

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



Νανοσυστήματα αλγινικού ως φορείς του φυσικού φλαβονοειδούς χρυσίνη: σύνθεση και χαρακτηρισμός

Διπλωματική Εργασία

Μιχαήλ Ακριτόπουλος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Αναστασία Δέτση

Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2023

Ευχαριστίες

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

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια μου, Δρ Αναστασία Δέτση, η οποία μου ανέθεσε ένα τόσο καινοτόμο θέμα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για να το ολοκληρώσω.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην τριμελή εξεταστική επιτροπή για τον χρόνο ανάγνωσης της διπλωματικής μου εργασίας.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ιωάννα Πιττερού, για τη συνεχή καθοδήγηση της, η οποία με την ασταμάτητη υποστήριξη της καθ' όλη τη εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας, αποτέλεσε την πυξίδα για την συγγραφή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Δρ Αναστάσιο Κριεμπάρδη και την Καθηγήτρια Χριστίνα Φούντζουλα από το Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, οι οποίοι με τα μέσα που μας παρείχαν συνετέλεσαν στην εξέλιξη του πειράματος.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να δώσω σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, τους υποψήφιους διδάκτορες και την κα Ζαμπία Κατσανεβάκη, για την πολύτιμη βοήθεια τους αλλά και την διατήρηση ενός ευχάριστου περιβάλλοντος εργασίας στους χώρους του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να δώσω πολλές ευχαριστίες στην οικογένεια μου για τη διαρκή στήριξη και υπομονή που έδειξε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου αλλά και καθ' όλη την πενταετή ακαδημαϊκή μου σταδιοδρομία στο Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Επίσης, ένα τεράστιο ευχαριστώ στους φίλους μου που, με την καθημερινή αλληλεπίδραση, με βοήθησαν να πετύχω τους στόχους μου.

Περίληψη

Η νανοτεχνολογία έχει φέρει επανάσταση στον τομέα των φαρμακευτικών επιστημών, προσφέροντας πρωτοφανείς ευκαιρίες για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, ενισχυμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα ενισχύοντας τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες. Η επιλογή του φορέα εγκλεισμού ενός φαρμάκου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το προφίλ απελευθέρωσής του και σχετίζεται κατά κύριο λόγο με την επιθυμητή εφαρμογή.

Το αλγινικό είναι ένα βιο-πολυμερές το οποίο χρησιμοποιείται για το σχηματισμό φορέων φαρμάκων καθώς είναι βιοδιασπώμενο, βιοσυμβατό με τον ανθρώπινο οργανισμό και κυρίως μη τοξικό. Πρόκειται για έναν πολυσακχαρίτη, ο οποίος αποτελείται από μονάδες α-1 γουλουρονικού οξέος και β-d μαννουρονικού οξέος συνδεδεμένες με 1-4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Τα νανοσωματίδια αλγινικού διαθέτουν πληθώρα εφαρμογών σε πολλούς τομείς με τους κυριότερους να αποτελούν τα φάρμακα, τα καλλυντικά και τα τρόφιμα.

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που αποτελούνται από φυσικά συστατικά (σάκχαρα, πολυαλκοόλες, οργανικά οξέα, οργανικές βάσεις) ονομάζονται φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NADES). Τα NADES είναι εύκολα στην παραγωγή, μη τοξικά, βιοδιασπώμενα και πολύ παχύρρευστα.

Η χρυσίνη ή αλλιώς 5,7 υδρόξυ-φλαβόνη ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και εντοπίζεται σε πολλά φυτικά εκχυλίσματα, συμπεριλαμβανομένης της πρόπολης, του μπλε λουλουδιού του πάθους (*Passiflora caerulea*) και του μελιού, τα οποία έχουν μεγάλη φαρμακευτική επίδραση. Παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών και φαρμακολογικών δράσεων, όπως η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης, η αντικαρκινική και η καρδιοπροστατευτική δράση, χάρη στις οποίες έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να λειτουργήσει ως φάρμακο για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη εγκλωβισμού του φλαβονοειδούς χρυσίνη σε σωματίδια αλγινικού με παράγοντα διασταύρωσης τον φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη ή αλλιώς NADES.

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας πραγματοποιείται μέσω πειραματικού σχεδιασμού *Box Behnken* με επιλεγμένες ανεξάρτητες μεταβλητές να είναι η περιεκτικότητα του διαλύματος αλγινικού (% w/v AI), του διαλύματος του χρησιμοποιούμενου φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (% v/v NADES) και του διαλύματος της προς εγκλωβισμό ένωσης, χρυσίνη (% w/w ChR). Οι αποκρίσεις που εξετάζονται είναι το μέγεθος, η κατανομή του μεγέθους, το επιφανειακό φορτίο (ζ-δυναμικό) και η απόδοση εγκλωβισμού των παραγόμενων νανοσυστημάτων.

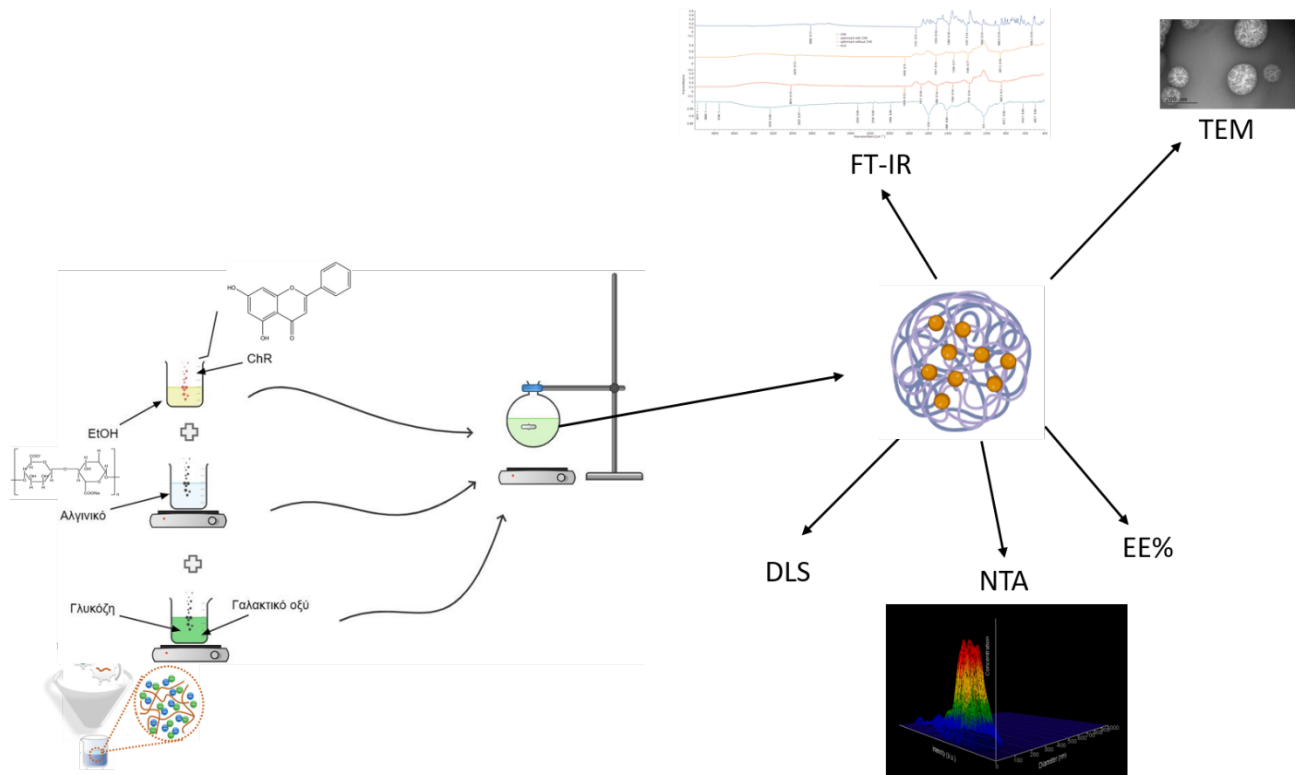
Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίζονται με βάση το μέγεθος με τις μεθόδους δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), με βάση τη δομή μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR/FT – IR), καθώς και μορφολογικά μέσω της ηλεκτρονικής μαγνητοσκοπίας διαπερατότητας (TEM).

Τα βέλτιστα νανοσυστήματα εμφανίζουν μέγεθος 138 ± 22.7 nm. Η απόδοση εγκλωβισμού της χρυσίνης σε είναι ίση με 40 ± 13.4 %.

Παράλληλα, μελετάται *in vitro* η αποδέσμευση της χρυσίνης σε συνθήκες προσομοίωσης του ανθρώπινου δέρματος. Συνολικά αποδεσμεύεται το 74% της εγκλωβισμένης ένωσης σε 24h με την κινητική μοντελοποίηση να υποδεικνύει ως μηχανισμό αποδέσμευσης τη διάχυση κατά Fick.

Επιστημονική περιοχή: Πράσινη Χημεία, Φαρμακευτική Χημεία, Νανοτεχνολογία

Λέξεις κλειδιά: εγκλωβισμός, νανοσωματίδια, αλγινικό, NADES, χρυσίνη, απόδοση εγκλωβισμού, φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης



Εικόνα 1: Γραφική περίληψη

Abstract

Nanotechnology has revolutionised the field of pharmaceutical sciences, offering unprecedented opportunities for targeted drug delivery, enhanced therapeutic efficacy by enhancing physicochemical and biological properties. The choice of the encapsulation vector for a drug depends on many factors such as its release profile and is primarily related to the desired application.

Alginate is a biopolymer which is used for drug carrier formation as it is biodegradable, biocompatible with the human body and mainly non-toxic. It is a polysaccharide consisting of α -l-glucuronic acid and β -d-mannuronic acid units linked by 1-4 glycosidic bonds. Alginate nanoparticles have a multitude of applications in many fields, the main ones being pharmaceuticals, cosmetics and foodstuffs.

Deep eutectic solvents consisting of natural components (sugars, polyalcohols, organic acids, organic bases) are called natural deep eutectic solvents (NADES). NADES are easy to produce, non-toxic, biodegradable and very viscous.

Chrysin or 5,7-hydroxyflavone belongs to the flavonoid family and is found in many plant extracts, including propolis, passion flower (*Passiflora caerulea*) and honey, which have a great medicinal effect. It exhibits a wide range of biological and pharmacological actions, such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer and cardioprotective activity, thanks to which it has been shown to act as a drug for the treatment of various diseases.

The aim of the present thesis is to study the encapsulation of the flavonoid chrysin in alginate particles with the natural deep eutectic solvent or NADES as crosslinking agent.

The process optimization is carried out through an experimental Box Behnken design with the selected independent variables being the content of the alginate solution (% w/v Al), the solution of the natural deep eutectic solvent used (% v/v NADES) and the solution of the compound to be encapsulated, chrysin (% w/w ChR). The responses investigated are the size, size distribution, surface charge (z-dynamic) and encapsulation efficiency of the produced nanosystems.

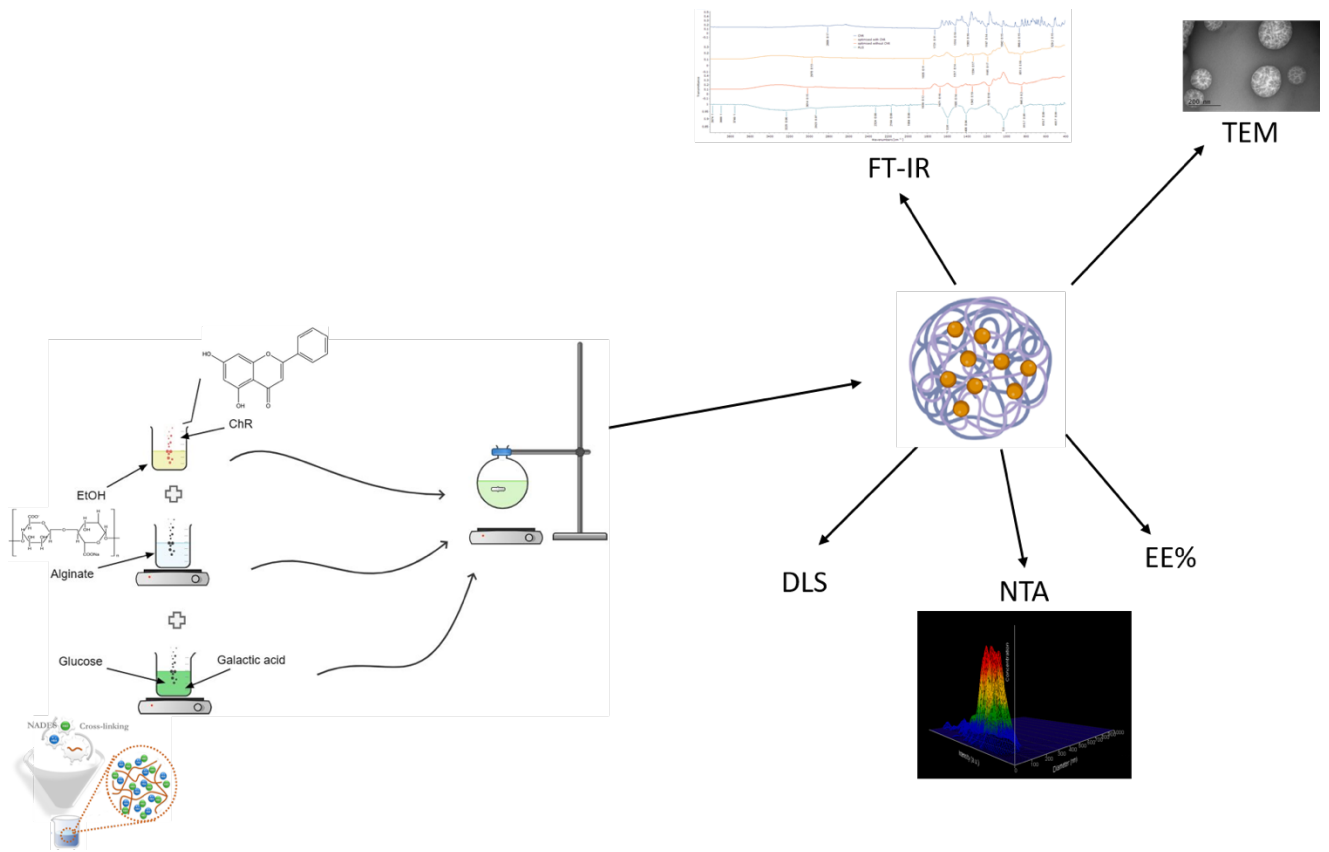
The nanoparticles are characterized by size through dynamic light scattering (DLS) and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) methods, by structure through Fourier transform infrared spectroscopy and attenuated total reflection (ATR/FT - IR), and morphologically through transmission electron magnetoscopy (TEM).

The optimal nanosystems exhibit a size of 138 ± 22.7 nm. The chrysin encapsulation efficiency in is equal to 40 ± 13.4 %.

In parallel, the release of chrysin is studied in vitro under conditions simulating human skin. Overall, 74 % of the encapsulated compound is released in 24h with kinetic modeling indicating Fick's diffusion as the release mechanism.

Scientific Area: Pharmaceutical Chemistry, Green Chemistry Pharmaceutical Nanotechnology

Key words: encapsulation, nanoparticles, alginate, NADES, chrysin, encapsulation efficacy, natural deep eutectic solvent



Εικόνα 2: Graphical abstract

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	2
Περίληψη	3
Abstract	5
Θεωρητικό μέρος	10
1.1 Εισαγωγή στη нанοτεχνολογία	10
1.1.1 Σύντομη ιστορική αναδρομή	10
1.2 Εφαρμογές της нанοτεχνολογίας	10
1.2.1 Πλεονεκτήματα της нанοτεχνολογίας	10
1.2.2 Εφαρμογές στην ιατρική	11
1.2.3 Εφαρμογές στη φαρμακευτική	11
2.1 Νανοδομημένα μεταφοράς φαρμάκων	12
2.1.1 Τύποι νανοδομημάτων χορήγησης φαρμάκων	12
2.1. Φαινολικές ενώσεις	17
2.1.1 Προέλευση φαινολικών ενώσεων.....	17
2.2 Φλαβονοειδή	17
2.1.2.1 Χημική δομή.....	18
2.1.2.2 Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών.....	19
2.2.1 Χρυσίνη	21
2.2.1.1 Προέλευση και ιδιότητες.....	21
2.2.1.2 Χημική Δομή.....	21
2.2.1.3 Βιολογικές δράσεις χρυσίνης	21
2.2.1.4 Χρυσίνη και εγκλωβισμός.....	23
3.1 Αλγινικό	24
3.1.1 Προέλευση και ιδιότητες αλγινικού	24
3.1.2 Δομή αλγινικού.....	24
3.1.3 Αλγινικό και νανοσωματίδια	25
4 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων	26
I. Με βάση το μέγεθος.....	26
II. Με βάση τη μορφολογία.....	29

III. Με βάση τη θερμική συμπεριφορά.....	31
IV. Με βάση τη δομή	31
5. Πράσινη χημεία	33
5.1 Ιοντικά υγρά.....	34
5.2 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες	34
5.2.1 Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NADES)	35
6 Μελέτη αποδέσμευσης.....	37
Burst effect	38
6.1 Κινητική μοντελοποίηση	39
6.3 Μελέτη αποδέσμευσης δραστικών ουσιών από νανοφορείς.....	42
6.4 Μembrάνη διάλυσης-διάχυσης.....	43
6.5 Θεραπευτικό παράθυρο	43
Σκοπός.....	45
Πειραματικό μέρος.....	46
7.1 Αντιδραστήρια.....	46
7.2 Οργανολογία και συσκευές.....	46
7.3 Σύνθεση του πράσινου βαθέως ευτηκτικού διαλύτη.....	47
7.4 Πράσινη σύνθεση νανοσωματιδίων αλγινικού για τον εγκλωβισμό της χρυσίνης.....	47
7.5 Εγκλωβισμός των νανosuστημάτων αλγινικού-χρυσίνης.....	49
8. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων.....	51
8.1 Προσδιορισμός χαρακτηριστικών νανοσωματιδίων.....	51
8.1.1 Προσδιορισμός δείκτη πολυδιασποράς και ζ – δυναμικού	51
8.1.2 Προσδιορισμός μεγέθους και συγκέντρωσης.....	51
8.2 Απόδοση εγκλωβισμού.....	53
8.2.1 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού.....	55
8.3 Μελέτη αποδέσμευσης <i>in vitro</i>	57
8.4 Βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανosuστημάτων αλγινικού – χρυσίνης με χρήση πειραματικού σχεδιασμού	58
9. Αποτελέσματα και συζήτηση	59
9.1 Αποτελέσματα πειραμάτων πειραματικού σχεδιασμού	59

9.1.1 Αποτελέσματα πειραμάτων για τον χαρακτηρισμό του μεγέθους	59
9.1.2 Σύγκριση Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	60
9.1.3 Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων.....	62
9.2 Βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων	72
9.3 Επιβεβαίωση μοντέλου	74
9.4 Μελέτη αποδέσμευσης <i>in vitro</i> της χρυσίνης από τα βέλτιστα νανοσυστήματα.....	75
9.4.1 Κινητικά μοντέλα αποδέσμευσης.....	76
9.5 Μελέτη δομής μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)..	79
9.5.1 Διαγράμματα ATR/FT-IR	79
9.5.2 Μετατοπίσεις χαρακτηριστικών κορυφών απορρόφησης του αλγινικού νατρίου στα φάσματα FT-IR των εγκλεισμένων νανοσωματιδίων	83
9.6 Αποτελέσματα Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διερχόμενης Δέσμης Ηλεκτρονίων TEM...84	
9.6.1 Αλγινικό-NADES με εγκλωβισμό χρυσίνης	84
9.6.2 Αλγινικό-NADES χωρίς εγκλωβισμό χρυσίνης (blank)	84
12. Συμπεράσματα.....	86
11. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	88
Συμμετοχές σε συνέδρια.....	89
Βιβλιογραφία	90
Ευρετήριο Εικόνων.....	93
Ευρετήριο Διαγραμμάτων.....	94
Ευρετήριο Πινάκων.....	96

Θεωρητικό μέρος

1.1 Εισαγωγή στη νανοτεχνολογία

1.1.1 Σύντομη ιστορική αναδρομή

Η πρώτη επίσημη επιστημονική αναφορά που έγινε στη νανοτεχνολογία ήταν από τον Richard Feynman το 1959 σε μία ομιλία του με τίτλο «Υπάρχει άπλετος χώρος στο βάθος» («There's plenty of room at the bottom»), στην οποία ανέλυσε τη δυνατότητα διάταξης και χειρισμού μεμονωμένων ατόμων και μορίων. [1]

Ωστόσο, η πιο συστηματική έρευνα ξεκίνησε τις δεκαετίες του 1980 και 1990. Το 1981, το μικροσκόπιο σάρωσης σήραγγας (STM) εφευρέθηκε από τους Gerd Binnig και Heinrich Rohrer, το οποίο επέτρεψε στους επιστήμονες να δουν και να χειριστούν μεμονωμένα άτομα και μόρια σε μια επιφάνεια.

Το 1986, ο όρος νανοτεχνολογία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Eric Drexler στο βιβλίο του «Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology», στο οποίο πρότεινε την έννοια των μοριακών μηχανών ικανών να κατασκευάζουν πολύπλοκες δομές σε ατομικό και μοριακό επίπεδο.

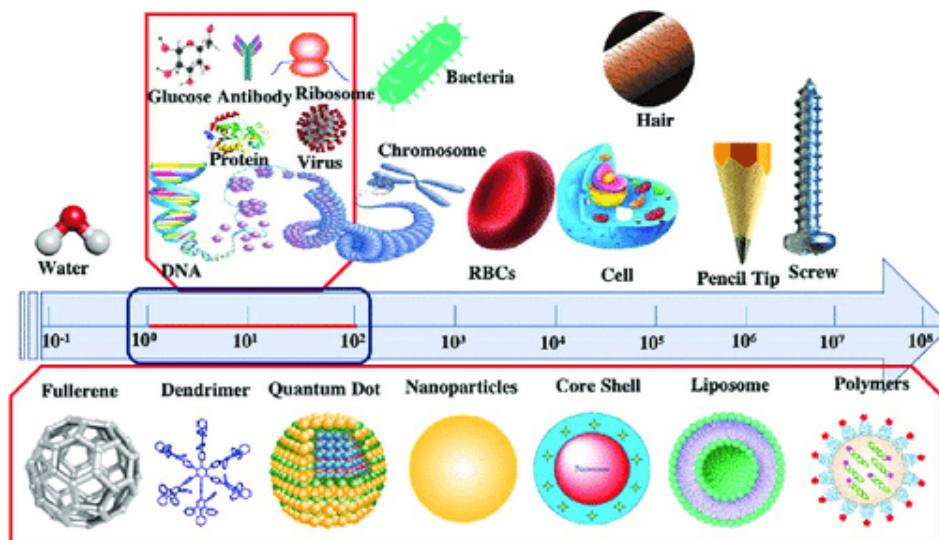
Στα επόμενα χρόνια, η πρόοδος στη νανοτεχνολογία επέτρεψε στους επιστήμονες να εξερευνήσουν και να χειριστούν υλικά σε νανοκλίμακα, οδηγώντας τους στην ανάπτυξη νέων υλικών και τεχνολογιών με ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων των ηλεκτρονικών, της ιατρικής, της ενέργειας και άλλων.

Σήμερα, η νανοτεχνολογία είναι ένας ταχέως αναπτυσσόμενος επιστημονικός κλάδος με ευρύ φάσμα εφαρμογών σε τομείς όπως η ιατρική, η ηλεκτρονική και η ενέργεια. Η έρευνα συνεχίζει να διευρύνει τα όρια των δυνατοτήτων σε επίπεδο νανοκλίμακας και συνεχώς γίνονται νέες ανακαλύψεις.

1.2 Εφαρμογές της νανοτεχνολογίας

1.2.1 Πλεονεκτήματα της νανοτεχνολογίας

Η νανοτεχνολογία είναι το διεπιστημονικό πεδίο που σχετίζεται με την ανάπτυξη και τη χρήση των υλικών με τα οποία μπορούν να παρασκευαστούν συσκευές και προϊόντα τάξης μεγέθους ενός δισεκατομμυριοστού του μέτρου [1].



Εικόνα 1: Σύγκριση διαστάσεων νανοκλίμακας με τις διαστάσεις άλλων υλικών

Στην κλίμακα νανομέτρων, τα υλικά παρουσιάζουν ασυνήθιστες ιδιότητες. Όταν τροποποιείται το μέγεθος ενός σωματιδίου, μπορεί να αλλάξει χρώμα, για παράδειγμα. Αυτό συμβαίνει επειδή στα σωματίδια κλίμακας νανομέτρων, η διάταξη των ατόμων αντανακλά το φως διαφορετικά. Ο χρυσός μπορεί να φαίνεται σκούρο κόκκινο ή μοβ, ενώ το ασημί μπορεί να φαίνεται κιτρινωπό ή κεχριμπαρένιο. [2]

Η νανοτεχνολογία μπορεί να αυξήσει την επιφάνεια ενός υλικού. Αυτό επιτρέπει σε περισσότερα άτομα να αλληλοεπιδρούν με άλλα υλικά. Η αυξημένη επιφάνεια είναι ένας από τους κύριους λόγους για τους οποίους τα υλικά κλίμακας νανομέτρων μπορεί να είναι ισχυρότερα, πιο ανθεκτικά και πιο αγωγίμα από τα αντίστοιχά τους μεγαλύτερης κλίμακας.

1.2.2 Εφαρμογές στην ιατρική

Ένας κύριος στόχος της ιατρικής είναι η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση κλινικών περιστατικών, παρέχοντας μια αποτελεσματική θεραπεία χωρίς δευτερογενή αποτελέσματα. Με την εμφάνιση της νανοτεχνολογίας, η επίτευξη αυτού του στόχου φαίνεται πιο κοντά από ποτέ. Για το σκοπό αυτό, η ανάπτυξη νέων υλικών όπως τα νανοσωματίδια, υπόσχεται νέα και ισχυρά εργαλεία σε τομείς όπως η απεικόνιση, η ταχύτερη διάγνωση, η χορήγηση φαρμάκων καθώς και η ανάπτυξη νέων ιατρικών προϊόντων. [3]

1.2.3 Εφαρμογές στη φαρμακευτική

Αν και τα νανοσωματίδια έχουν συνήθως μέγεθος κάτω από 100nm, όταν προορίζονται για φαρμακευτική χορήγηση, το μέγεθος τους περιορίζεται από 10-100 nm. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα νανοσωματίδια αποτελούνται από δύο στοιχεία: το ενεργό φαρμακευτικό συστατικό και τον φορέα. Όσον αφορά τα πολυμερή νανοσωματίδια που προορίζονται για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου έχει διαπιστωθεί ότι ενισχύουν την θεραπευτική αξία των υδατοδιαλυτών και αδιάλυτων

φαρμάκων και μειώνουν την τοξικότητά τους. Το σύστημα χορήγησης νανο-φαρμάκου εξαρτάται από το όργανο-στόχο, το επιθυμητό φάρμακο και τη συμβατότητά του με το βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές.[4]

2.1 Νανοδομήματα μεταφοράς φαρμάκων

Τα νανοδομήματα αποτελούν μικροκολλοειδείς δομές της κλίμακας των 10 έως 1000nm. 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 στο χώρο της επιστήμης. Τα νανοδομήματα χορήγησης φαρμάκων είναι ένα είδος νανοτεχνολογίας που περιλαμβάνει τη χρήση νανοσωματιδίων για την παροχή φαρμάκων σε συγκεκριμένα σημεία-στόχους μέσα στο σώμα. Αυτά τα νανοσωματίδια μπορούν να κατασκευαστούν έτσι ώστε να έχουν συγκεκριμένες ιδιότητες, όπως το μέγεθος και το σχήμα, που τους επιτρέπουν να αλληλοεπιδρούν με βιολογικά συστήματα με ελεγχόμενο τρόπο.

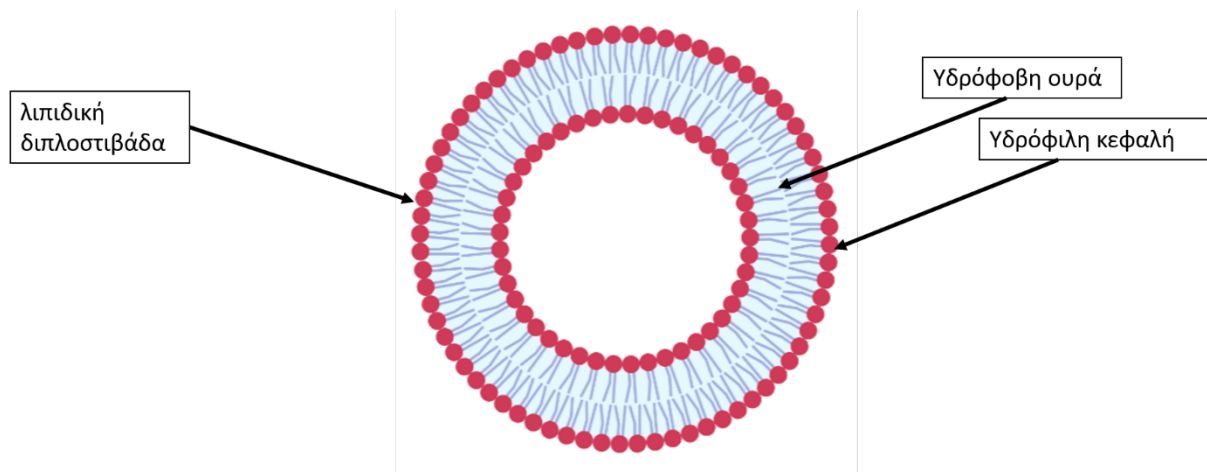
Η επιλογή ενός τέτοιου φορέα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως:

- η οδός χορήγησης
- το προφίλ αποδέσμευσης του φαρμάκου
- το επιθυμητό σχήμα και μέγεθος των νανοδομημάτων
- τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου
- η φυσιολογία και η τοποθεσία του στόχου δράσης
- η λειτουργικότητα των σωματιδίων

2.1.1 Τύποι νανοδομημάτων χορήγησης φαρμάκων

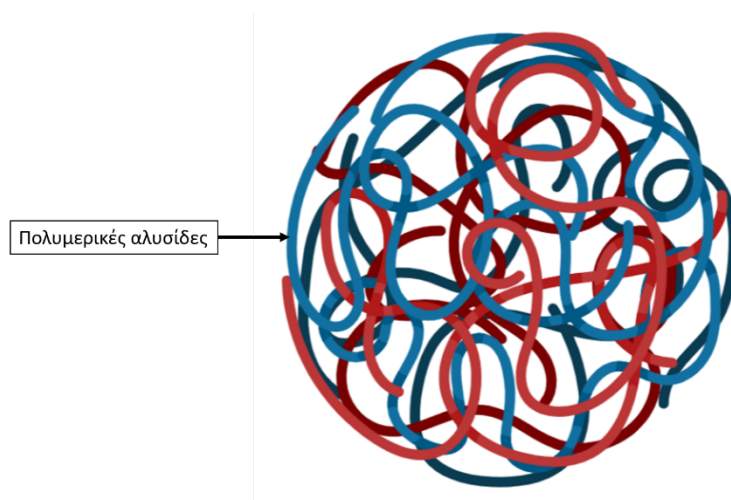
Υπάρχουν διάφοροι τύποι νανοδομημάτων χορήγησης φαρμάκων, όπως:

- **Λιποσώματα:** σφαιρικά νανοσωματίδια κατασκευασμένα από μια λιπιδική διπλοστιβάδα που μπορούν να εγκλωβίσουν φάρμακα μέσα στον υδατικό τους πυρήνα. Τα λιποσώματα μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να στοχεύουν συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς τροποποιώντας την επιφάνειά τους με μόρια στόχευσης. Ως φορείς φαρμάκων, τα λιποσώματα παρουσιάζουν εξαιρετικές ιδιότητες, όπως η προστασία των ενθυλακωμένων ουσιών από τη φυσιολογική αποικοδόμηση, η αύξηση του χρόνου ημιζωής του φαρμάκου, ο έλεγχος της αποδέσμευσης των μορίων του φαρμάκου και η εξαιρετική βιοσυμβατότητα και ασφάλεια.[46]



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση λιποσώματος

- **Πολυμερικά νανοσωματίδια:** νανοσωματίδια κατασκευασμένα χρησιμοποιώντας μια μεγάλη ποικιλία είτε φυσικών είτε συνθετικών πολυμερών, όπως το πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό οξύ) (PLGA) ή η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Τα πολυμερικά νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενθυλάκωση υδρόφοβων ή υδρόφιλων φαρμάκων και μπορούν να σχεδιαστούν για να απελευθερώνουν το φάρμακο με ελεγχόμενο τρόπο. Μελέτες φαρμακοκινητικής έδειξαν αυξημένη κατακράτηση του φαρμάκου στον οργανισμό και συσσώρευση στον ιστό-στόχο, παρατεταμένο χρόνο στην κυκλοφορία του αίματος μαζί με μειωμένη νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα, χαμηλότερες καρδιαγγειακές επιδράσεις και μειωμένη πρόσληψη από τα μακροφάγα όταν χρησιμοποιούνται συστήματα NP τροποποιημένων με επιφανειοδραστική ουσία.[47]



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση πολυμερικού νανοσωματιδίου

- **Δενδριμερή:** διακλαδισμένα, δενδροειδή νανοσωματίδια με πυρήνα και πολλαπλές διακλαδώσεις σε μονοδιασπορά.

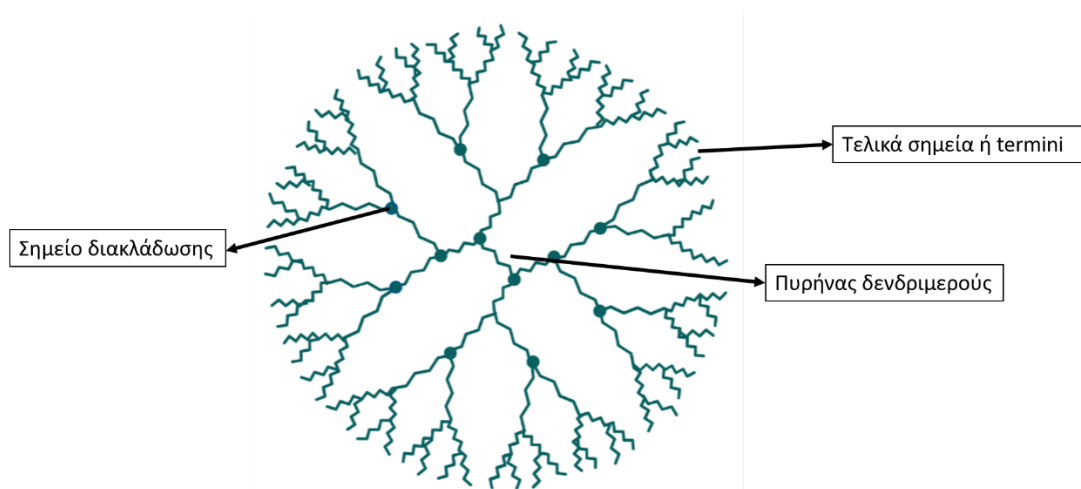
Τα δενδριμερή αποτελούνται από:

- τον πυρήνα (core)
- τα σημεία διακλάδωσης (branching units), τα οποία ξεκινούν από τον πυρήνα και συγκροτούν το δενδριμερές
- την εξωτερική επιφάνεια, στην οποία βρίσκονται οι τελικές ομάδες (Εικόνα 4)

Τα δενδριμερή μπορούν να σχεδιαστούν για παθητική στόχευση με μια επικάλυψη PEG ή για ενεργητική στόχευση με την προσθήκη ομάδων στόχευσης. Τα φάρμακα μπορούν είτε να συνδεθούν με ομοιοπολικό δεσμό στη δομή των δενδριμερών ή να διαλυτοποιηθούν μέσα στην υδρόφοβη περιοχή της δομής τους.

Λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους και της εύκολης τροποποίησης της δομής τους, τα δενδριμερή αναδεικνύονται ως πιθανά συστήματα χορήγησης φαρμάκων. Από φαρμακευτική άποψη είναι σημαντικό ότι τα σύμπλοκα ή τα συζεύγματα δενδριμερών-φαρμάκων έχουν ήδη αξιολογηθεί σε ενδοφλέβιες, στοματικές, διαδερμικές, οφθαλμικές και πνευμονικές οδούς

χορήγησης. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των δενδριμερών ως φορέων φαρμάκων περιλαμβάνουν την παράταση του χρόνου παραμονής του φαρμάκου στο κυκλοφορικό σύστημα, την προστασία του φαρμάκου από το περιβάλλον του, την αύξηση της σταθερότητας της δραστικής ένωσης και την ιστική στόχευση.

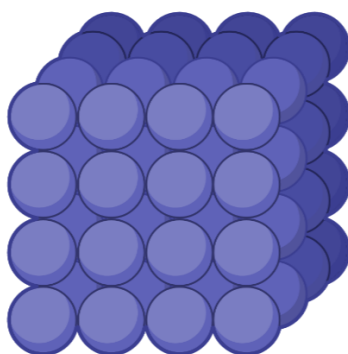


Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση δενδριμερούς νανοσωματιδίου

➤ **Νανοκρύσταλλοι:** κρυσταλλικά νανοσωματίδια με εύρος μεγέθους 10-200 nm. Οι νανοκρύσταλλοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της διαλυτότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των δυσδιάλυτων φαρμάκων.

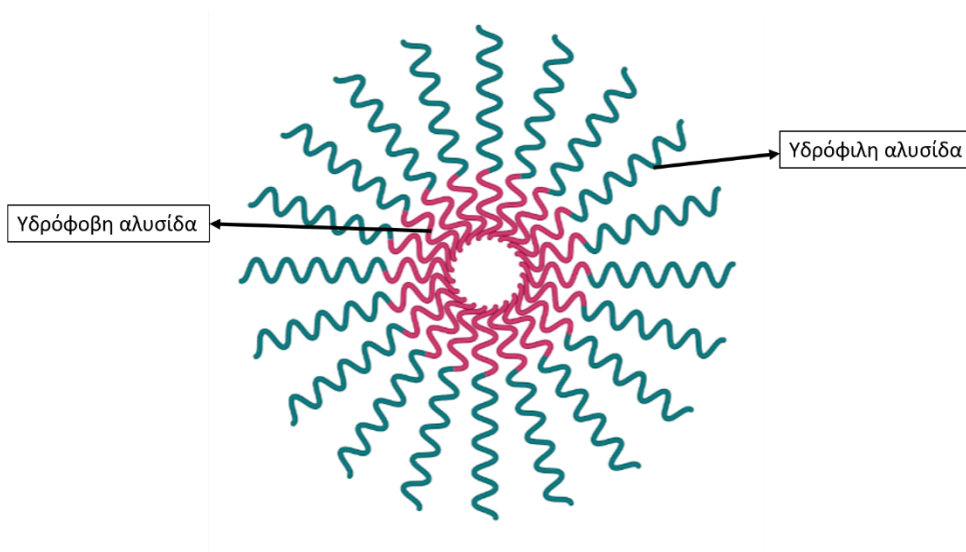
Οι κύριοι λόγοι για την αυξημένη ταχύτητα διάλυσης και συνεπώς την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα είναι:

- **Αύξηση της ταχύτητας διάλυσης μέσω της αύξησης της επιφάνειας:** η μείωση του μεγέθους οδηγεί σε αύξηση της επιφάνειας και συνεπώς, σύμφωνα με την εξίσωση Noyes-Whitney[49], σε αύξηση της ταχύτητας διάλυσης. Επομένως, η μικροκοκκοποίηση είναι ένας κατάλληλος τρόπος για την επιτυχή ενίσχυση της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων όπου η ταχύτητα διάλυσης είναι το βήμα που περιορίζει τον ρυθμό.
- **Αύξηση της διαλυτότητας κορεσμού:** η διαλυτότητα κορεσμού C_s είναι μια σταθερά που εξαρτάται από την χημική ένωση, το μέσο διάλυσης και τη θερμοκρασία. Αυτό ισχύει για τα μικροσωματίδια σκόνης με μέγεθος στην περιοχή των μικρομέτρων ή παραπάνω. Ωστόσο, κάτω από ένα κρίσιμο μέγεθος 1-2 μm , η διαλυτότητα κορεσμού είναι επίσης συνάρτηση του μεγέθους των σωματιδίων. Αυτή αυξάνεται με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων κάτω από τα 1000 nm. Επομένως, οι νανοκρύσταλλοι φαρμάκων διαθέτουν αυξημένη διαλυτότητα κορεσμού.[50]



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση νανοκρυστάλλου

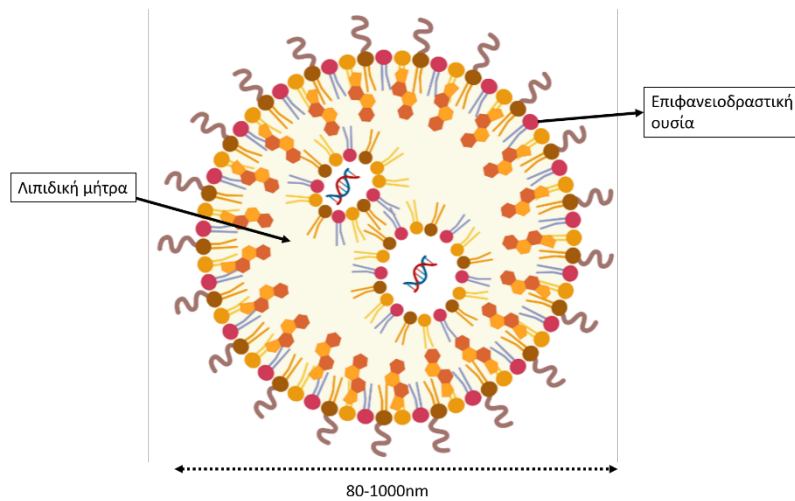
- **Πολυμερικά μικύλλια:** έχουν μέγεθος νανομέτρων και αποτελούνται από αμφίφιλα συμπολυμερή, τα οποία όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον σχηματίζουν μικύλλια. Ο υδρόφοβος πυρήνας τους είναι κατάλληλος για τον εγκλωβισμό και τη μεταφορά λιπόφιλων μορίων – φαρμάκων. Τα πολυμερικά μικύλλια παρουσιάζουν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



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση πολυμερικού μικυλλίου

- **Στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια:** Τα στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια (Solid Lipid Nanoparticles, SLN) είναι κολλοειδή σωματίδια που παρασκευάζονται από στερεά λιπίδια (π.χ. στερεά τριγλυκερίδια, κορεσμένα φωσφολιπίδια και λιπαρά οξέα) διασπαρμένα μέσα σε μια υδατική φάση. Παράγονται με τη μέθοδο της ομογενοποίησης –θερμής και ψυχρής- αλλά και με μεθόδους παρασκευής μικρογαλακτωμάτων. Το μέγεθος των σωματιδίων των SLN κυμαίνεται συνήθως από 80 έως 1000 nm. Τα εναιωρήματα στερεών λιπιδικών νανοσωματιδίων έχουν αναπτυχθεί για παρεντερική, από του στόματος, οφθαλμική, δερματική

και κοσμητική εφαρμογή, αλλά πρόσφατα έχουν ερευνηθεί ως πιθανά συστήματα μεταφοράς για τη μεταφορά φαρμάκων με στοχευμένη δράση.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση στερεού λιπιδικού νανοσυστήματος

- **Ανόργανα νανοσωματίδια:** μη τοξικά, υδρόφιλα, βιοσυμβατά και ιδιαίτερα σταθερά σε σύγκριση με τα οργανικά υλικά. Τα ανόργανα νανοσωματίδια κατασκευάζονται από ανόργανα υλικά, στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι νανοσωλήνες άνθρακα, τα κεραμικά, τα μέταλλα, τα οξείδια των μετάλλων και τα σουλφίδια των μετάλλων. Το πλεονέκτημα των ανοργάνων νανοσωματιδίων είναι η απλή διαδικασία παρασκευής τους σε ήπιες συνθήκες, με το επιθυμητό μέγεθος, σχήμα και πορώδες. Το πολύ μικρό μέγεθός τους (μικρότερο από 50 nm) τους δίνει τη δυνατότητα να ξεφεύγουν από το ΔΕΣ ενώ δεν επηρεάζονται από τις αλλαγές του pH. Παρουσιάζουν μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως υψηλή επιφάνεια ανά μονάδα όγκου και μοναδικές οπτικές και μαγνητικές ιδιότητες και μπορούν να λειτουργήσουν με διάφορα ειδικά ligands για να ενισχύσουν τη συγγενεία τους προς τα κύτταρα ή τα μόρια-στόχους. Εκτός από την ικανότητά τους για ελεγχόμενο προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου, τα ανόργανα νανοσωματίδια προστατεύουν το φάρμακο από την αποικοδόμηση και μπορούν να μειώσουν τη συχνότητα χορήγησης και τη δόση του φαρμάκου, μειώνοντας έτσι σημαντικά την τοξικότητα των φαρμάκων, ιδίως των καρκινικών φαρμάκων. Έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες σχετικά με τη χρήση ανόργανων νανοσωματιδίων για την ανίχνευση και τη θεραπεία του καρκίνου και οι εφαρμογές τους συνεχίζουν να αυξάνονται. [1,54]

Τα νανοσυστήματα χορήγησης φαρμάκων έχουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων χορήγησης φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης της βελτιωμένης βιοδιαθεσιμότητας, της στοχευμένης χορήγησης φαρμάκων και της μειωμένης τοξικότητας. Έχουν τη δυνατότητα να φέρουν επανάσταση στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών και καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι νευρολογικές διαταραχές.

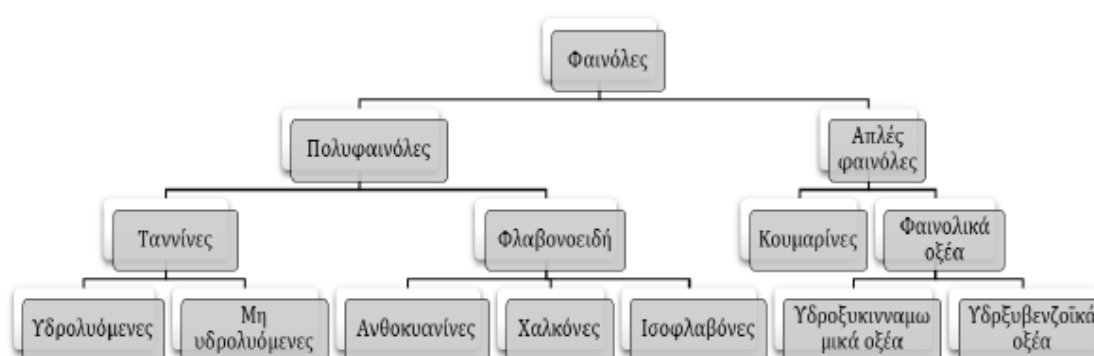
2.1. Φαινολικές ενώσεις

2.1.1 Προέλευση φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις είναι ο πιο γνωστός τύπος φυτοχημικών ουσιών που προέρχονται από φυτά. Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται μέσω των οδών σικιμικού οξέος και φαινυλοπροπανοειδών. Διαθέτουν ισχυρούς αντιοξειδωτικούς και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Ωστόσο, η βιοδραστικότητα επηρεάζεται από τον μεταβολικό μετασχηματισμό και τη βιοδιαθεσιμότητα.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τα βιοσυνθετικά δομικά στοιχεία τους ή τον ανθρακικό σκελετό. Οι φαινολικές ενώσεις αυτές φέρουν έναν τουλάχιστον υδροξύ-υποκαταστάτη. Οι υδροξύλομάδες μπορεί να είναι ελεύθερες ή να σχηματίζουν δομές όπως αιθέρες, εστέρες ή γλυκοζίτες. Οι φαινολικές ενώσεις είναι ιδιαίτερα δραστικές, λόγω του όξινου χαρακτήρα των ομάδων υδροξυλίου και των πυρηνόφιλων ιδιοτήτων των φαινολικών δακτυλίων.

Μια απλή ταξινόμηση διαιρεί την ευρεία κατηγορία των φαινολών σε απλές φαινόλες και πολυφαινόλες, αποκλειστικά βάσει του αριθμού των φαινολικών ομάδων, αλλά πολλές φυτικές φαινολικές ενώσεις πολυμερίζονται σε μεγαλύτερα μόρια. Τελικά, ο όρος «φυτικές φαινόλες» περιλαμβάνει τις απλές φαινόλες, όπως τα φαινολικά οξέα και τις κουμαρίνες και τις πολυφαινόλες όπως τα φλαβονοειδή και τις ταννίνες.



Εικόνα 6: Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων

Οι περισσότερες διαλυτές φαινολικές ενώσεις συντίθενται στο ενδοκυτταρικό ενδοπλασματικό δίκτυο των φυτών και αποθηκεύονται σε κενοτόπια. Οι δεσμευμένες φαινολικές ενώσεις, ωστόσο, σχηματίζονται με τη μεταφορά διαλυτών φαινολικών ενώσεων στο κυτταρικό τοίχωμα, οι οποίες στη συνέχεια συζεύγνυνται με μακρομόρια κυτταρικού τοιχώματος όπως κυτταρίνη και πρωτεΐνη μέσω εστερικών και γλυκοσιδικών δεσμών, συμβάλλοντας έτσι στο σχηματισμό κυτταρικού τοιχώματος.[22]

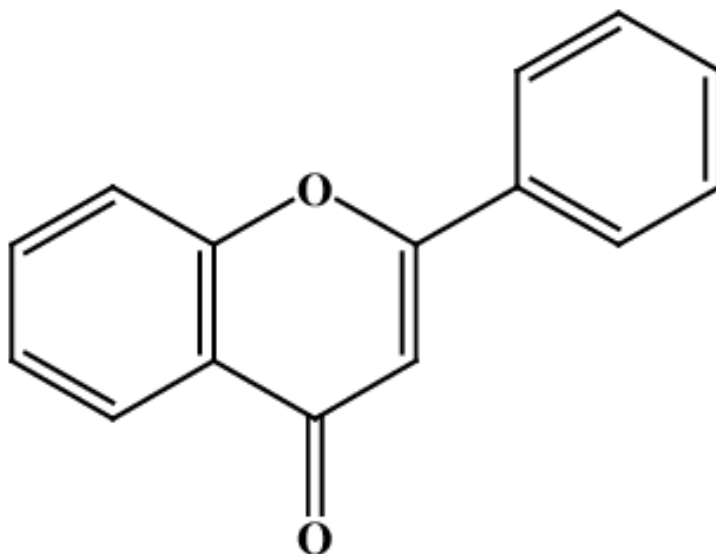
2.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φυσικές πολυφαινολικές ενώσεις που χαρακτηρίζονται από τον πυρήνα της φλαβάνης και αντιπροσωπεύουν μια από τις πιο διαδεδομένες κατηγορίες ενώσεων σε φρούτα, λαχανικά και ποτά φυτικής προέλευσης. Έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 8000 ενώσεις με δομή

φλαβονοειδών, πολλές από τις οποίες είναι υπεύθυνες για τα ελκυστικά χρώματα των λουλουδιών, των φρούτων και των φύλλων. Στα φυτά επιτελούν πολλές λειτουργίες, όπως τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, την προσέλκυση εντόμων και επικονιαστών. Επίσης λειτουργούν ως μόρια σήματος και φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας. Ανήκουν στις φαινολικές ενώσεις και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των πολυφαινολών με περισσότερες από έξι χιλιάδες διαφορετικές δομικές παραλλαγές. [6].

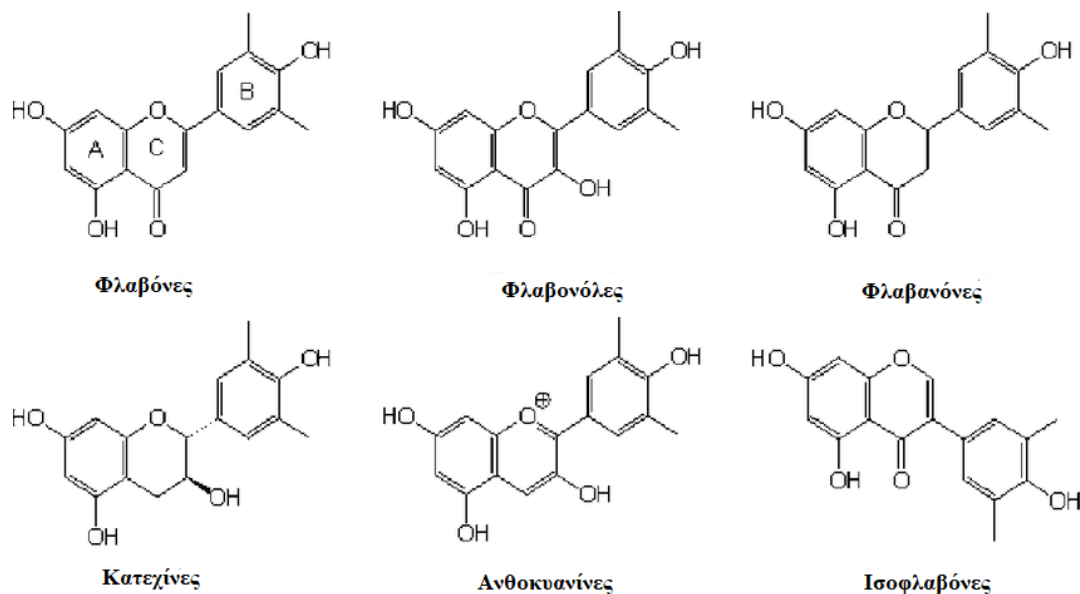
2.1.2.1 Χημική δομή

Ο όρος φλαβονοειδή χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα ευρύ σύνολο φυσικών προϊόντων που σχηματίζουν έναν ανθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων (C6-C3-C6) [8].



Εικόνα 7 Χημική δομή φλαβονοειδούς

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με την υποκατάσταση στον δακτύλιο του πυρανίου και στον τρόπο οξείδωσης. Υποκατηγορίες των φλαβονοειδών αποτελούν οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι κατεχίνες, οι ανθοκυανίνες και οι ισοφλαβόνες. Καθεμία από τις παραπάνω υποκατηγορίες εξαρτάται από τον τρόπο υποκατάστασης στους βενζοϊκούς δακτυλίους.



Εικόνα 8: Χημική δομή και υποκατηγορίες των φλαβονοειδών[51]

2.1.2.2 Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών

Αρκετοί ερευνητές έχουν δείξει τις ευεργετικές δράσεις των φλαβονοειδών, από την αντιμεταλλαξιγένεση έως την αντιγήρανση, οι οποίες οφείλονται στις ισχυρές αντιοξειδωτικές τους δράσεις. Τα φλαβονοειδή έχει αποδειχθεί σε πειραματικές μεθόδους *in vitro* και *in vivo* εδώ και πολλές δεκαετίες ότι διαθέτουν αντιαλλεργικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές, αντιαλλεργικές και αντικαρκινικές ιδιότητες[52]. Επιπλέον, ορισμένα από αυτά είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά.

- **Αντιαλλεργικές ιδιότητες:** τα φλαβονοειδή, ανάλογα με τη δομή τους, μπορούν να αναστείλουν τη διεγερμένη αποδέσμευση προφλεγμονωδών κοκκωδών συστατικών των μαστοκυττάρων, των βασεόφιλων και των ηωσινόφιλων που συμμετέχουν στην παθογένεια ασθενειών όπως το άσθμα, η αλλεργική ρινοεπιπεφυκίτιδα, η κνίδωση και άλλες.
- **Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες:** η αντιφλεγμονώδης δράση μπορεί να εκτιμηθεί από τις επιδράσεις των φλαβονοειδών στη λειτουργία των ουδετερόφιλων. Ορισμένα φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένης της κερκετίνης, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων με την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου και την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A2 και της οξειδάσης NADPH.
- **Αντιυικές ιδιότητες:** τα φλαβονοειδή μπορούν να εμποδίσουν τη δέσμευση και τη διείσδυση των ιών στα κύτταρα και να παρεμποδίσουν την αντιγραφή ή τη μετάφρασή τους.
- **Αντικαρκινικές ιδιότητες :** διαμορφώνουν τη δραστηριότητα των ενζύμων που απομακρύνουν τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), συμμετέχουν στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, προκαλούν απόπτωση, αυτοφαγία και καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων[53].
- **Αντιμυκητιασικές ιδιότητες:** εμφανίζονται αρκετοί αντιμυκητιασικοί μηχανισμοί που πραγματοποιούνται από τα φλαβονοειδή, όπως η διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης, η πρόκληση αρκετών μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών και η αναστολή του σχηματισμού κυτταρικού τοιχώματος, της κυτταρικής διαίρεσης και της σύνθεσης RNA.
- **Αντιοξειδωτικές ιδιότητες:** η αντιοξειδωτική ικανότητα ποικίλλει, καθώς εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων στον δακτύλιο B και C. Η λειτουργική ομάδα του

υδροξυλίου της δομής τους μπορεί να δωρίσει ένα ηλεκτρόνιο και υδρογόνο σε μια ρίζα μέσω συντονισμού, να σταθεροποιηθεί και να δημιουργήσει μια σχετικά σταθερή ρίζα φλαβονοειδούς. Γενικά, τα περισσότερα από τα φλαβονοειδή εμφανίζονται ως γλυκοσιδικά συζυγή, ώστε ο αριθμός και η θέση των συνδέσεων με το σάκχαρο να επηρεάζουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους. Απεναντίας, αν και τα αγλύκωνα φλαβονοειδή εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, εντούτοις η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι χαμηλότερη.

2.2.1 Χρυσίνη

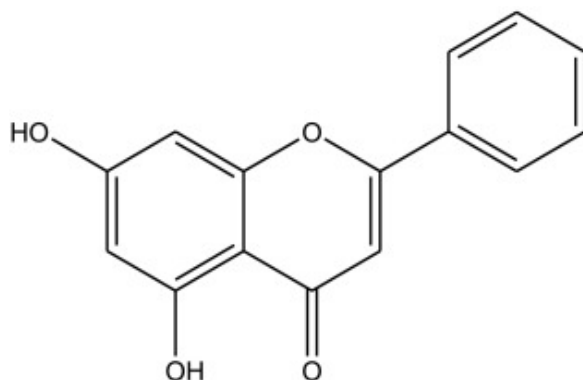
2.2.1.1 Προέλευση και ιδιότητες

Η χρυσίνη (ChR) είναι ένα διαιτητικό φυτοχημικό που υπάρχει σε αφθονία σε πολλά φυτικά εκχυλίσματα, συμπεριλαμβανομένης της πρόπολης, του μπλε λουλουδιού του πάθους (*Passiflora caerulea*) και του μελιού, τα οποία έχουν μεγάλη φαρμακευτική επίδραση. Σημαντική πηγή χρυσίνης αποτελούν επίσης τα μανιτάρια καθώς και το φαρμακευτικό φυτό *Radix scutellariae*. Η συγκέντρωση της χρυσίνης που συναντάται στην πρόπολη είναι ίση με 28g/l ενώ στο μέλι δάσους 5.3mg/kg.

2.2.1.2 Χημική Δομή

Η χρυσίνη είναι μια διυδρόξυ-φλαβόνη στην οποία οι δύο υδρόξυ-ομάδες βρίσκονται στις θέσεις 5 και 7.

Η χρυσίνη έχει την χαρακτηριστική δομή μίας φλαβόνης που αποτελείται από έναν σκελετό με δεκαπέντε άτομα άνθρακα. Η παρουσία καρβonyλίου, ο διπλός δεσμός C2-C3 στον δακτύλιο C και η υδροξυλίωση στις θέσεις 3 και 4 του δακτυλίου B είναι οι βασικές προϋποθέσεις για να έχει μια ένωση υψηλή αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 3: Χημική δομή της χρυσίνης (5,7 υδρόξυ-φλαβόνη)

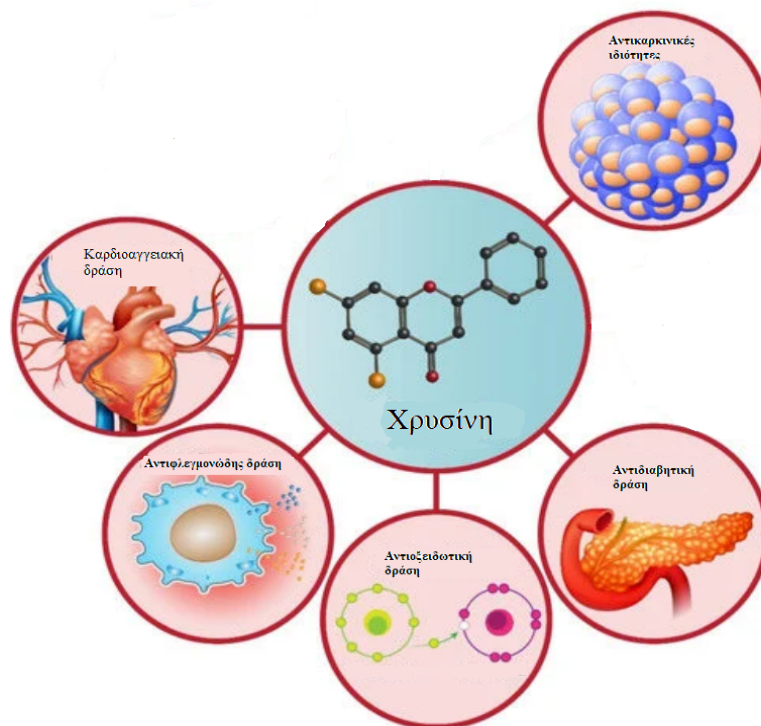
Οι φαινολικές ομάδες, λόγω της δομής συντονισμού που διαθέτουν, έχουν την τάση να σταθεροποιούν τη ρίζα που σχηματίζεται στον φαινολικό άνθρακα. Όταν οι φαινολικές ομάδες διαθέτουν ομάδες που λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων όπως το υδροξύλιο στις θέσεις όρθο ή πάρα παρουσιάζουν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Όσον αφορά στην παρουσία του καρβonyλίου, η αντιοξειδωτική ικανότητα βελτιώνεται όταν αυτός διαχωρίζεται από τον αρωματικό δακτύλιο.

2.2.1.3 Βιολογικές δράσεις χρυσίνης

Η χρυσίνη διαθέτει ποικιλία φαρμακολογικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών, αντιοξειδωτικών, αντινεοπλασματικών και αντικαρκινογόνων ιδιοτήτων.

- **Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες:** οι φλεγμονές και οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες συνδέονται με χρόνιες ασθένειες. Παρόμοια με άλλα φλαβονοειδή, η ChR λόγω του αντιοξειδωτικού και αντιφλεγμονώδους χαρακτήρα της δίνει καλά αποτελέσματα σε ανοσοπαθολογικούς και φυσικοχημικούς τραυματισμούς. Η ChR κατέχει ισχυρά ανοσοπροστατευτικά αποτελέσματα, καταστέλλει τη φλεγμονή στο ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπλέον, μπορεί να μειώσει τα φλεγμονώδη κύτταρα στον αεραγωγό και τις αλλεργικές αντιδράσεις, όπως το άσθμα.[19]

- **Καρδιοαγγειακές ιδιότητες:** η χρυσίνη καταστέλλει τις οδούς που εμπλέκονται στην θρόμβωση και στη συσσώρευση αιμοπεταλίων στον ενδοθηλιακό τραυματισμό της αορτής και στο καρδιακό οξειδωτικό στρες.[20]
- **Αντιδιαβητικές ιδιότητες:** η ChR σύμφωνα με τους Nas S.et al. (2019) έδειξε ότι είναι σε θέση να καταστέλλει τις μεταβολικές οδούς που εμπλέκονται στη διαβητική νεφροπάθεια, την αμφιβληστροειδοπάθεια, την καρδιακή μυοπάθεια και τη δυσλιπιδαιμία.
- **Αντιοξειδωτικές ιδιότητες :** η χορήγηση της ChR οδήγησε σε βελτίωση των ιδιοτήτων του σπέρματος, προστατεύοντας το αναπαραγωγικό σύστημα από της βλάβες της κίρσοκύλης, την ικανότητα να αναστέλλει τις οδούς του οξειδωτικού στρες σε διαφορετικά ζωικά μοντέλα οξειδωτικής βλάβης στην καρδιά, τον προστάτη, το αναπαραγωγικό σύστημα και τον ιπόκαμπο του εγκεφάλου.
- **Αντικαρκινικές ιδιότητες :** Ο καρκίνος, είναι μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό μη φυσιολογικών κυττάρων που εισβάλλουν και προκαλούν μεταστάσεις σε άλλα μέρη του σώματος. Οι φυσικές ενώσεις φυτικής προέλευσης μπορούν να συνεισφέρουν στην αντιμετώπιση της καρκινογένεσης. Η ασφάλεια, η αποτελεσματικότητα, η μεγάλη διαθεσιμότητα αυτών των ενώσεων παρέχουν πρόσθετες δυνατότητες όπως να αυξάνουν την αντοχή στη χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με άλλα παραδοσιακά αντικαρκινικά φάρμακα. [17]
- **Αντιϊκή δράση :** η χρυσίνη είναι ικανή να εμποδίσει τη δέσμευση και τη διείσδυση των ιών στα κύτταρα και να παρεμποδίσει την αντιγραφή ή τη μετάφρασή τους.



Εικόνα 4: Βιολογικές δράσεις του φυσικού φλαβονοειδούς χρυσίνη

Συνοψίζοντας, η ChR είναι ένα πολλά υποσχόμενο βιοδραστικό φλαβονοειδές με τις προαναφερθείσες σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία και τα συνθετικά της χρησιμοποιούνται ως φάρμακο για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Όντας ζωτικής σημασίας στις φαρμακευτικές

εφαρμογές της, η χρυσίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη από φλεγμονώδεις διαταραχές, καρδιαγγειακές παθήσεις, σακχαρώδη διαβήτη, οξειδωτικό στρες καθώς και καρκίνο.

2.2.1.4 Χρυσίνη και εγκλωβισμός

Μερικά παραδείγματα εγκλεισμού χρυσίνης που έχουν μελετηθεί παρουσιάζονται παρακάτω:

➤ Εγκλωβισμός χρυσίνης σε αλβουμίνη ορού βοοειδών

Μελετήθηκε ο εγκλωβισμός νανοσωματιδίων αλβουμίνης βόειου ορού φορτωμένου με ChR, με στόχο την αύξηση της διαλυτότητας της ChR και την βελτίωση της φαρμακευτικής τους δράσης. Μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός, τα αποτελέσματα έδειξαν σφαιρικό σχήμα με διάμετρο $97.5 \pm 5.75 \text{ nm}$ ενώ το ζ-δυναμικό ήταν -11 mV . Η *in vitro* μελέτη αποδέσμευσης φαρμάκου της χρυσίνης παρουσίασε ένα πρότυπο ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Η κυτταρική τοξικότητα των BSA NPs διερευνήθηκε επίσης σε κυτταρικές σειρές HFF2. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα NPs Chrysin-BSA μπορεί να αποτελέσουν ένα νέο σύστημα χορήγησης φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου. [23]

➤ Εγκλωβισμός χρυσίνης σε πολύ-αιθυλογλυκενόλη (PEG)

Μέσω της παρασκευής νανοσωματιδίων ChR-PEG πραγματοποιήθηκε μελέτη για την καλύτερη χορήγηση αντικαρκινικού φαρμάκου δοξορουβικίνης (DOX). Η DOX φορτώθηκε στα νανοσωματίδια, με αποτέλεσμα οι μέσες διαμέτροι τους να είναι κάτω από 200 nm. Ο ρυθμός αποδέσμευσης φαρμάκου σχετιζόταν στενά με το μήκος της αλυσίδας του PEG, καθώς η μικρότερη σε μέγεθος αλυσίδα PEG είχε ως αποτέλεσμα την ταχύτερη αποδέσμευση. Το συζυγές mPEG-Chrysin ήταν μη τοξικό τόσο για τους ινοβλάστες 3T3 όσο και για τα καρκινικά κύτταρα HepG2. [24]

➤ Εγκλωβισμός χρυσίνης σε νανοσωματίδια χρυσού (Au) για την αντιμετώπιση της λεισμανίασης

Η αναγωγική δύναμη της ChR χρησιμοποιήθηκε για σύζευξη με νανοσωματίδια Au. Τα νανοσωματίδια Au, τα οποία είναι ήδη γνωστά για τις αντιλεϊσμανιακές τους ιδιότητες, μαζί με τη συζευγμένη ChR, εμφάνισαν μειωμένο φορτίο παρασίτων στα μακροφάγα θηλαστικών. Μετά την επιτυχή σύνθεση των συζευγμένων νανοσωματιδίων, μετρήθηκε ότι η απόδοση φόρτωσης φαρμάκου ήταν $90,86 \pm 0,86\%$, δηλαδή περίπου το 90% της ChR φορτώθηκε σε Au- NP.

3.1 Αλγινικό

3.1.1 Προέλευση και ιδιότητες αλγινικού

Το αλγινικό είναι ένα φυσικό ανιονικό πολυμερές, που προέρχεται από το κυτταρικό τοίχωμα καφέ φυκιών και καψικός πολυσακχαρίτης κάποιων βακτηρίων.

- A. Καφέ φύκια (phaerhyceae): είναι μια ομάδα πολυκύτταρων φυκιών που ανήκουν στη γενεαλογία των stramenopile. Τα καφέ φύκια υποβάλλονται σε χημικές μεθόδους διεργασίας με στόχο την απομάκρυνση ακαθαρσιών όπως οι πολυφαινόλες, τα βαρέα μέταλλα και οι ενδοτοξίνες. Στη συνέχεια, γίνεται επεξεργασία τους, ως υδατικό διάλυμα με την διαδικασία της φυγοκέντρισης, αφού προστεθεί ποσότητα απιονισμένου νερού και όξινου ανθρακικού νατρίου[18]. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή και ως μέθοδος αλκαλικής εκχύλισης. Το εκχύλισμα διηθείται με χλωριούχο νάτριο ή ασβέστιο και προστίθεται στο διήθημα με σκοπό να καθιζάνει το αλγινικό. Το αλγινικό άλας που παράγεται με προσθήκη HCl μετατρέπεται σε αλγινικό οξύ[18,19].
- B. Βακτήρια: σε δύο είδη βακτηρίων απαντάται το αλγινικό, το *Pseudomonas aeruginosa* και το *Azotobacter*. Το *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα βακτήριο που βρίσκεται συνήθως στο περιβάλλον, για παράδειγμα στο έδαφος και στο νερό. Ορισμένα στελέχη *P. aeruginosa* (γνωστά ως βλεννοειδή στελέχη) μπορούν να εκκρίνουν άφθονες ποσότητες αλγινικού για να βοηθήσουν στο σχηματισμό παχιά δομημένων βιοφίλμ [10] ενώ το *Azotobacter* παράγει ένα πιο άκαμπτο αλγινικό (συνήθως υψηλότερες συγκεντρώσεις υπολειμμάτων G) που παραμένει στενά συνδεδεμένο με το κύτταρο και επιτρέπει τον σχηματισμό ανθεκτικών κύστεων[11]

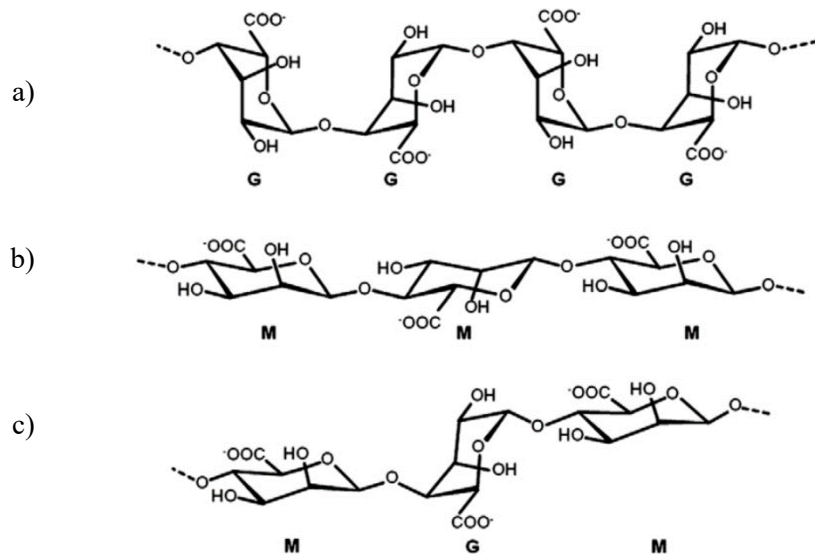


Έχει διερευνηθεί και χρησιμοποιηθεί εκτενώς για πολλές βιοϊατρικές εφαρμογές, λόγω της βιοσυμβατότητας, της χαμηλής τοξικότητας, του σχετικά χαμηλού κόστους και της ήπιας ζελατινοποίησης με προσθήκη δισθενών κατιόντων, όπως το Ca^{2+} [5].

3.1.2 Δομή αλγινικού

Το αλγινικό αποτελείται από α -L γουλουρονικού οξέος (G) και β -D-μαννουρονικού οξέος (M), γραμμικά συνδεδεμένοι με 1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς (Εικ. 2). Η σύνθεση και η σειρά των υπολειμμάτων G και M εξαρτώνται από την πηγή των χρησιμοποιούμενων φυκιών και επηρεάζουν τις

ιδιότητες του αλγινικού. Το αλγινικό μπορεί να είναι χημικά τροποποιημένο για να αλλάξει τις ιδιότητές του.



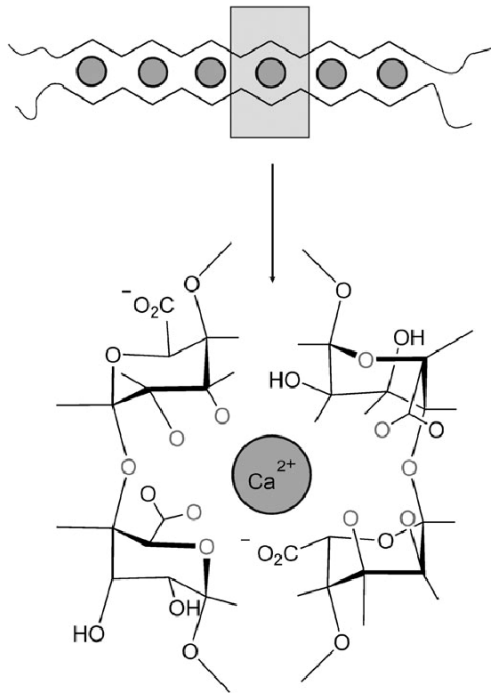
Εικόνα 5: Χημική ένωση αποτελούμενη από (a) α-L γουλουρονικό οξύ και (b) β-D μαννουρονικό οξύ σχηματίζοντας (c) 1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ τους

Στη φαρμακευτική το αλγινικό χρησιμεύει ως παράγοντας σχηματισμού γέλης και σταθεροποίησης, καθώς το αλγινικό μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο σε φαρμακευτικά προϊόντα ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Οι εκ του στόματος δοσολογικές μορφές είναι, επί του παρόντος, η πιο συχνή χρήση του αλγινικού σε φαρμακευτικές εφαρμογές. Παράλληλα, η χρήση αλγινικών υδρογέλης ως αποθηκών για την τοπική παροχή φαρμάκου στους ιστούς αυξάνεται. [5]

3.1.3 Αλγινικό και νανοσωματίδια

Η ικανότητα των υδατικών αλγινικών διαλυμάτων να σχηματίζουν νανοσωματίδια, όταν υποβάλλονται σε επεξεργασία με δισθενή ιόντα, κυρίως με δισθενή ιόντα ασβεστίου, η οποία λέγεται ιονοτροπική πηκτωμάτωση, έχει διερευνηθεί εκτενώς για την ανάπτυξη φορέων για παρατεταμένη ή ελεγχόμενη χορήγηση θεραπευτικών παραγόντων.

Τα G τμήματα του αλγινικού συμμετέχουν στην διαμοριακή σύνδεση, αφού το γουλουρονικό οξύ παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με τα δισθενή κατιόντα σε σχέση με τα M τμήματα του μαννουρονικού οξέος. Μεταξύ όλων των ειδών κατιόντων δισθενών μετάλλων, το ιόν ασβεστίου (Ca^{2+}) είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος παράγοντας crosslinking λόγω του χαμηλού κόστους και της χαμηλής τοξικότητάς του.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του “egg-box”

4 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

I. Με βάση το μέγεθος

Η αξιολόγηση των μετρήσεων που αφορούν στο μέγεθος ενός νανοκολοειδούς συστήματος διασποράς αποτελεί σημαντικό έργο το οποίο καθορίζει τη συμπεριφορά σε βάθος χρόνου ως φαρμακοτεχνολογικού προϊόντος και τελικά την αποτελεσματικότητα του ως φαρμακευτικού προϊόντος.[11]

4.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Η Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) αποτελεί ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο εργαστηριακά για τον προσδιορισμό του μεγέθους και του επιφανειακού φορτίου των νανοσυστημάτων. Αναλυτικότερα, είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους, της κατανομής μεγέθους και του ζ-δυναμικού των σωματιδίων. Είναι μία μέθοδος φιλική προς τον χρήστη καθώς διαθέτει οικονομικά όργανα, παρέχει ολοκληρωμένη ανάλυση δεδομένων, απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος και λειτουργεί χωρίς προ-πειραματική βαθμονόμηση.

4.1.1 Αρχή λειτουργίας για τον προσδιορισμό της κατανομής του μεγέθους

Η Δυναμική Σκέδαση Φωτός βασίζεται στην κίνηση Brown των σωματιδίων. Η ταχύτητα της κίνησης των σωματιδίων εξαρτάται από το μέγεθος τους, τη θερμοκρασία του διαλύματος και το ιξώδες του διαλύματος. Η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων είναι μέτρο σταθερότητας του συστήματος. Το φως που σκεδάζεται από τα σωματίδια περιέχει πληροφορίες για την ταχύτητα διάχυσης και συνεπώς για την κατανομή μεγέθους. Η κίνηση

Brown των σωματιδίων έχει ως αποτέλεσμα την διακύμανση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα δεδομένα έντασης-χρόνου αξιολογούνται μέσω μοντέλων συσχέτισης.

Η υδροδυναμική διάμετρος των νανοσωματιδίων υπολογίζεται μέσω του συντελεστή διάχυσης από την εξίσωση Stokes-Einstein:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta a}$$

- **T**: η απόλυτη θερμοκρασία
- **K_B**: η σταθερά Boltzmann
- **a**: η υδροδυναμική ακτίνα του σωματιδίου
- **η**: το ιξώδες του διαλύτη

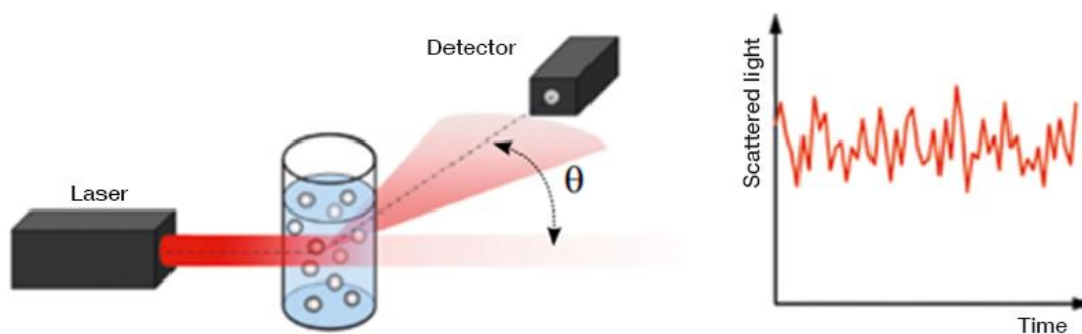
4.1.2 Αρχή λειτουργίας για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού

Η λειτουργία της μεθόδου για τον υπολογισμό του ζ-δυναμικού βασίζεται στην αρχή σκέδασης του φωτός. Το δείγμα τοποθετείται στην κυψελίδα ηλεκτροφόρησης, εφαρμόζεται το γνωστό ηλεκτρικό πεδίο και φωτίζεται από διασταυρούμενες ακτίνες λέιζερ.

Το ζ-δυναμικό εκφράζεται μέσω της εξίσωσης του Henry.

$$\zeta = \frac{4\pi n u_E}{\epsilon f(ka)}$$

- **u_E**: ηλεκτροφορητική κινητικότητα
- **ζ**: ζ-δυναμικό
- **ε**: διηλεκτρική σταθερά
- **n**: ιξώδες
- **f(ka)**: συνάρτηση Henry
- **a**: ακτίνα του σωματιδίου



Εικόνα 7 : Βασική ρύθμιση ενός συστήματος μέτρησης DLS. Το δείγμα περιέχεται σε μια κυψελίδα. Το σκεδαζόμενο φως του προσπίπτοντος λέιζερ μπορεί να ανιχνευθεί σε διαφορετικές γωνίες

4.2 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Το NTA αποτελεί μία καθιερωμένη μέθοδο για την άμεση και σε πραγματικό χρόνο οπτικοποίηση και ανάλυση νανοσωματιδίων σε υγρά. Είναι ένα ευέλικτο όργανο, το οποίο απαιτεί ελάχιστη ρύθμιση από τον χρήστη ενώ παρέχει βελτιωμένες μετρήσεις συγκέντρωσης μέσω προηγμένων αλγορίθμων και ικανότητα ανίχνευσης φθορισμού παρέχοντας ολιστική ανάλυση.

Μερικά από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου Nanoparticle Tracking Analysis είναι τα παρακάτω:

- Λογισμικό φιλικό προς τον χρήστη με εύκολη ρύθμιση SOP για καθημερινή χρήση
- Ελάχιστη προετοιμασία δείγματος
- Έλεγχος θερμοκρασίας στο πρόγραμμα
- Επιλογή μηκών κύματος λέιζερ

4.2.1 Αρχή λειτουργίας για τον προσδιορισμό του μεγέθους

Βασισμένη σε μία δέσμη φωτιζόμενη με λέιζερ, η κίνηση Brown των νανοσωματιδίων αναλύεται σε πραγματικό χρόνο από μια επιστημονική κάμερα CMOS υψηλής ευαισθησίας. Κάθε σωματίδιο οπτικοποιείται ταυτόχρονα, αναλύεται ξεχωριστά και παρακολουθείται από ένα αποκλειστικό πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας.

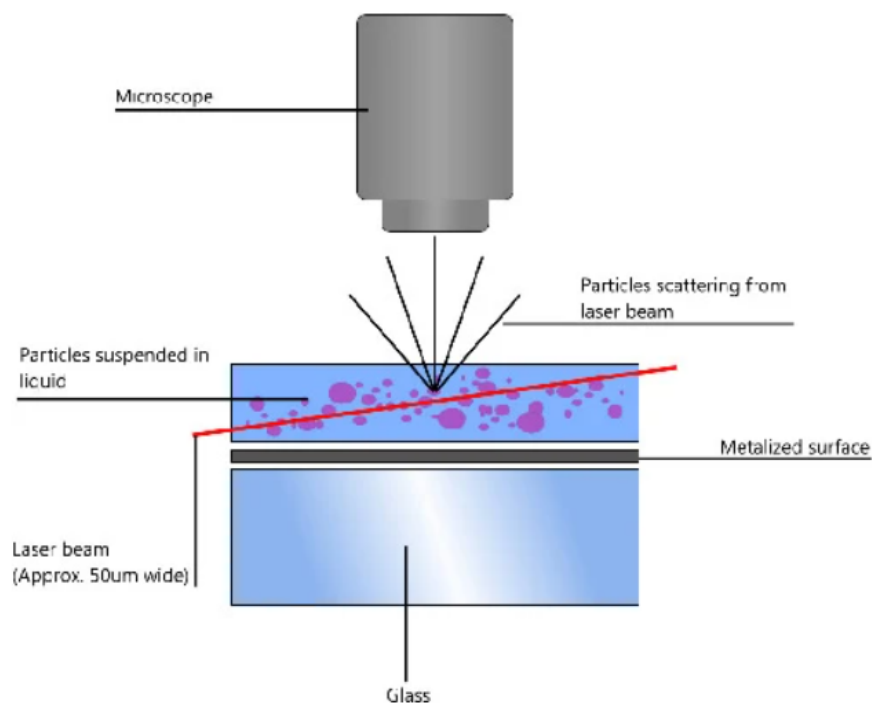
Η ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων εφαρμόζοντας τη δισδιάστατη εξίσωση Stokes-Einstein:

$$\langle x, y \rangle = \frac{K_B T_{ts}}{3\pi\eta d_h}$$

- $\langle x, y \rangle$ = μέση τετραγωνική μετατόπιση
- K_B : σταθερά Boltzmann,
- T : θερμοκρασία του διαλύτη σε βαθμούς Kelvin,
- t_s : χρόνος δειγματοληψίας (δηλαδή, $1/30$ fpsec = 33 msec),
- η : το ιξώδες,
- d_h : υδροδυναμική διάμετρος [14]

Η μέση τετραγωνική μετατόπιση στο επίπεδο $x-y$ χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών διάχυσης μετάφρασης (DT) για μεμονωμένα σωματίδια, δίνοντας μια αριθμητική κατανομή διαχυσιμότητας.

Ο προσδιορισμός μιας αριθμητικής κατανομής των συντελεστών διάχυσης αντιπροσωπεύει ένα σαφές πλεονέκτημα έναντι της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Το ανώτερο όριο για το μέγεθος των σωματιδίων που επιδέχονται παρακολούθηση από NTA είναι ~ 1000 nm, ενώ το κατώτερο όριο μεγέθους εξαρτάται από τον δείκτη διάθλασης σωματιδίων, το μήκος κύματος, την ισχύ λέιζερ, την ευαισθησία της κάμερας και μπορεί να κυμαίνεται από ~ 10 έως ~ 50 nm.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης μεγέθους σωματιδίων με ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων. Ένα λέιζερ φωτίζει σωματίδια που υφίστανται κίνηση Brown σε ένα δείγμα.[55]

Η κίνηση των σωματιδίων, δηλαδή το διάσπαρτο φως, καταγράφεται στη συνέχεια με μια φωτοευαίσθητη συσκευή φορτισμένης σύζευξης (CCD) ή κάμερα CMOS. Το λογισμικό παρακολουθεί μεμονωμένα σωματίδια και χρησιμοποιώντας την εξίσωση Stokes-Einstein υπολογίζει τις υδροδυναμικές τους διαμέτρους.

II. Με βάση τη μορφολογία

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μας δίνει πληροφορίες οι οποίες σχετίζονται με τη μορφολογία και τη διάσταση των σωματιδίων. Μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας είναι εφικτή η παρατήρηση της μορφολογίας των νανοσωματιδίων και γενικότερα των σωματιδίων ενός κολλοειδούς συστήματος διασποράς. Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατή η μελέτη της επιφάνειας και της δομής των νανοσωματιδίων λαμβάνοντας την πραγματική εικόνα των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους καθώς προσεγγίζονται και οι αλληλεπιδράσεις που μπορούν να έχουν με βιολογικά συστήματα. [1]

4.3 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διερχόμενης Δέσμης Ηλεκτρονίων (TEM)

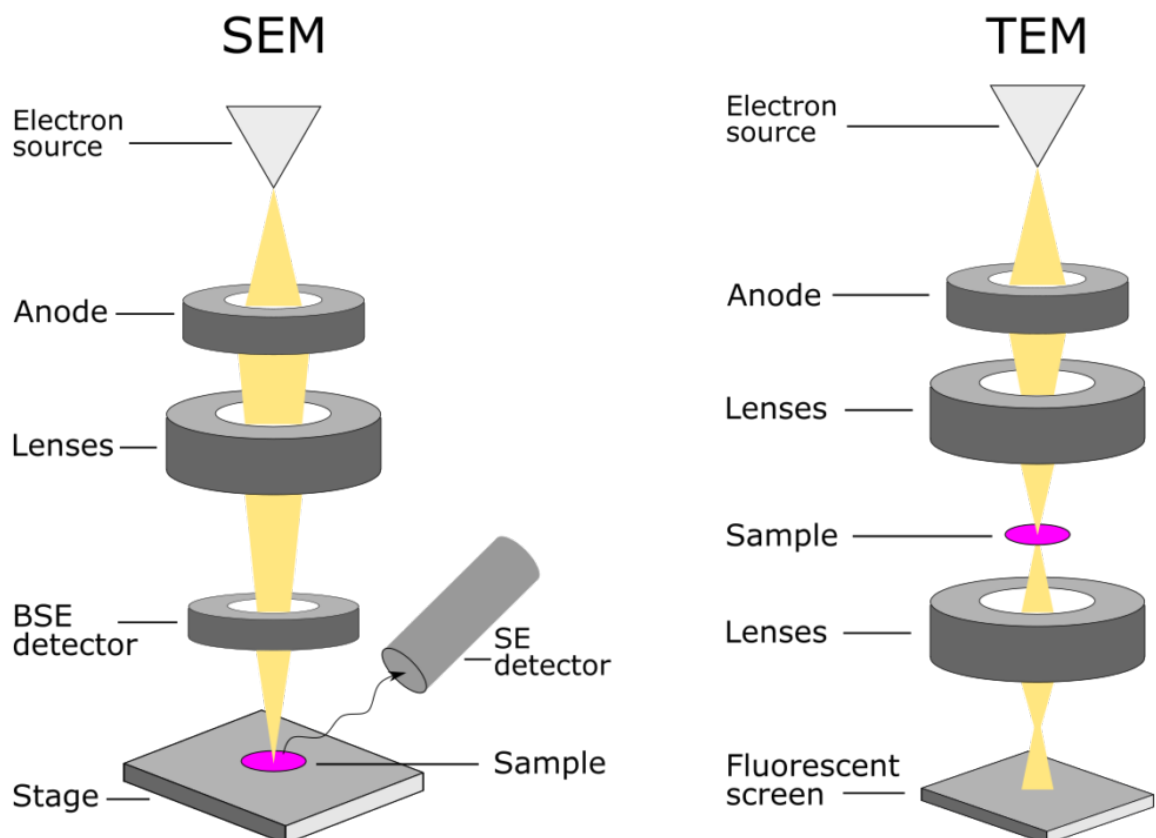
Μια χρήσιμη τεχνική μικροσκοπίας για τον χαρακτηρισμό της μορφολογίας των πολυμερικών νανοσωματιδίων είναι Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διερχόμενης Δέσμης Ηλεκτρονίων (TEM). Μια εικόνα TEM είναι δισδιάστατη και σχηματίζεται από τα ηλεκτρόνια που μεταδίδονται μέσω του

δείγματος. Η ανάλυση στα νανόμετρα με βάση το TEM παρέχει πληροφορίες για τις δομές των εσωτερικών σωματιδίων των νανοφορέων και είναι πολύτιμη για τη μέτρηση του πολυμερικού τοιχώματος των νανοκαψουλών.

Ένα από τα μειονεκτήματα του TEM είναι ότι τα νανοςωματίδια θα πρέπει να έχουν πάχος μικρότερο από 100 nm για λήψη εικόνων υψηλής ανάλυσης, καθώς η ενέργεια των ηλεκτρονίων δεν μπορεί να περάσει πέρα από μερικές εκατοντάδες νανόμετρα. Επιπλέον, τα οργανικά δείγματα μπορεί να υποστούν δομική βλάβη λόγω τοπικής θέρμανσης από την κινητική ενέργεια που απορροφάται από το δείγμα [25].

4.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Στις τεχνικές χαρακτηρισμού νανοςωματιδίων με βάση τη μορφολογία εντάσσεται και η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης ή SEM. Τα πολυμερικά νανοςωματίδια εξαιτίας της οργανικής τους φύσης είναι πρακτικά αόρατα στο SEM γιατί δεν ανακλούν τη δέσμη ηλεκτρονίων αποτελεσματικά. Η συγκεκριμένη διεργασία εμποδίζει τη φόρτιση της επιφάνειας, ελαττώνει τη θερμική υποβάθμιση αλλά και βελτιώνει το λαμβανόμενο σήμα. Παράλληλα, με το SEM λαμβάνονται πληροφορίες για το μέγεθος και την κατανομή μεγέθους των νανοςωματιδίων.



Εικόνα 9 : Σχηματικό διάγραμμα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.[25]

III. Με βάση τη θερμική συμπεριφορά

4.5 Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC)

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τον προσδιορισμό διαφόρων φυσικών ιδιοτήτων και θερμικών μεταβάσεων πολυμερών υλικών. Η DSC χρησιμοποιείται για να μετρήσει τη μεταβολή της διαφοράς του ποσού της ροής θερμότητας που εκλύεται ή απορροφάται μεταξύ του δείγματος και του υλικού αναφοράς όταν το δείγμα και το υλικό αναφοράς θερμαίνονται με ελεγχόμενο ρυθμό.

Η DSC μετρά τη μεταβολή μίας ιδιότητας από τη διαφορά της ροής θερμότητας, η οποία συνήθως εκλύεται λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας. Όταν δεν υπάρχει αλλαγή της θερμοκρασίας του δείγματος, η αλλαγή στην ροή θερμότητας δεν μπορεί να μετρηθεί εκτός αν πραγματοποιείται χημική αντίδραση.

4.6 Θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA)

Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis (TGA)) είναι μια μέθοδος θερμικής ανάλυσης κατά την οποία παρατηρούνται αλλαγές στις φυσικές και χημικές ιδιότητες των υλικών ως αποτέλεσμα της αύξησης της θερμοκρασίας. Η μέτρηση αυτή παρέχει πληροφορίες σχετικά με φυσικά φαινόμενα, όπως μεταβάσεις φάσεων, απορρόφηση, προσρόφηση και εκρόφηση, καθώς και χημικά φαινόμενα, όπως χημειοαντιδράσεις, θερμική αποσύνθεση και αντιδράσεις στερεού-αερίου (π.χ. οξείδωση ή αναγωγή).[33]

IV. Με βάση τη δομή

4.7 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance (NMR)) είναι μια προηγμένη τεχνική χαρακτηρισμού. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της μοριακής δομής σε ατομικό επίπεδο ενός δείγματος. Εκτός από τη μοριακή δομή, η φασματοσκοπία NMR μπορεί να προσδιορίσει τις αλλαγές φάσης, τις μεταβολές διαμόρφωσης, τη διαλυτότητα και το δυναμικό διάχυσης.[34]

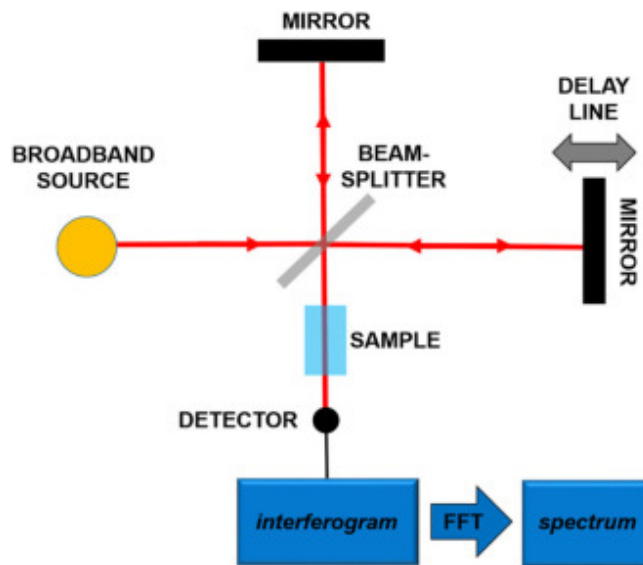
Το NMR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ νανοσωματιδίων και βιολογικών μορίων, όπως πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα. Για παράδειγμα, η ^1H NMR είναι χρήσιμη στη μελέτη της συγγένειας πρόσδεσης και του τρόπου αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός νανοσωματιδίου και μιας πρωτεΐνης.

4.8 Υπέρυθρος μετασχηματισμός Fourier (FT-IR)

Η μέθοδος υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR) είναι ένας τύπος φασματοσκοπίας που μπορεί να ανιχνεύσει αλλαγές στη συνολική σύνθεση των βιομορίων προσδιορίζοντας τις αλλαγές στις λειτουργικές ομάδες. Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει δομικές διαφορές στη μοριακή σύνδεση μεταξύ ενώσεων, οι οποίες μπορούν να αποκαλύψουν λεπτομέρειες σχετικά με την ύπαρξη των αλληλεπιδράσεών τους.[35]

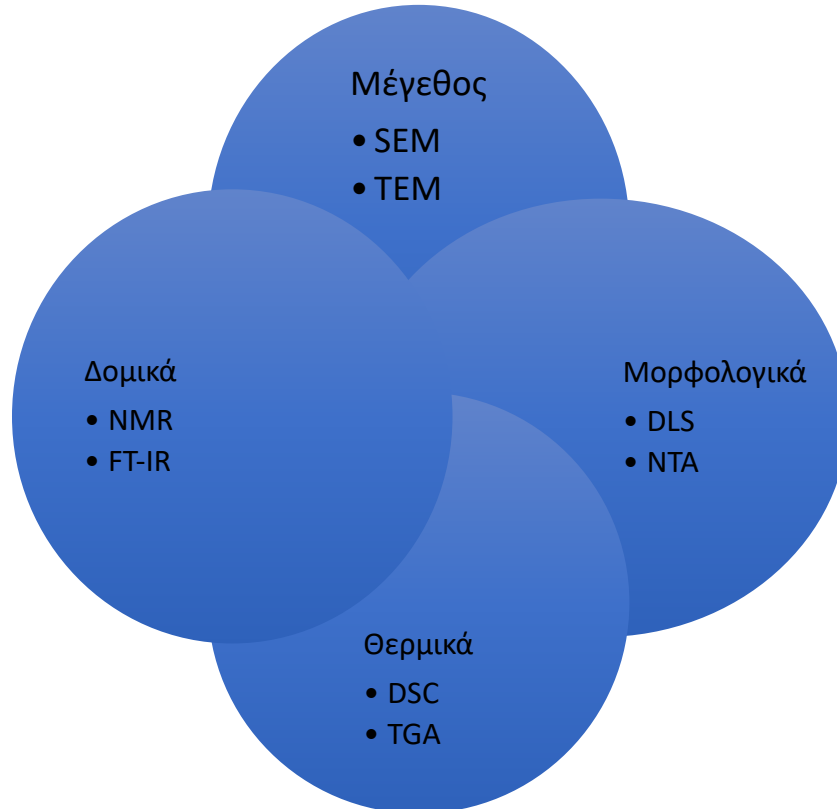
Ένα κλασικό FT-IR φασματοφωτόμετρο περιλαμβάνει πηγή ακτινοβολίας, κελί εισαγωγής του δείγματος, ανιχνευτή, ενισχυτή και μετατροπέα A/D. Η δόνηση και η περιστροφή των μορίων που επηρεάζονται από την υπέρυθη ακτινοβολία σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος μετράται με τη

χρήση FTIR. Το φάσμα είναι ξεχωριστό για κάθε μόριο καθώς οι κορυφές οι οποίες λαμβάνονται (ακίδες στο φάσμα) αντιστοιχούν στην κίνηση/δόνηση συγκεκριμένης χαρακτηριστικής ομάδας και αποδίδονται στις ιδιότητες της.[36]



Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας του φασματόμετρου FT-IR

Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων



5. Πράσινη χημεία

Οι πράσινες διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της πράσινης χημείας και της πράσινης νανοτεχνολογίας, χρησιμοποιούν μη τοξικές ουσίες και περιβαλλοντικά καλοήθειες διαλύτες σε όλη τη διαδικασία της σύνθεσης. Τέτοιες διαδικασίες στοχεύουν στην πλήρη εξάλειψη των τοξικών ουσιών στις αντιδράσεις καθώς και στην εξάλειψη των τοξικών υποπροϊόντων που καταστρέφουν το περιβάλλον και την υγεία του ανθρώπου [26].

Το 1998, οι Paul Anastas και Paul Warner εισήγαγαν τις Δώδεκα Αρχές της Πράσινης Χημείας, όπως φαίνονται στην Εικ. 10. Πιο αναλυτικά, οι Δώδεκα Αρχές της Πράσινης Χημείας βασίζονται στην ελαχιστοποίηση ή τη μη χρήση τοξικών διαλυτών στις χημικές διεργασίες και αναλύσεις, καθώς και στην αποφυγή δημιουργίας αποβλήτων που προκύπτουν από αυτές. Γι' αυτό, η ατομική και η ενεργειακή οικονομία κατέχουν εξέχουσες θέσεις, καθώς και η χρήση ανανεώσιμων και ασφαλών πρώτων υλών. Επιπλέον, η επιτάχυνση των χημικών αντιδράσεων μέσω της κατάλυσης μπορεί να συμβάλει, για παράδειγμα, στην εξοικονόμηση ενέργειας και στη μείωση της παραγωγής αποβλήτων. Μία από τις αρχές αφορά επίσης τη συνειδητή ανάπτυξη των χημικών προϊόντων, έτσι ώστε αυτά μετά την χρήση τους να αποικοδομούνται σε μη τοξικά παράγωγα.



Εικόνα 10: Οι Δώδεκα Αρχές της Πράσινης Χημείας

Μέσω της πράσινης νανοτεχνολογίας, τα νανο-υλικά έχουν συντεθεί και τροποποιηθεί με πολλούς τρόπους για να χρησιμοποιηθούν στη φαρμακευτική, την επικοινωνία, τη γεωργία και την περιβαλλοντική αποκατάσταση. Για την εκπλήρωση των στόχων της χημικής βιομηχανίας, τα τελευταία χρόνια γίνονται πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη πράσινων διαλυτών, όπως ορίζουν οι αρχές της πράσινης χημείας. Η πτητικότητα και η διαλυτότητα πολλών από τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες συμβάλλουν στη ρύπανση του αέρα, των υδάτων και του εδάφους και έχουν αυξήσει τον κίνδυνο έκθεσης των εργαζομένων.

Οι ιδανικοί πράσινοι διαλύτες διαθέτουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως χαμηλή τοξικότητα, μειωμένες περιβαλλοντικές επιπτώσεις και χαμηλό κόστος. Παράλληλα, ο διαλύτης θα

πρέπει να είναι βιοαποικοδομήσιμος, να επαναχρησιμοποιείται εύκολα και να αναλαμβάνεται από πηγές ενέργειας. Η ραγδαία ερευνητική ανάπτυξη των τελευταίων ετών έχει οδηγήσει στη δημιουργία πράσινων διαλυτών οι οποίοι είναι φιλικό στο περιβάλλον και έχουν σχεδιαστεί για να εισαχθούν στη βιομηχανία. Βασικά παραδείγματα είναι τα ιοντικά υγρά και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες.

5.1 Ιοντικά υγρά

Τα ιοντικά υγρά (ionic liquids, (IL) είναι οργανικά άλατα, που συνήθως αποτελούνται από ένα οργανικό κατιόν και ένα πολυατομικό ανόργανο ανιόν. Τα άλατα αυτά είναι σε υγρή κατάσταση και βρίσκονται σε θερμοκρασία κάτω των 100°C ή και σε θερμοκρασία δωματίου. Μπορούν να χαρακτηριστούν ως πράσινοι διαλύτες καθώς διαθέτουν ιδιότητες όπως, χαμηλό σημείο τήξης, υψηλή θερμική και χημική σταθερότητα, μεγάλο ηλεκτροχημικό παράθυρο και μεγάλη ισχύ διαλυτή. Η πιο σημαντική ιδιότητα τους είναι η σχεδόν αμελητέα τάση ατμών τους.

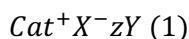
Ωστόσο, αρκετά ιοντικά υγρά είναι τοξικά και μη βιοαποδομήσιμα με βάση τις αξιολογήσεις του κύκλου ζωής τους, ενώ η σύνθεσή τους δεν ακολουθεί πάντα τις αρχές της πράσινης χημείας[27].

5.2 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες

Ως μια σειρά διαλυτών φιλικών προς το περιβάλλον και βιολογικής προέλευσης, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES) έχουν τύχει μεγάλης προσοχής τα τελευταία χρόνια. Ο όρος ευτηκτικός περιγράφει κάτι που τήκεται εύκολα, έτσι λοιπόν και τα ευτηκτικά μείγματα σε ένα συγκεκριμένο εύρος αναλογιών των συστατικών που τα απαρτίζουν, παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαμηλό σημείο τήξεως. Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES), παρουσιάζουν ακόμη πιο χαμηλό (βαθύ) σημείο τήξεως, το οποίο μπορεί να βρίσκεται από 100-200°C χαμηλότερα των επιμέρους σημείων τήξεως των συστατικών.

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES) αποτελούνται από δότες δεσμών υδρογόνου (HBDs) και δέκτες (HBAs) και η αλληλεπίδραση δεσμών υδρογόνου παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση ευτηκτικών συστημάτων.

Οι DES μπορούν να περιγραφούν με τον γενικό τύπο:



όπου:

Cat^+ : οποιοδήποτε κατιόν αμμωνίου, φωσφονίου ή σουλφονίου

X^- : βάση κατά Lewis, ένα ανιόν αλογονιδίου

Y : οξύ κατά Lewis ή Brønsted

z : αριθμός των μορίων Y που αλληλοεπιδρούν με το ανιόν

Τα DES ταξινομούνται σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τη φύση του συμπλοκοποιητικού παράγοντα που χρησιμοποιείται, βλ. Πίνακα 1.

Τύπος	Χημικός τύπος	Όροι
I	Cat ⁺ X ⁻ ·zMCl _x	M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
II	Cat ⁺ X ⁻ ·zMCl _x ·γH ₂ O	M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe
III	Cat ⁺ X ⁻ ·zRZ	Z = CONH ₂ , COOH, OH
IIIV	MCl _x + RZ = MCl _{x-1} ⁺ ·RZ + MCl _{x+1} ⁻	M = Al, Zn και Z = CONH ₂ , OH

Πίνακας 1 : Τύποι βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, DES [29]

Τα χαρακτηριστικά των DES εξαρτώνται από τη φύση και τη μοριακή αναλογία των συστατικών των δεκτών δεσμών υδρογόνου και των δοτών δεσμών υδρογόνου, το μέγεθος του ανιόντος, το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας και το μοριακό βάρος

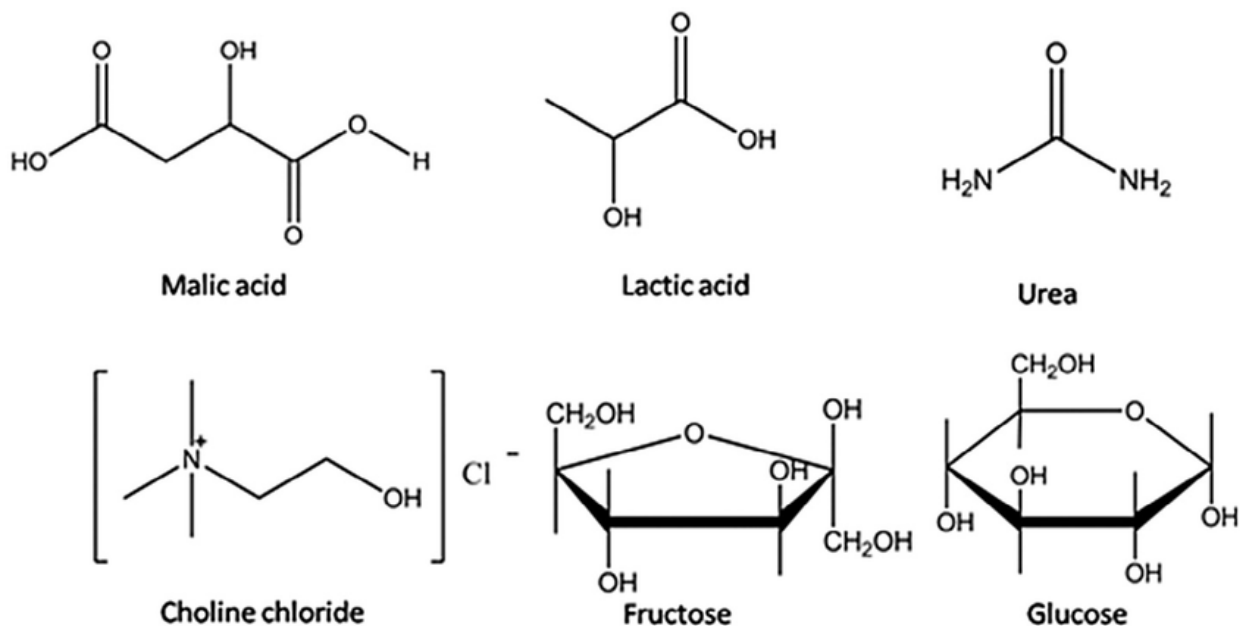
Οι DES διαθέτουν κάποιες σημαντικές ιδιότητες:

- Χαμηλότερο σημείο τήξης από τα καθαρά συστατικά τους, λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ του δέκτη δεσμού υδρογόνου και του δότη δεσμού υδρογόνου
- Μεγάλη βιοαποικοδομησιμότητα
- Μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα
- Αυξημένη πολικότητα
- Χαμηλή τοξικότητα
- Εξαιρετική δυνατότητα εφαρμογής στην εκχύλιση και το διαχωρισμό
- Η χρήση των DES διευρύνει πολύ το εύρος των διαθέσιμων συστημάτων διαλυτών
- Παρασκευή με άμεση ανάμειξη μεμονωμένων συστατικών
- Χαμηλή ενέργεια πλέγματος
- Υγροσκοπικότητα [28]

5.2.1 Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NADES)

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που αποτελούνται από φυσικά συστατικά (σάκχαρα, πολυαλκοόλες, οργανικά οξέα, οργανικές βάσεις) ονομάζονται φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NADES). Τα πιο βασικά NaDES βασίζονται σε ενώσεις χλωριούχου χολίνης *ChCl* καθώς και σε άλλους δότες δεσμών υδρογόνου όπως σάκχαρα, αμινοξέα, ηλεκτρικό οξύ, γλυκερίνη και κιτρικό οξύ. Τα NADES είναι εύκολα στην παραγωγή, μη τοξικά, βιοδιασπώμενα και πολύ παχύρρευστα. Επίσης είναι ανανεώσιμα και έχουν τη δυνατότητα να επαναχρησιμοποιηθούν.

Λόγω της ικανότητας τους να είναι δότες και δέκτες ηλεκτρονίων, διαθέτουν πολύ καλή διαλυτότητα. Η αυξημένη διαλυτότητα και το χαμηλό κόστος καθιστούν τα NaDES πολύ καλή επιλογή διαλύτη σε μεθόδους εκχύλισης, αντικαθιστώντας έτσι συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, όπως DMSO.



Εικόνα 11: Κύρια συστατικά του NADES

Στον τομέα της φαρμακευτικής, ένας πολύ σημαντικός ευτηκτικός διαλύτης είναι το THEDES (Therapeutic Deep Eutectic Systems) ή θεραπευτικά βαθέως ευτηκτικός διαλύτης. Είναι υποσύνολο των DES και αποτελούνται από ενισχυμένους φορείς βιοδραστικών μορίων, οι οποίοι αυξάνουν την βιοδιαθεσιμότητα του φαρμακοφόρου φορέα, την διαλυτότητα αλλά και τη διαπερατότητα του στο δέρμα. Μία αξιοσημείωτη ιδιότητα των THEDES είναι ότι συνιστούν έναν ιδανικό φορέα για υδρόφιλες και υδρόφοβες δραστικές ουσίες καθώς διατηρείται η αντιβακτηριακή δράση τους, οδηγώντας σε αυξημένη σταθερότητα και ελεγχόμενη αποδέσμευση [30].

Στην παρούσα εργασία, γίνεται χρήση NaDES το οποίο αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτικό οξύ (Glu:LA).

Η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ είναι δύο οργανικές ενώσεις που απαντώνται συνήθως σε βιολογικά συστήματα. Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης και αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τους περισσότερους οργανισμούς, ενώ το γαλακτικό οξύ είναι υποπροϊόν της αναερόβιας αναπνοής σε ορισμένους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου.

Όταν η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ συνδυάζονται σε συγκεκριμένες αναλογίες και θερμαίνονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, σχηματίζουν τον επιθυμητό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη. Το μείγμα αυτό είναι υγρό σε θερμοκρασία δωματίου και έχει μοναδικές ιδιότητες που το καθιστούν ελκυστικό για χρήση σε ευρύ φάσμα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της βιοτεχνολογίας, των φαρμακευτικών προϊόντων και της πράσινης χημείας.

Ο βαθέως ευτηκτικός διαλύτης γλυκόζης-γαλακτικού οξέος (Glu:LA) έχει δείξει ότι είναι πολλά υποσχόμενος σε μια ποικιλία εφαρμογών, όπως ως πράσινος διαλύτης για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυσικές πηγές, ως σταθεροποιητής για ένζυμα και άλλα βιομόρια και ως διαλύτης σε συστήματα χορήγησης φαρμάκων. Επιπλέον, το Glu:LA έχει χαμηλή τοξικότητα, είναι βιοσυμβατό και

μπορεί να διαλύσει ένα ευρύ φάσμα βιομορίων, καθιστώντας το ελκυστική εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών διαλυτών.

Συνολικά, η έρευνα για τη χρήση του Glu:LA και άλλων βαθέως ευτηκτικών διαλυτών βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο, αλλά υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη διερεύνηση των δυνατοτήτων αυτών των διαλυτών ως πράσινης και βιώσιμης εναλλακτικής λύσης σε σχέση με τους παραδοσιακούς διαλύτες σε διάφορες εφαρμογές.

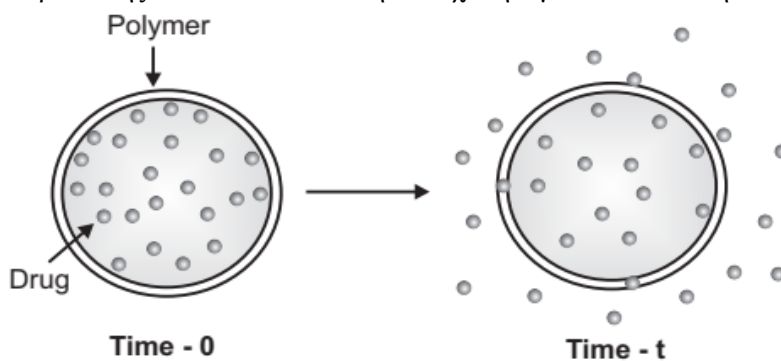
6 Μελέτη αποδέσμευσης

Η μελέτη αποδέσμευσης *in vitro* είναι μια σημαντική δοκιμή για την αξιολόγηση της ασφάλειας, της αποτελεσματικότητας και της ποιότητας των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων που βασίζονται σε νανοσωματίδια, χωρίς όμως να υπάρχει κάποιο πρότυπο ή κανονιστικό πρότυπο.[31]

Οι μέθοδοι *in vitro* αποδέσμευσης είναι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της αποδέσμευσης δραστικών ενώσεων από συστήματα χορήγησης φαρμάκων, όπως νανοσωματίδια, μικροσφαιρίδια, λιπώματα και υδρογέλες. Οι μέθοδοι αυτές είναι σημαντικές για την ανάπτυξη νέων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων, καθώς μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κινητική αποδέσμευσης, τους μηχανισμούς αποδέσμευσης και τη σταθερότητα του συστήματος χορήγησης φαρμάκων.

Υπάρχουν αρκετές *in vitro* μέθοδοι αποδέσμευσης οι οποίες χρησιμοποιούνται για:

- I. Διάχυση μέσω συστήματος δεξαμενής: ο μηχανισμός που καθορίζει το ρυθμό αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας είναι η διάχυση μέσα από την πολυμερική μεμβράνη.

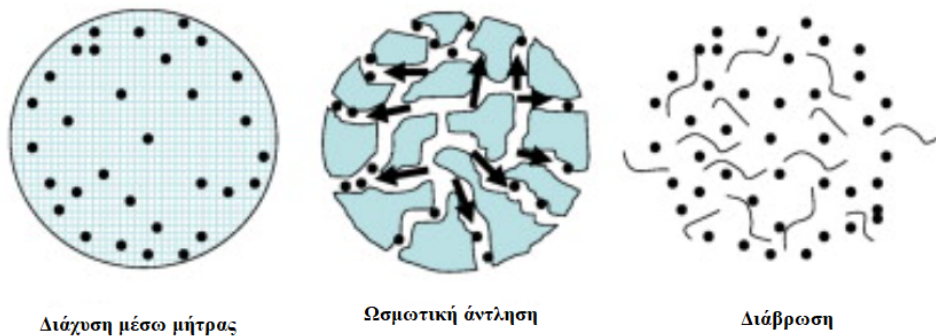


Εικόνα 12: Διάχυση μέσω συστήματος δεξαμενής, μέθοδος I

- II. Διάχυση μέσω μήτρας: λαμβάνει χώρα για μη αποικοδομήσιμες μήτρες και η αποδέσμευση δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας αλλά από τα χαρακτηριστικά της μήτρας (πάχος, διαπερατότητα).
- III. Ωσμωτική άντληση: λαμβάνει χώρα σε ημιδιαπερατές μεμβράνες και οφείλεται στη διαφορά πιέσεων
- IV. Διάβρωση: πραγματοποιείται με δύο τρόπους:
 - a) **Διάβρωση σε όλο τον όγκο:** λαμβάνει χώρα διάσπαση ξεκινώντας από την επιφάνεια της μήτρας οδηγώντας στην ελάττωση του μεγέθους της και η αποδέσμευση λαμβάνει

χώρα όταν ο ρυθμός της διάβρωσης είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό διείσδυσης του νερού στο κυστίδιο.

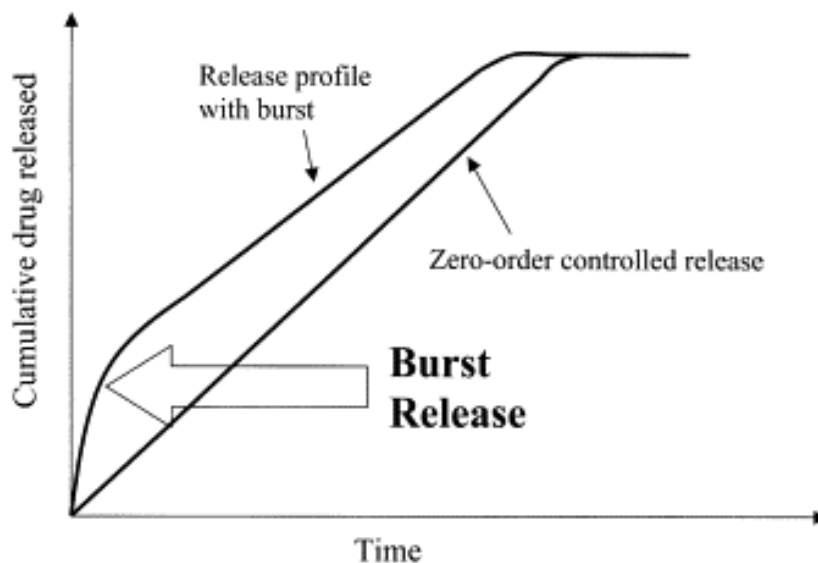
- b) **Επιφανειακή διάβρωση:** το νερό διεισδύει και προκαλεί την ομοιογενή αποδόμηση της μήτρας με πιθανή υδρόλυση του κυστιδίου και επομένως δεν προστατεύει την δραστική ουσία από το περιβάλλον.[37]



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση *in vitro* μεθόδων αποδέσμευσης II, III, IV

Burst effect

Όταν το σύστημα χορήγησης βυθίζεται για πρώτη φορά στο μέσο αποδέσμευσης, παρατηρείται μια ραγδαία και σύντομη αποδέσμευση φαρμάκου (burst release), ακολουθούμενη από ένα σταθερό προφίλ (plateau). Αν και υπό ορισμένες συνθήκες μια αρχική απότομη αποδέσμευση του θεραπευτικού θα μπορούσε να είναι επιθυμητή, είναι συχνά απρόβλεπτη με ανεξέλεγκτη διάρκεια και δοσολογία.[39] Ωστόσο, ως επί το πλείστον, η αποφυγή του φαινομένου της εκρηκτικής αποδέσμευσης είναι επιθυμητή για την ελαχιστοποίηση οποιασδήποτε αρχικής τοξικότητας που σχετίζεται με μια υψηλή δόση.



Εικόνα 14: Σχηματικό προφίλ διφασικής αποδέσμευσης δραστικής ουσίας σε σύγκριση με μηδενικής τάξης

6.1 Κινητική μοντελοποίηση

Η μαθηματική μοντελοποίηση της αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας είναι ικανή να προβλέψει τον ρυθμό αποδέσμευσης και διάχυσης της από τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Το φάρμακο αρχίζει να διαλύεται σε έναν ειδικό διαλύτη, όπως το νερό, το αίμα ή το γαστρικό υγρό.

Ωστόσο, τα διαλυμένα μόρια δεν διασκορπίζονται αμέσως σε όλο το διαλύτη που ονομάζεται "κύριο υγρό" (bulk liquid). Στην επιφάνεια του φαρμάκου εμφανίζεται ένα στρώμα που ονομάζεται "στάσιμο υγρό" (stagnant liquid). Η συγκέντρωση των μορίων του φαρμάκου θεωρείται πάντα μηδενική για την απλούστευση των υπολογισμών διάχυσης. Τα μόρια του φαρμάκου θα διαχέονται από την υψηλότερη συγκέντρωση προς την χαμηλότερη συγκέντρωση μέσω του στάσιμου υγρού με βάση το νόμο διάχυσης του Fick

$$J = -D_f \frac{dc}{dx}$$

Όπου:

- J : η ποσότητα της ουσίας που διέρχεται κάθετα από μια μονάδα επιφάνειας ανά χρόνο, γνωστή ως "ροή".
- D_f : ο συντελεστής διάχυσης και
- $\frac{dc}{dx}$: η κλίση της συγκέντρωσης

Τα κινητικά μοντέλα χρησιμοποιούνται κυρίως για την πρόβλεψη της αποδέσμευσης των εγκλεισμένων μορίων σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα κυριότερα κινητικά μοντέλα αποδέσμευσης είναι :

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

6.2.1 Μοντέλο μηδενικής τάξης (Zero order)

Για την κινητική μηδενικής τάξης η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας είναι συνάρτηση του χρόνου και η διεργασία γίνεται με σταθερό ρυθμό ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας.

Η εξίσωση που περιγράφει το μοντέλο μηδενικής τάξης είναι η παρακάτω:

$$C_t = C_o + k_o t$$

Όπου :

C_t : η ποσότητα της συγκέντρωσης που διαλύεται σε χρόνο t

C_o : η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα

k_o : η σταθερά αποδέσμευσης μηδενικής τάξης

t : ο χρόνος σε h

Η κινητική μηδενικής τάξης εφαρμόζεται σε συστήματα αποδέσμευσης που γίνονται με ώσμωση όπου η δραστική ουσία περικλείεται από μια μεμβράνη η οποία είναι διαπερατή από το νερό αλλά όχι από τη δραστική ουσία.[41]

6.2.2 Μοντέλο πρώτης τάξης (First order)

Το μοντέλο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει την απορρόφηση και/ή την αποβολή ορισμένων φαρμάκων αν και είναι δύσκολο να κατανοήσουμε αυτόν τον μηχανισμό σε θεωρητική βάση. Η αποδέσμευση του φαρμάκου η οποία ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης μπορεί να εκφραστεί με την εξίσωση:

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

Όπου:

Q: η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται σε χρόνο t

Q₀: η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα

k: η σταθερά αποδέσμευσης

t: ο χρόνος σε h

Η κινητική πρώτης τάξης εφαρμόζεται σε συστήματα αποδέσμευσης όπου οι βιοδραστικές ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές και περικλείονται από πορώδη μήτρα.

6.2.3 Μοντέλο Higuchi

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

$$Q = k_H t^{1/2} \text{ ή } \frac{Mt}{M_0} = kt^{1/2}$$

Όπου:

Q: Η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται στο χρόνο t

k_H: σταθερά Higuchi

t: χρόνος σε h

Το μοντέλο αυτό βασίζεται στις υποθέσεις ότι :

- i. οι αρχικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου στη μήτρα είναι πολύ υψηλότερες από ό,τι η διαλυτότητα του φαρμάκου
- ii. η διάχυση του φαρμάκου λαμβάνει χώρα μόνο σε μία διάσταση (το φαινόμενο των ακμών πρέπει να είναι αμελητέο),
- iii. τα σωματίδια του φαρμάκου είναι πολύ μικρότερα από το σύστημα
- iv. η διάχυση ή διαλυτότητα του φορέα είναι αμελητέα
- v. ο ρυθμός διάχυσης της δραστικής ουσίας είναι σταθερός
- vi. στο περιβάλλον αποδέσμευσης ισχύουν τέλειες συνθήκες βύθισης

6.2.4 Μοντέλο Korsmeyer-Peppas

Το μοντέλο Korsmeyer – Peppas είναι ένα ημι-εμπειρικό μοντέλο που περιγράφει την αποδέσμευση της δραστικής ουσίας από πολυμερικά συστήματα με βάση την εκθετική σχέση της αποδέσμευσης και του χρόνου.

Η αποδέσμευση του φαρμάκου η οποία ακολουθεί το συγκεκριμένο μοντέλο μπορεί να εκφραστεί με την εξίσωση:

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

F : κλάσμα της ουσίας που αποδεσμεύεται την χρονική στιγμή t

Mt : ποσότητα της ουσίας που αποδεσμεύεται την χρονική στιγμή t

M : συνολική ποσότητα της ουσίας σε δοσολογική μορφή ή στην ισορροπία

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

t : χρόνος σε h

n : εκθέτης διάχυσης ή αποδέσμευσης

Αυτή η εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του πρώτου 60% των δεδομένων αποδέσμευσης της δραστικής ένωσης.

Η τιμή του εκθέτη n , στο μοντέλο Korsmeyer-Peppas, χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού αποδέσμευσης, όπως περιγράφεται στον **πίνακα 2**.

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

- **0,45 ≤ n** αντιστοιχεί σε μηχανισμό Fickian διάχυση όπου κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης. Η διάχυση είναι πιο ισχυρή από την χαλάρωση των πολυμερικών αλυσίδων. Η κινητική τέτοιων συστημάτων χαρακτηρίζεται από τον ρυθμό διάχυσης
- **0,45 < n < 0,89** σε μη Fickian διάχυση, όπου φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι τα ισοδύναμα.
- **n = 0,89** σε μη Fickian διάχυση Case II, όπου κυριαρχούν τα φαινόμενα διόγκωσης ή χαλάρωσης και
- **n > 0,89** σε Super Case II, όπου συμβαίνει διάσπαση πολυμερικών αλυσίδων (λόγω των τάσεων που αναπτύσσονται) κατά τη ρόφηση.

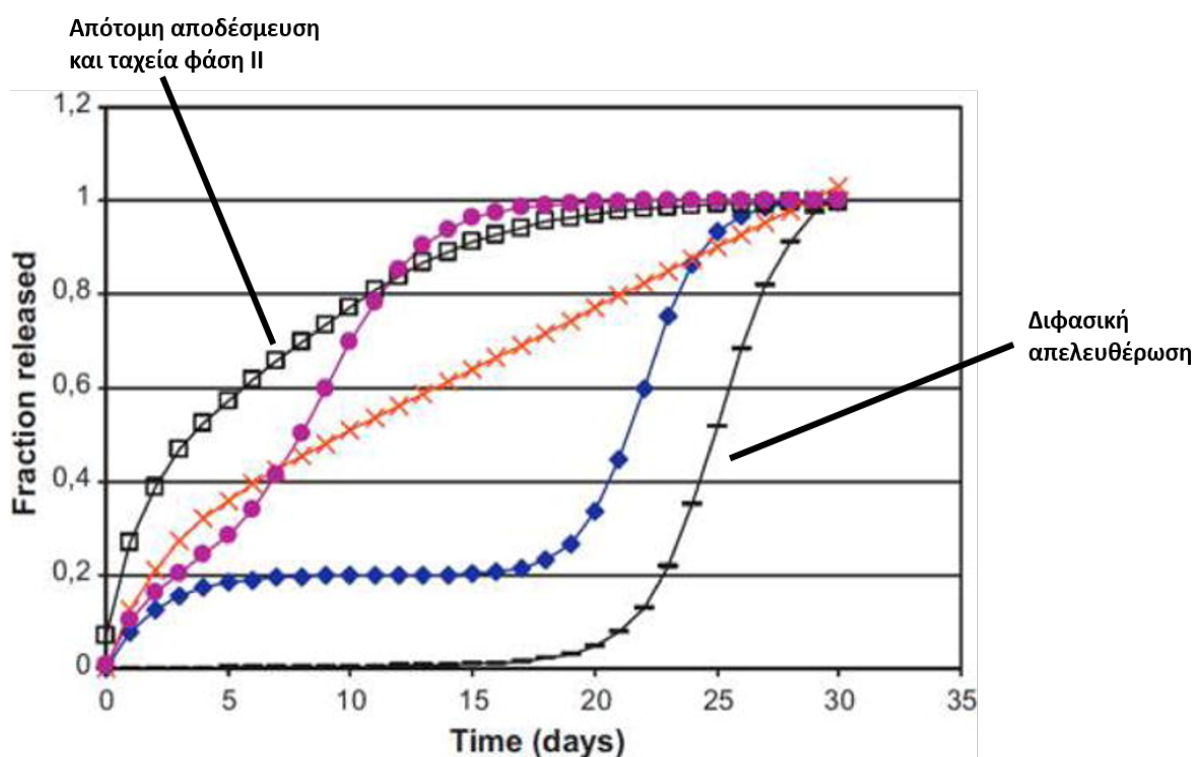
Πίνακας 2 Ερμηνεία των μηχανισμών αποδέσμευσης από πολυμερικές μεμβράνες[42]

Εκθέτης διάχυσης n	Μηχανισμός αποδέσμευσης	Ρυθμός ως συνάρτηση του χρόνου
Χαμηλότερο από 0.45	Fickian διάχυση	$t^{-0.5}$
0.45 < n < 0.89	Ανόμαλη μεταφορά	t^{n-1}
n=0.89	Μη Fickian/ Case II	Μηδενικής τάξης αποδέσμευση
Υψηλότερο από 0.89	Super Case II transport	t^{n-1}

6.3 Μελέτη αποδέσμευσης δραστικών ουσιών από νανοφορείς

Το πιο σύνθητες προφίλ αποδέσμευσης από πολυμερικά συστήματα μεταφοράς δραστικής ουσίας είναι το τριφασικό προφίλ. Ο ρυθμός αποδέσμευσης μπορεί μερικές φορές να είναι διφασικός όταν τα σωματίδια είναι μικρότερα.

- Φάση I : η πρώτη φάση του τριφασικού προφίλ αποδέσμευσης είναι μία ταχεία αποδέσμευση των μορίων της δραστικής ουσίας που είναι επιφανειακά προσροφημένη.
- Φάση II: η δεύτερη φάση του προφίλ αποδέσμευσης είναι μια βραδεία φάση αποδέσμευσης, που αποδίδεται στη βραδεία διάχυση μέσω των πόρων του πολυμερούς ενώ παράλληλα αρχίζει η υδρόλυση και η αποικοδόμηση του πολυμερούς.
- Φάση III: η τρίτη φάση είναι μία ταχεία φάση αποδέσμευσης, η οποία ελέγχεται από τη διάβρωση του πολυμερούς.



Διάγραμμα 1: γραφική παρουσίαση των προφίλ αποδεσμεύσεων : **τριφασική αποδέσμευση με σύντομη φάση II**, **απότομη αποδέσμευση μηδενικής τάξης**, **απότομη αποδέσμευση και ταχεία φάση II**, **τριφασική αποδέσμευση**, **διφασική αποδέσμευση**.

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

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

6.4 Μεμβράνη διάλυσης-διάχυσης

Στην παρούσα μελέτη γίνεται χρήση μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης καθώς συνιστούν μία πιο απλή και λιγότερο χρονοβόρα διαδικασία.

Η μεμβράνη διάλυσης-διάχυσης είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον χαρακτηρισμό της αποδέσμευσης δραστικών ενώσεων από συστήματα χορήγησης φαρμάκων, όπως νανοσωματίδια, μικροσφαιρίδια, λιποσώματα και υδρογέλες. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την τοποθέτηση του συστήματος χορήγησης φαρμάκου σε μια μεμβράνη με καθορισμένο μέγεθος πόρων, η οποία διαχωρίζει δύο διαμερίσματα ενός κυττάρου. Το ένα διαμέρισμα περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα και το άλλο διαμέρισμα περιέχει ένα διάλυμα δέκτη. Το ρυθμιστικό διάλυμα αναδεύεται συνεχώς για να διασφαλίζεται ότι η συγκέντρωση του απελευθερούμενου φαρμάκου διατηρείται σε σταθερό επίπεδο.

Η μεμβράνη λειτουργεί ως φραγμός που ελέγχει τη διάχυση του φαρμάκου από το σύστημα χορήγησης φαρμάκου στο διαμέρισμα του δέκτη. Το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης επιλέγεται έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι μόνο το απελευθερούμενο φάρμακο μπορεί να περάσει, ενώ το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα με το μέγεθος των μορίων του φαρμάκου και τον επιθυμητό ρυθμό αποδέσμευσης.

Λαμβάνονται δείγματα από το διάλυμα του δέκτη σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα και η ποσότητα του απελευθερωμένου φαρμάκου μετράται με κατάλληλη αναλυτική τεχνική, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ή η φασματοσκοπία UV-Vis. Με τη γραφική παράσταση της ποσότητας του απελευθερούμενου φαρμάκου σε συνάρτηση με το χρόνο, μπορούν να προσδιοριστούν η κινητική αποδέσμευσης και οι μηχανισμοί του συστήματος χορήγησης φαρμάκου.

Η μέθοδος μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης πλεονεκτεί επειδή είναι απλή, οικονομικά αποδοτική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ένα ευρύ φάσμα συστημάτων χορήγησης φαρμάκων. Ωστόσο, έχει περιορισμούς στο ότι δεν λαμβάνει υπόψη την επίδραση φυσιολογικών παραγόντων, όπως η ενζυμική αποικοδόμηση, το pH και η θερμοκρασία, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την αποδέσμευση του φαρμάκου *in vivo*. [43][44][45]

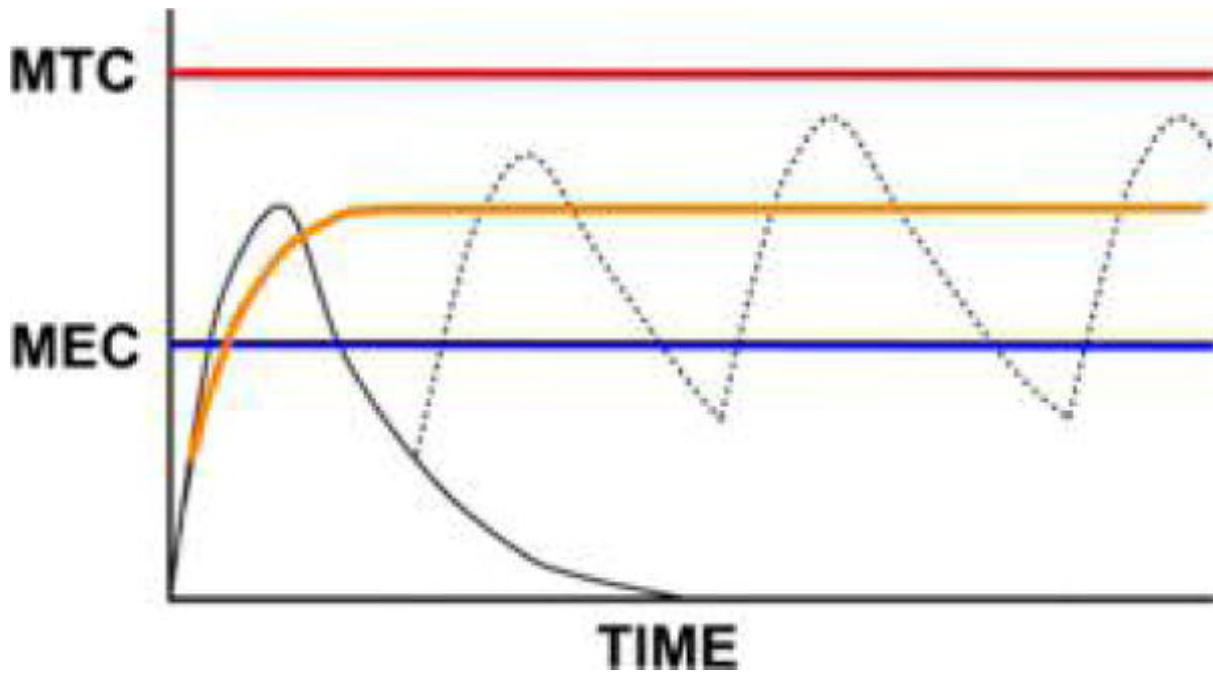
6.5 Θεραπευτικό παράθυρο

Το θεραπευτικό παράθυρο αναφέρεται στο εύρος των δόσεων φαρμάκου που θεραπεύουν αποτελεσματικά μια ασθένεια ή πάθηση, διατηρώντας παράλληλα ένα αποδεκτό επίπεδο ασφάλειας. Αντιπροσωπεύει την ισορροπία μεταξύ της επίτευξης του επιθυμητού θεραπευτικού αποτελέσματος και της ελαχιστοποίησης του κινδύνου ανεπιθύμητων ενεργειών ή τοξικότητας.

Στη φαρμακολογία, τα φάρμακα παρουσιάζουν συχνά μια σχέση δόσης-απόκρισης, όπου το μέγεθος της επίδρασης του φαρμάκου σχετίζεται με τη δόση του. Σε χαμηλότερες δόσεις, το φάρμακο μπορεί να έχει ανεπαρκή αποτελεσματικότητα, ενώ σε υψηλότερες δόσεις μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες. Το θεραπευτικό παράθυρο είναι το εύρος των δόσεων που βρίσκεται μεταξύ αυτών των δύο άκρων.

Το θεραπευτικό εύρος βρίσκεται μεταξύ της ελάχιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης (MEC) και πάνω από τη μέγιστη τοξική συγκέντρωση (MTC). Στην περίπτωση των ταχέως απορροφούμενων και αποβαλλόμενων φαρμάκων, μια δόση οδηγεί σε ταχεία αύξηση και πτώση της συγκέντρωσης του

φαρμάκου, όπως φαίνεται μέσω της μαύρης συμπαγούς καμπύλης στο Διάγραμμα 2. Η συχνή χορήγηση δόσεων σε τακτά χρονικά διαστήματα οδηγεί σε ταλαντευόμενες συγκεντρώσεις φαρμάκου στο πλάσμα (μαύρη συμπαγής καμπύλη ακολουθούμενη από διακεκομμένη καμπύλη) και η συγκέντρωση του φαρμάκου μπορεί να πέσει εκτός του θεραπευτικού εύρους για σημαντικά χρονικά διαστήματα. Η απελευθέρωση μηδενικής τάξης (πορτοκαλί καμπύλη) οδηγεί σε σταθερή συγκέντρωση φαρμάκου στο πλάσμα (μετά από μια αρχική αιχμή) και μπορεί να βελτιστοποιηθεί ώστε να βρίσκεται μεταξύ της MEC και της MTC.[38]



Διάγραμμα 2 : Γραφική απεικόνιση θεραπευτικού παραθύρου- Γράφημα συγκέντρωσης-χρόνου

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μιας διεργασίας εγκλωβισμού του φυσικού φλαβονοειδούς χρυσίνης σε νανοσυστήματα αλγινικού.

Προκειμένου να παρασκευαστούν τα νανοσωματίδια, χρησιμοποιείται η μέθοδος της ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού της χρυσίνης στα νανοσυστήματα αλγινικού πραγματοποιείται μέσω πειραματικού σχεδιασμού με τη μέθοδο των αποκριτικών επιφανειών (Response Surface Method, RSM). Ειδικότερα, χρησιμοποιείται το λογισμικό Design – Expert 12 και ο πειραματικός σχεδιασμός Box Behnken δεκαπέντε πειραμάτων. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίζονται η περιεκτικότητα του διαλύματος αλγινικού *AL* (% *w/v*), η περιεκτικότητα του διαλύματος του *NADES* (%*v/v*) και η περιεκτικότητα της χρυσίνης *ChR* (%*w/w*). Ως μελετώμενες αποκρίσεις, ορίζονται το μέγεθος των νανοσωματιδίων (*nm*) και η απόδοση εγκλωβισμού των νανοσωματιδίων.

Ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων νανοσωματιδίων γίνεται, ως προς το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό μέσω της μεθόδου της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), ως προς τη συγκέντρωση και το μέγεθος μέσω του Nanoparticle Tracking Analysis, ενώ ως προς την απόδοση εγκλωβισμού της χρυσίνης μέσω της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis).

Η απόδοση εγκλωβισμού της χρυσίνης υπολογίζεται με άμεσο τρόπο .

Πειραματικό μέρος

7.1 Αντιδραστήρια

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και τον χαρακτηρισμό των νανοσυστημάτων χρυσίνης-αλγινικού.

Πίνακας 3 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και τον χαρακτηρισμό των νανοσυστημάτων.

Αντιδραστήριο	Χημικός τύπος	Προμηθευτής
Αιθανόλη, 99.8%	C_2H_6O	Sigma - Aldrich
Άλας νατρίου του αλγινικού οξέος (αλγινικό νάτριο)	$(NaC_6H_7O_6)_n$	Glentham Life Services
Αποσταγμένο & υπερκάθαρο νερό	H_2O	-
Γαλακτικό οξύ	$C_3H_6O_3$	Labkem
Γλυκόζη	$C_6H_{12}O_6$	Sigma
Μονόξινο φωσφορικό κάλιο	K_2HPO_4	Penta
Polysorbate 80 (Tween 80)	$C_{64}H_{124}O_{26}$	Alfa Aesar
Χρυσίνη(5,7 υδροξυφλαβόνη), 98%	$C_{15}H_{10}O_4$	Alfa Aesar
Χλωριούχο ασβέστιο(MW=110.99g/mol)	$CaCl_2$	Sigma-Aldrich

7.2 Οργανολογία και συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία της παρασκευής και του χαρακτηρισμού νανοσυστημάτων αλγινικού με εγκλωβισμό της χρυσίνης παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και τον χαρακτηρισμό των νανοσυστημάτων

Όργανα-συσκευές	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp	ZX4
Λουτρό υπερήχων	Branson	2210 Ultrasonic Bath
Δυναμική σκέδαση φωτός	Malvern Panalytical	Zetasizer Nano ZS
Ζυγός ακρίβειας (μέχρι 210g)	KERN	ADJ 200-4
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	radleys	RR98072
Nanoparticle Tracking Analysis	Malvern Panalytical	NanoSight NS300

Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Φίλτρα σύριγγας 0.45 μm	Labbox	Non- Sterile Nylon Syringe Filters
Φυγόκεντρος		
Probe υπερήχων (400W)	Sonics & Materials Inc.	Vibra Cell
Syringe filters 0.22 μm & 0.45 μm	Labbox	Non – sterile Nylon Syringe Filters, 0.22 μm & 0.45 μm Poro
Vacuum freeze dryer	Frozen in time	Lablyo Mini
NMR	Varian	V600MHz

7.3 Σύνθεση του πράσινου βαθέως ευτηκτικού διαλύτη

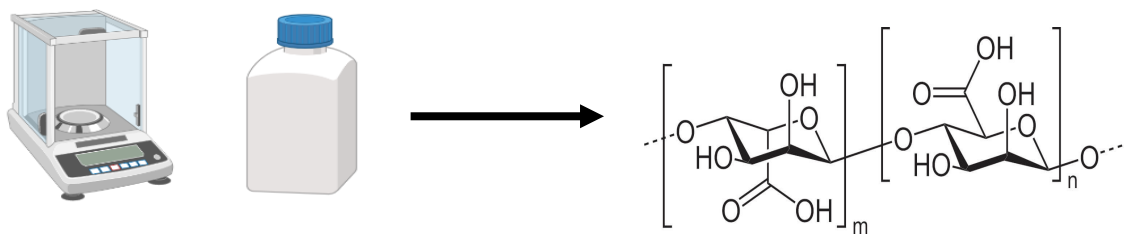
Ο βαθέως ευτηκτικός διαλύτης που συντίθεται αποτελείται από γλυκόζη, γαλακτικό οξύ και νερό σε αναλογία 1:5:6,2.(NADES Glu: LA: W 1:5:6,2). Αυτό επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της θέρμανσης και ανάδευσης των τριών συστατικών.

Αναλυτικότερα, ζυγίζονται οι επιθυμητές ποσότητες υδατικού διαλύματος γαλακτικού οξέος (LA) 80%w/w και της γλυκόζης και στη συνέχεια τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη των 50 ml. Στη συνέχεια, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε μάτι, έχοντας στο εσωτερικό της μαγνητικό αναδευτήρα. Η διαδικασία της ανάδευσης γίνεται στους 80°C στα 200 rpm.

7.4 Πράσινη σύνθεση νανοσωματιδίων αλγινικού για τον εγκλωβισμό της χρυσίνης

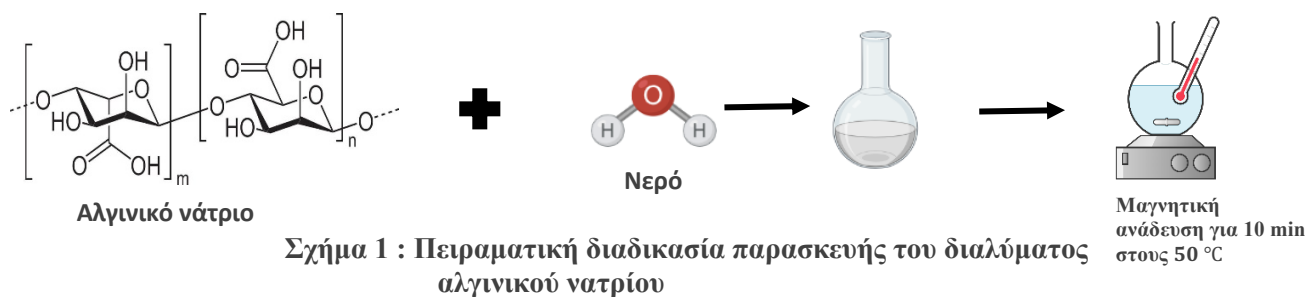
Η παρασκευή των νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES, με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη χρυσίνη, επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της ιονοτροπικής πυκνωμάτων. Το υδατικό διάλυμα του αλγινικού νατρίου AL παρασκευάζεται ως εξής:

- i. Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται ζυγισμένη ποσότητα αλγινικού νατρίου μαζί με 20 mL απεσταγμένου νερού.
- ii. Τοποθετείται η σφαιρική φιάλη σε αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση και θερμαινόμενη εστία, όπου και αφήνεται υπό έντονη ανάδευση και θέρμανση στους 50°C, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του αλγινικού νατρίου.
- iii. Απομακρύνεται η σφαιρική φιάλη από τον αναδευτήρα και αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- iv. Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL τοποθετούνται 100 mg επιφανειοδραστικής ουσίας Tween 80 μαζί με 10 mL του υδατικού διαλύματος που παρασκευάστηκε.
- v. Τοποθετείται η σφαιρική φιάλη σε αναδευτήρα για μαγνητική ανάδευση για 10 min.



Ζύγιση αλγινικού νατρίου στον ζυγό ακριβείας

Αλγινικό νάτριο



Η διαδικασία ακολουθείται για διαλύματα αλγινικού συγκέντρωσης 0.2 %w/v, 0.4 %w/v και 0.6 %w/v.

7.5 Εγκλωβισμός των νανοσυστημάτων αλγινικού-χρυσίνης

Η σύνθεση των νανοσυστημάτων αλγινικού-NADES ακολουθεί τα εξής βήματα:

- i. Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται διάλυμα αλγινικού νατρίου όγκου 10 mL συγκέντρωσης 0.6%w/v, 0.4%w/v και 0.2% w/v
- ii. Το διάλυμα τοποθετείται υπό μαγνητική ανάδευση στις 18.000 rpm για μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- iii. Στη συνέχεια, ζυγίζεται και προστίθεται σε vial 3mL ποσότητα ChR (5,7 υδροξυφλαβόνη, 98%) συγκέντρωσης 10%w/w, 20%w/w, 30%w/w δηλαδή 6 mg, 12 mg και 18 mg αντίστοιχα.
- iv. Στο vial, η ChR διαλύεται με προσθήκη 3 mL αιθανόλης (EtOH, 99.8%) μέσω της ανάδευσης του περιεχομένου του vial σε αναδευτήρα τύπου vortex. Για να διαλυθεί πλήρως η ChR έγινε χρήση bath νερού στους 60°C.
- v. Η ποσότητα EtOH-ChR του vial προστίθεται στην αναδεδυμένη σφαιρική φιάλη που περιέχει το αλγινικό και αφήνεται υπό ανάδευση για 20 λεπτά.
- vi. Προστίθεται ποσότητα του παρασκευασμένου βαθέως ευτηκτικού διαλύτη NADES, συγκέντρωσης 0.1% v/v, 0.2%v/v και 0.3%v/v, αυξάνοντας τις στροφές ανάδευσης στις 25.000 rpm και αφήνεται υπό ανάδευση για 1h.
- vii. Η προκύπτουσα διασπορά των νανοσυστημάτων αλγινικού –NADES αφήνεται υπό έντονη ολονύκτια (overnight) ανάδευση με σκοπό την πλήρη εξάτμιση της EtOH στο διάλυμα.
- viii. Μετά την ολονύκτια ανάδευση, το διάλυμα τοποθετείται σε κωνική φιάλη των 25 mL και γίνεται χρήση υπερήχων με probe σε 40% της δυναμικότητας του οργάνου. Οι υπερήχοι διαρκούν 5 λεπτά και πραγματοποιούνται τρεις φορές με ενδιάμεση «ξεκούραση» για 1 λεπτό.
- ix. Η διασπορά των νανοσυστημάτων αλγινικού-NADES, με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη χρυσίνη, που λαμβάνουμε αποθηκεύεται στη ψύξη σε θερμοκρασία $T = 4^{\circ}\text{C}$.

Παρατηρήσεις – Σχόλια

- Η χρυσίνη είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό. Πειραματικά διαπιστώνεται πως η χρυσίνη είναι διαλυτή στην αιθανόλη(EtOH), γι' αυτό και επιλέγεται η χρήση αυτού του διαλύτη.
- Η χρήση υπερήχων με probe έχει ως στόχο τη δημιουργία μίας ομοιόμορφης διασποράς της χρυσίνης στο διάλυμα του αλγινικού.
- Η επόμενη χρήση υπερήχων με probe μετά την ολονύκτια έντονη ανάδευση της διασποράς των νανοσωματιδίων έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο των συσσωματωμάτων και άρα τη μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων οδηγώντας σε μία πιο ομοιόμορφη και σταθερή διασπορά νανοσωματιδίων.
- Χρησιμοποιούμε μία συγκεκριμένη δυναμικότητα του οργάνου, καθώς και συγκεκριμένο χρόνο χρήσης του, ανάλογα με τον όγκο των διαλυμάτων και την ανάγκη προστασίας του NADES από τον κίνδυνο υποβάθμισής της εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά τη μέθοδο των υπερήχων. Έτσι, χρησιμοποιείται παγόλουτρο πάνω στην κωνική φιάλη κατά τη διάρκεια των υπερήχων με probe.

8. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

8.1 Προσδιορισμός χαρακτηριστικών νανοσωματιδίων

8.1.1 Προσδιορισμός δείκτη πολυδιασποράς και ζ – δυναμικού

Ο προσδιορισμός του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και του ζ-δυναμικού (z potential) των νανοσωματιδίων χρυσίνης πραγματοποιείται μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) στο όργανο Zetasizer Nano ZS της Malvern.

Για την παρασκευή του δείγματος που προορίζεται για μέτρηση στο όργανο του DLS λαμβάνονται σε μεγάλο vial των 30 mL αρχικά 10 μL από τη διασπορά των παραγόμενων νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES, με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη χρυσίνη, και αραιώνονται με 20 mL υπερκάθαρου νερού. Στη συνέχεια, το vial τοποθετείται σε αναδευτήρα τύπου vortex και έπειτα οδηγείται για χρήση υπερήχων με probe σε 30% της δυναμικότητας (120 Watt) του οργάνου για 5 min.

Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το όργανο του DLS, γίνεται χρήση κυψελίδας τύπου Disposable capillary cell (DTS1070), η οποία και πληρώνεται με σύριγγα με το δείγμα της αραιωμένης υδατικής διασποράς των νανοσωματιδίων μέχρι και την αναγραφόμενη ένδειξη πλήρωσής της. Η κυψελίδα μπαίνει στο όργανο του DLS και ξεκινούν οι μετρήσεις PDI και z potential. Για κάθε μέγεθος πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις με πολλαπλά σκαναρίσματα του δείγματος για την καθεμία. Καταγράφονται και οι τρεις μετρήσεις για κάθε μέγεθος, από τις οποίες εξάγεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση για κάθε μέγεθος.

Παρατηρήσεις – Σχόλια

- Οι επιθυμητές διασπορές θα πρέπει να έχουν δείκτη πολυδιασποράς μικρότερο από 0.4 ενώ το ζ δυναμικό θα πρέπει να προσεγγίζει τα -30 mV.
- Η χρήση υπερκάθαρου νερού για την αραιώση γίνεται λόγω της χαμηλής αγωγιμότητας του και περιεχόμενα ιόντα, τα οποία δε δύνανται να επηρεάσουν την μέτρηση του ζ-δυναμικού.
- Η υπερήχηση με τη μέθοδο του probe περιλαμβάνει τη βύθιση της κωνικής φιάλης, η οποία περιείχε τα σωματίδια, σε παγόλουτρο με σκοπό την αποφυγή ανάπτυξης υψηλών θερμοκρασιών και ενδεχόμενη υποβάθμιση των σωματιδίων.
- Οι μετρήσεις στο DLS γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος $T = 25^{\circ}\text{C}$, οπότε πριν την πραγματοποίηση των μετρήσεων απαιτείται η προθέρμανση του οργάνου του DLS για περίπου 30 min, έως και ότου αποκτήσει την σωστή θερμοκρασία.

8.1.2 Προσδιορισμός μεγέθους και συγκέντρωσης

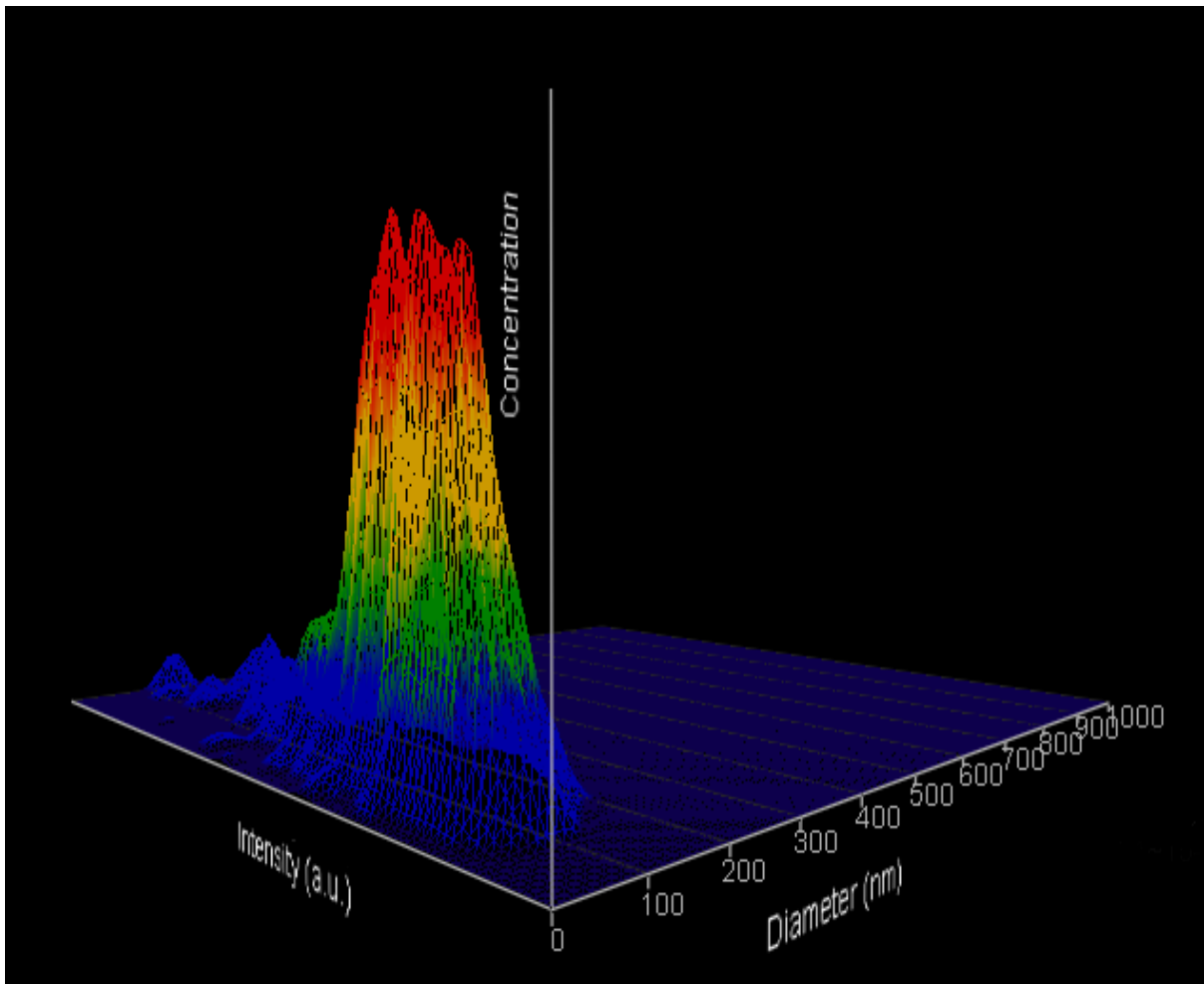
Ο προσδιορισμός του μεγέθους και της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων επιτυγχάνεται μέσω του Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) στο όργανο NanoSight NS300 της Malvern.

Για την παρασκευή του δείγματος που προορίζεται για μέτρηση στο όργανο του NTA λαμβάνονται σε μεγάλο vial των 30 mL αρχικά 10 μL από τη διασπορά των παραγόμενων νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη χρυσίνη και αραιώνονται με 20 mL υπερκάθαρου νερού.

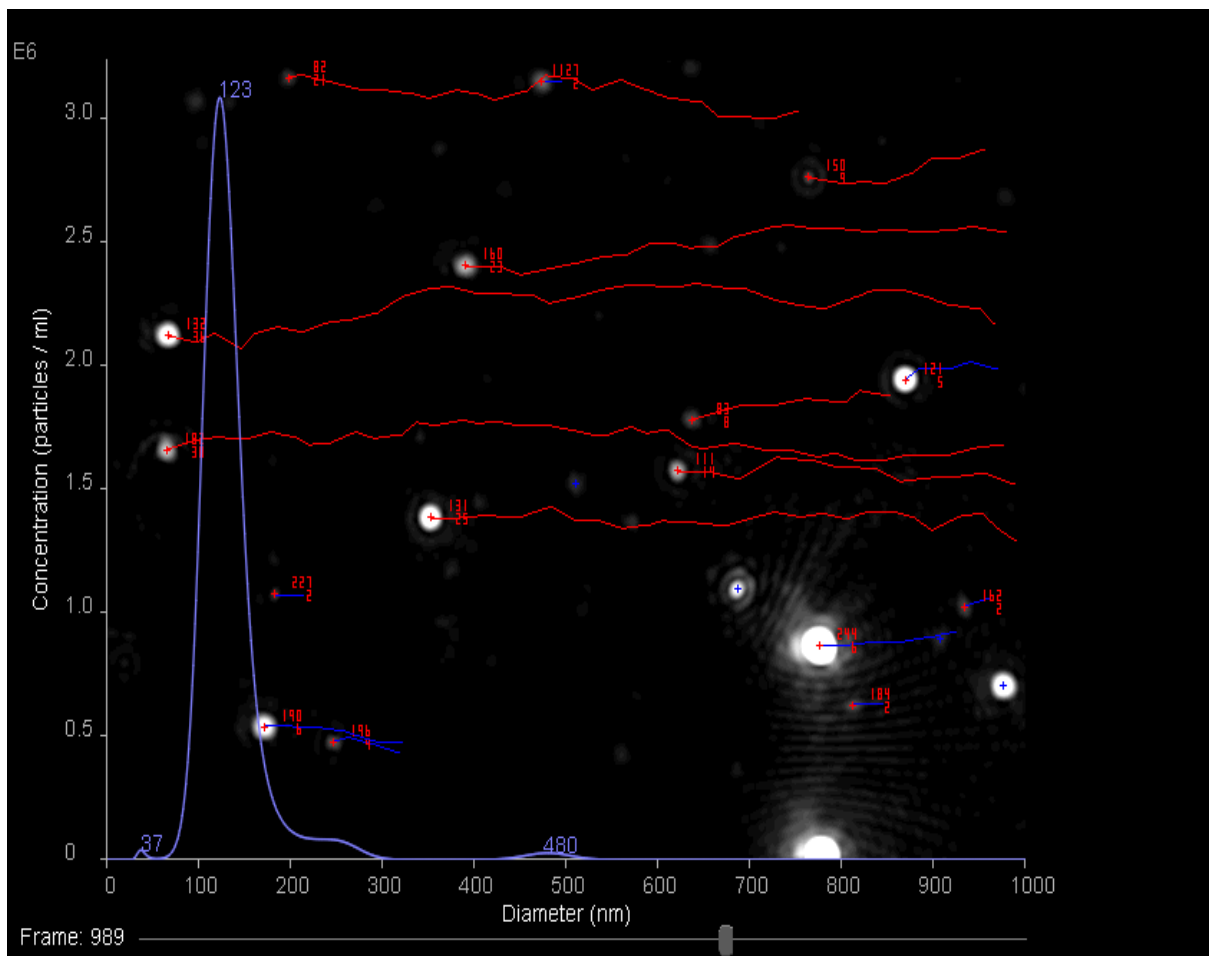
Αρχικά, ξεπλύνουμε το όργανο με υπερκάρθρο νερό, με χρήση σύριγγας 0.45μm η οποία τοποθετείται στην αντλία σύριγγας. Η αντλία σύριγγας NanoSight εφαρμόζει συνεχή πίεση στο έμβολο μιας σύριγγας για να παρέχει ομαλή ροή του δείγματος και συνεπώς να εξαλείφει το φαινόμενο των παλμών που παρατηρείται στις περισταλτικές αντλίες. Η πίεση ελέγχεται από το λογισμικό NTA.

Στη συνέχεια, λαμβάνουμε δείγμα από το vial των 30 ml και το τοποθετούμε στην αντλία σύριγγας.

Κάθε μέτρηση καταγράφεται και εξάγεται ένα εύρος μεγέθους και συγκέντρωσης με κάποιες αποκλίσεις. Το λογισμικό παρέχει επίσης σχηματικά τη διασπορά του κάθε δείγματος όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 15: Τρισδιάστατη αναπαράσταση των μεταβλητών συγκέντρωσης-διαμέτρου-έντασης για το τρίτο δείγμα με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό.



Εικόνα 16: Δισδιάστατη αναπαράσταση των μεταβλητών συγκέντρωσης-διαμέτρου για το τρίτο δείγμα με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό.

Παρατηρήσεις-Σχόλια

- Οι μετρήσεις στο NTA γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος $T = 25^{\circ}\text{C}$, οπότε πριν την πραγματοποίηση των μετρήσεων απαιτείται η προθέρμανση του οργάνου του NTA για περίπου 20 min, έως και ότου αποκτήσει την σωστή θερμοκρασία.
- Η πίεση στην αντλία σύριγγας ελέγχεται από το λογισμικό NTA.
- Όσο μεγαλύτερη είναι η αραιώση, τόσο μικρότερη είναι η ορατή διασπορά των νανοσωματιδίων που εμφανίζεται στην κάμερα του οργάνου Nanosight NS300.

8.2 Απόδοση εγκλωβισμού

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

$$\text{Απόδοση εγκλωβισμού } EE\% = \frac{\text{Μάζα ένωσης που εγκλωβίστηκε (mg)}}{\text{Αρχική μάζα ένωσης προς εγκλωβισμό (mg)}} \times 100\%$$

Η απόδοση εγκλωβισμού ενός νανοσυστήματος μπορεί να προσδιοριστεί με άμεσο και έμμεσο τρόπο.

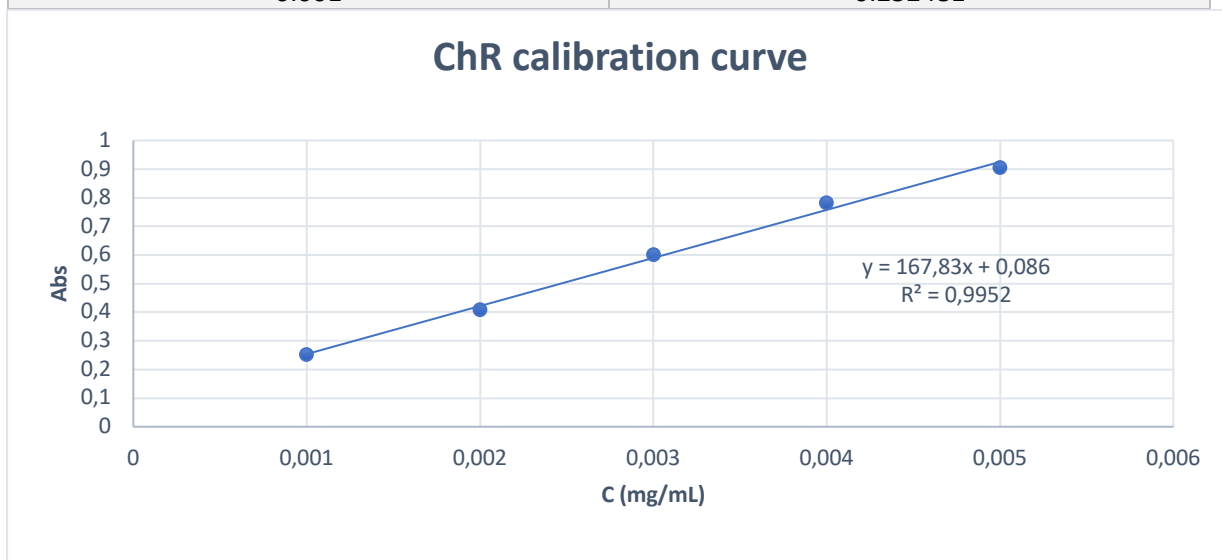
- ✚ Ο άμεσος προσδιορισμός απαιτεί λύση των σωματιδίων και είναι καταστρεπτική μέθοδος. Παρέχει όμως σημαντικές πληροφορίες και σχετικά με την ομοιογένεια του δείγματος των νανοσυστημάτων, παράμετρος εξέχουσας σημασίας για τις βιολογικές αξιολογήσεις των νανοσυστημάτων
- ✚ Ο έμμεσος προσδιορισμός γίνεται με βάση τη μάζα της ένωσης που δεν εγκλωβίστηκε και χρησιμοποιείται επί το πλείστον στη βιβλιογραφία καθώς αποτελεί μία γρήγορη και μη καταστρεπτική μέθοδος για το δείγμα.

Γενικά, ο προσδιορισμός της απόδοσης θα πρέπει να πραγματοποιείται και με τους δύο τρόπους με τις τιμές που προκύπτουν να είναι κοντινές μεταξύ τους.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα της ένωσης που εγκλείστηκε χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis). Από την απορρόφηση των δειγμάτων η μάζα της ένωσης μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της ένωσης όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3. Για τον σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς της χρυσίνης μελετήθηκε η διαλυτότητα της. Ο διαλύτης είναι η αιθανόλη (99.8%). Αφού διαλυθεί πλήρως η χρυσίνη με τη βοήθεια αναδευτήρα τύπου Vortex, τοποθετείται σε κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου υπεριώδους ορατού. Τα διαλύματα φωτομετρούνται με γνωστές συγκεντρώσεις σε συγκεκριμένο μήκος κύματος τα 270 nm. Παρακάτω παρουσιάζονται οι απορροφήσεις (Abs) των παρασκευασμένων διαλυμάτων χρυσίνης σε αιθανόλη με γνωστές συγκεντρώσεις (C), καθώς και η καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης σε αιθανόλη.

Πίνακας 5: Συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης και απορρόφησης

C(mg/mL)	Abs(270nm)
0.005	0.904362
0.004	0.782487
0.003	0.600047
0.002	0.407914
0.001	0.252481



Διάγραμμα 3 : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης σε αιθανόλη

Με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων χαράζεται η βέλτιστη ευθεία για τα πειραματικά δεδομένα. Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης των δύο μεγεθών προσεγγίζει τη μονάδα.

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

Προκύπτει η εξίσωση:

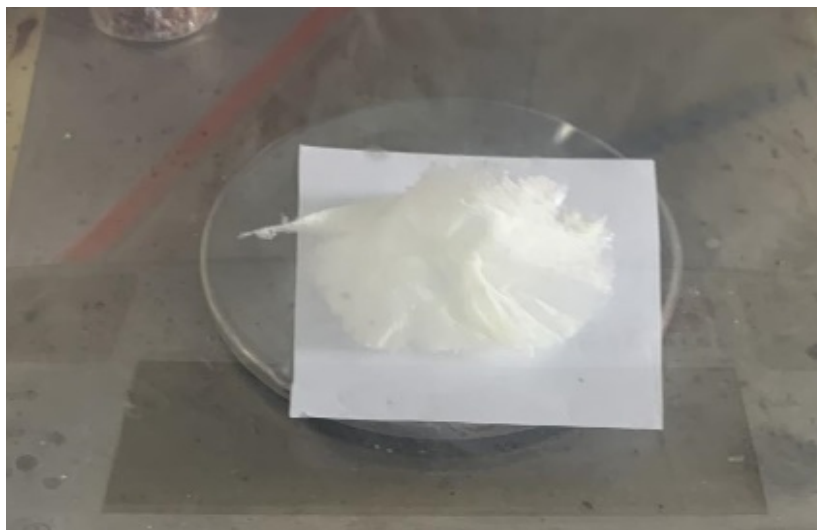
$$\text{Συγκέντρωση χρυσίνης} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Απορρόφηση (abs)} - 0.086}{167.83} \quad (1)$$

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

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η απόδοση εγκλωβισμού υπολογίστηκε με άμεσο τρόπο.

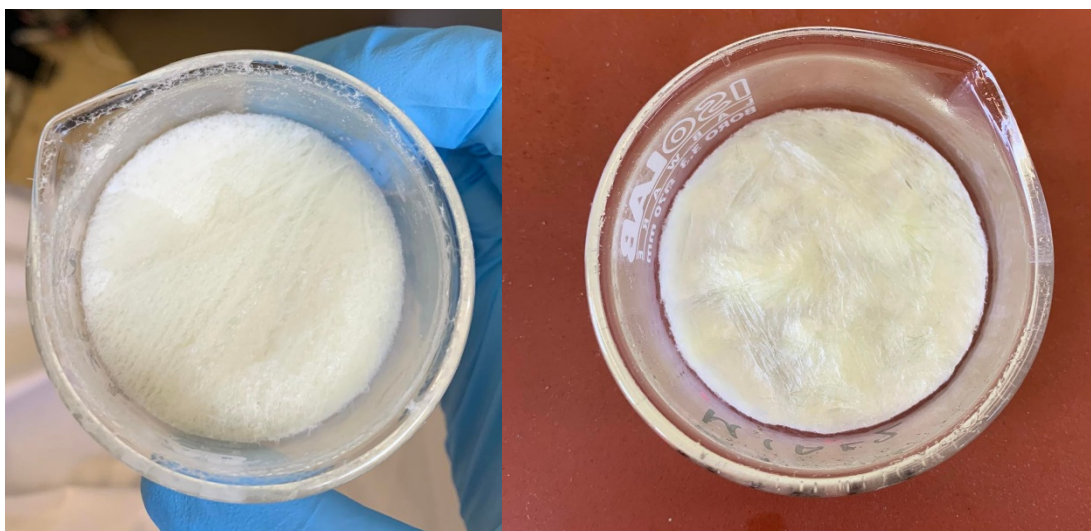
8.2.1 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού

Για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλωβισμού με άμεσο τρόπο, αρχικά ζυγίζεται η συνολική μάζα των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων.



Εικόνα 17: Ζύγιση λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων σε ζυγό ακριβείας

Στη συνέχεια, τα λυοφιλοποιημένα AL-NADES-ChR NPs τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη των 100 mL μαζί με 20 mL EtOH και αφήνονται υπό μαγνητική ανάδευση σε μάτι για 3-4 μέρες έως ότου δημιουργηθεί μία ομοιόμορφη διασπορά.



Εικόνα 18: Λυοφιλοποιημένα AL-NADES-ChR NPs.

Μετά την πλήρη ομογενοποίηση, η διασπορά τοποθετείται σε vial των 25ml και Έπειτα, τα δείγματα, τα οποία αποτελούνται από την αποδεσμευμένη χρυσίνη διαλυμένη σε EtOH φιλτράρονται με χρήση syringe filters πορώδους 0.22 μm .

Ύστερα, ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο UV – Vis και σε εύρος μεταξύ των 400 nm – 200 nm για την ποσοτικοποίηση της αποδεσμευμένης ChR. Αρχικά, καταστρώνεται Baseline στο όργανο χρησιμοποιώντας EtOH και στη συνέχεια ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων. Η φιλτραρισμένη διασπορά τοποθετείται σε κυψελίδα των 3.5 mL , με αραιώση 3000 μL αιθανόλης. Η απορρόφηση στα 270nm είναι το αποτέλεσμα που συλλέγεται για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια και με χρήση της εξίσωσης (1) υπολογίζεται η απόδοση εγκλωβισμού της χρυσίνης στα νανοσωματίδια αλγινικού – χρυσίνης.

Παρατηρήσεις-σχόλια

- Προκειμένου να είναι αξιόπιστες οι μετρήσεις των απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis, οι τιμές τους πρέπει να είναι μεγαλύτερες από 0.1 και μικρότερες από 1 ($0.1 < \text{Abs} < 1$). Για να ικανοποιείται αυτό το εύρος, και με χρήση των κυψελίδων πλήρωσης έως και 3.5 mL φωτομετρούνται συνήθως 50 μL από το υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος αραιωμένα με 3000 μL από το υπερκείμενο υγρό των κενών νανοσυστημάτων, ενώ όπου απαιτείται γίνονται διαφοροποιήσεις στις αναλογίες αυτές.
- Στην περίπτωση που οι τιμές των απορροφήσεων δεν βρίσκονται εντός του συγκεκριμένου εύρους, πραγματοποιείται περαιτέρω αραιώση με μεγαλύτερη ποσότητα EtOH.
- Η χρήση της αιθανόλης ως μέσου διασποράς των νανοσωματιδίων αποσκοπεί στη διάλυση της αποδεσμευμένης χρυσίνης.

8.3 Μελέτη αποδέσμευσης *in vitro*

Για την μελέτη της *in vitro* αποδέσμευσης της χρυσίνης από τα νανοσωματίδια αλγινικού-χρυσίνης χρησιμοποιείται η μέθοδος της μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης. Το διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται, το οποίο και παίζει ρόλο εξωτερικού περιβάλλοντος επιλέγεται να είναι όξινο, ως ισοτονικό με το pH του δέρματος. Έτσι, επιλέγεται ως εξωτερικό περιβάλλον ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με τιμή pH ίση με 7.4 και θερμοκρασία όπως αυτή του δέρματος, δηλαδή $T = 37^{\circ}\text{C}$.

- i. Σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL διαλύονται 1.74 g όξινου φωσφορικού καλίου K_2HPO_4 σε 100 mL απεσταγμένου νερού, οπότε και παρασκευάζεται το διάλυμα 1 ($\Delta 1$).
- ii. Σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL διαλύονται 2.07 g δισόξινου φωσφορικού καλίου KH_2PO_4 σε 150 mL απεσταγμένου νερού, οπότε και παρασκευάζεται το διάλυμα 2 ($\Delta 2$).
- iii. Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα (ΡΔ) με $\text{pH}=7.4$ με προσθήκη ποσότητας του $\Delta 2$ στο $\Delta 1$. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με τη χρήση πεχάμετρου.
- iv. Η διασπορά των νανοσωματιδίων μεταφέρεται στη μεμβράνη διάλυσης – διάχυσης, η οποία έπειτα τοποθετείται στο ποτήρι ζέσεως με 30mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών που βρίσκεται υπό ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 37°C .
- v. Συλλέγεται 1 ml εκ του διαλύματος σε δοχείο Ependorf, ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (20 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h) κατά τη διάρκεια της ημέρας και προσθήκη 1 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα για να μη μεταβληθεί ο όγκος 150 mL.
- vi. Ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων των δειγματοληψιών στο φασματοφωτόμετρο UV – Vis και σε εύρος μεταξύ των 400 nm – 200 nm για την ποσοτικοποίηση της αποδεσμευμένης χρυσίνης. Αρχικά, καταστρώνεται baseline στο όργανο χρησιμοποιώντας το παρασκευασθέν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και έπειτα ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων. Στην περίπτωση ανάγκης αραίωσης των δειγμάτων η αραίωση πραγματοποιείται επίσης με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, έτσι ώστε να «διαγράφεται» η απορρόφησή του. Από τις προκύπτουσες απορροφήσεις των δειγμάτων και για γνωστή ποσότητα εγκλωβισμένης ένωσης από τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλωβισμού υπολογίζεται το ποσοστό αποδέσμευσης της χρυσίνης από τα νανοσυστήματα αλγινικού – χρυσίνης (Release%) για κάθε χρονικό διάστημα δειγματοληψίας.

Παρατηρήσεις-σχόλια

- Η συγκέντρωση της χρυσίνης που αποδεσμεύτηκε, όπως προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς της και την απορρόφηση του δείγματος, μετατρέπεται σε μάζα μέσω του νόμου αραίωσης του Ostwald ($C_1V_1 = C_2V_2$ με βάση την 1122 αραίωση του δείγματος που έχει πραγματοποιηθεί πολλαπλασιάζοντας την προκύπτουσα συγκέντρωση από το νόμο του Ostwald με τον συνολικό όγκο της δειγματοληψίας (1 mL).
- Μέσω της παρακάτω σχέσης υπολογίζεται το ποσοστό αποδέσμευσης της χρυσίνης από τα νανοσυστήματα αλγινικού –NADES (Release%) για κάθε χρονικό διάστημα δειγματοληψίας:

$$\text{Release\%} = \left(\frac{\text{Μάζα ένωσης που αποδεσμεύτηκε}}{\text{Αρχική μάζα εγκλωβισμένης ένωσης}} \right) - 1$$

8.4 Βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων αλγινικού – χρυσίνης με χρήση πειραματικού σχεδιασμού

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο την βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού της χρυσίνης σε νανοσωματίδια αλγινικού-χρυσίνης η οποία πραγματοποιείται μέσω πειραματικού σχεδιασμού με τη μέθοδο των αποκριτικών επιφανειών (Response Surface Method, RSM). Ειδικότερα, χρησιμοποιείται το λογισμικό Design – Expert 12 και ο πειραματικός σχεδιασμός Box Behnken.

Οι **ανεξάρτητες μεταβλητές** που μελετώνται είναι:

1. Η περιεκτικότητα του διαλύματος της αλγινικού AL (% w/v)
2. Η περιεκτικότητα του διαλύματος του NADES (% v/v)
3. Η περιεκτικότητα της χρυσίνης ChR (%w/w)

Οι μελετώμενες **εξαρτημένες μεταβλητές** («αποκρίσεις») αφορούν:

1. Το μέγεθος (size) των νανοσωματιδίων (nm)
2. Την απόδοση εγκλωβισμού της χρυσίνης EE% (-)

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

Αρχικά τοποθετούνται άνω και κάτω όρια για τις παραμέτρους καθώς και τιμές βελτιστοποίησης των αποκρίσεων. Ακολούθως διαφαίνονται αυτές οι οριοθετήσεις:

Πίνακας 6: Οριοθέτηση παραμέτρων νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης

Factor	Name	Units	Minimum	Maximum	Coded Low	Coded High	Mean	Std. Dev.
A	AL	(%w/v)	0.2	0.6	-1 ↔ 0.2	+1 ↔ 0.6	0.4000	0.1512
B	NADES	(%w/v)	0.1	0.5	-1 ↔ 0.1	+1 ↔ 0.5	0.3000	0.1512
C	ChR	(%w/w)	10	30	-1 ↔ 10	+1 ↔ 30	20.00	7.56

Στόχος είναι η μεγιστοποίηση της απόδοσης εγκλεισμού EE % και η ελαχιστοποίηση του size των νανοσωματιδίων. Ακολουθεί ο πίνακας με τις τιμές των παραμέτρων κάθε πειράματος, οι οποίες προέκυψαν από το Design Expert.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Run	A:Al (%w/v)	B:NADES(%v/v)	C:ChR (%w/w)
1	0.6	0.1	20
2	0.6	0.5	20
3	0.6	0.3	10
4	0.6	0.3	30
5	0.2	0.1	20
6	0.2	0.5	20
7	0.2	0.3	10
8	0.2	0.3	30
9	0.4	0.5	10
10	0.4	0.5	30
11	0.4	0.1	10
12	0.4	0.1	30
13	0.4	0.3	20
14	0.4	0.3	20
15	0.4	0.3	20

Πίνακας 7: Προβλεπόμενα πειράματα για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης

9. Αποτελέσματα και συζήτηση

9.1 Αποτελέσματα πειραμάτων πειραματικού σχεδιασμού

9.1.1 Αποτελέσματα πειραμάτων για τον χαρακτηρισμό του μεγέθους

Τα αποτελέσματα με τις τιμές των αποκρίσεων για τα εκτελεσμένα δεκαπέντε πειράματα για τις μετρήσεις του δείκτη πολυδιασποράς, του ζ δυναμικού, της συγκέντρωσης του πειραματικού σχεδιασμού συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Run	Factor 1	Factor 2	Factor 1	NTA		DLS			EE
	A: Al (%w/v)	B: NADES(%v/v)	C:ChR (%w/w)	size(nm)	Concentration (particles/ml)	PDI	ζ-δυναμικό(-)	size	
1	0.6	0.1	20	136.4±2.5	7.55e+06	0.501	30.5±2.4	660.8	20
2	0.6	0.5	20	138.5±4.8	1.60e+07	0.532	29.6±1.0	741.6	32
3	0.6	0.3	10	125.6 ±3.2	2.62e+07	0.527	27.2±1.1	820.6	80
4	0.6	0.3	30	122.7±7.3	1.09e+07	0.525	10.6±0.02	822.0	37
5	0.2	0.1	20	123.0 ±4.5	1.31e+07	0.593	24.6±1.4	559.2	22
6	0.2	0.5	20	118.1±1.6	1.27e+07	0.753	15.4±1.5	762.9	36
7	0.2	0.3	10	137.0 ±6.0	1.16e+07	0.661	30.13±6.2	730.3	37
8	0.2	0.3	30	132.0±5.6	3.35e+07	0.523	28.83±1.1	551.8	17
9	0.4	0.5	10	86.3 ±35.6	5.13e+05	0.616	25.7±0.5	566.6	48
10	0.4	0.5	30	186.8±11.0	4.48e+06	0.593	17.03 ±1.4	527.0	36
11	0.4	0.1	10	204.4 ±115.6	4.43e+05	0.648	27.4±2.5	650.3	97
12	0.4	0.1	30	206.5±20.7	4.54e+06	0.614	29.8±1.9	582.4	30
13	0.4	0.3	20	156.2±5.3	2.07e+07	0.737	29.47±2.3	599.5	24
14	0.4	0.3	20	156.2±5.5	2.07e+07	0.737	29.57±2.2	599.2	24
15	0.4	0.3	20	156.2 ±5.2	2.07e+07	0.737	29.12±2.2	599.1	24

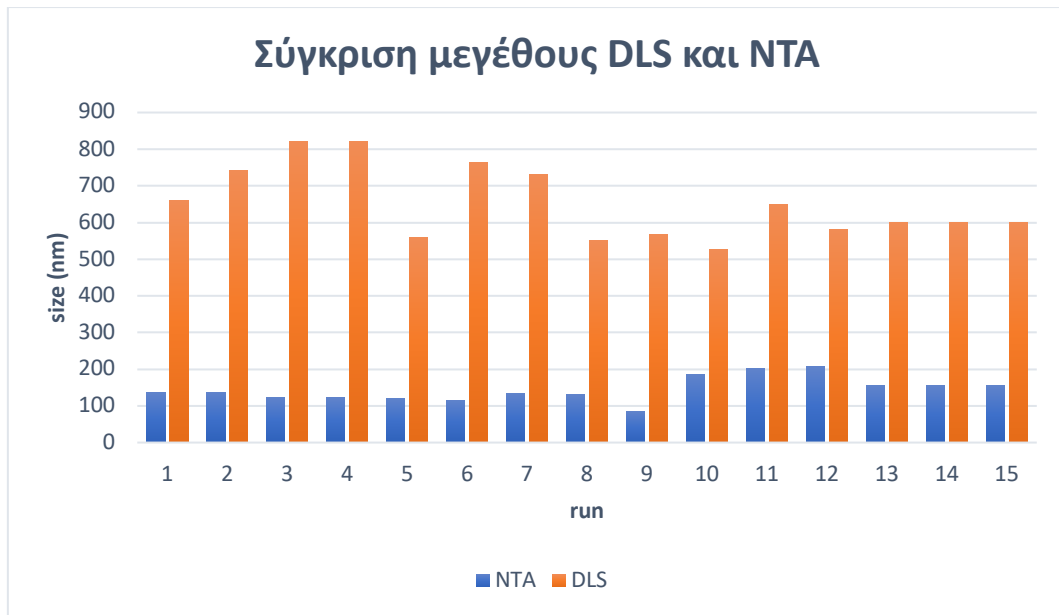
Πίνακας 8: Οι τιμές που προκύπτουν από την εκτέλεση του πειραματικού σχεδιασμού

Παρατηρήσεις- Σχόλια

- Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, η παρασκευή των νανοσυστημάτων αλγινικού με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη χρυσίνη παρουσιάζουν μέγιστη απόδοση εγκλωβισμού 97% και μέση απόδοση εγκλωβισμού 38%.
- Τα πειράματα με την μικρότερη τιμή χρυσίνης 10 w/w% παρουσιάζουν καλύτερες αποδόσεις όπως φαίνεται στα δείγματα 3,11.
- Ορισμένα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού οδήγησαν στο σχηματισμό πολύ σταθερών διασπορών νανοσυστημάτων, αφού η τιμή του ζ – δυναμικού τους προσέγγισε το +30 mV.

9.1.2 Σύγκριση Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ των μετρήσεων μεγέθους της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός και του Nanoparticle Tracking Analysis για τα νανοσυστήματα αλγινικού-NADES με θεραπευτικό παράγοντα την ChR.



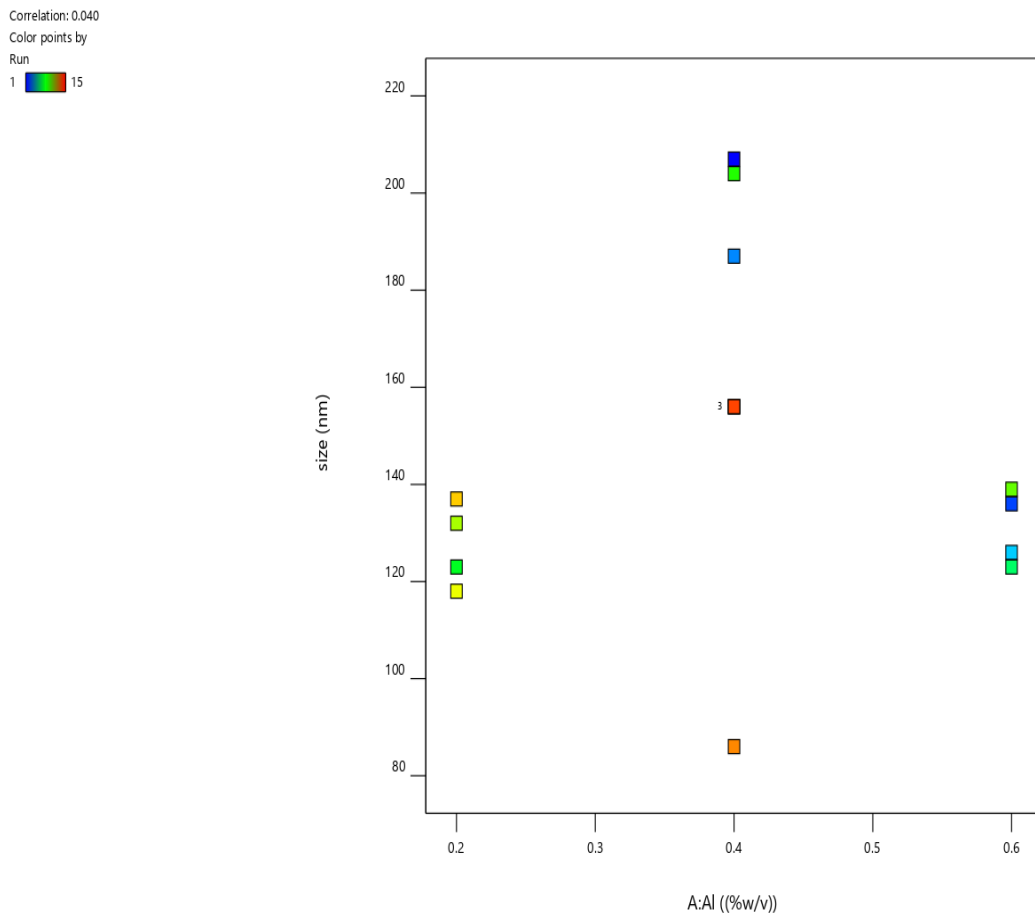
Εικόνα 19: Σύγκριση DLS και NTA

•

9.1.3 Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων

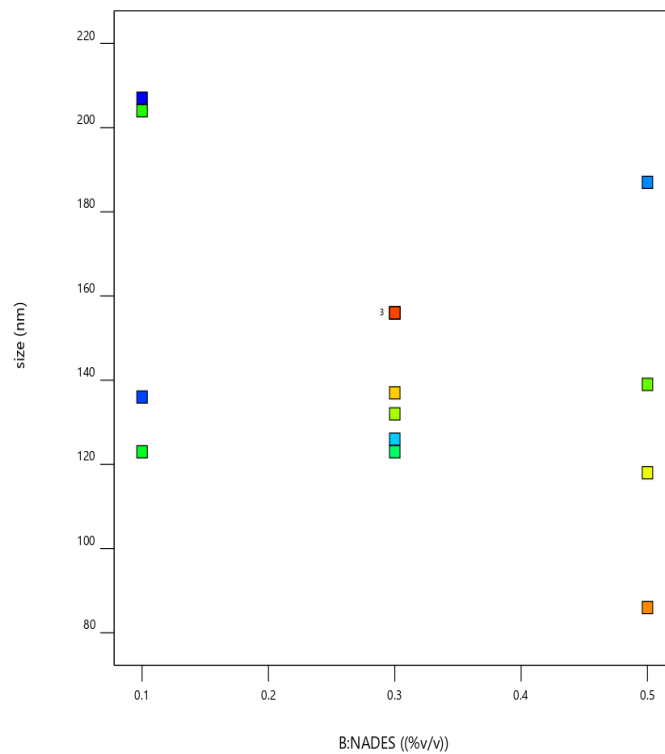
9.1.3.1 Μέγεθος νανοσυστημάτων

Αναλύονται παρακάτω οι συσχετισμοί μεταξύ του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε σχέση με την περιεκτικότητα αλγινικού, την περιεκτικότητα NADES και την περιεκτικότητα χρυσίνης.



Διάγραμμα 4: Σύσχετιση περιεκτικότητας αλγινικού (Al) με το μέγεθος των σωματιδίων

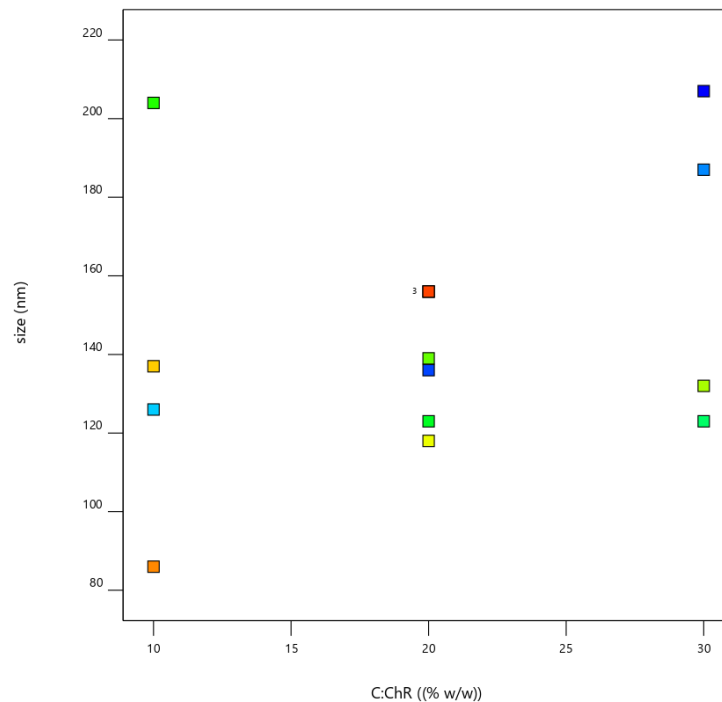
Correlation: -0.400
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 5: Συσχέτιση περιεκτικότητας NADES με το μέγεθος των σωματιδίων

- Παρατηρείται ότι για την χαμηλότερη περιεκτικότητα του βαθέως ευτηκρικού διαλύτη NADES (0.1% v/v) παρουσιάζονται μεγάλα μεγέθη στα νανοσωματίδια, ενώ για υψηλότερες συγκεντρώσεις (0.5% v/v) παρατηρείται ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων.
- Στην μεσαία τιμή του NADES (0.3% v/v), το μέγεθος των νανοσωαμιτιδίων προσεγγίζει περίπου τα 130 nm.

Correlation: 0.274
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 6 :Συσχέτιση περιεκτικότητας χρυσίνης (ChR) με το μέγεθος των σωματιδίων

- Με βάση το παραπάνω διαγράμμα παρατηρείται πως για τις υψηλότερες περιεκτικότητες του διαλύματος της χρυσίνης (10% w/w) τα σχηματιζόμενα νανοσυστήματα εμφανίζουν το μικρότερο μέγεθος.

Μελέτη απόκρισης

Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής επιλέγεται το reduced quadratic model, η εξίσωση του οποίου περιέχει τους όρους των ανεξάρτητων μεταβλητών, καθώς και πεπλεγμένους όρους αυτών. Οι όροι οι οποίοι αποτελούν το μοντέλο αυτό, οφείλουν να έχουν p value < 0.05 για να θεωρούνται σημαντικοί (significant). Από το μοντέλο αυτό αφαιρέθηκαν οι όροι AB , AC , B^2 , C^2 , για να είναι το μοντέλο στατιστικά σημαντικό με p value = 0.0317, δηλαδή τιμή μικρότερη από την τιμή 0.05. Παράλληλα, το μοντέλο παρουσιάζει τιμή F – value ίση με 4.14 υποδηλώνοντας ότι είναι στατιστικά σημαντικό, ενώ υπάρχει 3.17% πιθανότητα η υψηλή τιμή του F – value να οφείλεται σε θόρυβο.

Στον ακόλουθο πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA.

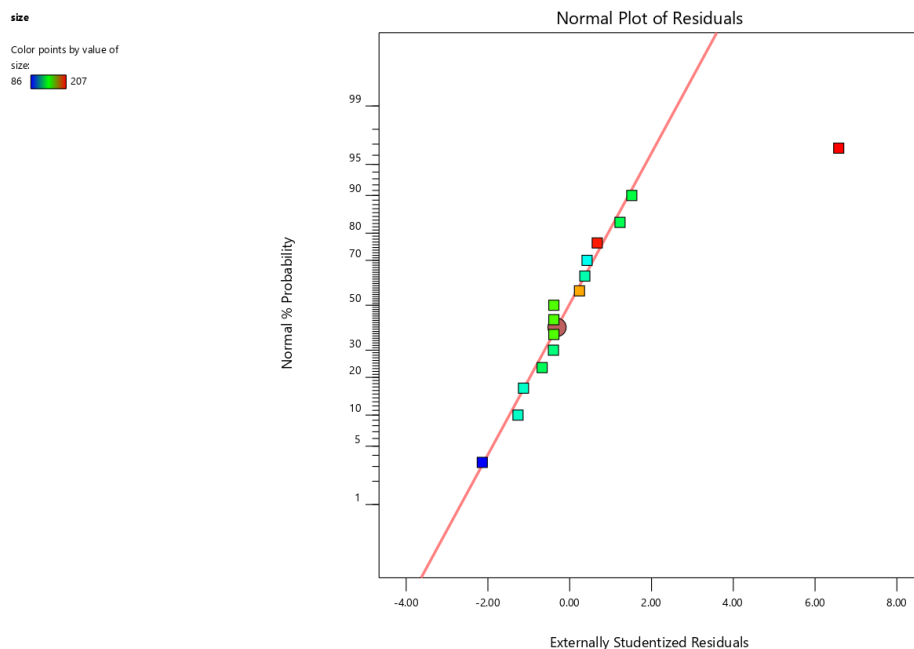
ANOVA για Reduced Quadratic model

Απόκριση 1: size

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	10685.22	5	2137.04	4.14	0.0314	significant
A-AI	24.50	1	24.50	0.0474	0.8324	
B-NADES	2450.00	1	2450.00	4.74	0.0573	
C-ChR	1152.00	1	1152.00	2.23	0.1695	
BC	2401.00	1	2401.00	4.65	0.0594	
A ²	4657.72	1	4657.72	9.02	0.0149	
Residual	4647.71	9	516.41			
Lack of Fit	4647.71	7	663.96			
Pure Error	0.0000	2	0.0000			
Cor Total	15332.93	14				

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει το μέγεθος των νανοσυστημάτων

Το R^2 λαμβάνει την τιμή 0.6969, η οποία υποδηλώνει σχετικά καλή προσαρμογή ενώ προέκυψε Adjusted $R^2=0,5285$ και Predicted $R^2=0,4837$. Τέλος, και η τιμή του Adequate Precision που σχετίζεται με το λόγο του σήματος προς το θόρυβο είναι ικανοποιητική, αφού είναι μεγαλύτερη από τέσσερα (*Adequate Precision* = 5.8843).



Διάγραμμα 7: Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών του μεγέθους των νανοσυστημάτων

Η εξίσωση σε όρους κωδικοποιημένων παραγόντων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για συγκεκριμένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Από προεπιλογή, τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων κωδικοποιούνται ως +1 και τα χαμηλά επίπεδα κωδικοποιούνται ως -1. Η κωδικοποιημένη εξίσωση είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων συγκρίνοντας τους συντελεστές των παραγόντων

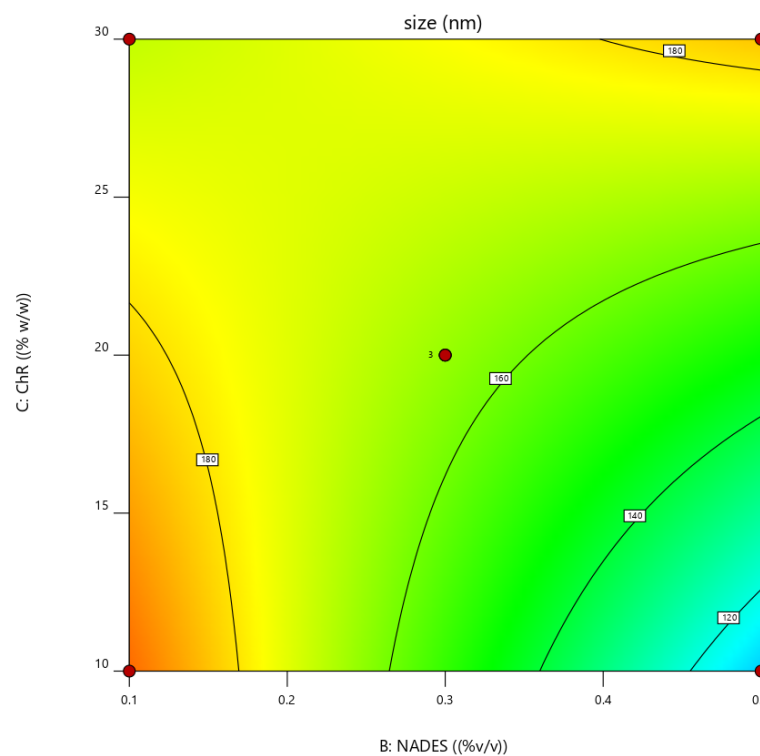
Η τελική εξίσωση που προκύπτει είναι :

$$Size = 95.5357 + 715.179 * A + -332.5 * B + -2.475 * C + 12.25 * B * C + -883.036 * A^2$$

Όπου


- A : περιεκτικότητα του διαλύματος σε αλγινικό
- B: περιεκτικότητα του διαλύματος σε NADES
- C : περιεκτικότητα του διαλύματος σε χρυσίνη

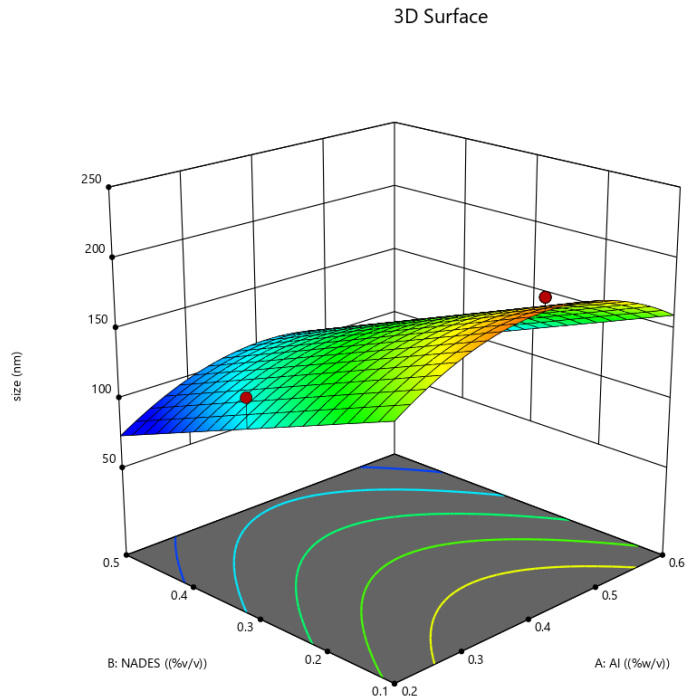
Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 86 207
 X1 = B: NADES
 X2 = C: ChR
 Actual Factor
 A: Al = 0.4



Διάγραμμα 8: Συσχέτιση μεγέθους σωματιδίων και περιεκτικότητας NaDES, ChR

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα μπορεί να υπολογιστεί το μέγεθος των σωματιδίων για συγκεκριμένη περιεκτικότητα αλγινικού Al=0.4% w/v. Για παράδειγμα ο συνδυασμός 0.3% v/v NaDES και 20% w/w CS, αναμένεται να δημιουργήσει σωματίδια 156 nm έναντι της τιμής 393.2 nm, η οποία υπολογίστηκε. Για άλλα ζεύγη τιμών το μοντέλο παρουσιάζει μικρότερη ή μεγαλύτερη ακρίβεια, εντός των ορίων του σφάλματος. Το διάγραμμα που ακολουθεί συνοψίζει το επιλεγμένο μοντέλο και καθιστά δυνατό τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων.

Factor Coding: Actual
 Design Points:
 ● Above Surface
 ○ Below Surface
 86  207
 X1 = A: Al
 X2 = B: NADES
 Actual Factor
 C: Chr = 10

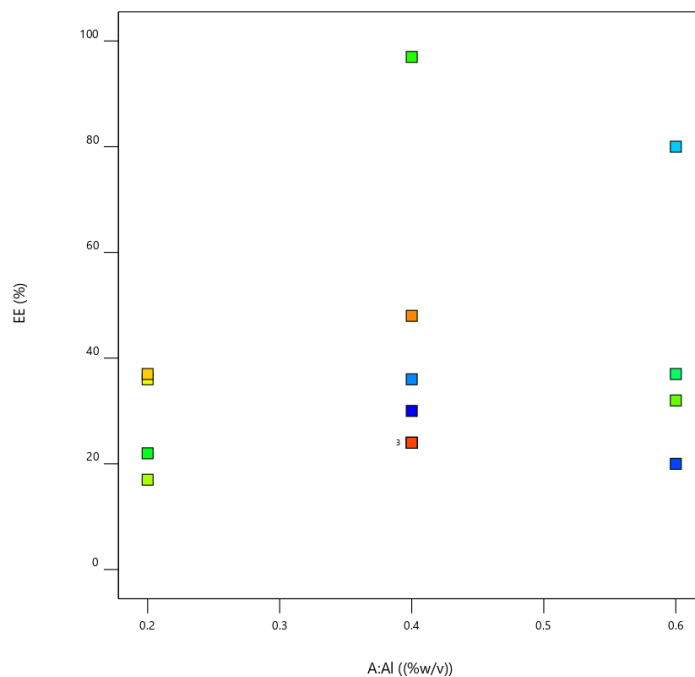


Διάγραμμα 9: Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης αλγινικού, NADES, χρυσίνης με το μέγεθος των σωματιδίων.

9.1.2.2 Απόδοση εγκλωβισμού των νανοσωματιδίων

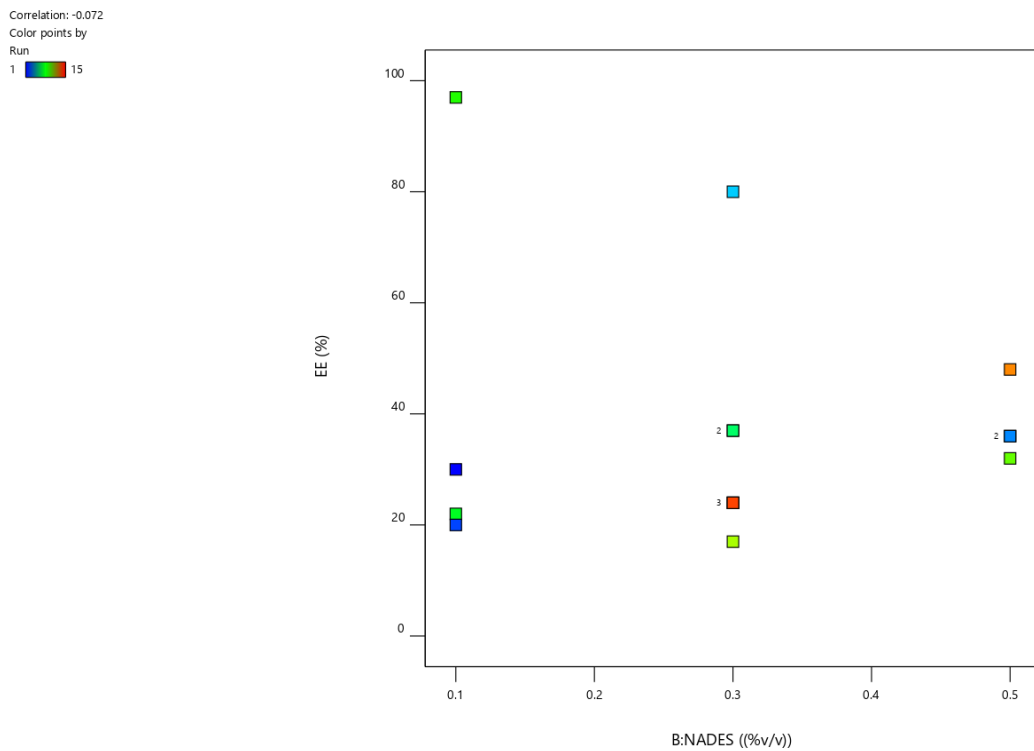
Αρχικά, αναλύεται η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στην απόδοση εγκλωβισμού της χρυσίνης στα παραγόμενα νανοσυστήματα αλγινικού.

Correlation: 0.240
 Color points by Run
 1  15



Διάγραμμα 10: Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος αλγινικού με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων

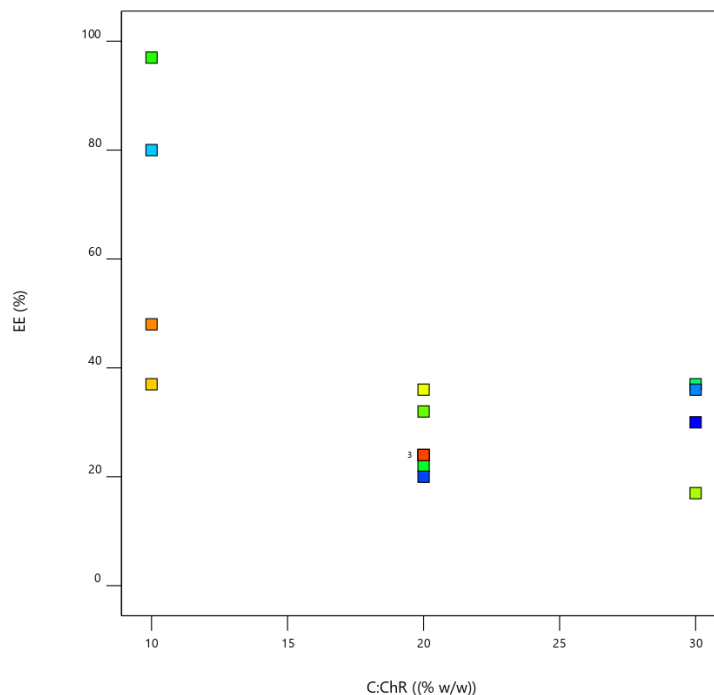
- Με βάση το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι οι μεσαίες περιεκτικότητες αλγινικού δίνουν την υψηλότερη απόδοση εγκλωβισμού στο 97%.



Διάγραμμα 11: Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NADES με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων

- Με βάση το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι οι χαμηλές περιεκτικότητες NADES δίνουν την υψηλότερη απόδοση εγκλωβισμού στο 97%

Correlation: -0.597
Color points by
Run
1 15



Διάγραμμα 12: Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος χρυσίνης με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων

- Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι οι χαμηλότερες περιεκτικότητες χρυσίνης (10% w/w) δίνουν τις μεγαλύτερες αποδόσεις εγκλωβισμού, ενώ οι υπόλοιπες αποδόσεις με περιεκτικότητες χρυσίνης 20 % w/w και 30 % w/w βρίσκονται σε εύρος 20-40 %.

Μελέτη απόκρισης

Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής επιλέγεται το reduced quadratic model, η εξίσωση του οποίου περιέχει τους όρους των ανεξάρτητων μεταβλητών, καθώς και πεπλεγμένους όρους αυτών. Από το μοντέλο αυτό αφαιρέθηκαν οι όροι AB , για να είναι το μοντέλο στατιστικά σημαντικό με p value = 0.0310, δηλαδή τιμή μικρότερη από την τιμή 0.05. Το μοντέλο παρουσιάζει τιμή F – value ίση με 4.59 υποδηλώνοντας ότι είναι στατιστικά σημαντικό, ενώ υπάρχει 3.10% πιθανότητα η υψηλή τιμή του F – value να οφείλεται σε θόρυβο.

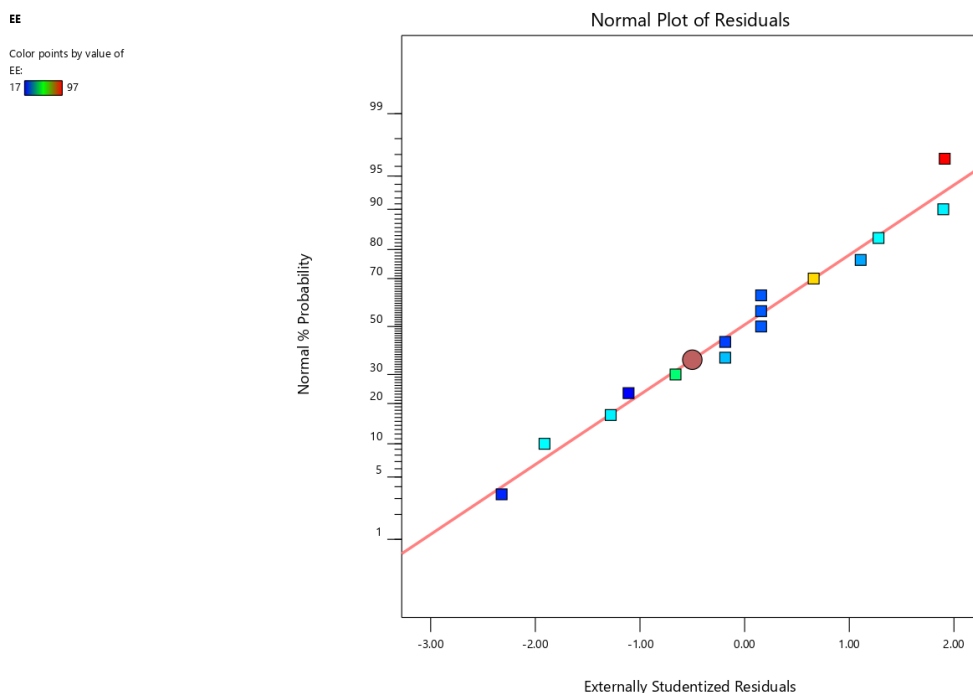
ANOVA για Reduced Quadratic model

Απόκριση 2: ΕΕ

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	5799.35	7	828.48	4.59	0.0310	significant
A-AI	406.13	1	406.13	2.25	0.1771	
B-NADES	36.13	1	36.13	0.2003	0.6680	
C-ChR	2520.50	1	2520.50	13.98	0.0073	
AC	132.25	1	132.25	0.7334	0.4201	
BC	756.25	1	756.25	4.19	0.0798	
B ²	182.00	1	182.00	1.01	0.3485	
C ²	1838.80	1	1838.80	10.20	0.0152	
Residual	1262.25	7	180.32			
Lack of Fit	1262.25	5	252.45			
Pure Error	0.0000	2	0.0000			
Cor Total	7061.60	14				

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

Το R^2 λαμβάνει την τιμή 0.8213, η οποία υποδηλώνει σχετικά καλή προσαρμογή ενώ προέκυψε Adjusted $R^2 = 0,6425$ και Predicted $R^2 = 0,2433$. Τέλος, και η τιμή του Adequate Precision που σχετίζεται με το λόγο του σήματος προς το θόρυβο είναι ικανοποιητική, αφού είναι μεγαλύτερη από τέσσερα (*Adequate Precision* = 6.6409).



Διάγραμμα 13: Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών του μεγέθους των νανοσυστημάτων

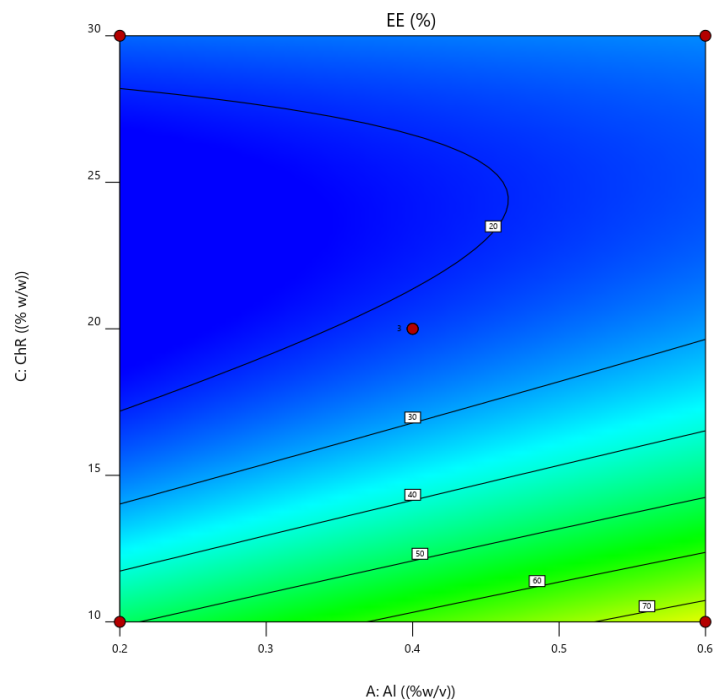
Συμπερασματικά, η συνολική εξίσωση παλινδρόμησης που προκύπτει για την παραπάνω απόκριση είναι η εξής:

$$EE\% = 169.438 + 93.125 * A + -253.125 * B + -11.5875 * C + -2.875 * AC + 6.875 * BC + 175 B^2 + 0.2225 * C^2$$

Όπου

- A : περιεκτικότητα του διαλύματος σε αλγινικό
- B: περιεκτικότητα του διαλύματος σε NADES
- C : περιεκτικότητα του διαλύματος σε χρυσίνη

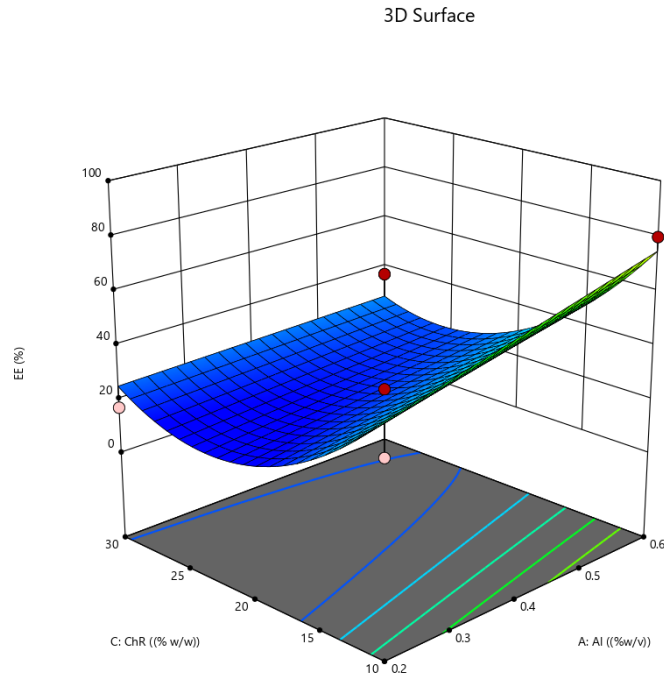
Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 17
 X1 = A: Al
 X2 = C: Chr
 Actual Factor
 B: NADES = 0.3



Διάγραμμα 14: Συσχέτιση απόδοσης εγκλεισμού και περιεκτικότητας αλγινικού και χρυσίνης

Με χρήση του παραπάνω διαγράμματος υπολογίζεται ενδεικτικά η απόδοση εγκλεισμού των σωματιδίων για συγκεκριμένη περιεκτικότητα NaDES = 0.3 % v/v. Το σημείο (20% w/w Chr, 0.4 % w/v Al), αντιστοιχίζεται σε τιμή EE% ίση με 24%. Η απόκλιση από το μέσο όρο είναι ελάχιστη.

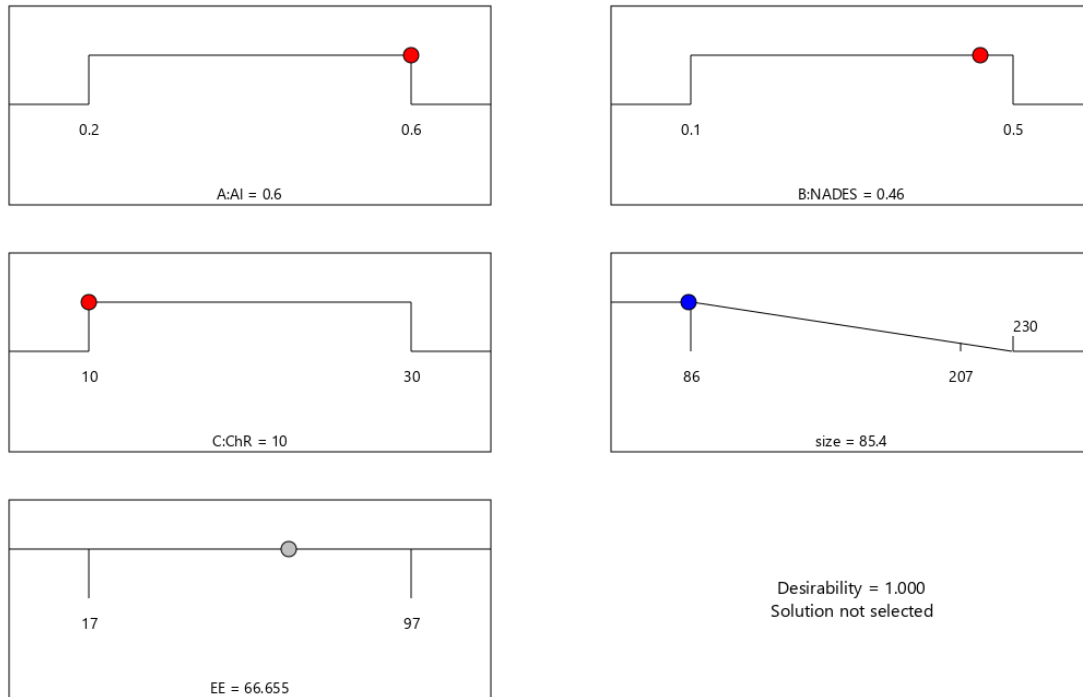
Factor Coding: Actual
 Design Points:
 ● Above Surface
 ○ Below Surface
 17 97
 X1 = A: Al
 X2 = C: ChR
 Actual Factor
 B: NADES = 0.3



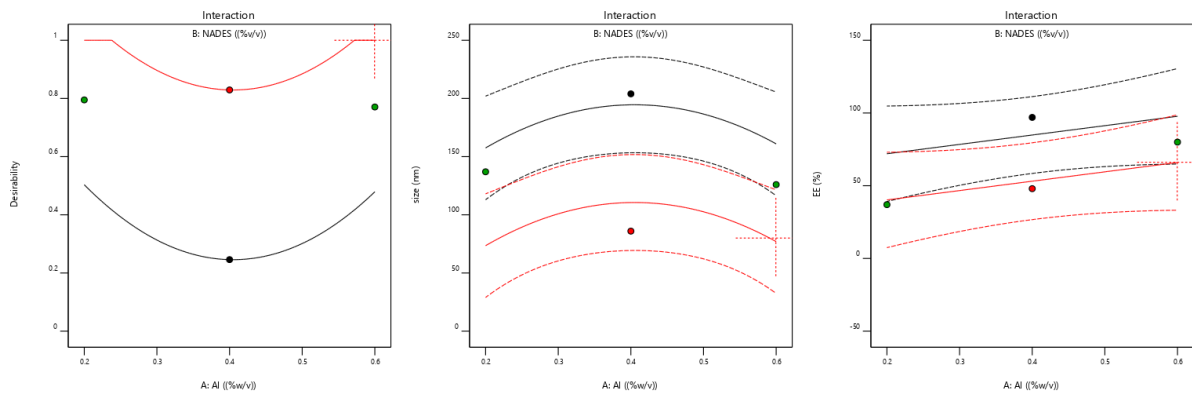
Διάγραμμα 15: Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης αλγινικού, NADES, χρυσίνης με την απόδοση εγκλωβισμού EE% των νανοσυστημάτων

9.2 Βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης των νανοσυστημάτων γίνεται με γνώμονα την ελαχιστοποίηση του μεγέθους και της κατανομής τους μεγέθους τους (size) και της απόδοσης εγκλωβισμού της χρυσίνης σε αυτά (EE%). Με βάση αυτά τα κριτήρια, η σύνθεση των νανοσυστημάτων αλγινικού με εγκλωβισμένη δραστική ένωση τη χρυσίνη βελτιστοποιείται για τις τιμές των ανεξαρτήτων μεταβλητών που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα μαζί με τις προβλεπόμενες τιμές των αποκρίσεων.



Σχήμα 2: Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών σύνθεσης νανοσυστημάτων και αναμενόμενες αποκρίσεις
Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι προβλέψεις του βέλτιστου μοντέλου σε συνάρτηση με τις περιεκτικότητες



Διάγραμμα 16: Σύνολο προβλέψεων για βέλτιστο size και EE% με την ελάχιστη περιεκτικότητα χρυσίνης 10 % w/w

Επόμενο στάδιο αποτέλεσε η σύνθεση νανοσωματιδίων με τα εξής χαρακτηριστικά:

Al(% w/v)	NADES(% v/v)	ChR (% w/w)
0.6	0.48	10

Πίνακας 11: Παράμετροι για σύνθεση βέλτιστων νανοσυστημάτων

Παρατηρήσεις-Σχόλια

- Για τις βελτιστοποιημένες τιμές που προέκυψαν στο Σχήμα 2 (Σχήμα 2: Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών σύνθεσης νανοσυστημάτων και αναμενόμενες αποκρίσεις) έγιναν οι στρογγυλοποιήσεις για την περιεκτικότητα χρυσίνης 10.15~10 % w/w και για την περιεκτικότητα του αλγινικού 0.599~0.6
- Επιλέχθηκε το πρώτο από τα 100 runs για βελτιστοποίηση.

Με βάση αυτές τις αναλογίες παρασκευάστηκαν τα 'βέλτιστα' νανοσυστήματα, των οποίων το μέγεθος και η απόδοση εγκλεισμού EE%, συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Size(nm)	EE%
138 ± 22.7	40±13.4

9.3 Επιβεβαίωση μοντέλου

Για περαιτέρω σύγκριση των αποκρίσεων πραγματοποιείται έλεγχος επιβεβαίωσης του μοντέλου (confirmation). Παρασκευάζονται δύο batch νανοσυστημάτων (confirmation runs) σύμφωνα με τις βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών που παρουσιάζονται στον Πίνακας 10, τα οποία αποτελούν και τα βέλτιστα νανοσυστήματα. Για τις ακόλουθες αποκρίσεις με χρήση του προγράμματος Design Expert προκύπτει πίνακας των αποκλίσεων των βελτίστων σωματιδίων από τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές των αποκρίσεων.

Επιβεβαίωση

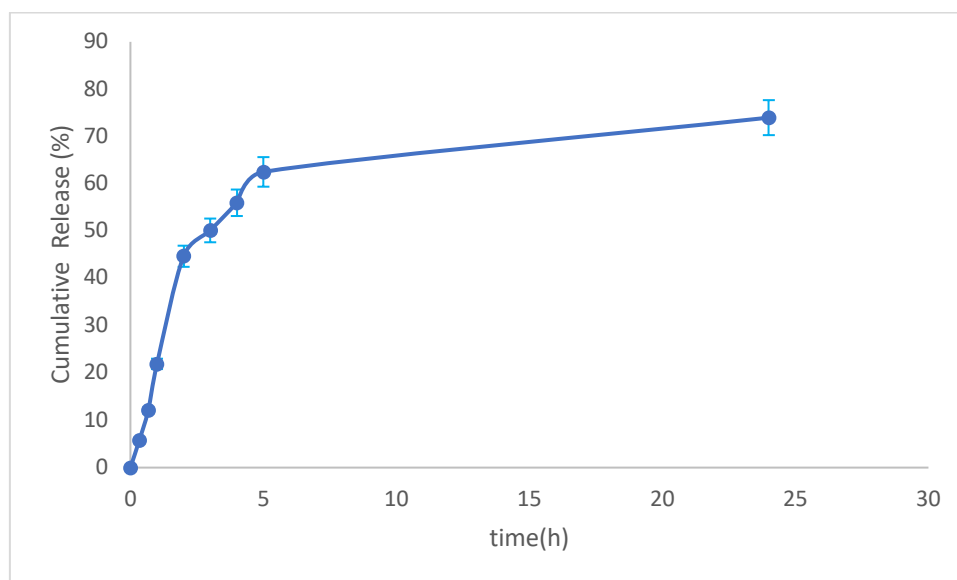
Πίνακας 12: Επιβεβαίωση εγκυρότητας των αποκρίσεων των νανοσυστημάτων για διάστημα εμπιστοσύνης 95%

Solution 1 of 100 Response	Predicted Mean	Predicted Median	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	95% PI high	Data Mean
Size (nm)	85.4	85.4	22.7247	2	23.9958	31.1176	139.682	138
EE%	66.655	66.655	13.4284	2	15.7191	29.4852	103.825	40

- Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα 13, τα σωματίδια τα οποία σχηματίστηκαν έχουν προδιαγραφές εντός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού.
- Συμπεραίνεται πως η διεργασία σύνθεσης των νανοσυστημάτων αλγινικού με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη χρυσίνη βελτιστοποιείται για τις τιμές των ανεξαρτήτων μεταβλητών του Πίνακα 13, με αποδεκτό μέγεθος νανοσωματιδίων και ικανοποιητική απόδοση εγκλωβισμού της χρυσίνης που υποδηλώνει την σταθερότητά τους

9.4 Μελέτη αποδέσμευσης *in vitro* της χρυσίνης από τα βέλτιστα νανοσυστήματα

Για την μελέτη της κινητικής αποδέσμευσης της χρυσίνης, εφαρμόζεται η μέθοδος της μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης. Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόζεται σε $pH=7.4$ και θερμοκρασία $37^{\circ}C$ για να επιτευχθεί η προσομοίωση στις συνθήκες του ανθρώπινου δέρματος. Το διάγραμμα το οποίο περιγράφει την αποδέσμευση σε σχέση με τον χρόνο παρουσιάζεται στο **διάγραμμα 17**.



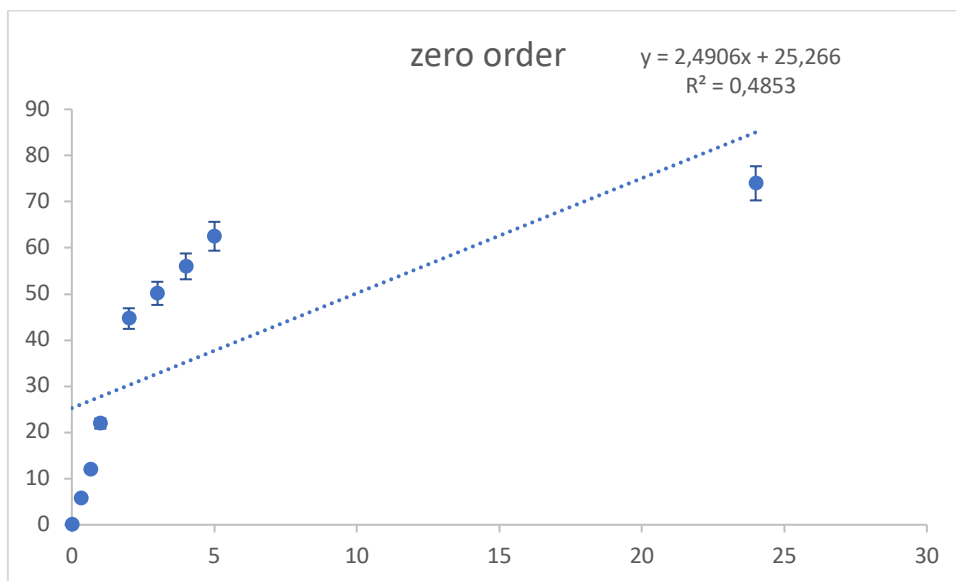
Διάγραμμα 17: Προφίλ αποδέσμευσης της χρυσίνης *in vitro* από τα νανοσυστήματα αλγινικού-NADES σε $pH=7.4$ σε θερμοκρασία $T = 37^{\circ}C$

Από το προκύπτον προφίλ αποδέσμευσης συμπεραίνεται πως αυτό είναι διφασικό, καθώς παρατηρούμε μία απότομη αποδέσμευση της χρυσίνης στις 5 ώρες (“Burst effect”), όπου το 63% της συνολικής ποσότητας της εγκλωβισμένης χρυσίνης αποδεσμεύεται, ενώ σταδιακά το ποσοστό αποδέσμευσής της αρχίζει να σταθεροποιείται σχηματίζοντας πλατό (“plateau”). Εν τέλει, σε συνολικό χρόνο μελέτης 24 ωρών, δηλαδή μία μέρα, αποδεσμεύεται αθροιστικά τελικά το 74% της συνολικής εγκλωβισμένης χρυσίνης.

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

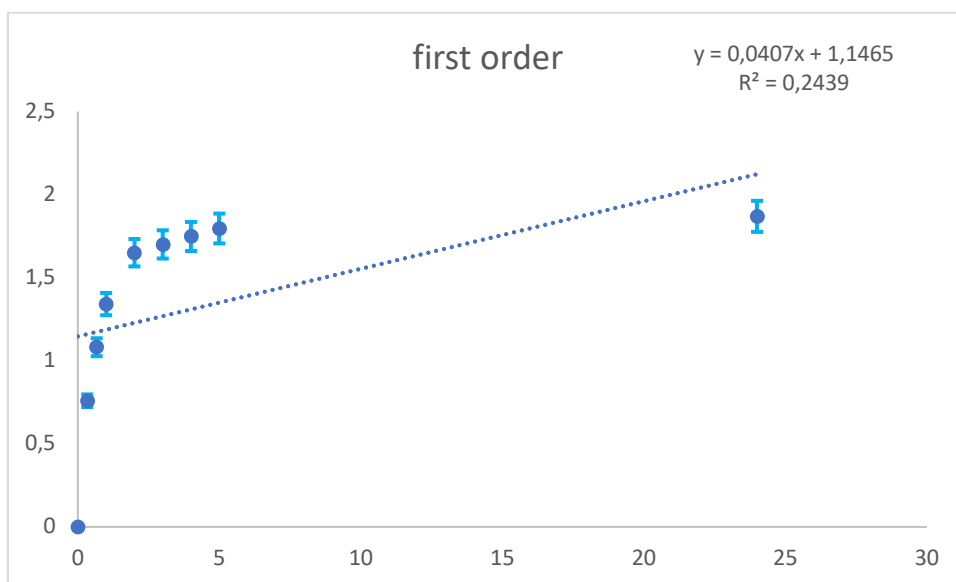
9.4.1 Κινητικά μοντέλα αποδέσμευσης

Κινητικό μοντέλο μηδενικής τάξης



Διάγραμμα 18 : Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της χρυσίνης *in vitro* από τα νανοσυστήματα αλγινικού –NADES στο κινητικό μοντέλο μηδενικής τάξης

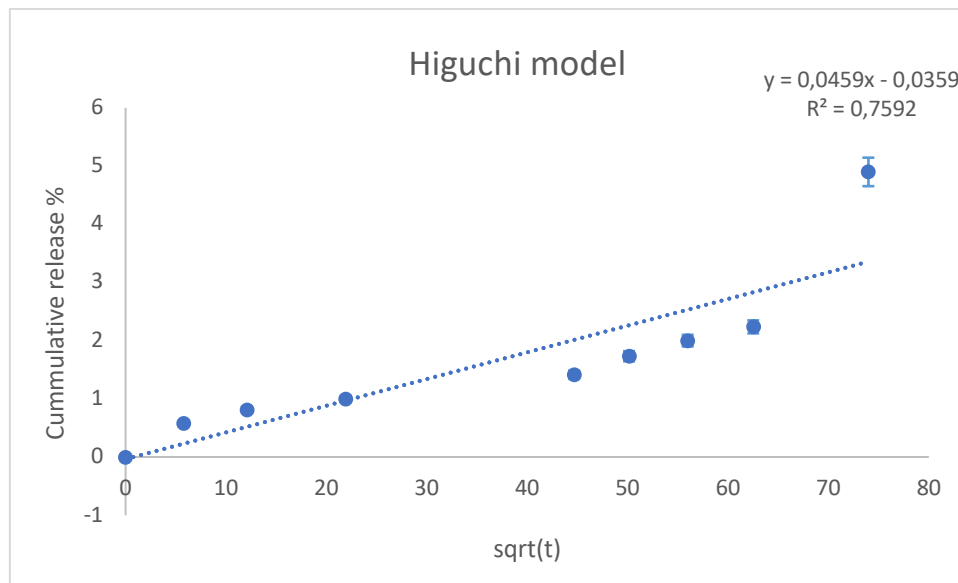
Κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης



Διάγραμμα 19: Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της χρυσίνης *in vitro* από τα νανοσυστήματα αλγινικού –NADES στο κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης

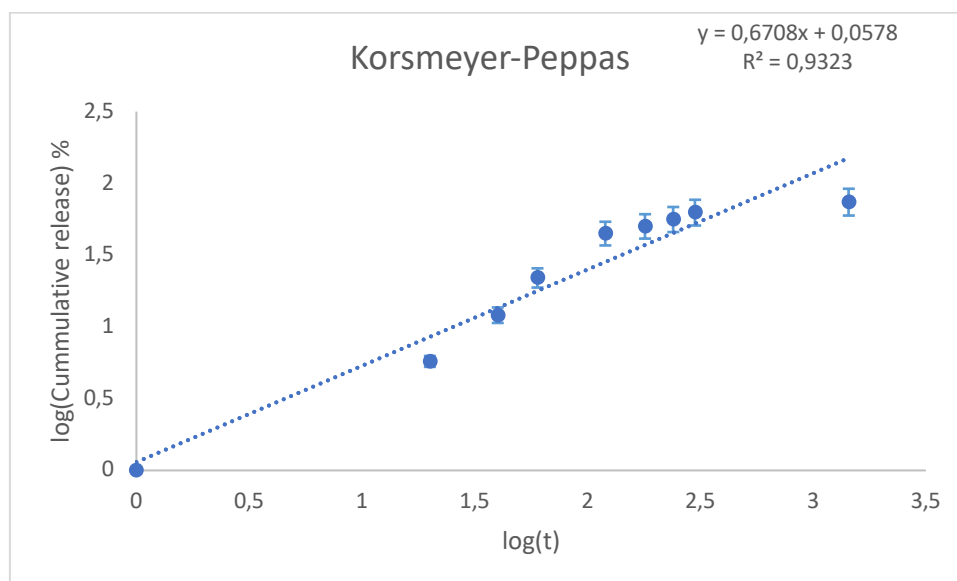
Τα μοντέλα μηδενικής και πρώτης τάξης δεν περιγράφουν καλά το σύστημα καθώς ο ρυθμός απελευθέρωσης δεν είναι σταθερός και δεν λαμβάνουν υπόψη τα δομικά χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των σωματιδίων. Ακολουθούν τα μοντέλα Higuchi και Korsmeyer-Peppas τα οποία αναμένεται να έχουν πολύ καλή προσαρμογή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

Κινητικό μοντέλο Higuchi



Διάγραμμα 20 :Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της χρυσίνης *in vitro* από τα νανোসυστήματα αλγινικού –NADES στο κινητικό μοντέλο Higuchi

Ημι-εμπειρικό κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas



Διάγραμμα 21 : Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της χρυσίνης *in vitro* από τα νανοσυστήματα αλγινικού –NADES στο ημί-εμπειρικό κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas

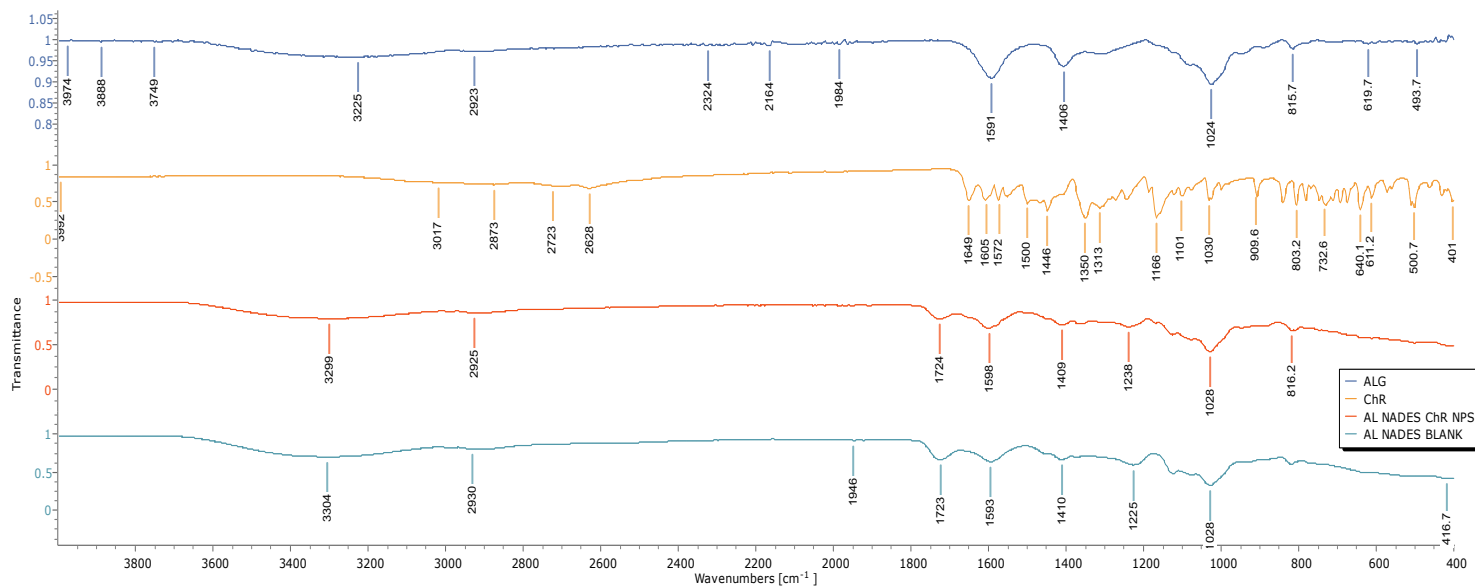
Παρατηρήσεις-σχόλια:

- Παρατηρούμε ότι τα κινητικά μοντέλα μηδενικής και πρώτης τάξης δεν παρουσιάζουν καλή προσαρμογή καθώς παρουσιάζουν συντελεστές γραμμικής συσχέτισης μακριά από τη μονάδα, $R^2 = 0.4853$ και $R^2 = 0.2439$, αντίστοιχα.
- Το μοντέλο Higuchi παρουσιάζει καλό συντελεστή γραμμικής συσχέτισης $R^2 = 0.7592$ καθώς προσεγγίζει τη μονάδα και περιγράφει κατάλληλα την κινητική αποδέσμευσης της χρυσίνης από τα νανοσυστήματα αλγινικού – NADES, η οποία σύμφωνα με το μοντέλο αυτό βασίζεται στον πρώτο νόμο διάχυσης του Fick.
- Το ημί-εμπειρικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas δίνει επίσης πολύ καλό συντελεστή γραμμικής συσχέτισης $R^2 = 0.9323$, του οποίου ο εκθέτης διάχυσης n υποδεικνύει το μηχανισμό της αποδέσμευσης. Η εξίσωση προσαρμογής είναι $y = 0.6708x + 0.0578$, επομένως έχουμε ότι $n=0,6708 > 0.45$. Έτσι, για την προκύπτουσα τιμή του εκθέτη διάχυσης που αντιστοιχεί στην κλίση της εξίσωσης προσαρμογής, επιβεβαιώνεται ότι κατά την αποδέσμευση της χρυσίνης από τα νανοσωματίδια κυριαρχεί ο μηχανισμός αποδέσμευσης της ανώμαλης μεταφοράς.

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

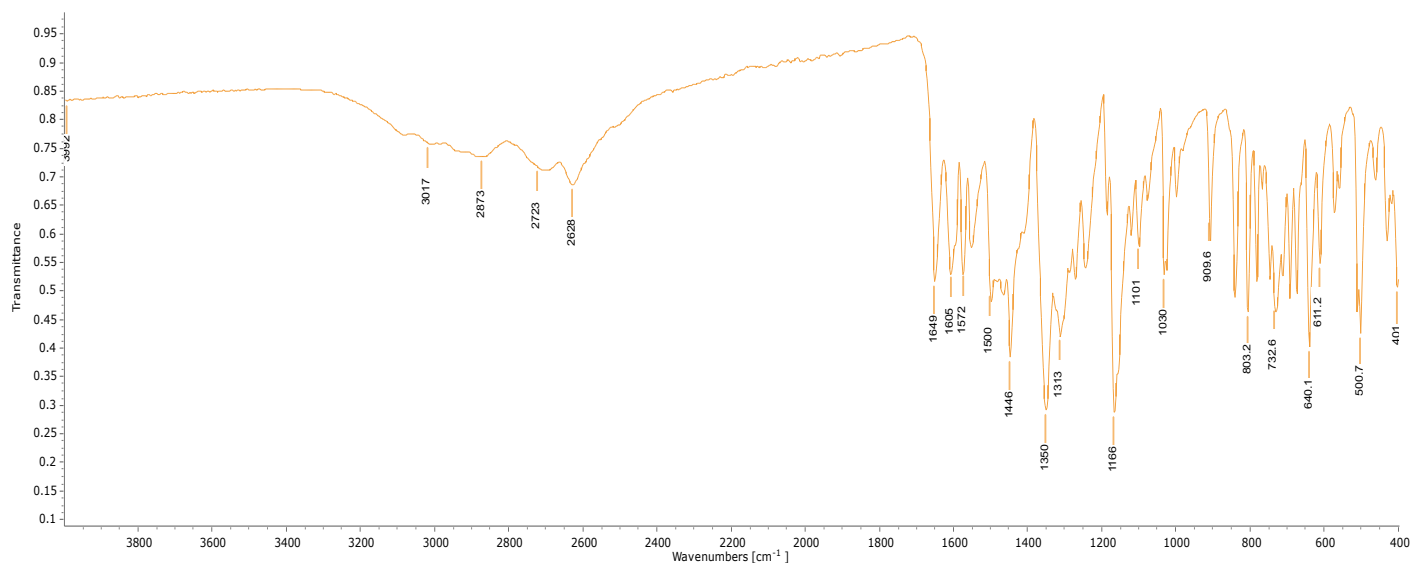
9.5.1 Διαγράμματα ATR/FT-IR

Για την μελέτη της δομής των βέλτιστων νανοσυστημάτων αλγινικού με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα την χρυσίνη πέρα από το φάσμα ATR/FT-IR λαμβάνονται και τα αντίστοιχα φάσματα των κενών νανοσυστημάτων, καθώς και το φάσμα της εγκλωβισμένης ένωσης.

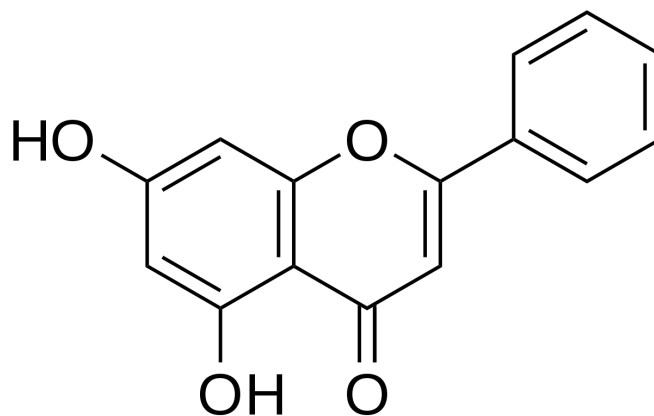


Διάγραμμα 22 : Στιβαγμένα φάσματα ATR/FT – IR της χρυσίνης, των βέλτιστων νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES με εγκλωβισμένη χρυσίνη, των βέλτιστων νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES χωρίς εγκλωβισμένη χρυσίνη και του αλγινικού νατρίου

Αρχικά, στο διάγραμμα 23 παρουσιάζεται το φάσμα FT-IR της χρυσίνης.



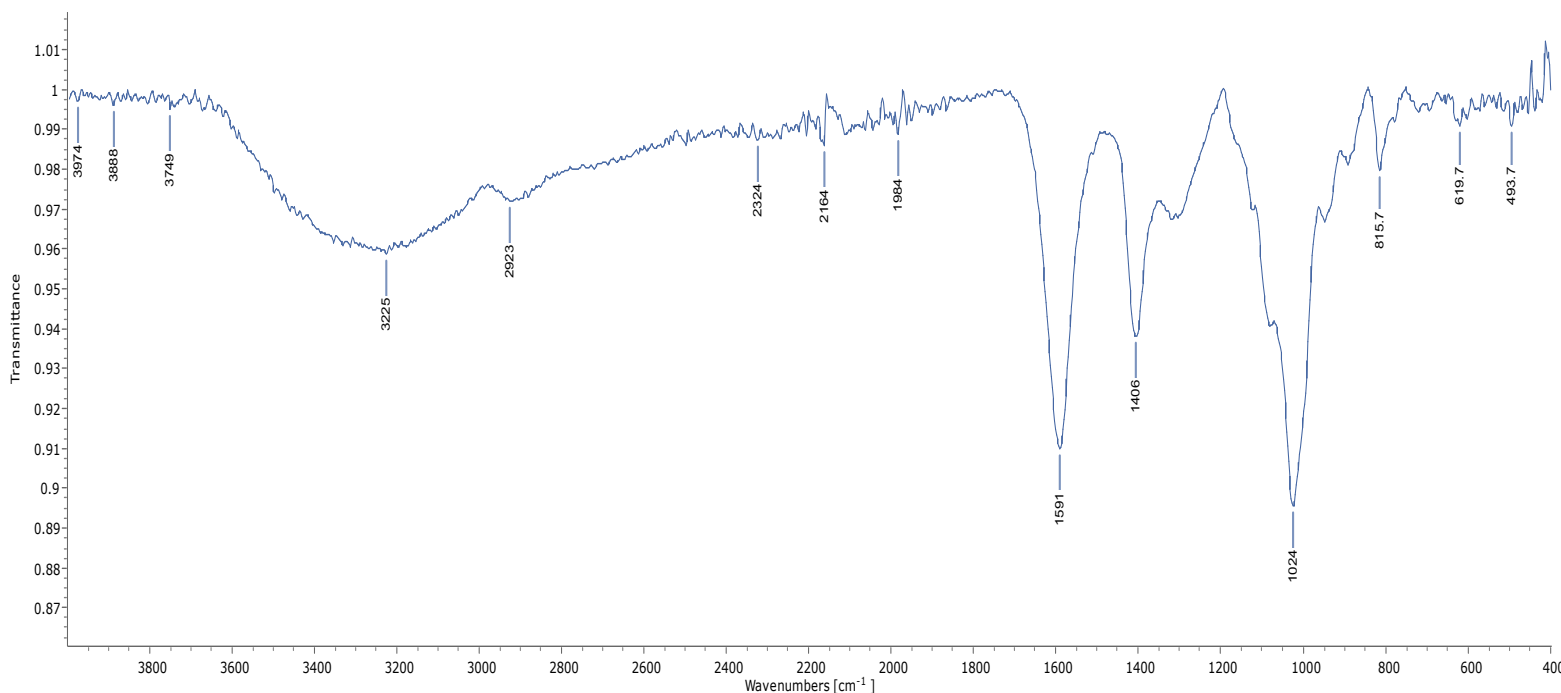
Διάγραμμα 23: Φάσμα ATR/FT – IR της χρυσίνης (5, 7 υδροξυφλαβόνη)



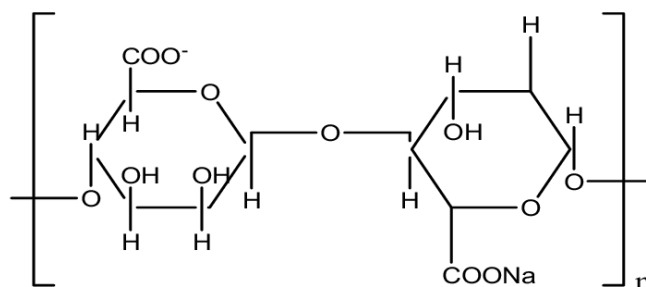
Εικόνα 20: Χημική δομή χρυσίνης (5, 7 υδροξυφλαβόνη)

Η εμφάνιση των μικρών κορυφών στα 3017, 2873, 2723 και 2628 cm^{-1} αποδίδονται σε τάσεις δόνησης C-H και C=C. Η χαρακτηριστική κορυφή στο μόριο της χρυσίνης που εμφανίζεται στα 1649 και 1605 cm^{-1} αντιστοιχούν σε C=O δονήσεις τάσης.[56,57]. Οι κορυφές στα 1572 και 1500 cm^{-1} εμφανίζονται λόγω τάσεων δόνησης C-C, ενώ η κορυφή στα 1350 cm^{-1} οφείλεται σε αρωματικές C-H δονήσεις κάμψης. Η εμφάνιση μικρής κορυφής στα 1166 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική λόγω της παρουσίας O-H δονήσεων κάμψης.

Στο διάγραμμα 24 παρουσιάζεται το φάσμα του αλγινικού νατρίου.



Διάγραμμα 24: Φάσμα ATR/FT – IR του αλγινικού νατρίου.



Εικόνα 21 : Δομή αλγινικού νατρίου.

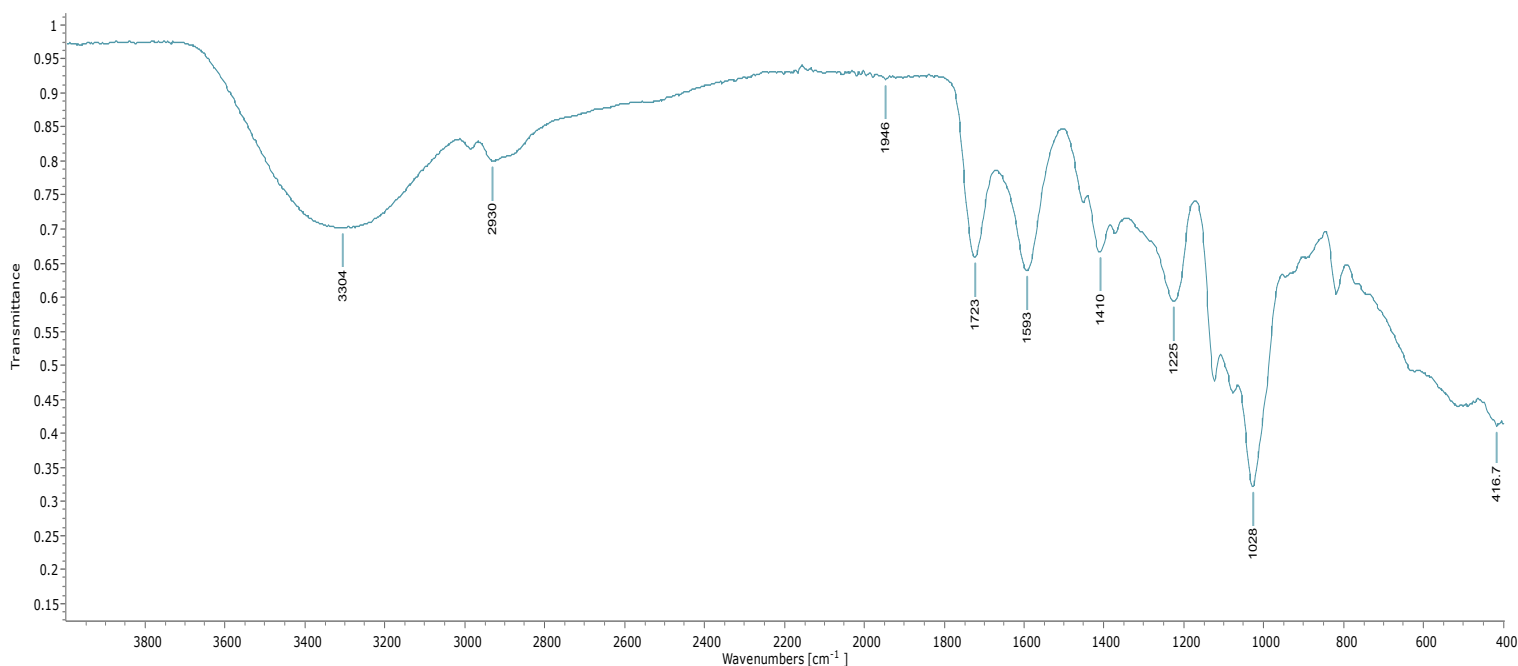
Η χαρακτηριστική κορυφή εμφανίζεται στα 3225 cm^{-1} , που αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών $O - H$. Η κορυφή στα 2923 cm^{-1} οφείλεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης των δεσμών $C - H$. Οι κορυφές στα 1591 cm^{-1} και στα 1406 cm^{-1} αντιστοιχούν στη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση τάσης των καρβονυλικών ομάδων, αντίστοιχα.

Τέλος, η κορυφή στα 1024 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης των δεσμών $C - O$.

Στο διάγραμμα 25 παρουσιάζεται το φάσμα των βέλτιστων κενών νανοσυστημάτων αλγινικού-NADES.



Διάγραμμα 25 : Φάσμα ATR/FT – IR του blank (αλγινικό με NADES χωρίς τον εγκλωβισμό της χρυσίνης)



Διάγραμμα 26 : Φάσμα ATR/FT – IR των βέλτιστων νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα την χρυσίνη

Συγκρίνοντας τα φάσματα FT-IR των εγκλεισμένων νανοσωματιδίων με το φάσμα FT-IR του αλγινικού νατρίου προκύπτει ο παρακάτω πίνακας με τις μετατοπίσεις στις χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης.

9.5.2 Μετατοπίσεις χαρακτηριστικών κορυφών απορρόφησης του αλγινικού νατρίου στα φάσματα FT-IR των εγκλεισμένων νανοσωματιδίων

Πίνακας 13: Μετατοπίσεις χαρακτηριστικών κορυφών απορρόφησης του αλγινικού νατρίου στα φάσματα FT-IR των εγκλεισμένων νανοσωματιδίων

Χαρακτηριστικές Ζώνες Απορρόφησης (cm^{-1})			
Δείγματα	AI	AI – NADES - ChR	AI – NADES (blank)
Δόνηση τάσης O-H	3225	3304	3299
Δόνηση τάσης C-H	2923	2930	2925
Ασύμμετρη δόνηση τάσης C-O-H	1590	1593	1598
Δόνηση τάσης C-O	1024	1028	1028

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα 13, στο φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη χρυσίνη παρατηρούνται μετατοπισμένες οι κορυφές που εμφανίζονται στα 3225 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 1590 cm^{-1} και 1024 cm^{-1} στο φάσμα του αλγινικού. Η μεγαλύτερη μετατόπιση παρατηρείται στις δονήσεις τάσεις O-H και εμφανίζεται στην

κορυφή 3225 cm^{-1} . Οι μετατοπίσεις αυτές είναι ενδεικτικές των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αλγινικού και χρυσίνης.

9.6 Αποτελέσματα Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διερχόμενης Δέσμης Ηλεκτρονίων TEM

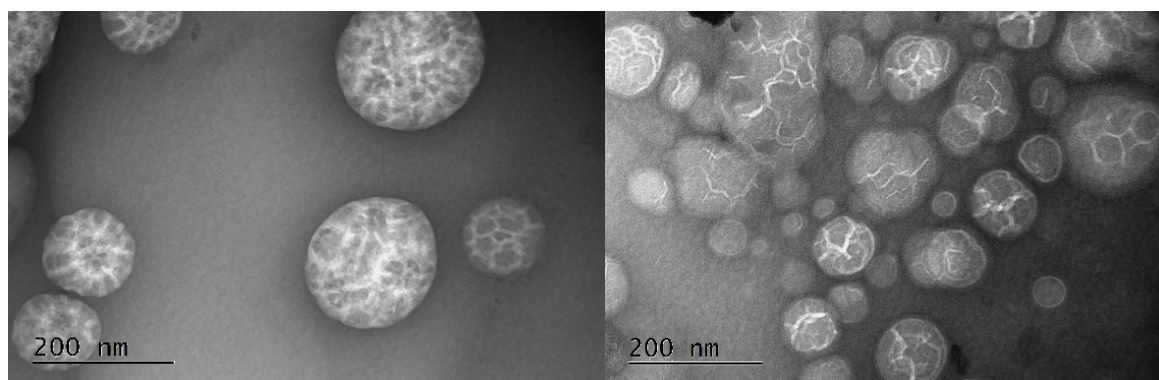
9.6.1 Αλγινικό-NADES με εγκλωβισμό χρυσίνης

Τα νανοσωματίδια αλγινικού με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα την χρυσίνη χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης. Εξετάστηκαν τα βέλτιστα δείγματα με τις αναλογίες που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα 15.

Al(% w/v)	NADES(% v/v)	ChR (% w/w)
0.6	0.48	10

Πίνακας 15: Παράμετροι για σύνθεση βέλτιστων νανοδομημάτων προς μορφολογικό χαρακτηρισμό μέσω του TEM

Τα μορφολογικά αποτελέσματα αποτυπώνονται στις παρακάτω εικόνες.



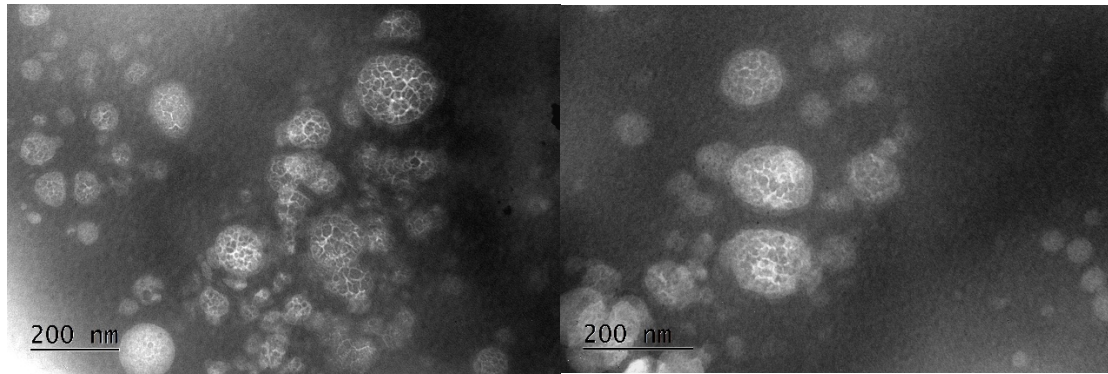
Εικόνα 22: Ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης σε νανοσωματίδια Al-NADES-ChR

9.6.2 Αλγινικό-NADES χωρίς εγκλωβισμό χρυσίνης (blank)

Τα νανοσωματίδια αλγινικού χωρίς τον εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα την χρυσίνη (blank) χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά μέσω του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διερχόμενης δέσμης ηλεκτρονίων. Τα μορφολογικά αποτελέσματα αποτυπώνονται στις παρακάτω εικόνες.

Πίνακας 14 : Παράμετροι για σύνθεση βέλτιστων νανοδομημάτων προς μορφολογικό χαρακτηρισμό μέσω του TEM

Al(% w/v)	NADES(% v/v)
0.6	0.48



Εικόνα 23: Ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης σε νανοσωματίδια Al –NADES.

Παρατηρήσεις-Σχόλια

- Στην εικόνα 22 γίνεται αντιληπτό το μέγεθος των νανοσωματιδίων σε κλίμακα 200 nm των βελτιστοποιημένων δειγμάτων.
- Διακρίνεται το σφαιρικό σχήμα των νανοσωματιδίων και η σχετικά ομοιόμορφη διασπορά στο διάλυμα αλλά και η ύπαρξη κάποιων συσσωματωμάτων.
- Στην εικόνα 23 όπου δεν έχουμε εγκλωβισμό χρυσίνης, παρατηρούμε σφαιρικό σχήμα και και η σχετικά ομοιόμορφη διασπορά στο διάλυμα αλλά και η ύπαρξη κάποιων συσσωματωμάτων.

12. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιείται ο εγκλωβισμός του φυσικού φλαβονοειδούς χρυσίνης σε πολυμερικά νανοσυστήματα και συγκεκριμένα σε καινοτόμα νανοσυστήματα AL-NADES NPs με τη μέθοδο της ιονοτροπικής πυκνωμάτων. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως πράσινη καθώς χρησιμοποιείται βαθέως ευτηκτικός διαλύτης NADES που αποτελείται από μίγμα γλυκόζης, γαλακτικού οξέος και νερού σε αναλογία 1:5:6,2.

Για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εγκλωβισμού της χρυσίνης στα νανοσυστήματα αλγινικού – NADES πραγματοποιείται πειραματικός σχεδιασμός Box Behnken δεκαπέντε πειραμάτων με χρήση του λογισμικού Design – Expert 12. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίζονται η περιεκτικότητα % w/v του διαλύματος του AL, η περιεκτικότητα % v/v του διαλύματος του χρησιμοποιούμενου NADES και η περιεκτικότητα % w/w του διαλύματος της χρησιμοποιούμενης ChR. Οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε συγκεντρώσεις αλγινικού 0.6 %w/v, 0.4% w/v και 0.2 %w/v, σε συγκεντρώσεις NADES 0.1% v/v ,0.3% v/v και 0.5% v/v και σε συγκεντρώσεις ChR 10% w/w ,20%w/w και 30%w/w.

Οι εξεταζόμενες αποκρίσεις (εξαρτημένες μεταβλητές) είναι το μέγεθος και η απόδοση εγκλωβισμού της χρυσίνης σε αυτά.

Η βελτιστοποίηση στοχεύει στην ελαχιστοποίηση του μεγέθους και την μεγιστοποίηση της απόδοσης εγκλωβισμού της χρυσίνης στα νανοσωματίδια. Οι βέλτιστες τιμές που προκύπτουν από την πειραματική μελέτη είναι 0.6 % w/v AL , 0.46 % v/v NADES και 10 % w/w ChR. Ταυτόχρονα, για τις βέλτιστες αυτές τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών προκύπτουν και οι προβλεπόμενες από το στατιστικό μοντέλο τιμές των αποκρίσεων. Παρασκευάζονται, λοιπόν, νανοσυστήματα αλγινικού – NADES σύμφωνα με τις βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών, οπότε και επιβεβαιώνονται οι προβλεπόμενες τιμές των αποκρίσεων για ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Οι πειραματικές τιμές των αποκρίσεων παρατίθενται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 15: Μέγεθος και απόδοση εγκλωβισμού νανοσυστημάτων

Size (nm)	EE (%)
138±22.7	40±13.4

Ακολούθως, παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια αλγινικού-NADES με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη χρυσίνη και χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος του. Παρακάτω, παρουσιάζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την μέθοδο Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).

- ❖ Τα νανοσωματίδια με περιεκτικότητα χρυσίνης 10 % w/w, την μικρότερη δηλαδή ποσότητα προς εγκλωβισμό χρυσίνης εμφανίζουν το μικρότερο μέγεθος ανάμεσα σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν με μέγεθος 86.3nm-204.4nm.

Για την μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

- ❖ Τα νανοσωματίδια με περιεκτικότητα αλγινικού 0.6 % w/v, παρουσιάζουν το μικρότερο δείκτη πολυδιασποράς PDI, ο οποίος κυμαίνεται από 0.501-0.532.

- ❖ Το μέγεθος που προσδιορίστηκε μέσω DLS είναι εμφανώς μεγαλύτερο από το μέγεθος που μετρήθηκε με το NTA, το οποίο είναι ακριβέστερη τεχνική με την ίδια αρχή μεθόδου.
- ❖ Τα νανοσωματίδια αλγινικού-NADES με εγκλωβισμένη χρυσίνη παρουσίασαν ισχυρά θετικό ζ-δυναμικό και στα περισσότερα δείγματα εμφάνισαν ζ-δυναμικό κοντά στα 30 mV.

Επίσης, όσον αφορά την απόδοση εγκλωβισμού EE% των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν, τα δείγματα στα οποία φορτώθηκε μικρότερη ποσότητα χρυσίνης 10% w/w παρουσίασαν τις μεγαλύτερες αποδόσεις εγκλωβισμού στα 97%, 80% και 48%.

Η μελέτη της αποδέσμευσης της χρυσίνης από τα βέλτιστα νανοσυστήματα αλγινικού – NADES *in vitro* με τη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης – διάχυσης σε συνθήκες προσομοίωσης του ανθρώπινου δέρματος οδηγεί σε διφασικό προφίλ αποδέσμευσής της. Ειδικότερα, παρουσιάζεται ταχεία αποδέσμευση του 63% της εγκλωβισμένης χρυσίνης μετά τις 5 ώρες, με σχηματισμό ενός ‘plateau’ στο συνολικό χρόνο των 24h, όπου αποδεσμεύεται το 74% της εγκλωβισμένης χρυσίνης. Το κινητικό μοντέλο που περιγράφει κατάλληλα την κινητική αποδέσμευσης της χρυσίνης είναι το μοντέλο Higuchi, γεγονός που υποδηλώνει πως η αποδέσμευσή της βασίζεται στη διάχυση που υπακούει στον πρώτο νόμο του Fick. Παράλληλα, καλή γραμμική συσχέτιση εμφανίζει το ημι-εμπειρικό κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas, όπου η τιμή του εκθέτη n επιβεβαιώνει το μηχανισμό αποδέσμευσης της ανώμαλης μεταφοράς.

Ακόμη επιβεβαιώθηκε ο επιτυχής εγκλωβισμός της χρυσίνης στα νανοσωματίδια αλγινικού-NADES μέσω των αντίστοιχων φασμάτων FT-IR. Οι χαρακτηριστικές κορυφές της ChR δεν εμφανίζονται στα νανοσυστήματα με εγκλωβισμένη στη ChR. Η επικάλυψη των κορυφών υποδηλώνει τον επιτυχή εγκλωβισμό της.

Τέλος, τα νανοσωματίδια μελετήθηκαν με βάση την μορφολογία τους με τη χρήση της μεθόδου της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης (TEM). Στις εικόνες που παρατέθηκαν, εμφανίζεται το σφαιρικό σχήμα των βέλτιστων νανοσωματιδίων και η ομοιόμορφη διασπορά στο διάλυμα.

11. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

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

- Μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων των νανοσυστημάτων με χρήση της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) και της θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA).
- Αξιολόγηση των βιολογικών δράσεων των νανοσυστημάτων με διάφορες βιοδοκιμές
- Μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης των νανοσωματιδίων αλγινικού- $CaCl_2$ που έχουν εγκλωβιστεί με χρυσίνη και σύγκριση με τα νανοσωματίδια αλγινικού-NADES.
- Σύγκριση νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES με νανοσωματίδια αλγινικού- $CaCl_2$ με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα τη χρυσίνη με τη μελέτη δομής μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR).
- *In vitro* αξιολόγηση των νανοσωματιδίων και κυτταροτοξική δράση τους.

Συμμετοχές σε συνέδρια

I. Pitterou, **M. Akritopoulos**, I. Mela, A. Tzani, C. Fountzoula, A. Kriebardis, A. Detsi, "Green synthesis of chrysin-loaded alginate nanoparticles using natural deep eutectic solvent (NADES) as crosslinker", 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, 9-11 March, 2023, Patra, Greece



GREEN SYNTHESIS OF CHRYSIN-LOADED ALGINATE NANOPARTICLES USING NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENT (NADES) AS CROSSLINKER



Ioanna Pitterou*, Michail Akritopoulos*, Ioanna Mela*, Andromachi Tzani*, Christina Fountzoula**, Anastasios Kriebardis**, Anastasia Detsi¹

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

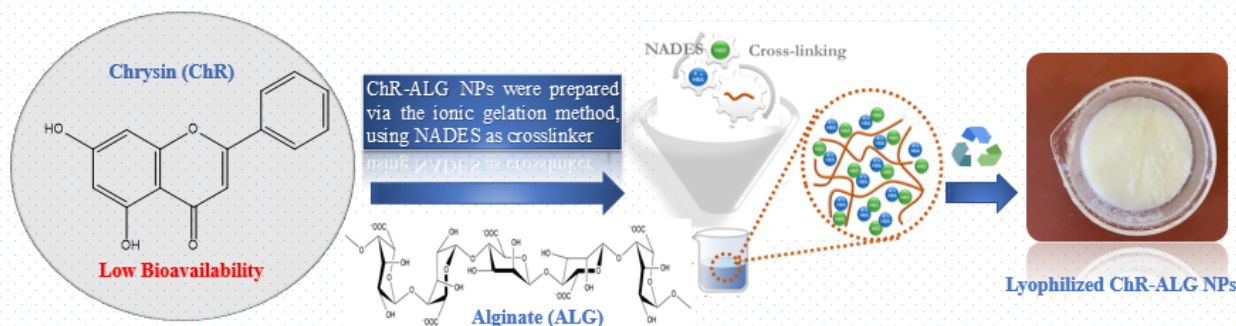
**Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology, Department of Biomedical Sciences, University of West Attica, Ag. Spyridonos, 12243 Egaleo, Athens, Greece

¹ E-mail: adetsi@chemeng.ntua.gr

Introduction

Chrysin (ChR) is a flavone that is found in several plants and in honeycomb and possesses various biological activities. However, its **low solubility** means it has poor bioavailability, which must be resolved to enable its pharmaceutical applications. One of the presented **solutions to increase the bioavailability** of compounds is the nanoencapsulation. Besides, in order to improve the efficiency and stability of nanostructures, it is also essential to find adequate materials. Biopolymers, such as polysaccharides, are one of the possibilities due their distinct advantages of biodegradability, edibility and lack of toxicity. **Alginate (ALG)** is a hydrophilic polysaccharide extracted from marine brown algae of the Phaeophyta family. It is a linear biopolymer composed by two uronic acids, 1,4-linked-β-D-mannuronic acid (M) and α-L-guluronic acid (G), being carboxylic groups from uronic acids responsible by their negative charge. This biopolymer is a non-toxic, biocompatible, biodegradable and presents mucoadhesive properties, being approved for pharmaceutical and food applications. **Deep Eutectic Solvents (DES)** are mixtures of two or more components, a hydrogen bond acceptor and a hydrogen bond donor, with a low-temperature eutectic point. When the components of the DES are naturally occurring compounds, the solvents are characterized as **Natural Deep Eutectic Solvents (NADES)**. The use of NADESs has emerged as a new smart strategy to replace toxic, non-biodegradable, and flammable organic solvents. In the present work, **alginate nanoparticles loaded with chrysin (ChR-ALG NPs)** were prepared via the ionic gelation method, using **Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as crosslinker**.

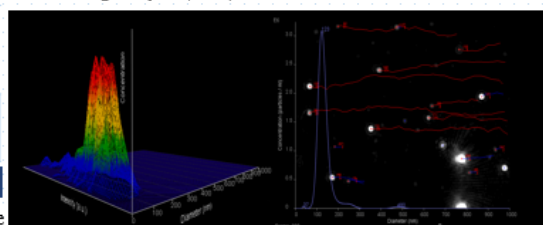
Methodology



Results & Discussion

✓ The ChR-ALG NPs were characterized using FT-IR, UV-Vis, DLS and Nanoparticle tracking analysis (NTA).

Sample	Size (nm)	Polydispersity Index (Pdl)	ζ-potential (mV)	Concentration (particles/mL)	Encapsulation efficiency (%)
ChR-ALG NPs	125.6 ± 3.2	0.527 ± 0.023	-27.2 ± 1.1	2.62e+07 ± 5.16e+06	80



Conclusions

- ✓ In this work has been demonstrated that encapsulation of ChR in ALG NPs can be achieved via ionic gelation method using NADES as crosslinker, obtaining encapsulation efficiency value of 80%.
- ✓ The NPs presented nanoscale size (125.6±3.2 nm), good size dispersion and satisfactory stability in suspension.

References

Tzani, A., Karadenizliou, M.A., Tsiaka, E., Krihi, E., Zoumpoulakis, P., Detsi, A. "Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications and Toxicity", Chapter 2: Exploring the Role of Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) Towards the Valorization of Food Processing Industry Waste. Nova Science Publishers, 19-51 (2022)

Acknowledgements

I.F. 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-5111934), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY).



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



Βιβλιογραφία

- 1) Δεμέτζος Κ. Σύγχρονη Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία, Επιστημονικές Εκδόσεις Παριζιάνου 2022 σελίδες 8-11, 117-120
- 2) Nanotechnology, National geographic
- 3) Sanvicens, N and Marco, MP. (2008). Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine. Trends Biotechnol 26: 425-433.
- 4) George, A., Shah, P.A. and Shrivastav, P.S., 2019. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. International journal of pharmaceutics, 561, pp.244-264.
- 5) Lee, K. Y., & Mooney, D. J. 2012. Alginate: properties and biomedical applications. Progress in polymer science, 37(1), 106–126.
- 6) Babu, P.V.A. and Liu, D., 2009. Flavonoids and cardiovascular health. In Complementary and alternative therapies and the aging population (pp. 371-392). Academic Press.
- 7) Mani, R. and Natesan, V., 2018. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. Phytochemistry, 145, pp.187-196.
- 8) Taiz, L. and Zeiger, E. 2002 Plant Physiology (Third Edition). Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, 67-86.
- 9) National Center for Biotechnology Information 2023. PubChem Compound Summary for CID 5281607, Chrysin. Retrieved June 28, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chrysin>.
- 10) Nivens, David & Ohman, Dennis & Williams, Jessica & Franklin, Michael. (2001). Role of Alginate and Its O Acetylation in Formation of Pseudomonas aeruginosa Microcolonies and Biofilms. Journal of bacteriology.
- 11) Sabra, W., and A. P. Zeng, 2009."Alginates: Biology and Applications." 153-173.
- 12) Δεμέτζος Κ., 2022, Σύγχρονη Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία, Επιστημονικές Εκδόσεις Παριζιάνου, σελίδες 137-144
- 13) Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. Biophysical reviews, 8(4), 409–427.
- 14) Dragovic, R.A., Gardiner, C., Brooks, A.S., Tannetta, D.S., Ferguson, D.J., Hole, P., Carr, B., Redman, C.W., Harris, A.L., Dobson, P.J. and Harrison, P., 2011. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 7(6), pp.780-788.
- 15) Foreman-Ortiz, I.U., Ma, T.F., Hoover, B.M., Wu, M., Murphy, C.J., Murphy, R.M. and Pedersen, J.A., 2022. Nanoparticle tracking analysis and statistical mixture distribution analysis to quantify nanoparticle-vesicle binding. Journal of Colloid and Interface Science, 615, pp.50-58.
- 16) Kasala, E.R., Bodduluru, L.N., Madana, R.M., Gogoi, R. and Barua, C.C., 2015. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. Toxicology letters, 233(2), pp.214-225.
- 17) Nøkling-Eide, K., Tan, F., Wang, S., Zhou, Q., Gravdahl, M., Langeng, A.M., Bulone, V., Aachmann, F.L., Sletta, H. and Arlov, Ø., 2023. Acid preservation of cultivated brown algae *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta* and characterization of extracted alginate and cellulose. Algal Research, 71, p.103057.
- 18) Paques, J.P., van der Linden, E., van Rijn, C.J. and Sagis, L.M., 2014. Preparation methods of alginate nanoparticles. Advances in colloid and interface science, 209, pp.163-171.

- 19) Zeinali, M., Rezaee, S.A. and Hosseinzadeh, H., 2017. An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, pp.998-1009.
- 20) Naz, S., Imran, M., Rauf, A., Orhan, I.E., Shariati, M.A., Shahbaz, M., Qaisrani, T.B., Shah, Z.A., Plygun, S. and Heydari, M., 2019. Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. *Life sciences*, 235, p.116797.
- 21) Missassi, G., dos Santos Borges, C., de Lima Rosa, J., Villela e Silva, P., da Cunha Martins, A., Barbosa, F. and De Grava Kempinas, W., 2017. Chrysin administration protects against oxidative damage in varicocele-induced adult rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- 22) Gan, RY, Chan, CL, Yang, QQ, Li, HB, Zhang, D, Ge, YY, Gunaratne, A, Ge, J & Corke, H 2018, Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. in *Sprouted Grains: Nutritional Value, Production, and Applications*. Elsevier, pp. 191-246
- 23) Nosrati, H., Rakhshbahar, A., Salehiabar, M., Afroogh, S., Manjili, H.K., Danafar, H. and Davaran, S., 2018. Bovine serum albumin: an efficient biomacromolecule nanocarrier for improving the therapeutic efficacy of chrysin. *Journal of Molecular Liquids*, 271, pp.639-646.
- 24) Zheng, H., Li, S., Pu, Y., Lai, Y., He, B. and Gu, Z., 2014. Nanoparticles generated by PEG-Chrysin conjugates for efficient anticancer drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(3), pp.454-460.
- 25) Crucho, C.I. and Barros, M.T., 2017. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*, 80, pp.771-784.
- 26) Thiye, V.C., Karikachery, A.R., Çakılka, P., Farooq, U., Genedy, H.H., Kaeokhamloed, N., Phan, D.H., Rezwan, R., Tezcan, G., Roger, E. and Katti, K.V., 2022. Green nanotechnology—an innovative pathway towards biocompatible and medically relevant gold nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 70, p.103256.
- 27) Hollmann, F. and Fernández, F.J.H., *Ionic Liquids: Green Solvents for Chemical Processing*.
- 28) Yu, D., Xue, Z. and Mu, T., 2022. Deep eutectic solvents as a green toolbox for synthesis. *Cell Reports Physical Science*, p.100809.
- 29) Smith, E.L., Abbott, A.P. and Ryder, K.S., 2014. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical reviews*, 114(21), pp.11060-11082.
- 30) Roda, Ana & Santos, Filipa & Matias, Ana & Paiva, Alexandre & Duarte, Ana. (2020). Design and Processing of Drug Delivery Formulations of Therapeutic Deep Eutectic Systems for Tuberculosis. *The Journal of Supercritical Fluids*. 1
- 31) Weng, J., Tong, H.H. and Chow, S.F., 2020. In vitro release study of the polymeric drug nanoparticles: development and validation of a novel method. *Pharmaceutics*, 12(8), p.732.
- 32) Bao, Q., Zou, Y., Wang, Y., Kozak, D., Choi, S. and Burgess, D.J., 2019. Drug release testing of long-acting intrauterine systems. *Journal of Controlled Release*, 316, pp.349-358.
- 33) Coats, A. W.; Redfern, J. P. (1963). "Thermogravimetric Analysis: A Review". *Analyst*. 88 (1053): 906–924
- 34) Singh, M. K., Singh, A. 2022, Chapter 14 - Nuclear magnetic resonance spectroscopy, In *The Textile Institute Book Series, Characterization of Polymers and Fibres*, Woodhead Publishing, Pages 321-339
- 35) Eid, M.M., 2022. Characterization of Nanoparticles by FTIR and FTIR-Microscopy. In *Handbook of Consumer Nanoproducts* (pp. 1-30). Singapore: Springer Singapore.
- 36) Shukla, A.K. and Iravani, S. eds., 2018. *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles*. Elsevier.
- 37) Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H. and Atyabi, F., 2011. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International journal of nanomedicine*, pp.877-895.

- 38) Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J. and Farokhzad, O.C., 2016. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical reviews*, 116(4), pp.2602-2663.
- 39) Huang, X. and Brazel, C.S., 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 73(2-3), pp.121-136.
- 40) Huang, X. and Brazel, C.S., 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 73(2-3), pp.121-136.
- 41) Mircioiu, C., Voicu, V., Anuta, V., Tudose, A., Celia, C., Paolino, D., Fresta, M., Sandulovici, R. and Mircioiu, I., 2019. Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 11(3), p.140.
- 42) Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L. and Chowdhury, P., 2010. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), pp.217-223.
- 43) Simon, J., & Peppas, N. A. (2011). An *in vitro* diffusion cell system for evaluating the performance of drug delivery systems. *Chemical Engineering Science*, 66(22), 5426-5432
- 44) Lin, W., Li, J., Ma, Y., Li, Z., Li, H., Zhang, X. & Yang, V. C. (2012). *In vitro* release kinetics and cytotoxicity of paclitaxel-loaded microspheres prepared by emulsion solvent evaporation method. *Journal of Controlled Release*, 160(1), 37-44
- 45) Chandran, S. S., Kandaswamy, P., Thambiraj, S., & Elango, K. (2017). Development and evaluation of nanostructured lipid carriers of glimepiride by using *in vitro* release diffusion membrane method. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 40, 86-92.
- 46) Liu, P., Chen, G. and Zhang, J., 2022. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules*, 27(4), p.1372.
- 47) Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F. and Alcudia, A., 2020. Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. *Nanomaterials*, 10(7), p.1403.
- 48) Markowicz-Piasecka, M. and Mikiciuk-Olasik, E., 2016. Dendrimers in drug delivery. In *Nanobiomaterials in Drug Delivery* (pp. 39-74). William Andrew Publishing.
- 49) Noyes, A.A. and Whitney, W.R., 1897. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 19(12), pp.930-934.
- 50) Junghanns, J.U.A. and Müller, R.H., 2008. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *International journal of nanomedicine*, 3(3), pp.295-310.
- 51) Katan, M.B. & Hollman, Peter. (1998). Dietary flavonoids and cardiovascular disease.. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases* 8 (1998) 1-4.
- 52) Middleton, Jr., MD, E., 1996. Biological properties of plant flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmacognosy*, 34(5), pp.344-348.
- 53) Kopustinskiene, D.M., Jakstas, V., Savickas, A. and Bernatoniene, J., 2020. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), p.457.
- 54) Paul, W. and Sharma, C.P., 2020. Inorganic nanoparticles for targeted drug delivery. *Biointegration of medical implant materials*, pp.333-373.
- 55) Dehghani, M., Gulvin, S.M., Flax, J. and Gaborski, T.R., 2020. Systematic evaluation of PKH labelling on extracellular vesicle size by nanoparticle tracking analysis. *Scientific Reports*, 10(1), p.9533.
- 56) Li, H., Zhao, C., Wang, Z. and Xing, J., 2023. Investigation of chrysin inhibition on free radical photopolymerization during the preparation of nanogels under green LED irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 438, p.114518.
- 57) Sundaraganesan, N., Mariappan, G., & Manoharan, S. (2012). Molecular structure and vibrational spectroscopic studies of Chrysin using HF and Density Functional Theory. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 87, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.11.011>

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Γραφική περίληψη	4
Εικόνα 2: Graphical abstract.....	6
Εικόνα 3: Χημική δομή της χρυσίνης (5,7 υδροξυ-φλαβόνη).....	21
Εικόνα 4: Βιολογικές δράσεις του φυσικού φλαβονοειδούς χρυσίνη	22
Εικόνα 5: Χημική ένωση αποτελούμενη από (a) α-L γουλουρονικό οξύ και (b) β-D μαννουρονικό οξύ σχηματίζοντας (c) 1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ τους	25
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του “egg-box”	26
Εικόνα 7 : Βασική ρύθμιση ενός συστήματος μέτρησης DLS. Το δείγμα περιέχεται σε μια κυψελίδα. Το σκεδαζόμενο φως του προσπίπτοντος λέιζερ μπορεί να ανιχνευθεί σε διαφορετικές γωνίες.....	28
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης μεγέθους σωματιδίων με ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων. Ένα λέιζερ φωτίζει σωματίδια που υφίστανται κίνηση Brown σε ένα δείγμα.[55]	29
Εικόνα 9 : Σχηματικό διάγραμμα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.[25]	30
Εικόνα 10: Οι Δώδεκα Αρχές της Πράσινης Χημείας	33
Εικόνα 11: Κύρια συστατικά του NADES	36
Εικόνα 12: Διάχυση μέσω συστήματος δεξαμενής, μέθοδος I.....	37
Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση <i>in vitro</i> μεθόδων αποδέσμευσης II, III, IV	38
Εικόνα 14: Σχηματικό προφίλ διφασικής αποδέσμευσης δραστικής ουσίας σε σύγκριση με μηδενικής τάξης[.....	38
Εικόνα 15: Τρισδιάστατη αναπαράσταση των μεταβλητών συγκέντρωσης-διαμέτρου-έντασης για το τρίτο δείγμα με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό.	52
Εικόνα 16: Δισδιάστατη αναπαράσταση των μεταβλητών συγκέντρωσης-διαμέτρου για το τρίτο δείγμα με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό.	53
Εικόνα 17: Ζύγιση λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων σε ζυγό ακριβείας.....	55
Εικόνα 18: Λυοφιλοποιημένα AL-NADES-ChR NPs.	56
Εικόνα 19: Σύγκριση DLS και NTA	61
Εικόνα 20: Χημική δομή χρυσίνης (5, 7 υδροξυφλαβόνη)	80
Εικόνα 21 : Δομή αλγινικού νατρίου.....	81
Εικόνα 22: Ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης σε νανοσωματίδια Al -NADES-ChR	84
Εικόνα 23: Ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης σε νανοσωματίδια Al –NADES.	85

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: γραφική παρουσίαση των προφίλ αποδέσμευσεων : τριφασική αποδέσμευση με σύντομη φάση II, απότομη αποδέσμευση μηδενικής τάξης, απότομη αποδέσμευση και ταχεία φάση II , τριφασική αποδέσμευση, διφασική αποδέσμευση.	42
Διάγραμμα 2 : Γραφική απεικόνιση θεραπευτικού παραθύρου- Γράφημα συγκέντρωσης-χρόνου	44
Διάγραμμα 3 : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης σε αιθανόλη	54
Διάγραμμα 4: Συσχέτιση περιεκτικότητας αλγινικού (Al) με το μέγεθος των σωματιδίων	62
Διάγραμμα 5: Συσχέτιση περιεκτικότητας NADES με το μέγεθος των σωματιδίων.....	63
Διάγραμμα 6 :Συσχέτιση περιεκτικότητας χρυσίνης (ChR) με το μέγεθος των σωματιδίων	64
Διάγραμμα 7: Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών του μεγέθους των νανοσυστημάτων.....	65
Διάγραμμα 8: Συσχέτιση μεγέθους σωματιδίων και περιεκτικότητας NaDES, ChR.....	66
Διάγραμμα 9: Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης αλγινικού, NADES, χρυσίνης με το μέγεθος των σωματιδίων.	67
Διάγραμμα 10: Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος αλγινικού με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων	67
Διάγραμμα 11: Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NADES με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων	68
Διάγραμμα 12: Συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος χρυσίνης με την απόδοση εγκλωβισμού των νανοσυστημάτων	69
Διάγραμμα 13: Συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών του μεγέθους των νανοσυστημάτων.....	70
Διάγραμμα 14: Συσχέτιση απόδοσης εγκλεισμού και περιεκτικότητας αλγινικού και χρυσίνης	71
Διάγραμμα 15: Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης αλγινικού, NADES, χρυσίνης με την απόδοση εγκλωβισμού EE% των νανοσυστημάτων.....	72
Διάγραμμα 16: Σύνολο προβλέψεων για βέλτιστο size και EE% με την ελάχιστη περιεκτικότητα χρυσίνης 10 % w/w.....	73
Διάγραμμα 17: Προφίλ αποδέσμευσης της χρυσίνης <i>in vitro</i> από τα νανοσυστήματα αλγινικού-NADES σε pH=7.4 σε θερμοκρασία $T = 37^{\circ}\text{C}$	75
Διάγραμμα 18 : Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της χρυσίνης <i>in vitro</i> από τα νανοσυστήματα αλγινικού –NADES στο κινητικό μοντέλο μηδενικής τάξης	76
Διάγραμμα 19: Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της χρυσίνης <i>in vitro</i> από τα νανοσυστήματα αλγινικού –NADES στο κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης..	76
Διάγραμμα 20 :Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της χρυσίνης <i>in vitro</i> από τα νανοσυστήματα αλγινικού –NADES στο κινητικό μοντέλο Higuchi	77
Διάγραμμα 21 : Προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων του προφίλ αποδέσμευσης της χρυσίνης <i>in vitro</i> από τα νανοσυστήματα αλγινικού –NADES στο ημί-εμπειρικό κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Reppas	78
Διάγραμμα 22 : Στιβαγμένα φάσματα ATR/FT – IR της χρυσίνης, των βέλτιστων νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES με εγκλωβισμένη χρυσίνη, των βέλτιστων νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES χωρίς εγκλωβισμένη χρυσίνη και του αλγινικού νατρίου	79
Διάγραμμα 23: Φάσμα ATR/FT – IR της χρυσίνης (5, 7 υδροξυφλαβόνη).....	80

Διάγραμμα 24: Φάσμα ATR/FT – IR του αλγινικού νατρίου.	81
Διάγραμμα 25 : Φάσμα ATR/FT – IR του blank (αλγινικό με NADES χωρίς τον εγκλωβισμό της χρυσίνης).....	82
Διάγραμμα 26 : Φάσμα ATR/FT – IR των βέλτιστων νανοσωματιδίων αλγινικού-NADES με εγκλωβισμένο θεραπευτικό παράγοντα την χρυσίνη	83

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1 : Τύποι βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, DES [29]	35
Πίνακας 2 Ερμηνεία των μηχανισμών αποδέσμευσης από πολυμερικές μεμβράνες[42]	41
Πίνακας 3 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και τον χαρακτηρισμό των ναοσυστημάτων.	46
Πίνακας 4: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και τον χαρακτηρισμό των ναοσυστημάτων	46
Πίνακας 5: Συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης και απορρόφησης	54
Πίνακας 6: Οριοθέτηση παραμέτρων ναοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης.....	58
Πίνακας 7: Προβλεπόμενα πειράματα για τη σύνθεση των ναοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης.....	59
Πίνακας 8: Οι τιμές που προκύπτουν από την εκτέλεση του πειραματικού σχεδιασμού	60
Πίνακας 9: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει το μέγεθος των ναοσυστημάτων	65
Πίνακας 10: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την απόδοση εγκλωβισμού των ναοσυστημάτων.....	70
Πίνακας 11: Παράμετροι για σύνθεση βέλτιστων ναοσυστημάτων.....	73
Πίνακας 12: Επιβεβαίωση εγκυρότητας των αποκρίσεων των ναοσυστημάτων για διάστημα εμπιστοσύνης 95%.....	74
Πίνακας 13: Μετατοπίσεις χαρακτηριστικών κορυφών απορρόφησης του αλγινικού νατρίου στα φάσματα FT-IR των εγκλεισμένων ναοσωματιδίων.....	83
Πίνακας 14: Μετατοπίσεις χαρακτηριστικών κορυφών απορρόφησης της χρυσίνης στα φάσματα FT-IR των εγκλεισμένων ναοσωματιδίων.....	Error! Bookmark not defined.
Πίνακας 16: Παράμετροι για σύνθεση βέλτιστων ναοσυστημάτων προς μορφολογικό χαρακτηρισμό μέσω του TEM.....	84
Πίνακας 17 : Παράμετροι για σύνθεση βέλτιστων ναοσυστημάτων προς μορφολογικό χαρακτηρισμό μέσω του TEM.....	84
Πίνακας 18: Μέγεθος και απόδοση εγκλωβισμού ναοσυστημάτων.....	86