



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (I) : Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

**Ανάπτυξη διεργασίας παρασκευής καινοτόμων ευτηκτογελών
για τον εγκλωβισμό του φυσικού φλαβονοειδούς χρυσίνη**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Κυριάκος Κυριακόπουλος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Αναστασία Δέτση

Αθήνα, Φεβρουάριος 2023



NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS

SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING

Department (I) : Chemical Sciences

Organic Chemistry Laboratory

Development of innovative eutectogels for the encapsulation of natural flavonoid chrysin

Master Thesis

Kyriakos Kyriakopoulos

Supervisor

Anastasia Detsi

Athens , February 2024

Στους γονείς μου, Γιώργο και Αγγελική

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. , Δρ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Αναστασία Δέτση για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου από την πρώτη στιγμή, με την ευκαιρία ανάθεσης του συγκεκριμένου θέματος , όπως και για την καθοδήγησή της καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας. Επιπρόσθετα , δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω την Δρ. Ιωάννα Πιττερού για την στήριξή της σε όλη την πορεία της συγκεκριμένης εργασίας . Το πλήθος γνώσεων της , οι συμβουλές της , η εμπειρία της και η κατάρτισή της αποτέλεσαν βασική μεταβλητή ως προς την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Περίληψη

Η νανοτεχνολογία εφαρμόζεται ευρέως στον τομέα της Φαρμακευτικής τεχνολογίας καθώς επιτυγχάνει τον εγκλεισμό φαρμάκων σε διάφορους φορείς προσδίδοντας σημαντικές 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. Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, οι οποίοι αποτελούν υποκατηγορία των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών όπως και κύριο συστατικό των ευτηκτογελών, έχουν κεντρίσει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στο τομέα των τροφίμων και της φαρμακοβιομηχανίας λόγω των πλεονεκτημάτων τους.

Ειδικότερα, στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία σχεδιάστηκε φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης (Natural Deep Eutectic Solvent, NADES) από τον οποίο παρασκευάστηκαν ευτηκτογέλες με χρήση πολυσακχαρίτη ως πηκτωματοποιητή. Ταυτόχρονα, αναπτύχθηκε μέθοδος παρασκευής νανοσωματιδίων στα οποία ο φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης είχε τον ρόλο του παράγοντα διασταύρωσης, ενώ σε αυτά εγκλωβίστηκε το φυσικό φλαβονοειδές χρυσίνη. Η προσθήκη των νανοσωματιδίων στην ευτηκτογέλη, ολοκλήρωσε την διαδικασία της παρασκευής, με τελικό προϊόν την καινοτόμο νανοςύνθετη ευτηκτογέλη.

Πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός για τον προσδιορισμό των κυριότερων παραμέτρων που επηρεάζουν τη διεργασία παρασκευής της ευτηκτογέλης και την βελτιστοποίηση της διεργασίας. Οι πολλαπλές χρήσεις του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NADES), κατά την ίδια παρασκευή, ανέδειξαν τα πολυδιάστατα χαρακτηριστικά του ενώ η γενικότερη νοοτροπία εφάπτονταν πλήρως με την επιστημονική προσέγγιση της πράσινης χημείας

Στο πρώτο μέρος της εργασίας, παρασκευάστηκαν ο φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης με χλωριούχο χολίνη (ChCl) και γαλακτικό οξύ (LA) σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2, οι ευτηκτογέλες μαζί με την βοήθεια πηκτωματοποιητή κόμμι ξανθάνης (Xanthan Gum) και νανοσωματίδια χιτοζάνης με εγκλεισμένο το φυσικό φλαβονοειδές χρυσίνη με παράγοντα διασταύρωσης τον ίδιο φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη. Με την προσθήκη του διαλύματος της κολλοειδούς διασποράς των νανοσωματιδίων χιτοζάνης-χρυσίνης στις ευτηκτογέλες παρασκευάστηκαν νανοςύνθετες ευτηκτογέλες.

Όλη η διαδικασία έγινε με την χρήση του πειραματικού σχεδιασμού (Design of Experiment, DoE) τύπου Box Behnken με την βοήθεια του λογισμικού Design Expert 12. Με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό πραγματοποιήθηκαν 15 πειράματα, τα οποία επαναλήφθηκαν δύο φορές. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές επιλέχθηκαν οι εξής: η περιεκτικότητα του κόμμι ξανθάνης %w/v (Xanthan Gum), η περιεκτικότητα της χρυσίνης % w/w (Chrysin-Chr), η περιεκτικότητα της διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης % v/v (Chitosan Nanoparticles-CS NPs). Οι εξαρτημένες μεταβλητές (αποκρίσεις) οι οποίες επιλέχθηκαν να μελετηθούν είναι οι παρακάτω: Απόδοση εγκλωβισμού (EE%), Ικανότητα διόγκωσης-SR (%), Ικανότητα συγκράτησης νερού-WRR (%).

Η βέλτιστη σύσταση της νανοςύνθετης ευτηκτογέλης για την μεγιστοποίηση της ικανότητας διόγκωσης (% SR) ήταν 20 % w/v κόμμι ξανθάνης (Xanthan Gum), 13,6%

w/w χρυσίνη (Chrysin-Chr), 10% v/v διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης (Chitosan Nanoparticles-CS NPs).

Στο δεύτερο μέρος , έγινε η μελέτη της ικανότητας διόγκωσης των νανოსύνθετων ευτηκτογελών η οποία ,στις βέλτιστες αναλογίες, έφτανε μέχρι και το 130% . Πολλές από τις ευτηκτογέλες δεν έφταναν στο σημείο ισορροπίας έτσι ώστε να αρχίσουν να έχουν την ικανότητα συγκράτησης νερού , αιτία που ήταν καθοριστική για τον αποκλεισμό αυτής της παραμέτρου από τις εξαρτημένες μεταβλητές .

Επιστημονική περιοχή: Πράσινη Χημεία, Πράσινη Νανοτεχνολογία, Φαρμακευτική Χημεία.

Λέξεις Κλειδιά: Ευτηκτογέλη, Χιτοζάνη, Χρυσίνη, Φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης , Νανοσωματίδια, Γαλακτικό Οξύ, Χλωριούχος Χολίνη, Κόμμι Ξανθάνης, Πειραματικός Σχεδιασμός, Ικανότητα Διόγκωσης ,Ικανότητα Συγκράτησης Νερού.

Abstract

Nanotechnology is widely applied in the field of Pharmaceutical Technology as it achieves the encapsulation of drugs in various carriers imparting important physicochemical and biological properties. The choice of a drug encapsulation carrier depends on many factors such as its release profile and it is primarily related to the desired application. Natural deep eutectic solvents, which are a subclass of deep eutectic solvents as well as the major component of eutectogels, have attracted interest in recent years in the food and pharmaceutical industry due to their advantages.

In particular, in the present Master's thesis, a Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) was designed and synthesized in order to prepare eutectogels using a polysaccharide as gelator. A method was developed to fabricate chitosan nanoparticles in which the natural deep eutectic solvent played the role of a cross-linking agent, while the natural flavonoid chrysin was encapsulated in them. The addition of the nanoparticles to the eutectogel, completed the preparation process, with the final product being an innovative nanocomposite eutectogel.

Our aim was to improve the independent variables set during the experimental design and to validate the experimental design model to generate the optimal conditions for the preparation of the nanocomposite eutectogel. The multiple roles played by the natural deep eutectic solvent (NADES), highlighted its multidimensional characteristics, while the overall approach was fully in line with the scientific approach of green chemistry.

In the first part of the work, the natural deep eutectic solvent was prepared using choline chloride (ChCl) and lactic acid (LA) in a molar ratio of 1: 2. Then, the eutectogels were prepared using xanthan gum (Xanthan Gum) as the gelator, finally, the chitosan nanoparticles with encapsulated natural flavonoid chrysin, using the NADES as crosslinking were prepared. The process was completed by adding the colloidal dispersion solution of the chitosan-chrysin nanoparticles to the eutectogels, to create the nanocomposite eutectogels.

The whole process was carried out using the Box Behnken type Design of Experiment (DoE) with the help of Design Expert 12 software. Based on the experimental design, 15 experiments were conducted and repeated twice. The following were selected as independent variables: xanthan gum content %w/v (Xanthan Gum), chrysin content %w/w (Chrysin-Chr), chitosan nanoparticle dispersion content %v/v (Chitosan Nanoparticles-CS NPs). The dependent variables (responses) which were selected to be studied are as follows: Entrapment efficiency (EE%), Swelling ratio -SR (%), Water retention ratio -WRR (%).

The optimum composition of the eutectogel nanocomposite for maximizing swelling ratio (% SR) was 20 % w/v xanthan gum (Xanthan Gum), 13.6 % w/w chrysin (Chrysin-Chr), 10 % v/v dispersed chitosan nanoparticles (Chitosan Nanoparticles-CS NPs).

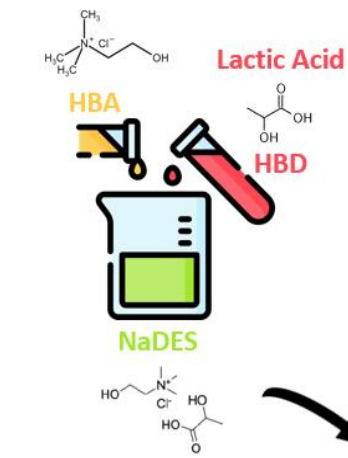
In the second part, the swelling capacity of the nanocomposite eutectogels was studied, which, in the optimal conditions, reached up to 130%. Many of the eutectogels did not reach the equilibrium point so this parameter was excluded from the dependent variables.

Scientific area: Green Chemistry, Green Nanotechnology, Medicinal Chemistry.

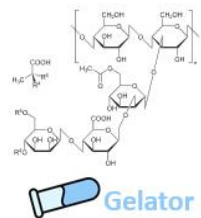
Keywords: Eutectogel, Chitosan, Chrysin, Natural Deep Eutectic Solvent, Nanoparticles, Lactic Acid, Choline Chloride, Xanthan Gum, Experimental Design, Swelling Ratio, Water Retention Ratio.

Graphical Abstract

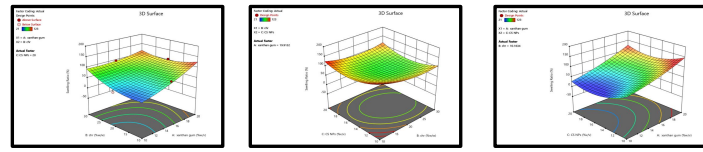
Choline Chloride



Xanthan gum



Design of Experiments

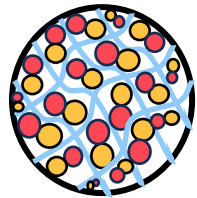


Swelling Ratio (%) - Retention Ratio (%)

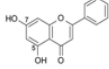


Nanocomposite Eutectogel

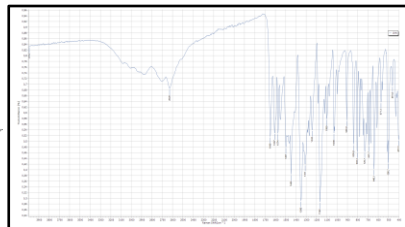
Freeze Drying



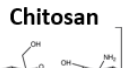
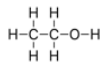
Chrysin



FT-IR



Ethanol

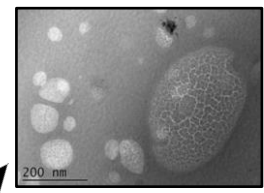


Crosslinking agent

NaDES

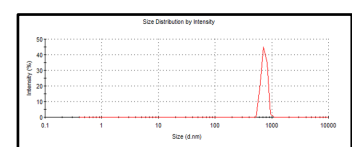
24h magnetic stirring

TEM

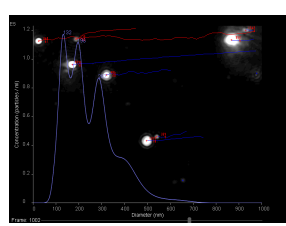


CS NPs

DLS



NTA



Πίνακας Συντομογραφιών

Συντομογραφίες	
EPA	Enviromental Protection Agency
DES	Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης
IL	Ιοντικά Υγρά
HBA	Αποδέκτης Δεσμού Υδρογόνου
HBD	Δότης Δεσμού Υδρογόνου
NADES	Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες
ChCl	Χλωριούχος Χολίνη
LA	Γαλακτικό Οξύ
CS	Χιτοζάνη
Chr	Χρυσίνη
CS NPs	Νανοδοματίδια Χιτοζάνης
SR	Ικανότητα διόγκωσης (Swelling Ratio)
WRR	Ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Retention Ratio)
RSM	Μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης
ChCl:LA	NaDES χλωριούχου χολίνης – γαλακτικού οξέος
FT-IR	Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier
TEM	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης
NTA	Ανάλυση Ανίχνευσης Σωματιδίων
DLS	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
DOE	Πειραματικός Σχεδιασμός
LMWG	Πηκτωματοποιητής Χαμηλού Μοριακού Βάρους
NPs	Νανοδοματίδια
NM	Νανοϋλικά
DDS	Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	2
Περίληψη.....	3
Abstract.....	5
Graphical Abstract.....	7
Πίνακας Συνομογραφιών.....	8
Ευρετήριο Εικόνων.....	12
Ευρετήριο Πινάκων.....	13
1 Θεωρητικό Μέρος.....	15
1.1 Πράσινη Χημεία.....	15
1.1.1 Εισαγωγή στην Πράσινη Χημεία.....	15
1.1.2 Ιστορία Πράσινης Χημείας.....	16
1.1.3 Εφαρμογές, πλεονεκτήματα & μειονεκτήματα.....	16
1.2 Πράσινοι Διαλύτες.....	18
1.2.1 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες.....	18
1.2.2 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents – NaDES).....	20
1.2.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες των DES και των NaDES.....	23
1.3 Ευτηκτογέλες.....	25
1.3.1 Ορισμός, κατηγορίες & τρόποι παρασκευής ευτηκτογελών.....	25
1.3.2 Ιδιότητες και εφαρμογές ευτηκτογελών.....	27
1.3.3 Σύγκριση δομικών ιδιοτήτων & χαρακτηριστικών των Ευτηκτογελών σε σχέση με τις Υδρογέλες.....	28
1.4 Χρυσίνη.....	31
1.4.1 Η οικογένεια των φλαβονοειδών.....	31
1.4.2 Χρυσίνη, πηγές & ιδιότητες της.....	31
1.4.3 Νανοδομημένα Χιτοζάνης-Χρυσίνης (CS-Chr NPs).....	34
1.5 Πράσινη Νανοτεχνολογία.....	35
1.5.1 Εισαγωγή στην Νανοτεχνολογία.....	35
1.5.2 Ταξινόμηση των νανοϋλικών.....	37
1.5.3 Πράσινη Νανοτεχνολογία.....	38
1.6 Εγκλωβισμός βιοδραστικών ενώσεων σε φορείς.....	41
1.6.1 Σημασία, Αντίκτυπο & Εξέλιξη της τεχνολογίας μεταφοράς φαρμάκων.....	41

1.6.2	Νανοσυστήματα ως μέσα μεταφοράς φαρμάκων.....	44
1.7	Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiments, DOE)	47
1.7.1	Πειραματικός Σχεδιασμός Box Behnken.....	47
2	Πειραματικό Μέρος	49
2.1	Σκοπός.....	49
2.2	Όργανα , συσκευές & αντιδραστήρια	50
2.3	Σύνθεση βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NADES) χλωριούχος χολίνη – γαλακτικό οξύ 1:2 (ChCl:LA)	52
2.4	Εγκλεισμός του φυσικού φλαβονοειδούς χρυσίνη σε νανοσωματίδια χιτοζάνης 54	
2.5	Παρασκευή νανوسύνθετων ευτηκτογελών.....	56
2.6	Πειραματικός σχεδιασμός – Design of experiments (DoE).....	58
2.7	Χαρακτηρισμός νανوسύνθετων ευτηκτογελών	60
2.7.1	Προσδιορισμός της ικανότητας διόγκωσης- Swelling Ratio (SR).....	60
2.7.2	Προσδιορισμός ικανότητας συγκράτησης νερού -Water Retention Ratio (WRR).....	61
2.8	Χαρακτηρισμός κolloειδούς διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS NPs) 62	
2.8.1	Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Spectroscopy , DLS)	62
2.8.2	Nanoparticle Tracking Analysis ,NTA	62
2.8.3	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (Transmission Electron Microscopy , TEM).....	63
3	Αποτελέσματα και συζήτηση	65
3.1	Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of experiments , DoE).....	65
3.1.1	Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων	65
3.1.2	Επιβεβαίωση του μοντέλου	70
3.2	Αξιολόγηση των αποκρίσεων της νανوسύνθετης ευτηκτογέλης που παρασκευάστηκε με τις βέλτιστες συνθήκες.....	72
3.2.1	Προσδιορισμός της ικανότητας διόγκωσης- Swelling Ratio (SR) & ικανότητας συγκράτησης νερού -Water Retention Ratio (WRR)	72
3.3	Χαρακτηρισμός κolloειδούς διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Spectroscopy DLS)	74
3.4	Nanoparticle Tracking Analysis , NTA	76
3.5	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (Transmission Electron Microscopy – TEM).....	77
4	Συμπεράσματα	79
5	Μελλοντικές προτάσεις	80

6 Παράρτημα Διαγραμμάτων	81
7 Βιβλιογραφία.....	85

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα. 1 Όρια διαχωρισμού μεταξύ της βιωσιμότητας , πράσινης μηχανικής και της πράσινης χημείας.....	15
Εικόνα. 2 Οι δώδεκα αρχές της πράσινης χημείας.....	17
Εικόνα. 3 Παραδείγματα χημικών δομών αποδεκτών δεσμού υδρογόνου (HBA) και δοτών δεσμού υδρογόνου (HBD).....	19
Εικόνα. 4 Σημαντικοί σταθμοί στην εξέλιξη των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών (DES)	21
Εικόνα. 5 Διάφοροι τομείς στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NADES).....	22
Εικόνα. 6 Ταξινόμηση των συμβατικών γελών	30
Εικόνα. 7 Χημική δομή της χρυσίνης.....	32
Εικόνα. 8 Σχηματική αναπαράσταση των επιδράσεων της χρυσίνης στην προαγωγή της υγείας σε προκλινικές μελέτες	33
Εικόνα. 9 Είδη νανοσωματιδίων φορτωμένα με χρυσίνη ,τα οποία βρίσκουν εφαρμογή σε αντικαρκινικές θεραπείες	34
Εικόνα. 10 Εφαρμογές της Νανοτεχνολογίας.....	36
Εικόνα. 11 Πλεονεκτήματα των πράσινα-συντιθεμένων NPs έναντι των συμβατικών και χημικών μεθόδων σύνθεσης.....	39
Εικόνα. 12 Η εξέλιξη του πεδίου της μεταφοράς φαρμάκων από το 1950 έως το 2014	42
Εικόνα. 13 Εξέλιξη των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων μέσω της εισαγωγής εγκεκριμένων από τον FDA φαρμακευτικών προϊόντων.....	43
Εικόνα. 14 Αναπαράσταση του συνόλου και των υποσυνόλων των τεχνητών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (DDS), μεταξύ των νανοσυστημάτων, μικροηλεκτρομηχανικά συστήματα (MEMS), άλλα ειδικά συστήματα και τα παράγωγά τους.	46
Εικόνα. 15 Το διάλυμα NADES μετά το πέρας της παρασκευής του.....	52
Εικόνα. 16 Διαδικασία διήθησης υπό κενό.....	54
Εικόνα. 17 Μαγνητική ανάδευση της κολλοειδούς διασποράς για 24h.....	55
Εικόνα. 18 Απεικόνιση των συστατικών της ευτηκτογέλης κατά την πηκτωματοποίηση.	56
Εικόνα. 19 Λουτρό ελαίου στο οποίο γίνεται η μαγνητική ανάδευση.....	56
Εικόνα. 20 Ευτηκτογέλη μετά το πέρας της μαγνητικής ανάδευσης.....	57
Εικόνα. 21 Λυοφιλοποιημένη νανοσύνθετη ευτηκτογέλη.....	57
Εικόνα. 22 Λυοφιλοποιημένη ευτηκτογέλη.....	60
Εικόνα. 23 Διαδικασία απομάκρυνσης του HCl ,έτσι ώστε να είναι επιτεύξιμη η ζύγιση της ευτηκτογέλης.....	61
Εικόνα. 24 Απεικόνιση των νανοσωματιδίων της διασποράς CS NPS 41 μέσω του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy)	77

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας.1 Εργαστηριακά όργανα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων.....	50
Πίνακας.2 Εργαστηριακά αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων.....	51
Πίνακας. 3 Απεικόνιση των συστατικών του NADES.....	52
Πίνακας. 4 Σύνθεση NADES.....	53
Πίνακας. 5 Εύρος τιμών των Ανεξάρτητων μεταβλητών & συνοπτική τους παρουσίαση μαζί με τις εξαρτημένες μεταβλητές.	59
Πίνακας. 6 Τιμές των παραμέτρων για το σύνολο των πειραμάτων για τις νανοσύνθετες ευτηκτογέλες μέσω του πειραματικού σχεδιασμού.	59
Πίνακας. 7 Τιμές των αποκρίσεων για τα αντίστοιχα 15 πειράματα.	65
Πίνακας. 8 Βέλτιστη σύσταση της νανοσύνθετης ευτηκτογέλης.....	66
Πίνακας. 9 Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο το οποίο περιγράφει την ικανότητα διόγκωσης.....	67
Πίνακας.10 Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο το οποίο περιγράφει την 1η απόκριση.....	67
Πίνακας. 11 Αποτελέσματα πειραμάτων βέλτιστης αναλογίας.....	70
Πίνακας. 12 Εύρος αποκρίσεων για την βέλτιστη αναλογία των ανεξάρτητων μεταβλητών.....	71
Πίνακας. 13 Η μέση υδροδυναμική διάμετρος, ο δείκτης πολυδιασποράς PdI και το ζ-δυναμικό μαζί με τα σφάλματά τους , για τα 3 διαφορετικά ποσοστά Χρυσίνης (% w/w) του πειραματικού σχεδιασμού.....	74
Πίνακας. 14 Σύγκριση τιμής υδροδυναμικής διαμέτρου DLS & NTA.....	76

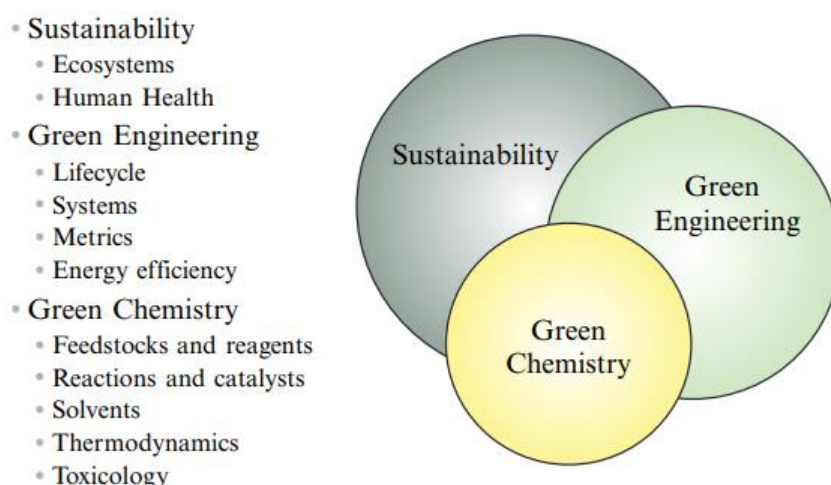
1 Θεωρητικό Μέρος

1.1 Πράσινη Χημεία

1.1.1 Εισαγωγή στην Πράσινη Χημεία

Η πράσινη χημεία δεν είναι ένας ξεχωριστός επιστημονικός κλάδος, αλλά μια υπεύθυνη διεπιστημονική προσέγγιση της επιστήμης, βασισμένη στην χημική, οικολογική και κοινωνική ευθύνη η οποία επιτρέπει την δημιουργικότητα και την προώθηση της καινοτόμου έρευνας . Ως προωθητικός τομέας της έρευνας, προσπαθεί να βρει και να διατηρήσει μια ισορροπία μεταξύ της χρήσης των φυσικών πόρων, της οικονομικής ανάπτυξης καθώς και της διατήρησης του περιβάλλοντος [1].

Σύμφωνα με τον ορισμό της EPA(Environmental Protection Agency), η πράσινη χημεία ορίζεται ως η χημεία η οποία σχεδιάζει χημικά προϊόντα και διεργασίες που είναι αβλαβή για το περιβάλλον, αποτρέποντας έτσι τον σχηματισμό ρύπανσης , μειώνοντας ή εξαλείφοντας την χρήση και την παραγωγή επιβλαβών ουσιών[1,2]. Ειδικότερα, στον πυρήνα της επικεντρώνεται στην χρήση της χημικής εμπειρογνωμοσύνης για την επίτευξη των στόχων της , καθ' όλη την διάρκεια του σχεδιασμού, της παραγωγής και της εφαρμογής των χημικών προϊόντων[3,4] . Οι διεργασίες της πράσινης χημείας περιλαμβάνουν σχεδόν όλα τα τμήματα της χημείας, όπως την ανόργανη, την οργανική, την βιοχημεία ,την περιβαλλοντική και την τοξικολογία[5].



Εικόνα. 1 Όρια διαχωρισμού μεταξύ της βιωσιμότητας , πράσινης μηχανικής και της πράσινης χημείας. [6]

Η πράσινη χημεία διαφοροποιείται από την πράσινη μηχανική, η οποία διαφοροποιείται από τη βιωσιμότητα. Αν και οι όροι χρησιμοποιούνται συχνά εναλλακτικά, κάθε μία από αυτές τις έννοιες ενσωματώνει ελαφρώς διαφορετικές ιδέες και περιλαμβάνει διαφορετικά πεδία δραστηριότητας[6].

1.1.2 Ιστορία Πράσινης Χημείας

Η πρώτη εμφάνιση της πράσινης χημείας χρονολογείται από τη δεκαετία του 1980, όταν και έγιναν εμφανείς οι αρνητικές επιπτώσεις της βιομηχανικής ανάπτυξης. Οι ανησυχίες αυξήθηκαν για το περιβαλλοντικό κόστος και τους επαγγελματικούς κινδύνους που συνδέονταν σε μεγάλο βαθμό με τις βιομηχανικές δραστηριότητες. [4] Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, να εισέλθουν μέχρι και το 1990 αρκετοί περιβαλλοντικά συνειδητοποιημένοι όροι στη χημική σκηνή όπως, π.χ. καθαρή χημεία, περιβαλλοντική χημεία, πράσινη χημεία, καλοήθης χημεία και βιώσιμη χημεία[7].

Η έννοια της πράσινης χημείας διατυπώθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Το Ινστιτούτο Πράσινης Χημείας ιδρύθηκε το 1997 και η έκδοση του πρώτου τόμου του καθιερωμένου περιοδικού πράσινης χημείας της Βασιλικής Εταιρείας Χημείας, το 1999[5].

Έπειτα, ακολούθησε η διατύπωση των δώδεκα αρχών της πράσινης χημείας, οι οποίες αναπτύχθηκαν το 1991 από τον Paul T. Anastas, έναν οργανικό χημικό που εργαζόταν στο Γραφείο Πρόληψης Ρύπανσης και Τοξινών της EPA (Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA) και τον John C. Warner. Οι αρχές αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν στις δύο εξής κύριες κατευθύνσεις: στην "Μείωση του κινδύνου" και στις "Ελάχιστες περιβαλλοντικές επιπτώσεις", ενώ ο όρος πράσινη χημεία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1996, υποδηλώνοντας μια αντίληψη της χημείας που αποσκοπεί στην καθοδήγηση της παραδοσιακής χημικής βιομηχανίας σε βιώσιμα μονοπάτια [3].

Προφανώς, είναι πολύ δελεαστικό να χρησιμοποιείται ένας όρος όπως "πράσινη χημεία" χωρίς να δίνεται κάποιος σαφής ορισμός. Η αλλαγή της ορολογίας το 1996 (από τον Anastas) και η ονομασία του περιοδικού GCN το 1999 υποστηρίζει αυτόν τον ισχυρισμό, καθώς πριν από την ανάπτυξή του γύρω στο 1998, λίγο μετά την ανάπτυξη της φιλοσοφίας της πράσινης χημείας από την EPA των ΗΠΑ, οι συγγραφείς χρησιμοποιούσαν τον όρο χωρίς να αναφέρονται στη φιλοσοφία αυτή[7].

1.1.3 Εφαρμογές, πλεονεκτήματα & μειονεκτήματα

Η έννοια της πράσινης χημείας βασίζεται σε δώδεκα αρχές (Εικόνα.2), οι οποίες αποσκοπούν στη μείωση ή την απομάκρυνση των εγγενών κινδύνων από τη σύνθεση, την παραγωγή και την εφαρμογή των χημικών προϊόντων και κατά συνέπεια ότι η

χρήση υλικών που είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, πρέπει να μειωθεί ή να εξαλειφθεί [3,5].



Εικόνα. 2 Οι δώδεκα αρχές της πράσινης χημείας

Για παράδειγμα, παραδοσιακά, τα κατάλοιπα της χημικής βιομηχανίας υποβάλλονται σε προ-επεξεργασία για τη μείωση της τοξικότητας πριν από την διάθεση. Ωστόσο, τα μέτρα αυτά είναι εξαιρετικά δαπανηρά. Η εφαρμογή μιας προσέγγισης της πράσινης χημείας κατά την αντιμετώπιση των βιομηχανικών υπολειμμάτων, απαιτεί την αξιοποίηση πολυδιάστατων πτυχών, όπως ο πιο πράσινος σχεδιασμός διεργασιών και τεχνικών, για τον περιορισμό της δημιουργίας αποβλήτων κατά την παραγωγή, έχοντας επίσης υπόψιν το κόστος και την ενέργεια που εμπλέκονται στην όλη διαδικασία, και τέλος, εξετάζοντας την επεξεργασία και την διάθεση τυχόν υπολειμμάτων που απομένουν[4].

Η προσέγγιση της Πράσινης Χημείας, επιδιώκει την επίτευξη της βιωσιμότητας σε μοριακό επίπεδο. Λόγω αυτού του στόχου, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι έχει εφαρμοστεί σε όλους τους τομείς της βιομηχανίας. Από την αεροδιαστημική, την αυτοκινητοβιομηχανία, τα καλλυντικά, τα ηλεκτρονικά, την ενέργεια, τα οικιακά προϊόντα, τα φαρμακευτικά, μέχρι και την γεωργία, αφού υπάρχουν εκατοντάδες

παραδείγματα επιτυχημένων-βραβευμένων εφαρμογών και οικονομικά ανταγωνιστικών τεχνολογιών[2].

Ταυτόχρονα, στα πλεονεκτήματα της πράσινης χημείας συγκαταλέγεται η μείωση στην παραγωγή αποβλήτων. Στην πραγματικότητα, η πράσινη χημεία είναι μια νέα στρατηγική για την προστασία τόσο του περιβάλλοντος όσο και της ανθρώπινης υγείας. Η εξοικονόμηση ενέργειας και η κατανάλωση, έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο περιβάλλον, γεγονός το οποίο έχει αναγνωριστεί εδώ και πολύ καιρό.[8]

Αντίθετα, στα μειονεκτήματα της πράσινης χημείας συμπεριλαμβάνεται η δημιουργία χημικών προϊόντων και διαδικασιών οι οποίες καταλήγουν να είναι υπερβολικά δαπανηρές, η δυσκολία-έλλειψη τεχνογνωσίας που υπάρχει στον συγκεκριμένο κλάδο, δεδομένου ότι το μονοπάτι της δόμησης των διεργασιών είναι δύσβατο, όπως και το κριτήριο επιλογής των σωστών χημικών ουσιών ή των πρώτων υλών. Ο στόχος της καθιέρωσης της πράσινης χημείας, είναι η μεγαλύτερη πρόκληση σε αυτό το φάσμα της επιστήμης και αντανακλάται ιδιαίτερα στην διάθεση του χρόνου, των χρημάτων και των πληροφοριών που απαιτούνται για την ολοκλήρωσή του. [8]

1.2 Πράσινοι Διαλύτες

1.2.1 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DESS) θεωρούνται ως μια αναδυόμενη κατηγορία πράσινων διαλυτών, οι οποίοι αποτελούν μια υποκατηγορία των ιοντικών υγρών (ILs), όμως έχουν λάβει αυξημένη προσοχή τις τελευταίες δύο δεκαετίες [9,10] αφότου εισήχθη ο όρος για πρώτη φορά το 2003 από τον Abbott [11]

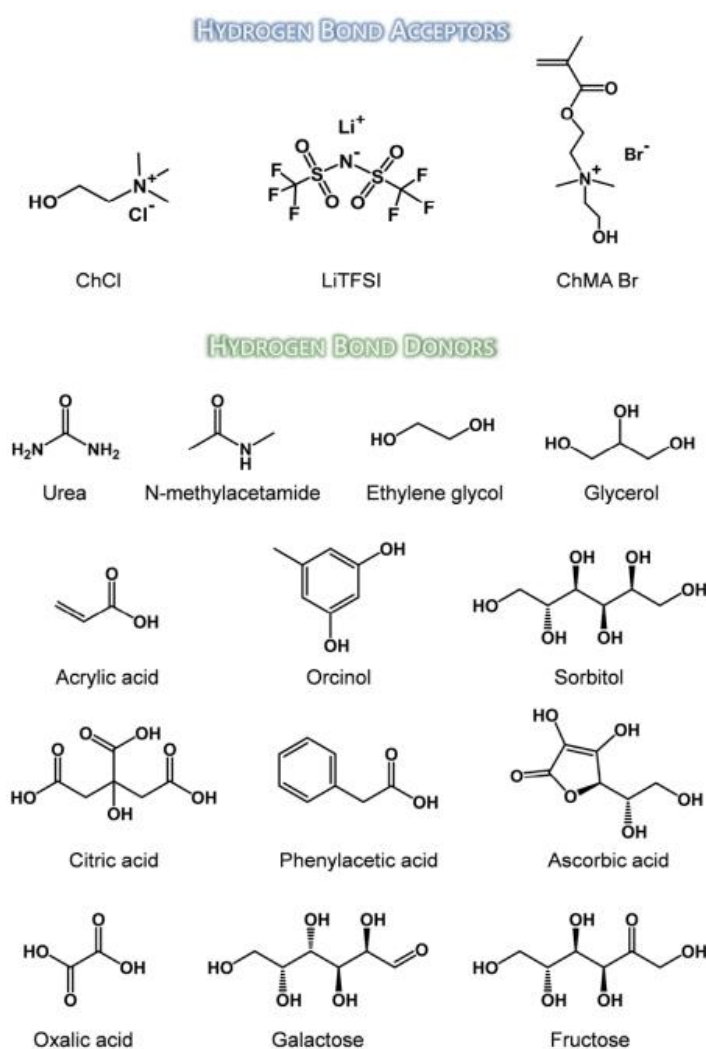
Ο λόγος που θεωρούνται συχνά ως μια υποκατηγορία των ιοντικών υγρών είναι λόγω των παρόμοιων ιδιοτήτων τους όπως :

- η ιοντική φύση,
- η χαμηλή πίεση ατμών,
- το σχετικά ευρύ φάσμα υγρών,
- το χαμηλό σημείο τήξης,
- η χαμηλή πτητικότητα,
- η υψηλή θερμική σταθερότητα
- και η υψηλή διαλυτότητα για διάφορες ουσίες .[9,12,13]

Αυτοί ορίζονται συχνά ως δυαδικά ή τριμερή μίγματα ενώσεων που μπορούν να συνδέονται κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου [14] ,με συμπλοκοποίηση ενός αποδέκτη δεσμού υδρογόνου (HBA) με έναν δότη δεσμού υδρογόνου (HBD).[12] Το μείγμα αυτών των συστατικών ,σε συγκεκριμένη μοριακή αναλογία, ορίζεται ως ευτηκτικό

και έχει χαμηλότερο σημείο τήξης, από εκείνο του κάθε συστατικού ξεχωριστά. [10, 14, 15] Ιδιότητα η οποία προκύπτει από την αποεστίαση φορτίου που συμβαίνει μέσω του δεσμού υδρογόνου μεταξύ π.χ. ενός ιόντος αλογονιδίου και του HBD που δημιουργεί ένα μεγαλύτερο μη συμμετρικό ιόν, το οποίο έχει χαμηλή ενέργεια πλέγματος και, ως εκ τούτου, χαμηλό σημείο τήξης.[12,16]

Σε γενικές γραμμές, οι HBAs περιλαμβάνουν χλωριούχο τεταρτοταγές αμμώνιο και άλατα μετάλλων (χλωριούχο χολίνη, βεταΐνη, $ZnCl_2$, $AlCl_3$ κ.λπ.) ενώ οι HBDs που επιλέγονται από ένα ευρύ φάσμα φυσικών ενώσεων, όπως οργανικά οξέα, αλκοόλες ή σάκχαρα περιλαμβάνουν πολυόλες, πολυοξέα πολυαμίνες (αιθυλενογλυκόλη, γλυκερόλη, οξαλικό οξύ, ουρία κ.λπ.) . [10,12, 15] Ρυθμίζοντας τη μοριακή αναλογία και τους τύπους των HBAs και HBDs, οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των DES μπορούν να ρυθμιστούν ώστε να δώσουν στα DESs ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.[15]



Εικόνα. 3 Παραδείγματα χημικών δομών αποδεκτών δεσμού υδρογόνου (HBA) και δοτών δεσμού υδρογόνου (HBD) [12]

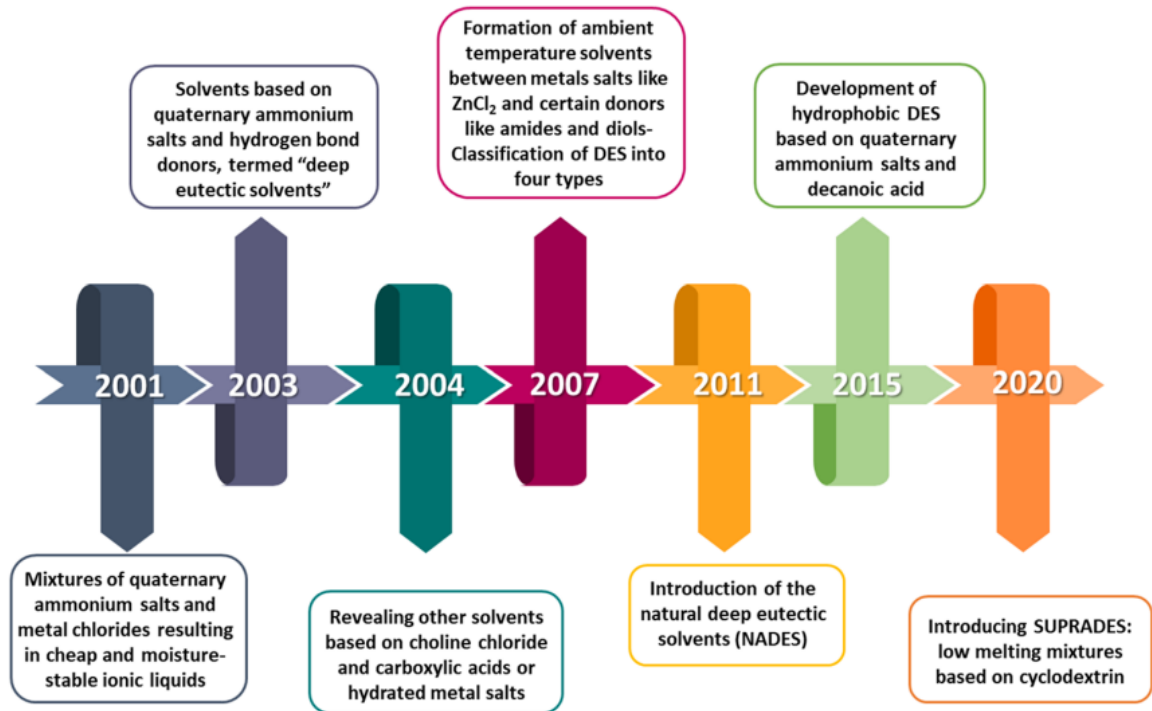
Τα DESs θεωρούνται μια δυνητικά πιο πράσινη εναλλακτική λύση έναντι των ILs με ορισμένα πρόσθετα πλεονεκτήματα, όπως :

- χαμηλότερη τιμή,
- ευκολότερη παρασκευή με μεγαλύτερη καθαρότητα,
- υψηλότερη βιοαποικοδομησιμότητα ,
- χαμηλότερη τοξικότητα
- και εξαιρετική δυνατότητα σχεδιασμού με ευρύτερη επιλογή (με επιλογές κατιόντων, ανιόντων και HBDs σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες άλατος/HBD).

Ως εκ τούτου, οι DESs προσελκύουν σήμερα ευρύ ακαδημαϊκό και βιομηχανικό ενδιαφέρον, με ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην κατάλυση, την οργανική σύνθεση, τις διεργασίες διάλυσης και εκχύλισης, την ηλεκτροχημεία, τη χημεία υλικών, τη βιοκατάλυση και τον βιομετασχηματισμό. [12,23]

1.2.2 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents – NaDES)

Οι NADES είναι ευτηκτικά μίγματα που βασίζονται στην αρχή των ILs και των DES, τα οποία σχηματίζονται με την ανάμειξη δύο ή περισσότερων κοινών φυσικών προϊόντων σε συγκεκριμένες μοριακές αναλογίες, ενώ η πρώτη τους εμφάνιση συνέβη το 2011 από τον Choi YH.[14,17,18] Αυτή η οικογένεια ευτηκτικών μιγμάτων που αποτελείται από φυσικά προϊόντα τα οποία έχουν βιολογικό ρόλο στους ζωντανούς οργανισμούς, ονομάζεται "φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες" (NADES). [16] Πιο συγκεκριμένα , αυτά τα φυσικά προϊόντα είναι κυτταρικά συστατικά τα οποία συναντάμε σε μεγάλες ποσότητες στα κύτταρα[17]. Λόγω της δυνατότητας αλλαγής των συστατικών και των μοριακών αναλογιών τους, μέχρι και σήμερα έχουν συντεθεί μεγάλες ποσότητες αυτών [16,17].



Εικόνα. 4 Σημαντικοί σταθμοί στην εξέλιξη των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών (DES) [14]

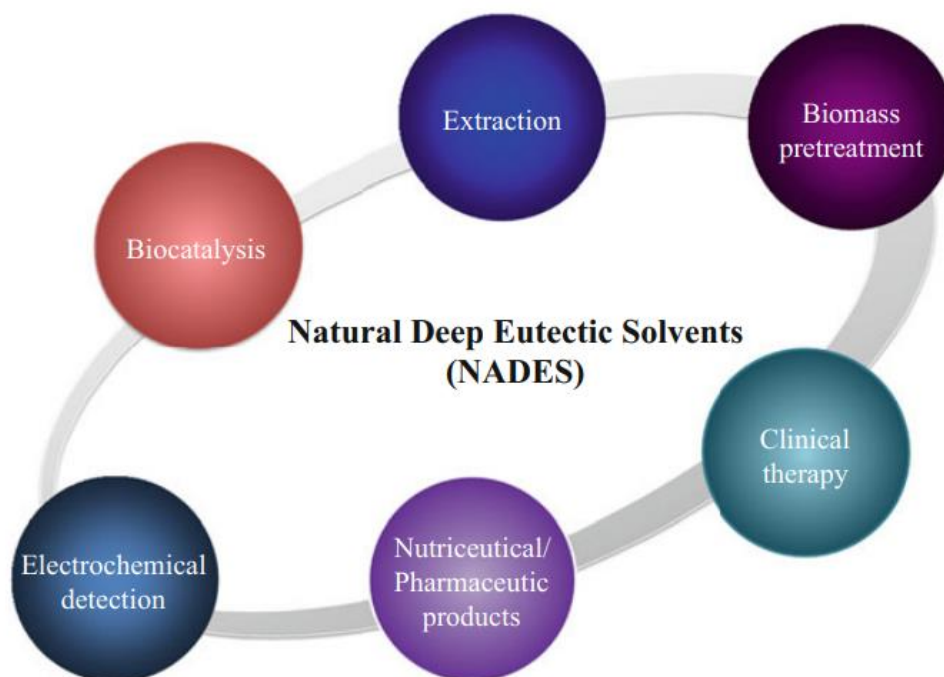
Ειδικότερα, οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NADES) είναι μια ειδική υποομάδα των DES που περιλαμβάνει πρωτογενείς φυτικούς μεταβολίτες [19] όπως οργανικά οξέα, αλκοόλες, παράγωγα χολίνης, αμινοξέα ή σάκχαρα, παράλληλα, εκτός αυτού, το νερό μπορεί επίσης να αποτελεί μέρος της σύνθεσης των φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών [10,14,20].

Λόγω των πλεονεκτημάτων τους, δηλαδή ότι είναι:

- φυσικοί,
- έχουν χαμηλό κόστος και απλότητα παρασκευής,
- έχουν χαμηλή πτητικότητα,
- βρίσκονται στην υγρή κατάσταση ακόμη και σε θερμοκρασίες κάτω του μηδενός,
- είναι βιοδιασπώμενοι,
- έχουν βιωσιμότητα,
- έχουν υψηλό δυναμικό εκχύλισης και σταθεροποίησης,
- μη αναφλεξιμότητα,

- και λόγω της μη τοξικότητας των συστατικών τους, φέρονται να διαθέτουν χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα και καλύτερη βιοσυμβατότητα

η οποία τους καθιστά ως πολλά υποσχόμενους πράσινους διαλύτες και μοναδικά λειτουργικά υγρά μέσα. Αυτοί είναι οι κύριοι λόγοι για τους οποίους έχουν κερδίσει δημοτικότητα σε πολλούς διαφορετικούς τομείς τα τελευταία χρόνια [16,17,19].



Εικόνα. 5 Διάφοροι τομείς στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NADES) [13]

Δεν αποτελεί λοιπόν έκπληξη το γεγονός ότι έχουν βρει εφαρμογή σε πολλούς διαφορετικούς τομείς όπως, αυτός της εκχύλισης και του διαχωρισμού στον οποίο έχουν αντικαταστήσει τους οργανικούς διαλύτες, στην προστασία του περιβάλλοντος, στις ενζυμικές αντιδράσεις ,ενώ λόγω της εξαιρετικής διαλυτότητας πολλών μη υδατοδιαλυτών βιοδραστικών ενώσεων εφαρμόζονται ενεργά ως μελλοντικά συστήματα χορήγησης βιοδραστικών ενώσεων στην βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων [14,20,21]. Ταυτόχρονα, οι ισχυρές διαλυτικές ιδιότητές τους έχουν προσελκύσει ευρεία προσοχή και έχουν αποδείξει ότι υπερέχουν στη διάλυση πολλών παραδοσιακών φτωχά υδατοδιαλυτών ή λιποδιαλυτών ενώσεων [17].

1.2.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες των DES και των NaDES

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών είναι ένας από τους κύριους λόγους της ύπαρξης του αυξανόμενου ενδιαφέροντος των ερευνητών για αυτούς. Εκτός από τη χαμηλή πτητικότητα, τη μη αναφλεξιμότητα, τη χαμηλή πίεση ατμών και τη χημική και θερμική σταθερότητα, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες είναι χημικά προσαρμοσσιμοι διαλύτες, δηλαδή οι φυσικές/χημικές ιδιότητές τους μπορούν να ρυθμιστούν λεπτομερώς μεταβάλλοντας τις συνθέσεις τους, με την επιλογή των συστατικών και τις μοριακές αναλογίες τους. Κάποιες από τις κύριες φυσικοχημικές ιδιότητες των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών είναι η συμπεριφορά των φάσεων, η πυκνότητα, το ιξώδες, η ιοντική αγωγιμότητα, η επιφανειακή τάση, η θερμοκρασία πήξης και η πολικότητα. [13,14,22] Αυτό δεν είναι σε καμία περίπτωση ένας πλήρης κατάλογος όλων των σχετικών ιδιοτήτων των DES, καθώς οι ερευνητές έχουν επίσης μετρήσει ιδιότητες που είναι εξαιρετικά σημαντικές, για συγκεκριμένες εφαρμογές (όπως μεταβολές του μοριακού όγκου, μεταβολές της θερμικής σταθερότητας, συντελεστές ενεργότητας, μοριακή θερμοχωρητικότητα, μετρήσεις πολικότητας, ενθαλπίες ανάμιξης, περίσσεια μοριακών όγκων, ταχύτητα του ήχου και πολλές άλλες) [9].

Ο μοναδικός συνδυασμός HBA:HBD οδηγεί σε DES με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των DES μπορούν να χειραγωγηθούν χρησιμοποιώντας διάφορους συνδυασμούς HBA και HBD, σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες. Εκτός από την ποικιλία των HBA προς HBD, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των DES επηρεάζονται και από τη μοριακή αναλογία των HBA και HBD, την καθαρότητα των HBA και HBD, τη θερμοκρασία, την περιεκτικότητα σε νερό και τη μέθοδο παρασκευής [23].

Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ HBA και HBD είναι ο κύριος κινητήριος παράγοντας για τον σχηματισμό των DES. Η αύξηση του αριθμού των λειτουργικών ομάδων -OH στο HBD έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μεγαλύτερου αριθμού δεσμών υδρογόνου. Όταν ο αριθμός των δεσμών υδρογόνου αυξάνεται, τότε κατά συνέπεια μειώνονται οι ελεύθεροι διαθέσιμοι χώροι με αποτέλεσμα την αύξηση της πυκνότητας του DES. Παρόμοια συμπεριφορά αναφέρεται όταν αυξάνεται ο αριθμός των αρωματικών ομάδων ή των αλκυλο-αλυσίδων των οργανικών οξέων. Οι πυκνότητες όλων των DES μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η θέρμανση οδηγεί σε μεγαλύτερη μοριακή δραστηριότητα και κινητικότητα, η οποία αυξάνει τον μοριακό όγκο του DES και τελικά μειώνει την πυκνότητα [23,24]. Από την άλλη πλευρά, όλες οι μελέτες συμφωνούν ότι, σε αντίθεση με την πυκνότητα, τόσο το ιξώδες όσο και η αγωγιμότητα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην παρουσία νερού σε βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες [14].

Το ιξώδες των DES επηρεάζεται κυρίως από τη χημική φύση των HBAs και HBDs όπως και από την περιεκτικότητα του DES σε νερό, καθώς αυτό είναι ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια κατά την εξέταση του ιξώδους των DES. Ταυτόχρονα, το

ιξώδες και η ηλεκτρική αγωγιμότητα επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία, καθώς το ιξώδες μειώνεται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η θέρμανση αυξάνει τη μέση ταχύτητα των μορίων στο υγρό ενώ μειώνει την εσωτερική αντίσταση των μορίων. Ταυτόχρονα, ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ HBA και HBD εξασθενεί με την αύξηση της θερμοκρασίας, οδηγώντας σε μείωση του ιξώδους του μίγματος [23,24,25].

Τα σημεία τήξης των DES είναι πολύ χαμηλότερα από εκείνα των HBA και HBD τους και η ιδιότητα αυτή αποδίδεται στον μεγάλο όγκο ιόντων, στην ασύμμετρη κατανομή φορτίου και στη μείωση της δύναμης Coulomb των DES. Τα σημεία τήξης και τα εύρη θερμοκρασίας υγρού των DES επηρεάζονται κυρίως από την ιοντική συμμετρία, την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και άλλα. Όμως, με την απώλεια της δομής ιοντικής συμμετρίας, ακολουθεί η χαμηλότερη θερμοκρασία ψύξης.

Η πολικότητα των DES είναι μια σημαντική παράμετρος που καθορίζει την εκχυλιστική τους ικανότητα και την αναμιξιμότητά τους με άλλους διαλύτες. Γενικά, η πολικότητα αυξάνεται με την αύξηση της διαμοριακής έλξης, η οποία σχετίζεται κυρίως με τη μοριακή δομή. Η πολικότητα των DES μειώνεται σημαντικά καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία λόγω της θραύσης του δικτύου των δεσμών υδρογόνου. Ένας άλλος παράγοντας ο οποίος έχει εμφανή επίδραση στην πολικότητα είναι η εισαγωγή νερού στα ευτηκτικά μίγματα και αυτό συμβαίνει διότι οι αλληλεπιδράσεις των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών του DES αρχίζουν να εξασθενούν κατά την αραιώση, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πολικότητας.

Τα όξινα DES σχηματίζονται εύκολα όταν τα οργανικά οξέα είναι HBDs. Στα DES με βάση άλατα-καρβοξυλικά οξέα, η οξύτητα παρέχεται κυρίως από το οργανικό οξύ που υπάρχει στο μίγμα. Η αύξηση της αλκυλικής πλευρικής αλυσίδας της ένωσης μειώνει την ικανότητα του διαλύτη να δίνει πρωτόνια. Από την άλλη πλευρά, το pH μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας και της περιεκτικότητας σε νερό. Αρκετά DES είναι ιδιαίτερα όξινα, όπως το CHCl_3 -μαλονικό οξύ, το CHCl_3 -κιτρικό οξύ και το CHCl_3 -οξαλικό οξύ. Λόγω της καλής διαλυτότητάς τους, χρησιμοποιούνται ευρέως στη μετατροπή βιομάζας, στην εκχύλιση και το διαχωρισμό, στη διαλυτοποίηση φαρμάκων και στην καταλυτική αντίδραση. Τα όξινα DES έχουν υψηλότερες δυνατότητες κλασματοποίησης και απολιγνινοποίησης [24].

Οι μελέτες σχετικά με την επιφανειακή τάση των DES είναι αρκετά περιορισμένες σε σύγκριση με τις μελέτες που αφορούν άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες. Ωστόσο, αποτελεί μια σημαντική ιδιότητα, καθώς εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ένταση των διαμοριακών δυνάμεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ του HBD και του αντίστοιχου άλατος. Λόγω αυτού, τα υψηλά ιξώδη υγρά παρουσιάζουν υψηλές επιφανειακές τάσεις.[14]

Η υψηλότερη θερμοκρασία διάσπασης των DES σημαίνει ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε υψηλότερη θερμοκρασία και ότι έχουν μεγαλύτερη σταθερότητα,

η οποία εξαρτάται από τη σύνθεσή τους, τη μοριακή αναλογία και το χρόνο θέρμανσης. Επηρεάζεται επίσης, από τον αριθμό των ομάδων HBD ή HBA, τη χωρική δομή και τις λειτουργικές ομάδες. Τα DES με μεγαλύτερο ποσοστό δομών καρβοξυλίου (-COOH) είναι πιο σταθερά. Η σταθερότητα και ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μπορεί να επηρεάζεται και από τον αριθμό των ομάδων δεσμών υδρογόνου και την τρισδιάστατη δομή τους [24].

1.3 Ευτηκτογέλες

1.3.1 Ορισμός, κατηγορίες & τρόποι παρασκευής ευτηκτογελών

Οι υδρογέλες αποτελούν ένα τρισδιάστατο διασυνδεδεμένο πολυμερικό δίκτυο το οποίο είναι διογκωμένο με νερό, ενώ παράγονται από την απλή αντίδραση ενός ή περισσότερων μονομερών. Ταυτόχρονα, πρόκειται για ένα πολυμερικό υλικό που παρουσιάζει την ικανότητα να διογκώνεται και να συγκρατεί ένα σημαντικό κλάσμα νερού εντός της δομής του, αλλά δεν διαλύεται σε αυτό. [26]

Ως μια πιθανή εναλλακτική λύση απέναντι στις υδρογέλες, οι ευτηκτογέλες είναι μια νέα κατηγορία μαλακών υλικών που εμφανίστηκαν στην οικογένεια των γελών τα τελευταία χρόνια. Αποτελούνται από διασταυρωμένα πολυμερικά δίκτυα και βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (DES) ή φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NADES) [27,28]. Οι κύριες κατηγορίες στις οποίες μπορούν να χωριστούν οι ευτηκτογέλες DES, είναι οι εξής :

- πολυμερικές γέλες στις οποίες οι DES δρουν μόνο ως διαλύτες (Eutectogels-S),
- πολυμερικές γέλες στις οποίες οι DES δρουν ως διαλύτες και πολυμερισμένα μονομερή (Eutectogels-P),
- υπερμοριακές γέλες στις οποίες οι DESs δρουν ως διαλύτες (Supramolecular Eutectogels) [15].

Η διερεύνηση των στρατηγικών παρασκευής των ευτηκτογελών είναι ζωτικής σημασίας για την προώθηση της ανάπτυξής τους. Επί του παρόντος, οι τρεις κύριες μέθοδοι για την παρασκευή ευτηκτογελών είναι :

- ο πολυμερισμός σε DES ,
- ο πολυμερισμός μονομερών DES ή DES,
- η συναρμολόγηση πολυμερών σε DES.

Ωστόσο, ο αναπόφευκτος ατελής πολυμερισμός στις δύο πρώτες μεθόδους οδηγεί σε τοξικά κατάλοιπα, δημιουργώντας δυνητικούς κινδύνους. Ως αποτέλεσμα, η τρίτη προσέγγιση, η οποία περιλαμβάνει την κατασκευή φυσικών ευτηκτογελών με την αυθόρμητη συναρμολόγηση πολυμερών σε DES και το σχηματισμό τρισδιάστατων

(3D) μη ομοιοπολικών διασταυρούμενων ικριωμάτων, έχει λάβει αυξανόμενη προσοχή λόγω της ευκολίας παρασκευής και της βιοασφάλειας της .[29] Οι ευτηκτογέλες οι οποίες σχεδιάζονται από διασταυρωμένα πολυμερή, μπορούν επίσης να παρασκευαστούν από πηκτωματοποιητές χαμηλού μοριακού βάρους (LMWGs-low molecular weight gelators), με αποτέλεσμα αυτοοργανωμένα δίκτυα δημιουργημένα μέσω υπερμοριακών αλληλεπιδράσεων.[30]

Ενώ ο σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ πολυμερικών αλυσίδων σε ολόκληρο το τρισδιάστατο πολυμερικό δίκτυο είναι μια απλή μέθοδος για την δημιουργία οποιασδήποτε κατηγορίας αυτών των μη υδατικών ηλεκτρολυτικών πηκτωμάτων, τέτοιου είδους ικρίωματα τείνουν να παράγουν εύθραυστες ευτηκτογέλες των οποίων η ελαστικότητα μπορεί να είναι περιορισμένη σε υψηλές πυκνότητες διασταυρωμένων δεσμών. Δεν αυτοθεραπεύονται και έχουν ανεπαρκή επιφανειακή προσαρμοστική πρόσφυση λόγω της μη αναστρεψιμότητας της διάσπασης των ομοιοπολικών δεσμών. Αντίθετα, οι μη ομοιοπολικοί σταυροδεσμοί (π.χ. αυτοί που σχηματίζονται από δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις Coulomb, διαλυτοφοβικότητα κ.λπ.) μεταξύ πολυμερικών αλυσίδων, πηκτωμάτων χαμηλού μοριακού βάρους (LMWGs) ή άλλων κολλοειδών νανοδομών ,μπορούν να επιτρέψουν πολύ μεγαλύτερη διάχυση ενέργειας και συχνά μπορούν να αυτοθεραπευτούν ή να αναδιαμορφωθούν εύκολα λόγω της ασθενέστερης, αναστρέψιμης φύσης των σταυροδεσμών τους. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα πιθανών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων για να αξιοποιηθούν κατά το σχεδιασμό ευτηκτογελών- ωστόσο, μόνο ένα μέρος αυτών έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα. Ταυτόχρονα, η τρέχουσα βιβλιογραφία βρίσκει πολυάριθμα παραδείγματα μη ομοιοπολικά διασυνδεδεμένων υδρογελών που παρουσιάζουν επιθυμητά φυσικά χαρακτηριστικά, όπως: ακραία ελαστικότητα, ικανότητα αυτοΐασης, ακόμη και υποβρύχια πρόσφυση[31].

Η πηκτωματοποίηση μπορεί επίσης να επιτευχθεί με την προσθήκη ορισμένων μικρών μορίων/χαμηλού μοριακού βάρους, τους πηκτωματοποιητές (LMWGs), ορισμένα από τα οποία έχουν επιφανειοδραστικό χαρακτήρα, στα DES. Συνήθως, μια μικρή ποσότητα (<5 wt%) του LMWG διαλύεται πρώτα στο DES σε αυξημένη θερμοκρασία-κατά την ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, μπορεί να συμβεί αυτοοργάνωση ενός τρισδιάστατου δικτύου LMWG, που οδηγεί σε πηκτωματοποίηση. Οι κύριες μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις που είναι υπεύθυνες για τη συναρμολόγηση των LMWG κατά το σχηματισμό ευτηκτογελών είναι ο δεσμός υδρογόνου και οι διαλυτοφοβικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες συχνά εμφανίζονται μαζί.[31] Επιπλέον, δεδομένου ότι ο τύπος των LMWGs είναι περιορισμένος και τα DES μπορεί να παρεμβαίνουν στην αυτοοργάνωση των LMWGs, η παρασκευή ευπροσάρμοστων υπερμοριακών ευτηκτογελών απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό και είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, περιορίζοντας έτσι σημαντικά την ανάπτυξη τους [32].

Συγκεκριμένα, οι δεσμοί υδρογόνου αποτελούν την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στρατηγική συναρμολόγησης μη ομοιοπολικών ικριωμάτων για ευτηκτογέλες. Μερικά από τα βασικά συμπεράσματα από τα υλικά ευτηκτογέλης συμπεριλαμβάνουν ότι :

- Ο δεσμός υδρογόνου, συχνά σε συνδυασμό με διαλυτοφοβικά φαινόμενα, είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για τη μη ομοιοπολική συναρμολόγηση ικριωμάτων ευτηκτογέλης.
- Οι πηκτωματοποιητές χαμηλού μοριακού βάρους (LMWGs) και τα πολυμερή βιολογικής προέλευσης έχουν χρησιμοποιηθεί συχνότερα για ευτηκτογέλες απ' ό,τι για ιοντογέλες τα τελευταία χρόνια.
- Η χρήση δύο διαφορετικών, συμπληρωματικών ικριωμάτων ,δηλαδή διπλών δικτύων, είναι επίσης πιο συνηθισμένη για τις ευτηκτογέλες ,ειδικότερα για την επίτευξη εξαιρετικών μηχανικών ιδιοτήτων εις βάρος της ικανότητας αυτοϊασης και ανακύκλωσης

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η συντριπτική πλειονότητα των ευτηκτογελών που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιήσει DES με βάση το ChCl . [31,32]

1.3.2 Ιδιότητες και εφαρμογές ευτηκτογελών

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η ταυτόχρονη ενσωμάτωση εξαιρετικών μηχανικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων, ισχυρής συγκολλητικότητας, εξαιρετικής ικανότητας αυτοθεραπείας, καθώς και πολλαπλών δυνατοτήτων ανίχνευσης σε μια ευτηκτογέλη μπορούν να επιτευχθούν εύκολα με την εισαγωγή δύο αντίθετα φορτισμένων πολυηλεκτρολυτών σε ένα DES. Συγκεκριμένα, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο αντίθετα φορτισμένων διακλαδισμένων πολυηλεκτρολυτών είναι αρκετά ισχυρές για να παρέχουν φυσικές ευτηκτογέλες με ευρέως ρυθμιζόμενες μηχανικές ιδιότητες και αξιοσημείωτη ικανότητα αυτοθεραπείας.[30]

Γενικότερα ,λόγω της άριστης ελαστικότητάς τους, της μη πτητικής τους φύσης και των ιδιοτήτων πρόσφυσης, προσελκύουν μεγάλο ενδιαφέρον στον βιοϊατρικό χώρο, ενώ έχουν ανυπολόγιστες προοπτικές στην ενέργεια ,την ηλεκτρονική και την περιβαλλοντική επιστήμη. [27, 33]. Οι ευτηκτογέλες οι οποίες χρησιμοποιούν φυσικά αλληλεπιδρώντα πολυμερικά δίκτυα, συχνά επαινούνται για τη βιοασφάλεια, γεγονός που τις καθιστά ως βιώσιμη εναλλακτική λύση έναντι των χημικά διασυνδεδεμένων πηκτωμάτων. Ωστόσο, λόγω των ασθενών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, συνήθως δεν διαθέτουν επαρκή σταθερότητα και μηχανική αντοχή.[34]

Οι ευτηκτογέλες που έχουν ισορροπημένες μηχανικές ιδιότητες και ιοντική αγωγιμότητα είναι πιο ελκυστικές για εφαρμογές σε εύκαμπτες συσκευές. Μέχρι στιγμής, η διατήρηση της υψηλής ιοντικής αγωγιμότητας και η απόκτηση καλών μηχανικών ιδιοτήτων χωρίς τον κίνδυνο διαρροής DES ήταν καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη ευτηκτογελών για φορητές συσκευές. Ωστόσο, οι περισσότερες

ευτηκτογέλες που κατασκευάζονται με διασύνδεση ομοιοπολικών δεσμών έχουν περιορισμένη ελαστικότητα και δεν είναι αυτοθεραπευόμενες μετά από την παραμόρφωση, λόγω της μη αναστρεψιμότητας της διάσπασης των ομοιοπολικών δεσμών. Έτσι, ο τρόπος κατασκευής ισχυρών και ανθεκτικών φυσικών ευτηκτογελών παραμένει μια μεγάλη πρόκληση [34,35]. Ωστόσο αυτές αποτελούν μια υποσχόμενη επιλογή για νέους εύκαμπτους ιοντικούς αγωγούς, με μεγάλες δυνατότητες για εφαρμογές στη μαλακή ρομποτική, στις συσκευές ιατρικής παρακολούθησης, και άλλους τομείς.[29]

Τέλος, σε διάφορους μεταφορείς χορήγησης φαρμάκων, οι υδρογέλες έχουν λάβει σημαντική προσοχή επειδή είναι πιο κοντά στους ζωντανούς ιστούς από άλλα συνθετικά υλικά. Η χρήση των υδρογελών έχει επεκταθεί σε διάφορες βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές, κάνοντας χρήση τους από το στόμα, διαδερμικά και μέσω άλλων οδών χορήγησης [36].Ως εκ τούτου, οι γέλες με βάση τα NADES θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν ένα καλύτερο μεταφορέα χορήγησης φαρμάκων, από τις υδρογέλες, για δυσδιάλυτα βιοδραστικά συστατικά και φάρμακα[33,36].

1.3.3 Σύγκριση δομικών ιδιοτήτων & χαρακτηριστικών των Ευτηκτογελών σε σχέση με τις Υδρογέλες

Οι υδρογέλες, ως ένας τύπος πηκτώματος, εφαρμόζονται εκτενώς στους τομείς της βιοϊατρικής και της χημείας. Ομοίως, δεδομένου ότι οι NADES μπορούν να θεωρηθούν ως άριστα υποψήφια μέσα εκχύλισης και συστήματα μεταφοράς βιοδραστικών ενώσεων και ενζύμων, οι ευτηκτογέλες αναμένεται να έχουν ευρείς δυνατότητες εφαρμογής στα τρόφιμα και την ιατρική. Ως μια πιθανή εναλλακτική λύση για τις υδρογέλες, οι ευτηκτογέλες σχηματίζονται με τη πηκτωματοποίηση φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών (NADES) που μπορεί να είναι πιο κοντά στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον από το καθαρό νερό. Εξάλλου, από την άποψη της κυτταρικής βιολογίας, δεδομένου ότι θεωρούνται ως ένα πιθανό τρίτο υγρό στα βιολογικά κύτταρα ,εκτός από το νερό και το λάδι, και καθώς η φύση της γέλης του κυτταροπλάσματος αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο, η μελέτη των πηκτωμάτων με βάση το NADES θα συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση του κυτταρικού μεταβολισμού στα βιολογικά συστήματα[17].

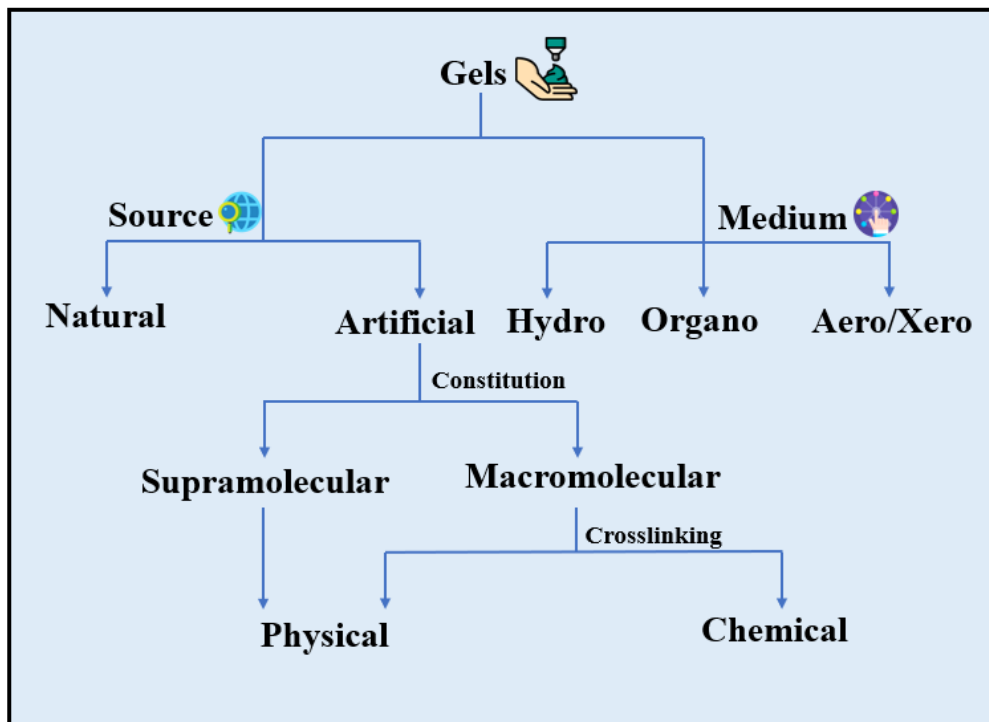
Δεδομένου ότι οι NADES είναι ένα είδος ελεγχόμενου διαλύτη (με βάση το συνδυασμό διαφορετικών συστατικών, μπορούν να σχηματιστούν διάφοροι διαλύτες), είναι επωφελές για τη λήψη διαφόρων ευτηκτογελών με διαφορετικές ιδιότητες πηκτώματος. Επομένως, με βάση τα χαρακτηριστικά των συστατικών της φυσικής πηγής, ως νέος τύπος πηκτώματος με περισσότερα πλεονεκτήματα από τις παραδοσιακές υδρογέλες και τις ιοντικές γέλες, αυτή η βιοδιασπώμενη και θερμοσταθερή ευτηκτογέλη αναμένεται να παρουσιάσει περισσότερες προοπτικές εφαρμογής[17].

Οι ευτηκτογέλες στο μεγαλύτερο μέρος του δικτύου τους είναι ικανές να έχουν αποθηκευμένο NADES ,λόγω της δράσης των τριχοειδών δυνάμεων. Ενώ ταυτόχρονα, ο πηκτωματοποιητής αντιπροσωπεύει ένα πολύ μικρό ποσοστό τους ,κατά βάρος.[37]

Οι υπερμοριακές ευτηκτογέλες που αναπτύσσονται με αυτοσυναρμολογημένα LMWGs μέσω διαμοριακών μη ομοιοπολικών δεσμών όπως ο δεσμός υδρογόνου και οι διαλυτοφοβικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες συχνά εμφανίζονται μαζί, είναι υπεύθυνες για τη συναρμολόγηση των LMWG κατά το σχηματισμό των ευτηκτογελών. Χαρακτηρίζονται από πλεονεκτήματα όπως είναι η απλή παρασκευή, η θερμική αναστρεψιμότητα και η απόκριση σε πολλαπλά ερεθίσματα. Παράλληλα, η καλή συμβατότητα των LMWGs με τα DES είναι επωφελής για την αποφυγή της διαρροής των DES και η χαμηλή ποσότητα πηκτωματοποιητή που απαιτείται για τη πηκτωματοποίηση μπορεί να διασφαλίσει ότι οι αγωγιμότητες των ευτηκτογελών είναι συγκρίσιμες με αυτές των καθαρών DES[31,38].

Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις αξιοποιούνται για τη δημιουργία ευτηκτογελών που μπορούν να παρουσιάσουν εξαιρετικά ελαστική μηχανική συμπεριφορά και συχνά αυτοθεραπευτική φύση. Χαρακτηρίζεται από σημαντικούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των επιμέρους συστατικών της (δηλ. HBA και HBD) που οδηγούν σε θερμοδυναμικά μη ιδανική συμπεριφορά μίγματος. Συνεπώς, δεν αποτελεί ίσως έκπληξη το γεγονός ότι ο δεσμός υδρογόνου είναι επίσης η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στρατηγική συναρμολόγησης μη ομοιοπολικών κριωμάτων για ευτηκτογέλες που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα. [31].

Οι υδρογέλες είναι χημικά ή φυσικά διασυνδεδεμένα πολυμερή, με τρισδιάστατη δομή που μπορεί να διατηρεί την ακεραιότητά της και να διογκώνεται στο νερό χωρίς να διαλύεται ,ενώ έχουν ήδη προσροφημένη μεγάλη ποσότητα νερού. Η διασύνδεση εντός του πολυμερικού δικτύου τους προσδίδει την τρισδιάστατη δομή τους και εμποδίζει τη διάλυσή τους στο νερό, μέσω της διατήρησης των θέσεων των πολυμερικών αλυσίδων (λόγω διασύνδεσης) εμποδίζοντάς τις από το να διαλυθούν ή να εκπλυθούν.[39,40]



Εικόνα. 6 Ταξινόμηση των συμβατικών γελών

Σε αυτές, η χημική διασύνδεση είναι μόνιμη και η δομή που αποκτάται είναι πολύ σταθερή, ενώ η φυσική διασύνδεση είναι δυναμική, αν και η δομική σταθερότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το εξωτερικό περιβάλλον. Τα χαρακτηριστικά αυτά προσδίδουν στις υδρογέλες ξεχωριστές επιδόσεις με βάση τη μεταβλητή αντοχή των δεσμών, καθώς ο μηχανισμός διασύνδεσης είναι κείρας σημασίας για τον καθορισμό της δομής, των ιδιοτήτων και των επιδόσεων της υδρογέλης [40,41].

- Η χημική διασύνδεση περιλαμβάνει το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας τρισδιάστατης δομής δικτύου .
- Η φυσική διασύνδεση βασίζεται σε αναστρέψιμες, μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυμερικών αλυσίδων για το σχηματισμό μιας δομής δικτύου . Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ή τη φυσική εμπλοκή των πολυμερικών αλυσίδων .

Η επιλογή μεταξύ χημικής και φυσικής διασύνδεσης εξαρτάται από τις επιθυμητές ιδιότητες και εφαρμογές της υδρογέλης. [40]

Τέλος, οι ευτηκτογέλες υπερτερούν των παραδοσιακών υδρογελών με ευαισθησία στη θερμοκρασία [34] ενώ υπερέχουν εξίσου σε σύγκριση με άλλους τύπους πηκτωμάτων, όπως τα ιοντικά πηκτώματα με ασθενή βιοσυμβατότητα και υψηλό κόστος.[29] Γενικότερα, η αγωγιμότητα των υδρογελών είναι σχετικά υψηλή, ενώ η σταθερότητα

των οργανογελών είναι καλύτερη. Οι ευτηκτογέλες είναι αυτές που συνδυάζουν την σταθερότητα των οργανογελών με την αγωγιμότητα των υδρογελών.[15]

1.4 Χρυσίνη

1.4.1 Η οικογένεια των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών όπου περιέχουν μεγάλες ομάδες πολυφαινολικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες παρουσιάζουν οφέλη για την ανθρώπινη υγεία λόγω των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Το ενδιαφέρον για τα φλαβονοειδή έχει αυξηθεί, καθώς αυτές οι πολύτιμες ενώσεις δρουν μέσω διαφόρων φυσιολογικών μηχανισμών και επηρεάζουν μια μεγάλη ποικιλία δικτύων σηματοδότησης. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περίπου 5000 διαφορετικά φλαβονοειδή, ενώ οι διατροφολόγοι υπολογίζουν ότι η κατά προσέγγιση μέση πρόσληψη φλαβονοειδών από τον άνθρωπο, με μια κανονική διατροφή, είναι 1-2 g/ημέρα .[42,43]

Τα φλαβονοειδή είναι φυσικές πολυφαινόλες με μοτίβα υδροξυλίωσης και υποκαταστάσεων που οδηγούν σε διάφορες υποκατηγορίες, όπως φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες, φλαβονόλες, φλαβόνες, κατεχίνες (ή φλαβανόλες), ισοφλαβόνες, διυδροφλαβονόλες και χαλκόνες. Οι πολλά υποσχόμενες πηγές διαιτητικών φλαβονοειδών είναι τα φρούτα και τα λαχανικά, εξαιτίας των οποίων απομακρύνονται διάφορα προβλήματα υγείας. Τα φλαβονοειδή είναι ζωτικής σημασίας συστατικά διαφόρων φαρμακευτικών φυτών, με αποτέλεσμα να έχουν διάφορα φαρμακολογικά οφέλη . [42,44]

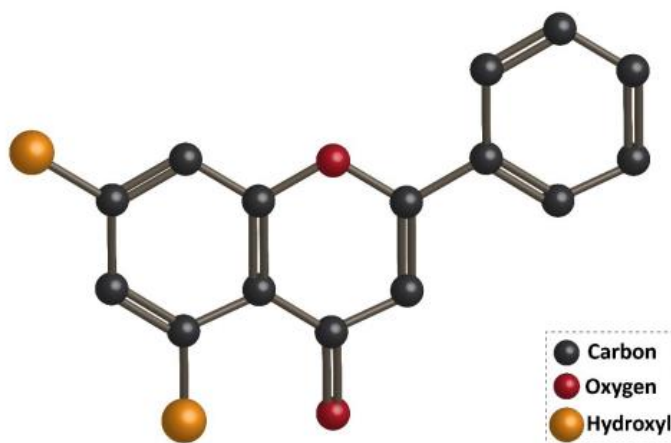
Ταυτόχρονα, μεταξύ του τεράστιου αριθμού φυτικών μεταβολιτών, τα φλαβονοειδή έχουν επιβεβαιωθεί για την πρόληψη νευροεκφυλιστικών ασθενειών από αρκετές κλινικές μελέτες. Ενώ η κατανάλωση φλαβονολών έδειξε σημαντική, αρνητική συσχέτιση με την άνοια μεταξύ άλλων φλαβονοειδών. Ο μηχανισμός που συμμετείχε στη νευροπροστασία των φλαβονοειδών μπορεί να περιλαμβάνει αντιοξειδωτική, αντι-αποπτωτική, αντι-νευροφλεγμονώδη δράση και διαμόρφωση διαφόρων κυτταρικών και μοριακών στόχων που μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της σοβαρότητας των νευρολογικών διαταραχών . [45]

1.4.2 Χρυσίνη, πηγές & ιδιότητες της

Το φυσικό φλαβονοειδές, χρυσίνη (5,7-διυδροξυφλαβόνη) ανήκει σε μια κατηγορία φλαβόνων πολυφαινολικών ενώσεων που έχουν σκελετό αποτελούμενο από 15 άτομα άνθρακα.[23] Αυτή έχει κοινή χημική δομή, η οποία αποτελείται από δύο συνενωμένους δακτυλίους, Α και C, και έναν φαινυλικό δακτύλιο, Β, συνδεδεμένο στη

δεύτερη θέση του δακτυλίου C. Μοιράζεται την κοινή δομή της φλαβόνης, με μια πρόσθετη ομάδα υδροξυλίου στην 5η και 7η θέση του δακτυλίου A. Τα φαινυλοπροπανοειδή είναι μια ποικιλόμορφη οικογένεια οργανικών ενώσεων που συντίθενται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη [42].

Την συναντάμε σε μια σειρά φυτών όπως το χαμομήλι ,ενώ μπορεί να βρεθεί και στις κηρήθρες ,στην πρόπολη, στο μέλι, στα μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* , τα φρούτα του πάθους (*Passiflora* sp.) και σε πολλά άλλα φυτά ,φρούτα και λαχανικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρυσίνη εμφανίζεται σε φυσικές πηγές με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα , η συγκέντρωση της χρυσίνης στο μέλι μελιτώματος είναι 0,10 mg/kg ,ενώ υψηλότερη συγκέντρωση (5,3 mg/kg) βρίσκεται στα μέλια δασών ,καθώς η περιεκτικότητα της χρυσίνης στην πρόπολη εκτιμάται σε 25 g/L . [43,44]



Εικόνα. 7 Χημική δομή της χρυσίνης[43]

Το μόριο της χρυσίνης, σε πρόσφατες μελέτες , έχει αποδειχθεί ότι έχει πολλές βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών, αντικαρκινικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων.[42] Ολοένα και περισσότερα στοιχεία αποδεικνύουν ότι διαθέτει αποτελέσματα που προάγουν συνολικά την υγεία, συμπεριλαμβανομένων και των αντιδιαβητικών, νευροπροστατευτικών, ηπατοπροστατευτικών , καρδιοπροστατευτικών επιδράσεων της. [43,45]

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες της ξεχωρίζουν μεταξύ των βιολογικών χαρακτηριστικών της, ενώ οι αντικαρκινικές επιδράσεις της διαμεσολαβούνται μέσω της αναστολής και της πρόληψης μιας σειράς διαδικασιών στα καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, της αυτοφαγίας, της αγγειογένεσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.[46,48] Ωστόσο, οι μηχανισμοί που διέπουν τις αντικαρκινικές επιδράσεις της χρυσίνης δεν είναι καλά κατανοητοί και χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να γίνουν, παρόλα αυτά το δυναμικό της χρυσίνης ως χημειοπροληπτικού

παράγοντα είναι αποδεδειγμένο .[47,48] Αποδεδειγμένες είναι και οι νευροπροστατευτικές επιδράσεις στην κατάθλιψη, το άγχος, τη νευροφλεγμονή, τη νόσο του Alzheimer, τη νόσο του Parkinson, τη νόσο του Huntington, την επιληψία, την εγκεφαλική ισχαιμία, τον τραυματισμό του νωτιαίου μυελού, τη νευροπάθεια, τη σκλήρυνση κατά πλάκας[45]

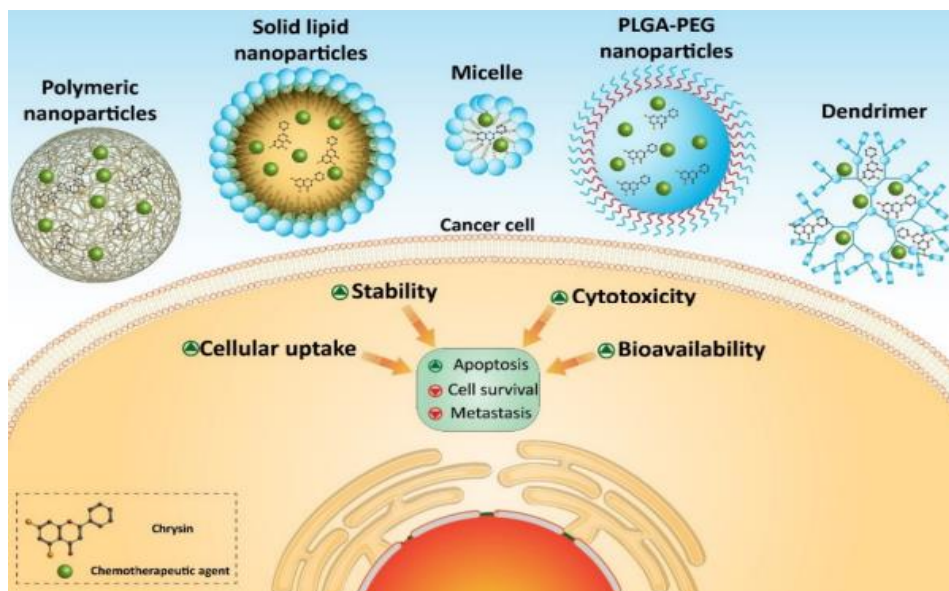


Εικόνα. 8 Σχηματική αναπαράσταση των επιδράσεων της χρυσίνης στην προαγωγή της υγείας σε προκλινικές μελέτες [43]

Ωστόσο, από την άλλη πλευρά, η ελεύθερη χρήση της σε κλινικά σενάρια μειονεκτεί λόγω της υδρόφοβης φύσης της, της κακής υδατοδιαλυτότητας, του γρήγορου μεταβολισμού χωρίς να εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και της μη ειδικής τοξικότητας [49,50]. Τα συσσωρευμένα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η κακή απορρόφηση, ο γρήγορος μεταβολισμός και η συστηματική αποβολή ευθύνονται για την κακή βιοδιαθεσιμότητα της χρυσίνης στον άνθρωπο που, στη συνέχεια, περιορίζουν τα θεραπευτικά της αποτελέσματα . [43] Έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή είναι αρκετά αποτελεσματικά σε χαμηλές δόσεις, αντίθετα όμως μπορεί να επιφέρουν και τοξικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, εάν καταναλωθούν σε πλεονάζουσες ή μεγαλύτερες ποσότητες. Παρόλα αυτά, μπορεί επίσης να προκαλέσει τοξικότητα στα ηπατικά κύτταρα ακόμη και στις ημερήσιες συγκεντρώσεις της, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία . Οι κυτταροτοξικές επιδράσεις της χορήγησης χρυσίνης αποδίδονται στην όμοια -με υπεροξειδάση- δράση της στα ηπατοκύτταρα η οποία προκαλεί την παραγωγή τοξικών υποπροϊόντων της χρυσίνης. [44].

1.4.3 Νανοσωματίδια Χιτοζάνης-Χρυσίνης (CS-Chr NPs)

Εν τούτοις, η χρυσίνη λόγω της κακής διαλυτότητάς της, απορροφάται ελάχιστα από τον οργανισμό. Ωστόσο, μια πολύ ενδιαφέρουσα λύση σε αυτό το πρόβλημα αποτελεί η νανοενθλάκωση. Έχουν διερευνηθεί διάφορα νέα συστήματα χορήγησης φαρμάκων για να ξεπεραστεί η κακή διαλυτότητα των φλαβονοειδών. Σε αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί πολυμερή και επιφανειοδραστικές ουσίες για να διευκολυνθεί η διαλυτοποίηση των φτωχά διαλυτών φλαβονοειδών. Ένα τέτοιο πολυμερές είναι η χιτοζάνη (CS). Η χιτοζάνη είναι ένας φυσικός μη τοξικός, βιοσυμβατός, βιοδιασπώμενος, κατιονικός πολυσακχαρίτης που λαμβάνεται με μερική αποακετυλίωση της χιτίνης, του κύριου συστατικού του κελύφους των καρκινοειδών. Με αυτό τον τρόπο η βιοδιαθεσιμότητα της χρυσίνης μπορεί να βελτιωθεί μέσω της μεταβολής των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων και της βιοκατανομής της, καθώς τα νανοσωματίδια με βάση την χιτοζάνη μπορούν να παρέχουν τις ευκαιρίες για εξειδικευμένη χορήγηση φαρμάκων διότι μπορούν να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα και να παρατείνουν το χρόνο στην κυκλοφορία του αίματος. Ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι νανοσωματίδια από βιοδιασπώμενα πολυμερή υλικά όπως και η χιτοζάνη, έχουν μελετηθεί ως πιθανά φάρμακα, ιδίως στην ογκολογική θεραπεία. [47,52] Οι περισσότερες από αυτές τις εφαρμογές κάνουν χρήση της υψηλής αναλογίας επιφάνειας προς μάζα των NPs, η οποία παρέχει μια μεγάλη λειτουργική επιφάνεια για τη δέσμευση, την προσρόφηση και τη μεταφορά άλλων ενώσεων.



Εικόνα. 9 Είδη νανοσωματιδίων φορτωμένα με χρυσίνη ,τα οποία βρίσκουν εφαρμογή σε αντικαρκινικές θεραπείες [43]

Συγκεκριμένα για την ενθλάκωση της χρυσίνης μέσα στο φυσικό πολυμερές της χιτοζάνης, το οποίο όπως προαναφέραμε παρουσιάζει προσκολλητικότητα, βιοσυμβατότητα , βιοαποικοδομησιμότητα και χρησιμοποιείται ευρέως για βιολογικές

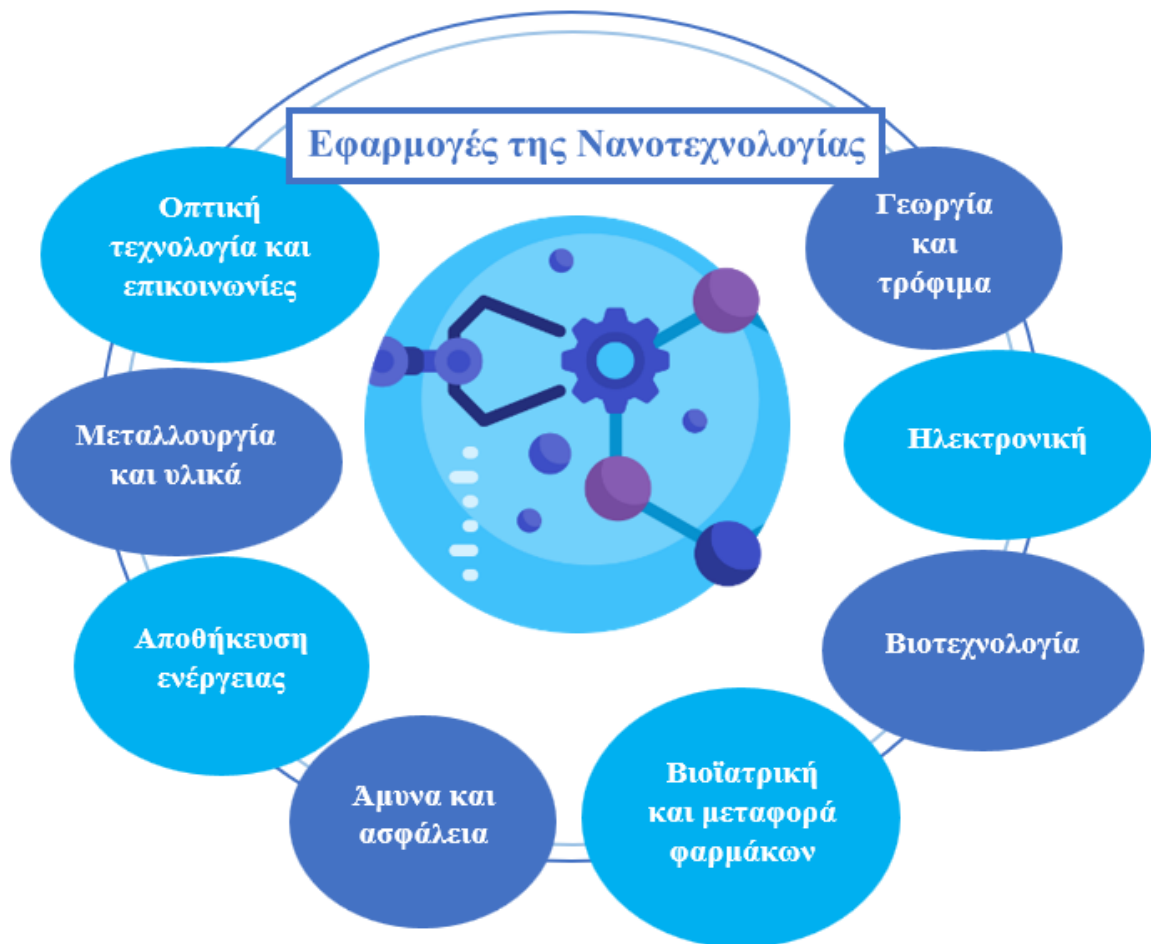
και βιοϊατρικές εφαρμογές, το θετικά φορτισμένο μόριο της χιτοζάνης διευκολύνει την προσκόλληση σε αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες και ενισχύει την παροχή φαρμάκων, καθώς συμβάλλει και στη βελτιωμένη σταθερότητα των νανοσωματιδίων χρυσίνης-χιτοζάνης. [47]

Γενικότερα μεταβλητές όπως το υδροδυναμικό μέγεθος μπορούν να επηρεάσουν διάφορες ιδιότητες, όπως η αποτελεσματικότητα της φόρτωσης, η κινητική απελευθέρωσης του φαρμάκου και η σταθερότητα των NPs. Αν και τα μικρότερα νανοσωματίδια λόγω της μεγάλης επιφάνειας παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης, εντούτοις, τείνουν επίσης να συσσωρεύονται εύκολα κατά την αποθήκευση. Τα σωματίδια με χαμηλό δείκτη πολυδιασποράς (PDI) είναι ομοιογενή στη φύση και παρέχουν μέγιστη σταθερότητα. Αντίθετα, ο υψηλός δείκτης πολυδιασποράς (PDI) υποδηλώνει την ετερογένεια των νανοσωματιδίων στο μείγμα [52].

1.5 Πράσινη Νανοτεχνολογία

1.5.1 Εισαγωγή στην Νανοτεχνολογία

Η νανοτεχνολογία είναι μια βασική τεχνολογία που συγκεντρώνει μεταξύ άλλων χημικούς, βιολόγους, φυσικούς και μηχανικούς της επιστήμης των υλικών, ενώ είναι μια διαδικασία της μικροσκοπικής κλίμακας των νανομέτρων η οποία συνδυάζει τα βασικά χαρακτηριστικά των βιολογικών, φυσικών και χημικών επιστημών. Η έννοια της νανοτεχνολογίας ξεκίνησε από τον βραβευμένο με Νόμπελ επιστήμονα Richard Feynman το 1959. [53,54,55] Η νανοτεχνολογία και η νανοεπιστήμη είναι δύο ερευνητικοί τομείς που επικεντρώνονται στην ύλη σε κλίμακα νανομέτρων. Ειδικότερα, κάθε υλικό που ταξινομείται ως νανοϋλικό έχει μέγεθος μεταξύ 1-100 nm και οι ιδιότητές του θα πρέπει να είναι διαφορετικές/ενισχυμένες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ιδιότητες του χύδην υλικού.[56] Τα κέρδη της παγκόσμιας αγοράς γύρω από τα νανοϋλικά ,το 2020, άγγιξαν περίπου τα 38,5 δισεκατομμύρια δολάρια . Γεγονός το οποίο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην επίτευξη υψηλών επιδόσεων σε αυτήν την τεχνολογία.[53]



Εικόνα. 10 Εφαρμογές της Νανοτεχνολογίας

Αυτή έχει αναδειχθεί σε πρωτοποριακό κλάδο με επαναστατικές εφαρμογές σε διάφορους τομείς. Ενώ ταυτόχρονα, το πεδίο έχει αναδειχθεί σε ιδιαίτερα ενεργό ερευνητικό πεδίο λόγω του ευρέως φάσματος των εφαρμογών που μπορεί να βρει, διότι περιλαμβάνει ξεχωριστούς τομείς όπως η μηχανική, η βιολογία, η ηλεκτρονική, η χημεία, η φυσική, οι επικοινωνίες, η ιατρική, τα τρόφιμα, η επιστήμη των υλικών, η ενέργεια και η πληροφορική. Η μελλοντική έρευνα στον τομέα της νανοτεχνολογίας αναμένεται να επιφέρει καινοτόμες ανακαλύψεις και να αντιμετωπίσει κρίσιμες προκλήσεις στον σημερινό κόσμο. [53,57,58]

Οι προσεγγίσεις της νανοτεχνολογίας ως προς τον τρόπο παραγωγής νανοϋλικών κατηγοριοποιούνται κυρίως σε δύο ομάδες που ονομάζονται "bottom-up" και "top-down". Οι νανοδομές έχουν παραχθεί με δύο κυρίαρχες προσεγγίσεις που ονομάζονται top-down και bottom-up. Η top-down προσέγγιση περιλαμβάνει την ανάπτυξη νανοϋλικών από υλικά χύδην, ενώ η bottom-up προσέγγιση επικεντρώνεται στην ανάπτυξη νανοϋλικών από άτομα και μόρια. Οι ξεχωριστές τεχνικές που υιοθετούνται για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων στην περίπτωση της bottom-up περιλαμβάνουν την sol-gel, την μοριακή συμπύκνωση, την εναπόθεση ατμών-ηλεκτροχημική και

χημική. Ενώ, η top-down περιλαμβάνει την χημική χάραξη, μηχανικές διαδικασίες, οπτικές διαδικασίες, θερμικές διαδικασίες και sputtering κ.λπ. [53,58]

Η "top-down" ανήκει στην παραγωγή δομών νανοκλίμακας από μικρότερες δομές. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες για την κατασκευή διαφόρων τεχνητών υλικών (π.χ. βιομηχανία ημιαγωγών). Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι παρουσιάζει έλεγχο και ακρίβεια όταν χρησιμοποιούνται αναπαραγωγίμες διαδικασίες λιθογραφίας. Είναι όμως πιο δαπανηρή από τις τεχνικές αυτοσυναρμολόγησης, γεγονός που αποτελεί το σημαντικότερο μειονέκτημα αυτής της προσέγγισης.

Η προσέγγιση "bottom-up" είναι μια χαμηλού κόστους, απλή μέθοδος, για την οικοδόμηση ανόργανων & οργανικών υλικών στις καθορισμένες δομές, μόριο προς μόριο και άτομο προς άτομο ενώ εφαρμόζονται σε πολλές βιολογικές διαδικασίες. Ωστόσο, το μειονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι προς το παρόν δεν μπορούν να κατασκευαστούν ολοκληρωμένες συσκευές, καθώς η αυτοσυναρμολόγηση κατέχεται επί του παρόντος μόνο για σχετικά απλά νανοδομημένα υλικά[58].

Τα νανοσωματίδια (NPs) έχουν προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον λόγω των ιδιόμορφων ιδιοτήτων και εφαρμογών τους, οι οποίες είναι επωφελείς σε σχέση με τις αντίστοιχες του όγκου τους, με μία ή περισσότερες διαστάσεις της τάξης των 100nm ή λιγότερο. Τα NPs που συντίθενται χημικά και φυσικά με μεθόδους top-down και bottom-up απαιτούν μεγαλύτερη ενέργεια και διαδικασίες παραγωγής. Ένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματα είναι ότι στις νανοδομές συμβαίνουν κβαντικά φαινόμενα που επιτρέπουν την αποτελεσματικότητα των σωματιδίων στις εκάστοτε εφαρμογές..[53,59,60]

1.5.2 Ταξινόμηση των νανοϋλικών

Τα άφθονα νανοϋλικά συντίθενται με βάση τη διάσταση αλλά και άλλους παράγοντες. Τα νανοϋλικά ταξινομούνται με βάση τη διαστασιμότητά τους, συμπεριλαμβανομένης της μηδενικής διάστασης (0D), της μίας διάστασης (1D), των δύο διαστάσεων (2D) και των τριών διαστάσεων (3D).

Νανοϋλικά μηδενικής διάστασης: Τα νανοϋλικά 0D χαρακτηρίζονται από τις διαστάσεις τους που είναι μικρότερες από 100 nm και οι νανοκλίμακες περιλαμβάνουν νανοσφαίρες και νανοσυσσωματώματα. Πχ: Κβαντικές κουκκίδες, φουλερένια και νανοσωματίδια χρυσού.

Νανοϋλικά μίας διάστασης: Τα 1D νανοϋλικά εκδηλώνονται σε δομές με σχήμα βελόνας. Η νανοκλίμακα περιλαμβάνει νανοσωλήνες, νανοκαλώδια, νανοϊνες και νανοράβδους. Βρίσκουν εκτεταμένες εφαρμογές στη βιοανίχνευση, τις οπτικές συσκευές, τα ηλεκτρονικά και τα συστήματα LED . Π.χ.: νανοράβδοι μετάλλων, νανοσωλήνες άνθρακα και μετάλλων, πολυμερικά νανοκαλώδια κ.λπ.

Νανοϋλικά δύο διαστάσεων: Τα 2D νανοϋλικά εκδηλώνονται σε δομές που μοιάζουν με πλάκες. Οι δομές αυτές περιλαμβάνουν νανοφίλμ, νανοεπικαλύψεις και νανοστρώματα. Π.χ.: φύλλα γραφενίου, νανοπλάκες άνθρακα κ.λπ.

Νανοϋλικά τριών διαστάσεων: Το κρυσταλλικό σχήμα εκδηλώνεται σε διάφορες προθέσεις και διαστάσεις άνω των 100 nm. Οι δομές περιλαμβάνουν νανοσωματίδια, νανოსωλήνες και πολλαπλά νανοστρώματα. Π.χ.: λιποσώματα, δένδριμερή κ.λπ. [53]

Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η χρήση νανοδομημένων υλικών εγείρει ανησυχίες για την υγεία και την περιβαλλοντική ασφάλεια, ευνοώντας την επέκταση ενός επιμέρους πεδίου αφιερωμένου στις πράσινες και ασφαλείς από το σχεδιασμό λύσεις. Οι καινοτόμες λύσεις θα πρέπει να ελαχιστοποιούν τους κινδύνους για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία από τα νανοϋλικά κατά τη διάρκεια της ζωής τους, π.χ. μέσω της αντικατάστασης τοξικών προϊόντων ή υφιστάμενων διαδικασιών από κατάλληλες φιλικές προς το περιβάλλον εναλλακτικές λύσεις. Η πράσινη νανοτεχνολογία στηρίζεται στις αρχές της πράσινης χημείας με στόχο τον αειφόρο σχεδιασμό, την κατασκευή, τη χρήση και το τέλος του κύκλου ζωής των νανοϋλικών. [61]

1.5.3 Πράσινη Νανοτεχνολογία

Η πράσινη νανοτεχνολογία είναι ένας κλάδος της πράσινης τεχνολογίας που περιλαμβάνει την εφαρμογή της πράσινης χημείας και μηχανικής, στον τομέα της νανοτεχνολογίας, για την σύνθεση αβλαβών και φιλικών προς το περιβάλλον νανოსυνόλων με στόχο την καταπολέμηση των προβλημάτων που επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία ή το περιβάλλον. [53,62] Αυτό συμβαίνει με τη χρήση ζωντανών οργανισμών, βιομοριών ή φυσικών αποβλήτων, ακολουθώντας μεθόδους που είτε μειώνουν είτε εξαλείφουν τη χημική ανάγκη για επιβλαβείς ουσίες, όπως διαλύτες και αναγωγικά μέσα, σε όλο το συνθετικό σχήμα. [57,63,64] Η πράσινη νανοτεχνολογία έχει ανθίσει τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς περιλαμβάνει τη δημιουργία προσοδοφόρων προϊόντων και τις διαφοροποιημένες εφαρμογές τους σε πολλούς τομείς. [53]

Ταυτόχρονα, η σύνθεση με βάση την πράσινη νανοτεχνολογία είναι απλή, φθηνή και μειώνει δραστικά την παραγωγή αποβλήτων ενώ, εφαρμόζει αποτελεσματικούς τρόπους ανακύκλωσης των προϊόντων. [53,65] Αναλυτικότερα, στην σύνθεση των πράσινων νανοϋλικών εμπλέκονται βήματα όπως η οικονομία του ατόμου, οι πράσινοι διαλύτες, η ενεργειακή αποδοτικότητα και η αξιολόγηση. Στην ατομική οικονομία, όλα τα άτομα των αντιδρώντων χρησιμοποιούνται πλήρως με μικρότερη ή καθόλου παραγωγή αποβλήτων. Στη χρήση πράσινων διαλυτών, δεν χρησιμοποιούνται βαριές οργανικές ενώσεις, αλλά νερό ή αιθανόλη. [53] Στοχεύοντας στην αξιοποίηση της χρήσης υλικών από ανανεώσιμες πηγές ή και βιοδιασπώμενων υλικών. [66] Βρίσκει εφαρμογές στη βελτίωση βασικών προβλημάτων βιωσιμότητας σε τομείς όπως η

κλιματική αλλαγή, ο καθαρισμός του νερού, η ιατρική, η παραγωγή τροφίμων, οι φυσικοί πόροι και οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας[67].

Ένα κύριο μειονέκτημα, όσον αφορά την εφαρμογή στην κλινική και ερευνητική πρακτική αυτών των πράσινων προσεγγίσεων που βασίζονται στην νανοτεχνολογία, σχετίζεται με την εκτεταμένη έλλειψη γνώσεων .[68] Επιπλέον, παρόλο που η πράσινη νανοτεχνολογία υπόσχεται να είναι φιλική προς το περιβάλλον και μια ασφαλέστερη πτυχή της νανοτεχνολογίας, εξακολουθεί να αντιμετωπίζει την πρόκληση της αντιμετώπισης των τοξικών επιδράσεων των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον και σε όλο το φάσμα της υγείας. Ωστόσο, οι προκλήσεις και τα ζητήματα που σχετίζονται με τις τοξικολογικές επιδράσεις, την ασαφή παραγωγή και τις κατευθυντήριες γραμμές ασφαλείας με την πράσινη νανοτεχνολογία χρειάζονται περαιτέρω ανάλυση και αξιολόγηση. Η πράσινη νανοτεχνολογία βρίσκεται στην αναδυόμενη φάση της και έχει ακόμη πολύ δρόμο να διανύσει για να αλλάξει την πορεία των συμβατικών διαδικασιών προς μια πιο πράσινη προσέγγιση και τη βελτιστοποίηση των στρατηγικών για τη βιομηχανική της κλιμάκωση .[67]



Εικόνα. 11 Πλεονεκτήματα των πράσινα-συντιθεμένων NPs έναντι των συμβατικών και χημικών μεθόδων σύνθεσης.

Τα πράσινα NP που συντίθενται υπόσχονται πολλά, ανοίγοντας νέες προοπτικές όχι μόνο στη βιοϊατρική έρευνα, αλλά και στην ενεργειακή και περιβαλλοντική έρευνα. Αυτά τα νανοσωματίδια έχουν επιδείξει αξιοσημείωτες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες που μπορούν να αξιοποιηθούν αποτελεσματικά σε διάφορες

φαρμακευτικές και βιοϊατρικές εφαρμογές. Την ίδια στιγμή όμως οι παρενέργειες των σημερινών θεραπειών αποτελούν σημαντική ανησυχία, όπως και η απελευθέρωση τέτοιων NPs στο περιβάλλον. Ως εκ τούτου, απαιτείται περισσότερη επιστημονική έρευνα προκειμένου να μελετηθούν διεξοδικά οι ιδιότητες των βιολογικά συντιθέμενων NPs[57].

Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές της πράσινης νανοτεχνολογίας είναι αυτή στον τομέα της χορήγησης φαρμάκων. Το συγκεκριμένο πεδίο αποτυπώνεται κάτω από τον όρο της "πράσινης νανοϊατρικής". Η αυξανόμενη ζήτηση για πράσινα συστήματα χορήγησης φαρμάκων με βάση τη νανοτεχνολογία έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφορετικών τύπων συσκευών χορήγησης, όπως ανόργανα (μεταλλικά) νανοσωματίδια, κβαντικές κουκκίδες, οργανικά πολυμερή νανοσωματίδια, μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίας, δενδριμερή, νανοδομημένοι φορείς λιπιδίων, στερεά νανοσωματίδια λιπιδίων κ.λπ. [62] Η κύρια πρόκληση για τη χορήγηση φαρμάκων είναι η παράδοση των μορίων φαρμάκων στα σημεία του σώματος που πάσχουν από ασθένεια και η αποφυγή των πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών στα μη πάσχοντα όργανα. Τα πράσινα νανοφάρμακα θα πρέπει να είναι ευεργετικά για τη χορήγηση φαρμάκων, πρώτον, με την αποτελεσματική φόρτωση των μορίων φαρμάκου στους νανοσωματιδιακούς φορείς, δεύτερον, με την ασφαλή παράδοση των φορτωμένων μορίων φαρμάκου στα νοσούντα όργανα του σώματος και τρίτον, με την έγκαιρη απελευθέρωση των μορίων φαρμάκου στα στοχευμένα σημεία του σώματος.[69] Επιπλέον, και το πιο σημαντικό, η χρήση βιομορίων ως πρώτων υλών στην παραγωγή συστημάτων χορήγησης φαρμάκων σε νανοκλίμακα τους προσδίδει αυξημένη βιοσυμβατότητα, σε σύγκριση με τα παραδοσιακά συντιθέμενα νανοσκευάσματα, τα οποία συχνά απαιτούν εκτεταμένα στάδια λειτουργικοποίησης, προκειμένου να καταστούν κατάλληλα για να έρθουν σε επαφή με διάφορους βιολογικούς ιστούς, με αύξηση του χρόνου και των εξόδων για την εύρεση ενός κατάλληλου συστήματος χορήγησης φαρμάκων.[68] Τα πράσινα νανοσωματιδιακά φαρμακευτικά σκευάσματα μπορούν να χορηγηθούν στα στοχευμένα σημεία του σώματος μέσω στοματικής, τοπικής, παρεντερικής και εισπνευστικής οδού χορήγησης.[69].

Παρά τις εν λόγω βελτιώσεις *in vitro*, η επιτυχής εφαρμογή των νανοσυστημάτων βρίσκει σαφείς προκλήσεις όταν εφαρμόζονται *in vivo*, όπως συμβαίνει με άλλα νανοϋλικά, ιδίως όσον αφορά την αποτελεσματική στόχευση και την απομάκρυνση από τον οργανισμό.[68] Οι ανησυχίες σχετικά με τα νανοφάρμακα, σχετίζονται κυρίως με την πιθανή τοξικότητα των νανοϋλικών που χρησιμοποιούνται, περιλαμβανομένων των επιπτώσεων στην υγεία του ανθρώπου όπως και στο περιβάλλον καθώς η ανάπτυξη πράσινων νανοφαρμακευτικών σκευασμάτων θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις αρχές της Πράσινης Χημείας.

Τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων (DDS) ερευνώνται και αναπτύσσονται ευρέως για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της χορήγησης δραστικών φαρμακευτικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων φαρμάκων, εμβολίων, αντισωμάτων, ενζύμων, πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Το πεδίο της "πράσινης

νανοϊατρικής" έχει αναδυθεί ως αποτέλεσμα της επίδρασης της πράσινης και φιλικής προς το περιβάλλον χημείας στον τομέα της νανοτεχνολογίας που καθοδηγείται από τη χορήγηση φαρμάκων. Σε εξέλιξη βρίσκεται η ανάπτυξη επαναστατικών υλικών για πράσινα συστήματα νανοδιανομής φαρμάκων, χρησιμοποιώντας χημικές αντιδράσεις φιλικές προς το περιβάλλον ή φυσικά βιοϋλικά, όπως φυτικά εκχυλίσματα και μικροοργανισμούς. Η χρήση των αρχών της πράσινης χημείας και των φιλικών προς το περιβάλλον τεχνικών σύνθεσης με ελάχιστες παρενέργειες αποτελεί προτεραιότητα στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και την εφαρμογή αυτών των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων[57].

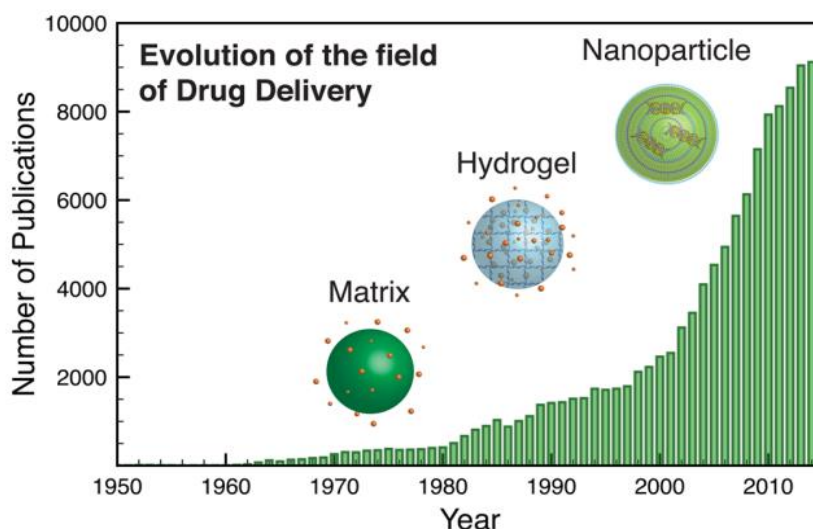
Κατά συνέπεια, τα πράσινα νανοσυστήματα είναι ενεργειακά αποδοτικά, οικονομικά αποδοτικά, φιλικά προς το περιβάλλον, μη τοξικά, βιοσυμβατά, επεξεργασμένα σε ένα στάδιο, αντιμικροβιακά. [70] Ενώ γενικότερα, τα νανοϋλικά που συντίθενται με πράσινο τρόπο έχουν επιδείξει μεγάλες δυνατότητες ως αντιμικροβιακοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.[64] Επομένως, η πράσινη σύνθεση νανοφαρμάκων υπόσχεται πολλά στους τομείς της βιοϊατρικής, καθώς η φιλική προς το περιβάλλον ανάπτυξη ανανεώσιμων και μη τοξικών νανοφορέων για τη χορήγηση φαρμάκων στις στοχευμένες περιοχές της νόσου θα αυξήσει σημαντικά τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα των αρχικών φαρμάκων και θα εξαλείψει τους πιθανούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον[69].

1.6 Εγκλωβισμός βιοδραστικών ενώσεων σε φορείς

1.6.1 Σημασία , Αντίκτυπο & Εξέλιξη της τεχνολογίας μεταφοράς φαρμάκων

Ορίζουμε τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων ως τεχνολογίες που έχουν σχεδιαστεί για να βελτιώσουν την εξειδίκευση των θεραπευτικών ουσιών με τη σταθεροποίησή τους *in vivo*, τον έλεγχο της απελευθέρωσής τους και τον εντοπισμό της επίδρασής τους. [66] Οι φορείς φαρμάκων είναι βιοσυμβατά εργαλεία για τη μεταφορά μορίων, με εφαρμογές στην φαρμακευτική ,στα καλλυντικά και τα τρόφιμα, πεδία τα οποία βρίσκονται σε θέση μεγάλου επιστημονικού και βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Ένα συμβατικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκου (όπως δισκία, κάψουλες, σιρόπια, αλοιφές κ.λπ.) επιτρέπει την απελευθέρωση του δραστικού φαρμακευτικού συστατικού για την επίτευξη της επιθυμητής θεραπευτικής απόκρισης. Ταυτόχρονα, τα συμβατικά συστήματα υστερούν λόγω κακής βιοδιαθεσιμότητας , διακυμάνσεων στα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα και της μη επίτευξης της παρατεταμένης απελευθέρωσης. Χωρίς έναν αποτελεσματικό μηχανισμό χορήγησης, ολόκληρη η θεραπευτική διαδικασία μπορεί να καταστεί ανεπιτυχής. Επιπλέον, η απελευθέρωση του φαρμάκου τη σωστή στιγμή ,σε σωστή ποσότητα συγκέντρωσης σε ένα συγκεκριμένο σημείο-στόχο , με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια, ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια, είναι ο κύριος στόχος ενός συστήματος μεταφοράς

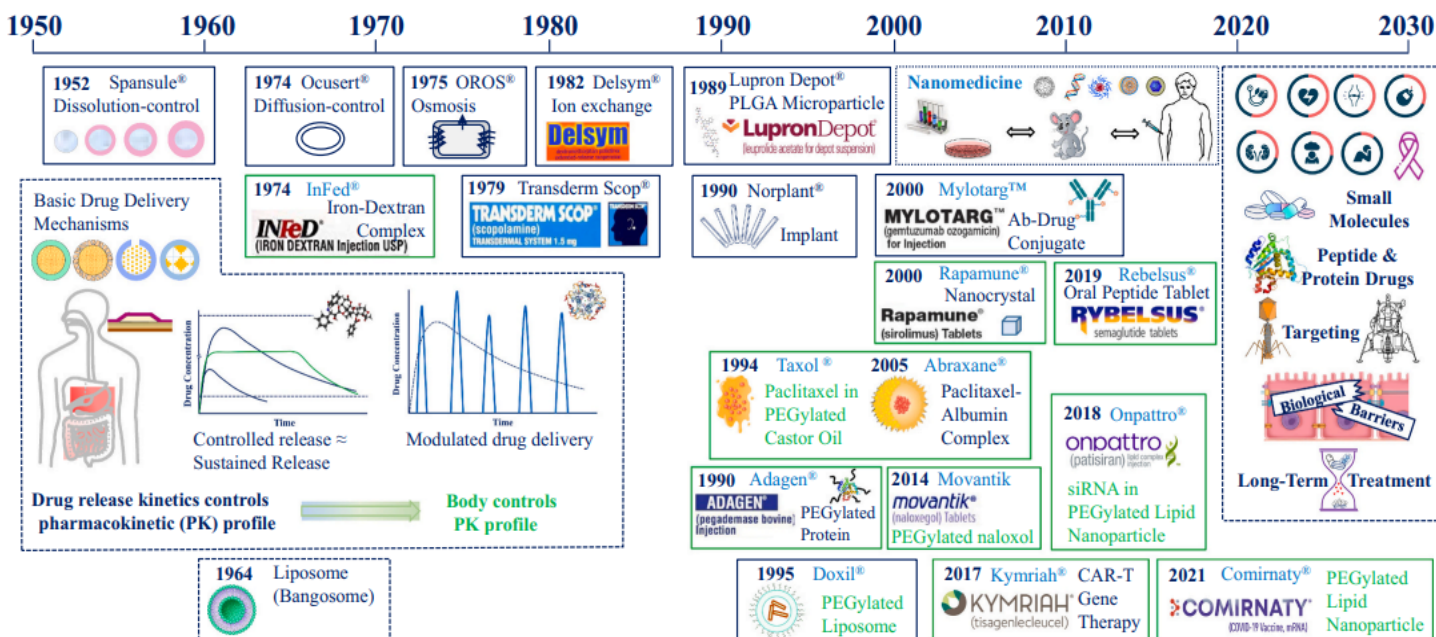
φαρμάκων. Ενώ, η υψηλή χωρητικότητα φόρτωσης είναι υποχρεωτική για τα οχήματα μεταφοράς, ώστε να επιτελέσουν θεραπευτικό αποτέλεσμα ή να επιτύχουν καλύτερη αποτελεσματικότητα. Τα συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων αναπτύσσονται για την καταπολέμηση των προβλημάτων που σχετίζονται με τη συμβατική χορήγησή τους. [72,73,74,75]



Εικόνα. 12 Η εξέλιξη του πεδίου της μεταφοράς φαρμάκων από το 1950 έως το 2014.[71]

Σύμφωνα με την επιστημονική έκθεση "Global Markets and Technologies for Advanced Drug Delivery Systems", τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων απέφεραν 178 δισεκατομμύρια δολάρια το 2015, καθώς η αγορά που δημιουργήθηκε το 2020 ήταν περίπου 231 δισεκατομμύρια δολάρια μεγαλύτερη, με εκτίμηση να φτάσει τα 310 δισεκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2025, με αύξηση 6,1%. Η αξία αυτή υπολογίζεται ότι θα αυξάνονταν περαιτέρω μετά την αίτηση πολυάριθμων εμβολίων κατά της νόσου COronaVirus 2019 (COVID-19). [73]

Τα σύγχρονα συστήματα χορήγησης φαρμάκων έχουν σημειώσει συνεχή πρόοδο από το 1952, όταν έκανε την εμφάνισή της η τεχνολογία παρατεταμένης αποδέσμευσης Spansule® .[76,77] Το 2000 σηματοδότησε επίσης την έναρξη της Εθνικής Πρωτοβουλίας Νανοτεχνολογίας από την κυβέρνηση των ΗΠΑ, την οποία σύντομα ακολούθησε και ο υπόλοιπος κόσμος. Η εκτεταμένη εργασία πάνω στη νανοϊατρική, οδήγησε τελικά στην έγκαιρη ανάπτυξη σκευασμάτων λιπιδικών νανοσωματιδίων για τη χορήγηση του εμβολίου COVID-19 το 2020. [78] Στις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί τεράστια εξέλιξη στα συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων, από τη μακροκλίμακα και τη νανοκλίμακα έως την έξυπνη στοχευμένη χορήγηση. [72]



Εικόνα. 13 Εξέλιξη των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων μέσω της εισαγωγής εγκεκριμένων από τον FDA φαρμακευτικών προϊόντων. [78]

Οι απαιτήσεις για μια επιτυχημένη παράδοση φαρμάκου καθορίζονται συνήθως από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του θεραπευτικού παράγοντα και τους βιοφραγμούς, όπως το δέρμα και η μεμβράνη των οργάνων του σώματος. Ανάλογα με το μέγεθος, τη χημική σύνθεση, την υδρόφιλη ιδιότητα και την ικανότητα δέσμευσης συγκεκριμένου υποδοχέα, οι ιδιότητες των φαρμάκων μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των ίδιων συμπτωμάτων. Τέτοια συστήματα σχεδιάζονται συνήθως με σκοπό :

- 1) τη βελτίωση της ανεπαρκούς βιοδιαθεσιμότητας λόγω αδιαλυτότητας στα φυσιολογικά υγρά και χαμηλής διαπερατότητας των διαφόρων οργάνων του σώματος
- 2) της χημικής σταθερότητας των δραστικών ουσιών
- 3) την αύξηση της φαρμακολογικής δραστηριότητας
- 4) τη μείωση των παρενεργειών και της τοξικότητας
- 5) την επίτευξη της υψηλής θεραπευτικής αποτελεσματικότητας με ελάχιστες δόσεις στις οποίες οι ασθενείς έχουν την ικανότητα να συμμορφώνονται με μεγαλύτερη ευκολία
- 6) δημιουργία βιοδιασπώμενων και εύκολων στη χορήγηση σκευασμάτων

Ο στόχος κάθε συστήματος μεταφοράς φαρμάκων είναι να παρέχει και να διατηρεί θεραπευτικές συγκεντρώσεις φαρμάκου στο βιολογικό σημείο-στόχο. [74, 76,77,79]

Τα συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων διακρίνονται από τα συμβατικά σκευάσματα που απελευθερώνουν το μεγαλύτερο μέρος ή το σύνολο των φορτωμένων φαρμάκων αμέσως χωρίς κανένα έλεγχο. Ο όρος "ελεγχόμενη" έχει την

πρόσθετη έννοια της διατήρησης της σχετικά σταθερής συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο, η διατήρηση της σταθερής συγκέντρωσης φαρμάκου είναι δύσκολη, καθώς η αποτελεσματική μεταφορά του φορτωμένου φαρμάκου στον επιθυμητό στόχο και η απελευθέρωσή του στον κατάλληλο χρόνο και την σωστή δοσολογία ,είναι πρόκληση.[78,80] Μερικά από τα αναπτυσσόμενα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων ,συμπεριλαμβάνουν διάφορα συστήματα με φορείς όπως τα πολυμερικά νανοσωματίδια (NPs), μικκύλια, δενδριμερή , λιποσώματα , σφιγγοσώματα, νιοσώματα, ,ανόργανα υλικά, τα οποία και προσφέρουν απaráμιλλες ευκαιρίες για την εξέλιξη του κλάδου αυτού. [81,82]

Εν κατακλείδι, η εξέλιξη των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων έχει διανύσει πολύ δρόμο και θα συνεχίσει να αναπτύσσεται με εξαιρετικούς ρυθμούς. Η ενσωμάτωση μορίων φαρμάκων σε νέα συστήματα χορήγησης παρέχει άφθονα θεραπευτικά και εμπορικά πλεονεκτήματα. Είναι προφανές ότι έχουν ανοίξει νέοι δρόμοι και πόρτες στην παράδοση στο εμπόριο ήδη υπάρχοντων αλλά και νέων φαρμάκων. Ωστόσο, ορισμένες πτυχές, όπως η μετάφραση σε κλινική χρήση, η δαπανηρή παραγωγή και το περιορισμένο ωφέλιμο φορτίο φαρμάκου, πρέπει να αντιμετωπιστούν με πιο εκτεταμένο τρόπο. Βέβαια, υπάρχουν ακόμη περιθώρια βελτίωσης και όλα τα νεοαναπτυχθέντα συστήματα χορήγησης φαρμάκων θα πρέπει να χαρακτηρίζονται και να διερευνώνται διεξοδικά προτού εγκριθεί η χρήση τους στον άνθρωπο. [74]

1.6.2 Νανοσυστήματα ως μέσα μεταφοράς φαρμάκων

Η βελτιστοποίηση των στρατηγικών χορήγησης φαρμάκων για τη θεραπεία ιατρικών παθήσεων συχνά αποσκοπεί στη στόχευση των θεραπευτικών ουσιών σε συγκεκριμένα σημεία του σώματος, όπως όγκους ή μολυσμένους ιστούς, και στη μείωση της κατανομής των φαρμάκων σε ιστούς εκτός στόχου, για την ελαχιστοποίηση των παρενεργειών. Η χρήση νανοδομημένων υλικών αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη βελτίωση της χορήγησης και της στόχευσης φαρμάκων . Πολλές βιολογικές δραστηριότητες λαμβάνουν χώρα στη νανοκλίμακα και, ως εκ τούτου, τα κατασκευασμένα νανοϋλικά πλεονεκτούν για τη ρύθμιση των βιοδιεπιφανειών και των βιολογικών διεργασιών για τη βελτίωση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων.[83]

Οι νανοσωματιδιακοί φορείς φαρμάκων βελτιώνουν τη σταθερότητα, τους χρόνους ημιζωής των φαρμάκων -καθώς με τον εγκλωβισμό αυτών μπορούν να απομονωθούν τα τοξικά φάρμακα ώστε να υπάρξει μεγαλύτερη ημιζωή στα μόρια που υφίστανται αυθόρμητη αποικοδόμηση υπό φυσιολογικές συνθήκες- , διατηρούν τις θεραπευτικές συγκεντρώσεις φαρμάκων , μπορούν να ρυθμίσουν την ταχύτητα απελευθέρωσης του φαρμάκου και να βελτιώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα.[72,79,83,84]

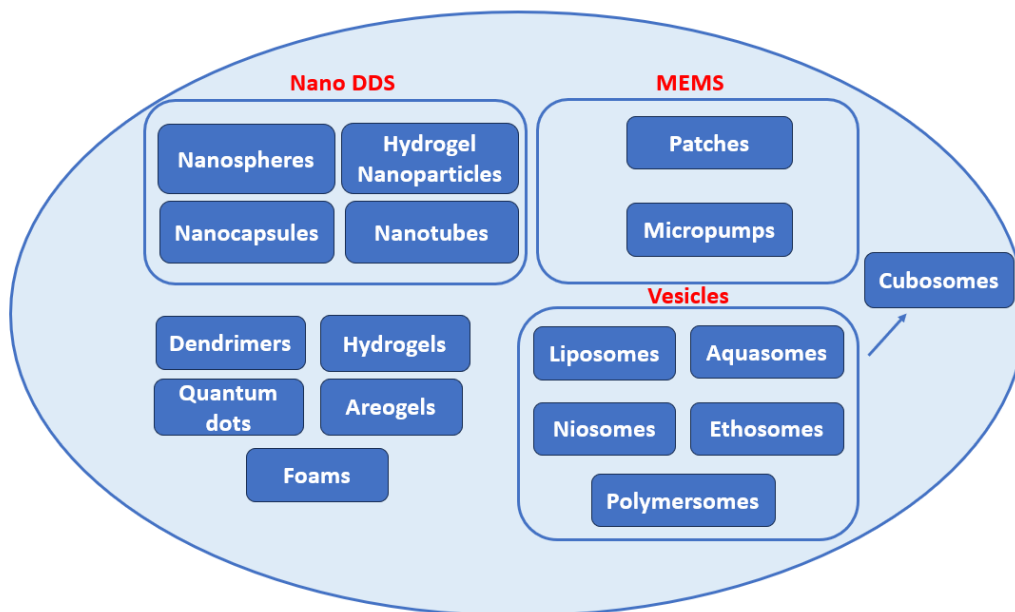
Η χορήγηση φαρμάκων με βάση το συγκεκριμένο σημείο μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση νανοσωματιδίων που χορηγούνται μέσω διαφορετικών οδών. Η ενίσχυση της διαλυτότητας των ιδιαίτερα υδρόφοβων φαρμάκων, η παροχή διαρκών και

ελεγχόμενων εγκλωβισμένων φαρμάκων καθώς και η βελτίωση των στοχευμένων θεραπειών αποτελούν τα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας νανομεταφοράς φαρμάκων.[84] Επιπλέον, τα νανοσωματίδια έλαβαν δραματική ανάπτυξη τα τελευταία δέκα χρόνια, αναδεικνύοντας τα ήδη καλά σχεδιασμένα και έξυπνα συστήματα χορήγησης φαρμάκων για την υπέρβαση περίπλοκων εμποδίων στη θεραπεία επίμονων ασθενειών.[85]

Από την άποψη της λειτουργίας, ένα τέλειο νανοσύστημα μεταφοράς φαρμάκων θα πρέπει να περιλαμβάνει:

- 1) πυρήνα φόρτωσης φαρμάκων : για τη φόρτωση μορίων φαρμάκων
- 2) συστήματα διαφυγής και διείσδυσης : για τη διαφυγή από διάφορα αιχμαλωτισμένα κύτταρα και τη διείσδυση σε βιολογικούς φραγμούς
- 3) μόρια στόχευσης : για την τοποθέτηση, τον εντοπισμό παθολογικών παραγόντων και την καθοδήγηση της παροχής του μεταφορέα φαρμάκου στη βλάβη
- 4) ευφύες σύστημα ελεγχόμενης απελευθέρωσης : για την απελευθέρωση μορίων φαρμάκων κατ' απαίτηση σύμφωνα με το καθορισμένο πρόγραμμα[80].

Τα ευέλικτα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες των υλικών-φορέων προσδίδουν στα νανοσωματίδια την ικανότητα να επιτυγχάνουν την αποτελεσματική διάγνωση και θεραπεία ασθενειών. Με βάση τις μοναδικές δομικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των φυσικών πολυμερών, έχουν αναπτυχθεί πολλαπλά οχήματα χορήγησης με εξαιρετικά προφίλ φόρτωσης και απελευθέρωσης, φαρμακοκινητική, ικανότητα στόχευσης και βιοασφάλεια. Ανάλογα με τις οδούς χορήγησης φαρμάκων, οι φορείς χορήγησής τους οι οποίοι παράγονται από φυσικά πολυμερή, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενδοφλέβια, από του στόματος, διαδερμική και επιτόπια χορήγηση. Οι πιο αντιπροσωπευτικοί φορείς χορήγησης που αποτελούνται από φυσικούς πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες για παρεντερική χορήγηση είναι τα μικρο-/νανοσωματίδια για τη βελτίωση της συστηματικής κυκλοφορίας και την ενίσχυση της ιστικής στόχευσης των ωφέλιμων φορτίων.[85]



Εικόνα. 14 Αναπαράσταση του συνόλου και των υποσυνόλων των τεχνητών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (DDS), μεταξύ των νανοσυστημάτων, μικροηλεκτρομηχανικά συστήματα (MEMS), άλλα ειδικά συστήματα και τα παράγωγά τους.[73]

Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας φόρτωσης νανο-φαρμάκων, η παραγωγή φαρμάκων θα επιτύχει το στόχο του χαμηλού κόστους, της υψηλής απόδοσης και της αυτοματοποίησης. Τα νανοσυστήματα είναι σωματίδια φορτωμένα με φάρμακα που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές μορφολογίες, όπως νανοκάψουλες, νανοσφαίρες, λιποσώματα, αφροί, νανοσωλήνες άνθρακα, δενδριμερή, κυβοσώματα, νιοσώματα και υδρογέλες .[73,85]

Η τεχνολογία χορήγησης νανο-φαρμάκων ξεπερνά πολλές ελλείψεις και ανυπέρβλητα προβλήματα των παραδοσιακών φαρμάκων, παρέχει έναν νέο τρόπο για την έρευνα νέων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων. Παρά τα πολλά διακριτά πλεονεκτήματα, η κλινική μετάβαση των νανοφαρμάκων με βάση τα υλικά-φορείς θα μπορούσε να περιοριστεί σημαντικά από τη χρονοβόρα και δαπανηρή ανάπτυξη των υλικών-φορέων σε φαρμακευτικά έκδοχα, την ρύπανση του περιβάλλοντος που προκαλείται από τα νανოსωματίδια, τις πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις των υπολειμματικών ουσιών μετά την απελευθέρωση φαρμάκων και την τοξικότητα των φαρμάκων σε όργανα που δεν αποτελούν στόχο . [74,84,85]

1.7 Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiments, DOE)

1.7.1 Πειραματικός Σχεδιασμός Box Behnken

Ο στατιστικός σχεδιασμός πειραμάτων (DoE) είναι μια προσέγγιση για τη βελτιστοποίηση χημικών διεργασιών. Ξεκινά με ένα σχέδιο δοκιμών πειραματικού σχεδιασμού διαλογής που περιλαμβάνει όλους τους γνωστούς παράγοντες που πιθανολογείται ότι επηρεάζουν την απόδοση του συστήματος[86,87] Τα αποτελέσματα των πειραμάτων του DoE αναλύονται για να βρεθούν ποιοι παράγοντες επηρεάζουν τα αποτελέσματα με στατιστικά σχετικό τρόπο και ποιοι από αυτούς είναι αλληλοεξαρτώμενοι, αν υπάρχουν. Οι αναλύσεις αυτές μπορούν να παρουσιαστούν μέσω ημι-κανονικών διαγραμμάτων ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και άλλων μέσων. Τα δεδομένα από μη γραμμικές μελέτες αντιδράσεων μπορούν να παρουσιαστούν με διαγράμματα περιγράμματος και με τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM) [87].

Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM) είναι μια εμπειρική στατιστική τεχνική μοντελοποίησης η οποία ξεκίνησε το 1950 .[88] Χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης και την ταυτόχρονη επίλυση πολυμεταβλητών εξισώσεων . Η RSM είναι ένα αποτελεσματικό στατιστικό εργαλείο για τη βελτιστοποίηση πολύπλευρων διεργασιών, καθώς ελαχιστοποιεί τον αριθμό των πειραματικών δοκιμών που απαιτούνται για την αξιολόγηση πολλών παραμέτρων και των αλληλεπιδράσεών τους. [89] Η τεχνική αυτή είναι πολύ χρήσιμη για τη μοντελοποίηση και την ανάλυση προβλημάτων μηχανικής. Σε αυτή, ο κύριος στόχος είναι η βελτιστοποίηση της επιφάνειας απόκρισης που επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους της διαδικασίας. Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης ποσοτικοποιεί επίσης τη σχέση μεταξύ των ελεγχόμενων παραμέτρων εισόδου και των επιφανειών απόκρισης που λαμβάνονται . Η διαδικασία σχεδιασμού της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης έχει ως εξής :

- (i) Σχεδιασμός μιας σειράς πειραμάτων για την επαρκή και αξιόπιστη μέτρηση της απόκρισης που μας ενδιαφέρει.
- (ii) Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου της επιφάνειας απόκρισης δεύτερης τάξης με τις καλύτερες προσαρμογές.
- (iii) Εύρεση του βέλτιστου συνόλου πειραματικών παραμέτρων που παράγουν μέγιστη ή ελάχιστη τιμή απόκρισης.
- (iv) Η αναπαράσταση των άμεσων και αλληλεπιδραστικών επιδράσεων των παραμέτρων της διεργασίας μέσω διαγραμμάτων δύο και τριών διαστάσεων.[90]

Ο σχεδιασμός Box Behnken είναι ένας σφαιρικός και περιστρεφόμενος σχεδιασμός της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης (RSM). Αποτελείται από τρία

αλληλοεμπλεκόμενα παραγοντικά σχέδια με όλα τα σημεία να βρίσκονται όλα στην επιφάνεια μιας σφαίρας που περιβάλλει το κέντρο του σχεδίου .[89] Η ειδική διάταξη των επιπέδων του σχεδιασμού Box-Behnken επιτρέπει στον αριθμό των σημείων σχεδιασμού να αυξάνεται με τον ίδιο ρυθμό που αυξάνεται και ο αριθμός των πολυωνυμικών συντελεστών [90].

Ο σχεδιασμός Box-Behnken απαιτεί έναν αριθμό πειραμάτων σύμφωνα με τη σχέση $N = k^2 + k + cp$, όπου (k) είναι ο αριθμός των παραγόντων και (cp) είναι ο αριθμός των επαναλήψεων του κεντρικού σημείου.

Το Box-Behnken είναι ένα σφαιρικό, περιστρεφόμενο σχέδιο, αν το δούμε ως κύβο, αποτελείται από ένα κεντρικό σημείο και τα μεσαία σημεία των άκρων. Ωστόσο, μπορεί επίσης να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τρία αλληλοεμπλεκόμενα παραγοντικά σχέδια και ένα κεντρικό σημείο . Έχει εφαρμοστεί για τη βελτιστοποίηση διαφόρων χημικών και φυσικών διεργασιών.[90] Αυτός ο σχεδιασμός απαιτεί τουλάχιστον τρεις παράγοντες που χρησιμοποιούνται σε τρία διαφορετικά επίπεδα. Αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση περισσότερων από τρεις παράγοντες, είναι απλούστερο στη χρήση του όταν χρησιμοποιείται για τη δοκιμή τριών παραγόντων. [91].

2 Πειραματικό Μέρος

2.1 Σκοπός

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία έχει ως στόχο την ανάπτυξη της πράσινης διεργασίας παρασκευής ευτηκτογελών με έναν φυσικό πολυσακχαρίτη [κόμμι ξανθάνης (xanthan gum)] ως πηκτωματοποιητή και τον φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη που αποτελείται από χλωριούχο χολίνη (ChCl) και γαλακτικό οξύ (LA) ως κύριο συστατικό. Επίσης, το φλαβονοειδές χρυσίνη εγκλείστηκε σε νανοσωματίδια χιτοζάνης και η διασπορά των νανοσωματιδίων ενσωματώθηκε στις ευτηκτογέλες.

Η σύσταση και οι συνθήκες παρασκευής της νανოსύνθετης ευτηκτογέλης καθορίζονται από τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές, την περιεκτικότητα σε κόμμι ξανθάνης (%w/v), την περιεκτικότητα της χρυσίνης (% w/w) και την περιεκτικότητα σε διασπορά νανοσωματιδίων χιτοζάνης (%v/v). Η βελτιστοποίηση της διεργασίας πραγματοποιείται ως προς τις σημαντικότερες παραμέτρους τις οποίες θέσαμε ως αποκρίσεις (εξαρτημένες μεταβλητές): την ικανότητα διόγκωσης-SR(%), την ικανότητα συγκράτησης του νερού-WRR(%) και την απόδοση εγκλωβισμού-EE(%). Όλη η ανάλυση του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken τριών επιπέδων γίνεται με τη χρήση του λογισμικού Design Expert 12. Οι νανოსύνθετες ευτηκτογέλες χαρακτηρίστηκαν ως προς την ικανότητα διόγκωσης (% SR) και την ικανότητα συγκράτησης νερού (%WRR).

Στην συνέχεια, παρασκευάστηκαν οι νανοςύνθετες ευτηκτογέλες με βάση τις βέλτιστες συνθήκες που υποδείχθηκαν από τον πειραματικό σχεδιασμό και αξιολογήθηκαν ως προς τις εξαρτημένες μεταβλητές, επιβεβαιώνοντας το μοντέλο.

Τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, με εγκλεισμένη χρυσίνη μελετήθηκαν με τεχνικές δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA), ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης (TEM) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των νανοσωματιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό αλλά και τη μορφολογία των νανοσωματιδίων.

2.2 Όργανα , συσκευές & αντιδραστήρια

Στους παρακάτω πίνακες περιγράφονται όλα τα όργανα , οι συσκευές και τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.

Όργανο-Συσκευή	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp	ZX4
Ζυγός ακριβείας (έως 210 mg)	Kern	ADJ 200-4
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	Witeg	MSH-20A
Επωαστήρας (Incubator)	Gallenkamp	
Περιστροφικός αναδευτήρας	Buchi	Rotavapor ® R-144
Πεχάμετρο	Metrohm	744
Συσκευή λυοφιλίωσης	Frozen In time	Lablyo Mini
Φασματόμετρο FT-IR /AT-IR	Jasco	4200
Probe υπερήχων	Sonics & Materials Inc	Vibra cell
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Δυναμική Σκέδαση Φωτός	Malvern Panalytical	Zetasizer Nano ZS
Nanoparticle Tracking Analysis	Malvern Panalytical	NanoSight NS300

Πίνακας. 1 Εργαστηριακά όργανα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων.

Αντιδραστήριο	Μοριακός Τύπος	Προμηθευτής
Χιτοζάνη		Gletnham Life Sciences
Χλωριούχος χολίνη	$C_5H_{14}ClNO$	Alfa Aesar
Γαλακτικό οξύ	$C_3H_6O_3$	Labbox
Νερό (απιονισμένο)	H_2O	-
Καυστικό Νάτριο	$NaOH$	Penta
Υδροχλώριο	HCl	Penta
Ακετόνη	C_3H_6O	Lachner
Αιθανόλη	C_2H_6O	PanReac AppliChem
Χρυσίνη	$C_{15}H_{10}O_4$	Alfa Aesar

Πίνακας. 2 Εργαστηριακά αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιηθήκαν κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων.

2.3 Σύνθεση βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NADES) χλωριούχος χολίνη – γαλακτικό οξύ 1:2 (ChCl:LA)

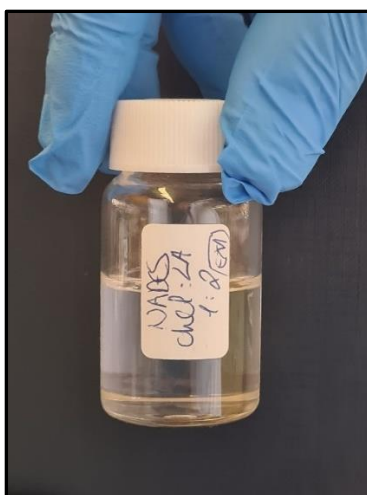
Ο Φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης (NADES) που χρησιμοποιείται στη μελέτη αυτή είναι ο διαλύτης χλωριούχος χολίνη-γαλακτικό οξύ. Η σύνθεση του NADES γίνεται σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2. Τα επιμέρους συστατικά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Ένωση	Μοριακός Τύπος	Μοριακό Βάρος (g/mol)	Μοριακή αναλογία
Χλωριούχος Χολίνη (ChCl)	$C_5H_{14}ClNO$	139.620	1
Γαλακτικό Οξύ (LA)	$C_3H_6O_3$	90.078	2

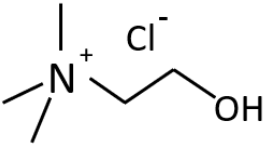
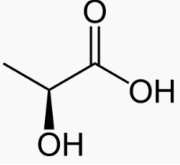
Πίνακας. 3 Απεικόνιση των συστατικών του NADES

Ειδικότερα, έγινε χρήση καθαρής χλωριούχου χολίνης και υδατικού διαλύματος γαλακτικού οξέος (80%w/w). Σημειώνεται ότι η χλωριούχος χολίνη παραμένει για 24 h σε αντλία κενού ούτως ώστε να απομακρυνθεί το περισσότερο ποσοστό υγρασίας που κατακρατείται. Το μείγμα παρασκευάζεται με ανάμειξη 10.2 g χλωριούχου χολίνης και 16,4 g γαλακτικού οξέος έτσι ώστε να επιτευχθεί η γραμμομοριακή αναλογία 1:2.

Τέλος, τα συστατικά μεταφέρονται σε γυάλινη σφαιρική φιάλη όπου και θερμαίνονται σε θερμοκρασία 60 °C με μαγνητική ανάδευση για 1,5h.



Εικόνα. 15 Το διάλυμα NADES μετά το πέρας της παρασκευής του

NADES	HBA	HBD
<p style="text-align: center;">ChCl : LA 1 : 2</p>		

Πίνακας. 4 Σύνθεση NADES

2.4 Εγκλεισμός του φυσικού φλαβονοειδούς χρυσίνη σε νανοσωματίδια χιτοζάνης

Σε 10ml υδατικού διαλύματος γαλακτικού οξέος (LA) 2% v/v στο οποίο προστίθεται 20mg χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους ώστε το τελικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση χιτοζάνης 0,2 % w/v .

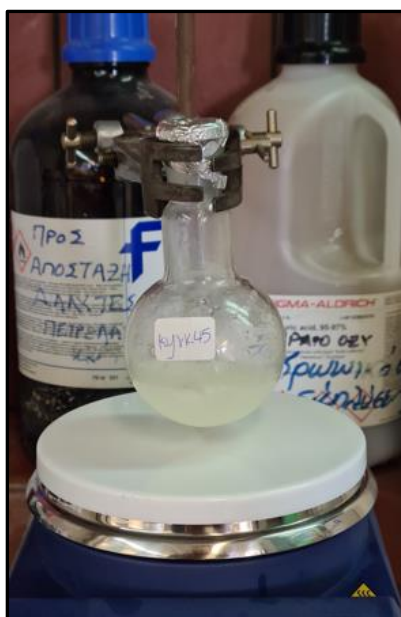
Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται σε 4,8 , μέσω ρυθμιστικού διαλύματος NaOH 10% w/v. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό έτσι ώστε να φιλτραριστούν τυχόν ακαθαρσίες και να αποφευχθεί η δημιουργία περιοχών που λειτουργούν ως αφετηρία συσσωματώσεων .



Εικόνα. 16 Διαδικασία διήθησης υπό κενό

Μετάπειτα, η ποσότητα 2mg της χρυσίνης (ανάλογα με την τιμή που υποδεικνύεται μέσω πειραματικού σχεδιασμού) διαλύεται σε 5ml αιθανόλης με ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex.

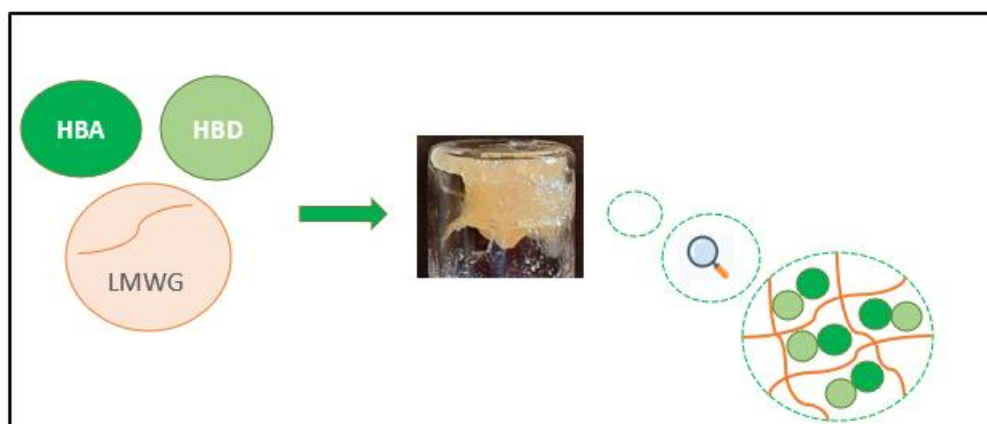
Στη συνέχεια προστίθεται 30μL διαλύματος NADES (ChCl-LA) 0,3% v/v και το διάλυμα μεταφέρεται σε γυάλινη σφαιρική φιάλη και αναδεύεται μαγνητικά για 24h έτσι ώστε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη.



Εικόνα. 17 Μαγνητική ανάδευση της κολλοειδούς διασποράς για 24h.

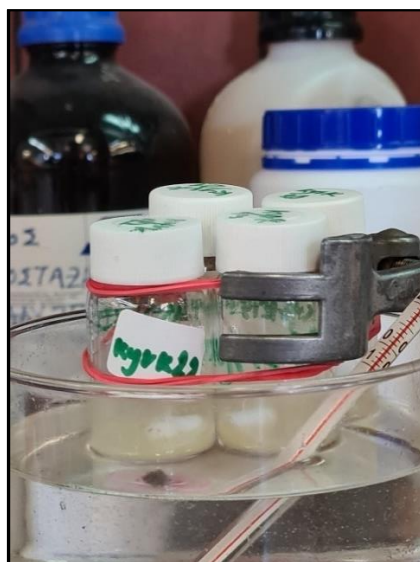
2.5 Παρασκευή νανოსύνθετων ευτηκτογελών

Σε 2ml NADES (ChCl-LA) προστίθεται ποσότητα 0,2g από κόμμι ξανθάνης (ανάλογα με την τιμή που υποδεικνύεται μέσω πειραματικού σχεδιασμού).



Εικόνα. 18 Απεικόνιση των συστατικών της ευτηκτογέλης κατά την πηκτωματοποίηση.

Γίνεται προσθήκη όλης της ποσότητας από την αρχή η οποία συνοδεύεται με ισχυρή ανάδευση με σπαθίδα έτσι ώστε να επιτευχθεί η ομοιογένεια στο εσωτερικό της ευτηκτογέλης .



Εικόνα. 19 Λουτρό ελαίου στο οποίο γίνεται η μαγνητική ανάδευση.

Το φιαλίδιο με την ευτηκτογέλη τοποθετείται σε μαγνητική ανάδευση και θερμαίνεται στους 80°C για 30 min. Το φιαλίδιο ψύχεται στους 60°C και προστίθεται ποσότητα 0,3ml διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης (ανάλογα με την τιμή που υποδεικνύεται μέσω πειραματικού σχεδιασμού).



Εικόνα. 20 Ευτηκτογέλη μετά το πέρας της μαγνητικής ανάδευσης.

Τέλος ,η νανοσύνθετη ευτηκτογέλη ξηραίνεται με λυοφιλοποίηση.



Εικόνα. 21 Λυοφιλοποιημένη νανοσύνθετη ευτηκτογέλη.

2.6 Πειραματικός σχεδιασμός – Design of experiments (DoE)

Ο πειραματικός σχεδιασμός χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μειωθεί σημαντικά ο αριθμός των πειραμάτων και να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την υπό μελέτη διεργασία πετυχαίνοντας την βελτιστοποίηση των αποκρίσεων τις οποίες έχουμε θέσει. Η υλοποίηση του πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken έγινε με την χρήση του λογισμικού Design Expert 12[®]. Ταυτόχρονα, επιλέχθηκε να γίνουν 3 φορές οι επαναλήψεις του κεντρικού σημείου για την εκτίμηση του γνήσιου σφάλματος. Με αυτό τον τρόπο, επιτεύχθηκε η ελαχιστοποίηση του κόστους παραγωγής για την δημιουργία της συγκεκριμένης νανοσύνθετης ευτηκτογέλης.

Με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό πραγματοποιήθηκαν 15 πειράματα, τα οποία επαναλήφθηκαν δύο φορές. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές επιλέχθηκαν οι εξής :

- η περιεκτικότητα του κόμμεως ξανθάνης % w/v (Xanthan Gum)
- η περιεκτικότητα της χρυσίνης % w/w (Chrysin-Chr),
- η περιεκτικότητα της διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης % v/v (Chitosan Nanoparticles-CS NPs)

Αυτοί οι παράγοντες είναι αλληλένδετοι και επηρεάζουν άμεσα τις ιδιότητες της νανοσύνθετης ευτηκτογέλης. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανάλυση της ταυτόχρονης επίδρασης των παραμέτρων αυτών σε κάθε απόκριση η οποία εξετάζεται. Οι εξαρτημένες μεταβλητές (αποκρίσεις) οι οποίες επιλέχθηκαν να μελετηθούν είναι οι παρακάτω :

- Απόδοση εγκλωβισμού (EE%)
- Ικανότητα διόγκωσης-SR (%)
- Ικανότητα συγκράτησης νερού-WRR (%)

Συνοπτικά οι ανεξάρτητες μεταβλητές με το εύρος τιμών τους όπως και τις αποκρίσεις τις οποίες τέθηκαν, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.5 .

Ανεξάρτητες μεταβλητές	Ελάχιστη Τιμή	Ενδιάμεση Τιμή	Μέγιστη Τιμή	Εξαρτημένες Μεταβλητές
Κόμμα Ξανθάνης (% w/v)	10% w/v	15% w/v	20% w/v	Απόδοση Εγκλωβισμού- EE (%)
Χρυσίνη (% w/w)	10% w/v	20% w/v	30% w/v	Ικανότητα Διόγκωσης- SR (%)
Διασπορά Νανοσωματιδίων Χιτοζάνης (% v/v)	10% v/v	15% v/v	20% v/v	Ικανότητα συγκράτησης νερού- WRR (%)

Πίνακας. 5 Εύρος τιμών των Ανεξάρτητων μεταβλητών & συνοπτική τους παρουσίαση μαζί με τις εξαρτημένες μεταβλητές.

Ακολουθεί ο πίνακας.6 στον οποίο συνοψίζονται οι συνδυασμοί της σύστασης των ανεξάρτητων μεταβλητών οι οποίοι αποτέλεσαν το σύνολο των 15 πειραμάτων όπως προέκυψαν από το Design Expert 12.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Run	A: xanthan gum % w/v	B: Chr % w/w	C: CS NPs %
1	15	10	20
2	10	30	15
3	15	20	15
4	15	30	10
5	20	10	15
6	15	20	15
7	20	20	20
8	15	30	20
9	10	20	20
10	20	30	15
11	10	20	10
12	15	20	15
13	15	10	10
14	20	20	10
15	10	10	15

Πίνακας. 6 Τιμές των παραμέτρων για το σύνολο των πειραμάτων για τις νανოსύνθετες ευτηκτογέλες μέσω του πειραματικού σχεδιασμού.

2.7 Χαρακτηρισμός νανοσύνθετων ευτηκτογελών

2.7.1 Προσδιορισμός της ικανότητας διόγκωσης- Swelling Ratio (SR)

Το σύνολο των ευτηκτογελών οι οποίες παρασκευάστηκαν με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα του προσδιορισμού της ικανότητας διόγκωσης-(SR) ,αρχικά υπόκεινται σε λυοφιλοποίηση. Στο επόμενο βήμα, ακολουθούσε η ζύγιση (g) της κάθε μιας λυοφιλοποιημένης ευτηκτογέλης και η μεταφορά τους σε φιαλίδιο όπου περιέχει 10ml διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl) 0.1 M , pH=1,2 . Στη συνέχεια, το φιαλίδιο τοποθετείται στον επωαστήρα σε συνθήκες 37°C, στα 90rpm. Η διαδικασία ζύγισης της ευτηκτογέλης πραγματοποιείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα 5min., 10min., 15min., 20min., 25min., 30min, 60min., 120min., 180min. περιλαμβάνει την αφαίρεση της ευτηκτογέλης από τα φιαλίδια ,καθώς και την απομάκρυνση της επιφανειακής περίσσειας HCl με διηθητικό χαρτί, ώστε τελικά οι μετρήσεις που λαμβάνονται να αφορούν μόνο στην προσροφούμενη ποσότητα διαλύματος HCl στην ευτηκτογέλη.



Εικόνα. 22 Λυοφιλοποιημένη ευτηκτογέλη.

Ο προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης SR(%) γίνεται σύμφωνα με την εξίσωση 1.1 που ακολουθεί :

$$\mathbf{SR(\%)} = \frac{\mathbf{W_s - W_d}}{\mathbf{W_d}} * \mathbf{100} \quad (1.1)$$

Όπου : **SR (%)** , η ικανότητα διόγκωσης, **Ws (g)** , η μάζα της διογκωμένης υδρογέλης την χρονική στιγμή t , **Wd** , η μάζα της ξηρής υδρογέλης που ζυγίστηκε στο t=0.

2.7.2 Προσδιορισμός ικανότητας συγκράτησης νερού -*Water Retention Ratio (WRR)*

Η ικανότητα συγκράτησης του νερού προσδιορίζεται από το χρονικό σημείο στο οποίο η ευτηκτογέλη έχει φτάσει στο σημείο ισορροπίας, όπου έχει απορροφήσει την μέγιστη ποσότητα νερού και η μάζα της θεωρείται ότι διατηρείται πρακτικά σταθερή. Το ποσοστό συγκράτησης νερού διατυπώνεται ως το ποσοστό της ποσότητας του νερού που συγκρατείται σε σχέση με τη μάζα της ξηρής ευτηκτογέλης που ζυγίστηκε με την αφετηρία του πειράματος.

Ο προσδιορισμός ικανότητας συγκράτησης νερού γίνεται σύμφωνα με την εξίσωση 1.2 που ακολουθεί :

$$\mathbf{WRR(\%)} = \frac{\mathbf{W_s - W_d}}{\mathbf{W_e - W_d}} * \mathbf{100} \quad (1.2)$$

Όπου : **WRR (%)** , η ικανότητα συγκράτησης νερού, **Ws (g)** , η μάζα της διογκωμένης υδρογέλης την χρονική στιγμή t , **Wd (g)** , η μάζα της ξηρής υδρογέλης που ζυγίστηκε στο $t=0$ και **We (g)** , η μάζα της υδρογέλης στο σημείο ισορροπίας.



Εικόνα. 23 Διαδικασία απομάκρυνσης του HCl ,έτσι ώστε να είναι επιτεύξιμη η ζύγιση της ευτηκτογέλης.

2.8 Χαρακτηρισμός κολλοειδούς διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS NPs)

Για τον χαρακτηρισμό των παραγόμενων νανοσωματιδίων ως προς το μέγεθος, την κατανομή του μεγέθους και το ζ-δυναμικό έγινε χρήση της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering ,DLS) και της μεθόδου Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) . Τέλος , για τον προσδιορισμό του μεγέθους αλλά και την μελέτη της μορφολογίας τους, χρησιμοποιήθηκε το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy , TEM).

2.8.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Spectroscopy , DLS)

Ο προσδιορισμός του μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων Χιτοζάνης γίνεται με την μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός DLS(Dynamic Light Spectroscopy) στο όργανο Zetasizer Nano ZS της Malvern. Η προετοιμασία του δείγματος ξεκινάει με την ανάδευση σε Vortex του φιαλιδίου που περιέχει την κολλοειδή διασπορά. Απαιτείται αραίωση των 10 μL διαλύματος νανοσωματιδίων σε 20 ml υπερκίθου νερού και ανάδευση σε Vortex, για να επιτευχθεί καλύτερη διασπορά του δείγματος. Με τη χρήση σύριγγας μεταφέρεται ποσότητα του δείγματος σε κυψελίδα τύπου U (DTS 1070) μέχρι την πλήρη διαβροχή των ηλεκτροδίων και εξασφαλίζεται ότι δεν έχουν δημιουργηθεί φυσαλίδες αέρα. Έπειτα, κλείνονται οι είσοδοί της με πώματα και τοποθετείται σε ειδική θέση στο όργανο. Με επιλογή του κατάλληλου αρχείου SOP, λαμβάνονται οι μετρήσεις μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού. Για καθένα από αυτά λαμβάνονται τρεις μετρήσεις με στόχο την επίτευξη της επαναληψιμότητας και υπολογίζεται ο μέσος όρος τους. Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων Χιτοζάνης καταδεικνύεται από την μεταβολή των μεγεθών αυτών με το χρόνο.

2.8.2 Nanoparticle Tracking Analysis ,NTA

Μια άλλη μέθοδος που επιλέχθηκε για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων χιτοζάνης στα οποία εγκλωβίζονταν η χρυσίνη ,είναι η Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Με σκοπό την παρατήρηση του μεγέθους τους αλλά και την κατανομή μεγέθους τους.

Το μοντέλο του οργάνου που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται NanoSight NS300. Στην διάρκεια μίας μέτρησης κατά την συγκεκριμένη μέθοδο ένα αραιωμένο δείγμα νανοσωματιδίων διέρχεται από έναν ειδικό θάλαμο, ο οποίος διαπερνάται από μία

δέσμη λέιζερ. Τα σωματίδια του δείγματος σκεδάζουν το φως και μέσω μία κάμερας γίνεται ορατή η κίνηση Brown την οποία πραγματοποιούν.

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

Μέσω του λογισμικού του οργάνου λαμβάνονται μετρήσεις για το μέγεθος (από 10nm έως 1000nm) του κάθε νανοσωματιδίου ξεχωριστά αλλά παρέχονται και πληροφορίες σχετικά με το σύνολο του πληθυσμού των νανοσωματιδίων, όπως η μέση υδροδυναμική διάμετρος και η τυπική της απόκλιση. Επιπλέον, παρέχονται πληροφορίες για την συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο δείγμα που μετράται κάθε φορά. Το λογισμικό πραγματοποιεί και επεξεργασία των παραπάνω μετρήσεων, προσφέροντας στο χρήστη διαγράμματα κατανομής του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε δύο και τρεις διαστάσεις. Ακόμα, αποθηκεύει στιγμιότυπα από την κάμερα κατά τη διέλευση των σωματιδίων από το θάλαμο σε μορφή εικόνων και δημιουργεί το διάγραμμα κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων που φαίνονται στο συγκεκριμένο στιγμιότυπο. Τέλος, καταγράφει σε video την διέλευση των σωματιδίων και το αποθηκεύει αυτόματα με τις υπόλοιπες μετρήσεις σε συγκεκριμένο αρχείο. Για κάθε δείγμα που διέρχεται από το θάλαμο ανάλυσης, το όργανο λαμβάνει πέντε με έξι διαφορετικές μετρήσεις και στιγμιότυπα και κατασκευάζει ένα διάγραμμα κατανομής του μεγέθους.

2.8.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (Transmission Electron Microscopy , TEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης (TEM) είναι μια αναλυτική τεχνική κατά την οποία γίνεται χρήση μιας εστιασμένης δέσμης ηλεκτρονίων πάνω στο δείγμα χρησιμοποιώντας ένα σύστημα συγκεντρωτικών (ηλεκτρομαγνητικών φακών). Στόχος του είναι η εξέταση της δομής, της μορφολογίας και των ιδιοτήτων των υλικών σε νανοκλίμακα. Στο TEM, μια δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από ένα λεπτό στρώμα δείγματος και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ηλεκτρονίων και του δείγματος χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εικόνων και φασμάτων υψηλής ανάλυσης.

Τα δείγματα υπό διερεύνηση εναιωρήθηκαν σε απιονισμένο νερό και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με υπερήχους για να διασπαστούν τα συσσωματωμένα σωματίδια. Μια σταγόνα από το εναιώρημα στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε ένα πλέγμα χαλκού

επικαλυμμένο με άνθρακα 300 mesh έτσι ώστε να στεγνώσει υπό την επίδραση αέρα καθόλη την διάρκεια της νύχτας.

3 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of experiments , DoE)

3.1.1 Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων

Ως στόχος του πειραματικού σχεδιασμού τέθηκε η βελτιστοποίηση της σύστασης της νανοσύνθετης ευτηκτογέλης έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί η ικανότητα διόγκωσής της. Μετά το πέρας των 15 πειραμάτων , τα αποτελέσματα που προέκυψαν περιλαμβάνονται στον παρακάτω πίνακα. .

Run	Factor 1 R1: Swelling Ratio %
1	76
2	79
3	35
4	90
5	93
6	35
7	105
8	97
9	26
10	75
11	60
12	40
13	97
14	123
15	21

Πίνακας. 7 Τιμές των αποκρίσεων για τα αντίστοιχα 15 πειράματα.

Μέσω της στατιστικής μελέτης που πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του Design Expert 12 , επιλέχθηκε το κατάλληλο μοντέλο παλινδρόμησης το οποίο συσχετίζει με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα την κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή με τις αντίστοιχες αποκρίσεις. Η βέλτιστη σύσταση η οποία προέκυψε παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα. .

Κόμμι Ξανθάνης (% w/v)	Χρυσίνη (% w/w)	Διασπορά Νανοσωματιδίων Χιτοζάνης (% v/v)
20	13,6	10

Πίνακας. 8 Βέλτιστη σύσταση της νανოსύνθετης ευτηκτογέλης

A) R1 : Ικανότητα Διόγκωσης (SR)

Για την μελέτη αυτής της απόκρισης το μοντέλο το οποίο επιλέχθηκε το τετραγωνικό μοντέλο (quadratic) . Η αρχική μορφή της εξίσωσης περιλαμβάνει τους όρους A, B, C, AB, AC, BC, A², B², C² , όπου με A, B, C έχουν συμβολιστεί οι ανεξάρτητες μεταβλητές :

A: περιεκτικότητα Κόμμι Ξανθάνης (xanthan gum) κατά βάρος (% w/v)

B: περιεκτικότητα Χρυσίνης (chr) κατά βάρος (% w/w)

C: περιεκτικότητα Διασπορά Νανοσωματιδίων Χιτοζάνης (CS NPs) κατ'όγκο (% v/v)

Εφόσον η τιμή του p-value είναι μικρότερη από 0.05 ,με p-value= 0.0029, υποδεικνύεται ότι οι όροι του μοντέλου είναι στατιστικά σημαντικοί. Σε αυτή την περίπτωση , τα A, AB, B²,C² είναι σημαντικοί όροι του μοντέλου ,όπως διαπιστώνουμε από τον πίνακα. . Τιμές μεγαλύτερες από 0.100 υποδεικνύουν ότι οι όροι του μοντέλου δεν είναι στατιστικά σημαντικοί. Στην περίπτωση την οποία υπάρχουν πολλοί ασήμαντοι όροι μοντέλου (χωρίς να υπολογίζονται αυτοί που απαιτούνται για την υποστήριξη της ιεραρχίας) , η μείωση του μπορεί να βελτιώσει το μοντέλο που περιγράφεται.

Η τιμή του F-value του μοντέλου ισούται με 10.70 και φανερώνει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό. Ταυτόχρονα, η πιθανότητα ύπαρξης κάποιας τόσο μεγάλης τιμής F-value ,λόγω θορύβου, ανέρχεται στο 0.29% .

Η τιμή του F-value του Lack of Fit του μοντέλου είναι 29 , το οποίο σημαίνει ότι η κακή προσαρμογή είναι σημαντική σε σχέση με το καθαρό σφάλμα. Υπάρχει 3.36% πιθανότητα η F-value του Lack of Fit του μοντέλου να έχει αυτή την τιμή λόγω θορύβου.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	13123.57	7	1874.80	10.70	0.0029	significant
A- xanthan gum	5512.50	1	5512.50	31.47	0.0008	
B- chr	364.50	1	364.50	2.08	0.1924	
C-CS NPs	544.50	1	544.50	3.11	0.1213	
AB	1444.00	1	1444.00	8.24	0.0240	
A ²	327.41	1	327.41	1.87	0.2139	
B ²	1615.41	1	1615.41	9.22	0.0189	
C ²	3880.03	1	3880.03	22.15	0.0022	
Residual	1226.17	7	175.17			
Lack of Fit	1209.50	5	241.90	29.03	0.0336	significant
Pure Error	16.67	2	8.33			
Cor Total	14349.73	14				

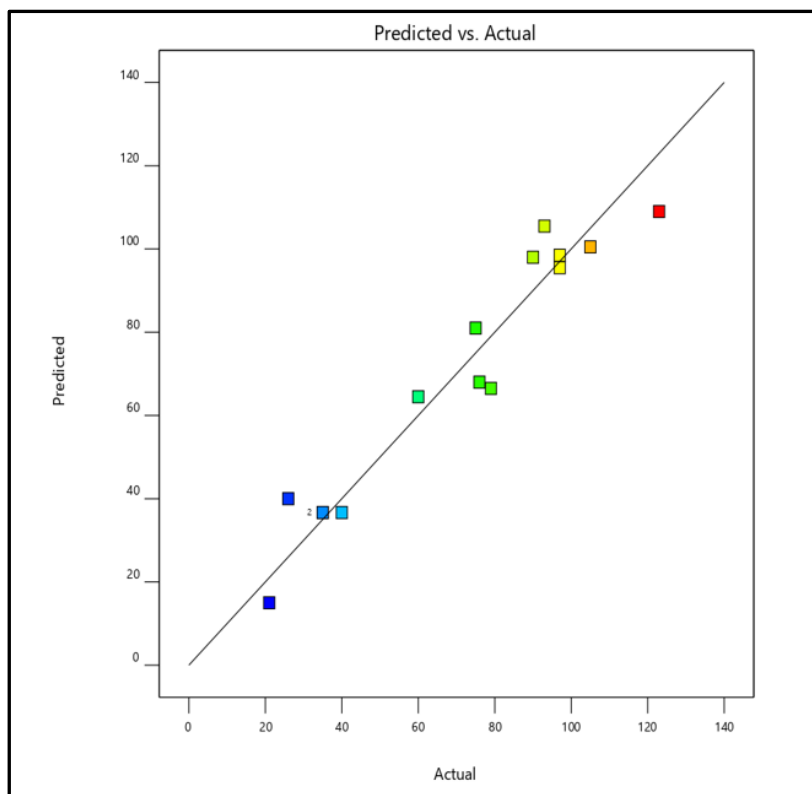
Πίνακας. 9 Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο το οποίο περιγράφει την ικανότητα διόγκωσης

Σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα, ο συντελεστής πολλαπλής συσχέτισης (R^2) έχει τιμή 0.9327, γεγονός που φανερώνει την αρκετά καλή προσαρμογή του μοντέλου. Ο προβλεπόμενος συντελεστής πολλαπλής συσχέτισης (Predicted R^2) ισούται με 0,3387, δεν βρίσκεται σε λογική συμφωνία με τον προσαρμοσμένο συντελεστή πολλαπλής συσχέτισης (Adjusted R^2) ο οποίος ισούται με 0.8291, λόγω του ότι η διαφορά είναι μεγαλύτερη από 0.2. Ο όρος “Adeq Precision” αντιστοιχεί στην μέτρηση της αναλογίας του σήματος προς τον θόρυβο, όπου στην συγκεκριμένη περίπτωση ισούται με 10.1391. Μια αναλογία η οποία είναι μεγαλύτερη από 4, αξιολογείται ως επιθυμητή και φανερώνει την ύπαρξη επαρκούς σήματος.

Std. Dev.	13.24	R²	0.9146
Mean	70.13	Adjusted R²	0.8291
C.V. %	18.87	Predicted R²	0.3387
		Adeq Precision	10.1391

Πίνακας. 10 Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο το οποίο περιγράφει την 1η απόκριση.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρακάτω, παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών του μοντέλου με τις πραγματικές τιμές που συλλέχθηκαν μέσω των πειραμάτων.



Διάγραμμα.1 Συσχέτιση προβλεπόμενων και πραγματικών τιμών της 1^{ης} απόκρισης.

Στο παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι το μοντέλο έχει μια σχετικά καλή γραμμικότητα.

Το μοντέλο της παλινδρόμησης το οποίο συσχετίζει τις παραμέτρους σχεδιασμού A , B ,C με την απόκριση της Ικανότητα Διόγκωσης- SR (%)

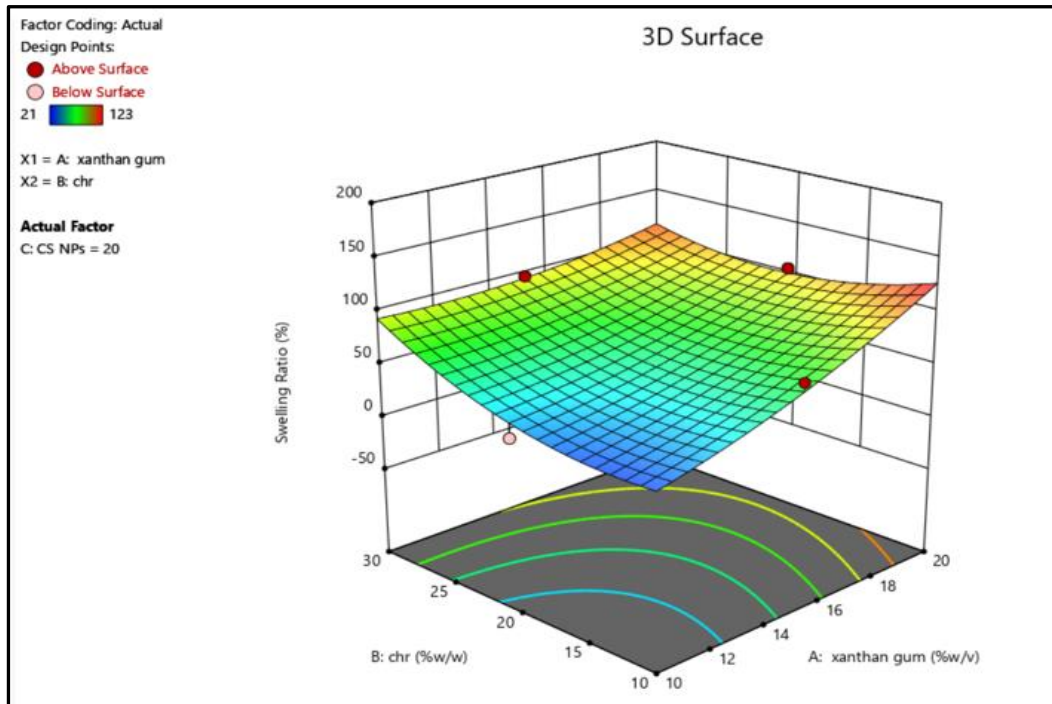
$$\text{Swelling Ratio(R1)} = 36.67 + 26.25 \cdot A + 6.75 \cdot B - 8.25 \cdot C - 19 \cdot A \cdot B + 4 \cdot A \cdot C + 7 \cdot B \cdot C + 9.42 \cdot A^2 + 20.92 \cdot B^2 + 32.42 \cdot C^2 \quad (1)$$

Τέλος, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση της Ικανότητα Διόγκωσης- SR (%) είναι η εξής:

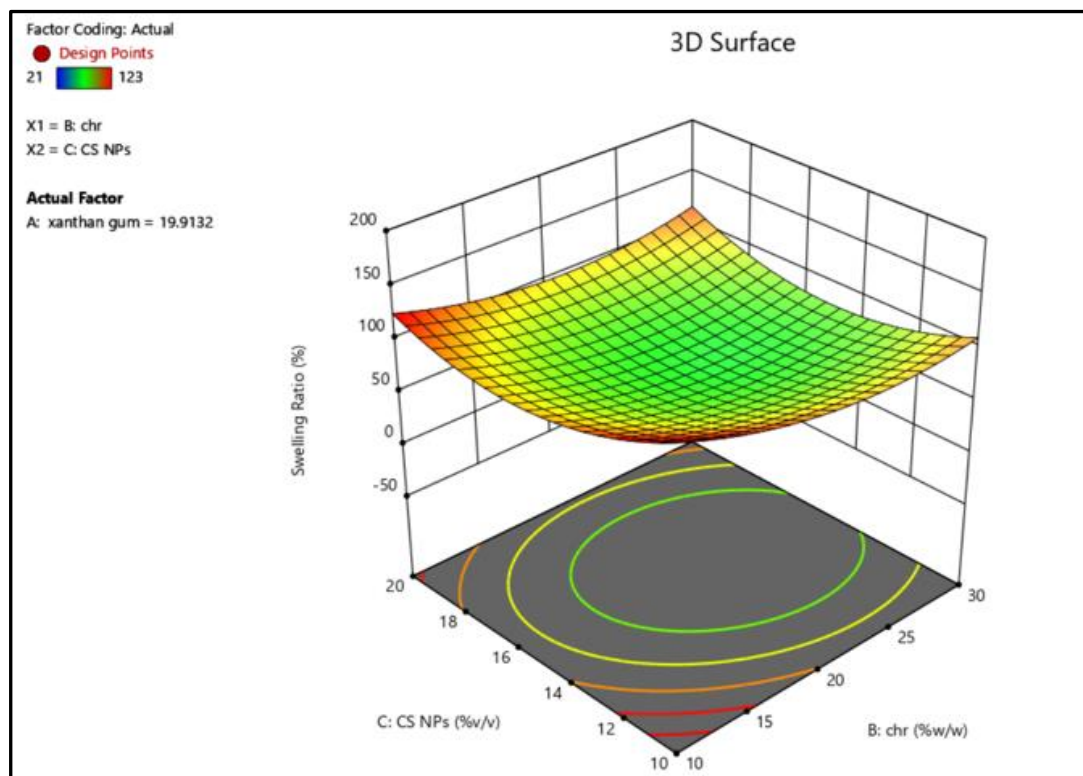
$$\text{Swelling Ratio(R1)} = 393.33 - 0.85 \cdot \text{Xanthan Gum} - 4.09 \cdot \text{Chr} - 45.75 \cdot \text{CS NPs} - 0.38 \cdot \text{Xanthan Gum} \cdot \text{Chr} + 0.16 \cdot \text{Xanthan Gum} \cdot \text{CS NPs} + 0.14 \cdot \text{Chr} \cdot \text{CS NPs} + 0.38 \cdot (\text{Xanthan Gum})^2 + 0.21 \cdot (\text{Chr})^2 + 1.30 \cdot (\text{CS NPs})^2 \quad (2)$$

Στη συνέχεια , παρατίθενται τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσει δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών κάθε φορά , όπου η τρίτη μεταβλητή λαμβάνει την βέλτιστη τιμή της.

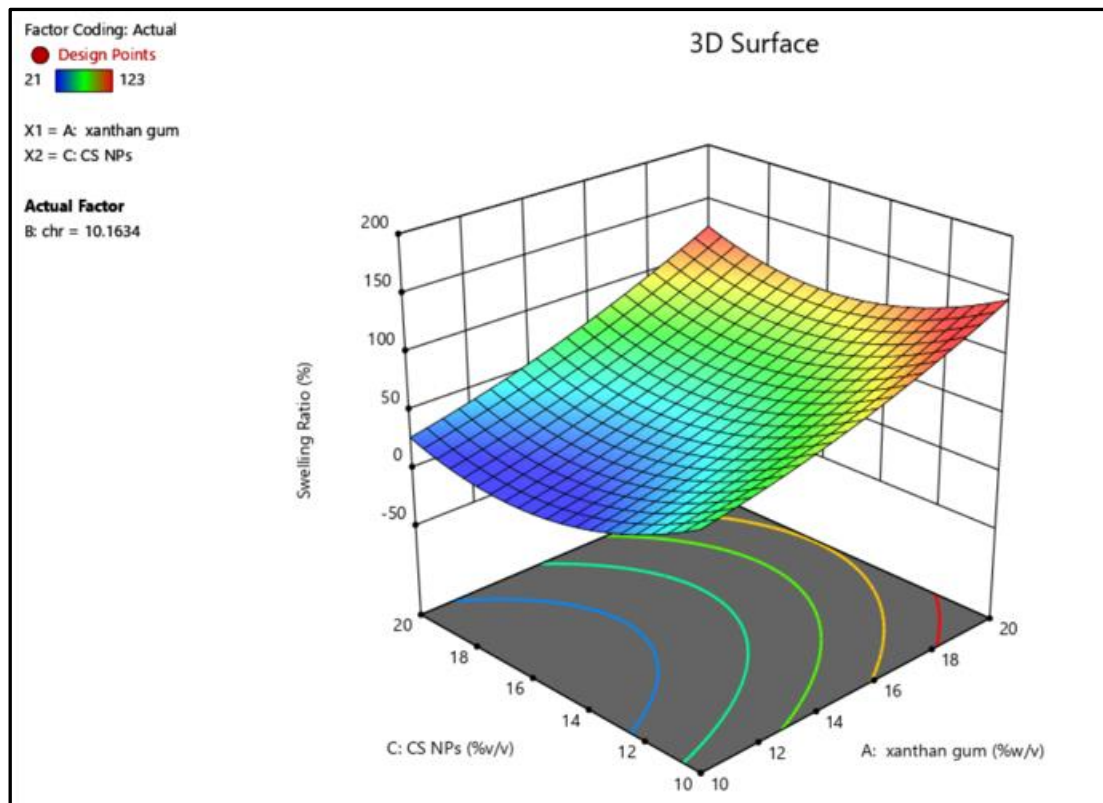
A) Ικανότητα Διόγκωσης – Swelling Ratio SR-(%)



Διάγραμμα.2 Τρισδιάστατη(3D) επιφάνεια του SR(%) συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C.



Διάγραμμα.3 Τρισδιάστατη(3D) επιφάνεια του SR(%) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A.



Διάγραμμα.4 Τρισδιάστατη(3D) επιφάνεια του SR(%) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο A.

3.1.2 Επιβεβαίωση του μοντέλου

Η νανοσύνθετη ευτηκτογέλη με τη βέλτιστη σύσταση παρασκευάστηκε 2 φορές, με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό, όσον αφορά στην ικανότητα διόγκωσης. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης παρουσιάζονται στον πίνακα.11 .

Runs	Ικανότητα Διόγκωσης – Swelling Ratio SR-(%)
1	80
2	98

Πίνακας. 11 Αποτελέσματα πειραμάτων βέλτιστης αναλογίας

Στον παρακάτω πίνακα.12 , παρουσιάζονται τα εύρη αποκρίσεων για την βέλτιστη αναλογία των ανεξάρτητων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού.

Όπως παρατηρήσαμε οι αποκλίσεις που φανερώνουν τα αποτελέσματα των επαναληπτικών πειραμάτων είναι εντός των ορίων που έχουν τεθεί από τον πειραματικό σχεδιασμό. Τα αποτελέσματά επιβεβαιώθηκαν και κατά συνέπεια η νανοσύνθετη ευτηκτογέλη με την βέλτιστη σύσταση παρουσιάζει την ικανότητα διόγκωσης η οποία είχε προβλεφθεί.

Two-sided Confidence = 95%

Response	Predicted Mean	Predicted Median	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean	95% PI high
Swelling Ratio	129.887	129.887		13.9008	2	16.7333	86.8732	89	172.902

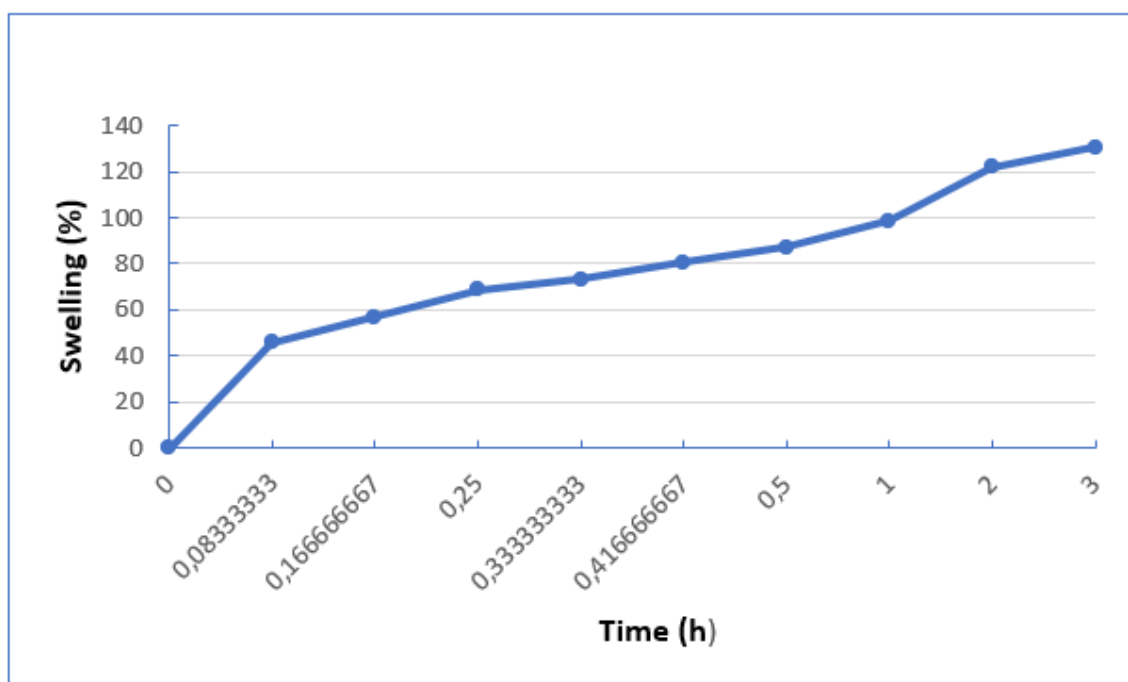
Πίνακας. 12 Εύρος αποκρίσεων για την βέλτιστη αναλογία των ανεξάρτητων μεταβλητών.

3.2 Αξιολόγηση των αποκρίσεων της νανοσύνθετης ευτηκτογέλης που παρασκευάστηκε με τις βέλτιστες συνθήκες

Οι βέλτιστες συνθήκες της νανοσύνθετης ευτηκτογέλης (πίνακας.8) αποτελούνται από ποσότητα 0,4g κόμμεως ξανθάνης, 0,2ml υδατικής διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης και 2,7mg χρυσίνης.

3.2.1 Προσδιορισμός της ικανότητας διόγκωσης- *Swelling Ratio (SR)* & ικανότητας συγκράτησης νερού -*Water Retention Ratio (WRR)*

Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει το ποσοστό της διόγκωσης επί τοις εκατό (%) συναρτήσει του χρόνου ,για την ευτηκτογέλη που παρασκευάστηκε με τις συνθήκες που υπέδειξε ως βέλτιστες ο πειραματικός σχεδιασμός. Η βέλτιστη σύσταση της ευτηκτογέλης για την μεγιστοποίηση της ικανότητας διόγκωσης παρουσιάζεται στον πίνακα.8 .

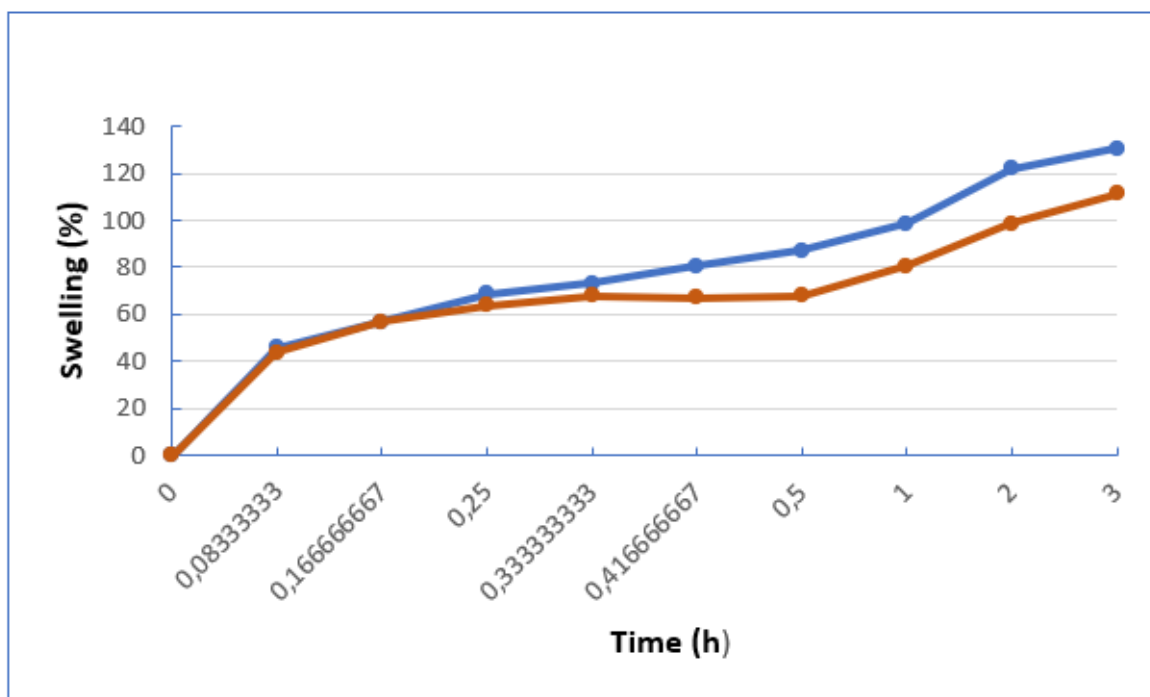


Διάγραμμα.5 Ποσοστό διόγκωσης της ευτηκτογέλης με την βέλτιστη σύσταση συναρτήσει του χρόνου

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα.5, παρατηρούμε ότι η μέγιστη διόγκωση της ευτηκτογέλης παρουσιάζεται στις 3h με ποσοστό 130% . Στα πρώτα 5min (0,083h)

παρατηρείται η πιο απότομη αύξηση στο ποσοστό της διόγκωσης ,ενώ έπειτα ακολουθεί μια εκθετικά αυξανόμενη πορεία καθόλη την διάρκεια μέχρι τη 1hr στην οποία παρατηρούμε μια μεγαλύτερη αύξηση .ε

Η ευτηκτογέλη για το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα το οποίο διήρκησε το πείραμα, δεν έφτασε στο σημείο ισορροπίας έτσι ώστε η ικανότητα συγκράτησης νερού να μπορεί να προσδιοριστεί.



Διάγραμμα.6 Ποσοστό διόγκωσης των ευτηκτογελών με την βέλτιστη σύσταση συναρτήσει του χρόνου

Στο παραπάνω διάγραμμα.6 , παρουσιάζεται η συγκριτική μεταβολή του ποσοστού διόγκωσης συναρτήσει του χρόνου για τις 2 επαναλήψεις που έγιναν με την βέλτιστη σύσταση. Μέχρι το διάστημα των 20min (0,33h) παρατηρείται αύξηση του ποσοστού διόγκωσης ενώ έπειτα η αυξητική τους πορεία συνεχίζεται με μικρές διαφορές. Το μέγιστο ποσοστό διόγκωσης το οποίο φτάνουν είναι μεταξύ 112%-130% ,ποσοστό το οποίο είναι μεγαλύτερο από τον μέσο όρο της μέγιστης ικανότητας διόγκωσης % των ευτηκτογελών οι οποίες παρασκευάστηκαν σε αυτή την εργασία.

Ούτε σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε σημείο ισορροπίας, έτσι ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί η ικανότητα συγκράτησης νερού. Αυτό είναι ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε σε αρκετές νανοσύνθετες ευτηκτογέλες που παρασκευάστηκαν κατά την διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού και όχι μόνο στις παρασκευές της βέλτιστης σύστασης. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην απόφαση να αποκλείσουμε την απόκριση της ικανότητας συγκράτησης νερού από τις εξαρτημένες μεταβλητές.

3.3 Χαρακτηρισμός κολλοειδούς διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Spectroscopy DLS)

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων πραγματοποιείται με την μέθοδο της δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Πρόκειται για μία μη-επεμβατική, γρήγορη, σχετικά οικονομική και εύκολη μέθοδο προσδιορισμού του μεγέθους των σωματιδίων, του ζ-δυναμικού και του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) .

Δείγμα	Μέση υδροδυναμική διάμετρος(nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)	Ποσοστό Χρυσίνης (% w/w)
CS NPs - 41	758.77 ± 31.79	0.571 ± 0.17	40.53 ± 1.47	20%
CS NPs - 47	142.3 ± 12.80	0.565 ± 0.06	46.53 ± 2.61	10%
CS NPs - 49	505.6 ± 96.81	0.464 ± 0.06	26.37 ± 1.79	30%

Πίνακας. 13 Η μέση υδροδυναμική διάμετρος, ο δείκτης πολυδιασποράς PDI και το ζ-δυναμικό μαζί με τα σφάλματά τους , για τα 3 διαφορετικά ποσοστά Χρυσίνης (% w/w) του πειραματικού σχεδιασμού.

Στον πίνακα.13 παρουσιάζονται οι τιμές της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου , του δείκτη πολυδιασποράς PDI και του ζ-δυναμικού, και τα 3 διαφορετικά ποσοστά χρυσίνης (% w/w) .

Στο πρώτο δείγμα CS NPS – 41 , με ποσοστό χρυσίνης 20% w/w , παρατηρούμε ότι η μέση υδροδυναμική διάμετρος είναι 758.77 nm ενώ η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς PDI είναι 0.571 . Για τιμές μεγαλύτερες του 0.2 γνωρίζουμε ότι έχουμε πολυδιασπορά , δηλαδή υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ των μεγεθών των νανοσωματιδίων . Το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, παρουσιάζει θετικό πρόσημο το οποίο είναι αναμενόμενο και οφείλεται στο θετικό φορτίο της χιτοζάνης και είναι 40.53 mV . Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η τιμή αυτή υποδηλώνει μια σχετικά καλή σταθερότητα του κολλοειδούς συστήματος.[92]

Στο δεύτερο δείγμα CS NPS – 47 , με ποσοστό χρυσίνης 10% w/w , παρατηρούμε ότι η μέση υδροδυναμική διάμετρος ισούται με 142.3 nm ενώ η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς PDI είναι 0.565. Το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, είναι

46.53 mV, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η τιμή αυτή υποδηλώνει μια σχετικά καλή σταθερότητα του κολλοειδούς συστήματος.[92]

Στο τρίτο δείγμα CS NPS – 47 , με ποσοστό χρυσίνης 30% w/w , παρατηρούμε ότι η μέση υδροδυναμική διάμετρος ισούται με 505.6 nm ενώ η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς PdI είναι 0.464 . Για τιμές μεγαλύτερες του 0.2 γνωρίζουμε ότι έχουμε πολυδιασπορά, παρόλα αυτά η τιμή αυτή είναι σχετικά ικανοποιητική. Το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, παρουσιάζει θετικό πρόσημο το οποίο είναι αναμενόμενο και οφείλεται στο θετικό φορτίο της χιτοζάνης και είναι 26.37 mV . Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η τιμή αυτή είναι σχετικά ικανοποιητική.[92]

Συνολικά παρατηρείται ότι το εύρος των μεγεθών των νανοσωματιδίων κυμαίνεται από 142.3 nm έως 758.77 nm .Το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι μια σημαντική παράμετρος , καθώς πολλές από τις φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με τα νανοσωματίδια εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την διάμετρο των νανοσωματιδίων , όμως αυτό στην συγκεκριμένη μέθοδο μπορεί και να αποκλίνει από το πραγματικό μέγεθος γεγονός το οποίο είναι ικανό να επηρεάσει και τις τιμές του PdI.[93] Το εύρος των τιμών του PdI το οποίο είναι από 0.464 έως 0.571 ,υποδεικνύει ότι το σύστημα έχει μεγάλη κατανομή μεγεθών. Τέλος, το ζ-δυναμικό κυμαίνεται από 26.37 mV έως 46.53 mV τιμές που κατά κύριο λόγο δείχνουν μια καλή σταθερότητα της διασποράς [92] , που υποδηλώνει παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων. Στην παρεντερική χορήγηση, το επιφανειακό φορτίο είναι σημαντικό για τον καθορισμό του κατά πόσον τα νανοσωματίδια θα συσσωρευτούν στην κυκλοφορία του αίματος ή εάν θα προσκολληθούν ή θα αλληλεπιδράσουν με μια κυτταρική μεμβράνη με αντίθετο φορτίο.[50]

3.4 Nanoparticle Tracking Analysis , NTA

Στον παρακάτω πίνακα.14 παρατηρούμε ότι η τιμή της υδροδυναμική διαμέτρου από την τεχνική NTA είναι 260,1 nm . Η μέτρηση έχει σημαντική διαφορά με αυτή η οποία παρατηρήθηκε με την μέθοδο του DLS . Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε τις διαφορές.

Δείγμα	Υδροδυναμική διάμετρος (nm) με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	Υδροδυναμική διάμετρος (nm) με Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)
CS NPS-41	758.77 ± 31.79	260.1 ± 14.1

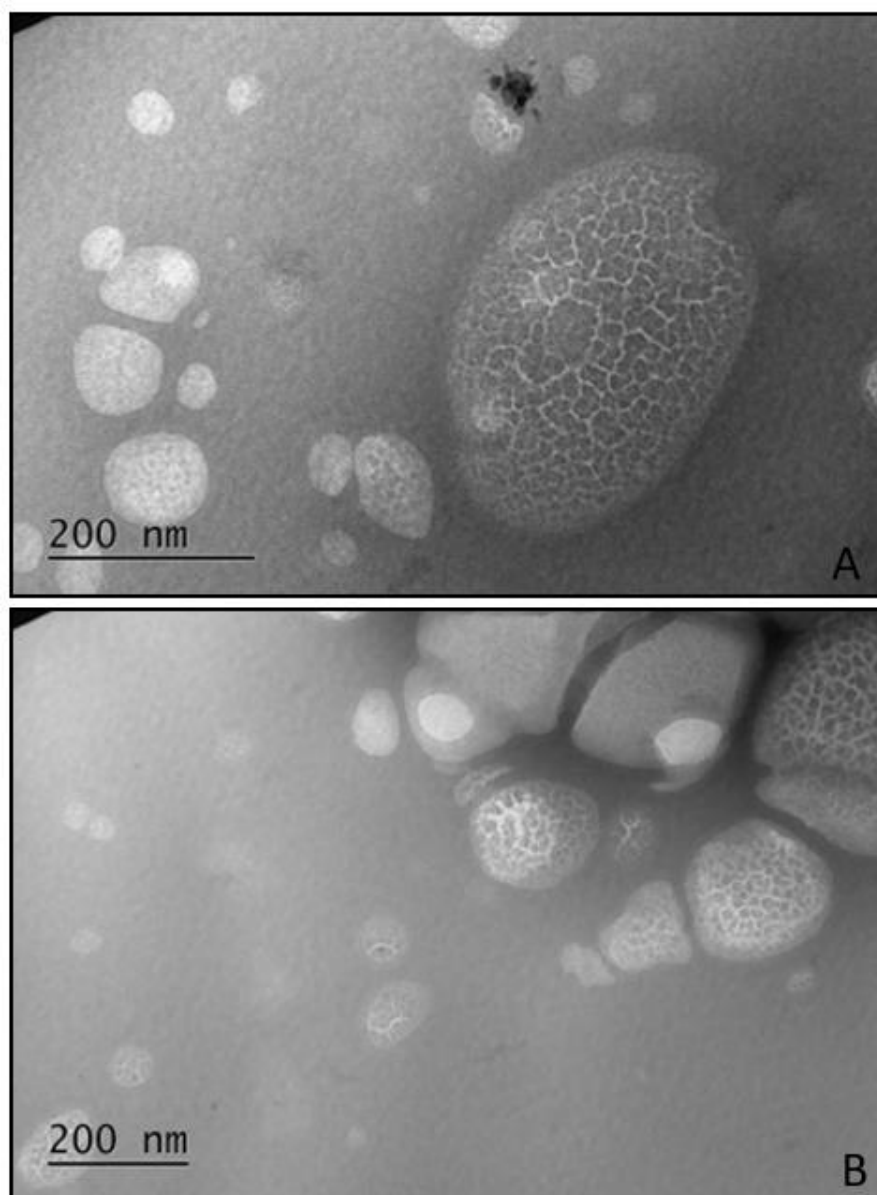
Πίνακας. 14 Σύγκριση τιμής υδροδυναμικής διαμέτρου DLS & NTA.

Αναλυτικότερα, η DLS βασίζεται στις διακυμάνσεις της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτουν από την κίνηση Brown των NPs για τον προσδιορισμό του μεγέθους ενός συνόλου σωματιδίων ή της συσσωμάτωσης των σωματιδίων. Ωστόσο, η ένταση της σκέδασης του φωτός είναι ανάλογη της έκτης δύναμης της διαμέτρου των NPs - ως εκ τούτου, η DLS είναι πιο ευαίσθητη στα μεγαλύτερα σωματίδια από ό,τι στα μικρότερα σωματίδια. Ως αποτέλεσμα, η DLS συχνά υπερεκτιμά το μέσο μέγεθος των σωματιδίων ενός δείγματος, ιδίως καθώς αυξάνεται η κατανομή μεγέθους. Επιπλέον, λίγα συσσωματώματα ή σωματίδια σκόνης μπορούν να εμποδίσουν την ανάλυση ενός πληθυσμού μικρότερων σωματιδίων, οδηγώντας τελικά σε ανακριβή περιγραφή του δείγματος.

Η Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) είναι ένα εναλλακτικό μέσο για τη μέτρηση του μεγέθους των NP, το οποίο ξεπερνά τα μειονεκτήματα της DLS ,για αυτό τον σκοπό η NTA χρησιμοποιεί μια βιντεοκάμερα CCD υψηλής ευαισθησίας για να καταγράψει το σκεδαζόμενο φως των μεμονωμένων NP και να παρακολουθήσει την κίνηση Brown κάθε NP για να δώσει ανεξάρτητες μετρήσεις μεγέθους. Συνολικά, η NTA και η DLS μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικές μέθοδοι χαρακτηρισμού. [94,95]

3.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (Transmission Electron Microscopy – TEM)

Η μελέτη της μορφολογίας των νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS NPs) πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy – TEM) . Στην παρακάτω εικόνα παρατηρούμε την CS NPS-41 η οποία έχει υποβληθεί και στην μέθοδο χαρακτηρισμού του DLS & NTA .



Εικόνα. 24 Απεικόνιση των νανοσωματιδίων της διασποράς CS NPS 41 μέσω του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy)

Αρχικά , η εικόνα που λήφθηκε για την κolloειδή διασπορά μας , επιβεβαιώνει ότι το σχήμα παραπέμπει σε σφαιρικό και ότι η επιφάνεια τους είναι λεία. Στο εσωτερικό του παρατηρείται το διασταυρωμένο πλέγμα όπως και την ανομοιομορφία του. Το μέγεθος της διαμέτρου των νανοσωματιδίων κυμαίνεται από 50nm έως και 200nm , τιμή η οποία όπως είναι αναμενόμενο βρίσκεται πιο κοντά με την τιμή από την μέθοδο NTA και όχι από αυτή της DLS.

4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία , πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση της παρασκευής νανοσύνθετων ευτηκτογελών με την χρήση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NADES) , ο οποίος χρησιμοποιείται ως παράγοντας διασύνδεσης της ευτηκτογέλης αλλά και των νανοσωματιδίων χιτοζάνης που παρασκευάσαμε. Ο NADES αποτελείται από χλωριούχο χολίνη και γαλακτικό οξύ (ChCl:LA) σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2, ενώ ο πηκτωματοποιητής που συντελεί στην δημιουργία της ευτηκτογέλης είναι το κόμμι ξανθάνης. Στα νανοσωματίδια χιτοζάνης πραγματοποιήθηκε εγκλωβισμός του φυσικού φλαβονοειδούς χρυσίνης (5,7-διυδροξυφλαβόνη). Οι νανοσύνθετες ευτηκτογέλες χαρακτηρίστηκαν ως προς την ικανότητα διόγκωσης-SR (%) , ενώ τα νανοσωματίδια χιτοζάνης χαρακτηρίστηκαν μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) , nanoparticle tracking analysis (NTA) και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης (TEM). Μέσω του DLS το μέγεθος παρατηρήθηκε στα 142.3 ± 12.80 nm , το PDI 0.565 ± 0.06 και το ζ-δυναμικό 46.53 ± 2.61 mV. Με χρήση του TEM το μέγεθος τους ήταν στα 50-200nm και στην εσωτερική τους μορφολογία παρατηρήθηκε το διασταυρωμένο πλέγμα όπως και η ανομοιομορφία του.

Χρησιμοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE) τύπου Box Behnken με την βοήθεια του λογισμικού Design Expert 12. Με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό πραγματοποιήθηκαν 15 πειράματα, τα οποία επαναλήφθηκαν δύο φορές. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές επιλέχθηκαν οι εξής : η περιεκτικότητα του κόμμιως ξανθάνης %w/v (Xanthan Gum) , η περιεκτικότητα της χρυσίνης % w/w (Chrysin-Chr), η περιεκτικότητα της διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης % v/v (Chitosan Nanoparticles-CS NPs), ενώ οι εξαρτημένες μεταβλητές (αποκρίσεις) οι οποίες επιλέχθηκαν να μελετηθούν είναι οι παρακάτω : Απόδοση εγκλωβισμού (EE%) , Ικανότητα διόγκωσης-SR (%) , Ικανότητα συγκράτησης νερού-WRR (%) . Μέσω των χαρακτηρισμών καταλήξαμε στον αποκλεισμό των εξαρτημένων μεταβλητών της απόδοσης εγκλωβισμού (EE%) και της ικανότητας συγκράτησης νερού-WRR (%) . Κατ' επέκταση, η μόνη μεταβλητή την οποία θέσαμε ως προς μεγιστοποίηση, με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης σύστασης των ανεξάρτητων μεταβλητών, ήταν αυτή της ικανότητας διόγκωσης-SR (%) με την βοήθεια του τετραγωνικού μοντέλου (quadratic model) του πειραματικού σχεδιασμού.

Έπειτα , ακολούθησε η παρασκευή νανοσύνθετων ευτηκτογελών της βέλτιστης σύστασης για την διαδικασία της επαλήθευσης του μοντέλου. Η βέλτιστη σύσταση αποτελούνταν από: 20 %w/v κόμμι ξανθάνης (Xanthan Gum) , 13,6 % w/w χρυσίνης (Chrysin-Chr), 10 % v/v διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης (Chitosan Nanoparticles-CS NPs). Το μέγιστο ποσοστό διόγκωσης το οποίο έφτασαν οι νανοσύνθετες ευτηκτογέλες ήταν μεταξύ 112%-130% , ποσοστό το οποίο είναι μεγαλύτερο από τον μέσο όρο της μέγιστης ικανότητας διόγκωσης % των ευτηκτογελών τις οποίες παρασκευάσαμε , γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχία του μοντέλου.

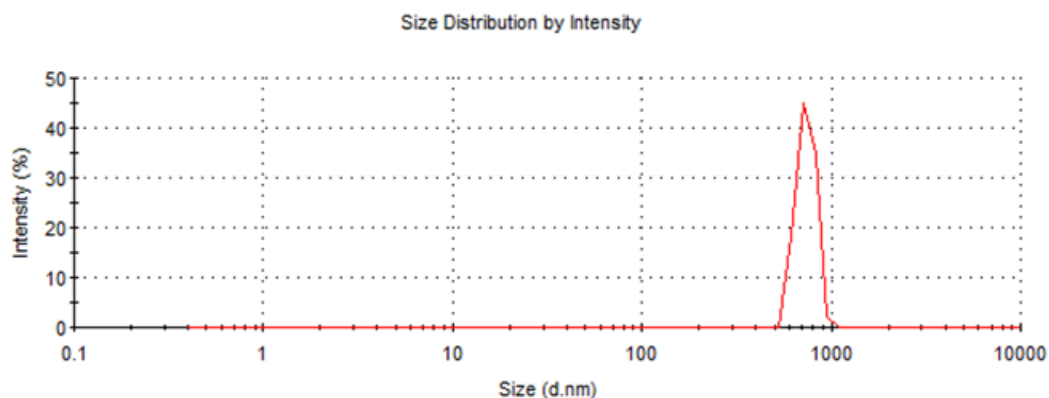
5 Μελλοντικές προτάσεις

Η σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης σε μορφή κολλοειδούς διασποράς όσο και στο εσωτερικό της ευτηκτογέλης, για την ολοκλήρωση της δημιουργίας της νανοσύνθετης ευτηκτογέλης οδηγεί στην εξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων και αξίζει περαιτέρω διερεύνηση, καθώς, αποτελεί ένα σχετικά νέο ερευνητικό πεδίο με λίγες πλήρεις έρευνες.

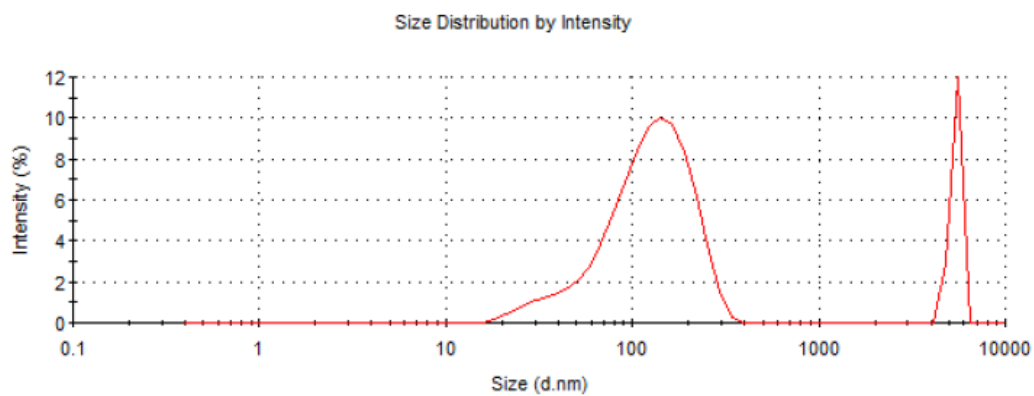
Οι δυνατότητες της μελλοντικής εξέλιξης της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας αποτελούνται από τα παρακάτω :

- Ο προσδιορισμός της αποδέσμευσης της χρυσίνης από την βέλτιστη κολλοειδή διασπορά νανοσωματιδίων χιτοζάνης
- Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης της κολλοειδούς διασποράς των νανοσωματιδίων και των νανοσύνθετων ευτηκτογελών με την μέθοδο AAPH
- Μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων των νανοσύνθετων ευτηκτογελών μέσω TGA ανάλυσης
- Βιολογική αξιολόγηση των νανοσύνθετων ευτηκτογελών και της κολλοειδούς διασποράς νανοσωματιδίων χιτοζάνης

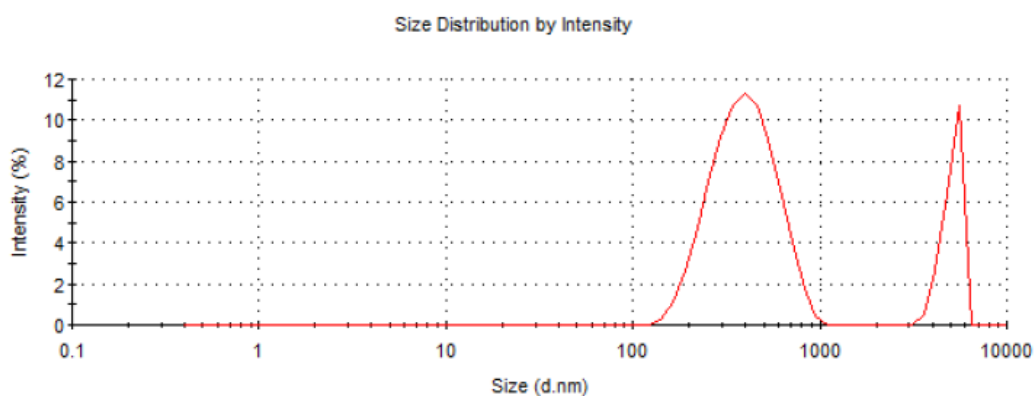
6 Παράρτημα Διαγραμμάτων



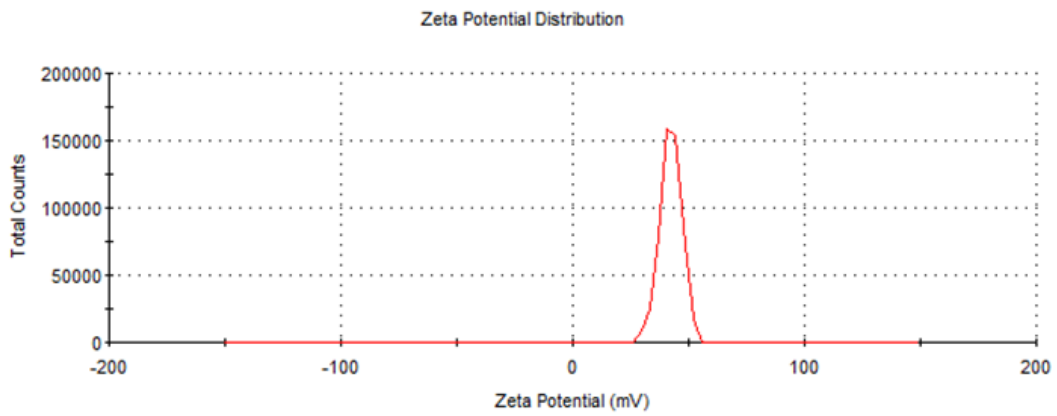
Διάγραμμα.7 Κατανομή μεγέθους CS NPS 41



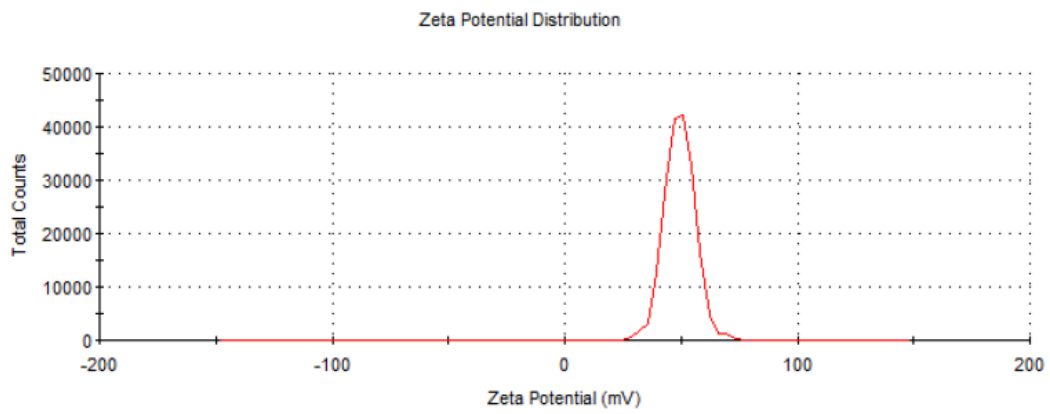
Διάγραμμα.8 Κατανομή μεγέθους CS NPS 47



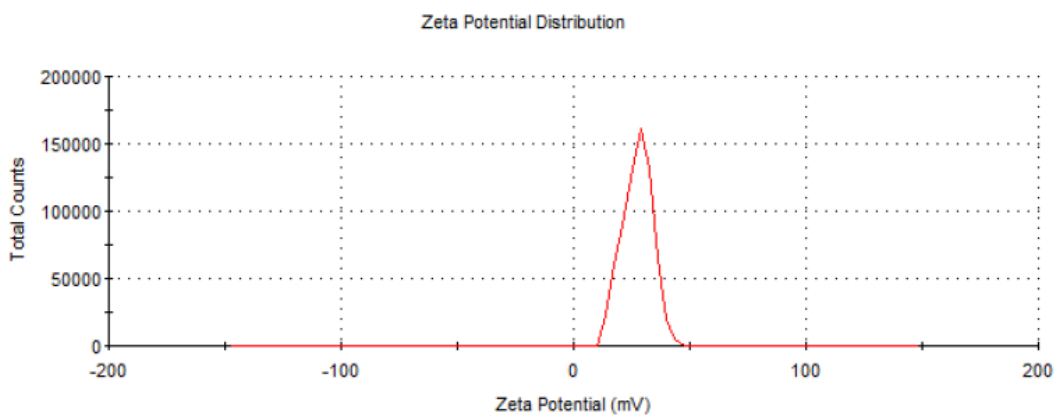
Διάγραμμα.9 Κατανομή μεγέθους CS NPS 49



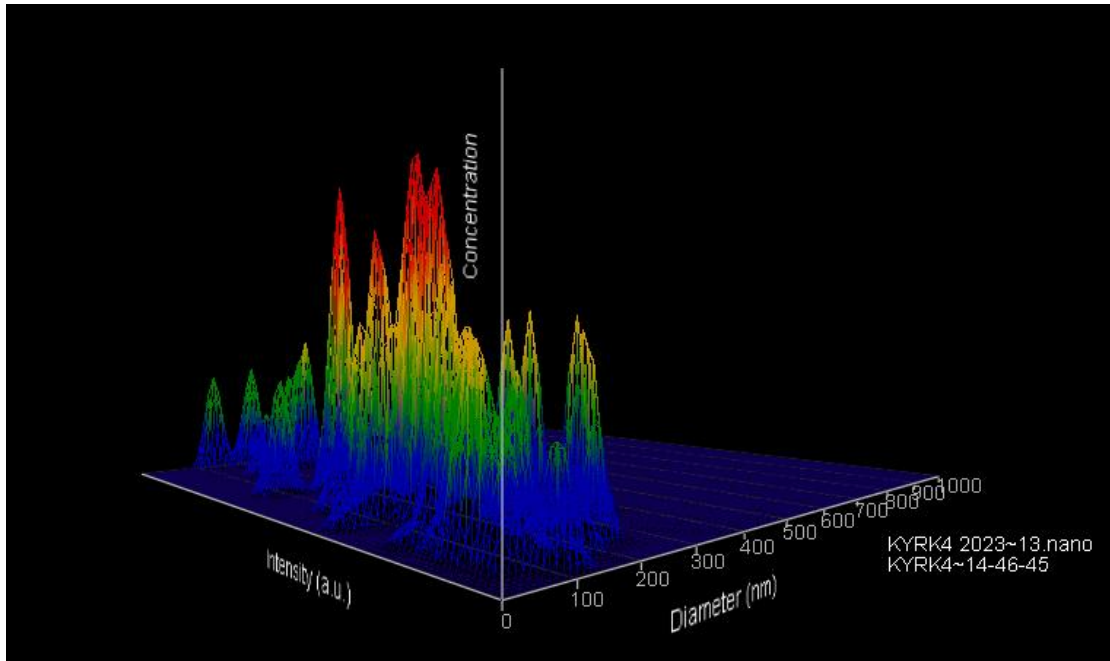
Διάγραμμα.10 ζ-δυναμικό CS NPS 41



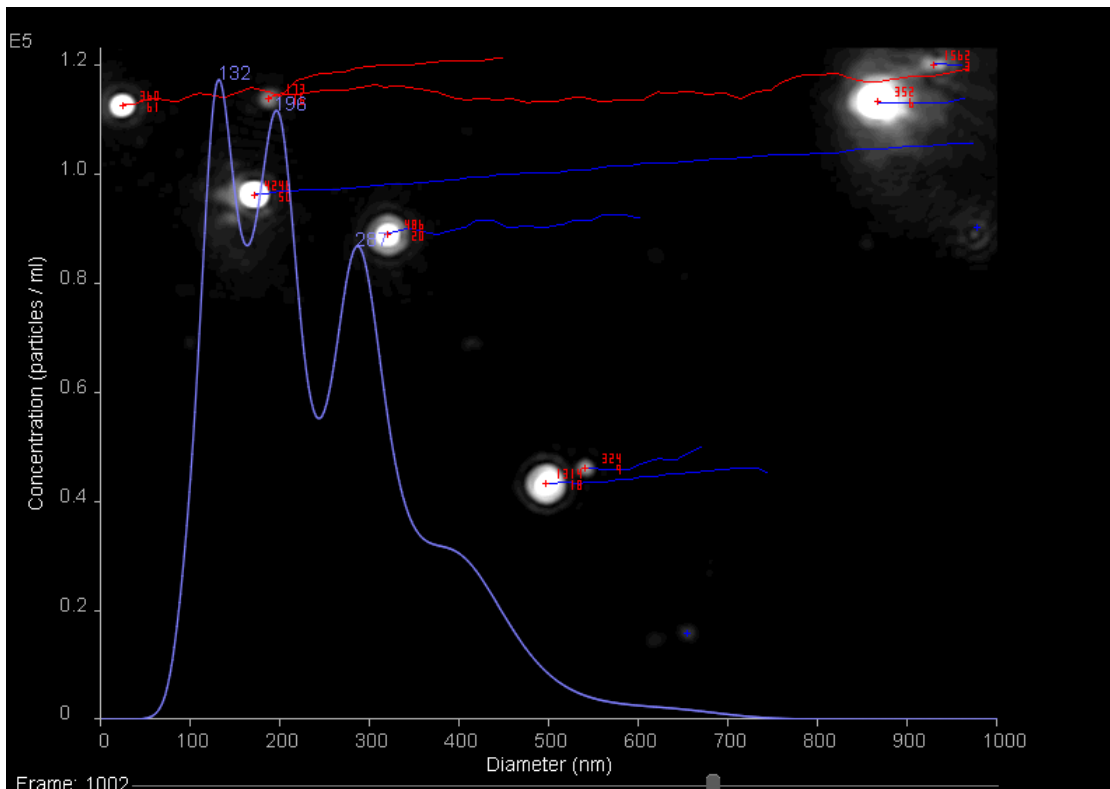
Διάγραμμα.11 ζ-δυναμικό CS NPS 47



Διάγραμμα.12 ζ-δυναμικό CS NPS 49



Διάγραμμα.13 Τρισδιάστατο διάγραμμα κατανομής μεγέθους της διασποράς νανοσωματιδίων CS NPS 41 με την μέθοδο NTA



Διάγραμμα.14 Εικόνα των νανοσωματιδίων της διασποράς CS NPS 41 και η κατανομή μεγέθους τους

7 Βιβλιογραφία

- [1] Abdussalam-Mohammed, W., Ali, A. Q., & Errayes, A. O. (2020). Green chemistry: principles, applications, and disadvantages. *Chem. Methodol*, 4(4), 408-423.
- [2] Wale, T., Suryavanshi, S., Wavare, V., Phalke, P., & Sharmale, M. (2023). Review on Green Chemistry. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 13(7), 190-193.
- [3] Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 301-312.
- [4] Marteel-Parrish, A. E., & Abraham, M. A. (2013). Principles of Green Chemistry and Green Engineering. *Green Chemistry and Engineering: A Pathway to Sustainability*, 21-42.
- [5] Trombino, S., Sole, R., Di Gioia, M. L., Procopio, D., Curcio, F., & Cassano, R. (2023). Green Chemistry Principles for Nano-and Micro-Sized Hydrogel Synthesis. *Molecules*, 28(5), 2107
- [6] Ivanković, A., Dronjić, A., Bevanda, A. M., & Talić, S. (2017). Review of 12 principles of green chemistry in practice. *International Journal of Sustainable and Green Energy*, 6(3), 39-48.
- [7] Ncube, A., Mtetwa, S., Bukhari, M., Fiorentino, G., & Passaro, R. (2023). Circular Economy and Green Chemistry: The Need for Radical Innovative Approaches in the Design for New Products. *Energies*, 16(4), 1752
- [8] Linthorst, J. A. (2010). An overview: origins and development of green chemistry. *Foundations of chemistry*, 12, 55-68.
- [9] Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., ... & Sangoro, J. R. (2020). Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chemical reviews*, 121(3), 1232-1285
- [10] Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural deep eutectic solvents (NADES): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development. *Plants*, 10(10), 2091.
- [11] Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical communications*, (1), 70-71.
- [12] Tomé, L. C., & Mecerreyes, D. (2020). Emerging ionic soft materials based on deep eutectic solvents. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(39), 8465-8478.
- [13] Yang, Z. (2019). Natural deep eutectic solvents and their applications in biotechnology. *Application of ionic liquids in biotechnology*, 31-59.
- [14] El Achkar, T., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2021). Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental chemistry letters*, 19, 3397-3408.
- [15] Wang, J., Zhang, S., Ma, Z., & Yan, L. (2021). Deep eutectic solvents eutectogels: progress and challenges. *Green Chemical Engineering*, 2(4), 359-367
- [16] Jurić, T., Mičić, N., Potkonjak, A., Milanov, D., Dodić, J., Trivunović, Z., & Popović, B. M. (2021). The evaluation of phenolic content, in vitro antioxidant and antibacterial activity of *Mentha piperita* extracts obtained by natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 362, 130226.
- [17] Zeng, C., Zhao, H., Wan, Z., Xiao, Q., Xia, H., & Guo, S. (2020). Highly biodegradable, thermostable eutectogels prepared by gelation of natural deep eutectic solvents using xanthan gum: preparation and characterization. *RSC advances*, 10(47), 28376-28382.
- [18] Oomen, W. W., Begines, P., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2020). Natural deep eutectic solvent extraction of flavonoids of *Scutellaria baicalensis* as a replacement for conventional organic solvents. *Molecules*, 25(3), 617.
- [19] Cao, J., Cao, J., Wang, H., Chen, L., Cao, F., & Su, E. (2020). Solubility improvement of phytochemicals using (natural) deep eutectic solvents and their bioactivity evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, 318, 113997.

- [20] Shekaari, H., Mokhtarpour, M., Faraji, S., & Zafarani-Moattar, M. T. (2021). Enhancement of curcumin solubility by some choline chloride-based deep eutectic solvents at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, 532, 112917.
- [21] Yue, Y., Huang, Q., Fu, Y., & Chang, J. (2020). A quick selection of natural deep eutectic solvents for the extraction of chlorogenic acid from herba artemisiae scopariae. *RSC advances*, 10(39), 23403-23409.
- [22] García, G., Aparicio, S., Ullah, R., & Atilhan, M. (2015). Deep eutectic solvents: physicochemical properties and gas separation applications. *Energy & Fuels*, 29(4), 2616-2644
- [23] Ijardar, S. P., Singh, V., & Gardas, R. L. (2022). Revisiting the physicochemical properties and applications of deep eutectic solvents. *Molecules*, 27(4), 1368.
- [24] Zhang, M., Zhang, X., Liu, Y., Wu, K., Zhu, Y., Lu, H., & Liang, B. (2021). Insights into the relationships between physicochemical properties, solvent performance, and applications of deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(27), 35537-35563.
- [25] Alcalde, R., Gutiérrez, A., Atilhan, M., & Aparicio, S. (2019). An experimental and theoretical investigation of the physicochemical properties on choline chloride–Lactic acid based natural deep eutectic solvent (NADES). *Journal of Molecular Liquids*, 290, 110916.
- [26] Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research*, 6(2), 105-121
- [27] Zhang, H., Tang, N., Yu, X., Li, M. H., & Hu, J. (2022). Strong and tough physical eutectogels regulated by the spatiotemporal expression of non-covalent interactions. *Advanced Functional Materials*, 32(41), 2206305.
- [28] Zeng, C., Zhao, H., Wan, Z., Xiao, Q., Xia, H., & Guo, S. (2020). Highly biodegradable, thermostable eutectogels prepared by gelation of natural deep eutectic solvents using xanthan gum: preparation and characterization. *RSC advances*, 10(47), 28376-28382.
- [29] Chen, S., & Feng, J. (2023). Facile Solvent Regulation for Highly Strong and Tough Physical Eutectogels with Remarkable Strain Sensitivity. *ACS Applied Materials & Interfaces*.
- [30] Criado-Gonzalez, M., Alegret, N., Fracaroli, A. M., Mantione, D., Guzmán-González, G., Del Olmo, R., ... & Mecerreyes, D. (2023). Mixed Conductive, Injectable, and Fluorescent Supramolecular Eutectogel Composites. *Angewandte Chemie International Edition*, 62(26), e202301489.
- [31] Panzer, M. (2022). Holding it together : noncovalent cross-linking strategies for ionogels and Eutectogels, *Materials Advances*.
- [32] Wu, Y., Yang, L., Wang, J., Li, S., Zhang, X., Chen, D., ... & Yang, W. (2023). Degradable Supramolecular Eutectogel-Based Ionic Skin with Antibacterial, Adhesive, and Self-Healable Capabilities. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(30), 36759-36770.
- [33] Bianchi, M. B., Zhang, C., Catlin, E., Sandri, G., Calderón, M., Larraneta, E., ... & Paredes, A. J. (2022). Bioadhesive eutectogels supporting drug nanocrystals for long-acting delivery to mucosal tissues. *Materials Today Bio*, 17, 100471.
- [34] Zhang, H., Tang, N., Yu, X., Li, M. H., & Hu, J. (2022). Strong and tough physical eutectogels regulated by the spatiotemporal expression of non-covalent interactions. *Advanced Functional Materials*, 32(41), 2206305.
- [35] Gao, Y., Zhou, J., Xu, F., Huang, W., Ma, X., Dou, Q., ... & Wu, L. (2023). Highly Stretchable, Self-Healable and Self-Adhesive Double-Network Eutectogel Based on Gellan Gum and Polymerizable Deep Eutectic Solvent for Strain Sensing. *ChemistrySelect* 8(12), e202204463
- [36] Xia, H., Ren, M., Zou, Y., Qin, S., & Zeng, C. (2020). Novel biocompatible polysaccharide-based eutectogels with tunable rheological, thermal, and mechanical properties: the role of water. *Molecules*, 25(15), 3314.
- [37] Rizzo, C., Marullo, S., Benaglia, M., & D'Anna, F. (2023). DBS-Based Eutectogels: Organized Vessels to Perform the Michael Addition Reaction. *European Journal of Organic Chemistry*, 26(35), e202300263.

- [38] Zhang, B., Sun, H., Huang, Y., Zhang, B., Wang, F., & Song, J. (2021). Multifunctional supramolecular eutectogels for self-healable conductive materials and interface lubrication. *Chemical Engineering Journal*, 425, 131518.
- [39] Su, M., Ruan, L., Dong, X., Tian, S., Lang, W., Wu, M., ... & Lei, L. (2023). Current state of knowledge on intelligent-response biological and other macromolecular hydrogels in biomedical engineering: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 227, 472-492.
- [40] Thang, N. H., Chien, T. B., & Cuong, D. X. (2023). Polymer-based hydrogels applied in drug delivery: An overview. *Gels*, 9(7), 523.
- [41] Li, Z., & Lin, Z. (2021). Recent advances in polysaccharide-based hydrogels for synthesis and applications. *Aggregate*, 2(2), e21.
- [42] Mani, R., & Natesan, V. (2018). Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*, 145, 187-196.
- [43] Moghadam, E. R., Ang, H. L., Asnaf, S. E., Zabolian, A., Saleki, H., Yavari, M., ... & Kumar, A. P. (2020). Broad-spectrum preclinical antitumor activity of chrysin: current trends and future perspectives. *Biomolecules*, 10(10), 1374.
- [44] Naz, S., Imran, M., Rauf, A., Orhan, I. E., Shariati, M. A., Shahbaz, M., ... & Heydari, M. (2019). Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. *Life sciences*, 235, 116797.
- [45] Talebi, M., Talebi, M., Farkhondeh, T., Kopustinskiene, D. M., Simal-Gandara, J., Bernatoniene, J., & Samarghandian, S. (2021). An updated review on the versatile role of chrysin in neurological diseases: Chemistry, pharmacology, and drug delivery approaches. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111906.
- [46] Ragab, E. M., El Gamal, D. M., Mohamed, T. M., & Khamis, A. A. (2022). Therapeutic potential of chrysin nanoparticle-mediation inhibition of succinate dehydrogenase and ubiquinone oxidoreductase in pancreatic and lung adenocarcinoma. *European Journal of Medical Research*, 27(1), 172.
- [47] Ragab, E. M., El Gamal, D. M., Mohamed, T. M., & Khamis, A. A. (2022). Study of the inhibitory effects of chrysin and its nanoparticles on mitochondrial complex II subunit activities in normal mouse liver and human fibroblasts. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 1-15.
- [48] Shahbaz, M., Naeem, H., Imran, M., Ul Hassan, H., Alsagaby, S. A., Al Abdulmonem, W., ... & Ihsan, A. (2023). Chrysin a promising anticancer agent: recent perspectives. *International Journal of Food Properties*, 26(1), 2294-2337.
- [49] Kamat, S., Kumari, M., & Jayabaskaran, C. (2022, March). Visualizing the anti-cancer effects of chrysin nanoparticles by flow cytometry, microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. In *Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications XVII* (Vol. 11977, pp. 40-52). SPIE.
- [50] Ferrado, J. B., Perez, A. A., Visentini, F. F., Islan, G. A., Castro, G. R., & Santiago, L. G. (2019). Formation and characterization of self-assembled bovine serum albumin nanoparticles as chrysin delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 43-51.
- [51] Sangeetha, K. S., Umamaheswari, S., Reddy, C. U. M., & Kalkura, S. N. (2017). Chrysin loaded chitosan nanoparticle: Formulation and in-vitro characterization. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(3), 1102.
- [52] Siddhardha, B., Pandey, U., Kaviyarasu, K., Pala, R., Syed, A., Bahkali, A. H., & Elgorban, A. M. (2020). Chrysin-loaded chitosan nanoparticles potentiates antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 9(2), 115.
- [53] Salem, S. S. (2023). A mini review on green nanotechnology and its development in biological effects. *Archives of Microbiology*, 205(4), 128.
- [54] Malik, S., Muhammad, K., & Waheed, Y. (2023). Nanotechnology: A revolution in modern industry. *Molecules*, 28(2), 661.
- [55] Martins, R., & Kaczerewska, O. B. (2021). Green nanotechnology: the latest innovations, knowledge gaps, and future perspectives. *Applied Sciences*, 11(10), 4513.

- [56] Barhoum, A., García-Betancourt, M. L., Jeevanandam, J., Hussien, E. A., Mekkawy, S. A., Mostafa, M., ... & Bechelany, M. (2022). Review on natural, incidental, bioinspired, and engineered nanomaterials: history, definitions, classifications, synthesis, properties, market, toxicities, risks, and regulations. *Nanomaterials*, 12(2), 177.
- [57] Nallasamy, L., Murugavelu, G. S., Ganesh, S., Nandhakumar, P. K., Krishnamoorthy, D., Chandrasekaran, S., & Balan, L. (2023). Green Nanotechnology Revolution in Biomedical Application and Treatments. In *Nanovaccinology: Clinical Application of Nanostructured Materials Research to Translational Medicine* (pp. 181-191). Cham: Springer International Publishing.
- [58] Kumar, R., Kumar, M., & Luthra, G. (2023). Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. *Materials Today: Proceedings*.
- [59] Mayegowda, S. B., Sarma, G., Gadilingappa, M. N., Alghamdi, S., Aslam, A., Refaat, B., ... & Al-Moraya, I. S. (2023). Green-synthesized nanoparticles and their therapeutic applications: A review. *Green Processing and Synthesis*, 12(1), 20230001
- [60] Patel, M., Patel, J., & Dayaramani, R. (2022). Green-nanotechnology-driven drug delivery systems. *Sustainable Nanotechnology: Strategies, Products, and Applications*, 117-133.
- [61] Martins, R., & Kaczerewska, O. B. (2021). Green nanotechnology: the latest innovations, knowledge gaps, and future perspectives. *Applied Sciences*, 11(10), 4513.
- [62] Kanwar, R., Rathee, J., Salunke, D. B., & Mehta, S. K. (2019). Green nanotechnology-driven drug delivery assemblies. *ACS omega*, 4(5), 8804-8815.
- [63] Thipe, V. C., Karikachery, A. R., Çakilkaya, P., Farooq, U., Genedy, H. H., Kaeokhamloed, N., ... & Katti, K. V. (2022). Green nanotechnology—An innovative pathway towards biocompatible and medically relevant gold nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 70, 103256.
- [64] Medina-Cruz, D., Mostafavi, E., Vernet-Crua, A., Cheng, J., Shah, V., Cholula-Diaz, J. L., ... & Webster, T. J. (2020). Green nanotechnology-based drug delivery systems for osteogenic disorders. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(3), 341-356.
- [65] Das, C. A., Kumar, V. G., & Kode, J. (2023). Green nanotechnology approaches using *Mesobacillus jeotgali* ADCG SIST 4 strain synthesized gold nanoparticles for anticancer studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 88, 104976.
- [66] Santos, C., de Araújo Gonçalves, M., de Macedo, L. F., Torres, A. H. F., Marena, G. D., Chorilli, M., & Trovatti, E. (2023). Green nanotechnology for the development of nanoparticles based on alginate associated with essential and vegetable oils for application in fruits and seeds protection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 232, 123351.
- [67] Mahdavi Dehkharghani, F., Ghahremanlou, M., Zandi, Z., Jalili, M., Mozafari, M. R., & Mardani, P. (2023). Future energy and therapeutic perspectives of green nano-technology: recent advances and challenges. *Nano Micro Biosystems*, 2(1), 11-21.
- [68] Medina-Cruz, D., Mostafavi, E., Vernet-Crua, A., Cheng, J., Shah, V., Cholula-Diaz, J. L., ... & Webster, T. J. (2020). Green nanotechnology-based drug delivery systems for osteogenic disorders. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(3), 341-356.
- [69] Lam, P. L., Wong, W. Y., Bian, Z., Chui, C. H., & Gambari, R. (2017). Recent advances in green nanoparticulate systems for drug delivery: efficient delivery and safety concern. *Nanomedicine*, 12(4), 357-385.
- [70] Chaudhary, V. (2022). Prospects of green nanotechnology for efficient management of neurodegenerative diseases. *Frontiers in Nanotechnology*, 4, 1055708.
- [71] Tibbitt, M. W., Dahlman, J. E., & Langer, R. (2016). Emerging frontiers in drug delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 138(3), 704-717
- [72] Adepu, S., & Ramakrishna, S. (2021). Controlled drug delivery systems: current status and future directions. *Molecules*, 26(19), 5905.
- [73] Trucillo, P. (2021). Drug carriers: Classification, administration, release profiles, and industrial approach. *Processes*, 9(3), 470.

- [74] Laffleur, F., & Keckeis, V. (2020). Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed. *International journal of pharmaceutics*, 590, 119912.
- [75] Li, Y., & Yang, L. (2015). Driving forces for drug loading in drug carriers. *Journal of microencapsulation*, 32(3), 255-272.
- [76] Gao, J., Karp, J. M., Langer, R., & Joshi, N. (2023). The future of drug delivery. *Chemistry of Materials*, 35(2), 359-363.
- [77] Li, C., Wang, J., Wang, Y., Gao, H., Wei, G., Huang, Y., ... & Jin, Y. (2019). Recent progress in drug delivery. *Acta pharmaceutica sinica B*, 9(6), 1145-1162.
- [78] Park, H., Otte, A., & Park, K. (2022). Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. *Journal of Controlled Release*, 342, 53-65.
- [79] Dutta, R. (2007). *Drug Carriers in Pharmaceutical Design: Promises and Progress*. *Current Pharmaceutical Design*, 13(7), 761-769
- [80] Tang, P., Shen, T., Wang, H., Zhang, R., Zhang, X., Li, X., & Xiao, W. (2023). Challenges and opportunities for improving the druggability of natural product: Why need drug delivery system?. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 164, 114955.
- [81] Liu, C., Liu, C., Bai, Y., Wang, J., & Tian, W. (2023). Drug Self-Delivery Systems: Molecule Design, Construction Strategy, and Biological Application. *Advanced Healthcare Materials*, 2202769.
- [82] Bharatia, R., Kumar, S., Chaurasiya, S., Gautam, K. M., Bharti, S., & Varun, R. (2023). Sphingosomes: A Novel Vesicular Drug Delivery System. *International Journal of Pharma Professional's Research (IJPPR)*, 14(3), 88-93.
- [83] Finbloom, J. A., Huynh, C., Huang, X., & Desai, T. A. (2023). Bioinspired nanotopographical design of drug delivery systems. *Nature Reviews Bioengineering*, 1(2), 139-152.
- [84] Liu, R., Luo, C., Pang, Z., Zhang, J., Ruan, S., Wu, M., ... & Gao, H. (2023). Advances of nanoparticles as drug delivery systems for disease diagnosis and treatment. *Chinese chemical letters*, 34(2), 107518.
- [85] Ying Du & Baoan Chen (2019) Combination of drugs and carriers in drug delivery technology and its development, *Drug Design, Development and Therapy*, , 1401-1408,
- [86] Uy, M., & Telford, J. K. (2009, March). Optimization by design of experiment techniques. In *2009 IEEE Aerospace conference* (pp. 1-10). IEEE.
- [87] Weissman, S. A., & Anderson, N. G. (2015). Design of experiments (DoE) and process optimization. A review of recent publications. *Organic Process Research & Development*, 19(11), 1605-1633.
- [88] Khuri, A. I., & Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149.
- [89] Swamy, G. J., Sangamithra, A., & Chandrasekar, V. (2014). Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box-Behnken design of experiments. *Dyes and Pigments*, 111, 64-74.
- [90] Aslan, N. E. V. Z. A. T., & Cebeci, Y. A. K. U. P. (2007). Application of Box-Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel*, 86(1-2), 90-97.
- [91] De Leon, A. C., Kidd, M. T., & Corzo, A. (2010). Box-Behnken Design: alternative multivariate design in broiler nutrition research. *World's Poultry Science Journal*, 66(4), 699-706.
- [92] Byrn, S. R.; Zograf, G.; Xiaoming, C. S. (2017). *Solid-State Properties of Pharmaceutical Materials*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- [93] Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W. (2010). Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical research*, 27, 796-810.
- [94] James, A. E., & Driskell, J. D. (2013). Monitoring gold nanoparticle conjugation and analysis of biomolecular binding with nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light scattering (DLS). *Analyst*, 138(4), 1212-1218.

- [95] Hou, J., Ci, H., Wang, P., Wang, C., Lv, B., Miao, L., & You, G. (2018). Nanoparticle tracking analysis versus dynamic light scattering: Case study on the effect of Ca²⁺ and alginate on the aggregation of cerium oxide nanoparticles. *Journal of hazardous materials*, 360, 319-328.