών φίλτρων **2c** και **3c** σε νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες του Σχήμα 12. Στόχος της μελέτης αυτής ήταν να μελετηθεί κατά πόσο το μοντέλο που προέκυψε από τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **1c** παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα και για τον εγκλωβισμό άλλο συνθετικών αντηλιακών φίλτρων με παρόμοια δομή, τουλάχιστον όσον αφορά τις βέλτιστες συνθήκες. Παράχθηκαν λοιπόν τέσσερις νέες διασπορές νανοσωματιδίων, εκ των οποίων στις δύο είχε εγκλωβιστεί το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο **2c** ενώ στις άλλες δύο το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο **3c**. Οι διασπορές αξιολογήθηκαν ως προς το μέγεθος των νανοσωματιδίων και την απόδοση εγκλωβισμού των αντηλιακών φίλτρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακας 26 και στον Πίνακας 27.

Πίνακας 26: Αξιολόγηση νανοσωματιδίων στα οποία έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας **2c** σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες

Πείραμα	Συνθήκες			Αποτελέσματα	
	ST (min)	NaDES (%)	DL (%)	Size (nm)	EE (%)
Run 1	10	4	4.22	95.8	69
Run 2	10	4	4.22	114.8	82

Πίνακας 27: Αξιολόγηση νανοσωματιδίων στα οποία έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας 3c σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες

Πείραμα	Συνθήκες			Αποτελέσματα	
	ST (min)	NaDES (%)	DL (%)	Size (nm)	EE (%)
Run 1	10	4	4.22	132.1	42
Run 2	10	4	4.22	145.3	34

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων φαίνεται να είναι ικανοποιητικό και στις δύο περιπτώσεις. Τα νανοσωματίδια στα οποία εγκλωβίστηκε ο εστέρας **2c** παρουσιάζουν μέγεθος 105.3 nm κατά μέσο όρο. Η συγκεκριμένη τιμή διαφέρει μόλις κατά 10% από το μέγεθος των βέλτιστων νανοσωματιδίων στα οποία έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας **1c**. Τα νανοσωματίδια στα οποία εγκλωβίστηκε ο εστέρας **3c** παρουσιάζουν, κατά μέσο μέγεθος 138.7nm. Δηλαδή, 18% απόκλιση από το μέγεθος των βέλτιστων νανοσωματιδίων στα οποία έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας **1c**. Σίγουρα, δεν μπορεί να υποστηριχθεί ότι το μοντέλο που εξάχθηκε για την διεργασία εγκλωβισμού του πρώτου συνθετικού αντηλιακού φίλτρου μπορεί να παρέχει ακριβή ή βέλτιστα αποτελέσματα για τον εγκλωβισμό άλλων αντηλιακών φίλτρων. Όμως, μπορεί να παρέχει μία ικανοποιητική πρόβλεψη για το μέγεθος των νανοσωματιδίων, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένδειξη.

Η απόδοση εγκλωβισμού των αντηλιακών φίλτρων **2c** και **3c** με τις βέλτιστες συνθήκες μετρήθηκε με άμεσο τρόπο. Ειδικότερα, η απόδοση εγκλωβισμού του εστέρα **2c** στα NLCs ήταν κατά μέσο όρο 75.5% και πλησιάζει κατά πολύ την κατά μέσο όρο απόδοση εγκλωβισμού του εστέρα **1c**, όπως αυτή προβλέπεται από το μοντέλο. Η απόδοση εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **3c** ήταν η χαμηλότερη από τους τρεις εστέρες και είχε κατά μέσο όρο τιμή 38%. Η συγκεκριμένη τιμή της απόδοσης εγκλωβισμού έχει αρκετά μεγάλη διαφορά σε σχέση με αυτή που προβλέπει το μοντέλο για τις βέλτιστες συνθήκες και το γεγονός αυτό αποτελεί μία ένδειξη ότι για τον εγκλωβισμό του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **3c** χρειάζεται μεγαλύτερη διερεύνηση.

3.4 Αξιολόγηση Αντηλιακής Προστασίας μέσω του παράγοντα SPF και του λc

Η φωτοπροστατευτική δράση των ενώσεων μελετήθηκε ως προς τον δείκτη αντηλιακής προστασίας SPF, τον λόγο της απορρόφησης UVA/UVB, και το κρίσιμο μήκος κύματος, λc. Αρχικά, η μέτρηση των παραπάνω μεγεθών πραγματοποιείται στα χημικά συντιθέμενα φίλτρα σαν καθαρές ενώσεις διαλυμένες σε DBA (σε σταθερή συγκέντρωση 2.5% w/w). Ακολούθως, αξιολογείται και η αντηλιακή δράση που παρουσιάζουν οι διασπορές των νανοσωματιδίων όπου έχουν εγκλωβιστεί τα συνθετικά αντηλιακά φίλτρα (Rai et al., 2012b; Zhao et al., 2019). Οι διασπορές που αξιολογούνται ως προς τη φωτοπροστατευτική τους δράση είναι εκείνες που έχουν συντεθεί με βάση τις βέλτιστες συνθήκες του μοντέλου, και κατ' επέκταση αυτές που παρουσιάζουν το βέλτιστο μέγεθος και την βέλτιστη απόδοση εγκλωβισμού. Για λόγους σύγκρισης, αξιολογούνται οι ακόλουθες διασπορές:

- *Reference*: Μέτρηση του προυπάρχοντος αντηλιακού σκευάσματος.

- *NLCs Blank*: Διασπορά NLCs, στα οποία δεν έχει εγκλωβιστεί κάποιο αντηλιακό φίλτρο και δεν έχει πραγματοποιηθεί επικάλυψη με διάλυμα CS-NaDES, ενσωματωμένη στο προυπάρχον σκεύασμα.
- *NLCs Blank Coated*: Διασπορά NLCs, στα οποία δεν έχει εγκλωβιστεί κάποιο αντηλιακό φίλτρο και έχει πραγματοποιηθεί επικάλυψη με διάλυμα CS-NaDES, ενσωματωμένη στο προυπάρχον σκεύασμα.
- *NLCs Loaded*: Διασπορά NLCs, στα οποία έχει εγκλωβιστεί κάποιο αντηλιακό φίλτρο σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες και δεν έχει πραγματοποιηθεί επικάλυψη με διάλυμα CS-NaDES, ενσωματωμένη στο προυπάρχον σκεύασμα.
- *NLCs Loaded&Coated*: Διασπορά NLCs, στα οποία έχει εγκλωβιστεί κάποιο αντηλιακό φίλτρο σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες και έχει πραγματοποιηθεί επικάλυψη με διάλυμα CS-NaDES, ενσωματωμένη στο προυπάρχον σκεύασμα.

3.4.1 Αξιολόγηση του εστέρα 1c και των αντίστοιχων διασπορών

Αρχικά, πραγματοποιείται η αξιολόγηση του εστέρα 1c σαν καθαρή ένωση διαλυμένη σε DBA (συγκέντρωση 2.5% w/w), ώστε να εξαχθεί συμπέρασμα για τις φωτοπροστατευτικές του ιδιότητες.

Πίνακας 28: Αξιολόγηση του εστέρα 1c ως προς τις φωτοπροστατευτικές του ιδιότητες

	SPF	UVA/UVB	λ_c
Εστέρας 1c	4.81	0.405	349.8

Ο δείκτης προστασίας έναντι της UVB ακτινοβολίας, δηλαδή ο παράγοντας SPF, έχει σχετικά υψηλή τιμή, οπότε ο εστέρας 1c παρουσιάζει σημαντική αντηλιακή προστασία. Επιπλέον, ο λόγος UVA/UVB είναι 0.405. Το κρίσιμο μήκος κύματος του αντηλιακού είναι 349, άρα το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο 1c κατατάσσεται στην κατηγορία των αντηλιακών «καλής UVA προστασίας».

Αφού ο εστέρας 1c παρουσιάζει υψηλή δράση κατά της ακτινοβολίας UV σαν καθαρή ένωση, είναι επιθυμητή και η αξιολόγηση του εγκλωβισμένου εστέρα στους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς. Πραγματοποιείται η ενσωμάτωση 1 ml από τις διασπορές των NLCs σε 5 g του προυπάρχοντος αντηλιακού σκευάσματος και μετρούνται όλα τα δείγματα που λήφθηκαν με στόχο την παρατήρηση της αύξησης του δείκτη SPF.

Πίνακας 29: Αξιολόγηση φωτοπροστατευτικής δράσης των αντίστοιχων διασπορών NLCs στις οποίες έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας 1c

	SPF	STD _{SPF}	UVA/UVB	STD _{UVA/UVB}	λ_c	STD λ_c
Reference	15.12	5.43	0.694	0.01	375.3	0.54
NLCs Blank	15.35	3.96	0.700	0.01	375.6	0.70
NLCs Blank Coated	15.47	2.20	0.684	0.01	374.9	0.25
NLCs Loaded	18.86	3.85	0.688	0.01	375.3	0.25
NLCs Loaded & Coated	16.16	3.02	0.699	0.01	375.6	0.33

Αφού οι διασπορές των νανοσωματιδίων που αξιολογήθηκαν έχουν σχηματιστεί σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες, λαμβάνεται η παραδοχή πως η απόδοση εγκλωβισμού του αντηλιακού θα είναι εκείνη που προβλέπεται από το μοντέλο, δηλαδή 77.5%. Άρα, η ποσότητα του εστέρα που παραμένει εγκλωβισμένη στα νανοσωματίδια είναι 5,72 mg στα 15 ml των διασπορών. Εφόσον για κάθε μέτρηση ενσωματώνεται 1 ml της διασποράς σε 5g του ήδη υπάρχοντος αντηλιακού σκευάσματος, η ποσότητα του εστέρα που ενσωματώνεται και προκαλεί αύξηση στο SPF είναι 0,38 mg. Οπότε, στα τελικά σκευάσματα που μετρήθηκαν η περιεκτικότητα του εστέρα είναι 0,0076%.

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακας 29, παρατηρείται ότι η προσθήκη των NLCs Blank, τα οποία δεν έχει επικαλυφθεί με διάλυμα χιτοζάνης και NaDES, δεν επιφέρει κάποια ιδιαίτερη αύξηση στο παράγοντα SPF του αντηλιακού σκευάσματος. Στην περίπτωση που στο υπάρχον αντηλιακό σκεύασμα προστίθεται το δείγμα NLCs Blank Coated, παρουσιάζεται μία μικρή αύξηση στον παράγοντα αντηλιακής προστασίας, η οποία πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη του NaDES Bet-LA (1:2) στο διάλυμα της επικάλυψης. Η μεγαλύτερη αύξηση του παράγοντα αντηλιακής προστασίας σημειώθηκε στο δείγμα το οποίο περιείχε λιπιδικά νανοσωματίδια στα οποία είχε εγκλωβιστεί το αντηλιακό φίλτρο **1c**, χωρίς όμως να έχει πραγματοποιηθεί η επικάλυψη τους με χιτοζάνη. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση αυτή, δηλαδή στο δείγμα «NLCs Loaded», παρατηρήθηκε αύξηση 24,7% της τιμής του SPF του αρχικού αντηλιακού σκευάσματος. Η αύξηση αυτή θεωρείται σημαντική, ειδικά αν ληφθεί υπ' όψιν ότι η περιεκτικότητα του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου στο δείγμα ήταν 0,0076%. Τέλος, αύξηση του δείκτη SPF παρατηρείται και κατά τη μέτρηση του δείγματος «NLCs Loaded&Coated». Στην περίπτωση αυτής της διασποράς των νανοσωματιδίων, στα οποία είχε εγκλωβιστεί το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο και είχε πραγματοποιηθεί και επικάλυψη με διάλυμα CS-NaDES, η αύξηση που καταγράφεται είναι 6.8%, αν και αναμενόταν αυτό το δείγμα να εμφανίσει τη μεγαλύτερη αύξηση.

3.4.2 Αξιολόγηση του εστέρα **2c** και των αντίστοιχων διασπορών

Πραγματοποιείται η αξιολόγηση του εστέρα **2c** σαν καθαρή ένωση διαλυμένη σε DBA (συγκέντρωση 2.5% w/w), ώστε να εξαχθεί συμπέρασμα για τις φωτοπροστατευτικές του ιδιότητες.

Πίνακας 30: Αξιολόγηση του εστέρα **2c** ως προς τις φωτοπροστατευτικές του ιδιότητες

	SPF	UVA/UVB	λ_c
Εστέρας 2c	9.22	0.381	343.9

Ο δείκτης προστασίας έναντι της UVB ακτινοβολίας, δηλαδή ο παράγοντας SPF, έχει τιμή 9.22, οπότε ο εστέρας **2c** παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή αντηλιακή προστασία. Ο λόγος UVA/UVB είναι 0.381, δηλαδή μικρότερος από 0.410. Με αυτό τον τρόπο το συγκεκριμένο αντηλιακό φίλτρο κατατάσσεται στην κατηγορία των αντηλιακών «μέτριας UVA προστασίας» αλλά πολύ κοντά στην κατηγορία αντηλιακών «καλής UVA προστασίας». Επιπλέον, το κρίσιμο μήκος κύματος του αντηλιακού είναι 343.9. Εάν ληφθεί το κρίσιμο μήκος κύματος σαν παράγοντας αξιολόγησης του αντηλιακού φίλτρου σε σχέση με την UVA

ακτινοβολία, τότε το αντηλιακό φίλτρο κατατάσσεται στην κατηγορία των αντηλιακών «καλής UVA προστασίας» (Diffey, 1994; Moyal, 2008; Stevanato et al., 2014).

Πίνακας 31: Αξιολόγηση φωτοπροστατευτικής δράσης των αντίστοιχων διασπορών NLCs στις οποίες έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας 2c

	SPF	STD _{SPF}	UVA/UVB	STD _{UVA/UVB}	λ _c	STD λ _c
Reference	15.12	5.43	0.694	0.01	375.3	0.54
NLCs Blank	15.35	3.96	0.700	0.01	375.6	0.70
NLCs Blank Coated	15.47	2.20	0.684	0.01	374.9	0.25
NLCs Loaded	15.66	3.07	0.696	0.01	375.2	0.38
NLCs Loaded & Coated	22.47	6.20	0,701	0.01	375.7	0.31

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακας 31, η προσθήκη του εγκλωβισμένου συνθετικού αντηλιακού φίλτρου 2c σε αντηλιακό σκεύασμα προκάλεσε την μεγαλύτερη αύξηση του δείκτη SPF σε σχέση με όλα τα δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων NLCs Loaded&Coated, όπου είχε εγκλωβιστεί ο εστέρας 2c παρουσίασε αύξηση της φωτοπροστατευτικής δράσης του σκευάσματος κατά 48%. Πιθανότατα, μία τόσο μεγάλη αύξηση οφείλεται στη συνεργιστική δράση όλων των εμπορικών αντηλιακών φίλτρων που προυπήρχαν στο σκεύασμα, του εστέρα 2c, και της ποσότητας NaDES Bet-LA (1:2). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, θεωρείται ότι η απόδοση εγκλωβισμού του αντηλιακού φίλτρου 2c είναι ίση με 75.5%, άρα η τελική περιεκτικότητα του στο δείγμα που μετρήθηκε είναι 0.0074%

3.4.3 Αξιολόγηση του εστέρα 3c και των αντίστοιχων διασπορών

Πραγματοποιείται η αξιολόγηση του εστέρα 3c σαν καθαρή ένωση διαλυμένη σε DBA (συγκέντρωση 2.5% w/w), ώστε να εξαχθεί συμπέρασμα για τις φωτοπροστατευτικές του ιδιότητες.

Πίνακας 32: Αξιολόγηση του εστέρα 3 ως προς τις φωτοπροστατευτικές του ιδιότητες

	SPF	UVA/UVB	λ _c
Εστέρας 3c	5.05	0.375	342.4

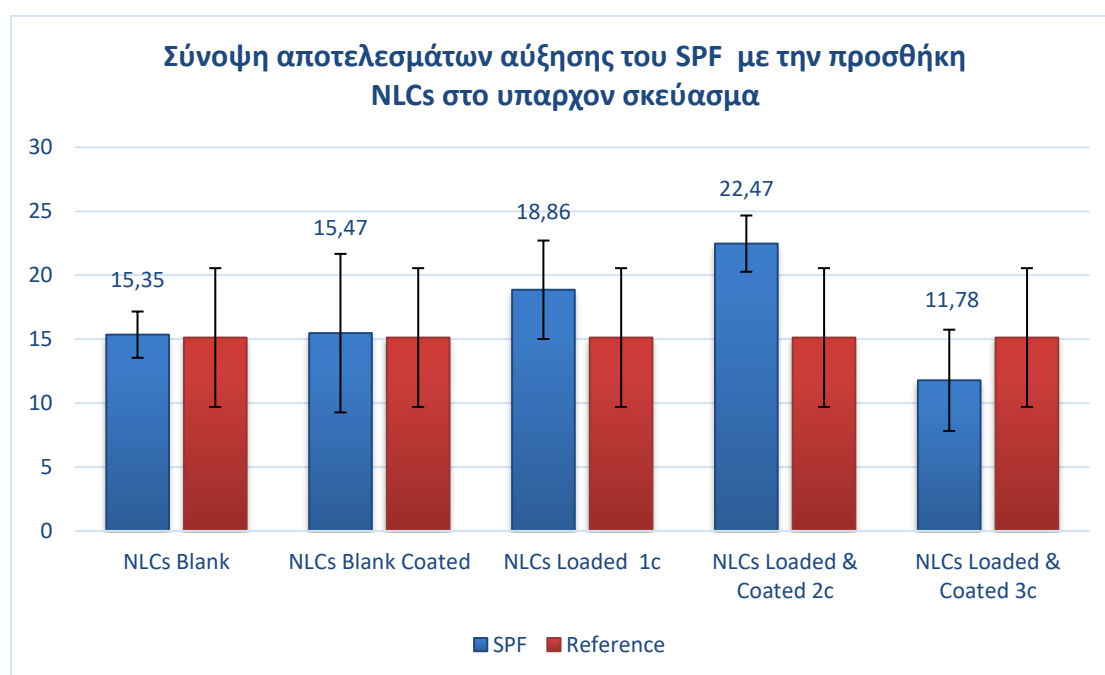
Ο δείκτης προστασίας έναντι της UVB ακτινοβολίας, δηλαδή ο παράγοντας SPF, έχει τιμή 5.05, οπότε ο εστέρας 3c παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή αντηλιακή προστασία. Επιπλέον, ο λόγος UVA/UVB είναι 0.375 και το κρίσιμο μήκος κύματος 342.4. Εάν ληφθεί το κρίσιμο μήκος κύματος σαν παράγοντας αξιολόγησης του αντηλιακού φίλτρου σε σχέση με την UVA ακτινοβολία, τότε το αντηλιακό φίλτρο κατατάσσεται στην κατηγορία των αντηλιακών «καλής UVA προστασίας» (Diffey, 1994; Moyal, 2008; Stevanato et al., 2014).

Πίνακας 33: Αξιολόγηση φωτοπροστατευτικής δράσης των αντίστοιχων διασπορών NLCs στις οποίες έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας 3c

	SPF	STD _{SPF}	UVA/UVB	STD _{UVA/UVB}	λ _c	STD λ _c
Reference	15.12	5.43	0.694	0.01	375.3	0.54

NLCs Blank	15.35	3.96	0.700	0.01	375.6	0.70
NLCs Blank Coated	15.47	2.20	0.684	0.01	374.9	0.25
NLCs Loaded & Coated	11.78	1.81	0.673	0.01	374.3	0.38

Στην περίπτωση που στο προυπάρχον αντηλιακό σκεύασμα προστέθηκαν επικαλυμμένα νανοσωματίδια με εγκλωβισμένο εστέρα **3c**, ο δείκτης προστασίας SPF δεν παρουσίασε κάποια αύξηση. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μείωση κατά 22% στην περίπτωση του δείγματος NLCs Loaded&Coated. Επιπλέον, σε αυτή την περίπτωση δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι η περιεκτικότητα του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **3c** στο αντηλιακό σκεύασμα είναι 0.0076% καθώς η απόδοση εγκλωβισμού στα NLCs ήταν πολύ χαμηλότερη από την προβλεπόμενη από το μοντέλο. Σύμφωνα με τις αποδόσεις εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **3c**, θεωρείται ότι η απόδοση εγκλωβισμού είναι ίση με 38%, άρα η τελική περιεκτικότητα του στο δείγμα που μετρήθηκε είναι 0.0037%.



Διάγραμμα 21: Σύνοψη αποτελεσμάτων για την αύξηση του δείκτη SPF σε υπάρχον αντηλιακό σκεύασμα μετά την προσθήκη των NLCs με τα συνθετικά αντηλιακά φίλτρα

3.5 Αξιολόγηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των αντηλιακών φίλτρων και των αποδεσμευμένων από τα σωματίδια αντηλιακών φίλτρων

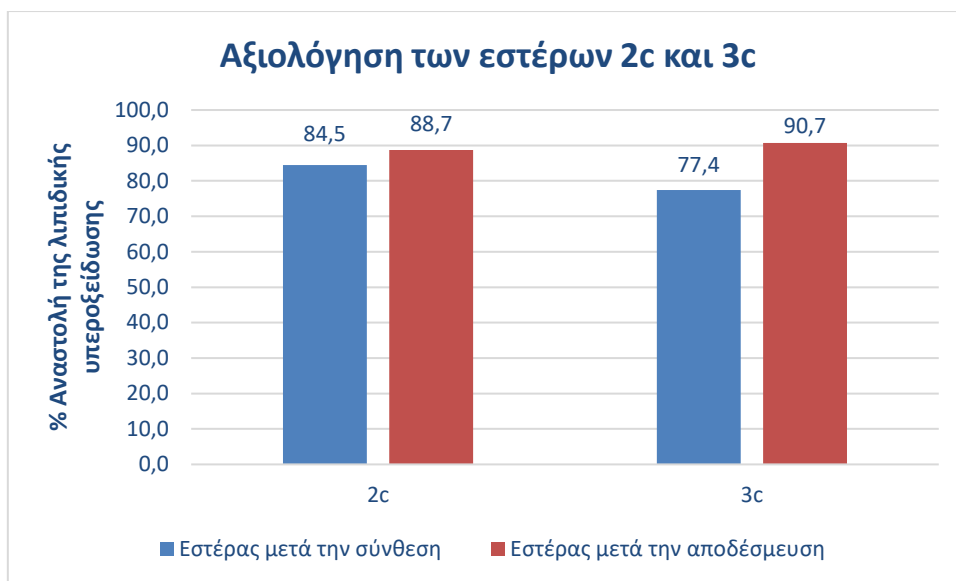
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της *in vitro* βιοδοκιμής για τον έλεγχο της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP), που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH. Εξετάστηκαν τόσο τα αντηλιακά φίλτρα σαν καθαρές ενώσεις σε σταθερή συγκέντρωση, όσο και τα αντηλιακά φίλτρα μετά τον εγκλωβισμό και την αποδέσμευσή τους από τους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς. Το ποσοστό αναστολής αναφέρεται σε συγκέντρωση της εξεταζόμενης ένωσης ίση με 0.10 mM και για μελέτη της αναστολής του φαινομένου της λιπιδικής υπεροξειδωσης για 1 min.



Διάγραμμα 22: Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης του εστέρα 1c και του αποδεσμευμένου από τα σωματίδια εστέρα 1c

Όπως είναι εμφανές από το [Διάγραμμα 22](#), ο εστέρας 1c εμφανίζει έντονη αντιοξειδωτική δράση όταν αξιολογείται η ικανότητά του να αναστέλλει την λιπιδική υπεροξειδωση, επαγόμενη από τον εκκινητή AAPH. Τα ποσοστά αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης ξεπερνά το 80% και, πιο συγκεκριμένα, είναι 93.2% για τον εστέρα 1c όταν η μελέτη πραγματοποιείται μετά την σύνθεση του και 81.6% μετά τον εγκλωβισμό και την αποδέσμευση του από τα NLCs. Η δράση της ένωσης μπορεί να οφείλεται στη δομή του εστέρα και ιδιαίτερα στην ύπαρξη ενός στο φαινολικού υδροξυλίου.

Οι εστέρες 2c και 3c αξιολογήθηκαν σαν καθαρές ενώσεις μετά την σύνθεσή τους αλλά και μετά από τη αποδέσμευσή τους από τα NLCs. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο [Διάγραμμα 23](#). Οι ενώσεις μετά τη σύνθεσή τους εμφάνισαν πολύ υψηλή αντιοξειδωτική δράση, ίση με 84.5% και 77.4% αντίστοιχα. Μετά την αποδέσμευσή του, η ικανότητα του εστέρα 2c να αναστέλλει την λιπιδική υπεροξειδωση αυξήθηκε κατά 4.2% ενώ του εστέρα 3c αυξήθηκε κατά 13.3%. Άρα, αξιοσημείωτο είναι ότι η δράση των αποδεσμευμένων εστέρων είναι ισχυρότερη, γεγονός που υποδεικνύει πως τα συνθετικά αντηλιακά φίλτρα 2c και 3c κατά τον εγκλωβισμό του στα NLCs διατηρούν την αντιοξειδωτική δράση τους, αλλά και ότι ο εγκλωβισμός του οδηγεί σε ενισχυμένη δράση αυτών. Ενδεχομένως, κατά τον εγκλωβισμό τους να επιδέχονται φυσικοχημικές τροποποιήσεις μέσω των δεσμών τους με τους νανοφορείς, οι οποίες και να αυξάνουν την αντιοξειδωτική τους δράση κατά την αποδέσμευσή τους.

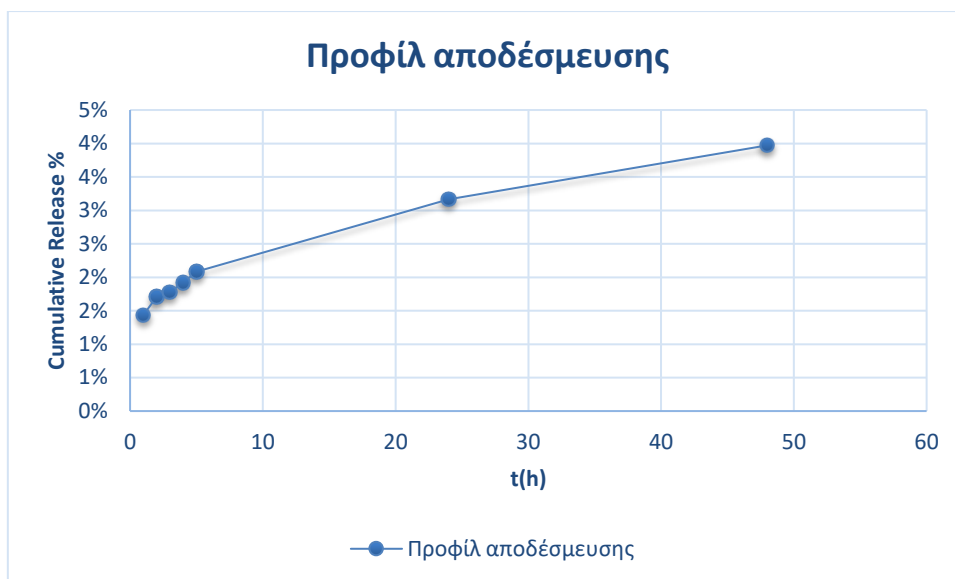


Διάγραμμα 23: Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των εστέρων 2c και 3c και των αποδεσμευμένων από τα σωματίδια εστέρων 2c και 3c

3.6 Μελέτη αποδέσμευσης *in vitro* του εστέρα 1c από τα βέλτιστα νανοσυστήματα

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της αποδέσμευσης του χημικά συντιθέμενου αντηλιακού φίλτρου 1c από το ένα batch νανοδομημένων λιπιδικών φορέων σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες *in vitro* με τη μέθοδο της μεμβράνης διαπίδυσης. Οι συνθήκες στις οποίες μελετάται η αποδέσμευση του εστέρα είναι pH=5.5 και θερμοκρασία 32°C, προσομοιώνοντας με αυτό τον τρόπο τις συνθήκες του ανθρώπινου δέρματος. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε για μη επικαλυμμένα σωματίδια.

Αρχικά, 5ml από τη διασπορά των νανοσωματιδίων τοποθετήθηκε στο εσωτερικό της μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης και στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε 35 ml από το buffer που προσομοιώνει τις συνθήκες του ανθρώπινου δέρματος. Λήφθηκαν δείγματα για τις χρονικές στιγμές 1h,2h,3h,4h,5h,24h και 48h. Η μελέτη της αποδέσμευσης *in vitro* από τα νανοσυστήματα για ακόμη μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (προς επίτευξη μεγαλύτερου ποσοστού αποδέσμευσης) δεν είναι εφικτή με την επιλεγμένη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης – διάχυσης, καθώς οι πολλαπλές αραιώσεις του buffer κατά τις δειγματοληψίες οδηγούν σε αναξιόπιστες μετρήσεις μετά από τις πρώτες ημέρες. Τα δείγματα που λήφθηκαν μετρήθηκαν με την μέθοδο της φασμοτοσκοπίας UV-Vis ώστε να ανιχνευτεί η ένωση που αποδεσμευόταν. Το προκύπτον προφίλ αποδέσμευσης παρουσιάζεται στο [Διάγραμμα 24](#). Αξίζει να σημειωθεί πως το ποσοστό αποδέσμευσης σε κάθε χρονική στιγμή προκύπτει με βάση την μέση απόδοση εγκλωβισμού του εστέρα υπολογισμένη με άμεσο τρόπο, καθώς και αυτή θεωρείται πιο αξιόπιστη.



Διάγραμμα 24: Προφίλ αποδέσμευσης του εστέρα 1c *in vitro* από τους μη επικαλυμμένους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς σε pH=5.5 και θερμοκρασία 32°C

Όπως φαίνεται, το ποσοστό του εστέρα που αποδεσμεύεται τις δύο μέρες στις οποίες ολοκληρώνεται η ανάλυση είναι αρκετά χαμηλό, μόλις 4%, γεγονός που έρχεται σε αντιπαράθεση με αντίστοιχες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στη βιβλιογραφία για τέτοιου είδους νανοσυστήματα (S. R. Castro et al., 2021; Rodrigues da Silva et al., 2017). Στις συγκεκριμένες μελέτες, απεδείχθη ότι οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς παρουσιάζουν όντως προφίλ παρατεταμένης αποδέσμευσης, όμως η αποδέσμευση έχει ολοκληρωθεί σε 24 ή 48 h. Η διαφορά τους με την παρούσα ανάλυση είναι ότι οι ενώσεις που απελευθερώνονταν ήταν ευδιάλυτες στο υδατικό μέσο. Το γεγονός αυτό, υπέδειξε ότι ένα τόσο χαμηλό ποσοστό απελευθέρωσης μετά από δύο ημέρες δεν είναι αντιπροσωπευτικό και ότι η ένωση δεν μπορεί να ανιχνευτεί στο υδατικό μέσο, καθώς είναι δυσδιάλυτη.

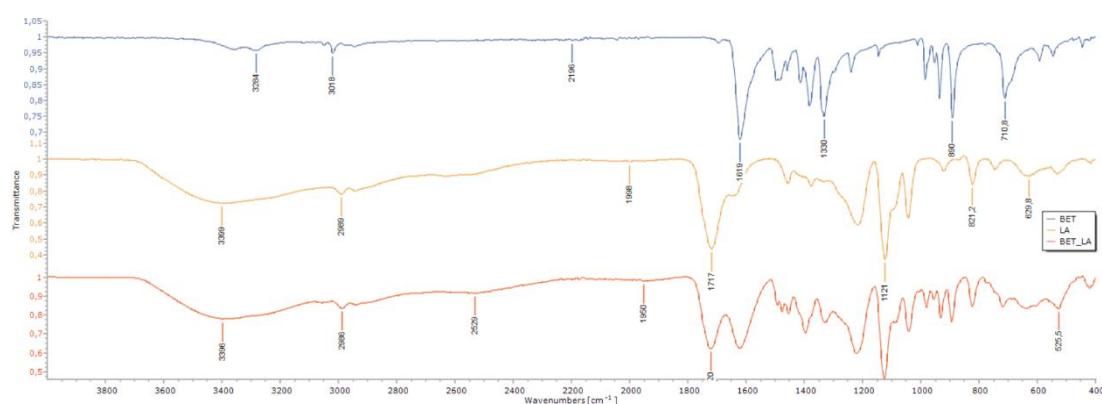
Για την επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης επιλέχθηκε να μελετηθεί η διασπορά των νανοσωματιδίων που είχε παραμείνει στο εσωτερικό της μεμβράνης μετά το πέρας των δύο ημερών. Πιο συγκεκριμένα, το περιεχόμενο της μεμβράνης μεταφέρθηκε σε κατάλληλο vial μαζί με μείγμα διαλυτών ώστε να διασπαστούν τα νανοσωματίδια και να μπορέσει να ανιχνευτεί η ποσότητα του εστέρα 1c που έχει παραμείνει στο εσωτερικό της μεμβράνης και δεν έχει αποδεσμευτεί στο υδατικό μέσο. Η ανάλυση έδειξε ότι στο εσωτερικό της μεμβράνης είχαν παραμείνει μόλις 2.5 mg εστέρα, δηλαδή το 47% της αρχικής ποσότητας που είχε προστεθεί. Άρα το ποσοστό που είχε απελευθερωθεί στο υδατικό μέσο ήταν 53%, σε αντίθεση με το 4%, το οποίο ανιχνεύθηκε. Συμπερασματικά, επειδή η ένωση η οποία μελετάται είναι δυσδιάλυτη το νερό, από τη συγκεκριμένη μέθοδος μελέτης της αποδέσμευσης δεν είναι δυνατή η εξαγωγή κάποιου προφίλ αποδέσμευσης μέσω της προσαρμογής σε πειραματικά σημεία. Είναι όμως δυνατή η εξαγωγή του ποσοστού του εστέρα που έχει αποδεσμευτεί μετά το πέρας των δύο ημερών, εάν διασπαστεί η διασπορά των νανοσωματιδίων που έχει παραμείνει στο εσωτερικό της μεμβράνης.

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

Για τη δομική μελέτη των βέλτιστων νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με εγκλωβισμένο το χημικά συντηθέμενο αντηλιακό φίλτρο **1c**, πραγματοποιείται η λήψη του φάσματος με τη μέθοδο ATR/FT – IR. Πέρα από το φάσμα ATR/FT – IR αυτών, λήφθηκαν και τα αντίστοιχα φάσματα των κενών νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με ή χωρίς επικάλυψη, καθώς και τα φάσματα ορισμένων συστατικών που τα απαρτίζουν (χρησιμοποιούμενος διαλύτης και τα συστατικά αυτού). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προκύπτουν από τη σύγκριση των εκάστοτε φασμάτων που λήφθηκαν.

Αρχικά, στο **Διάγραμμα 25**, παρουσιάζονται στοιβαγμένα τα φάσματα ATR/FT – IR των συστατικών του NaDES που χρησιμοποιείται για την επικάλυψη των νανοσωματιδίων, της βεταΐνης και του γαλακτικού οξέος. Στο φάσμα της βεταΐνης σχηματίζεται μία κορυφή στα 1619 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στις δονήσεις τάσης της καρβονυλικής ομάδας στο μόριό της ($C = O$). Στο φάσμα του γαλακτικού οξέος εμφανείς είναι δύο κορυφές, η πρώτη σε κυματαριθμό 3399 cm^{-1} , η οποία και αντιπροσωπεύει τις δονήσεις τάσης του των ομάδων $O - H$ στα μόριά του, και η δεύτερη σε κυματαριθμό 1717 cm^{-1} , η οποία και αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης των ομάδων $C = O$ στα μόρια του.

Όσον αφορά τώρα το φάσμα του NADES Bet:LA (1:2), στο **Διάγραμμα 25**, μπορεί να παρατηρηθεί μια έντονη ζώνη απορρόφησης στα 3396 cm^{-1} , η οποία και αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης των ομάδων $O - H$ στα μόρια του γαλακτικού οξέος σε αυτόν. Επιπλέον, μια ζώνη απορρόφησης των ομάδων $C = O$ των μορίων του γαλακτικού οξέος εμφανίζεται στα 1720 cm^{-1} , ενώ στα 1621 cm^{-1} παρατηρείται η αντίστοιχη καμπύλη για την καρβονυλική ομάδα της βεταΐνης. Άξιο παρατήρησης είναι το γεγονός πως τόσο οι δονήσεις τάσεις των ομάδων $C = O$ όσο και των ομάδων $O - H$ στο φάσμα του παραγόμενου NaDES είναι μετατοπισμένες συγκριτικά με αυτές των συστατικών του. Αυτό υποδηλώνει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ του δέκτη και του δότη δεσμών υδρογόνου στα ευτηκτικά μίγματα. Με βάση τις δομικές πληροφορίες που λαμβάνονται από το παρακάτω διάγραμμα επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου προς σχηματισμό του NaDES, το φάσμα του οποίου διατηρεί τις χαρακτηριστικές ζώνες των συστατικών του που αντικατοπτρίζουν τις λειτουργικές ομάδες που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις τους (Zafar et al., 2022).



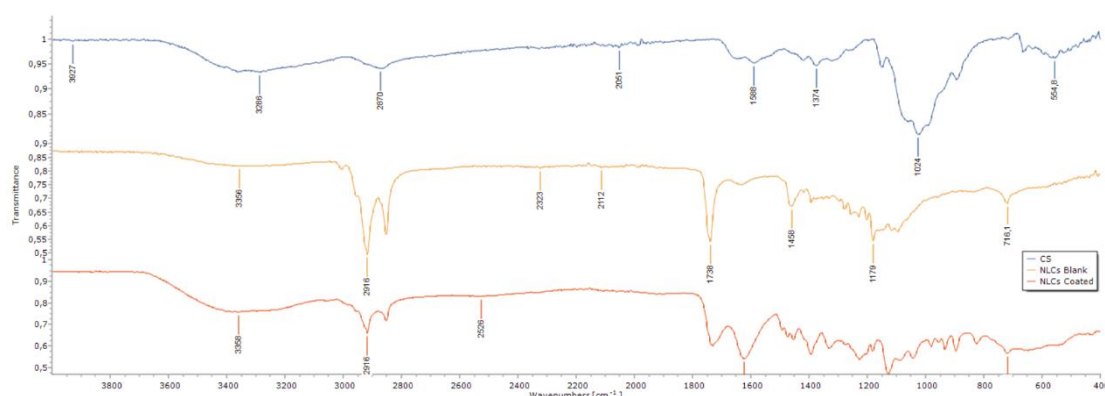
Διάγραμμα 25: Στοιβαγμένα φάσματα ATR/FT – IR της βεταΐνης, του γαλακτικού οξέος του NaDES Bet:LA (1:2)

Οι χαρακτηριστικές κορυφές των φασμάτων που αφορούν το NaDES και τα επιμέρους συστατικά του συνοψίζονται στον Πίνακα 34.

Πίνακας 34: Χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης ATR/FT-IR για τα συστατικά του διαλύματος επικάλυψης

Χαρακτηριστικές Ζώνες Απορρόφησης (cm^{-1})		
Δονήσεις Τάσεων	C=O	O-H
Bet	1619	-
LA	1717	3399
NaDES	1621 & 1720	3396

Επιπλέον, λήφθηκαν τα φάσματα των κενών NLCs (NLCs Blank) και των επικαλυμμένων κενών NLCs (NLCs Coated) καθώς και της καθαρής χιτοζάνης για λόγους σύγκρισης. Στο φάσμα της χιτοζάνης (Διάγραμμα 26), οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3284 cm^{-1} που αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών O – H και N – H, στα 3018 cm^{-1} που οφείλεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης των δεσμών C – H, στα 1619 cm^{-1} , στα 1588 cm^{-1} και στα 1330 cm^{-1} που αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης των δεσμών –NH₂. Μάλιστα, οι τρεις αυτές κορυφές επιβεβαιώνουν ότι η χιτοζάνη που χρησιμοποιείται έχει υψηλό ποσοστό απακετυλίωσης. Τέλος, η κορυφή στα 1027 cm^{-1} αφορά την ασύμμετρη δόνηση τάσης των δεσμών C – O – C (Kaur et al., 2021).

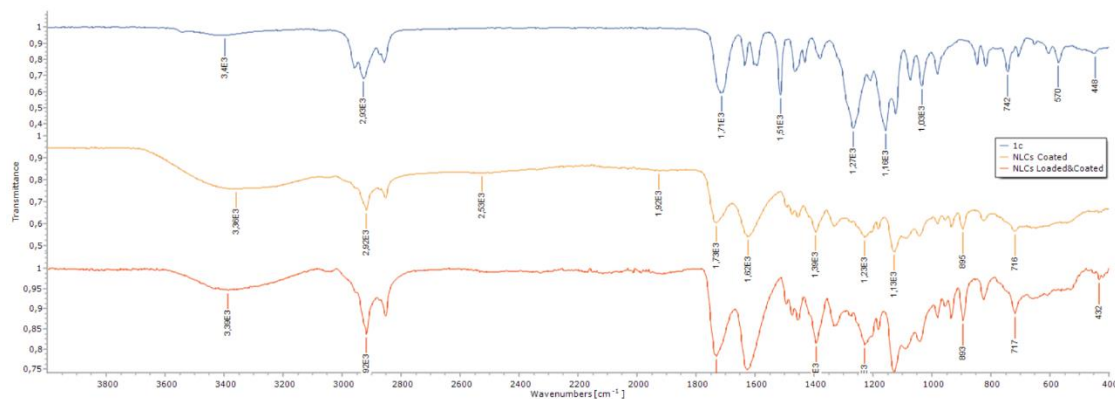


Διάγραμμα 26: Φάσμα ATR/FT-IR της χιτοζάνης και των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με ή χωρίς επικάλυψη

Μέσω σύγκριση των φασμάτων των NLCs Blank με τα επικαλυμμένα NLCs Coated δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφορές όσο αφορά τις πιο χαρακτηριστικές κορυφές. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι στο δείγμα NLCs Coated σημειώνεται μία κορυφή στα 1621 cm^{-1} η οποία δεν διακρίνεται στο φάσμα των NLCs Blank αλλά υπάρχει στο φάσμα της χιτοζάνης. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει την αλληλεπίδραση των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με τη χιτοζάνη και την τελική επικάλυψή τους.

Τέλος, λήφθηκε το φάσμα της καθαρής ένωσης **1c** (Διάγραμμα 27) καθώς και το φάσμα των νανοσωματιδίων στα οποία εγκλωβίστηκε ο εστέρας με τις βέλτιστες συνθήκες, με στόχο την διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους και πως ο εγκλωβισμός επηρεάζει την ένωση **1c**. Στο φάσμα του εστέρα **1c** παρατηρούνται πολλές κορυφές, οι οποίες όμως εμφανίζονται και στο φάσμα των κενών NLCs. Πρόκειται για τις κορυφές σε κυματαριθμό 1160 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} και 3400 cm^{-1} . Επιπλέον, παρατηρείται πως στο φάσμα

του εστέρα υπάρχουν και κάποιες κορυφές που δεν υπάρχουν στο φάσμα των κενών επικαλυμμένων NLCs (NLCs Coated), όπως για παράδειγμα εκείνες σε κυματαριθμό 570 cm^{-1} , 742 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 1273 cm^{-1} και 1510 cm^{-1} . Στο φάσμα των βέλτιστων νανοσωματιδίων (NLCs Loaded&Coated) οι παραπάνω κορυφές δεν υπάρχουν, οπότε το φάσμα των NLCs Loaded&Coated είναι σε μεγάλο βαθμό όμοιο με το φάσμα NLCs Coated. Το γεγονός ότι χαρακτηριστικές κορυφές του εστέρα **1c** δεν υπάρχουν στο φάσμα των νανοσωματιδίων όπου έχει εγκλωβιστεί υποδηλώνει τον επιτυχή εγκλωβισμό του.



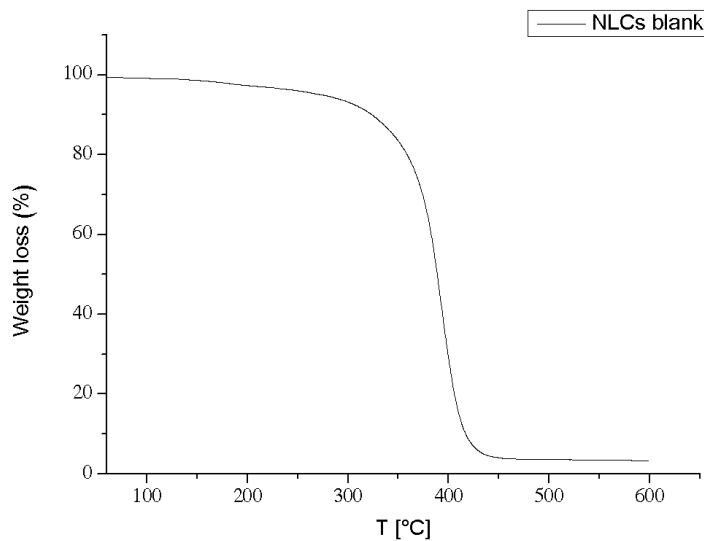
Διάγραμμα 27: Φάσμα ATR/FT-IR του εστέρα 1c και των βέλτιστων νανοσωματιδίων

3.8 Μελέτη θερμικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων με TGA

Για την μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων των NLCs αλλά και για την μελέτη της μεταβολής των θερμικών του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **1c** μετά τον εγκλωβισμό του στα νανοσωματίδια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με την μέθοδο της θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA). Για λόγους σύγκρισης των θερμικών ιδιοτήτων των NLCs, μελετήθηκαν δύο διαφορετικές διασπορές:

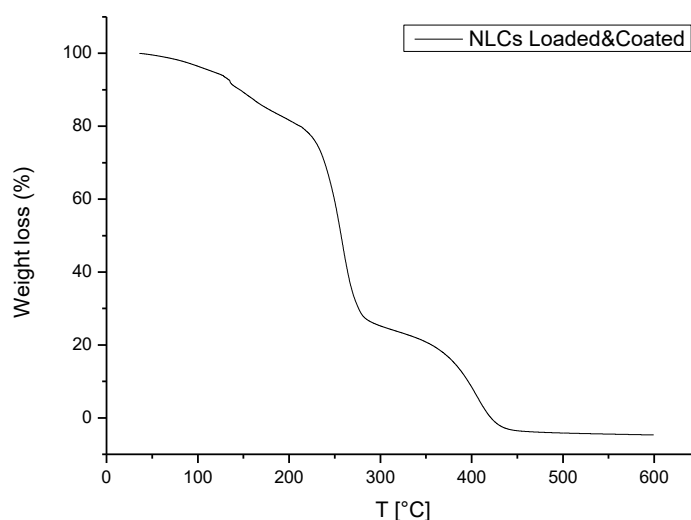
- *NLCs Blank*: Διασπορά NLCs στα οποία δεν έχει εγκλωβιστεί κάποιο αντηλιακό φίλτρο και δεν έχει πραγματοποιηθεί επικάλυψη με διάλυμα CS-NaDES.
- *NLCs Loaded&Coated*: Διασπορά NLCs στα οποία έχει εγκλωβιστεί κάποιο αντηλιακό φίλτρο σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες και έχει πραγματοποιηθεί επικάλυψη με διάλυμα CS-NaDES.

Η σχετική θερμική μετάπτωση των προς ανάλυση δειγμάτων παρατηρήθηκε σε γράφημα TGA. Ειδικότερα, στο δείγμα «NLCs Blank» (Διάγραμμα 28) παρατηρείται μόνο ένα στάδιο θερμικής διάσπασης στο θερμοκρασιακό εύρος $350\text{--}430^\circ\text{C}$. Ο μέγιστος ρυθμός αποικοδόμησης παρουσιάζεται στους 393°C . Εφόσον αυτό το δείγμα αποτελείται κυρίως από τα λιπίδια (τριμυριστίνη και ελαιόλαδο), η θερμική αποδόμηση των λιπιδίων που συμμετέχουν στο σχηματισμό των NLCs πραγματοποιείται στη συγκεκριμένη θερμοκρασία.



Διάγραμμα 28: Καμπύλη TGA για τα κενά NLCs

Στην καμπύλη TGA του δείγματος «NLCs Loaded&Coated» παρουσιάζεται ένα πρώτο στάδιο απώλειας μάζας (περίπου 17%) σε θερμοκρασιακό εύρος 100-150°C (μέγιστος ρυθμός απώλειας 137.5°C. Στη συνέχεια, παρατηρείται ένα δεύτερο στάδιο στο θερμοκρασιακό εύρος 210-290°C. Ο μέγιστος ρυθμός αποικοδόμησης του δείγματος φαίνεται να είναι περίπου στους 260°C. Η απώλεια βάρους στο συγκεκριμένο βήμα αποικοδόμησης είναι 59%. Το μεγάλο ποσοστό απώλειας μάζας σε αυτό το θερμικό εύρος είναι λογικό αφού με βάση τη βιβλιογραφία το NaDES Bet:LA (1:2), που χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη των NLCs, παρουσιάζει μέγιστο ρυθμό αποικοδόμησης στους 252°C (Tzani et al., 2021b). Αφού το NaDES υπάρχει σε περίσσεια στο συγκεκριμένο δείγμα μετά την επικάλυψη των NLCs, στο σημείο που αποικοδομείται θα παρατηρείται και ο μεγαλύτερος ρυθμός απώλειας μάζας. Ακόμα, διαφαίνεται και ένα τρίτο βήμα απώλειας μάζας στο θερμοκρασιακό εύρος 350-450°C, με μέγιστο ρυθμό αποικοδόμησης στους 404°C (απώλεια 28%). Το συγκεκριμένο στάδιο αποικοδόμησης είναι κοινό με αυτό του δείγματος «NLCs Blank», με την διαφορά ότι ο μέγιστος ρυθμός αποικοδόμησης παρουσιάζεται σε θερμοκρασία κατά 10°C μεγαλύτερη. Εξάγεται, λοιπόν, το συμπέρασμα ότι η επικάλυψη των νανοσωματιδίων με το διάλυμα CS-NaDES σταθεροποιεί τα νανοσωματίδια θερμικά. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στις ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φορέα και της χιτοζάνης. Το υπόλειμμα μετά το πέρας της θερμικής ανάλυσης είναι το 4.6% του αρχικού βάρους του δείγματος.



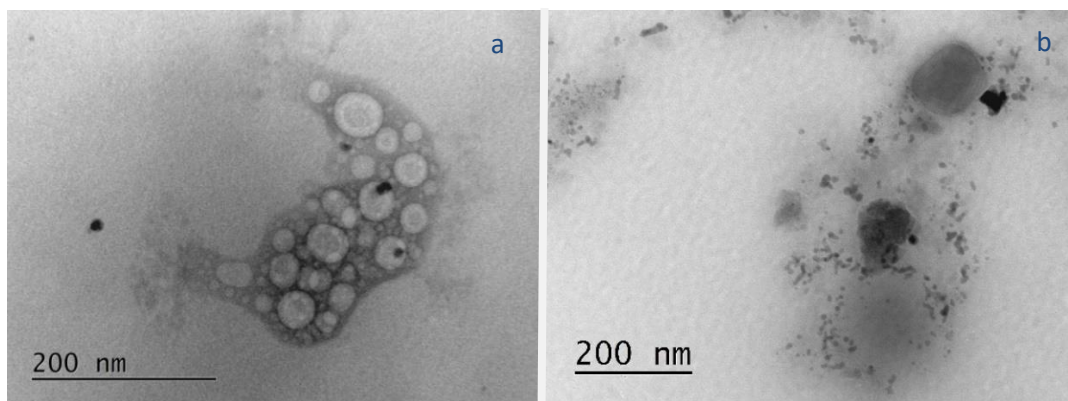
Διάγραμμα 29: Καμπύλη TGA για τα βέλτιστα νανοσωματίδια όπου έχει εγκλωβιστεί το φίλτρο 1c

3.9 Μελέτη της μορφολογίας των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με TEM

Η μελέτη της μορφολογίας των NLCs πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Transmission Electron Microscopy (TEM). Για λόγους σύγκρισης της μορφολογίας των NLCs, μελετήθηκαν τέσσερις διαφορετικές διασπορές:

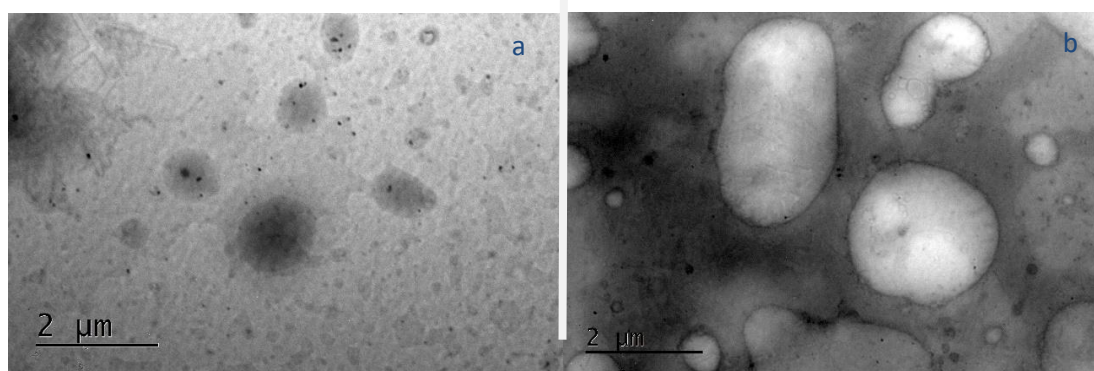
- *NLCs Blank*: Διασπορά NLCs στα οποία δεν έχει εγκλωβιστεί κάποιο αντηλιακό φίλτρο και δεν έχει πραγματοποιηθεί επικάλυψη με διάλυμα CS-NaDES.
- *NLCs Loaded*: Διασπορά NLCs στα οποία έχει εγκλωβιστεί κάποιο αντηλιακό φίλτρο σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες και δεν έχει πραγματοποιηθεί επικάλυψη με διάλυμα CS-NaDES.
- *NLCs Loaded&Coated*: Διασπορά NLCs στα οποία έχει εγκλωβιστεί κάποιο αντηλιακό φίλτρο σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες και έχει πραγματοποιηθεί επικάλυψη με διάλυμα CS-NaDES.
- *SLCs Blank*: Διασπορά νανοσωματιδίων με στερεό λιπίδιο, χωρίς την ύπαρξη του υγρού λιπιδίου.

Αρχικά, η εικόνα που λήφθηκε για το δείγμα NLCs Blank (Εικόνα 35a) επιβεβαιώνει το γεγονός ότι τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν σφαιρικό σχήμα και λεία επιφάνεια. Στο εσωτερικό των νανοσωματιδίων παρατηρείται κάποια ανομοιομορφία, η οποία ενδεχομένως οφείλεται στην άτακτη δομή τους λόγω της ύπαρξη υγρού και στερεού λιπιδίου. Η άτακτη δομή είναι που επιτρέπει άλλωστε και την υψηλή απόδοση εγκλωβισμού της βιοδραστική ένωσης στο εσωτερικό τους. Επιπλέον, το μέγεθος των μη επικαλυμμένων νανοσωματιδίων φαίνεται να είναι σύμφωνο με την κλίμακα της υδροδυναμικής διαμέτρου που λαμβάνεται με την μέθοδο NTA, δηλαδή κυμαίνεται μεταξύ 30 nm και 100 nm.



Εικόνα 35: Εικόνες TEM a) των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων (NLCs Blank) και b) των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (SLNs Blank)

Για την σύγκριση της μορφολογίας διαφορετικών λιπιδικών φορέων, λήφθηκε και η εικόνα TEM ενός δείγματος κενών νανοσωματιδίων στερεού λιπιδίου (SLNs Blank), δηλαδή νανοσωματιδίων που αποτελούνται από το στερεό λιπίδιο, την τριμυριστίνη. Οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς φαίνεται να έχουν καλύτερα καθορισμένο σχήμα σε σχέση με τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs Blank) που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 35b**. Επιπλέον, το μέγεθος των κενών SLNs είναι στο εύρος 20 – 50 nm και μικρότερο από εκείνο των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων χωρίς εγκλωβισμένο συνθετικό αντηλιακό φίλτρο των κενών NLCs και, με βάση την κλίμακα των 200 nm. Τέλος, στο δείγμα των SLNs δεν παρατηρείται η ανομοιομορφία του παρατηρείται στα NLCs και το εσωτερικό τους τμήμα φαίνεται να είναι πιο «συμπαγές». Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ύπαρξη μονάχα ενός στερεού λιπιδίου στο εσωτερικό τους.



Εικόνα 36: Εικόνες TEM από NLCs με εγκλωβισμένο τον εστέρα 1c a) χωρίς επικάλυψη (NLCs Loaded) και b) επικαλυμμένα με διάλυμα CS-NaDES (NLCs Loaded&Coated)

Στην εικόνα TEM των NLCs, στα οποία έχει εγκλωβιστεί το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο **1c** (**Εικόνα 36a**), φαίνεται πως τα νανοσωματίδια μετά τον εγκλωβισμό έχουν σφαιρικό σχήμα και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 570 nm μέχρι 1 μm. Η εικόνα που λήφθηκε για το δείγμα NLCs Loaded&Coated (**Εικόνα 36b**) υποδεικνύει ότι τα νανοσωματίδια μετά την επικάλυψη διατηρούν το σφαιρικό σχήματος και τη λεία επιφάνεια. Παρατηρείται όμως και αύξηση του μεγέθους, λόγω συσσωμάτωσης τους, και ανομοιομορφία στα μεγέθη. Δηλαδή, στην εικόνα διακρίνονται μικρότερα σωματίδια, διαμέτρου 400 nm, με σφαιρικό σχήμα, αλλά και μεγαλύτερα συσσωματώματα με διάμετρο έως 2 μm. Ακόμα, παρατηρείται πως τα επικαλυμμένα NLCs έχουν πιο έντονο περίγραμμα, που πιθανόν να οφείλεται στην

επικάλυψη τους με χιτοζάνη με τον μηχανισμό της επιφανειακής προσρόφησης λόγω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης (S. A. Lee et al., 2017; Zewail et al., 2019).

3.10 Μελέτη σταθερότητας έναντι της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων

Σημαντικό κομμάτι της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η επικάλυψη των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με διάλυμα χιτοζάνης και NaDES Bet:LA (1:2). Η επικάλυψη πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού της προσρόφησης των θετικά φορτισμένων μορίων της χιτοζάνης στην επιφάνεια των αρνητικά φορτισμένων νανοδομημένων λιπιδικών φορέων. Οι λόγοι για τους οποίους επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί η επικάλυψη στους συγκεκριμένους φορείς είναι αφενός η επίτευξη μίας ακόμα πιο παρατεταμένης αποδέσμευσης των χημικά συντιθέμενων αντηλιακών φίλτρων σε σχέση με τα μη επικαλυμμένα σωματίδια, αφετέρου η αποτροπή της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων με το πέρασμα του χρόνου.

Οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς που υπάρχουν σε ένα γαλάκτωμα εμφανίζουν μία αυθόρμητη τάση να συσσωματώνονται με το πέρασμα του χρόνου. Η αύξηση στην τιμή της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου τους μπορεί να είναι εμφανής ακόμα και σε διάστημα 60 ημερών. Επιπλέον, το ποσοστό αύξησης της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων δείχνει να διαφέρει ανάλογα με την σύσταση τους αλλά και με το ποσοστό φόρτωσης της βιοδραστικής ένωσης που προορίζεται για εγκλωβισμό (Rabelo et al., 2018). Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της ικανότητας των επικαλυμμένων νανοδομημένων λιπιδικών φορέων να αντιστέκονται στην συσσωμάτωση σε σχέση με τους μη επικαλυμμένους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς. Στόχος της μελέτης αυτής ήταν η παρατήρηση της συμπεριφοράς των νανοσωματιδίων και κατά πόσο η επικάλυψη τους ενισχύει τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ τους και προλαμβάνει την συσσωμάτωση.

Για τον παραπάνω σκοπό, συντέθηκαν δύο διασπορές NLCs σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες εγκλωβισμού, όπως αυτές είχαν υπαγορευτεί από το μοντέλο. Δηλαδή, ο χρόνος εφαρμογής υπερήχων κατά τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων ήταν 10min, το ποσοστό φόρτωσης του χημικά συντιθέμενου αντηλιακού φίλτρου ήταν 4.22% w/w. Η διαφορά μεταξύ των δύο διασπορών έγκειται στο γεγονός ότι στην μία πραγματοποιήθηκε επικάλυψη με διάλυμα χιτοζάνης και NaDES Bet:LA (1:2) με περιεκτικότητα 4% v/v σε NaDES και 0.3% w/v χιτοζάνη. Αντίθετα, στην δεύτερη διασπορά δεν πραγματοποιήθηκε επικάλυψη. Οι δύο διασπορές μετρήθηκαν ως προς το μέγεθός και την κατανομή των νανοσωματιδίων τους με την μέθοδο Nanoparticle Tracking Analysis σε διάστημα μίας μέρας μετά τον σχηματισμό τους και σε διάστημα 60 ημερών μετά τον σχηματισμό τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 35:

Πίνακας 35: Μεταβολή μεγέθους νανοσωματιδίων σε βάθος χρόνου

	Μέγεθος (nm)	
	1d	60d
NLCs	130.9	162.4

NLCs Coated	116.0	132.4
--------------------	-------	-------

Παρατηρείται ότι μετά την πάροδο των δύο μηνών η μέση υδροδυναμική διάμετρος των νανοσωματιδίων αυξήθηκε αισθητά και στις δύο περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, για τα μη επικαλυμμένα σωματίδια, παρατηρήθηκε αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου κατά 24% μετά το πέρας των δύο μηνών. Αντίθετα, στην περίπτωση των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων, η αντίστοιχη αύξηση ήταν 14%. Άρα, στην περίπτωση των μη επικαλυμμένων νανοσωματιδίων υπάρχει μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στο θετικό φορτίο που αποκτούν τα NLCs μετά την επικάλυψη τους με χιτοζάνη και κατ' επέκταση τις έντονες απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ τους. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η επικάλυψη των νανοσωματιδίων με διάλυμα CS-NaDES, έχει θετική δράση όσον αφορά την σταθερότητα του νανοσυστήματος καθώς καθυστερεί την συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων με την πάροδο του χρόνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η χημική σύνθεση του 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρας (ένωση **1c**), που αποτελεί παράγωγο του φερουλικού οξέος. Η σύνθεση περιλαμβάνει τρία στάδια, την αντίδρασης προστασίας του υδροξυλίου του φερουλικού οξέος, την εστέροποίηση Steglich μεταξύ του προστατευμένου φερουλικού οξέος και της n-οκτανόλης, και την αντίδραση αποπροστασίας με καθαρισμό του τελικού προϊόντος. Οι παραπάνω αντιδράσεις παρουσίασαν απόδοση 97%, 65% και 30% αντίστοιχα. Η ένωση **1c** εμφάνισε καλό προφίλ φωτοπροστατευτικής δράσης, παρουσιάζοντας δείκτη SPF ίσο με 4.81 για συγκεκριμένη συγκέντρωση (2.5% w/w σε διαλύτη DBA). Διαθέτει, επίσης, υψηλή τιμή κρίσιμου μήκους κύματος ($\lambda_c = 349.8$ nm), καθώς και αρκετά υψηλό λόγο UVA/UVB (0.405), επομένως χαρακτηρίστηκε ως αντηλιακό καλής UVA προστασίας και είναι υποψήφιο μόριο για περαιτέρω διερεύνηση της εφαρμογής του ως αντηλιακό φίλτρο. Επιπλέον, εμφάνισε πολύ υψηλή ικανότητα αναστολής της λιπιδική υπεροξειδωσις που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, ίση με 93%.

Στην συνέχεια, αναπτύχθηκε η διεργασία εγκλωβισμού του ανωτέρω συνθετικού αντηλιακού φίλτρου σε νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς (NLCs), με τη μέθοδος παρασκευής τους να είναι η γαλακτωματοποίηση με εξάτμιση του διαλύτη. Το στερεό λιπίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των NLCs ήταν η τριμυριστίνη, η οποία απομονώθηκε από μοσχοκάρυδο, ενώ αξιολογήθηκαν δύο υγρά λιπίδια, το ελαιόλαδο και το έλαιο αμυγδάλου. Τα NLCs που παρασκευάστηκαν με ελαιόλαδο παρουσίασαν κατά μέσο όρο μικρότερα μεγέθη και καλύτερη απόδοση εγκλωβισμού, οπότε το ελαιόλαδο επιλέχθηκε να είναι το υγρό λιπίδιο που θα χρησιμοποιούταν για τον πειραματικό σχεδιασμό. Ακόμα, πραγματοποιήθηκε η επικάλυψη των νανοσωματιδίων με χιτοζάνη. Μάλιστα, η μέθοδος επικάλυψης αποκτά πράσινο χαρακτήρα καθώς η διαδικασία περιλαμβάνει τη διαλυτοποίηση του κατιοντικού πολυσακχαρίτη της χιτοζάνη στο φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη (NaDES) βεταΐνης – γαλακτικού οξέος (Bet:LA) σε γραμμομοριακή αναλογία (1:2). Η πολυμερική επικάλυψη των NLCs με χιτοζάνη, μελετήθηκε με δυναμική σκέδαση φωτός DLS και οι θετικές τιμές του ζ-δυναμικού, έναντι των αρνητικών τιμών στην περίπτωση των μη επικαλυμμένων NLCs, επιβεβαίωσαν την επιτυχή επικάλυψη.

Για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός Box Behken δεκαπέντα πειραμάτων, με χρήση του προγράμματος Design Expert. Οι παράμετροι οι οποίες εξετάστηκαν ήταν: ο χρόνος εφαρμογής υπερήχων στη διασπορά των νανοσωματιδίων κατά τον σχηματισμό τους, η περιεκτικότητα % v/v του NaDES στο διάλυμα επικάλυψης και το ποσοστό φόρτωσης του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου % w/w DL. Οι προς μελέτη αποκρίσεις ήταν το μέγεθος των νανοσωματιδίων, η απόδοση εγκλωβισμού (% EE) του αντηλιακού φίλτρου στα νανοσωματίδια και η τιμή του ζ-δυναμικού. Εξάχθηκαν μοντέλα πρόβλεψης για το μέγεθος των νανοσωματιδίων και την απόδοση εγκλωβισμού σε σχέση με τις παραμέτρους, όμως δεν ήταν δυνατό να εξαχθεί μοντέλο πρόβλεψης για τις τιμές του ζ-δυναμικού, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις η τιμές του ήταν πολύ κοντινές στα +30 mV. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η επικάλυψη των

νανοσωματιδίων ήταν επιτυχημένη για όλες τις τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών και τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια παρουσιάζουν σταθερότητα.

Άρα, για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού οι ανεξάρτητες μεταβλητές που επιλέχθηκαν τελικά είναι ο χρόνος εφαρμογής υπερήχων στη διασπορά των νανοσωματιδίων κατά τον σχηματισμό τους και το ποσοστό φόρτωσης του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου % w/w DL. Στόχος της βελτιστοποίησης ήταν η ελαχιστοποίηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων και η μεγιστοποίηση της απόδοσης εγκλωβισμού του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου. Έτσι, προέκυψαν οι βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών, οι οποίες είναι: 10min εφαρμογή υπερήχων στις διασπορές κατά το σχηματισμό των νανοσωματιδίων και 4.22% w/w DL, ενώ η περιεκτικότητα του NaDES στο διάλυμα επικάλυψης επιλέχθηκε να διατηρηθεί 4% v/v. Ταυτόχρονα, για τις βέλτιστες αυτές τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών προέκυψαν και οι προβλεπόμενες από το στατιστικό μοντέλο τιμές των αποκρίσεων. Οι βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών επιβεβαιώθηκαν μέσω τριών νέων πειραμάτων και οι προβλεπόμενες τιμές των αποκρίσεων για ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95% είναι: μέγεθος νανοσωματιδίων 118.4 nm και απόδοση εγκλωβισμού 77.5%.

Μετά την βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού και την αξιολόγηση των ιδιοτήτων των βέλτιστων NLCs, εγκλωβίστηκαν και άλλα δύο συνθετικά αντηλιακά φίλτρα σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες που παρουσιάστηκαν παραπάνω. Τα φίλτρα που εγκλωβίστηκαν ήταν 4-μεθοξυβενζυλο (E)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο) ακρυλικός εστέρας (ένωση **2c**) και ο 4-(tert-βουτυλο)βενζυλο (E)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο) ακρυλικός εστέρας (ένωση **3c**). Τα συνθετικά αντηλιακά φίλτρα **2c** και **3c** αξιολογήθηκαν και ως προς την φωτοπροστατευτική τους δράση. Το φίλτρο **2c** παρουσιάζει πολύ έντονη φωτοπροστατευτική δράση με δείκτη SPF ίσο με 9.22 για συγκεκριμένη συγκέντρωση (2.5% w/w σε διαλύτη DBA), λ_c ίσο με 343.9 nm και λόγο UVA/UVB ίσο με 0.381. Οι αντίστοιχες τιμές για το φίλτρο **3c** είναι 5.05, 342.4 nm και 0.375. Μετά τον εγκλωβισμό του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **2c** σε NLCs, το μέγεθος των νανοσωματιδίων ήταν κατά μέσο όρο 105.3 nm \pm 13.5 nm και η απόδοση εγκλωβισμού ήταν 75.5%. Αντίστοιχα, τα NLCs στα οποία εγκλωβίστηκε το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο **3c** παρουσίασαν μέγεθος 138.7 nm \pm 9.3 nm ενώ η απόδοση εγκλωβισμού ήταν σχετικά χαμηλή, 38% \pm 6%. Συμπερασματικά, είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί ο εγκλωβισμός και άλλων συνθετικών αντηλιακών φίλτρων με τις βέλτιστες συνθήκες της διεργασίας εγκλωβισμού του αντηλιακού φίλτρου **1c** και να ληφθούν πολύ ικανοποιητικές τιμές για τις επιθυμητές αποκρίσεις.

Εκτός από την αξιολόγηση των τριών αντηλιακών συνθετικών φίλτρων, μελετήθηκε και το ποσοστό αύξησης της φωτοπροστατευτικής δράσης ήδη υπάρχοντος αντηλιακού σκευάσματος με δείκτη προστασίας SPF 15, αφού σε αυτό προστέθηκαν NLCs στα οποία είχαν εγκλωβιστεί τα τρία συνθετικά αντηλιακά φίλτρα. Όσον αφορά τα NLCs με εγκλωβισμένο το φίλτρο **1c**, η προσθήκη 500μL της διασποράς σε 5g (προσθήκη περίπου 0.38 mg εστέρα) του ήδη υπάρχοντος αντηλιακού σκευάσματος, αύξησε τον δείκτη προστασίας SPF του αντηλιακού κατά 24.7% όταν τα NLCs όπου είχε εγκλωβιστεί το αντηλιακό φίλτρο δεν ήταν επικαλυμμένα με χιτοζάνη και κατά 6.8% όταν είχε πραγματοποιηθεί επικάλυψη. Το μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης του παράγοντα SPF προκάλεσε η προσθήκη επικαλυμμένων NLCs στα οποία είχε εγκλωβιστεί το συνθετικό

αντηλιακό φίλτρο **2c**. Η προστατευτική δράση του αντηλιακού σκευάσματος έναντι της UVB ακτινοβολίας αυξήθηκε κατά 48% με προσθήκη μικρής ποσότητας του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου (0.38 mg). Η προσθήκη NLCs με εγκλωβισμένο το αντηλιακό φίλτρο **3c** δεν προκάλεσε κάποια αύξηση του παράγοντα SPF.

Τέλος, μελετήθηκε και η ικανότητα αναστολής της λιπιδική υπεροξειδωσής που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH των συνθετικών αντηλιακών φίλτρων μετά την αποδέσμευσή τους από τα νανοσωματίδια. Η ικανότητα του αντηλιακού φίλτρου **1c** να αναστέλλει την λιπιδική υπεροξειδωσής μειώθηκε στο 81.6%, έναντι του 93% που εμφάνισε πριν εγκλωβιστεί. Οι ενώσεις **2c** και **3c** μετά τη σύνθεσή τους εμφάνισαν πολύ υψηλή αντιοξειδωτική δράση, ίση με 84.5% και 77.4% αντίστοιχα. Μετά την αποδέσμευσή, η ικανότητα του εστέρα **2c** να αναστέλλει την λιπιδική υπεροξειδωσής αυξήθηκε στο 88.7% ενώ του εστέρα **3c** αυξήθηκε στο 90.7%. Άρα, η δράση των αποδεσμευμένων εστέρων είναι ισχυρότερη, γεγονός που υποδεικνύει πως τα συνθετικά αντηλιακά φίλτρα **2c** και **3c** κατά τον εγκλωβισμό του στα NLCs διατηρούν την αντιοξειδωτική δράση τους, αλλά και ότι ο εγκλωβισμός του οδηγεί σε ενισχυμένη δράση αυτών. Ενδεχομένως, κατά τον εγκλωβισμό τους να επιδέχονται φυσικοχημικές τροποποιήσεις μέσω των δεσμών τους με τους νανοφορείς, οι οποίες και να αυξάνουν την αντιοξειδωτική τους δράση κατά την αποδέσμευσή τους.

Τα βέλτιστα NLCs (κενά ή με εγκλωβισμένο αντηλιακό φίλτρο) μελετήθηκαν δομικά μέσω φασματοσκοπίας υπεράυθρου με μετασχηματισμό Fourier και αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR/FT – IR). Η ομοιότητα που παρατηρείται μεταξύ των φασμάτων τους, ώστε να μη διακρίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της εγκλωβισμένης ένωσης, υποδεικνύει τον επιτυχή εγκλωβισμό. Επιπλέον, μελετήθηκε και η αποδέσμευση του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου από τα βέλτιστα νανοσυστήματα *in vitro* με τη μέθοδο της μεμβράνης διαπίδυσης σε συνθήκες προσομοίωσης του ανθρώπινου δέρματος. Επειδή η προς μελέτη ένωση είναι δυσδιάλυτη στο νερό, δεν ήταν δυνατό να εξαχθεί προφίλ αποδέσμευσης αλλά παρατηρήθηκε ότι σε διάστημα 48 h, είχε αποδεσμευτεί το 53% της αρχικής ποσότητας της εγκλωβισμένης ένωσης. Αποδεικνύεται, έτσι, πως τα συστήματα αυτά παρέχουν τη δυνατότητα παρατεταμένης αποδέσμευσης του φίλτρου.

Η μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων των βέλτιστων νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου της θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA). Στο γράφημα TGA των κενών νανοδομημένων λιπιδικών φορέων, παρατηρείται μόνο ένα στάδιο θερμικής διάσπασης στο θερμοκρασιακό εύρος 350-430°C. Το συγκεκριμένο στάδιο αποτελεί το στάδιο αποικοδόμησης των λιπιδίων που συμμετέχουν στον σχηματισμό των NLCs. Ο μέγιστος ρυθμός αποικοδόμησης παρουσιάζεται στους 393°C. Τα βέλτιστα νανοσωματίδια στα οποία είχε εγκλωβιστεί ο εστέρας **1c** αποικοδομήθηκαν θερμικά σε τρία στάδια και ο μεγαλύτερος ρυθμός αποικοδόμησης παρουσιάστηκε στους 260°C, όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς στο συγκεκριμένο θερμοκρασιακό εύρος αποικοδομείται το NaDES Bet-Lac (1:2), το οποίο βρίσκεται σε περίσσεια στο δείγμα. Η απώλεια της μάζας στο βήμα όπου παρουσιάστηκε ο μέγιστος ρυθμός αποικοδόμησης ήταν το 58%. Το τρίτο στάδιο αποικοδόμησης των βέλτιστων νανοσωματιδίων παρουσιάστηκε στο θερμοκρασιακό εύρος 350-450°C, με μέγιστο ρυθμό αποικοδόμησης στους 404°C και η απώλεια μάζας ήταν 28%. Το συγκεκριμένο στάδιο αποικοδόμησης είναι κοινό με αυτό του δείγματος των NLCs, με την

διαφορά ότι ο μέγιστος ρυθμός αποικοδόμησης παρουσιάζεται σε θερμοκρασία κατά 10°C μεγαλύτερη. Εξάγεται, λοιπόν, το συμπέρασμα ότι η επικάλυψη των νανοσωματιδίων με το διάλυμα CS-NaDES προσφέρει θερμική σταθερότητα στα λιπίδια που συμμετέχουν στο σχηματισμό των NLCs.

Η μελέτη της μορφολογίας των βέλτιστων NLCs πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διαπερατότητας (TEM). Αρχικά, η σύγκριση της μορφολογίας των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων χωρίς εγκλωβισμένο συνθετικό αντηλιακό φίλτρο (Blank-NLCs) με τη μορφολογία των στερεών νανοσωματιδίων λιπιδικής σύστασης χωρίς εγκλωβισμένο συνθετικό αντηλιακό φίλτρο (Blank-SLNs) υποδεικνύει πως το εσωτερικό των Blank-NLCs εμφανίζει μια άτακτη δομή κάτι που αποδίδεται στον συνδυασμό του στερεού και του υγρού λιπιδίου, η οποία δεν παρατηρείται στα Blank-SLNs. Αξίζει να σημειωθεί πως η άτακτη δομή είναι που επιτρέπει και την υψηλή απόδοση εγκλωβισμού της βιοδραστικής ένωσης στο εσωτερικό τους. Από τις εικόνες TEM προκύπτει ότι τα Blank-SLNs παρουσιάζουν μικρότερο μέγεθος σε εύρος από 20 nm έως 50 nm σε σχέση με τα Blank-NLCs αλλά και σε σχέση με τα επικαλυμμένα NLCs (Loaded&Coated-NLCs). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των Loaded&Coated-NLCs και των μη επικαλυμμένων με χιτοζάνη στα οποία έχει εγκλωβιστεί το συνθετικό αντηλιακό φίλτρο **1c** (Loaded-NLCs). Τα Loaded&Coated-NLCs και Loaded-NLCs παρουσίασαν σφαιρικό και η λεία επιφάνεια. Όμως, οι εικόνες TEM των Loaded&Coated-NLCs έδειξαν καλύτερα καθορισμένη επιφάνεια και εμφάνισαν πιο «έντονο» περίγραμμα, που πιθανόν να οφείλεται στην επικάλυψη τους με χιτοζάνη με τον μηχανισμό της επιφανειακής προσρόφησης λόγω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης. Τα Loaded&Coated-NLCs παρουσίασαν και εμφανώς μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τα κενά NLCs, με το μέγεθος τους να κυμαίνεται από 400 nm έως και 2.7 μm.

Απαραίτητη, επίσης, κρίθηκε και η παρακολούθηση της σταθερότητας των νανοσωματιδίων έναντι της αυθόρμητης τάσης τους προς συσσωμάτωση. Το χαρακτηριστικό μέγεθος που επιλέχθηκε να μελετηθεί σε βάθος χρόνο σαν ένδειξη της συσσωμάτωσης ήταν το μέγεθος της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι μετά το πέρας δύο μηνών το μέγεθος των νανοσωματιδίων αυξάνεται αισθητά. Το μέγεθος των μη επικαλυμμένων νανοσωματιδίων αυξήθηκε κατά 24%, ενώ το μέγεθος των επικαλυμμένων με διάλυμα CS-NaDES νανοσωματιδίων αυξήθηκε κατά 14%. Εξάγεται λοιπόν το συμπέρασμα, ότι η επικάλυψη των νανοσωματιδίων, που τους προσδίδει και θετικό ζ-δυναμικό, δρα έναντι της συσσωμάτωσης τους λόγω των απωστικών δυνάμεων που ασκούνται μεταξύ τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Η μελέτη εγκλωβισμού καινοτόμων αντηλιακών φίλτρων σε νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς, όπως συμπεραίνεται από το σύνολο της παρούσας εργασίας, αποτελεί μία μελέτη με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον και ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Κρίνεται βέβαια σκόπιμο να διερευνηθεί εκτενέστερα, έτσι προτείνονται οι εξής μελλοντικοί στόχοι:

- Μελέτη της αποδέσμευσης των αντηλιακών φίλτρων από τα αντηλιακά σκευάσματα με μία εναλλακτική μέθοδο ώστε να καταστεί δυνατή η ποσοτικοποίηση του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου που απελευθερώνεται σε πολλαπλές χρονικές στιγμές. Με αυτόν τον τρόπο θα επιτευχθεί και η εξαγωγή μαθηματικού μοντέλου για το ρυθμό αποδέσμευσης της ένωσης.
- Περαιτέρω μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων των συνθετικών αντηλιακών φίλτρων με τις μεθόδους DSC και TGA με στόχο την μελέτη της μεταβολής των θερμικών των συνθετικών αντηλιακών φίλτρων πριν και με μετά τον εγκλωβισμό.
- Μελέτη της μορφολογίας των βέλτιστων και των κενών νανοσωματιδίων μέσω της τεχνικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης SEM, και σύγκριση των εικόνων με τα αποτελέσματα της μεθόδου TEM.
- Μελέτη θερμικών ιδιοτήτων των βέλτιστων νανοσωματιδίων με την μέθοδο DSC.
- Πραγματοποίηση Πειραματικού Σχεδιασμού και Βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού για τα φίλτρα **2c** και **3c**.
- Μελέτη της σταθερότητας των νανοσυστημάτων σε βάθος χρόνου μεγαλύτερο των εξήντα ημερών όχι μόνο ως προς το μέγεθος τους, αλλά και ως προς την απόδοση εγκλωβισμού των αντηλιακών φίλτρων σε αυτά.
- Μελέτη κυτταροτοξικότητας των συνθετικών αντηλιακών φίλτρων και των καινοτόμων νανοσυστημάτων.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Σ1. Ioanna Pitterou, **Marianna Fanouria Mitsioni**, Ioanna Kostopoulou, Andromachi Tzani, Christina Fountzoula, Anastasios Kriebardis, Marianthi Miliaronikolaki, Nikolaos Paraskevopoulos, Anastasia Detsi, Green Synthesis of Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) Loaded with Octyl Ferulate and Incorporation in Sunscreen, 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, March 9-11, 2023.



GREEN SYNTHESIS OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS (NLCs) LOADED WITH OCTYL FERULATE AND INCORPORATION IN SUNSCREEN



Ioanna Pitterou¹, Marianna Fanouria Mitsioni¹, Ioanna Kostopoulou¹, Andromachi Tzani¹, Christina Fountzoula², Anastasios Kriebardis², Marianthi Miliaronikolaki³, Nikolaos Paraskevopoulos³, Anastasia Detsi¹

¹Laboratory of Organic Chemistry, School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, Zografou Campus, 15780 Athens, Greece

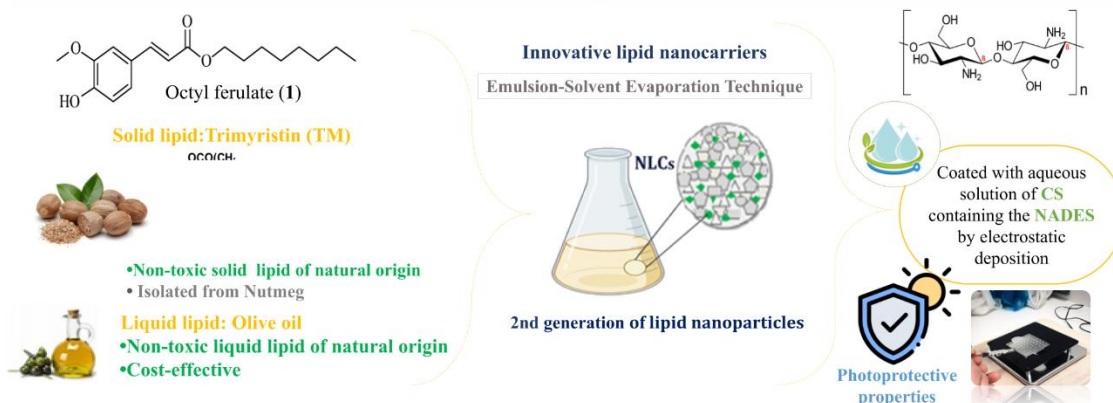
²Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology, Department of Biomedical Sciences, University of West Attica, Ag. Spyridonos, 12243 Egaleo, Athens, Greece

³Cellco Chemicals SA, Terma Odou Makrygianni, 196 00 Mandra Attiki, Greece

Introduction

Octyl ferulate (**1**) was synthesized as a potential **UVA sunscreen**, exhibiting high critical wavelength value ($\lambda_c=349.8\text{nm}$), as well as a fairly high UVA/UVB ratio (0.405). The aim of the study is to develop and optimize the **green synthesis of biocompatible nanosystems** for the **encapsulation** of ester **1** in order to investigate the release profile of the compound and the photoprotective properties of the nanosystems. Moreover, sunscreen emulsions were prepared incorporating the nanoparticles and were evaluated for their ultraviolet (UV) radiation protection ability in terms of sun protection factor (SPF). The **nanostructured lipid carriers (NLCs)** were obtained by the emulsification and solvent evaporation technique and coated with chitosan (CS) by electrostatic deposition. The coating of the NLCs was affected by adding an aqueous solution of CS containing the **Natural Deep Eutectic Solvent (NADES)** to achieve the dissolution of CS.

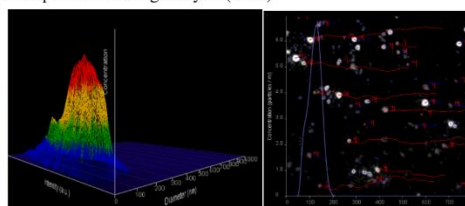
Methodology



Results & Discussion

✓ The CS/NADES/ester **1** NLCs were characterized using FT-IR, UV-Vis, DLS and Nanoparticle tracking analysis (NTA).

Sample	Size (nm)	Polydispersity Index (PdI)	ζ-potential (mV)	Concentration (particles/mL)	Encapsulation efficiency (%)
CS/NADES/ester 1 NLCs	129.8±1.3	0.298±0.038	+25.7 ±1.5	5.47e+08 ± 1.45e+07	98



Conclusions

- ✓ The CS/NADES/ester **1** NLCs presented nanoscale size (129.8±1.3 nm), good size dispersion and satisfactory stability in suspension.
- ✓ The incorporation of the prepared CS/NADES/ester **1** NLCs in a formulation containing commercial UV filters resulted in a significant increase of the SPF of the formulation.

References

Detsi, A., Kavetsou, E., Kostopoulou, I., Pitterou, I., Pontillo, A.R.N., Tzani, A., Christodoulou, P., Siliachli, A., Zoumpoulakis, P., *Pharmaceutics*, 12 669 (2020).

Acknowledgements

I.P. gratefully acknowledges State Scholarships Foundation (IKY). This research is co-financed by Greece and the European Union (ESF) through the Operational Programme (Human Resources Development, Education and Lifelong Learning) in the context of the project "Strengthening Human Resources Research Potential via Doctorate Research" (MIS-5113934), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY).



Operational Programme
Human Resources Development,
Education and Lifelong Learning
Co-financed by Greece and the European Union



BIBΛIOΓPAΦIA

- Abiola, T. T., Whittock, A. L., & Stavros, V. G. (2020). Unravelling the Photoprotective Mechanisms of Nature-Inspired Ultraviolet Filters Using Ultrafast Spectroscopy. *Molecules*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173945>
- Albert, D. E. (2015). Methods for Verifying Medical Device Cleanliness. In *Developments in Surface Contamination and Cleaning* (pp. 109–128). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-31303-2.00004-2>
- Anderson, M., & Omri, A. (2004). The Effect of Different Lipid Components on the in Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1080/10717540490265243>
- Assistant Professor, B. K. (2018). Lipid nano particulate drug delivery: An overview of the emerging trend. ~ 779 ~ *The Pharma Innovation Journal*, 7(7), 779–789. www.thepharmajournal.com
- Autier, P., Doré, J.-F., Négrier, S., Le Liénard, D., Panizzon, R., Lejeune, F. J., Guggisberg, D., & Eggermont, A. M. M. (n.d.). *Sunscreen Use and Duration of Sun Exposure: a Double-Blind, Randomized Trial*. <http://jnco.oxfordjournals.org/>
- Bashiri, S., Ghanbarzadeh, B., Ayaseh, A., Dehghannya, J., Ehsani, A., & Ozyurt, H. (2020). Essential oil-loaded nanostructured lipid carriers: The effects of liquid lipid type on the physicochemical properties in beverage models. *Food Bioscience*, 35. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100526>
- Bigaj-Józefowska, M. J., & Grześkowiak, B. F. (2022). Polymeric nanoparticles wrapped in biological membranes for targeted anticancer treatment. In *European Polymer Journal* (Vol. 176). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111427>
- Boldrini, C. L., Quivelli, A. F., Manfredi, N., Capriati, V., & Abboto, A. (2022). Deep Eutectic Solvents in Solar Energy Technologies. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27030709>
- Brand, R. M., Wipf, P., Durham, A., Epperly, M. W., Greenberger, J. S., & Faló, L. D. (2018). Targeting mitochondrial oxidative stress to mitigate UV-induced skin damage. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00920>
- Carvalho, P. M., Felício, M. R., Santos, N. C., Gonçalves, S., & Domingues, M. M. (2018). Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00237>
- Castro, S. R., Ribeiro, L. N. M., Breikreitz, M. C., Guilherme, V. A., Rodrigues da Silva, G. H., Mitsutake, H., Alcântara, A. C. S., Yokaichiya, F., Franco, M. K. K. D., Clemens, D., Kent, B., Lancellotti, M., de Araújo, D. R., & de Paula, E. (2021). A pre-formulation study of

- tetracaine loaded in optimized nanostructured lipid carriers. *Scientific Reports*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-99743-6>
- Castro, V. I. B., Mano, F., Reis, R. L., Paiva, A., & Duarte, A. R. C. (2018). Synthesis and Physical and Thermodynamic Properties of Lactic Acid and Malic Acid-Based Natural Deep Eutectic Solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 63(7), 2548–2556.
<https://doi.org/10.1021/acs.jced.7b01037>
- Căta, A., Ienașcu, I. M. C., Ștefănuț, M. N., Roșu, D., & Pop, O. R. (2023). Properties and Bioapplications of Amphiphilic Janus Dendrimers: A Review. In *Pharmaceutics* (Vol. 15, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020589>
- Chauhan, I., Yasir, M., Verma, M., & Singh, A. P. (2020). Nanostructured lipid carriers: A groundbreaking approach for transdermal drug delivery. In *Advanced Pharmaceutical Bulletin* (Vol. 10, Issue 2, pp. 150–165). Tabriz University of Medical Sciences.
<https://doi.org/10.34172/apb.2020.021>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. In *Pharmaceutics* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Das, N., Kumar, A., & Rayavarapu, R. G. (2021). The role of deep eutectic solvents and carrageenan in synthesizing biocompatible anisotropic metal nanoparticles. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 12, 924–938. <https://doi.org/10.3762/bjnano.12.69>
- Das, S., & Chaudhury, A. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. In *AAPS PharmSciTech* (Vol. 12, Issue 1, pp. 62–76). <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9563-0>
- Davis, P. A., & Iwahashi, C. K. (n.d.). *Whole almonds and almond fractions reduce aberrant crypt foci in a rat model of colon carcinogenesis*. www.elsevier.com/locate/canlet
- De Jonge, N., & Ross, F. M. (2011). Electron microscopy of specimens in liquid. In *Nature Nanotechnology* (Vol. 6, Issue 11, pp. 695–704). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2011.161>
- del Pozo-Rodríguez, A., Solinís, M. A., Gascón, A. R., & Pedraz, J. L. (2009). Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), 181–189.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.015>
- Diffey, B. L. (1994). A method for broad spectrum classification of sunscreens. In *International Journal of Cosmetic Science* (Vol. 16).
- Diirr, H., Pauly, K., Quast, H., Ross, K., Spiegel, E., Peters, K., uon, H. G., Gerhard Hofle, B., & Steglich, W. (1974). Madrid; b) A. Schonberg, M. MamlukJetrahedron Lett. 1971. 4993; 1972, 1512; c). In *cf. also M. Kausch, Dissertation, Universitat Saarbrücken* (Vol. 96, Issue 7).

- Dimitrovska Cvetkovska, A., Manfredini, S., Ziosi, P., Molesini, S., Dissette, V., Magri, I., Scapoli, C., Carrieri, A., Durini, E., & Vertuani, S. (2017). Factors affecting SPF in vitro measurement and correlation with in vivo results. *International Journal of Cosmetic Science*, 39(3), 310–319. <https://doi.org/10.1111/ics.12377>
- Doktorovová, S., Araújo, J., Garcia, M. L., Rakovský, E., & Souto, E. B. (2010). Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured lipid carriers (PEG-NLC). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(2), 538–542. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.033>
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14, Issue 6, pp. 12222–12248). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Duong, V. A., Nguyen, T. T. L., & Maeng, H. J. (2020). Preparation of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for drug delivery and the effects of preparation parameters of solvent injection method. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25204781>
- Dutra, E. A., Gonçalves Da Costa E Oliveira, D. A., Rosa, E., Kedor-Hackmann, M., Rocha, M. I., Santoro, M., & Kedor-Hackmann, E. R. M. (2004). Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. In *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 40).
- Edington, S. C., Liu, S., & Baiz, C. R. (2021). Infrared spectroscopy probes ion binding geometries. In *Methods in Enzymology* (Vol. 651, pp. 157–191). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.028>
- Elmowafy, M., & Al-Sanea, M. M. (2021). Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 29, Issue 9, pp. 999–1012). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.07.015>
- Elsayed, M., Isah, A., Hiba, M., Hassan, A., Al-Garadi, K., Mahmoud, M., El-Husseiny, A., & Radwan, A. E. (2022). A review on the applications of nuclear magnetic resonance (NMR) in the oil and gas industry: laboratory and field-scale measurements. In *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology* (Vol. 12, Issue 10, pp. 2747–2784). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s13202-022-01476-3>
- Esposito, E., Ravani, L., Drechsler, M., Mariani, P., Contado, C., Ruokolainen, J., Ratano, P., Campolongo, P., Trezza, V., Nastruzzi, C., & Cortesi, R. (2015). Cannabinoid antagonist in nanostructured lipid carriers (NLCs): Design, characterization and in vivo study. *Materials Science and Engineering C*, 48, 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.012>
- Fanali, C., Gallo, V., Posta, S. Della, Dugo, L., Mazzeo, L., Cocchi, M., Piemonte, V., & De Gara, L. (2021). Choline chloride–lactic acid-based NADES as an extraction medium in a

- response surface methodology-optimized method for the extraction of phenolic compounds from hazelnut skin. *Molecules*, 26(9).
<https://doi.org/10.3390/molecules26092652>
- Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W. (2010). Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27(5), 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>
- Fukuda, I. M., Pinto, C. F. F., Moreira, C. D. S., Saviano, A. M., & Lourenço, F. R. (2018). Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). In *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 54, Issue Special Issue). Faculdade de Ciências Farmaceuticas (Biblioteca). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000001006>
- Gallarate, M., Trotta, M., Battaglia, L., & Chirio, D. (2009). Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: Preliminary studies on insulin encapsulation. *Journal of Microencapsulation*, 26(5), 394–402.
<https://doi.org/10.1080/02652040802390156>
- Geoffrey, K., Mwangi, A. N., & Maru, S. M. (2019). Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 27, Issue 7, pp. 1009–1018). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.08.003>
- Ghezzi, M., Pescina, S., Padula, C., Santi, P., Del Favero, E., Cantù, L., & Nicoli, S. (2021). Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 332, pp. 312–336). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.031>
- Gilles, V., Vieira, M. A., Lacerda, V., Castro, E. V. R., Santos, R. B., Orestes, E., Carneiro, J. W. M., & Greco, S. J. (2015). A new, simple and efficient method of steglich esterification of juglone with long-chain fatty acids: Synthesis of a new class of non-polymeric wax deposition inhibitors for crude oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(1), 74–83. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140216>
- Guan, L. L., Lim, H. W., & Mohammad, T. F. (2021). Sunscreens and Photoaging: A Review of Current Literature. In *American Journal of Clinical Dermatology* (Vol. 22, Issue 6, pp. 819–828). Adis. <https://doi.org/10.1007/s40257-021-00632-5>
- Guo, F., Zhu, Z., Zheng, Z., Jin, Y., Di, X., Xu, Z., & Guan, H. (2020). Facile synthesis of highly efficient fluorescent carbon dots for tetracycline detection. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(4), 4520–4527. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06779-3>
- Habibi, N., Mauser, A., Ko, Y., & Lahann, J. (2022). Protein Nanoparticles: Uniting the Power of Proteins with Engineering Design Approaches. In *Advanced Science* (Vol. 9, Issue 8). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/adv.202104012>

- Hassan, I., Dorjay, K., Sami, A., & Anwar, P. (2013). Sunscreens and Antioxidants as Photo-protective Measures: An update. *Our Dermatology Online*, 4(3), 369–374. <https://doi.org/10.7241/ourd.20133.92>
- Hauss, D. J. (2007). Oral lipid-based formulations. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 59, Issue 7, pp. 667–676). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.006>
- Heinz, H., Pramanik, C., Heinz, O., Ding, Y., Mishra, R. K., Marchon, D., Flatt, R. J., Estrela-Lopis, I., Llop, J., Moya, S., & Ziolo, R. F. (2017). Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications. In *Surface Science Reports* (Vol. 72, Issue 1, pp. 1–58). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2017.02.001>
- Inaloo, I. D., Majnooni, S., & Esmailpour, M. (2018). Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles in a Deep Eutectic Solvent: An Efficient and Recyclable Catalytic System for the Synthesis of Primary Carbamates and Monosubstituted Ureas. *European Journal of Organic Chemistry*, 2018(26), 3481–3488. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201800581>
- Jaferník, K., Ładniak, A., Blicharska, E., Czarnek, K., Ekiert, H., Wiącek, A. E., & Szopa, A. (2023). Chitosan-Based Nanoparticles as Effective Drug Delivery Systems—A review. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28041963>
- Jain, A. K., & Thareja, S. (2019). In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. In *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* (Vol. 47, Issue 1, pp. 524–539). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1561457>
- Jain, P., Rahi, P., Pandey, V., Asati, S., & Soni, V. (2017). Nanostructure lipid carriers: A modish contrivance to overcome the ultraviolet effects. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(2), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2017.02.001>
- Jain, R. A., Rhodes, C. T., Railkar, A. M., Malick, A. W., & Shah, N. H. (n.d.). *Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres: effect of various formulation variables*. www.elsevier.com/locate/ejphabio
- Jaiswal, P., Gidwani, B., & Vyas, A. (2016). Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. In *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* (Vol. 44, Issue 1, pp. 27–40). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.909822>
- Jansook, P., Pichayakorn, W., & Ritthidej, G. C. (2018). Amphotericin B-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carrier (NLCs): effect of drug loading and biopharmaceutical characterizations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(10), 1693–1700. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1492606>
- Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Marchie, A., Parker, T. L., Connelly, P. W., Qian, W., Haight, J. S., Faulkner, D., Vidgen, E., Lapsley, K. G., & Spiller, G. A. (2002). Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors: Blood lipids, oxidized low-density

- lipoproteins, lipoprotein(a), homocysteine, and pulmonary nitric oxide: A randomized, controlled, crossover trial. *Circulation*, *106*(11), 1327–1332.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000028421.91733.20>
- Jesus, A., Augusto, I., Duarte, J., Sousa, E., Cidade, H., Cruz, M. T., Lobo, J. M. S., & Almeida, I. F. (2022). Recent Trends on UV filters. *Applied Sciences*, *12*(23).
<https://doi.org/10.3390/app122312003>
- Jordan, A., Whymark, K. D., Sydenham, J., & Sneddon, H. F. (2021). A solvent-reagent selection guide for Steglich-type esterification of carboxylic acids. *Green Chemistry*, *23*(17), 6405–6413. <https://doi.org/10.1039/d1gc02251b>
- Joshi, M., Pathak, S., Sharma, S., & Patravale, V. (2008). Design and in vivo pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject. *International Journal of Pharmaceutics*, *364*(1), 119–126.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.032>
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
- Junyaprasert, V. B., Teeranachaideekul, V., Souto, E. B., Boonme, P., & Müller, R. H. (2009). Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and in vitro skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, *377*(1–2), 207–214.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.020>
- Kalaydina, R. V., Bajwa, K., Qorri, B., Decarlo, A., & Szewczuk, M. R. (2018). Recent advances in “smart” delivery systems for extended drug release in cancer therapy. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 13, pp. 4727–4745). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S168053>
- Kaliva, M., & Vamvakaki, M. (2020). Nanomaterials characterization. In *Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications* (pp. 401–433). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00017-0>
- Katopodi, A., Tsotsou, E., Iliou, T., Deligiannidou, G. E., Pontiki, E., Kontogiorgis, C., Tsopeles, F., & Detsi, A. (2021). Synthesis, bioactivity, pharmacokinetic and biomimetic properties of multi-substituted coumarin derivatives. *Molecules*, *26*(19).
<https://doi.org/10.3390/molecules26195999>
- Kaul, S., Gulati, N., Verma, D., Mukherjee, S., & Nagaich, U. (2018). Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. *Journal of Pharmaceutics*, *2018*, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2018/3420204>
- Kaur, I., Agnihotri, S., & Goyal, D. (2021). Fabrication of chitosan–alginate nanospheres for controlled release of cartap hydrochloride. *Nanotechnology*, *33*(2), 25701.
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/ac2d4c>

- Kodad, O., & Socias I Company, R. (2008). Variability of oil content and of major fatty acid composition in almond (*Prunus amygdalus* Batsch) and its relationship with kernel quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(11), 4096–4101. <https://doi.org/10.1021/jf8001679>
- Lademann, J., Schanzer, S., Jacobi, U., Schaefer, H., Pflücker, F., Driller, H., Beck, J., Meinke, M., Roggan, A., & Sterry, W. (2005). Synergy effects between organic and inorganic UV filters in sunscreens. *Journal of Biomedical Optics*, *10*(1), 014008. <https://doi.org/10.1117/1.1854112>
- Lee, J. H., & Yeo, Y. (2015a). Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*, *125*, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>
- Lee, J. H., & Yeo, Y. (2015b). Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*, *125*, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>
- Lee, S. A., Joung, H. J., Park, H. J., & Shin, G. H. (2017). Preparation of Chitosan-Coated Nanostructured Lipid Carriers (CH-NLCs) to Control Iron Delivery and Their Potential Application to Food Beverage System. *Journal of Food Science*, *82*(4), 904–912. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13655>
- Lee, S. G., & Xu, X. (2005). Design for the environment: Life cycle assessment and sustainable packaging issues. In *International Journal of Environmental Technology and Management* (Vol. 5, Issue 1, pp. 14–41). Inderscience Publishers. <https://doi.org/10.1504/IJETM.2005.006505>
- Leyva-Porras, C., Cruz-Alcantar, P., Espinosa-Solís, V., Martínez-Guerra, E., Piñón-Balderrama, C. I., Martínez, I. C., & Saavedra-Leos, M. Z. (2020). Application of differential scanning calorimetry (DSC) and modulated differential scanning calorimetry (MDSC) in food and drug industries. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym12010005>
- Li, X., & Row, K. H. (2016). Development of deep eutectic solvents applied in extraction and separation. In *Journal of Separation Science* (Vol. 39, Issue 18, pp. 3505–3520). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600633>
- Loganathan, S., Valapa, R. B., Mishra, R. K., Pugazhenti, G., & Thomas, S. (2017). Thermogravimetric Analysis for Characterization of Nanomaterials. In *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization* (Vol. 3, pp. 67–108). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46139-9.00004-9>
- López-García, R., & Ganem-Rondero, A. (2015). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Occlusive Effect and Penetration Enhancement Ability. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, *05*(02), 62–72. <https://doi.org/10.4236/jcda.2015.52008>
- López-Hortas, L., Torres, M. D., Falqué, E., & Domínguez, H. (2020). Organic UV filter loaded nanocarriers with broad spectrum photoprotection. In *Nanocosmetics: Fundamentals*,

- Applications and Toxicity* (pp. 127–140). Elsevier Applied Science.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822286-7.00009-7>
- Lutjen, A. B., Quirk, M. A., Barbera, A. M., & Kolonko, E. M. (2018). Synthesis of (E)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 5291–5298. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.04.007>
- Marques, C. A., & Machado, A. A. S. C. (2021). An integrated vision of the Green Chemistry evolution along 25 years. *Foundations of Chemistry*, 23, 299+. <https://link.gale.com/apps/doc/A679732997/AONE?u=anon~2849318d&sid=googleScholar&xid=acc529c1>
- Martínez, J., Cortés, J. F., & Miranda, R. (2022). Green Chemistry Metrics, A Review. In *Processes* (Vol. 10, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pr10071274>
- Martin-Gorgojo, A., Gilaberte, Y., & Nagore, E. (2021). Vitamin D and skin cancer: An epidemiological, patient-centered update and review. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu13124292>
- Mazur, K. L., Feuser, P. E., Valério, A., Poester Cordeiro, A., de Oliveira, C. I., Assolini, J. P., Pavanelli, W. R., Sayer, C., & Araújo, P. H. H. (2019). Diethyldithiocarbamate loaded in beeswax-copaiba oil nanoparticles obtained by solventless double emulsion technique promote promastigote death in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 507–512. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.048>
- Mbanga, L., Mulenga, M., Mpiana, P. T., Bokolo, K., Mumbwa, M., & Mvingu, K. (2014). Determination of Sun Protection Factor (SPF) of Some Body Creams and Lotions Marketed in Kinshasa by Ultraviolet Spectrophotometry. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science (IJARCS)*, 1(8), 7–13. www.arcjournals.org
- Mendes, L. P., Pan, J., & Torchilin, V. P. (2017). Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules22091401>
- Mircioiu, C., Voicu, V., Anuta, V., Tudose, A., Celia, C., Paolino, D., Fresta, M., Sandulovici, R., & Mircioiu, I. (2019). Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. In *Pharmaceutics* (Vol. 11, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030140>
- Mishra, V., Thakur, S., Patil, A., & Shukla, A. (2018). Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 15, Issue 8, pp. 737–758). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1504768>
- Mohamed, M. A., Mohd Hir, Z. A., Wan Mokhtar, W. N. A., & Osman, N. S. (2020). Features of metal oxide colloidal nanocrystal characterization. In *Colloidal Metal Oxide Nanoparticles* (pp. 83–122). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813357-6.00008-5>

- Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M., & Wasan, E. K. (2017). An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. In *Pharmaceutics* (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053>
- Moyal, D. (2008). How to measure UVA protection afforded by sunscreen products. In *Expert Review of Dermatology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 307–313). <https://doi.org/10.1586/17469872.3.3.307>
- Mutlu, H., & Barner, L. (2022). Getting the Terms Right: Green, Sustainable, or Circular Chemistry? *Macromolecular Chemistry and Physics*, 223(13). <https://doi.org/10.1002/macp.202200111>
- Naguib, Y. W., Rodriguez, B. L., Li, X., Hursting, S. D., Williams, R. O., & Cui, Z. (2014). Solid lipid nanoparticle formulations of docetaxel prepared with high melting point triglycerides: In vitro and in vivo evaluation. *Molecular Pharmaceutics*, 11(4), 1239–1249. <https://doi.org/10.1021/mp4006968>
- Nam, N. N., Do, H. D. K., Trinh, K. T. L., & Lee, N. Y. (2023). Design Strategy and Application of Deep Eutectic Solvents for Green Synthesis of Nanomaterials. In *Nanomaterials* (Vol. 13, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nano13071164>
- Naseri, N., Valizadeh, H., & Zakeri-Milani, P. (2015). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. In *Advanced Pharmaceutical Bulletin* (Vol. 5, Issue 3, pp. 305–313). Tabriz University of Medical Sciences. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.043>
- Nash, J. F., Tanner, P. R., & Matts, P. J. (2006). Ultraviolet a radiation: Testing and labeling for sunscreen products. In *Dermatologic Clinics* (Vol. 24, Issue 1, pp. 63–74). <https://doi.org/10.1016/j.det.2005.08.005>
- Ncube, A., Mtetwa, S., Bukhari, M., Fiorentino, G., & Passaro, R. (2023). Circular Economy and Green Chemistry: The Need for Radical Innovative Approaches in the Design for New Products. *Energies*, 16(4). <https://doi.org/10.3390/en16041752>
- Nesseem, D. (2011). Formulation of sunscreens with enhancement sun protection factor response based on solid lipid nanoparticles. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(1), 70–79. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00598.x>
- Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. In *Archives of Dermatological Research* (Vol. 302, Issue 2, pp. 71–83). <https://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3>
- Nobre, R., & Fonseca, A. P. (2016). Determination Of Sun Protection Factor By Uv-Vis Spectrophotometry. *Health Care : Current Reviews*, 4(2). <https://doi.org/10.4172/hccr.1000108>

- Nohynek, G. J., & Dufour, E. K. (2012). Nano-sized cosmetic formulations or solid nanoparticles in sunscreens: A risk to human health? *Archives of Toxicology*, *86*(7), 1063–1075. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0831-5>
- Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., & Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. In *Heliyon* (Vol. 8, Issue 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>
- Oresajo, C., Stephens, T., Hino, P. D., Law, R. M., Yatskayer, M., Foltis, P., Pillai, S., & Pinnell, S. R. (2008). Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. In *Journal of Cosmetic Dermatology* (Vol. 7).
- Osterwalder, U., & Herzog, B. (2009). Sun protection factors: World wide confusion. *British Journal of Dermatology*, *161*(SUPPL. 3), 13–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09506.x>
- Pathak, Y., & Thassu, D. (n.d.). Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization edited by. In *DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES* (Vol. 191).
- Peres, D. D., Ariede, M. B., Candido, T. M., de Almeida, T. S., Lourenço, F. R., Consiglieri, V. O., Kaneko, T. M., Velasco, M. V. R., & Baby, A. R. (2017). Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experiment applied to the development of multifunctional sunscreens. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *43*(2), 246–256. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1236809>
- Pharmaceutical Nanotechnology Costas Demetzos Fundamentals and Practical Applications.* (n.d.).
- Pinnell, S. R. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *48*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.16>
- Press, P. (n.d.). *Controlling drug delivery*. www.pharmpress.com
- Qosa, H., Mohamed, L. A., Batarseh, Y. S., Alqahtani, S., Ibrahim, B., LeVine, H., Keller, J. N., & Kaddoumi, A. (2015). Extra-virgin olive oil attenuates amyloid- β and tau pathologies in the brains of TgSwDI mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(12), 1479–1490. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.022>
- Qureshi, A. A., Laden, F., Colditz, G. A., & Hunter, D. J. (n.d.). *Geographic Variation and Risk of Skin Cancer in US Women Differences Between Melanoma, Squamous Cell Carcinoma, and Basal Cell Carcinoma.*
- Rabelo, R. S., Oliveira, I. F., da Silva, V. M., Prata, A. S., & Hubinger, M. D. (2018). Chitosan coated nanostructured lipid carriers (NLCs) for loading Vitamin D: A physical stability study. *International Journal of Biological Macromolecules*, *119*, 902–912. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.174>

- Rai, R., Shanmuga, S., & Srinivas, C. R. (2012a). Update on photoprotection. *Indian Journal of Dermatology*, 57(5), 335–342. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.100472>
- Rai, R., Shanmuga, S., & Srinivas, C. R. (2012b). Update on photoprotection. *Indian Journal of Dermatology*, 57(5), 335–342. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.100472>
- Rashmi, H. B., & Negi, P. S. (2020). Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. In *Food Research International* (Vol. 136). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>
- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., & Tekade, R. K. (2018). Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery* (pp. 369–400). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>
- Reis, J. S., Corrêa, M. A., Chung, M. C., & Dos Santos, J. L. (2014). Synthesis, antioxidant and photoprotection activities of hybrid derivatives useful to prevent skin cancer. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(9), 2733–2738. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.03.017>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 31, Issue 7, pp. 603–632). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Rittié, L., & Fisher, G. J. (2015). Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015370>
- Rodrigues da Silva, G. H., Ribeiro, L. N. M., Mitsutake, H., Guilherme, V. A., Castro, S. R., Poppi, R. J., Breikreitz, M. C., & de Paula, E. (2017). Optimised NLC: a nanotechnological approach to improve the anaesthetic effect of bupivacaine. *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1–2), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.066>
- Saadatkah, N., Carillo Garcia, A., Ackermann, S., Leclerc, P., Latifi, M., Samih, S., Patience, G. S., & Chaouki, J. (2020). Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA. In *Canadian Journal of Chemical Engineering* (Vol. 98, Issue 1, pp. 34–43). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/cjce.23673>
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., De Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., Paolino, D., & Bonina, F. (2000). In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 199). www.elsevier.com/locate/ijpharm
- Saka, H. (n.d.). *Transmission Electron Microscopy*.
- Sander, C. S., Chang, H., Salzmann, S., Èller, C. S. L. M., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P., & Thiele, J. J. (n.d.). *Photoaging is Associated with Protein Oxidation in Human Skin In Vivo*.

- Schalka, S., Naranjo Ravelli, F., Perim, N., & Vasconcelos, R. (2017). Chemical and Physical Sunscreens. In M. C. A. Issa & B. Tamura (Eds.), *Daily Routine in Cosmetic Dermatology* (pp. 113–121). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12589-3_7
- Selvamuthukumar, S., & Velmurugan, R. (2012). *Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy*. <http://www.lipidworld.com/content/11/1/159>
- Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (n.d.). *SPRINGER BRIEFS IN PHARMACEUTICAL SCIENCE & DRUG DEVELOPMENT Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability*. <http://www.springer.com/series/10224>
- Shahgaldian, P., Da Silva, E., Coleman, A. W., Rather, B., & Zaworotko, M. J. (2003). Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLNs): A detailed study of preparation and stability parameters. *International Journal of Pharmaceutics*, 253(1–2), 23–38. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00639-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00639-7)
- Son, G. H., Lee, B. J., & Cho, C. W. (2017). Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. In *Journal of Pharmaceutical Investigation* (Vol. 47, Issue 4, pp. 287–296). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0320-1>
- Souto, E. B., & Müller, R. H. (2010). Lipid nanoparticles: Effect on bioavailability and pharmacokinetic changes. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 197, pp. 115–141). https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_4
- Stanfield, J., Osterwalder, U., & Herzog, B. (2010). In vitro measurements of sunscreen protection. In *Photochemical and Photobiological Sciences* (Vol. 9, Issue 4, pp. 489–494). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/b9pp00181f>
- Stevanato, R., Bertelle, M., & Fabris, S. (2014). Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(1), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.02.014>
- Subramaniam, B., Siddik, Z. H., & Nagoor, N. H. (2020). Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. In *Journal of Nanoparticle Research* (Vol. 22, Issue 6). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04848-0>
- Sudhahar, V., & Balasubramanian, V. (2013). Sun production factor (SPF) determination of marketed sunscreen formulation by In-Vitro method using UV-VIS spectrophotometer. In *Scholars Research Library Archives of Applied Science Research* (Issue 5). www.scholarsresearchlibrary.com
- Tanner, P. R. (2006). Sunscreen product formulation. In *Dermatologic Clinics* (Vol. 24, Issue 1, pp. 53–62). <https://doi.org/10.1016/j.det.2005.09.002>
- Tegos, G. P., Anbe, M., Yang, C., Demidova, T. N., Satti, M., Mroz, P., Janjua, S., Gad, F., & Hamblin, M. R. (2006). Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates

- between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1402–1410. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1402-1410.2006>
- Thompson, A. J., Hart-Cooper, W. M., Cunniffe, J., Johnson, K., & Orts, W. J. (2021). Safer Sunscreens: Investigation of Naturally Derived UV Absorbers for Potential Use in Consumer Products. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 9(27), 9085–9092. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c02504>
- Tiwari, G., Tiwari, R., Bannerjee, S., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Sriwastawa, B. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2. <https://doi.org/10.4103/2230-973x.96920>
- Tzani, A., Kalafateli, S., Tatsis, G., Bairaktari, M., Kostopoulou, I., Pontillo, A. R. N., & Detsi, A. (2021a). Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Sustainable Chemistry*, 2(4), 576–599. <https://doi.org/10.3390/suschem2040032>
- Tzani, A., Kalafateli, S., Tatsis, G., Bairaktari, M., Kostopoulou, I., Pontillo, A. R. N., & Detsi, A. (2021b). Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Sustainable Chemistry*, 2(4), 576–599. <https://doi.org/10.3390/suschem2040032>
- Üner, M. (2006). Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61.
- Veerasingam, S., Ranjani, M., Venkatachalapathy, R., Bagaev, A., Mukhanov, V., Litvinyuk, D., Mugilarasan, M., Gurumoorthi, K., Guganathan, L., Aboobacker, V. M., & Vethamony, P. (2021). Contributions of Fourier transform infrared spectroscopy in microplastic pollution research: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(22), 2681–2743. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1807450>
- Walters, C., Keeney, A., Wigal, C. T., Johnston, C. R., & Cornelius, R. D. (1997). The Spectrophotometric Analysis and Modeling of Sunscreens. In *Journal of Chemical Education* (Vol. 74, Issue 1).
- Wang, P. W., Hung, Y. C., Lin, T. Y., Fang, J. Y., Yang, P. M., Chen, M. H., & Pan, T. L. (2019). Comparison of the biological impact of UVA and UVB upon the skin with functional proteomics and immunohistochemistry. *Antioxidants*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/antiox8120569>
- Wang, S. Q., Stanfield, J. W., & Osterwalder, U. (2008). In vitro assessments of UVA protection by popular sunscreens available in the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 59(6), 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.07.043>

- Warner, J. C., Cannon, A. S., & Dye, K. M. (2004). Green chemistry. *Environmental Impact Assessment Review*, 24(7–8), 775–799. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2004.06.006>
- Wilson, D. R., & Green, J. J. (2017). Nanoparticle tracking analysis for determination of hydrodynamic diameter, concentration, and zeta-potential of polyplex nanoparticles. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1570, pp. 31–46). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6840-4_3
- Wright, M. (2012). Nanoparticle tracking analysis for the multiparameter characterization and counting of nanoparticle suspensions. *Methods in Molecular Biology*, 906, 511–524. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-953-2_41
- Xu, C., Zeng, X., Yang, Z., & Ji, H. (2021). Sunscreen enhancement of octyl methoxycinnamate microcapsules by using two biopolymers as wall materials. *Polymers*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/polym13060866>
- Xu, S., Kwa, M., Agarwal, A., Rademaker, A., & Kundu, R. V. (2016). Sunscreen product performance and other determinants of consumer preferences. *JAMA Dermatology*, 152(8), 920–927. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.2344>
- Yaar, M., & Gilchrest, B. A. (2007). Photoageing: Mechanism, prevention and therapy. In *British Journal of Dermatology* (Vol. 157, Issue 5, pp. 874–887). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08108.x>
- Yang, J., Hou, B., Wang, J., Tian, B., Bi, J., Wang, N., Li, X., & Huang, X. (2019). Nanomaterials for the removal of heavy metals from wastewater. In *Nanomaterials* (Vol. 9, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano9030424>
- Yue, Y., Zhou, H., Liu, G., Li, Y., Yan, Z., & Duan, M. (2010). The advantages of a novel CoQ10 delivery system in skin photo-protection. *International Journal of Pharmaceutics*, 392(1–2), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.032>
- Zafar, A., Imam, S. S., Yasir, M., Alruwaili, N. K., Alsaidan, O. A., Warsi, M. H., Ullah, S. N. M. N., Alshehri, S., & Ghoneim, M. M. (2022). Preparation of NLCs-Based Topical Erythromycin Gel: In Vitro Characterization and Antibacterial Assessment. *Gels*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/gels8020116>
- Zewail, M., Nafee, N., Helmy, M. W., & Boraie, N. (2019). Coated nanostructured lipid carriers targeting the joints – An effective and safe approach for the oral management of rheumatoid arthritis. *International Journal of Pharmaceutics*, 567. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118447>
- Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>
- Zhang, Z., Sha, X., Shen, A., Wang, Y., Sun, Z., Gu, Z., & Fang, X. (2008). Polycation nanostructured lipid carrier, a novel nonviral vector constructed with triolein for

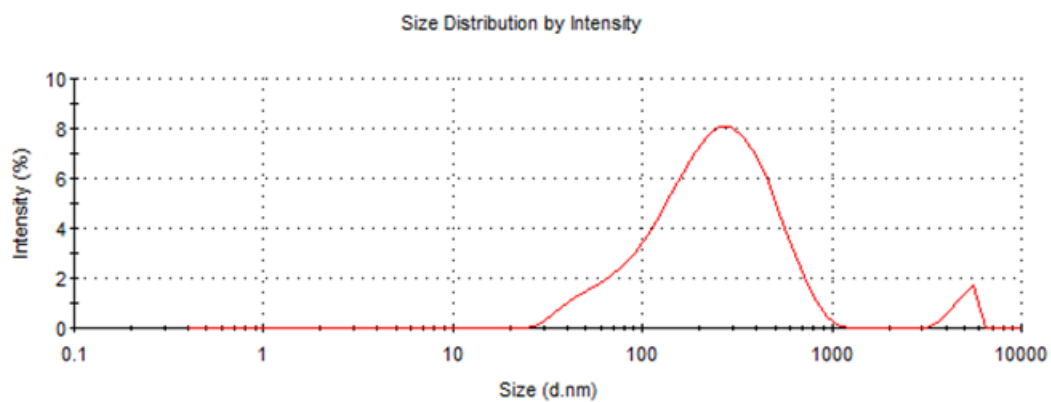
efficient gene delivery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370(3), 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.127>

Zhao, X., Luo, J., Liu, Y., Pandey, P., Yang, S., Wei, D., & Han, K. (2019). Substitution Dependent Ultrafast Ultraviolet Energy Dissipation Mechanisms of Plant Sunscreens. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 10(17), 5244–5249. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.9b02175>

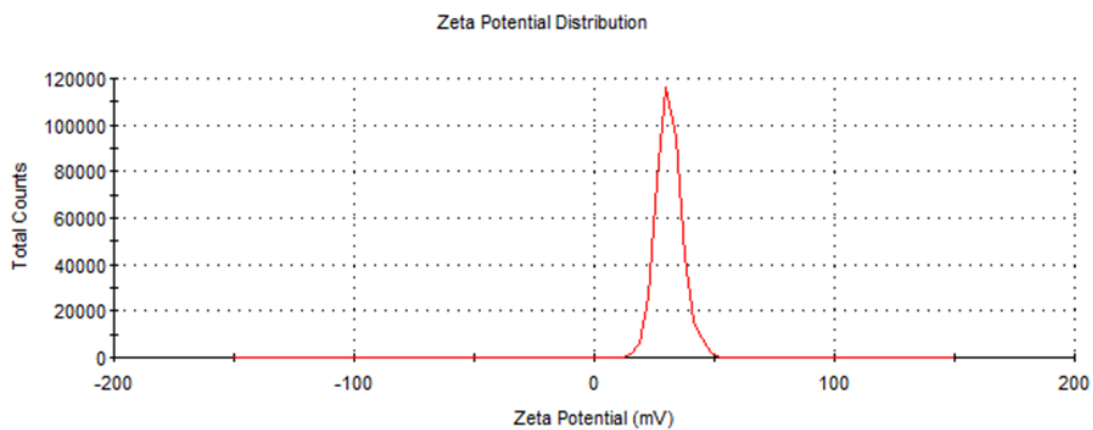
Zuo, W., Chen, G., Chen, F., Li, S., & Wang, B. (2016). Green synthesis and characterization of gold nanoparticles embedded into magnetic carbon nanocages and their highly efficient degradation of methylene blue. *RSC Advances*, 6(34), 28774–28780. <https://doi.org/10.1039/c6ra00537c>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

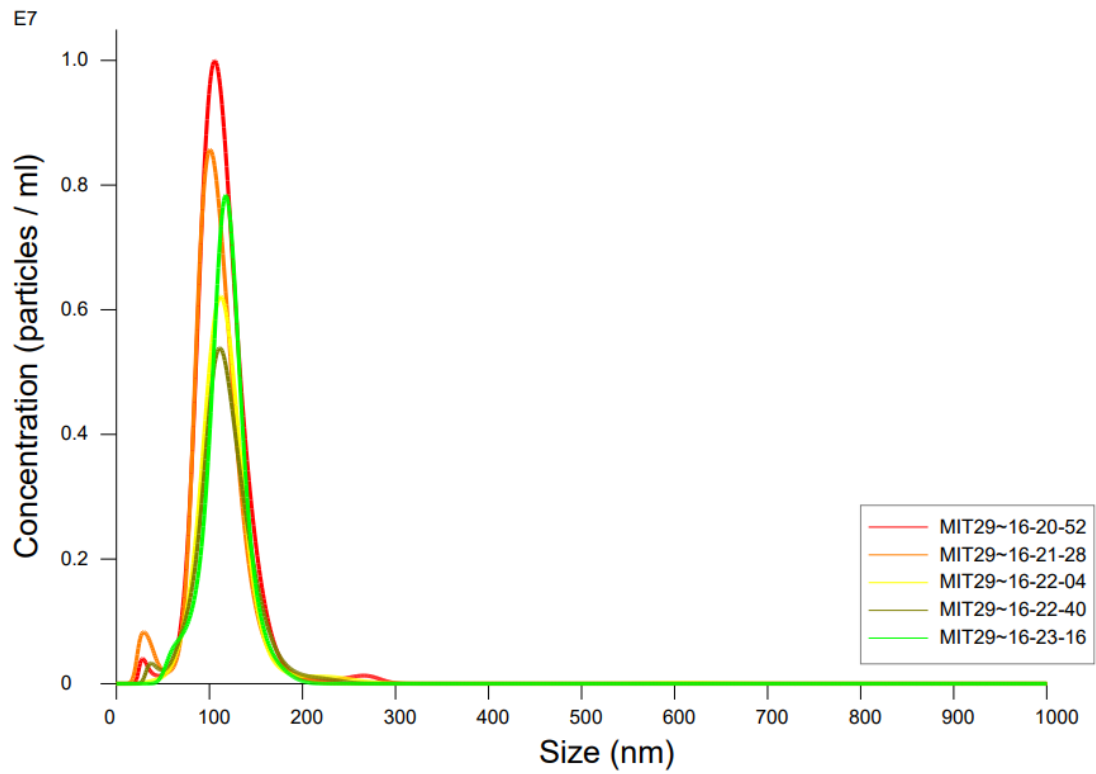
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ



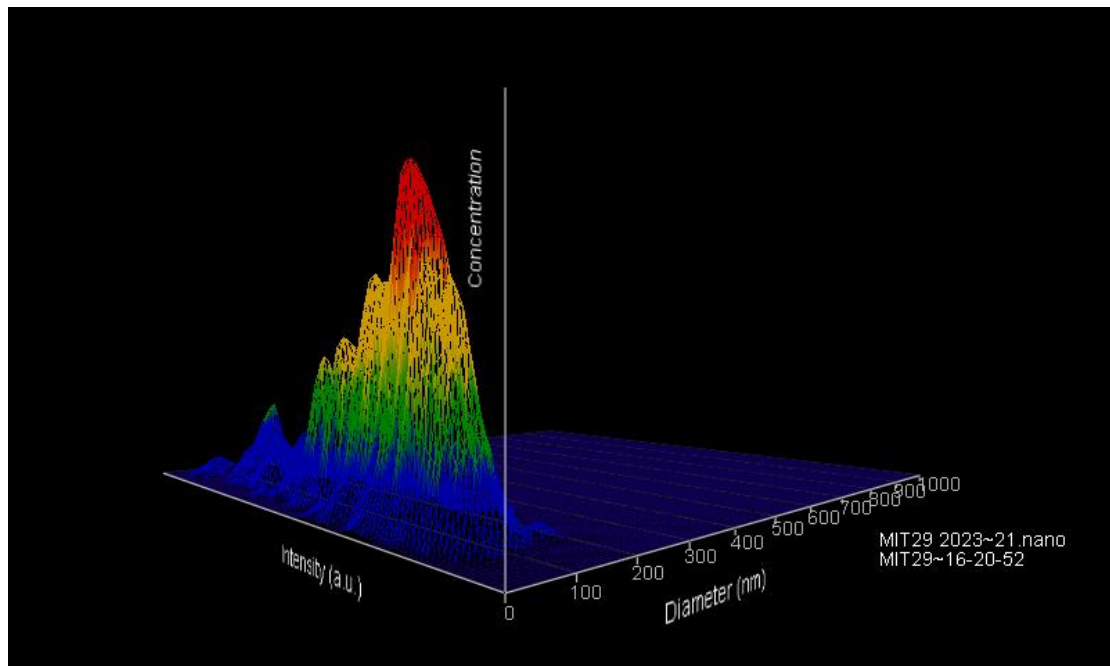
Διάγραμμα 30: Κατανομή μεγέθους των βέλτιστων νανοσυστημάτων με την μέθοδο DLS



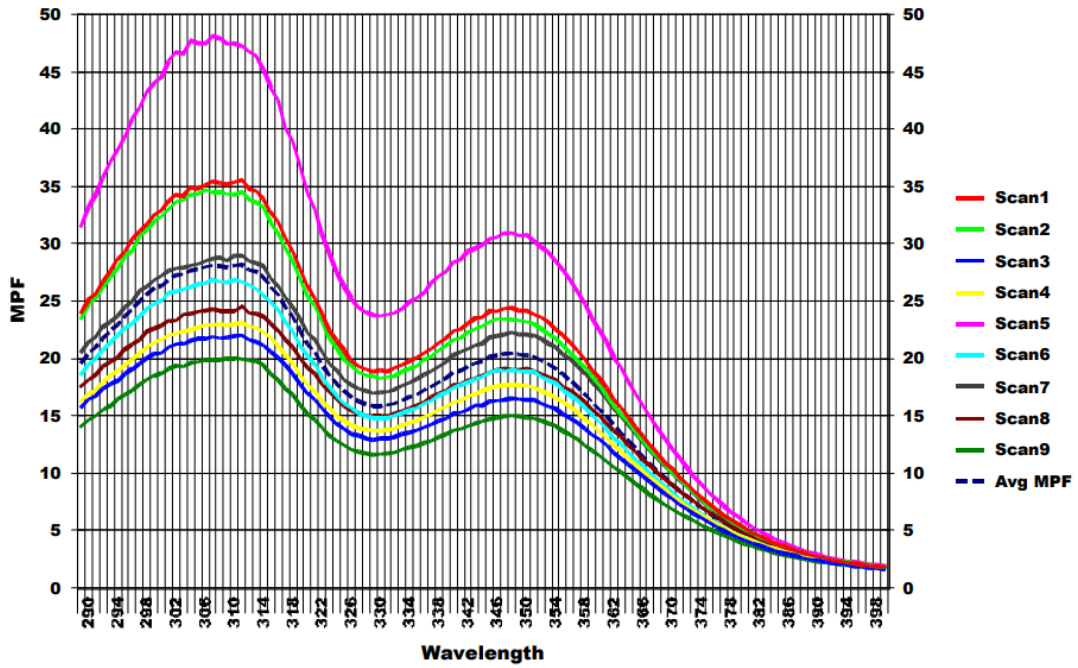
Διάγραμμα 31: ζ – δυναμικό των βέλτιστων νανοσυστημάτων



Διάγραμμα 32: Κατανομή μεγέθους των βέλτιστων νανοσυστημάτων με την μέθοδο NTA

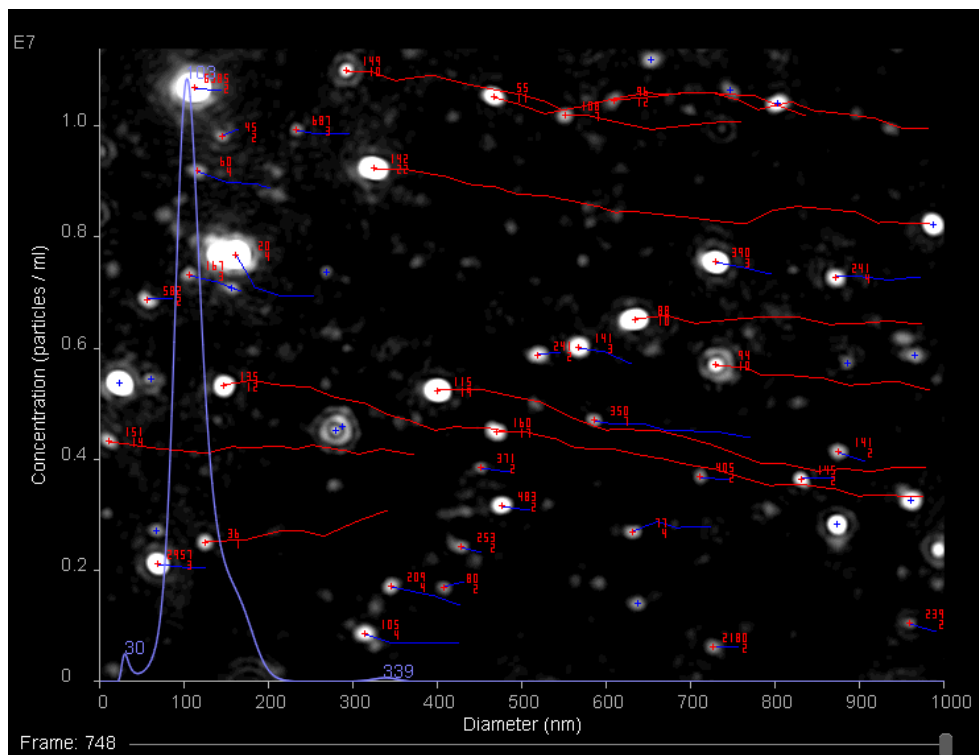


Διάγραμμα 33: Τρισδιάστατο διάγραμμα κατανομής μεγέθους των βέλτιστων νανοσυστημάτων με την μέθοδο NTA

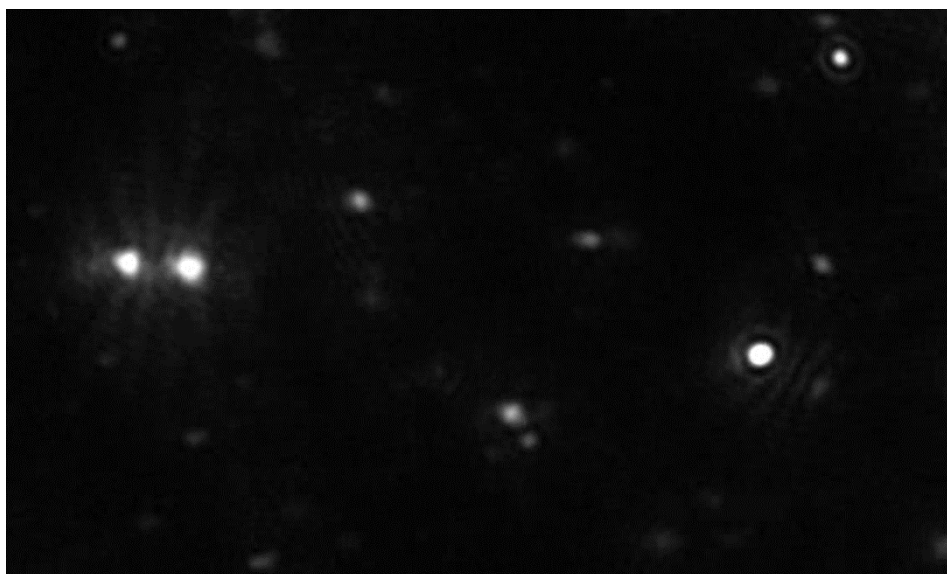


Διάγραμμα 34: Διάγραμμα εννέα διαφορετικών καμπυλών για την μέτρηση του δείκτη SPF σε αντηλιακό σκεύασμα που έχουν ενσωματωθεί τα βέλτιστα νανοσυστήματα με τον εστέρα 2c

EΙΚΟΝΕΣ



Εικόνα 37: Εικόνα των βέλτιστων νανοσωματιδίων με εγκλωβισμένο τον εστέρα 1c και η κατανομή του μεγέθους τους



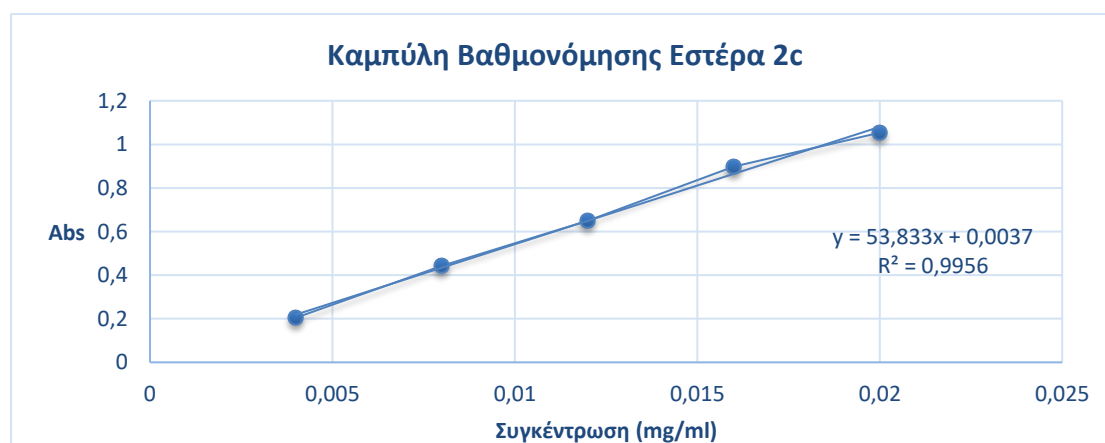
Εικόνα 38: Εικόνα από τα βέλτιστα νανοσωματίδια κατά την μέτρηση του μεγέθους τους με τη μέθοδο NTA

ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΕΣΤΕΡΩΝ 2c ΚΑΙ 3c

Για την ποσοτικοποίηση του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου 2c:

Πίνακας 36: Απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων του εστέρα 2c

C(mg/ml)	Abs (321 nm)
0.020	1.053680
0.016	0.897605
0.012	0.650128
0.0080	0.442261
0.0040	0.204699



Διάγραμμα 35: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του εστέρα 2c

Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων χαράζεται η βέλτιστη ευθεία στα πειραματικά δεδομένα, όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, η οποία παρουσιάζει συντελεστή γραμμικής συσχέτισης των δύο μεγεθών πολύ κοντά στη μονάδα. Η εξίσωση της συσχέτισης

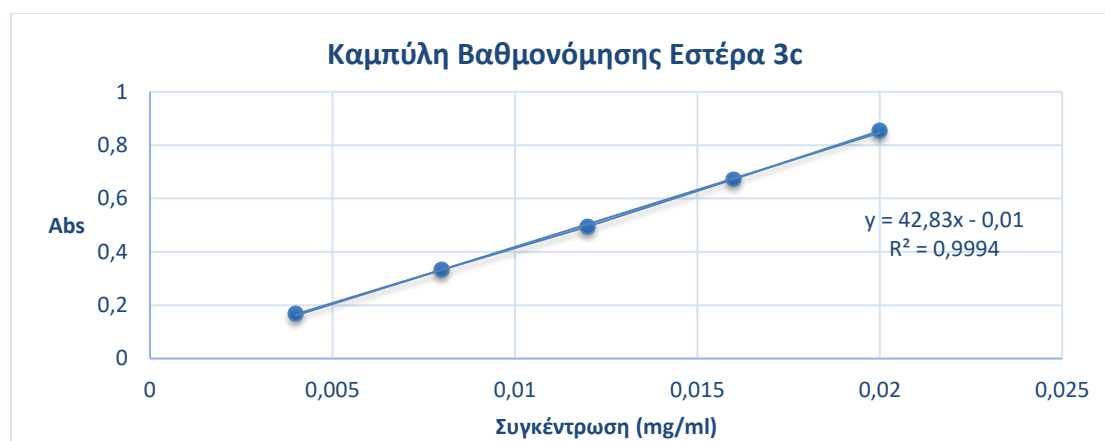
της συγκέντρωσης των διαλυμάτων του αντηλιακού φίλτρου σε αιθανόλη με την απορρόφηση στα 321 nm που εξάγεται είναι η εξής:

$$\text{Συγκέντρωση} = \frac{\text{Απορρόφηση} - 0,003}{53,83}$$

Για την ποσοτικοποίηση του συνθετικού αντηλιακού φίλτρου **3c**:

Πίνακας 37: Απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων του εστέρα **3c**

C(mg/ml)	Abs (321 nm)
0.020	0.853397
0.016	0.672200
0.012	0.495117
0.0080	0.332603
0.0040	0.166602



Διάγραμμα 36: Καμπύλη βαθμονόμησης εστέρα **3c**

Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων χαράζεται η βέλτιστη ευθεία στα πειραματικά δεδομένα, όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, η οποία παρουσιάζει συντελεστή γραμμικής συσχέτισης των δύο μεγεθών πολύ κοντά στη μονάδα. Η εξίσωση της συσχέτισης της συγκέντρωσης των διαλυμάτων του αντηλιακού φίλτρου σε αιθανόλη με την απορρόφηση στα 321nm που εξάγεται είναι η εξής:

$$\text{Συγκέντρωση} = \frac{\text{Απορρόφηση} + 0,01}{42,83}$$

ΕΥΡΕΤΗΡΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης του εστέρα 1c	93
Διάγραμμα 2: ζ-δυναμικό για νανοσωματίδια που δεν είναι επικαλυμμένα με χιτοζάνη ..	109
Διάγραμμα 3: ζ-δυναμικό για νανοσωματίδια που είναι επικαλυμμένα με χιτοζάνη	109
Διάγραμμα 4: Διαγραμματική αναπαράσταση της διαφορά μεταξύ του μεγέθους των νανοσωματιδίων που λήφθηκε από τις μεθόδους DLS και NTA	116
Διάγραμμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της διαφοράς μεταξύ της έμμεσης και της άμεσης απόδοσης εγκλωβισμού.....	117
Διάγραμμα 6: Συσχέτιση του μεγέθους των νανοσωματιδίων με το χρόνο εφαρμογής υπερήχων	118
Διάγραμμα 7: Συσχέτιση του μεγέθους των νανοσωματιδίων με την περιεκτικότητα του διαλύματος επικάλυψης σε NaDES.....	118
Διάγραμμα 8: Συσχέτιση του μεγέθους των νανοσωματιδίων με το ποσοστό φόρτωσης της ένωσης.....	119
Διάγραμμα 9: Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών για το μέγεθος των νανοσωματιδίων	121
Διάγραμμα 10: Δισδιάστατη απεικόνιση της συσχέτισης του μεγέθους των νανοσωματιδίων με τον χρόνο που εφαρμόζονται υπέρηχοι και την περιεκτικότητα του NaDES	121
Διάγραμμα 11: Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaDES και ST με το μέγεθος των νανοσωματιδίων	122
Διάγραμμα 12: Συσχέτιση της απόδοσης εγκλωβισμού με τον χρόνο υπερήχων	123
Διάγραμμα 13: Συσχέτιση της απόδοσης εγκλωβισμού με το ποσοστό (w/w) φόρτωσης του αντηλιακού φίλτρου.....	123
Διάγραμμα 14: Συσχέτιση της απόδοσης εγκλωβισμού με το ποσοστό (% v/v) περιεκτικότητας του διαλύματος επικάλυψης σε DES	124
Διάγραμμα 15: Συσχέτιση πραγματικών με προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών για την δεύτερη απόκριση (την απόδοση εγκλωβισμού)	125
Διάγραμμα 16: Δισδιάστατη απεικόνιση της συσχέτισης της απόδοσης εγκλωβισμού με τον χρόνο που εφαρμόζονται υπέρηχοι και τον χρόνο εφαρμογής υπερήχων.....	126
Διάγραμμα 17: Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης ST, DL με το μέγεθος των νανοσωματιδίων	127
Διάγραμμα 18: Συσχέτιση του ζ-δυναμικού με τον χρόνο που οι διασπορές εκτίθενται σε υπερήχους	127
Διάγραμμα 19: Συσχέτιση του ζ-δυναμικού με το ποσοστό (% v/v) περιεκτικότητας του διαλύματος επικάλυψης σε NaDES.....	128
Διάγραμμα 20: Συσχέτιση του ζ-δυναμικού με το ποσοστό (w/w) φόρτωσης του αντηλιακού φίλτρου.....	128
Διάγραμμα 21: Σύνοψη αποτελεσμάτων για την αύξηση του δείκτη SPF σε υπάρχον αντηλιακό σκεύασμα μετά την προσθήκη των NLCs με τα συνθετικά αντηλιακά φίλτρα...	136
Διάγραμμα 22: Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσής του εστέρα 1c και του αποδεσμευμένου από τα σωματίδια εστέρα 1c.....	137
Διάγραμμα 23: Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσής των εστέρων 2c και 3c και των αποδεσμευμένων από τα σωματίδια εστέρων 2c και 3c	138
Διάγραμμα 24: Προφίλ αποδέσμευσης του εστέρα 1c <i>in vitro</i> από τους μη επικαλυμμένους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς σε pH=5.5 και θερμοκρασία 32°C.....	139

Διάγραμμα 25: Στοιβαγμένα φάσματα ATR/FT – IR της βεταΐνης, του γαλακτικού οξέος του NaDES Bet:LA (1:2)	140
Διάγραμμα 26: Φάσμα ATR/FT-IR της χιτοζάνης και των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων με ή χωρίς επικάλυψη	141
Διάγραμμα 27: Φάσμα ATR/FT-IR του εστέρα 1c και των βέλτιστων νανοσωματιδίων	142
Διάγραμμα 28: Καμπύλη TGA για τα κενά NLCs	143
Διάγραμμα 29: Καμπύλη TGA για τα βέλτιστα νανοσωματίδια όπου έχει εγκλωβιστεί το φίλτρο 1c	144
Διάγραμμα 30: Κατανομή μεγέθους των βέλτιστων νανοσυστημάτων με την μέθοδο DLS	169
Διάγραμμα 31: ζ – δυναμικό των βέλτιστων νανοσυστημάτων	169
Διάγραμμα 32: Κατανομή μεγέθους των βέλτιστων νανοσυστημάτων με την μέθοδο NTA	170
Διάγραμμα 33: Τρισδιάστατο διάγραμμα κατανομής μεγέθους των βέλτιστων νανοσυστημάτων με την μέθοδο NTA	170
Διάγραμμα 34: Διάγραμμα εννέα διαφορετικών καμπυλών για την μέτρηση του δείκτη SPF σε αντηλιακό σκεύασμα που έχουν ενσωματωθεί τα βέλτιστα νανοσυστήματα με τον εστέρα 2c	171
Διάγραμμα 35: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του εστέρα 2c	172
Διάγραμμα 36: Καμπύλη βαθμονόμησης εστέρα 3c	173

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Γραφική Περίληψη	6
Εικόνα 2: Graphical Abstract	9
Εικόνα 3: Η υπεριώδης ακτινοβολία στο φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας	18
Εικόνα 4: Διαφορετικά επίπεδα διείσδυσης της UVA και UVB ακτινοβολίας στις στιβάδες του δέρματος	19
Εικόνα 5: Διαφορά στο μηχανισμό προστασίας μεταξύ φυσικών και τα χημικών φίλτρων (αριστερά), Διαφορά στο μηχανισμό προστασίας μεταξύ UVB φίλτρων και φίλτρων «ευρέως φάσματος» (δεξιά)	22
Εικόνα 6: Δομικά στοιχεία Λιποσωμάτων	37
Εικόνα 7: Δομή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με εγκλωβισμένη βιοδραστική ένωση	38
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της διαφοράς στη δομή των SLNs (αριστερά) και των NLCs (δεξιά) (Subramaniam et al., 2020)	39
Εικόνα 9: Διάκριση των NLCs ανάλογα με την μορφολογία τους (Assistant Professor, 2018)	42
Εικόνα 10: Τα προφίλ της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα	48
Εικόνα 11: Παραδείγματα εξωτερικών ερεθισμάτων που μπορούν να προκαλέσουν την αποδέσμευση μίας βιοδραστικής ένωσης από έναν νανοφορέα (Harrison, 2018)	51
Εικόνα 12: Απεικόνιση της αρχικής αποτόμης απελευθέρωσης της βιοδραστικής ένωσης από τους νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς	54
Εικόνα 13: Παράδειγμα δημιουργία ενός βαθύως ευτηκτικού διαλύτη	58
Εικόνα 14: Επικάλυψη νανοσωματιδίων με χιτοζάνη με τον μηχανισμό της επιφανειακής προσρόφησης λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων	62

Εικόνα 15: Απεικόνιση των "στρωμάτων" των ιόντων γύρω από ένα νανοσωματίδιο	69
Εικόνα 16: Εικόνα από κάμερα μικροσκοπίου που χρησιμοποιείται στη μέθοδο ανάλυσης NTA	71
Εικόνα 17: Η ποσότητα του 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρα που συντέθηκε χημικά.....	81
Εικόνα 18: Μέθοδος δημιουργίας του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη.....	84
Εικόνα 19: Πειραματική διαδικασία απομόνωση στερεού λιπιδίου από μοσχοκάρυδο	85
Εικόνα 20: Πειραματική διαδικασία σύνθεσης των NLCs με εγκλωβισμένο αντηλιακό φίλτρο	86
Εικόνα 21: Δημιουργία διαλύματος για την επικάλυψη των νανοσωματιδίων.....	88
Εικόνα 22: Πειραματική διαδικασία επικάλυψης των NLCs με διάλυμα χιτοζάνης και NaDES	89
Εικόνα 23: Η εικόνα του λογισμικού κατά τη λήψη των μετρήσεων με τη μέθοδο NTA.....	90
Εικόνα 24: Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό της έμμεσης απόδοσης εγκλωβισμού	94
Εικόνα 25: Πειραματική διαδικασία υπολογισμού άμεσης απόδοσης εγκλωβισμού	96
Εικόνα 26: Πειραματική διάταξη μελέτης της invitro απελευθέρωσης των αντηλιακών φίλτρων σε υδατικό μέσω με τη χρήση μεμβράνης	97
Εικόνα 27: Εμπορικό αντηλιακό σκεύασμα με ενσωματωμένη τη διασπορά των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων όπου έχουν εγκλωβιστεί τα αντηλιακά φίλτρα.....	102
Εικόνα 28: Αρχική τοποθέτηση του δείγματος στην πλάκα	102
Εικόνα 29: Οδηγίες για τις καθορισμένες κινήσεις ώστε το δείγμα να απλωθεί ομοιόμορφα στο υπόστρωμα (αριστερά) και η τελική μορφή του προς μέτρηση δείγματος (δεξιά)	103
Εικόνα 30: Εικόνα οργάνου κατά την μέτρηση του παράγοντα της αντηλιακής προστασίας SPF	103
Εικόνα 31: Φάσμα ¹ H-NMR (600MHz, CDCl ₃ -d ₁) του εστέρα 1b.....	106
Εικόνα 32: Σύγκριση φασμάτων ¹ H-NMR (600MHz, CDCl ₃ -d ₁) των εστέρων 1b και 1c.....	107
Εικόνα 33: Σύγκριση διασποράς NLCs με ελαιόλαδο (αριστερά) και με έλαιο αμυγδάλου (δεξιά).....	111
Εικόνα 34: Βέλτιστες Διασπορές νανοσωματιδίων με βάση το μοντέλο	131
Εικόνα 35: Εικόνες TEM α) των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων (NLCs Blank) και β) των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (SLNs Blank).....	145
Εικόνα 36: Εικόνες TEM από NLCs με εγκλωβισμένο τον εστέρα 1c α) χωρίς επικάλυψη (NLCs Loaded) και β) επικαλυμμένα με διάλυμα CS-NaDES (NLCs Loaded&Coated).....	145
Εικόνα 37: Εικόνα των βέλτιστων νανοσωματιδίων με εγκλωβισμένο τον εστέρα 1c και η κατανομή του μεγέθους τους	171
Εικόνα 38: Εικόνα από τα βέλτιστα νανοσωματίδια κατά την μέτρηση του μεγέθους τους με τη μέθοδο NTA	172

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Τα πιο συνήθη χρησιμοποιούμενα οργανικά φίλτρα και η διάκρισή τους.....	22
--	----

Πίνακας 2: Αξιολόγηση αντηλιακών φίλτρων ανάλογα με το κρίσιμο μήκος κύματος που απορροφούν.....	27
Πίνακας 3: Αξιολόγηση αντηλιακών φίλτρων ανάλογα με το λόγο απορρόφησης UVA και UVB ακτινοβολίας	28
Πίνακας 4: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για την σύνθεση του αντηλιακού φίλτρου. 78	
Πίνακας 5: Συνθετικά μόρια και οι συμβολισμοί τους	81
Πίνακας 6: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων.....	82
Πίνακας 7: Χρησιμοποιούμενα όργανα για την παραγωγή και την αξιολόγηση των νανοσωματιδίων	83
Πίνακας 8: Ρυθμίσεις οργάνου στη μέθοδο NTA.....	90
Πίνακας 9: Απορροφήσεις διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων του εστέρα 1c	93
Πίνακας 10: Αντηλιακά φίλτρα που προϋπάρχουν στο αντηλιακό σκεύασμα και η αντίστοιχη περιεκτικότητά τους.....	101
Πίνακας 11: Συνθήκες και αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων για τα νανοσωματίδια με υγρό λιπίδιο το ελαιόλαδο	110
Πίνακας 12: Συνθήκες και αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων για τα νανοσωματίδια με υγρό λιπίδιο το έλαιο αμυγδάλου	110
Πίνακας 13: Τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών που εξετάζονται στον πειραματικό σχεδιασμό	112
Πίνακας 14: Υπό μελέτη παράμετροι με στόχο τη βελτιστοποίηση των αποκρίσεων	112
Πίνακας 15: Τα 15 πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού που προτάθηκαν από το λογισμικό.....	113
Πίνακας 16: Οι τιμές των αποκρίσεων για τα δεκαπέντε εκτελεσμένα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού	113
Πίνακας 17: Αποτελέσματα για το μέγεθος και το δείκτη πολυδιασποράς από τη μέθοδο DLS	115
Πίνακας 18: Σύγκριση αποτελεσμάτων για το μέγεθος των νανοσωματιδίων των μεθόδων DLS και NTA	115
Πίνακας 19: Διαφορά μεταξύ των τιμών της απόδοσης εγκλωβισμού, υπολογιζόμενη με άμεσο και έμμεσο τρόπο, κατά τον πειραματικό σχεδιασμό.....	116
Πίνακας 20: Αποτελέσματα ANOVA για το τετραγωνικό μοντέλο που περιγράφει την πρώτη απόκριση (το μέγεθος των νανοσωματιδίων)	120
Πίνακας 21: Αποτελέσματα ANOVA για το τετραγωνικό μοντέλο που περιγράφει την δεύτερη απόκριση (την απόδοση εγκλωβισμού)	125
Πίνακας 22: Αποτελέσματα για τον μέσο όρο της απόκρισης του ζ-δυναμικού.....	129
Πίνακας 23: Όρια τιμών των ανεξάρτητων και των εξαρτημένων μεταβλητών σε συνδυασμό με τα κριτήρια βελτιστοποίησης.....	129
Πίνακας 24: Αξιολόγηση διασπορών για τις βέλτιστες συνθήκες.....	130
Πίνακας 25: Επιβεβαίωση του μοντέλου για διάστημα εμπιστοσύνης 95%.....	131
Πίνακας 26: Αξιολόγηση νανοσωματιδίων στα οποία έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας 2c σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες	131
Πίνακας 27: Αξιολόγηση νανοσωματιδίων στα οποία έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας 3c σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες	132
Πίνακας 28: Αξιολόγηση του εστέρα 1c ως προς τις φωτοπροστατευτικές του ιδιότητες ..	133

Πίνακας 29: Αξιολόγηση φωτοπροστατευτικής δράσης των αντίστοιχων διασπορών NLCs στις οποίες έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας 1c	133
Πίνακας 30: Αξιολόγηση του εστέρα 2c ως προς τις φωτοπροστατευτικές του ιδιότητες ..	134
Πίνακας 31: Αξιολόγηση φωτοπροστατευτικής δράσης των αντίστοιχων διασπορών NLCs στις οποίες έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας 2c	135
Πίνακας 32: Αξιολόγηση του εστέρα 3 ως προς τις φωτοπροστατευτικές του ιδιότητες	135
Πίνακας 33: Αξιολόγηση φωτοπροστατευτικής δράσης των αντίστοιχων διασπορών NLCs στις οποίες έχει εγκλωβιστεί ο εστέρας 3c	135
Πίνακας 34: Χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης ATR/FT-IR για τα συστατικά του διαλύματος επικάλυψης	141
Πίνακας 35: Μεταβολή μεγέθους νανοσωματιδίων σε βάθος χρόνου	146
Πίνακας 36: Απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων του εστέρα 2c	172
Πίνακας 37: Απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων του εστέρα 3c	173

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Χημικές δομές παραγώγων του κινωμωμικού οξέος που εμφανίζουν αντηλιακή δράση κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας. α) Φερουλικό οξύ, β) OMC.....	29
Σχήμα 2: Μηχανισμός της αντίδρασης «Εστεροποίηση Steglich»	31
Σχήμα 3: Χημική δομή του στερεού λιπιδίου	46
Σχήμα 4: Χημική Δομή του πολυμερούς της Χιτοζάνης	63
Σχήμα 5: Χημική Δομή του μορίου AAPH (2,2'- azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride)74	
Σχήμα 6: Δομή του αντηλιακού φίλτρου UVB, OctylMethoxyCinnamate (OMC).....	77
Σχήμα 7: 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρας, το αντηλιακό φίλτρο που συντέθηκε χημικά	77
Σχήμα 8: Αντίδραση προστασίας του φερουλικού οξέος	79
Σχήμα 9: Αντίδραση Steglich του προστατευμένου φερουλικού οξέος με αλκοόλη, (i) DCC, DMAP, ξηρό DCM, 48h και R'=octyl	79
Σχήμα 10: Αντίδραση αποπροστασίας των εστέρων του φερουλικού οξέος, (i) NaBH ₄ , THF, 24h, 450°C και R=octyl	80
Σχήμα 11: 3-(4-ακετοξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικός (E)-οκτυλεστέρας (1b)	106
Σχήμα 12: Βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών (κόκκινο) και οι αναμενόμενες αποκρίσεις τους (μπλε)	130