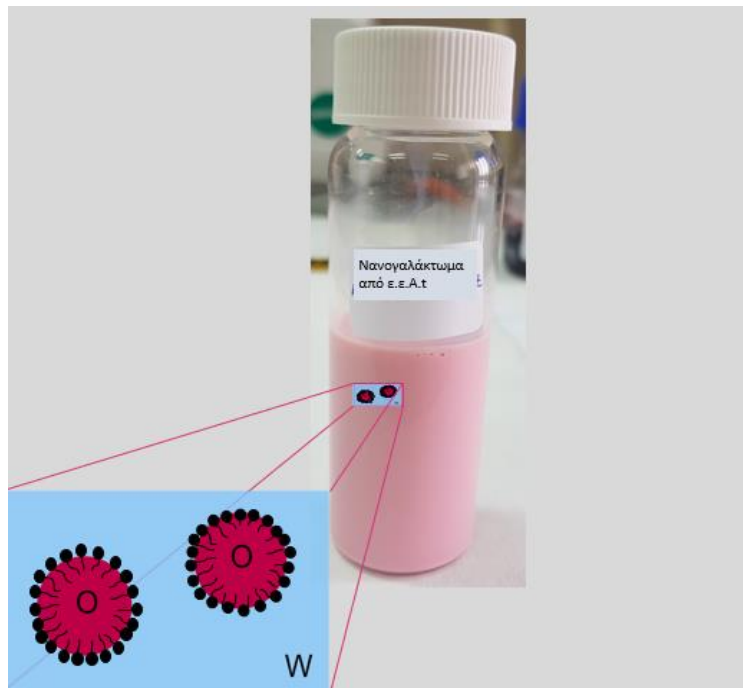




ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«Νανογαλακτώματα με δραστικό
συστατικό ελαιώδες εκχύλισμα ριζών
Alkanna tinctoria»**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑΣ ΠΟΥΛΙΑΝΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΑΝΔΡΕΑΝΑ Ν. ΑΣΗΜΟΠΟΥΛΟΥ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η παρασκευή νανογαλακτωμάτων με δραστικό συστατικό ελαιώδες εκχύλισμα των ριζών του φυτού *Alkanna tinctoria*. Στόχος ήταν η παρασκευή σταθερών γαλακτωμάτων τύπου έλαιο σε νερό (O/W) με το μέγεθος των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης να βρίσκεται στη νανοκλίμακα. Με αυτόν τον τρόπο συνδυάζονται αφενός τα πλεονεκτήματα του ελαιώδους εκχυλίσματος των ριζών του φυτού *Alkanna tinctoria* που χρησιμοποιείται ως δραστική ουσία σε φαρμακευτικά σκευάσματα και αφετέρου τα πλεονεκτήματα του νανομεγέθους των σταγονιδίων του ελαίου στη διεσπαρμένη φάση.

Οι παράμετροι που μελετήθηκαν είναι η τιμή της υδρόφιλης λιπόφιλης ισορροπίας (Hydrophilic Lipophilic Balance) του συστήματος με τιμές που προσεγγίζουν την τιμή του ελαιόλαδου, δηλαδή 7 και 8.5, μεταβάλλοντας είτε την ποσότητα των επιφανειοδραστικών, είτε χρησιμοποιώντας διάφορα είδη επιφανειοδραστικών ουσιών. Επιπλέον, μελετήθηκαν οι μέθοδοι παρασκευής των νανογαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα η ομογενοποίηση με υπερήχηση για την επίτευξη παρασκευής γαλακτώματος στη νανοκλίμακα, αλλά και η μηχανική ομογενοποίηση με ομογενοποιητή και στη συνέχεια κατεργασία του γαλακτώματος με υπερήχους για τη μείωση του μεγέθους των διεσπαρμένων σταγόνων. Η επίδραση των παραγόντων που μελετήθηκαν στα χαρακτηριστικά του γαλακτωμάτων εξετάστηκε με τη μέτρηση του μέσου μεγέθους των σωματιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε οπτική παρατήρηση των γαλακτωμάτων αμέσως μετά το τέλος της ομογενοποίησης με υπερήχους και κατά την αποθήκευση στο ψυγείο με τη πάροδο του χρόνου.

Τόσο κατά την οπτική παρατήρηση, όσο και με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων, μεγαλύτερη σταθερότητα παρουσίασε το νανογαλάκτωμα της σύνθεσης 1Α με σύσταση HPLC-Grade H₂O 18.4 g, Tween 80 0.72 g, ελαιώδες εκχύλισμα 5 g και Span 80 1.08 g. Συγκεκριμένα παραμένει σταθερό για τουλάχιστον 20 ημέρες με μέσο μέγεθος σταγονιδίων 187 nm, δείκτη πολυδιασποράς 0.185 και ζ-δυναμικό -43.6 mV.

Λέξεις- Κλειδιά

Νανογαλάκτωμα, O/W, ομογενοποίηση υπερήχων, *Alkanna tinctoria*

Abstract

The aim of this study was the preparation of oil in water (O/W) nanoemulsions with active ingredient oily extract from the roots of *Alkanna tinctoria*, renowned for its biological actions. These preparations combine the advantages of the *Alkanna tinctoria* roots oily extract as bioactive substance and the advantages of the nanoscale droplets.

Hydrophilic lipophilic balance (HLB) value and the preparation method were studied, in order to identify their effect on nanoemulsions characteristics. The HLB value of the system should be close to the HLB value of the oil phase. For this reason, HLB values 7 and 8.5 were studied by changing either the quantities of emulsifiers or the kind of them. Also, it was studied the preparation method. Specifically, nanoemulsions were prepared either with sonication technique or with a homogenizer followed by a probe sonicator. The effect of the parameters on nanoemulsion characteristics evaluated by measuring mean particle size, PDI and z-potential values. Moreover, the nanoemulsions were optical observed after the preparation and during the storage period at 4 °C.

The optimal nanoemulsion has the following features: average size 187 nm, polydispersity index 0.186 and zeta potential -43.3 mV and stays stable for at least 20 days.

Keywords

Nanoemulsion, O/W, ultrasonic homogenization, *Alkanna tinctoria*

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Τμήματος κας. Ανδρεάνας Ν. Ασημοπούλου.

Σε αυτό το σημείο θέλω να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ανδρεάνα Ασημοπούλου για την ανάθεση του θέματος, την ηθική και επιστημονική υποστήριξη τόσο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, όσο και κατά τη διάρκεια των σπουδών μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής κ. Παναγιώτη Μπαρμπαλέξη για την ελεύθερη πρόσβαση στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα του Τμήματος κα. Αντιγόνη Κωλέττη, η οποία με βοήθησε τόσο στο πειραματικό μέρος της εργασίας, όσο και στη συγγραφή της. Κυρίως όμως την ευχαριστώ για την ψυχολογική στήριξη και την άμεση επικοινωνία που υπήρχε καθ' όλη την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τον κ. Άγγελο Αργυριάδη, Χημικό Μηχανικό, για την σημαντική του βοήθεια στη Παρασκευή και τον χαρακτηρισμό των νανογαλακτωμάτων, καθώς η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχεια ερευνητικής του εργασίας.

Ακόμα, ευχαριστώ όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για τη παροχή βοήθειας σε πρακτικά ζητήματα και για το ευχάριστο κλίμα κατά την τέλεση των πειραμάτων.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τα άτομα του προσωπικού μου περιβάλλοντος για την στήριξή τους. Κυρίως τους ευχαριστώ για την ανοχή και την κατανόηση που έδειξαν κατά τη διάρκεια των δυσκολιών που αντιμετώπιζα και με βοηθούσαν με την αισιοδοξία τους.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	1
1. Αλκαννίνη, Σικονίνη.....	2
1.1 Χημεία αλκαννίνης και σικονίνης.....	2
1.2 Ιστορική αναδρομή	2
1.3 Βοτανική περιγραφή του φυτού <i>Alkanna tinctoria</i>	3
1.4 Βιολογική δράση αλκαννίνης, σικονίνης και των παραγώγων	3
1.5 Συνοπτική περιγραφή απομόνωσης αλκαννίνης και σικονίνης	6
2. Γαλακτώματα.....	7
2.1 Ορισμός	7
2.2 Τύποι γαλακτωμάτων.....	7
2.3 Δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ σταγονιδίων	8
2.4 Σταθερότητα Γαλακτωμάτων	9
2.4.1 Θερμοδυναμική Σταθερότητα.....	9
2.4.2 Κινητική Σταθερότητα	10
2.5 Αποσταθεροποίηση Γαλακτωμάτων	12
2.5.1 Θρόμβωση (flocculation).....	12
2.5.2 Συνένωση (coalescence).....	13
2.5.3 Κρέμωση (creaming) και καθίζηση (sedimentation).....	13
2.5.4 Ωρίμανση Ostwald (Ostwald ripening).....	14
3. Νανογαλακτώματα.....	15
3.1 Σύνθεση νανογαλακτώματος	15
3.1.1 Λιπαρή φάση.....	15
3.1.2 Υδατική φάση	15
3.1.3 Γαλακτωματοποιητές	16
3.1.3.1 Υδρόφιλη- Λιπόφιλη Ισορροπία (HLB)	16
3.1.3.2 Νόμος Bancroft.....	17
3.1.3.3 Tween και Span	17
3.1.3.4 Λεκιθίνη.....	17
3.2 Παρασκευή νανογαλακτωμάτων	18
3.2.1 Χαμηλής ενέργειας μέθοδοι	19
3.2.1.1 Μέθοδος αναστροφής φάσης θερμοκρασίας (Phase Inversion Temperature, PIT)	19

3.2.1.2 Μέθοδος αναστροφής φάσης συγκέντρωσης (Phase Inversion Concentration, PIC)	20
3.2.2 Υψηλής ενέργειας μέθοδοι	20
3.2.2.1 Ομογενοποιητές υπερήχων (Ultrasonic homogenizer)	20
3.2.2.2 Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (High Pressure Homogenization)	21
3.2.2.3 Μικρορευστοποίηση (Microfluidization)	22
3.3 Τεχνικές χαρακτηρισμού νανογαλακτωμάτων	22
3.3.1 ζ-δυναμικό (z-potential)	22
3.3.2 Μέγεθος σταγονιδίων (z-averages) και δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	23
3.3.3 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	23
3.3.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission electron microscopy, TEM)	23
3.3.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning electron microscopy, SEM)	24
3.4 Ιδιότητες νανογαλακτωμάτων	24
3.4.1 Μέγεθος σταγόνας	24
3.4.2 Διεπιφανειακά χαρακτηριστικά	24
3.4.3 Ρεολογία	25
3.4.4 Οπτική εμφάνιση	25
3.4.5 Επίδραση θερμοκρασίας	25
3.5 Εφαρμογές νανογαλακτωμάτων	25
3.6 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα νανογαλακτωμάτων	26
4. Πειραματικό Μέρος	28
4.1 Υλικά-Σκεύη-Συσκευές	28
4.2 Συνοπτική περιγραφή πειραματικής διαδικασίας	28
4.3 Παρασκευές νανογαλακτωμάτων	30
5. Αποτελέσματα	33
5.1 Χαρακτηρισμός νανογαλακτωμάτων	33
5.2 Οπτικές παρατηρήσεις νανογαλακτωμάτων	36
6. Συμπεράσματα	44
7. Βιβλιογραφία	45

Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 3.1 Επιφανειοδραστικές ουσίες.....	18
Πίνακας 4.1 Υλικά για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων.	28
Πίνακας 4.2 Σκεύη και συσκευές για την παραγωγή νανογαλακτωμάτων.	28
Πίνακας 4.3 Βασική παρασκευή νανογαλακτώματος 1A.	30
Πίνακας 4.4 Συστατικά και ποσότητες αυτών για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων βασισμένες στην παρασκευή 1A.....	31
Πίνακας 4.5 Συστατικά και ποσότητες αυτών για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων με τη χρήση ομογενοποιητή κατά την γαλακτωματοποίηση.....	32
Πίνακας 5.1 Μετρήσεις μεγέθους, πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των παρασκευαζόμενων νανογαλακτωμάτων.	33

Πίνακας Σχημάτων

Σχήμα 1.1 Χημικές ενώσεις αλκανίνης και σικονίνης (Κοντογιαννόπουλος, 2011).....	2
Σχήμα 1.2 Φυτό <i>Alkanna tinctoria</i> (Κοντογιαννόπουλος, 2011).....	3
Σχήμα 1.3 Προϊόντα Histoplastin Red σήμερα (https://www.histoplastin.com/).	5
Σχήμα 2.1 Μονά νανογαλακτώματα τύπου i. έλαιο σε νερό (O/W) και iii. νερό σε έλαιο (W/O) και διπλά νανογαλακτώματα τύπου ii. νερό σε έλαιο σε νερό (W/O/W) και iv. έλαιο σε νερό σε έλαιο (O/W/O) (Wilson et al., 2022).	8
Σχήμα 2.2 Κατάσταση κινητικής σταθερότητας και κατάσταση θερμοδυναμικής αστάθειας γαλακτωμάτων.	11
Σχήμα 2.3 Φαινόμενα αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων (McClements & Jafari, 2018)	12
Σχήμα 3.1 Περιγραφή υπερήχησης για την παρασκευή νανογαλακτώματος (Taha et al., 2020).21	
Σχήμα 4.1 Συνοπτική περιγραφή πειραματικής διαδικασίας.	29
Σχήμα 5.1 Συσκευή Zetasizer Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ.	33
Σχήμα 5.2 Νανογαλακτώματα 1A1, 1A2, 1A3 και 1A4 την 0 ημέρα.	36
Σχήμα 5.3 Νανογαλακτώματα 1A1, 1A2, 1A3 και 1A4 την 12η και 20η ημέρα.....	36
Σχήμα 5.4 Νανογαλακτώματα 2A1, 2A2 και 2A3 την 0η ημέρα.	37
Σχήμα 5.5 Νανογαλακτώματα 2A1, 2A2 και 2A3 την 8η και 16η ημέρα παρατήρησης.....	37
Σχήμα 5.6 Νανογαλακτώματα 3A1, 3A2 και 3A3 την 0η ημέρα.	38
Σχήμα 5.7 Νανογαλακτώματα 3A1, 3A2 και 3A3 την 1η, 15η και 20η ημέρα.	38
Σχήμα 5.8 Νανογαλάκτωμα 3B1 την 0η, 1η, 8η και 20η ημέρα.	39
Σχήμα 5.9 Νανογαλακτώματα 3Γα και 3Γβ την 0η και 20η ημέρα.	40
Σχήμα 5.10 Νανογαλάκτωμα 3Δ την 0 ^η και 20 ^η ημέρα.	40
Σχήμα 5.11 Νανογαλάκτωμα 4A την 0η, 1η, 5η και 20η ημέρα.	41
Σχήμα 5.12 Νανογαλάκτωμα 4B την 0 ^η και 20 ^η ημέρα.	41
Σχήμα 5.13 Νανογαλάκτωμα 5A την 0 ^η και 20 ^η ημέρα.....	42
Σχήμα 5.14 Νανογαλακτώματα 1PBS1, 1PBS2 και 1PBS3 την 0η και 1η ημέρα.....	43
Σχήμα 5.15 Νανογαλακτώματα 1APBS1, 1APBS2 και 1APBS3 την 0η και 1η ημέρα.....	43

Εισαγωγή

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο την παρασκευή σταθερών νανογαλακτωμάτων με δραστικό συστατικό το ελαιώδες εκχύλισμα των ριζών του φυτού *Alkanna tinctoria* και αποτελεί συνέχεια της ερευνητικής εργασίας του κ. Άγγελου Αργυριάδη, Χημικού Μηχανικού. Για τον σκοπό αυτό στα πειράματα που εκτελούνται μεταβάλλονται οι συνθέσεις ως προς τη ποσότητα και το είδος των γαλακτωματοποιητών που χρησιμοποιούνται. Ταυτόχρονα αλλαγές επιτυγχάνονται και στη μέθοδο γαλακτωματοποίησης του γαλακτώματος με εφαρμογή μηχανικής ομογενοποίησης με ομογενοποιητή. Στη συνέχεια του πειράματος τα νανογαλακτώματα που παρασκευάζονται χαρακτηρίζονται με οπτική παρατήρηση, αλλά και ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, δηλαδή το μέσο μέγεθος σταγονιδίων, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ- δυναμικό.

Το ελαιώδες εκχύλισμα των ριζών του φυτού *Alkanna tinctoria* χρησιμοποιείται ως δραστική ουσία στο νανογαλάκτωμα. Είναι γνωστό για τις βιολογικές του δράσεις και αποτελεί πρώτη ύλη παρασκευής του φαρμακευτικού σκευάσματος HELIXDERM® το οποίο είναι εγκεκριμένο από τον ΕΟΦ για την επούλωση πληγών και αποτελεί ευρεσιτεχνία του Ομοτ. Καθηγητή του Τμήματος Χημικών Μηχανικών.

Η εφαρμογή των νανογαλακτωμάτων αποτελεί ενδιαφέρον θέμα της εποχής λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν σε σχέση με τα συμβατικά γαλακτώματα. Η παγκόσμια αγορά των νανογαλακτωμάτων προβλέπεται να φτάσει τα 16.18 εκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2026 σύμφωνα με άρθρα στο Report and Data (*Nanoemulsions Market, 2020*). Αναφέρουν ότι τα νανογαλακτώματα παρουσιάζουν μεγάλη ζήτηση στη βιομηχανία των καλλυντικών και η ανάπτυξη τους θα αρχίσει να αυξάνεται σε περισσότερες αγορές. Ωστόσο, το αντικείμενο των νανογαλακτωμάτων είναι ακόμα και σήμερα δύσκολο για πλήρη κατανόηση.

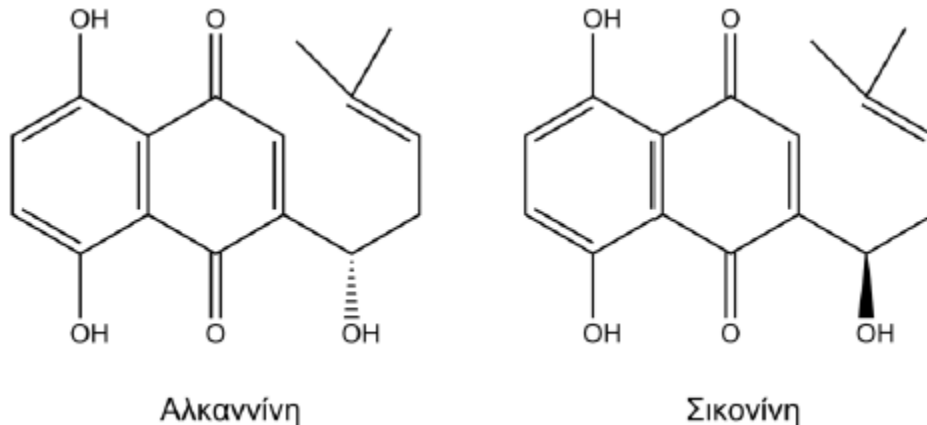
Όσον αφορά τη δομή της εργασίας στην πρώτη ενότητα περιγράφεται το φυτό *Alkanna tinctoria* και οι βιολογικές του ιδιότητες. Στη δεύτερη ενότητα περιγράφονται τα γαλακτώματα ως προς τη σταθερότητά τους, καθώς και τα φαινόμενα που οδηγούν στην αποσταθεροποίησή τους. Στην τρίτη ενότητα γίνεται αναφορά στα νανογαλακτώματα, στα συστατικά αυτών, στις μεθόδους παρασκευής και στις ιδιότητές τους.

Στη τέταρτη ενότητα περιγράφεται το πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας. Αναφέρονται αναλυτικά τα υλικά και οι μέθοδοι εκτέλεσης των πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα γίνεται λόγος για τον τρόπο παρασκευής νανογαλακτωμάτων από ελαιώδες εκχύλισμα του φυτού *Alkanna tinctoria* και οι συνθέσεις που πραγματοποιήθηκαν για την παρασκευή τους. Στην πέμπτη ενότητα παρατίθενται οι μετρήσεις που προέκυψαν και σχολιάζονται. Στην έκτη ενότητα περιέχονται εικόνες των τελικών νανογαλακτωμάτων οι οποίες σχολιάζονται. Τέλος, σχολιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την διεξαγωγή των πειραμάτων.

1. Αλκαννίνη, Σικονίνη

1.1 Χημεία αλκαννίνης και σικονίνης

Η αλκαννίνη και η σικονίνη είναι δύο εναντιομερείς υδροξυ-ναφθοκινόνες, οι οποίες εντοπίζονται σε φυσικά προϊόντα. Είναι λιπόφιλες ερυθρές χρωστικές ουσίες που βιοσυντίθενται, κυρίως ως παράγωγα εστέρων, στις ρίζες περισσότερων από 150 φυτών, τα οποία ανήκουν στα γένη *Alkanna*, *Lithospermum*, *Echium*, *Onosma*, *Anchusa* και *Cynoglossum* της οικογένειας Boraginaceae (Akgun et al., 2009; Assimoroulou et al., 2006).



Σχήμα 1.1 Χημικές ενώσεις αλκαννίνης και σικονίνης (Κοντογιαννόπουλος, 2011).

Η αλκαννίνη, *S* εναντιομερές, και τα παράγωγά της εντοπίζονται κυρίως στην Ευρώπη στις ρίζες αρκετών φυτών της οικογένειας Boraginaceae και ειδικά στις ρίζες του φυτού *Alkanna tinctoria* ή *Alkanet* (Parageorgiou et al., 2006). Από την άλλη, στην Ανατολή εντοπίζεται στις ρίζες του φυτού *Lithospermum erythrorhizon* η σικονίνη, το *R* εναντιομερές, και τα παράγωγά της (Parageorgiou et al., 1999). Τα φυσικά αυτά προϊόντα χαρακτηρίζονται από έντονο κόκκινο χρώμα που παρουσία αλκαλικών υδατικών διαλυμάτων μετατρέπεται σε μπλε, λόγω του ιονισμού των όξινων φαινολικών υδροξυλίων (Parageorgiou et al., 1999).

1.2 Ιστορική αναδρομή

Υπάρχουν πολλές αναφορές στις ιδιότητες του φυτού *Alkanna tinctoria* που ξεκινούν από την αρχαιότητα. Η πρώτη από αυτές εντοπίζεται στα έργα του Έλληνα γιατρού Ιπποκράτη (4^{ος} -5^{ος} π.Χ.) στα οποία αναφέρεται η χρήση των ριζών του φυτού για τη θεραπεία των ελκών. Το 300 π.Χ ο Έλληνας μελετητής και βοτανολόγος Θεόφραστος αναφέρθηκε στις ιδιότητες των ριζών ως βαφή. Επίσης, στις εκστρατείες του Μέγα Αλέξανδρου υπήρχαν γιατροί ειδικοί στα φυτικά φάρμακα, οι οποίοι χρησιμοποιούσαν τις ρίζες του φυτού για την θεραπεία των αρρώστων και των τραυματισμένων. Το φυτό περιγράφεται με περισσότερες λεπτομέρειες στο έργο του Διοσκουρίδη (77 π.Χ.), *De Materia Medica* (Parageorgiou et al., 1999). Συγκεκριμένα στο βιβλίο χρησιμοποιεί την άγχουσα για την θεραπεία ελκών, εγκαυμάτων καθώς και για την επούλωση τραυμάτων των νεύρων, εννοώντας πιθανότατα τους τένοντες. Σχετικές αναφορές στις θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού γίνονται τον 17^ο αιώνα μ.Χ. από τον Άγγλο φυσικό Nicolas

Culperer, ο οποίος αναφέρθηκε στη θεραπεία χρόνιων ελκών και φλεγμονών και στην επούλωση εγκαυμάτων από φωτιά με τη χρήση των ριζών του φυτού (Κοντογιαννόπουλος, 2011).

Η σικονίνη αποτελεί κύριο συστατικό στις ρίζες του φυτού *Lithospermum erythrorhizon*. Η ρίζα του φυτού αυτού χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα ως βαφή λόγω του κόκκινου-μωβ χρώματός της. Ως φάρμακο χρησιμοποιήθηκε από τον χειρουργό Huato 200 μ.Χ. Στη κινέζικη φαρμακολογία η σικονίνη και τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται ως και σήμερα στην παρασκευή φαρμάκων για την θεραπεία εγκαυμάτων, ελκών, αιμορροΐδων κ.ά.. Επιπλέον η σικονίνη χρησιμοποιείται στην Ιαπωνία σε καλλυντικά και βαφές. Στην Ευρώπη και την Αμερική η σικονίνη χρησιμοποιείται ως χρωστική ουσία τροφίμων και καλλυντικών (Parageorgiou et al., 1999).

1.3 Βοτανική περιγραφή του φυτού *Alkanna tinctoria*

Το φυτό *Alkanna tinctoria* είναι πολυετής πόα, ύψους 10-25 cm, με ερυθρωπό βλαστό, απλωτό, σχεδόν άκλωνο ή διακλαδιζόμενο στην κορυφή, με άφθονα σκληρά λογχοειδή φύλλα, χοντρή ρίζα και μπλε μικρά άνθη που εμφανίζονται αρχές καλοκαιριού. Είναι κοινό σε όλη την Ελλάδα σε άγονες, αμμώδεις και χερσαίες περιοχές όπως και σε βράχους. Ευδοκίμει στη Μεσογειακή Ευρώπη και Μ. Ασία. Οι ρίζες του φυτού έχουν μήκος 10-25 cm, πάχος ως και 1,5 cm και είναι κυρίως απλές ή με μικρή διακλάδωση. Οι ρίζες του κυκλοφορούν στην αγορά σε κομμάτια μήκους 7-10 cm και πάχους 5-15 mm, σε ελικοειδή μορφή, αποτελούμενη από ένα σκούρο κόκκινο φλοιό που διαχωρίζεται εύκολα. Μόνο ο εσωτερικός φλοιός και τα εξωτερικά μέρη του εσωτερικού φλοιού είναι κόκκινα και καλύπτονται με μια βαθιά χρωστική, η οποία παλαιότερα χρησιμοποιούταν ως βαφή και γι' αυτό το φυτό είναι γνωστό και ως Βαφόριζα (Κυριάκου, 2016).



Σχήμα 1.2 Φυτό *Alkanna tinctoria* (Κοντογιαννόπουλος, 2011).

1.4 Βιολογική δράση αλκαννίνης, σικονίνης και των παράγωγων

Με αφετηρία τις ιστορικές αναφορές στις φαρμακευτικές ιδιότητες των δύο φυτών, *Alkanna tinctoria* και *Lithospermum erythrorhizon*, και σε συνδυασμό με τις έρευνες για την δραστηριότητά τους από πολλούς ερευνητές, αποδείχθηκε ότι η δραστική ουσία είναι η αλκαννίνη, η σικονίνη και τα παράγωγά τους. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν πλούσια βιολογική δράση, όπως

επουλωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, αντιθρομβωτική δράση τους (Parageorgiou et al., 1999).

Τα ενεργά συστατικά των ριζών του φυτού *Alkanna tinctoria* προσδιορίστηκαν επιστημονικά το 1976 από τον καθηγητή κ. Β. Παπαγεωργίου και τους συνεργάτες του και είναι η αλκαννίνη, η σικονίνη και τα παράγωγα αυτών. Για την πραγματοποίηση της μελέτης συλλέχθηκαν ρίζες του φυτού *Alkanna tinctoria* από διάφορες τοποθεσίες, εκχυλίστηκαν με εξάνιο και εν τέλει απομονώθηκαν οι χρωστικές των ριζών από τους κηρούς, τα φυσικά πολυμερή και τα φθορίζοντα συστατικά. Τα εκχυλίσματα αυτά εφαρμόστηκαν σε έλκη που προκλήθηκαν σε δέρμα πειραματόζων (π.χ. ποντίκια, γάτες, σκυλιά). Μεταξύ αυτών των κλασμάτων εκείνο που περιείχε τις χρωστικές επέδειξε εξαιρετικές επουλωτικές ικανότητες, ενώ τα υπόλοιπα κλάσματα ήταν ανενεργά. Επομένως, προέκυψε ως συμπέρασμα ότι οι επουλωτικές δυνατότητες του φυτού οφείλονται στις χρωστικές των ριζών του. Χημικές αναλύσεις των χρωστικών ταυτοποίησαν τους παρακάτω εστέρες της αλκαννίνης: β,β-διμεθυλακρυλο- , αγγελυλο- , ισοβαλερυλο- και β-ακετοξυισοβαλερυλο-. Ενδιαφέρον είναι ότι στο δείγμα δεν ταυτοποιήθηκε ελεύθερη αλκαννίνη (Parageorgiou et al., 1999).

Χρησιμοποιώντας τους εστέρες της αλκαννίνης που εκχυλίστηκαν από τις ρίζες του *Alkanna tinctoria*, παρασκευάστηκε αλοιφή (Histoplastin Red® και αργότερα HELIXDERM®), η οποία βασίστηκε σε πατέντα του καθηγητή κ. Β. Παπαγεωργίου. Σε πρώτη φάση το σκεύασμα εφαρμόστηκε, με επιτυχία, σε πειραματόζωα και έπειτα εφαρμόστηκε κλινικά σε ασθενείς με άτονα έλκη στα κάτω άκρα τα οποία δεν μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με προηγούμενες θεραπείες. Κατά την θεραπεία η αλοιφή εφαρμοζόταν καθημερινά γύρω από την άκρη του έλκους. Σε διάστημα τριών ως τεσσάρων εβδομάδων παρατηρήθηκε ανάπτυξη του επιθηλιακού ιστού και σε έξι εβδομάδες ήταν αισθητή η μείωση του μεγέθους του έλκους ακόμα και πλήρη θεραπεία. Το ποσοστό επιτυχίας ήταν 80% χωρίς παρουσία φλεγμονής του δέρματος κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η αποτελεσματικότητα της αλοιφής δοκιμάστηκε στη θεραπεία εγκαυμάτων και αποδείχθηκε ότι είναι περισσότερο δραστική σε σχέση με παρόμοια φαρμακευτικά σκευάσματα. Επίσης, εφαρμόστηκε επιτυχώς στη θεραπεία λεπρωδών πληγών (Parageorgiou et al., 1999). Στο Σχήμα 1.3 φαίνονται καλλυντικά προϊόντα Histoplastin Red® τα οποία κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά.



Σχήμα 1.3 Προϊόντα Histoplastin Red σήμερα (<https://www.histoplastin.com/>).

Μία πρόσφατη έρευνα του 2017 από τους Gümüs και Özlü επαληθεύουν τις επουλωτικές ικανότητες των ριζών του φυτού *Alkanna tinctoria*. Είναι μίγμα ελαιόλαδου, κεριό μέλισσας και ρίζες του φυτού *Alkanna tinctoria*, το οποίο εφαρμόζεται εξωτερικά σε πληγές εγκαύματος 2^{ου} βαθμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σκεύασμα αυτό αυξάνει τη επιθηλιοποίηση, μειώνει το χρόνο ανάρρωσης, εμφανίζει μηδενικά ποσοστά μόλυνσης και μειώνει τον πόνο κατά την εφαρμογή στην πληγή (Gümüş & Özlü, 2017).

Έχουν, επίσης, πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την αποτελεσματικότητα της σικονίνης και των παραγώγων της σε πειραματόζωα στην Ιαπωνία. Μία από αυτές αφορά την επουλωτική δράση του παραδοσιακού ιαπωνικού σκευάσματος, Shiunko, το οποίο φέρει ως δραστικό συστατικό την σικονίνη και τα παράγωγά της από το εκχύλισμα του φυτού *Lithospermum erythrorhizon*. Ύστερα από πειράματα σε ποντίκια που έφεραν δερματικά τραύματα και τα οποία είχαν μολυνθεί με διάφορα βακτήρια παρατηρήθηκε πως η επουλωτική ικανότητα τόσο στα αποστειρωμένα όσο και στα μολυσμένα τραύματα ήταν θεαματική (Huang et al., 2004). Ακόμα η επουλωτική δράση του εκχυλίσματος των ριζών *Lithospermum erythrorhizon* μελετήθηκε σε διαβητικά ποντίκια και βρέθηκε να περιορίζει τη φάση της φλεγμονής και γι' αυτό τον λόγο το εκχύλισμα προτάθηκε για ασθενείς που πάσχουν από χρόνια έλκη αλλά και έλκη από κατάκλιση (Parageorgiou et al., 2006).

Το φυτό *Arnebia euchroma* της οικογένειας Boraginaceae αποτελεί πρώτη ύλη για την παρασκευή κινέζικων αντιθρομβωτικών φαρμάκων. Από το εκχύλισμα του φυτού αυτού απομονώθηκαν τέσσερις ενώσεις, οι οποίες παρεμποδίζουν την συσσωμάτωση αιμοπεταλίων όπως αποδείχθηκε. Οι ενώσεις αυτές είναι οι εξής: σικονίνη, ακετυλοσικονίνη, β,β-διμεθυλακρυλο-σικονίνη και τετρακρυλο-σικονίνη (Chang et al., 1993).

Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση της αλκαννίνης, σικονίνης και των παραγώγων τους, μελετήθηκε από πολλές ομάδες επιστημόνων. Αποδεικνύεται βάση αυτών ότι είναι δραστικά έναντι Gram- θετικών βακτηρίων, όπως των *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* και *Bacillus subtilis*. Επιπροσθέτως, εμφανίζουν δραστικότητα έναντι διαφόρων ειδών βακτηρίων

γαλακτικού οξέος, ενώ είναι ενεργά έναντι Gram- αρνητικών βακτηρίων, όπως *E. coli* και *P. Aeruginosa* (Parageorgiou et al., 2006).

Επίσης, εκχυλίσματα σικονίνης και δεοξυσικονίνης προερχόμενα από ρίζες του φυτού *Lithospermum erythrorhizon* παρουσίασαν αντιδερματοφυτικές ιδιότητες έναντι πέντε μυκήτων στους οποίους εφαρμόστηκαν. Πιο δραστική αυτών αποδείχθηκε η δεοξυσικονίνη και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ως ενεργό συστατικό για την παρασκευή αλοιφής (Parageorgiou et al., 2006).

Στη κινεζική φαρμακολογία τα εκχυλίσματα των ριζών του φυτού *Lithospermum erythrorhizon* χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του καρκίνου. Στα πλαίσια μιας εκστρατείας κατά του καρκίνου το 1974 ελέγχθηκαν 1500 κινόνες από τις οποίες πάνω από το 10% παρουσίασαν δράση εναντίον των εξής καρκινικών κυττάρων: L1210 λευχαιμίας, καρκινοσάρκωμα Walker 256 (W256), αδενοκαρκίνωμα 755, σάρκωμα 180 και καρκίνωμα Lewis του πνεύμονα (Parageorgiou et al., 2006).

1.5 Συνοπτική περιγραφή απομόνωσης αλκαννίνης και σικονίνης

Αρχικά, αποξηραμένες ρίζες του φυτού *Alkanna tinctoria* εκχυλίζονται με διαλύτη κ-εξάνιο. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την προσθήκη των ριζών σε κωνική φιάλη και προσθήκη κ-εξανίου τόσο ώστε οι ρίζες να καλύπτονται. Στη συνέχεια, γίνεται εκχύλιση του μίγματος είτε με συσκευή Soxhlet είτε με υπερήχηση. Μετά την εκχύλιση το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και διηθείται. Για την ανάκτηση και απομάκρυνση του κ-εξανίου χρησιμοποιείται περιστροφικός εξατμιστήρας. Με αυτήν την διαδικασία, τελικά, παραλαμβάνεται το προκαταρκτικό εκχύλισμα στο οποίο περιέχονται κηροί, λιπίδια, χρωστικές, φθορίζουσες και πολυμερή. Ακολουθεί αποκλήρωση του προκαταρκτικού εκχυλίσματος με προσθήκη μεθανόλης καθώς δεν διαλύει τους κηρούς. Το μεθανολικό εκχύλισμα διηθείται και οι κηροί παραλαμβάνονται με απόξεση των ξηραμένων ηθμών ενώ στο διήθημα περιέχονται φθορίζουσες, λιπίδια και πολυμερή. Η απομόνωση των λιπιδίων επιτυγχάνεται με προσθήκη οξικού χαλκού διαλυμένου σε μεθανόλη, στο μεθανολικό διήθημα. Οι χρωστικές και τα πολυμερή αντιδρούν με τον οξικό χαλκό και σχηματίζουν στερεά σύμπλοκα τα οποία συλλέγονται ως ίζημα από τον ηθμό ενώ τα λιπίδια υπάρχουν στο διήθημα. Ως τελικό στάδιο είναι η απομόνωση των χρωστικών. Για τον σκοπό αυτό γίνεται πλύση των συμπλόκων διαδοχικά με απεσταγμένο νερό, κ-εξάνιο και ακετόνη ώστε να επιτευχθεί απομάκρυνση περίσσειας οξικού χαλκού. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού οξέος για διάσπαση συμπλόκων και έπειτα πραγματοποιείται εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα για την παραλαβή των χρωστικών στην αιθερική φάση. Η απομόνωση του μίγματος των χρωστικών ουσιών που συλλέχθηκε γίνεται με διήθηση και εν συνεχεία απομάκρυνση του αιθέρα με περιστροφική εξάτμιση (Βραγοτέρης, 2013).

2. Γαλακτώματα

2.1 Ορισμός

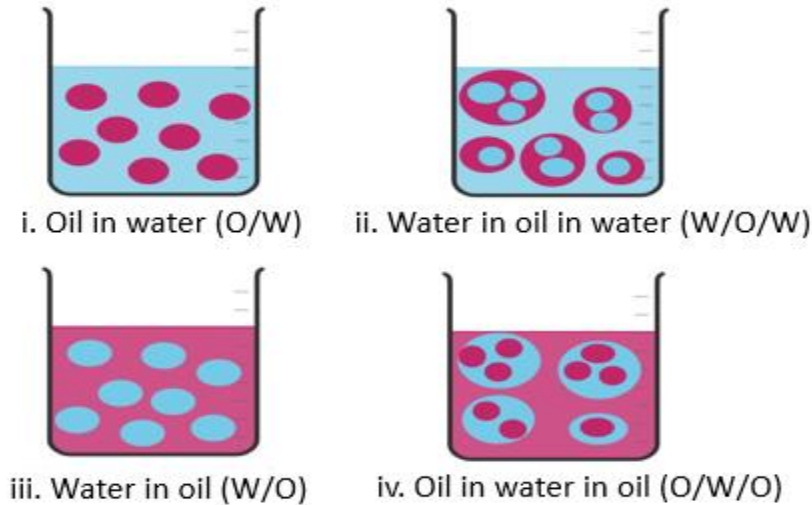
Τα γαλακτώματα είναι κολλοειδή συστήματα διασποράς αποτελούμενα από δύο (ή περισσότερα) μη αναμίξιμα ή μερικώς αναμίξιμα υγρά από τα οποία το ένα βρίσκεται διεσπαρμένο σε μορφή μικρών σταγονιδίων στη μάζα του άλλου υγρού. Το υγρό που υπάρχει σε περίσσεια ονομάζεται κλειστή, συνεχής ή εξωτερική φάση, ενώ το διεσπαρμένο ονομάζεται εσωτερική, ασυνεχής ή διεσπαρμένη φάση. Για παράδειγμα, εάν έλαιο αναμιχθεί με νερό και ανακινηθούν τότε τα δύο υγρά διασπείρονται το ένα στο άλλο δημιουργώντας ένα γαλάκτωμα. Το γαλάκτωμα αυτό, ωστόσο, δεν είναι σταθερό, διότι τα σταγονίδια της ασυνεχούς φάσης τείνουν να συσσωματωθούν γεγονός που οδηγεί στην καταστροφή του και κατά συνέπεια στο διαχωρισμό των δύο φάσεων (Demetzos, 2016; Wilson et al., 2022).

Η παρασκευή ενός γαλακτώματος ονομάζονται γαλακτωματοποίηση και για το σχηματισμό τους χρησιμοποιούνται ουσίες που ονομάζονται γαλακτωματοποιητές. Η επιλογή του γαλακτωματοποιητή είναι σημαντική καθώς καθορίζει τη σταθερότητα του γαλακτώματος στη πάροδο του χρόνου (Demetzos, 2016; Tadros, 2013).

2.2 Τύποι γαλακτωμάτων

Τα γαλακτώματα μπορεί να είναι είτε μονά είτε πολλαπλά. Τα μονά γαλακτώματα χαρακτηρίζονται ως έλαιο σε νερό (O/W) όταν σταγονίδια ελαίου είναι διεσπαρμένα στο νερό και ως νερό σε έλαιο (W/O) όταν σταγονίδια νερού είναι διεσπαρμένα στο έλαιο, όπως φαίνονται στο Σχήμα 2.1 (Wilson et al., 2022).

Τα πολλαπλά γαλακτώματα μπορεί να είναι συστήματα νερού σε ελαίου-νερού (W/O/W) στα οποία τα σταγονίδια νερού είναι διεσπαρμένα στα σταγονίδια ελαίου σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό (O/W) ή συστήματα ελαίου σε νερού-ελαίου (O/W/O) στα οποία τα σταγονίδια ελαίου είναι διεσπαρμένα στα σταγονίδια νερού σε γαλακτώματα νερού σε έλαιο (W/O), όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.1 (Wilson et al., 2022).



Σχήμα 2.1 Μονά νανογαλακτώματα τύπου i. έλαιο σε νερό (O/W) και iii. νερό σε έλαιο (W/O) και διπλά νανογαλακτώματα τύπου ii. νερό σε έλαιο σε νερό (W/O/W) και iv. έλαιο σε νερό σε έλαιο (O/W/O) (Wilson et al., 2022).

2.3 Δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ σταγονιδίων

Οι ελκτικές δυνάμεις van der Waals ανάμεσα σε άτομα ή μόρια μπορεί να είναι: αλληλεπιδράσεις διπόλου – διπόλου, διπόλου – επαγόμενου διπόλου και διασποράς. Οι δυνάμεις διπόλου – διπόλου και διπόλου – επαγόμενου διπόλου είναι διανύσματα διαφορετικού προσανατολισμού και άρα τείνουν να εξουδετερώνονται. Τα άτομα ή τα μόρια αποτελούνται από πυρήνες και ηλεκτρόνια που περιστρέφονται γύρω από τον πυρήνα και σχηματίζονται προσωρινά δίπολα, τα οποία επάγουν άλλα δίπολα σε γειτονικά άτομα ή μόρια. Οι δυνάμεις διασποράς ή δυνάμεις London ανάμεσα σε άτομα ή μόρια σε μικροσκοπικά σωματίδια μπορούν να προστεθούν δημιουργώντας ισχυρές ελκτικές δυνάμεις van der Waals σε μικρές αποστάσεις ανάμεσα στα σταγονίδια (Tadros, 2013). Οι δυνάμεις London μειώνονται πολύ γρήγορα με την απόσταση αλλά μπορεί να είναι σημαντικές όταν τα μόρια βρίσκονται πολύ κοντά. Όταν, όμως, τα μόρια έρχονται σε πολύ στενή επαφή τα ηλεκτρονικά τους νέφη απωθούνται οπότε εμφανίζονται οι απωστικές δυνάμεις van der Waals. Οι δυνάμεις αυτές μειώνονται πολύ γρηγορότερα με την απόσταση. Όταν απουσιάζουν οι απωστικές δυνάμεις τότε λαμβάνει χώρα κροκίδωση και παραγωγή μεγάλων συσσωματωμάτων. Επομένως η παρουσία απωστικών δυνάμεων είναι απαραίτητη για την σταθερότητα των γαλακτωμάτων. Υπάρχουν δύο είδη απωστικών δυνάμεων: (α) ηλεκτροστατική άπωση και (β) στερεοχημική άπωση (Tadros, 2013).

Ηλεκτροστατική άπωση προκύπτει από προσρόφηση ιονικού τασιενεργού στη διεπιφάνεια. Το δυναμικό επιφάνειας ψ_0 μειώνεται αρχικά γραμμικά με το ζ δυναμικό ψ_d και έπειτα εκθετικά καθώς αυξάνεται η απόσταση χ . Η αύξηση της της διπλοστοιβάδας εξαρτάται από την συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη και το σθένος του, όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη και όσο πιο μικρό το σθένος του, τόσο πιο αυξημένη η διπλοστοιβάδα. Η άπωση εμφανίζεται όταν οι διπλοστοιβάδες αρχίζουν να αλληλεπικαλύπτονται. Η επέκταση της διπλοστοιβάδας και άρα η άπωση, μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του τασιενεργού (Tadros, 2013).

Ωστόσο, η ηλεκτροστατική άπωση δεν συνεισφέρει σημαντικά στην σταθεροποίηση γαλακτώματος τύπου νερού σε έλαιο λόγω της χαμηλής διηλεκτρικής της σταθεράς της συνεχούς φάσης. Δηλαδή, η σταθερότητα του γαλακτώματος οφείλεται στη δύναμή της.

Στερεοχημική άπωση συναντάται κυρίως σε συστήματα που σταθεροποιούνται με τη χρήση μη ιονικών γαλακτωματοποιητών και πολυμερών (Nour, 2018). Οι «παχιές» υδρόφιλες αλυσίδες (π.χ. πολυαιθυλενοξείδια σε νερό) παράγουν άπωση λόγω δύο κύριων φαινομένων: (α) μη ευνοούμενη ανάμιξη των αλυσίδων σε καλές συνθήκες διαλύτη και (β) εντροπικός περιορισμός όγκου ή ελαστική αλληλεπίδραση που προκύπτει από απώλειες στην εντροπία διαμόρφωσης των αλυσίδων ή από αλληλοεπικάλυψη (Tadros, 2013).

2.4 Σταθερότητα Γαλακτωμάτων

Στα γαλακτώματα ο όρος σταθερότητα αφορά την ικανότητα τους να αντιστέκονται στις αλλαγές των ιδιοτήτων τους με την πάροδο του χρόνου, δηλαδή όσο πιο σταθερά είναι τα γαλακτώματα τόσο πιο αργά αλλάζουν οι ιδιότητές τους. Υπάρχουν δύο ειδών σταθερότητας που χαρακτηρίζουν τα γαλακτώματα, η θερμοδυναμική και η κινητική. Η θερμοδυναμική περιγράφει την δυνατότητα πραγματοποίησης μιας διεργασίας, ενώ η κινητική περιγράφει τον ρυθμό με τον οποίο αυτή συμβαίνει (Παπαβδής, 2014)

2.4.1 Θερμοδυναμική Σταθερότητα

Η θερμοδυναμική σταθερότητα ενός γαλακτώματος προσδιορίζεται όταν αναδευτεί ένα έλαιο με νερό και με το πέρασμα του χρόνου παρατηρηθεί η μεταβολή στην εμφάνιση του συστήματος. Αρχικά, κατά την ανάμιξη των δύο φάσεων σχηματίζεται αδιαφανές γαλάκτωμα το οποίο με την πάροδο του χρόνου καταρρέει και τελικά επέρχεται διαχωρισμός των φάσεων με τη δημιουργία δύο στρωμάτων, ελαίου και νερού. Η θερμοδυναμική αστάθεια εξηγείται με περισσότερη σαφήνεια συγκρίνοντας την ελεύθερη ενέργεια ενός συστήματος που αποτελείται από ένα έλαιο και μία υδατική φάση πριν και μετά τη γαλακτωματοποίηση. Με την παραδοχή ότι αρχικά οι φάσεις είναι πλήρως διαχωρισμένες και τελικά δημιουργείται το σύστημα του γαλακτώματος (McClements, 2004):

$$\text{Αρχική κατάσταση, Συνολική ενέργεια Gibbs: } G^i = G_o^i + G_w^i + G_I^i - TS_{config}^i \quad (1)$$

$$\text{Τελική κατάσταση, Συνολική ενέργεια Gibbs: } G^f = G_o^f + G_w^f + G_I^f - TS_{config}^f \quad (2)$$

Όπου:

G_o, G_w, G_I : ελεύθερες ενέργειες Gibbs του ελαίου, του νερού και της διεπιφάνειας ελαίου-νερού αντίστοιχα,

T : απόλυτη θερμοκρασία

S_{config} : εντροπία διαμόρφωσης των σταγονιδίων στο σύστημα.

Οι ενέργειες Gibbs του νερού και του ελαίου παραμένουν σταθερές πριν και μετά την ομογενοποίηση και άρα η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ των δύο καταστάσεων είναι (McClements, 2004):

$$\Delta G_{formation} = G^f - G^i = G_I^f + G_I^i - (TS_{config}^f - TS_{config}^i) = \Delta G_I - T\Delta S_{config} \quad (3)$$

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας της διεπιφάνειας μεταξύ της αρχικής και τελικής κατάστασης είναι ίση με την αύξηση της επιφάνειας επαφής μεταξύ των δύο φάσεων, ελαίου και νερού, πολλαπλασιαζόμενη με τη διεπιφανειακή τάση (γ):

$$\Delta G_I = \gamma\Delta A \quad (4)$$

Επομένως προκύπτει η σχέση:

$$\Delta G_{formation} = \gamma\Delta A - T\Delta S_{config} \quad (5)$$

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας επιφάνειας ($\gamma\Delta A$) είναι πάντα θετική, λόγω της αύξησης της επιφάνειας επαφής κατά την ομογενοποίηση. Από την άλλη ο όρος της εντροπίας διαμόρφωσης των σταγονιδίων είναι πάντα αρνητικός και στα περισσότερα γαλακτώματα αμελητέος σε σύγκριση με την ελεύθερη ενέργεια Gibbs και τελικά η σχέση γίνεται:

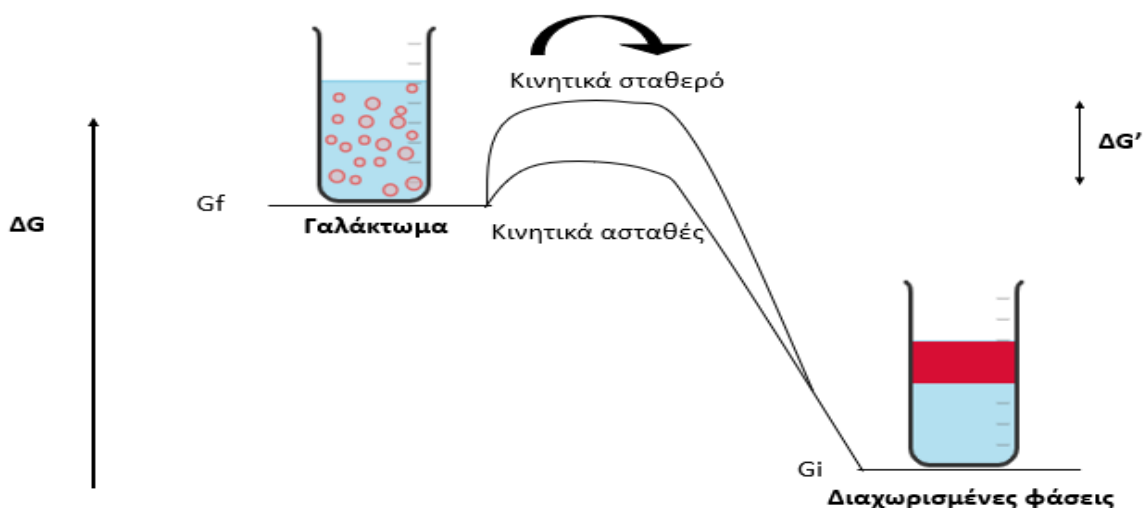
$$\Delta G = \gamma\Delta A \quad (6)$$

Συμπερασματικά, ο σχηματισμός ενός γαλακτώματος είναι θερμοδυναμικά ασταθής εξαιτίας της αύξησης της διεπιφάνειας τάσης μετά τη γαλακτωματοποίηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η επιφανειακή τάση είναι μικρή, τότε ο όρος της εντροπίας διαμόρφωσης είναι συγκριτικά μεγαλύτερος από τον όρο της ελεύθερης ενέργειας της διεπιφάνειας και οδηγεί στο σχηματισμό γαλακτωμάτων θερμοδυναμικά σταθερών νανογαλακτώματα (McClements, 2004).

2.4.2 Κινητική Σταθερότητα

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό του γαλακτώματος και καθορίζει τη θερμοδυναμική σταθερότητα αυτό. Όμως, δεν πληροφορεί για το ρυθμό με τον οποίο αλλάζουν οι ιδιότητες του γαλακτώματος σε σχέση με το χρόνο και το είδος των αλλαγών αυτών. Οι πληροφορίες αυτές δίνονται από την μελέτη της κινητικής σταθερότητας η οποία μελετά τη μακροπρόθεσμη σταθερότητα δύο γαλακτωμάτων με την ίδια σύνθεση αλλά με διαφορετικό μέγεθος σταγονιδίων. Γαλακτώματα με μικρότερο μέγεθος σταγονιδίων έχουν μεγαλύτερη κινητική σταθερότητα από γαλακτώματα με μεγαλύτερο μέγεθος σταγονιδίων, παρότι τα μικρά σταγονίδια εμφανίζουν υψηλή θερμοδυναμική αστάθεια λόγω της μεγαλύτερης διεπιφάνειας επαφής (McClements, 2004).

Η γνώση της σταθερότητας ενός γαλακτώματος σε σχέση με το χρόνο είναι πολύ σημαντική για τη δημιουργία σταθερών τελικών προϊόντων τα οποία διατηρούν τις επιθυμητές ιδιότητες τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Γι' αυτό σε πολλούς τομείς παρασκευής γαλακτωμάτων, η κινητική σταθερότητα είναι σημαντικότερη της θερμοδυναμικής σταθερότητας.



Σχήμα 2.2 Κατάσταση κινητικής σταθερότητας και κατάσταση θερμοδυναμικής αστάθειας γαλακτωμάτων.

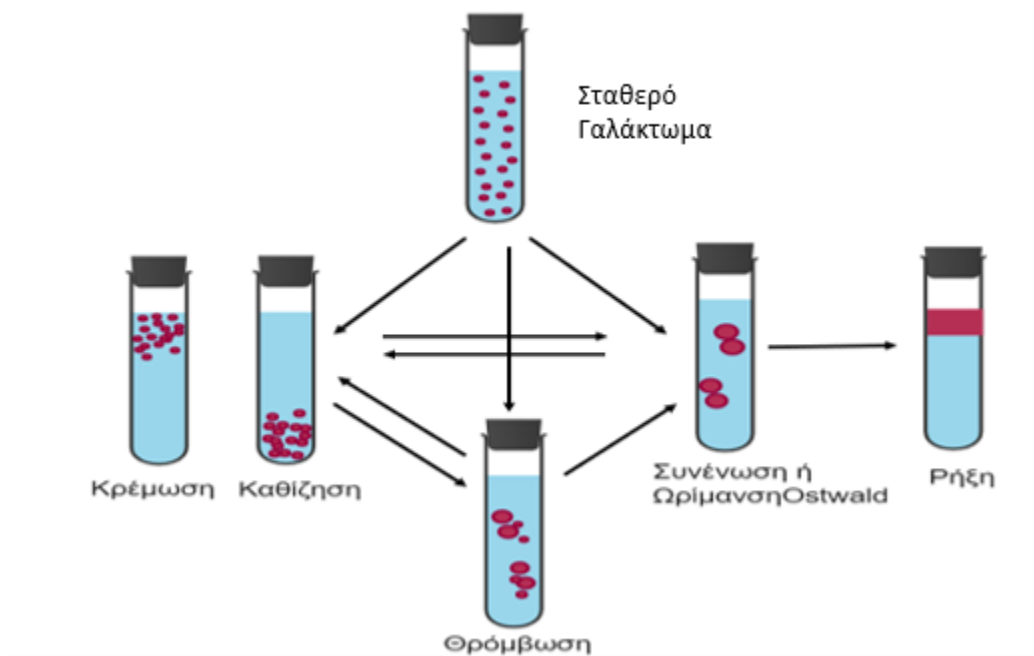
Κινητικά σταθερό είναι ένα γαλάκτωμα το οποίο έχει ενέργεια ΔG^* πολύ υψηλότερη από τη θερμική ενέργεια του συστήματος (kT). Τα γαλακτώματα έχουν πολλές διαφορετικές μετασταθείς καταστάσεις, με διαφορετική ενέργεια ενεργοποίησης η καθεμία. Επομένως μπορεί να μεταφερθεί από τη μία μετασταθή κατάσταση στην επόμενη μέχρι να καταλήξει σε θερμοδυναμική σταθερότητα (McClements, 2004).

Η κινητική σταθερότητα των γαλακτωμάτων στηρίζεται στη δυναμική φύση των σταγονιδίων. Τα σταγονίδια στο γαλάκτωμα κινούνται συνεχώς και συγκρούονται περιοδικά μεταξύ τους λόγω του φαινομένου της βαρύτητας και των εξωτερικών εφαρμοζόμενων δυνάμεων. Τα σταγονίδια μετά από μία σύγκρουση είναι πιθανό να απομακρυνθούν μεταξύ τους, να παραμείνουν όπως είναι ή να συνενωθούν, πράγμα που εξαρτάται από τη φύση των αλληλεπιδράσεων αυτών. Επομένως, η κινητική σταθερότητα των γαλακτωμάτων επηρεάζεται από τη δυναμική των σταγονιδίων και τη φύση των αλληλεπιδράσεων (McClements, 2004).

Κατά την ανάμιξη ελαίου και νερού, είναι γνωστό ότι το γαλάκτωμα που θα σχηματιστεί είναι προσωρινό και με την πάροδο του χρόνου θα διαχωριστεί σε δύο ευδιάκριτες φάσεις. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης μεταξύ της γαλακτωποιημένης κατάστασης και της μη γαλακτωποιημένης κατάστασης (McClements, 2004). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2 η ελεύθερη ενέργεια Gibbs της διεσπαρμένης φάσης είναι μεγαλύτερη από την ελεύθερη ενέργεια Gibbs των διαχωρισμένων φάσεων. Για να επιτευχθεί κινητική σταθερότητα είναι απαραίτητη η εξασφάλιση μεγάλου ενεργειακού φράγματος μεταξύ των δύο καταστάσεων. Όσο μεγαλύτερο είναι το ενεργειακό φράγμα, τόσο περισσότερο κινητικά σταθερό το γαλάκτωμα (McClements, 2012). Για τον σχηματισμό σταθερού γαλακτώματος χρησιμοποιούνται γαλακτωματοποιητές οι οποίοι δημιουργούν μία υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης αποτρέποντας την αστάθεια. Ο γαλακτωματοποιητής προσροφάται στην επιφάνεια των ήδη σχηματιζόμενων σταγονιδίων δημιουργώντας μία μεμβράνη που αποτρέπει τη συνένωση (McClements, 2004).

2.5 Αποσταθεροποίηση Γαλακτωμάτων

Η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης των σταγονιδίων σε ένα γαλάκτωμα ορίζεται από το άθροισμα της ηλεκτροστατικής άπωσης λόγω της επικάλυψης των διάχυτων διπλοστιβάδων και της διασωματιδιακής έλξης λόγω διαμοριακών δυνάμεων van der Waals. Όταν οι σταγόνες είναι απομακρυσμένες κυριαρχούν απωστικές δυνάμεις και ευνοείται η σταθεροποίηση του γαλακτώματος, ενώ όταν οι σταγόνες πλησιάζουν μεταξύ τους κυριαρχούν ελκτικές δυνάμεις και οδηγούν στην αποσταθεροποίηση (Wilson et al., 2022). Ένα γαλάκτωμα είναι θερμοδυναμικά ασταθές σύστημα και με το πέρασμα του χρόνου οδηγείται σε κατάρρευση, η οποία εξαρτάται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ της σταθερής κατάστασης του γαλακτώματος και της μη σταθερής των διαχωρισμένων φάσεων (McClements, 2012). Η αποσταθεροποίηση αυτή δύναται να συμβεί με έναν από τους παρακάτω τρόπους, οι οποίοι απεικονίζονται σχηματικά στο Σχήμα 2.3:



Σχήμα 2.3 Φαινόμενα αποσταθεροποίησης γαλακτωμάτων (McClements & Jafari, 2018)

2.5.1 Θρόμβωση (flocculation)

Θρόμβωση (flocculation) είναι η συγκόλληση σταγόνων με σχηματισμό χαλαρών δομών. Κατά την θρόμβωση οι αρχικές σταγόνες διατηρούν την ταυτότητα τους (McClements, 2004). Ωστόσο αυτό εξαρτάται από τις ελκτικές δυνάμεις που κυριαρχούν στην αλληλεπίδραση. Όταν έχει επέλθει θρόμβωση στο γαλάκτωμα η συσσωμάτωση συμβαίνει λόγω της κοντινής απόστασης των σταγονιδίων (Wilson et al., 2022). Δηλαδή, το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην απουσία άπωσης μεταξύ των σταγόνων. Το φαινόμενο μπορεί να είναι «αδύναμο» ή «έντονο» ανάλογα με το μέγεθος των εμπλεκόμενων ελκτικών δυνάμεων (Tadros, 2013). Η θρόμβωση είναι στις περισσότερες περιπτώσεις αντιστρεπτή διεργασία και μπορεί να οδηγήσει σε κρέμωση ή καθίζηση (Barradas & de Holanda e Silva, 2020).

Η θρόμβωση επιταχύνει τον διαχωρισμό λόγω βαρυτικής δύναμης σε αραιωμένα γαλακτώματα, πράγμα που οδηγεί στη μείωση του χρόνου ζωής αυτού. Επίσης, μπορεί να αυξήσει το ιξώδες του γαλακτώματος ακόμα και να οδηγήσει στη δημιουργία γέλης (McClements, 2004). Ο ρυθμός θρόμβωσης εξαρτάται από τις ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των σταγονιδίων, τη συχνότητα σύγκρουσης των σταγονιδίων και το χρονικό διάστημα που παραμένουν σε επαφή (Barradas & de Holanda e Silva, 2020).

2.5.2 Συνένωση (coalescence)

Συνένωση (coalescence) είναι η διαδικασία συγχώνευσης δύο ή περισσότερων σταγόνων σε μία μεγαλύτερη σε όγκο σταγόνα αλλά με μικρότερη επιφάνεια. Με τη διαδικασία αυτή το γαλάκτωμα μεταβαίνει στην πιο σταθερή θερμοδυναμική του κατάσταση λόγω της μείωσης της επιφάνειας. Η συνένωση προκαλεί γρηγορότερη κρέμωση ή καθίζηση λόγω της αύξησης του μεγέθους των σταγόνων (McClements, 2004). Η διεργασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των χαρακτηριστικών του γαλακτώματος και είναι μη αντιστρεπτή. Κατά την συγχώνευση των σταγονιδίων μειώνεται η διεπιφανειακή τάση του συστήματος και επομένως μειώνεται η ελεύθερη ενέργεια Gibbs. Η συνένωση επάγει τη δημιουργία λεπτού φιλμ ελαίου στην επιφάνεια, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο φαινόμενο Marangoni που είναι η μαζική μεταφορά κατά μήκος μιας διεπαφής μεταξύ δύο ρευστών λόγω κλίσης της επιφανειακής τάσης. Η αλλαγή αυτή δεν γίνεται μακροσκοπικά αισθητή παρά μόνο στα τελευταία στάδια όταν οδηγεί στη ρήξη του γαλακτώματος (Wilson et al., 2022).

Ο βαθμός με τον οποίο λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της συνένωσης και ο φυσικός μηχανισμός που συμβαίνει εξαρτάται σημαντικά από την φύση του γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιείται για την σταθερότητα του συστήματος καθώς και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Για να μην επέλθει συνένωση οι σταγόνες δεν πρέπει να έρχονται σε στενή επαφή για μεγάλο χρονικό διάστημα (McClements, 2004).

2.5.3 Κρέμωση (creaming) και καθίζηση (sedimentation)

Κρέμωση (creaming) και καθίζηση (sedimentation) σε ένα γαλάκτωμα προκύπτει όταν σταγόνες διαφορετικής πυκνότητας της διεσπαρμένης φάσης διαχωρίζονται είτε στο πάνω είτε στο κάτω μέρος (Wilson et al., 2022). Συγκεκριμένα όταν τα σταγονίδια έχουν μικρότερη πυκνότητα από την συνεχή φάση τείνουν να κινούνται ανοδικά χωρίς αύξηση στο μέγεθος τους, κρέμωση, ενώ κινούνται καθοδικά όταν έχουν μικρότερη πυκνότητα από την συνεχή φάση, καθίζηση (McClements, 2007). Όπως και στη θρόμβωση οι σταγόνες δεν χάνουν τα χαρακτηριστικά τους σε σχέση με το αρχικό γαλάκτωμα και γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίζεται ως αντιστρεπτή διεργασία (Παναγιώτου, 1998). Επίσης, η πιθανότητα συσσωμάτωσης οφείλεται στην αυξημένη πιθανότητα αλληλεπίδρασης των σταγόνων μεταξύ τους.

Η πυκνότητα των περισσότερων εδωδιμων ελαίων είναι μικρότερη από αυτή του νερού, επομένως το λάδι έχει τη τάση να βρίσκεται στην επιφάνεια και το νερό κάτω από αυτό. Στα γαλακτώματα τύπου ελαίου σε νερό (O/W) λαμβάνει χώρα η κρέμωση, ενώ στα γαλακτώματα τύπου νερού σε έλαιο (W/O) τείνει να συμβαίνει καθίζηση. Μερικές φορές όμως μπορεί να συμβεί το ανάποδο από αυτό που περιεγράφηκε, όταν η πυκνότητα της ελαιώδους φάσης αυξάνεται επειδή περιέχει ουσίες πύκνωσης ή κρυστάλλους λίπους (McClements, 2007).

Από την εξίσωση Stoke προκύπτουν οι εξής τρόποι επιβράδυνσης της κρέμωσης: μείωση της διαφοράς πυκνοτήτων μεταξύ υδατικής και ελαιώδους φάσης, με μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων ή με αύξηση του ιξώδους της συνεχούς φάσης (McClements, 2007).

Το φαινόμενο της κρέμωσης και της καθίζησης μπορεί να αποτραπεί ελαχιστοποιώντας την διαφορά της πυκνότητας μεταξύ των δύο φάσεων του γαλακτώματος. Επίσης μειώνοντας την ακτίνα των σταγονιδίων, άρα μειώνοντας την επίδραση του φαινομένου της βαρύτητας. Τέλος, λύση αποτελεί η χρήση υψηλού μοριακού βάρους πολυμερών, συνθετικών ή φυσικών (Tadros, 2013).

2.5.4 Ωρίμανση Ostwald (Ostwald ripening)

Ωρίμανση Ostwald είναι η διαδικασία κατά την οποία τα μεγαλύτερα σταγονίδια τείνουν να αυξηθούν σε βάρος των μικρότερων μέσω διάχυσης της διεσπαρμένης φάσης στη συνεχή. Η διαδικασία αυτή είναι μη αντιστρεπτή και είναι αποτέλεσμα του φαινομένου Kelvin, κατά την οποία τα σωματίδια με μικρότερη διάμετρο έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στο διάλυμα και μειώνουν τη συνολική επιφάνεια της διεσπαρμένης φάσης άρα μειώνεται η ελεύθερη ενέργεια Gibbs. Το φαινόμενο αυτό αναστέλλεται όταν τα αναμίξιμα υγρά δεν διαλύονται το ένα στο άλλο (Wilson et al., 2022).

Η ωρίμανση Ostwald συμβαίνει πιο γρήγορα όταν το μέσο μέγεθος των σταγόνων στο γαλάκτωμα μειώνεται, επειδή η διαλυτότητα της διεσπαρμένης φάσης αυξάνεται με μείωση της διαμέτρου των σταγόνων. Επίσης, ο ρυθμός εμφάνισης του φαινομένου αυξάνεται όσο αυξάνεται η διεπιφανειακή τάση (McClements, 2004).

3. Νανογαλακτώματα

Ως νανογαλάκτωμα μπορεί να οριστεί ένα συμβατικό γαλάκτωμα με πολύ μικρό μέγεθος σωματιδίων. Η διάμετρος των σταγονιδίων στη διεσπαρμένη φάση ανήκει στο εύρος 20-600 nm σύμφωνα με διάφορους ερευνητές (Anton & Vandamme, 2011; Bouchemal et al., 2004; K. & Kumar, 2022; Mahdi Jafari et al., 2006). Εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους είναι διαφανή ή ημιδιαφανή στο εύρος 20-200nm, ενώ σε μεγαλύτερο μέγεθος είναι θολά (Mahdi Jafari et al., 2006). Τα νανογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα, επομένως για να σχηματιστούν απαιτούν ενέργεια, είτε μηχανική (high energy), είτε χημική (low energy) (Solansetal., 2005; Sonnevile-Aubrunetal., 2018). Τα νανογαλακτώματα αποτελούνται από μία υδατική και μία ελαιώδη φάση, οι οποίες ομογενοποιούνται με τη βοήθεια επιφανειοδραστικών ουσιών. Όταν η ελαιώδης φάση διασπείρεται στην υδατική προκύπτει O/W νανογαλάκτωμα, ενώ σε αντίθετη περίπτωση προκύπτει W/O νανογαλάκτωμα (Wilson et al., 2022). Όπως τα κοινά γαλακτώματα έτσι και τα νανογαλακτώματα επιτρέπουν την μεταφορά (transport) ή διαλυτοποίηση υδροφοβικών ουσιών σε υδατική φάση (Maali & Mosavian, 2013).

3.1 Σύνθεση νανογαλακτώματος

Ένα νανογαλάκτωμα σχηματίζεται με την ανάμιξη μιας υδατικής και μιας ελαιώδους φάσης και σταθεροποιείται με τη προσθήκη κάποιου γαλακτωματοποιητή ή μίγμα γαλακτωματοποιητών. Η επιτυχής παρασκευή ενός νανογαλακτώματος απαιτεί προσεκτική επιλογή των συστατικών καθώς και της ποσότητας αυτών (Barradas & de Holanda e Silva, 2020).

3.1.1 Λιπαρή φάση

Τα έλαια και τα λίπη ανήκουν στην ομάδα των λιπιδίων. Τα λιπίδια είναι αδιάλυτα ή ελάχιστα διαλυτά στο νερό, ενώ διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες. (McClements, 2004). Η λιπαρή φάση σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό (O/W) αποτελεί ποσοστό 2-20% του συνόλου. Η διαλυτότητα της δραστικής ουσίας στην ελαιώδη φάση είναι σημαντικό κριτήριο για την επιλογή του κατάλληλου ελαίου. Νανογαλακτώματα τύπου ελαίου σε νερό (O/W) είναι καλύτερη επιλογή για λιποφιλικά φάρμακα, ενώ νανογαλακτώματα τύπου νερού σε έλαιο (W/O) προτιμώνται για υδροφιλικά φάρμακα (Qadir et al., 2016). Τα έλαια που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι ελαιόλαδο, σογιέλαιο, βαμβακέλαιο, καρθαμέλαιο, λάδι καρύδας, ρυζέλαιο (Singh et al., 2017). Τα λιπίδια περιέχουν μεγάλο αριθμό μορίων, όπως είναι οι ακυλογλυκερόλες (μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια), τα λιπαρά οξέα και τα φωσφολιπίδια (McClements, 2004).

3.1.2 Υδατική φάση

Το μόριο του νερού αποτελείται από δύο άτομα υδρογόνου συνδεδεμένα με ομοιοπολικό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου. Στα νανογαλακτώματα, το νερό χρησιμοποιείται ως διαλύτης για τα υδατοδιαλυτά συστατικά είτε ως συνεχής φάση για τη δημιουργία O/W νανογαλακτωμάτων είτε ως διεσπαρμένη φάση για νανογαλακτώματα W/O. Λόγω της μοριακής δομής του νερού διαθέτει μεγάλη διεπιφανειακή τάση και έντονο ιοντικό προσανατολισμό. Επίσης, καθορίζουν τη διαλυτότητα και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών που υπάρχουν στα υδατικά διαλύματα. Το νερό έχει υψηλή διηλεκτρική σταθερά επομένως είναι ένας πολικός διαλύτης, δηλαδή τα ηλεκτρικά φορτισμένα μόρια ή σωματίδια διαχωρίζονται εύκολα σε αυτό. Επίσης, έχει

υψηλή θερμοχωρητικότητα, δηλαδή για να αυξηθεί η θερμοκρασία του κατά ένα βαθμό Κελσίου απαιτείται μεγάλη ποσότητα θερμότητας (McClements, 2004).

3.1.3 Γαλακτωματοποιητές

Οι γαλακτωματοποιητές είναι μόρια που είναι ικανά να προσροφηθούν στην διεπιφάνεια νερού-ελαίου και να προστατέψουν τις σταγόνες του γαλακτώματος από θρόμβωση ή/και συνένωση (McClements, 2004). Οι γαλακτωματοποιητές είναι αμφιφιλικά μόρια που σταθεροποιούν τα νανογαλακτώματα μειώνοντας την διεπιφανειακή τάση και αποτρέποντας την συσσωμάτωση των σταγονιδίων. Προσροφώνται αμέσως στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού και προσδίδουν στερική ή ηλεκτροστερική σταθερότητα. Η επιλογή του κατάλληλου γαλακτωματοποιητή ή πιο αποτελεσματικά μίγμα αυτών επηρεάζει τόσο το μέγεθος όσο και τη σταθερότητα του νανογαλακτώματος αλλά και καθορίζει τη τοξικότητα, τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες μειώνουν την επιφανειακή τάση και κατά συνέπεια μειώνουν το μέγεθος των σταγονιδίων. Έχει παρατηρηθεί πως μίγμα επιφανειοδραστικών ουσιών οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση της επιφανειακής τάσης σε σχέση με χρήση μόνο μίας ουσίας (Maali & Mosavian, 2013). Αν ο γαλακτωματοποιητής είναι λιποδιαλυτός τότε το τελικό γαλάκτωμα είναι τύπου W/O, ενώ αν είναι υδατοδιαλυτός τότε η συνεχής φάση είναι το νερό και το γαλάκτωμα που σχηματίζεται είναι τύπου O/W. Γενικά η φάση στην οποία ο γαλακτωματοποιητής είναι πιο διαλυτός είναι η συνεχής φάση του γαλακτώματος. Η επιλογή του κατάλληλου γαλακτωματοποιητή ή συνήθως σύστημα αυτών είναι πολύ σημαντική για την απόκτηση σταθερών γαλακτωμάτων (Maali & Mosavian, 2013).

3.1.3.1 Υδρόφιλη- Λιπόφιλη Ισορροπία (HLB)

Κάθε γαλακτωματοποιητής διαθέτει ένα υδρόφιλο τμήμα και ένα λιπόφιλο τμήμα στο μόριο του. Το υδρόφιλο τμήμα προσανατολίζεται προς τα μόρια του νερού, ενώ το λιπόφιλο τμήμα προς τα μόρια του ελαίου με αποτέλεσμα τη μείωση της επιφανειακής τάσης μεταξύ νερού-ελαίου. Η ισορροπία υδρόφιλου-λιπόφιλου μέρους ενός μη ιονικού γαλακτωματοποιητή ονομάζεται Hydrophilic Lipophilic Balance. Επινοήθηκε το 1949 από τον Griffin. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί γαλακτωματοποίηση δύο μη αναμίξιμων υγρών είναι απαραίτητη η εύρεση του απαιτούμενου HLB της ελαιώδους φάσης. Στη συνέχεια, με την παρακάτω σχέση μπορεί να βρεθεί η κατάλληλη αναλογία επιφανειοδραστικών για την επίτευξη γαλακτωματοποίησης (Tadros, 2013).

$$HLB = X * HLB_X + Y * HLB_Y \quad (7)$$

όπου X και Y% ποσότητα γαλακτωματοποιητών στο μίγμα.

Η τιμή HLB εκφράζεται σε μια αυθαίρετη κλίμακα από το 1-20. Κάθε επιφανειοδραστική ουσία έχει μία τιμή HLB μεταξύ 1 και 20, η οποία υπολογίζεται με βάση τη σχέση μεταξύ του υδρόφιλου και του λιπόφιλου τμήματος του μορίου και είναι το %βάρους της υδρόφιλης ομάδας διαιρεμένο με το 5. HLB ίσο με 20 αναφέρεται σε 100% υδρόφιλη επιφανειοδραστική ουσία και HLB ίσο με 0 αναφέρεται σε 100% λιπόφιλη επιφανειοδραστική ουσία. Γενικά χαμηλές τιμές HLB έχουν γαλακτωματοποιητές με λιπόφιλο χαρακτήρα, ενώ υψηλές τιμές HLB έχουν γαλακτωματοποιητές με υδρόφιλο χαρακτήρα (McClements, 2004).

Ανάλογα την τιμή HLB οι γαλακτωματοποιητές ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες (Gadhav, 2014):

- 4-6, χρησιμοποιούνται για την παρασκευή W/O γαλακτωμάτων.
- 7-9, χρησιμοποιούνται για διαβροχή υλικών (wetting agents).
- 8-18, χρησιμοποιούνται για την παρασκευή O/W γαλακτωμάτων.
- 13-15, χρησιμοποιούνται για απορρυπαντικά (detergents).
- 10-18, χρησιμοποιούνται σε διαλύματα για να αυξήσουν τη διαλυτοποίηση των δυσδιάλυτων υλικών (solubilizers).

3.1.3.2 Νόμος Bancroft

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τον συνδυασμό της σταθερότητας των γαλακτωμάτων σε σχέση με τις ιδιότητες των επιφανειοδραστικών ουσιών. Ο κανόνας του Bancroft αναφέρει το εξής: “για να επιτευχθεί σταθερό γαλάκτωμα πρέπει η επιφανειοδραστική ουσία να είναι διαλυτή στη συνεχή φάση” (Kralchevsky et al., 2009).

3.1.3.3 Tween και Span

Τα TWEENS και SPANS είναι μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό σταθερών γαλακτωμάτων. Συνήθως χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό σε διάφορες αναλογίες ώστε να παραχθούν γαλακτώματα διάφορων τύπων και με την επιθυμητή σταθερότητα.

Τα SPANS είναι εστέρες σορβιτάνης (sorbitan esters) που προκύπτουν από την αφυδάτωση της σορβιτάλης μέσω αντίδρασης εστεροποίησης με λιπαρά οξέα σε ελεγχόμενες συνθήκες. Το μέγεθος και το μήκος των λιπαρών οξέων που χρησιμοποιούνται συντελούν στο καθορισμό της υδρόφιλης-λιπόφιλης ισορροπίας καθώς και της διαλυτότητας του επιφανειοδραστικού σε πολικά και μη πολικά διαλύματα. Επιπλέον, εστεροποίηση με λιπαρά οξέα δημιουργεί πολυεστέρες. Η τιμή HLB μειώνεται με αύξηση του βαθμού εστεροποίησης και του αριθμού των μορίων των λιπαρών οξέων. SPANS με χαμηλό HLB έχουν υψηλή λιποφιλικότητα, άρα διαλύονται στο λάδι (Foo et al., 2020).

Τα TWEENS είναι αιθοξυλιωμένα SPANS. Τα TWEENS παρασκευάζονται από αιθοξυλίωση (ethoxylation) των SPANS για να αυξηθεί η τιμή HLB και να βελτιωθεί η υδροφιλικότητα του μορίου στην υδατική φάση για το σχηματισμό σταθερών ναογαλακτωμάτων τύπου O/W. Η διαλυτότητα των TWEENS σε υδατικά διαλύματα αυξάνεται με αύξηση του βαθμού αιθοξυλίωσης. Ωστόσο για σταθερό βαθμό αιθοξυλίωσης και εστεροποίησης, η υδατοδιαλυτότητα μειώνεται με αύξηση του μεγέθους και του μοριακού βάρους των λιπαρών οξέων (Foo et al., 2020).

3.1.3.4 Λεκιθίνη

Η λεκιθίνη είναι επιφανειοδραστική ουσία, η οποία μπορεί να προέρχεται από σόγια, ελαιοκράμβη και αυγό (McClements, 2004). Η απομόνωση της λεκιθίνης έγινε για πρώτη φορά από το Γάλλο χημικό Theodore Nicolaw Gobley το 1850. Η λεκιθίνη διαχωρίστηκε από τον κρόκο του αυγού στο οποίο οφείλει την ονομασία της από την αρχαία λέξη «λέκιθος». Αργότερα η λεκιθίνη αναγνωρίστηκε ως μίγμα φωσφολιπιδίων. Το 1920 έγιναν οι πρώτες προσπάθειες για

τον διαχωρισμό της λεικιθίνης από ακατέργαστο σογιέλαιο. Η σόγια αποτελεί ως και σήμερα τη κύρια πηγή για τη παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων λεικιθίνης. Πηγές λεικιθίνης είναι ακόμα το καλαμπόκι, ο βαμβακόσπορος, η ελαιοκράμβη και τα αυγά. Η λεικιθίνη σόγιας αποτελείται κυρίως από φωσφολιπίδια και σογιέλαιο (Klang & Valenta, 2011).

Το υδροφιλικό μέρος της λεικιθίνης είναι είτε ανιονικό είτε αμφιτερικό, ενώ το λιποφιλικό μέρος αποτελείται από δύο λιπαρά οξέα. Η φυσική λεικιθίνη έχει HLB περίπου 8 και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες επιφανειοδραστικές ουσίες για τη σταθερότητα γαλακτωμάτων (McClements, 2004).

Πίνακας 3.1 Επιφανειοδραστικές ουσίες.

Όνομα	Εμπορικό όνομα	HLB	Διαλυτότητα
Lecithin		8	Νερό/έλαιο
Polyoxythylene (20) sorbitan monostearate	Polysorbate 60 Tween 60	14.9	Νερό
Polyoxythylene (20) sorbitan monooleate	Polysorbate 80 Tween 80	15.0	Νερό
Sorbitan stearate	Span 60	4.7	Έλαιο
Sorbitan monooleate	Span 80	4.3	Έλαιο
Steareth 100	Brij 72	4.9	Έλαιο

3.2 Παρασκευή νανογαλακτωμάτων

Για να παρασκευαστεί ένα γαλάκτωμα χρειάζονται νερό, επιφανειοδραστική ουσία και ενέργεια. Η συνολική ελεύθερη ενέργεια ΔG για την δημιουργία ενός γαλακτώματος προκύπτει με εφαρμογή της παρακάτω εξίσωσης (Tadros et al., 2004):

$$\Delta G = \Delta A * \gamma - T * \Delta S \quad (8)$$

Όπου ΔA η αύξηση της διεπιφάνειας, γ η διεπιφανειακή τάση, T η θερμοκρασία και ΔS η μεταβολή της εντροπίας. Εφόσον η αύξηση της διεπιφάνειας και η διεπιφανειακή τάση είναι θετικά ποσά και η τιμή της εντροπίας διασποράς $T*\Delta S$ είναι επίσης θετική και μικρότερη του γινομένου $\Delta A*\gamma$, συνεπάγεται ότι η ελεύθερη ενέργεια ΔG είναι θετική. Η θετική τιμή της ΔG οδηγεί σε μη αυθόρμητο σχηματισμό γαλακτωμάτων και συνεπώς απαιτείται προσφορά ενέργειας για την παραγωγή σταγονιδίων. Η δημιουργία μεγάλων σταγονιδίων (μακρογαλακτώματα) είναι εύκολη ακόμα και με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Σε αντίθεση, η δημιουργία μικρότερων σταγονιδίων είναι δύσκολη και γι' αυτό είναι αναγκαία η προσθήκη επιφανειοδραστικών ουσιών αλλά και ενέργειας (Tadros et al., 2004).

Η ενέργεια που προσδίδεται στο σύστημα χρησιμοποιείται για να ξεπεράσει την ελεύθερη ενέργεια απαιτείται ώστε να αυξηθεί η διεπιφάνεια μεταξύ των δύο φάσεων και τελικά να διασπαρεί η μία στην άλλη.

Κατά την διαδικασία της γαλακτωματοποίησης λαμβάνουν χώρα ποικίλες διεργασίες, όπως η διατάραξη των σταγονιδίων, η προσρόφηση των γαλακτωματοποιητών και η σύγκρουση των σταγονιδίων. Καθεμία από αυτές πραγματοποιούνται πολλές φορές κατά την γαλακτωματοποίηση και ο χρόνος διάρκειας τους είναι πολύ μικρός. Αυτό αποδεικνύει τη δυναμική φύση της διεργασίας της γαλακτωματοποίησης (Tadros et al., 2004).

3.2.1 Χαμηλής ενέργειας μέθοδοι

Για τον σχηματισμό νανογαλακτωμάτων με χαμηλής ενέργειας μεθόδους χρησιμοποιείται η εσωτερική χημική ενέργεια του συστήματος. Η χημική ενέργεια που απελευθερώνεται ευθύνεται για τα φαινόμενα που λαμβάνουν μέρος κατά τον σχηματισμό των νανογαλακτωμάτων. Αυτά τα φαινόμενα οφείλονται στη μεταβολή της αυθόρμητης καμπυλότητας των επιφανειοδραστικών μορίων από αρνητική σε θετική (O/W) και από θετική σε αρνητική (W/O). Μερικές από αυτές τις μεθόδους είναι η μέθοδος αναστροφής φάσης θερμοκρασίας, η μέθοδος αναστροφής φάσης σύστασης και η αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση (Safaya & Rotliwala, 2020).

3.2.1.1 Μέθοδος αναστροφής φάσης θερμοκρασίας (Phase Inversion Temperature, PIT)

Η μέθοδος αναστροφής φάσης θερμοκρασίας συντελεί στη δημιουργία γαλακτωμάτων χωρίς τη χρήση υψηλών δυνάμεων διάτμησης. Βασίζεται στην εξάρτηση της βέλτιστης καμπυλότητας με τη θερμοκρασία στους μη ιονικούς γαλακτωματοποιητές. Η κινούσα δύναμη για τον αυθόρμητο σχηματισμό νανογαλακτωμάτων είναι οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού με τη θερμοκρασία. Οι μη ιονικοί γαλακτωματοποιητές συμπεριφέρονται υδροφιλικά σε χαμηλές θερμοκρασίες εξαιτίας της υψηλής ενυδάτωσης των πολικών μορίων, τα οποία είναι πιο διαλυτά στο νερό. Με την αύξηση της θερμοκρασίας συμπεριφέρονται λιποφιλικά λόγω της προοδευτικής αφυδάτωσης των πολικών μορίων, τα οποία πια διαλύονται ελάχιστα στο νερό. Επομένως, η υδρόφιλη- λιπόφιλη ισορροπία (HLB) του γαλακτωματοποιητή μεταβάλλεται με την μεταβολή της θερμοκρασίας. Νανογαλακτώματα τύπου O/W ευνοούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ νανογαλακτώματα τύπου W/O ευνοούνται από υψηλές θερμοκρασίες (Kumar, 2022). Κατά την αλλαγή από υδρόφιλο σε λιπόφιλο χαρακτήρα υπάρχει ένα σημείο, το οποίο ονομάζεται PIT ή υδρόφιλη-λιπόφιλη θερμοκρασία, όπου δεν υπάρχει ούτε υδροφιλικότητα ούτε λιποφιλικότητα. Η διαλυτότητα του γαλακτωματοποιητή είναι σχεδόν ίδια και στις δύο φάσεις, η καμπυλότητα είναι μηδέν και η επιφανειακή τάση εξαιρετικά μικρή, πράγμα που επιτρέπει την γαλακτωματοποίηση. Έχει διαπιστωθεί ωστόσο ότι τα γαλακτώματα είναι πολύ ασταθή και ο ρυθμός συσσωμάτωσης είναι πολύ υψηλός. Αν η θερμοκρασία του συστήματος διαφοροποιείται γρήγορα και αισθητά από το σημείο PIT με άμεση ψύξη ή θέρμανση τότε μπορούν να παραχθούν κινητικά σταθερά γαλακτώματα (Jintapattanakit, 2018). Η αλατότητα επηρεάζει το σημείο PIT. Μελέτη των Sharif et al (Sharif et al., 2012) απέδειξε ότι με αύξηση της συγκέντρωσης των NaCl και Na₂SO₄ μειώνεται το σημείο PIT. Η μέθοδος PIT συγκριτικά με τη μέθοδο PIC είναι περισσότερο αποτελεσματική. Επίσης τα γαλακτώματα που παρασκευάζονται με τη μέθοδο PIT έχουν μικρότερο μέγεθος σταγονιδίων και διασποράς (PDI) σε σχέση με αυτά με την μέθοδο PIC (Jintapattanakit, 2018). Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος, εύκολος έλεγχος της θερμοκρασίας αλλά επιτυγχάνεται με μη ιονικούς γαλακτωματοποιητές (Kumar, 2022).

3.2.1.2 Μέθοδος αναστροφής φάσης συγκέντρωσης (Phase Inversion Concentration, PIC)

Με τη μέθοδο αυτή παράγονται νανογαλακτώματα σε σταθερή θερμοκρασία και με τη χρήση απλού μαγνητικού αναδευτήρα. Συστατικά της συνεχούς φάσης προστίθενται αργά στα συστατικά της διεσπαρμένης φάσης. Συγκεκριμένα τα νανογαλακτώματα τύπου O/W σχηματίζονται με τη δημιουργία της ελαιώδους φάσης σταθερής συγκέντρωσης και σταδιακή προσθήκη του νερού. Με την αύξηση του νερού στο σύστημα η ενυδάτωση της πολυμερικής αλυσίδας του επιφανειοδραστικού αυξάνεται. Αυτό προκαλεί αλλαγή στην καμπυλότητα του επιφανειοδραστικού από αρνητική σε μηδέν. Στο σημείο αυτό η επιφανειοδραστική ουσία δε δρα ούτε λιπόφιλα ούτε υδρόφιλα. Επιπλέον προσθήκη νερού αλλάζει την καμπυλότητα σε θετική και το W/O νανογαλάκτωμα σε O/W νανογαλάκτωμα (Jintarattanakit, 2018). Με την τεχνική αυτή μπορούν να παρασκευαστούν νανογαλακτώματα με μέγεθος σταγονιδίων ως 30 nm. Είναι οικονομική μέθοδος και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται είναι απλός (K. &Kumar, 2022).

3.2.2 Υψηλής ενέργειας μέθοδοι

Τα νανογαλακτώματα που παρασκευάζονται με μεθόδους υψηλής ενέργειας είναι θερμοκινητικά σταθερά. Χαρακτηριστικό των διαδικασιών υψηλής ενέργειας είναι ότι χρησιμοποιούν μηχανικές συσκευές για τη δημιουργία έντονων μηχανικών δυνάμεων με στόχο τη διάσπαση μη αναμίξιμων υγρών και σχηματισμό μικρών, ομοιόμορφων σταγονιδίων (Gharibzahedi & Jafari, 2018). Με τις μεθόδους υψηλής ενέργειας, επίσης, γίνεται καλύτερος έλεγχος της σταθερότητας, της ρεολογικής συμπεριφοράς και της εμφάνισης του νανογαλακτώματος (Pandey et al., 2020). Ωστόσο τα μειονεκτήματα αυτών είναι το κόστος τους και η υψηλή θερμοκρασία λειτουργίας (Singh et al., 2017)

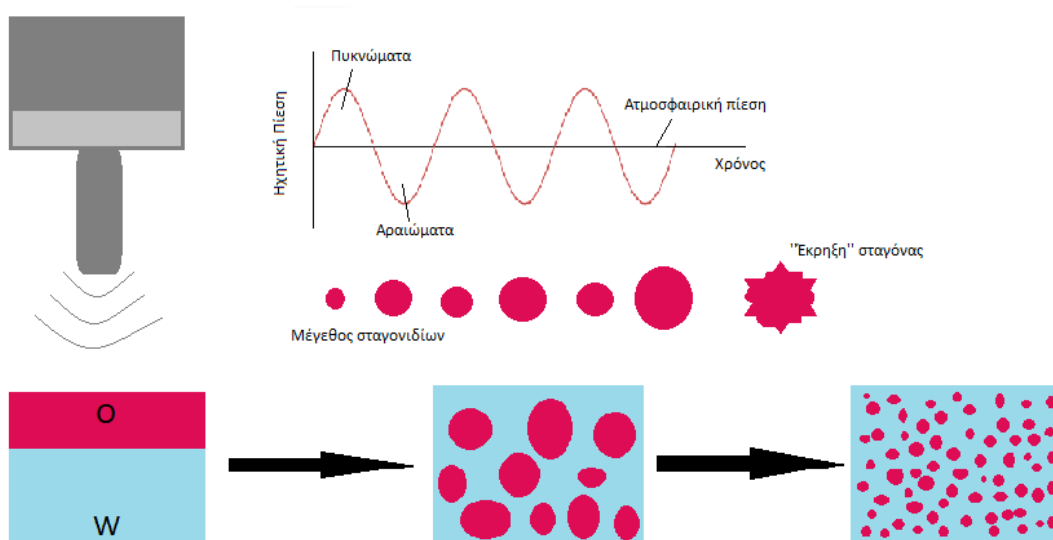
3.2.2.1 Ομογενοποιητές υπερήχων (Ultrasonic homogenizer)

Στην ομογενοποίηση με υπερήχους εφαρμόζονται ηχητικά κύματα υψηλών συχνοτήτων (άνω των 20kHz) (K. & Kumar, 2022; Singh et al., 2017). Οι ομογενοποιητές υπερήχων χρησιμοποιούν ανιχνευτές που περιλαμβάνουν πιεζοηλεκτρικούς μετατροπείς που διαστέλλονται και συστέλλονται ως αντίδραση σε μια εναλλασσόμενη ηλεκτρική τάση. Η μηχανική αυτή δόνηση ενισχύεται και μεταφέρεται στην ακίδα η άκρη της οποίας βυθίζεται στο δείγμα (Gharibzahedi & Jafari, 2018). Τα παραγόμενα ηχητικά κύματα δημιουργούν μικροφουσαλίδες γύρω από την ακίδα, οι οποίες συνεχίζουν να αναπτύσσονται μέχρι να εκραγούν (Singh et al., 2017). Η κατάρρευση των μικροφουσαλίδων που σχηματίζονται από τη σπηλαίωση, δημιουργεί έντονες δυνάμεις διάτμησης γύρω από την ακίδα υπερήχων και οδηγεί σε διάσπαση των σταγονιδίων στην εσωτερική φάση με ομοιόμορφη κατανομή (Rai et al., 2018). Το μέγεθος των σταγονιδίων τείνει να μειώνεται με αύξηση του χρόνου ομογενοποίησης, της έντασης και της συγκέντρωσης του επιφανειοδραστικού (Choi, 2020). Σημειώνεται ότι η περεταιίρω των βέλτιστων συνθηκών εφαρμογή υπερήχων δεν συντελεί στην επιπλέον μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων, αλλά στην άσκοπη κατανάλωση ενέργειας. Το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το αρχικό γαλάκτωμα που εισάγεται στον ομογενοποιητή υπερήχων. Εάν το γαλάκτωμα έχει μεγαλύτερα σταγονίδια και μεγαλύτερη κατανομή τότε το νανογαλάκτωμα που θα παραχθεί θα έχει και αυτό σταγονίδια με μεγαλύτερη διάμετρο (Maali & Mosavian, 2013). Σε σύγκριση με τη μέθοδο μικρορευστοποίησης (microfluidization) η μέθοδος υπερήχων είναι πιο οικονομική, απλή και

γρήγορη. Επίσης, στη μέθοδο υπερήχησης χρησιμοποιούνται γαλακτωματοποιητές σε χαμηλή συγκέντρωση (K. & Kumar, 2022). Ωστόσο λόγω των υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων που δημιουργούνται από τη σπηλαιώση, τα μόρια του νερού μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες. Επίσης η ανεξέλεγκτη αύξηση της θερμοκρασίας κατά την υπερήχηση μπορεί να οδηγήσει σε πυρόλυση και χημική φθορά του μίγματος. Οι λόγοι αύξησης της θερμοκρασίας κατά την μέθοδο της ομογενοποίησης υπερήχων μπορεί να οφείλεται στην θέρμανση του πιεζοηλεκτρικού μετατροπέα η οποία μεταφέρεται στην ακίδα και επομένως στο προς κατεργασία δείγμα. Για αποδοτικότητα ως 93% του πιεζοηλεκτρικού μετατροπέα το φαινόμενο αυτό περιορίζεται ή δεν εμφανίζεται καθόλου. Επίσης, η θερμοκρασία στο δείγμα αυξάνεται λόγω του φαινομένου της σπηλαιώσης. Λύση σε αυτό το πρόβλημα αποτελεί ο ρυθμός λειτουργίας (Duty cycle). (Gharibzahedi & Jafari, 2018). Η μέθοδος της υπερήχησης για τον σχηματισμό νανογαλακτωμάτων συνιστάται σε μικρή κλίμακα παραγωγής (Solans et al., 2005,).

Περιγραφή της υπερήχησης

Ακουστική σπηλαιώση είναι η ανάπτυξη και κατάρρευση των φυσαλίδων στο υγρό μέσο σε ένα υπερηχητικό πεδίο. Οι φυσαλίδες σπηλαιώσης αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της εφαρμογής μιας σειράς κύκλων εναλλασσόμενης υψηλής πίεσης (πυκνώματα) και χαμηλής πίεσης (αραιώματα). Το μέγεθος της φυσαλίδας αυξάνεται με την αύξηση των κύκλων και όταν φτάσει σε ένα κρίσιμο μέγεθος που δεν απορροφά επιπλέον ενέργεια τότε καταρρέει βίαια στη διάρκεια ενός κύκλου υψηλής πίεσης (Taha et al., 2020).



Σχήμα 3.1 Περιγραφή υπερήχησης για την παρασκευή νανογαλακτώματος (Taha et al., 2020).

3.2.2.2 Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (High Pressure Homogenization)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως καθώς ευνοεί τον σχηματισμό νανογαλακτωμάτων χρησιμοποιώντας διάφορες δυνάμεις, όπως υδραυλική διάτμηση, έντονος στροβιλισμός και σπηλαιώση. Το προγαλάκτωμα, δηλαδή τα δύο μη αναμίξιμα υγρά με τους γαλακτωματοποιητές, αναγκάζεται να περάσει μέσα από μία μικρή οπή σε υψηλή πίεση (500-5000 psi) και έτσι

προκαλείται μείωση του μεγέθους ως και 1 nm (Qadir et al., 2016). Κατά τη διαδικασία αυτή καταναλώνεται μεγάλη ποσότητα ενέργειας και θερμοκρασίας, η οποία αυξάνεται και μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση των συστατικών. Το μέγεθος των σταγονιδίων που παράγονται με αυτή τη μέθοδο εξαρτάται από τη συγκέντρωση του δείγματος, το είδος του ομογενοποιητή, και τις συνθήκες λειτουργίας όπως η ένταση και ο βαθμός της ενέργειας, ο χρόνος και η θερμοκρασία (Pandey et al., 2020). Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η εύκολη κλιμάκωση της από το εργαστήριο στη βιομηχανία, είναι γρήγορη και αποφεύγεται η χρήση οργανικών διαλυτών (Maali & Mosavian, 2013).

3.2.2.3 Μικρορευστοποίηση (Microfluidization)

Στην μικρορευστοποίηση για την μείωση του μεγέθους ενός γαλακτώματος επιδρούν ταυτόχρονα υδραυλική διάτμηση, στροβιλισμός και τριβή. Στον μικρορευστοποιητή η τροφοδοσία εισάγεται σε θάλαμο αποτελούμενο από μικρο-κανάλια υπό την επίδραση υψηλής πίεσης (500-50000 psi) προερχόμενη από αντλία εκτόπισης (Singh et al., 2017). Οι δύο φάσεις, υδατική και ελαιώδης, συνδυάζονται σε ομογενοποιητή και σχηματίζεται το προγαλάκτωμα, το οποίο εισάγεται στον μικρορευστοποιητή για τη δημιουργία σταθερών νανογαλακτωμάτων με εφαρμογή υψηλής πίεσης (Qadir et al., 2016a). Το γαλάκτωμα χωρίζεται σε δύο ρεύματα, τα οποία ρέουν σε ξεχωριστά μεταξύ τους κανάλια. Τα ρεύματα αυτά κινούμενα γρήγορα κατευθύνονται στο θάλαμο της συσκευής και προσκρούονται μεταξύ τους δημιουργώντας έντονες διασπαστικές δυνάμεις με αποτέλεσμα την διάσπαση των μεγαλύτερων σταγονιδίων σε μικρότερα. Το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των περασμάτων, η πίεση ομογενοποίησης, η συγκέντρωση και ο ρυθμός προσρόφησης του επιφανειοδραστικού (Choi, 2020).

3.3 Τεχνικές χαρακτηρισμού νανογαλακτωμάτων

3.3.1 ζ-δυναμικό (z-potential)

Ως ζ-δυναμικό ορίζεται το ηλεκτροκινητικό δυναμικό ενός κolloειδούς συστήματος. Το ζ-δυναμικό είναι η διαφορά δυναμικού μεταξύ του μέσου διασποράς και του σταθερού στρώματος του ρευστού που συνδέεται με τη διασπορά των σωματιδίων και έχει μονάδα μέτρησης mV. Η μέτρηση του ζ-δυναμικού δίνει πληροφορίες για τη φόρτιση της επιφάνειας της διεσπαρμένης φάσης και της σταθερότητας του συστήματος. Η τιμή του ζ-δυναμικού συσχετίζεται με τη σταθερότητα των κolloειδών διασπορών καθώς υποδεικνύει το βαθμό άπωσης μεταξύ των γειτονικών, ομοίως φορτισμένων σωματιδίων σε διασπορά. Το ζ-δυναμικό των νανογαλακτωμάτων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως από τις επιφανειοδραστικές ουσίες, τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών, τη μορφολογία και το μέγεθος των σωματιδίων, το pH του διαλύματος και την κατάσταση της ενυδάτωσης (Qadir et al., 2016a).

Εάν τα σταγονίδια στο νανογαλάκτωμα έχουν μεγάλο αρνητικό ή θετικό ζ-δυναμικό τότε θα τείνουν να απωθούνται μεταξύ τους, άρα θα αποφευχθούν φαινόμενα αποσταθεροποίησης. Από την άλλη πλευρά εάν η τιμή του ζ-δυναμικού είναι χαμηλή τότε δεν υπάρχει δύναμη που να εμποδίζει τα σταγονίδια να έρθουν κοντά και επομένως να ενωθούν και να αποσταθεροποιηθούν. Η διαχωριστική τιμή μεταξύ σταθερών και μη σταθερών νανογαλακτωμάτων είναι είτε -30 mV είτε +30 mV. Νανογαλακτώματα με ζ-δυναμικά

περισσότερο θετικά από +30 mV και περισσότερο αρνητικά από -30 mV θεωρούνται σταθερά (Barradas & de Holanda e Silva, 2020).

3.3.2 Μέγεθος σταγονιδίων (z-averages) και δείκτης πολυδιασποράς (PDI)

Το μέγεθος των σταγονιδίων και ο δείκτης πολυδιασποράς βοηθούν στη περιγραφή της ποιότητας, σταθερότητας, ομοιομορφίας και διασποράς των νανογαλακτωμάτων. Το μέγεθος των σταγονιδίων είναι βασικός παράγοντας για τη μέτρηση της γαλακτωματοποίησης καθώς προσδιορίζεται ο βαθμός και η έκταση απελευθέρωσης και απορρόφησης του ενεργού συστατικού. Η φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (PCS) και οι τεχνικές σκέδασης φωτός, στατική σκέδαση φωτός (SLS) και δυναμική σκέδαση φωτός (DLS), είναι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του μεγέθους των σταγονιδίων ενός νανογαλακτώματος. Μικρό μέγεθος σταγονιδίων στο νανογαλάκτωμα αποτρέπει φαινόμενα αποσταθεροποίησης λόγω της υψηλής καμπυλότητας και της πίεσης Laplace που αντιτίθεται στην παραμόρφωση μεγάλων σταγονιδίων (Marzuki et al., 2019).

Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) αναφέρεται στο λόγο της τυπικής απόκλισης προς το μέσο μέγεθος σταγονιδίων, καταδεικνύοντας την ομοιομορφία του μεγέθους των σταγονιδίων στο νανογαλάκτωμα. Ο δείκτης PDI δείχνει την απόκλιση από το μέσο μέγεθος σταγονιδίων. PDI κοντά στο μηδέν υποδηλώνει μονοδιάσπαρτο σύστημα σταγονιδίων, ενώ PDI κοντά στη μονάδα υποδηλώνει μεγάλο εύρος μεγέθους σταγονιδίων. Όταν ο PDI παραμένει κοντά στη τιμή 0.2, παρά την εκτεταμένη αποθήκευση του νανογαλακτώματος, υποδεικνύει ομογένεια των σταγονιδίων (Marzuki et al., 2019).

3.3.3 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Το μέγεθος των σταγονιδίων είναι σημαντικός φυσικός χαρακτηρισμός ενός νανογαλακτώματος και μπορεί να επηρεάσει ένα πλήθος άλλων χαρακτηριστικών όπως οπτικές ιδιότητες, ρεολογία και σταθερότητα (Barradas & de Holanda e Silva, 2020). Η δυναμική σκέδαση του φωτός ή DLS, γνωστή και ως φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων, είναι τεχνική που χρησιμοποιείται για την προσδιορισμό του προφίλ κατανομής μεγέθους μικρών σωματιδίων σε συστήματα διασποράς. Μετρά τη κίνηση Brown και μέσω της εξίσωσης Stokes-Einsteinη συσχετίζει με το μέγεθος των σωματιδίων. Ο υπολογισμός του μεγέθους των σωματιδίων γίνεται με το φωτισμό τους με λέιζερ και αναλύοντας τις διακυμάνσεις έντασης στο διαχυμένο φως. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κατά κόρον για τη γρήγορη μέτρηση και αξιολόγηση του μεγέθους των σωματιδίων σε ένα νανογαλάκτωμα.

3.3.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission electron microscopy, TEM)

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης αποτελεί ένα τύπο ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι η εξέλιξη του οπτικού μικροσκοπίου. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιεί ως πηγή ακτινοβολίας τα ηλεκτρόνια και διαθέτει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα και μεγέθυνση σε σχέση με το οπτικό μικροσκόπιο. Τα εξεταζόμενα δείγματα πρέπει να είναι πολύ λεπτά και ικανά να αντέχουν την υψηλή πίεση που υπάρχει μέσα στο όργανο (Qadir et al., 2016a).

Σε ένα συμβατικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης το δείγμα ακτινοβολείται από μία δέσμη ηλεκτρονίων ομοιόμορφης πυκνότητας ρεύματος. Έπειτα η δέσμη διέρχεται από μία οπή που έχει η άνοδος, εστιάζεται από τους μαγνητικούς φακούς και περνά μέσα στο δείγμα. Στη συνέχεια δημιουργείται η εικόνα από τον αντικειμενικό φακό και μεγεθύνεται από τους φακούς προβολής. Η εικόνα οδηγείται σε φθορίζουσα οθόνη ή σε ένα φωτογραφικό φιλμ ή ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή (Qadir et al., 2016b).

3.3.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning electron microscopy, SEM)

Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης δίνεται η δυνατότητα καταγραφής υψηλής ποιότητας φωτογραφιών της επιφάνειας ενός δείγματος. Λόγω του τρόπου με το οποίο δημιουργούνται οι εικόνες στην τεχνική SEM, αυτές έχουν χαρακτηριστική τρισδιάστατη εμφάνιση και είναι χρήσιμες για τον προσδιορισμό της δομής της επιφάνειας του δείγματος (Qadir et al., 2016b). Η μέθοδος SEM πλεονεκτεί στο ότι έχει μεγάλο βάθος πεδίου, το οποίο επιτρέπει μεγάλο μέρος του δείγματος να εστιαστεί ταυτόχρονα. Επίσης, οι εικόνες που παράγονται είναι υψηλής ανάλυσης και έτσι χαρακτηριστικά σε πολύ κοντινή απόσταση μπορούν να εξεταστούν με μεγέθυνση. Όλα αυτά σε συνδυασμό με την εύκολη παρατήρηση του δείγματος καθιστούν τη τεχνική αυτή μία από της ευρέως χρησιμοποιούμενες σε ερευνητικούς τομείς σήμερα. Ωστόσο είναι ακριβή και απαιτεί υψηλό κενό και αγωγιμότητα δείγματος. Η παρουσία επιφανειοδραστικών στο δείγμα μπορεί να αναστείλει τον χαρακτηρισμό νανογαλακτωμάτων με τη μέθοδο SEM λόγω του σχηματισμού μιας λείας επικάλυψης στις επιφάνειες των σταγονιδίων (Luykx et al., 2008).

3.4 Ιδιότητες νανογαλακτωμάτων

Οι φυσικοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων εξαρτάται από τη φύση των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης. Κατανοώντας τον μηχανισμό και τη φύση αυτών τότε γίνονται πιο κατανοητές και οι χημικές, φυσικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων.

3.4.1 Μέγεθος σταγόνας

Το μέγεθος της σταγόνας σε ένα νανογαλάκτωμα επηρεάζει την εμφάνιση, την διάρκεια ζωής και την υφή του. Το μέγεθος των σταγονιδίων είναι δυνατόν να ελεγχθεί με την εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών ομογενοποίησης ή/και με τη συγκέντρωση του συστήματος. Δηλαδή, η ένταση και η διάρκεια της ενέργειας που προσδίδεται για να ελαττωθεί το μέγεθος των σταγόνων μπορεί να ποικίλουν όπως και το είδος και η ποσότητα του λαδιού και του γαλακτωματοποιητή (Choi & McClements, 2020).

3.4.2 Διεπιφανειακά χαρακτηριστικά

Οι ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων μπορούν να τροποποιηθούν αλλάζοντας τη σύνθεση, το πάχος, τη ρεολογία, το φορτίο ή την περιβαλλοντική ευαισθησία των διεπιφανειακών στρωμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται ελέγχοντας προσεκτικά τον τύπο και τη συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιείται. Τα διεπιφανειακά χαρακτηριστικά επηρεάζονται επίσης από αλλαγές στη διαμόρφωση και την αλληλεπίδραση των επιφανειοδραστικών παραγόντων στην διεπαφή καθώς και στις ανταγωνιστικές διαδικασίες προσρόφησης. Οι σταγόνες ελαίου έχουν ηλεκτρικό φορτίο όταν επικαλύπτονται από ιονισμένες

επιφανειοδραστικές ουσίες. Τα ηλεκτρικά χαρακτηριστικά αυτών επιδρούν στην φυσική σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων αλλάζοντας τις κολλοειδείς αλληλεπιδράσεις που δρουν μεταξύ των σταγονιδίων, γεγονός που επηρεάζει την τάση που έχουν να συσσωματώνονται (Choi & McClements, 2020).

3.4.3 Ρεολογία

Τα γαλακτώματα γενικά παρουσιάζουν ποικιλία ρεολογικών χαρακτηριστικών ανάλογα με τις συνθέσεις, τις δομές και τις αλληλεπιδράσεις τους. Οι μικρές διαστάσεις των σταγονιδίων ελαίου στα νανογαλακτώματα μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά ρεολογικά χαρακτηριστικά από τα συμβατικά γαλακτώματα με το ίδιο κλάσμα όγκου ελαιώδους φάσης. Επομένως η ρεολογία των νανογαλακτωμάτων μπορεί να τροποποιηθεί μειώνοντας το μέγεθος των σταγονιδίων. Το ιξώδες ενός γαλακτώματος, γενικά, αυξάνεται εκθετικά με την αύξηση της συγκέντρωσης των σταγονιδίων, επειδή τα σταγονίδια συσσωρεύονται και δεν μπορούν να μετακινηθούν εύκολα (Choi & McClements, 2020).

3.4.4 Οπτική εμφάνιση

Η σκέδαση του φωτός στα νανογαλακτώματα εξαρτάται από τις διαστάσεις των σταγονιδίων ελαίου σε σχέση με το μήκος κύματος του φωτός (300-800 nm). Όταν το μέγεθος των σταγονιδίων είναι πολύ μικρότερο του μήκους κύματος του φωτός (<50 nm) τότε η σκέδαση είναι ασθενής και τα νανογαλακτώματα εμφανίζονται διαφανή ή ημιδιαφανή. Αντίθετα όταν η διάμετρος των σταγόνων είναι περίπου παρόμοια με το μήκος κύματος του φωτός (100-200 nm) τότε η σκέδαση είναι έντονη και τα νανογαλακτώματα είναι αδιαφανή. Η οπτική εμφάνιση του νανογαλακτώματος επηρεάζεται από τη συγκέντρωση των σταγονιδίων και το σχετικό δείκτη διάθλασης. Τα νανογαλακτώματα τείνουν να είναι οπτικά καθαρότερα όταν ο σχετικός δείκτης διάθλασης πλησιάζει στη μονάδα ή όταν η συγκέντρωση των σταγόνων μειώνεται. Ακόμα, το μέγεθος των σταγόνων συμβάλει στην οπτική εμφάνιση του νανογαλακτώματος (Choi & McClements, 2020).

3.4.5 Επίδραση θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι ένας παράγοντας, ο οποίος επηρεάζει τον σχηματισμό γαλακτωμάτων. Συγκεκριμένα η δύναμη Laplace, η διεπιφανειακή τάση και το ιξώδες των συστατικών ενός γαλακτώματος μειώνονται με αύξηση της θερμοκρασίας. Αυτό έχει ως συνέπεια την μείωση της απαιτούμενης ενέργειας που παρέχεται για το σχηματισμό μικρότερων σταγονιδίων. Η αυξημένη θερμοκρασία ευνοεί τη διαλυτοποίηση των γαλακτωματοποιητών τόσο στην υδατική όσο και στην ελαιώδη φάση. Ωστόσο η αυξημένη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της γαλακτωματοποίησης μπορεί να αποδειχθεί καταστροφική (Fisher, 2012).

3.5 Εφαρμογές νανογαλακτωμάτων

Τα νανογαλακτώματα βρίσκουν ευρέως εφαρμογή σε πολλούς τομείς όπως στα καλλυντικά, στη προσωπική υγιεινή, στα φάρμακα, στα τρόφιμα και στη γεωργία. Τα νανογαλακτώματα είναι τόσο διαδεδομένα λόγω των παρακάτω (Maali & Mosavian, 2013):

- Κατά την αποθήκευσή τους δεν επιτυγχάνεται κρέμωση ή καθίζηση εξαιτίας του μικρού μεγέθους των σταγονιδίων που μειώνει τη βαρυτική δύναμη και τις κινήσεις Brown.

- Δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός των δύο φάσεων, διότι το μικρό μέγεθος των σταγονιδίων αποτρέπει την συσσωμάτωση και κατ' επέκταση τη ρήξη του νανογαλακτώματος.
- Συγκριτικά με τα μικρογαλακτώματα τα νανογαλακτώματα για να σχηματιστούν χρησιμοποιούνται μικρότερες συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητή.

Τα νανογαλακτώματα χρησιμοποιούνται στην φαρμακευτική για τους εξής λόγους (Bouchemal et al., 2004; Maali & Mosavian, 2013):

- Μπορούν να εφαρμοστούν με διάφορους τρόπους όπως σε αφρό, σε σπρέι, σε κρέμα και ως υγρή μορφή.
- Τα νανογαλακτώματα σε σχέση με τα συμβατικά γαλακτώματα έχουν μεγαλύτερη ενεργή επιφάνεια και αυτό τα καθιστά πιο ικανά για τη μεταφορά δραστικών ουσιών στο δέρμα.
- Εναποτίθενται πιο ομοιόμορφα στο δέρμα και έχουν υψηλότερη διείσδυση λόγω του μικρού μεγέθους των σταγονιδίων και της μικρότερης επιφανειακής τάσης.
- Η διαφανής όψη και η ρευστότητα των νανογαλακτωμάτων τους προσδίδει ευχάριστη αίσθηση κατά την εφαρμογή στο δέρμα.
- Χρησιμοποιούνται και ως σύστημα μεταφοράς αρωματικών ουσιών άρα βρίσκουν εφαρμογή ως καλλυντικά και ως αρώματα.
- Τα νανογαλακτώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατο για τα λιποσώματα και κυστίδια που είναι λιγότερο σταθερά.
- Τα νανογαλακτώματα αποτελούν το πρώτο στάδιο για την παραγωγή νανοκάψουλων και νανοσφαιρίδιων.

3.6 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα νανογαλακτωμάτων

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα των νανογαλακτωμάτων. Αρχικά, το μέγεθος τους τα καθιστά ικανά στη μεταφορά φαρμάκων λόγω της μεγάλης διεπιφάνειας χάρη στην οποία βελτιώνεται η απορρόφηση του φαρμάκου μέσω πολλών διαδρομών. Η μεγάλη διεπιφάνεια, επίσης, επηρεάζει φαινόμενα μεταφοράς μάζας του φαρμάκου, παράγοντας βαρυσήμαντος για την διαρκή και στοχευμένη μεταφορά του. Επιπρόσθετα, τα νανογαλακτώματα είναι πιο σταθερά σε σχέση με τα συμβατικά γαλακτώματα καθώς η μείωση λόγω της βαρυτικής έλξης μπορεί να αποφευχθεί σε μεγάλο βαθμό. Ακόμα, η κρέμωση και η καθίζηση δεν είναι συνυφασμένα με τα νανογαλακτώματα που σημαίνει πως είναι εφικτή η πιο μακροχρόνια αποθήκευση. Γενικά, υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρασκευής νανογαλακτωμάτων. Μερικές από αυτές καταναλώνουν λίγη ή και καθόλου ενέργεια (θέρμανση ή ανάμειξη) με τη βοήθεια επιφανειοδραστικών ουσιών. Υπάρχουν, όμως, και μέθοδοι που χρησιμοποιούν μηχανικές συσκευές για την δημιουργία μικρότερων σταγονιδίων. Τα νανογαλακτώματα χρησιμοποιούνται στην διαλυτοποίηση λιποφιλικών φαρμάκων και στην κάλυψη της ανεπιθύμητης γεύσης αυτών. Δεν θεωρούνται τοξικά δεδομένου ότι αποτελούνται από λάδι, νερό και κάποιον γαλακτωματοποιητή, με τον τελευταίο να είναι ασφαλής και εγκεκριμένος για την ασφάλεια του καταναλωτή. Γι' αυτό τον λόγο δεν προκαλούν ερεθισμούς. Σε σχέση με τα μικρογαλακτώματα, τα νανογαλακτώματα χρειάζονται λιγότερη ποσότητα γαλακτωματοποιητών. Τα νανογαλακτώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σύστημα μεταφοράς πολλών τύπων φαρμάκων με ποικίλες φυσικές

ιδιότητες και χημικές δομές. Τέλος, βρίσκουν εφαρμογές σε πολλούς τομείς όπως η κοσμετολογία, τα τρόφιμα, η φαρμακευτική και στη σύνθεση υλικών (Azmi et al., 2019).

4. Πειραματικό Μέρος

4.1 Υλικά-Σκεύη-Συσκευές

Πίνακας 4.1 Υλικά για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων.

Υλικά	Περιγραφή
Ελαιώδες εκχύλισμα <i>Alkanna tinctoria</i> (A.t)	E090 2507200E1 (Ελλάδα)
HPLC Grade water	Honeywell (U.S.)
Polysorbate 80 (Tween 80)	Fluka Analytical (Switzerland)
Span 80	Merck (Germany)
Cosphaderm SF-S (λεκιθίνη)	Cosphatec, Batch CO 509 (Germany)
Brij 72	ALDRICH Chemistry, Lot BCBC3247 (Germany)
Ελαιόλαδο	Μινέρβα, Ελλάδα
Phosphate buffered saline tablet	Sigma, Lot #SLBS4223

Πίνακας 4.2 Σκεύη και συσκευές για την παραγωγή νανογαλακτωμάτων.

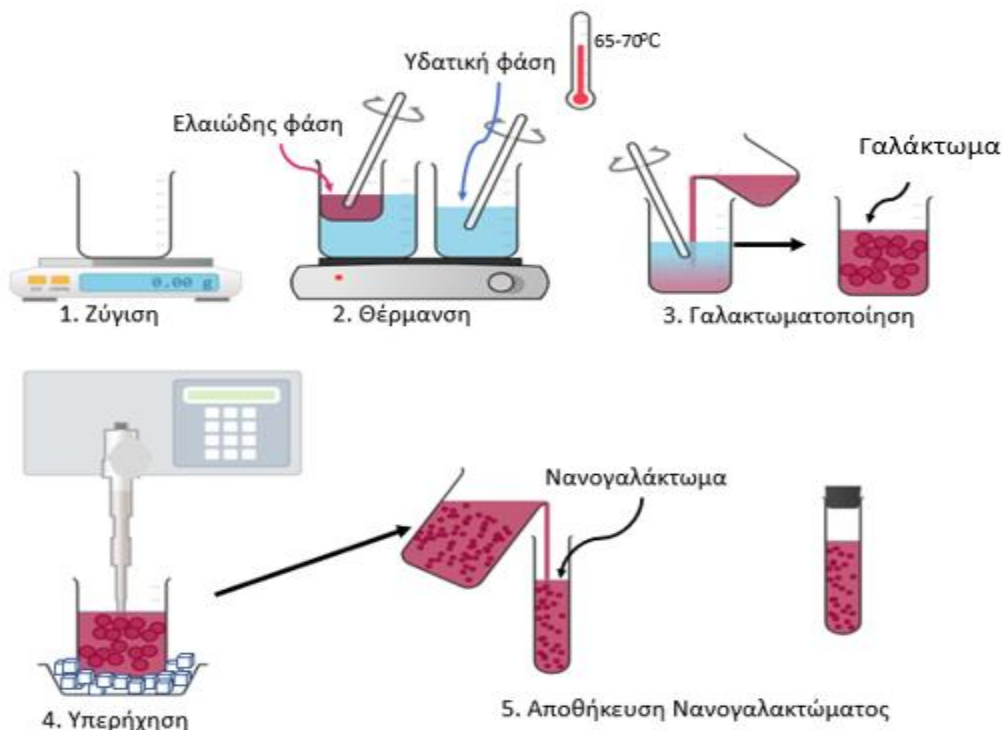
Σκεύη/Συσκευές	Περιγραφή
Γυάλινοι ράβδοι ανάδευσης	
Ποτήρια ζέσης	25 ml, 50 ml, 100 ml
Θερμόμετρα	
Πιπέτες	
Σπάτουλες	
Γυάλινα φιαλίδια	25 ml, 50 ml
Ζυγός ακριβείας	SHIMADZU, LIBROR AEG-220
Θερμική πλάκα	
Ομογενοποιητής υπερήχων (Ultrasonic Homogenizer)	BIOLOGICS INC., ULTRASONIC HOMOGENIZER MODEL 3000
Ομογενοποιητής (Homogenizer)	Witeg Labortechnik GmbH, HOMOGENIZER HG-15A
Malvern ZetaSizer Nano ZS	Malvern Instruments, Malvern, UK

4.2 Συνοπτική περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

Το Πειραματικό Μέρος περιλαμβάνει την παρασκευή νανογαλακτωμάτων από ελαιώδες εκχύλισμα *Alkanna tinctoria*. Οι παρασκευές που επιτυγχάνονται έχουν κοινή υδατική φάση, αποτελούμενη από HPLC Grade water ή PBS και Tween 80, ενώ μεταβάλλεται η ελαιώδης φάση διατηρώντας ως έλαιο το ελαιώδες εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* και αλλάζοντας την επιφανειοδραστική ουσία, Span 80 ή Cosphaderm. Στόχος είναι η παρασκευή σταθερών γαλακτωμάτων με μέγεθος σταγονιδίων στην τάξη της νανοκλίμακας, δηλαδή η επιτυχής παρασκευή νανογαλακτωμάτων. Για την ομογενοποίηση των δύο φάσεων, ελαιώδους και υδατικής, χρησιμοποιείται σε ορισμένες συνταγές ομογενοποιητής, ενώ κατά κόρον γίνεται ήπια ανάδευση με γυάλινη ράβδο. Για την δημιουργία νανογαλακτωμάτων χρησιμοποιείται

ομογενοποιητής υπερήχων σε όλες τις συνταγές. Συνοπτικά η πειραματική διαδικασία μπορεί να παρουσιαστεί στα παρακάτω βήματα.

1. Αρχικά ζυγίζεται ξεχωριστά κάθε συστατικό που θα χρησιμοποιηθεί τόσο στην υδατική όσο και στην ελαιώδη φάση. Σημαντική είναι η διατήρηση της αναλογίας κάθε συστατικού στο συνολικό μίγμα.
2. Ακολουθεί ανάμιξη του λιπόφιλου επιφανειοδραστικού (SPAN 80, Cosphaderm) με το λάδι και του υδρόφιλου επιφανειοδραστικού (TWEEN 80) με το νερό προς σχηματισμό της ελαιώδους φάσης και της υδατικής φάσης αντίστοιχα. Στη συνέχεια θερμαίνονται οι δύο φάσεις ξεχωριστά και αναδεύονται ταυτόχρονα με γυάλινη ράβδο. Σημειώνεται ότι η ελαιώδης φάση θερμαίνεται σε λουτρό. Βιβλιογραφικά οι επιφανειοδραστικές ουσίες ομογενοποιούνται τόσο στο λάδι όσο και στο νερό στους 65-70°C.
3. Μόλις οι φάσεις ομογενοποιηθούν πλήρως ακολουθεί ανάμιξη αυτών. Η ελαιώδης φάση μεταγγίζεται στην υδατική φάση με συνεχής ανάδευση, για το σχηματισμό γαλακτώματος τύπου O/W. Δηλαδή δημιουργούνται σταγονίδια ελαίου που βρίσκονται διασπαρμένα στη συνεχή φάση του νερού. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το γαλάκτωμα.
4. Το γαλάκτωμα τοποθετείται σε λουτρό πάγου και έπειτα στους υπερήχους. Με την εφαρμογή των υπερήχων το μακρογαλάκτωμα μετατρέπεται σε νανογαλάκτωμα.
5. Τέλος, το νανογαλάκτωμα τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο και αποθηκεύεται στο ψυγείο για περαιτέρω οπτική παρατήρηση και μελέτη.



Σχήμα 4.1 Συνοπτική περιγραφή πειραματικής διαδικασίας.

4.3 Παρασκευές νανογαλακτωμάτων

Για να μελετηθεί η σύνθεση O/W νανογαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκαν διάφορες συνθέσεις στις οποίες μεταβάλλονταν οι επιφανειοδραστικές ουσίες, το HLB του συστήματος και η μέθοδος γαλακτωματοποίησης. Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζεται η βασική παρασκευή, βάση της οποίας εκτελέστηκαν με τις κατάλληλες παραλλαγές και οι υπόλοιπες.

Πίνακας 4.3 Βασική παρασκευή νανογαλακτώματος 1A.

HLB=8.5			
Φάση	Συστατικό	Ποσότητα (g)	Αναλογία
Υδατική	HPLC-Grade H ₂ O	18.4	73%
	Tween 80	0.72	2.9%
Ελαιώδης	Ελαιώδες εκχύλισμα A.t	5	19.8%
	Span 80	1.08	4.3%

Για την παρασκευή, λαμβάνονται δύο ποτήρια ζέσεως των 25 mL, δύο των 50 mL και ένα των 100 mL. Αρχικά, στα ποτήρια των 25 mL ζυγίζονται με ζυγό ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων οι αναγραφόμενες ποσότητες ελαιώδους εκχυλίσματος *Alkanna tinctoria* και Span 80, οι οποίες είναι 5 g και 1.08 g αντίστοιχα. Στα ποτήρια των 50mL ζυγίζονται οι ποσότητες HPLC-Grade H₂O και Tween 80, οι οποίες είναι 18.4 g και 0.72 g αντίστοιχα. Στο ποτήρι των 50mL εισάγεται νερό παροχής για την δημιουργία υδατόλουτρου, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη θέρμανση της ελαιώδους φάσης με χρήση θερμαντικής πλάκας. Είναι απαραίτητη η έμμεση θέρμανση του ελαιώδους εκχυλίσματος και όχι απευθείας επαφή με τη θερμαντική πλάκα για να μην λάβει χώρα η οξειδωση του. Το ελαιώδες εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* μεταγγίζεται στο ποτήρι ζέσεως στο οποίο έχει ζυγιστεί η επιφανειοδραστική ουσία Span 80 και αναδεύεται με γυάλινη ράβδο. Με τη χρήση θερμόμετρου υδραργύρου όταν η θερμοκρασία ανέλθει στους 65-70 °C βάση βιβλιογραφίας επιτυγχάνεται ομογενοποίηση γεγονός που αποδεικνύεται και πρακτικά. Ταυτόχρονα θερμαίνεται η υδατική φάση, η οποία σχηματίζεται με τη προσθήκη του HPLC-Grade H₂O στο Tween 80. Γίνεται ανάδευση και της υδατικής φάσης με γυάλινη ράβδο στους 65-70 °C. Όταν και οι δύο φάσεις φτάνουν σε αυτή τη θερμοκρασία, 65-70 °C, και ομογενοποιηθούν πλήρως τότε προστίθεται η ελαιώδης φάση στην υδατική με ταυτόχρονη ανάδευση. Με αυτόν τον τρόπο παρασκευάζεται το γαλάκτωμα, μακρογαλάκτωμα. Για να παρασκευαστεί γαλάκτωμα στη νάνο κλίμακα το μακρογαλάκτωμα εισάγεται αρχικά σε λουτρό πάγου και στη συνέχεια πραγματοποιείται υπερήχηση (ultrasonication). Το λουτρό πάγου είναι απαραίτητο, διότι η υπερήχηση προκαλεί τοπική αύξηση της θερμοκρασίας στο γαλάκτωμα και μπορεί να το καταστρέψει. Οι συνθήκες υπερήχησης είναι παλμός (Duty Cycle) 0.5, ένταση (Amplitude) 90%. Πραγματοποιούνται συνολικά 7 κύκλοι υπερήχησης διάρκειας 5 λεπτών έκαστος, με 6 ενδιάμεσα διαστήματα ηρεμίας διάρκειας επίσης 5 λεπτών. Η ακίδα εφαρμόζεται έτσι ώστε να είναι λίγο κάτω από την επιφάνεια του μίγματος. Το πλέον σχηματιζόμενο νανογαλάκτωμα μεταγγίζεται σε γυάλινο φιαλίδιο και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε πρώτο στάδιο γίνεται οπτική παρατήρηση του τελικού νανογαλακτώματος.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για επόμενες παρασκευές στις οποίες οι αλλαγές παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Στον πίνακα φαίνονται το HLB, τα συστατικά με τις

ποσότητες αυτών, η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η γαλακτωματοποίηση και οι συνολικοί κύκλοι υπερήχων. Στον Πίνακα 4.4 παρατίθενται οι συστάσεις των παρασκευών που πραγματοποιήθηκαν καθώς και οι πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν για τον σχηματισμό νανογαλακτωμάτων.

Πίνακας 4.4 Συστατικά και ποσότητες αυτών για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων βασισμένες στην παρασκευή 1Α.

Σύνθεση	HBL	Συστατικά	Ποσότητα (g)	T _{γαλακτ.} (°C)	Κύκλοι Υπερηχησης
2A	7.0	HPLC-Grade H ₂ O	18.40	70	7
		Tween 80	0.47		
		Ελαιώδες εκχύλισμα A.t.	5.00		
		Span 80	1.33		
3A	7.0	HPLC-Grade H ₂ O	18.40	70	7
		Tween 80	0.50		
		Ελαιώδες εκχύλισμα A.t.	5.00		
		Cosphaderm	1.30		
3B1	8.5	HPLC-Grade H ₂ O	18.40	70	7
		Tween 80	0.74		
		Ελαιώδες εκχύλισμα A.t.	5.00		
		Cosphaderm	1.06		
3Γ	7.0	HPLC-Grade H ₂ O	18.40	65	7/9
		Tween 80	0.50		
		Ελαιώδες εκχύλισμα A.t.	5.00		
		Cosphaderm	1.30		
3Δ	7.0	PBS	18.40	65	7
		Tween 80	0.50		
		Ελαιώδες εκχύλισμα A.t.	5.00		
		Cosphaderm	1.30		
4A	7.0	HPLC-Grade H ₂ O	18.40	70	7
		Tween 80	0.48		
		Ελαιώδες εκχύλισμα A.t.	5.00		
		Cosphaderm	0.60		
		Span 80	0.72		
4B	8.5	HPLC-Grade H ₂ O	18.40	65	7
		Tween 80	0.72		
		Ελαιώδες εκχύλισμα A.t.	5.00		
		Cosphaderm	0.55		
		Span 80	0.53		
5A	8.5	HPLC-Grade H ₂ O	18.40	70	7
		Tween 80	0.64		
		Ελαιώδες εκχύλισμα A.t.	5.00		
		Brij 72	1.16		
1PBS	8.5	PBS	18.40	70	7
		Tween 80	0.72		

Πίνακας 4.4 (συνέχεια).

		Ελαιώδες εκχύλισμα A.t	5.00		
		Span 80	1.08		
1APBS	8.5	PBS	18.40	70	7
		Tween 80	0.72		
		Ελαιώδες εκχύλισμα A.t	5.00		
		Span 80	1.08		

Προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη δυνατή γαλακτωματοποίηση των δύο φάσεων πραγματοποιούνται πειράματα με τη χρήση ομογενοποιητή. Για την εκτέλεση των πειραμάτων αυτών κατά την ομογενοποίηση της ελαιώδους στην υδατική φάση πραγματοποιείται ανάδευση με τη χρήση ομογενοποιητή. Η ανάδευση είναι συνεχής με διάρκεια 15 min. Στη συνέχεια το προγαλάκτωμα εισάγεται στον ομογενοποιητή υπερήχων και εφαρμόζεται υπερήχηση με τις συνθήκες παλμός (Duty Cycle) 0.5, ένταση (Amplitude) 90%. Οι κύκλοι υπερήχησης είναι διάρκειας 5 λεπτών έκαστος, με 6 ενδιάμεσα διαστήματα ηρεμίας διάρκειας επίσης 5 λεπτών. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ομογενοποίηση επιτεύχθηκε μόνο με ελαιόλαδο ως έλαιο ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου πριν την χρήση του ελαιώδους εκχυλίσματος *Alkanna tinctoria*.

Πίνακας 4.5 Συστατικά και ποσότητες αυτών για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων με τη χρήση ομογενοποιητή κατά την γαλακτωματοποίηση.

Σύνθεση	HLB	Συστατικά	Ποσότητα (g)	T _{γαλακτ} (°C)	Κύκλοι Υπερηχησης	Διάρκεια ομογενοποίησης
3AH	7.0	HPLC-Grade H ₂ O	18.40	70	7	15min
		Tween 80	0.50			
		Ελαιόλαδο	5.00			
		Cosphaderm	1.30			
3BH	8.5	HPLC-Grade H ₂ O	18.40	70	7	15min
		Tween 80	0.74			
		Ελαιόλαδο	5.00			
		Cosphaderm	1.06			

5. Αποτελέσματα

5.1 Χαρακτηρισμός νανογαλακτωμάτων

Για την διεξαγωγή των μετρήσεων χρησιμοποιείται η συσκευή Zetasizer της εταιρίας Malvern τύπου ZetaSizer Nano ZS του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ.



Σχήμα 5.1 Συσκευή Zetasizer Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ.

Για τις μετρήσεις του μεγέθους των σταγονιδίων και του ζ-δυναμικού, κάθε νανογαλάκτωμα αραιώνεται. Συγκεκριμένα 50 μL νανογαλακτώματος αραιώνονται με 3.5 mL της συνεχούς φάσης αυτού (HPLC-Grade H₂O ή PBS). Δηλαδή το νανογαλάκτωμα αραιώνεται σε εβδομηταπλάσια ποσότητα της συνεχούς φάσης.

Πίνακας 5.1 Μετρήσεις μεγέθους, πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των παρασκευαζόμενων νανογαλακτωμάτων.

Δείγμα	Ημέρα	Μέσο μέγεθος σταγονιδίων (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
1A1 (16/2/22)	1	189±2	0.182±0.009	-65.8±1.9
	1	185±2	0.197±0.009	-61.5±1.9
	1	183±2	0.176±0.009	-62.3±1.9
	8	231±8	0.338±0.016	-48.6±0.4
	8	225±8	0.327±0.016	-49.6±0.4
	8	211±8	0.301±0.016	-48.2±0.4
	25	211±1	0.276±0.001	-44.2±0.4
	25	212±1	0.279±0.001	-45.2±0.4
	25	212±1	0.277±0.001	-44.7±0.4
	1	187±2	0.182±0.06	-42.6±0.9
	1	184±2	0.177±0.06	-44.3±0.9
	1	189±2	0.191±0.06	-44.8±0.9

1A2 (17/2/22)	8	234±4	0.283±0.03	-49.6±1.1
	8	236±4	0.276±0.03	-51.9±1.1
	8	226±4	0.279±0.03	-52.0±1.1
	25	199±3	0.216±0.019	-36.9±3.3
	25	193±3	0.221±0.019	-42.9±3.3
	25	192±3	0.238±0.019	-44.7±3.3
1A3 (17/2/22)	1	191±2	0.204±0.004	-45.1±1.2
	1	188±2	0.195±0.004	-47.4±1.2
	1	186±2	0.201±0.004	-44.6±1.2
	8	221±2	0.329±0.019	-56.1±3.2
	8	226±2	0.287±0.019	-60.6±3.2
	8	222±2	0.293±0.019	-63.9±3.2
	25	191±3	0.185±0.007	-41.8±1.3
	25	187±3	0.195±0.007	-44.6±1.3
	25	184±3	0.178±0.007	-44.3±1.3
1A4(18/2/22)	3	202±2	0.265±0.007	
	3	200±2	0.250±0.007	
	3	196±2	0.263±0.007	
2A1(21/2/22)	4	299±2	0.396±0.003	-39.5±3.0
	4	294±2	0.402±0.003	-34.9±3.0
	4	296±2	0.404±0.003	-35.2±3.0
	21	263±8	0.345±0.013	-37.1±0.5
	21	248±8	0.317±0.013	-37.6±0.5
	21	244±8	0.317±0.013	-38.3±0.5
2A2(21/2/22)	4	265±7	0.298±0.028	-45.1±1.7
	4	259±7	0.274±0.028	-46.8±1.7
	4	248±7	0.342±0.028	-49.3±1.7
	21	212±3	0.190±0.006	-42.3±1.0
	21	206±3	0.198±0.006	-42.2±1.0
	21	207±3	0.184±0.006	-44.3±1.0
2A3(21/2/22)	4	261±2	0.292±0.028	-49.1±0.6
	4	257±2	0.274±0.028	-48.5±0.6
	4	259±2	0.341±0.028	-47.7±0.6
	21	231±5	0.251±0.003	-45.7±0.7
	21	221±5	0.252±0.003	-47.2±0.7
	21	220±5	0.245±0.003	-47.1±0.7
3A1(22/2/22)	3	233±4	0.335±0.031	-46.3±0.5
	3	228±4	0.352±0.031	-47.5±0.5
	3	236±4	0.396±0.031	-47.1±0.5
3A2(22/2/22)	3	236±4	0.378±0.006	-45.3±0.7
	3	229±4	0.371±0.006	-47.0±0.7
	3	232±4	0.382±0.006	-46.5±0.7
3A3(22/2/22)	3	270±6	0.429±0.017	-49.3±0.2
	3	269±6	0.423±0.017	-49.5±0.2
	3	259±6	0.455±0.017	-48.9±0.2
	4	285±2	0.427±0.008	-30.5±0.8

5A(10/3/22)	4	283±2	0.407±0.008	-32.4±0.8
	4	281±2	0.422±0.008	-32.1±0.8

Σε αυτό το σημείο επισημαίνεται ότι δεν έγιναν μετρήσεις για όλα τα νανογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν, αλλά μόνο εκείνα που ήταν οπτικά σταθερά, δηλαδή δεν εμφάνιζαν φαινόμενα αποσταθεροποίησης. Ωστόσο, μετρήσεις λήφθηκαν για τις παρασκευές 3A και 5A παρόλο που παρατηρούνταν φαινόμενα αποσταθεροποίησης. Οι μετρήσεις έγιναν για να επιβεβαιωθεί ότι τα νανογαλακτώματα δεν παρουσιάζουν βέλτιστα χαρακτηριστικά για να παραμείνουν κινητικά σταθερά.

Τα νανογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με την αρχική/ βασική σύνθεση 1A, καθώς και τα νανογαλακτώματα της σύνθεσης 2A ήταν οπτικά ομογενοποιημένα επομένως λήφθηκαν οι μετρήσεις για το μέσο μέγεθος σταγονιδίων, τη πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό.

Όπως φαίνεται από τη πρώτη ημέρα των μετρήσεων της τριπλέτας για τη σύνθεση 1A, το μέγεθος είναι και για τα 3 δείγματα (1A1, 1A2, 1A3) μικρότερο από 187±3 nm. Οι τιμές για το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό είναι τέτοιες που υποδηλώνουν τη σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων. Σε επόμενη μέτρηση, την όγδοη ημέρα, το μέσο μέγεθος των σταγονιδίων στην διεσπαρμένη φάση αυξήθηκε στα 226±7 nm. Η αύξηση αυτή ήταν αναμενόμενη με την πάροδο του χρόνου λόγω θερμοδυναμικής αστάθειας του συστήματος. Παρατηρείται, επίσης, αύξηση της πολυδιασποράς αλλά το ζ-δυναμικό διατηρείται υψηλό (σε απόλυτη τιμή). Κατά την τρίτη μέτρηση, 25 ημέρες μετά την παρασκευή τους, τα νανογαλακτώματα ανακινήθηκαν. Από τις μετρήσεις φαίνεται ότι το μέγεθος των σταγόνων εμφανίζεται μειωμένο σε σχέση με αυτό της όγδοης ημέρας, όπως και ο δείκτης πολυδιασποράς, ενώ το ζ-δυναμικό είναι περίπου σταθερό. Σημειώνεται ότι το νανογαλακτώμα 1A4 παρασκευάστηκε με επιπλέον κύκλους υπερήχησης ώστε να διαπιστωθεί αν συντελεί στη μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων, πράγμα που όπως δείχνουν οι μετρήσεις δεν επιτεύχθηκε.

Αναλόγως, οι μετρήσεις των νανογαλακτωμάτων της σύνθεσης 2A (2A1, 2A2, 2A3) έδειξαν αυξημένο μέσο μέγεθος σταγονιδίων 271±18 nm, από την πρώτη μέτρηση 4 ημέρες μετά την παρασκευή τους. Επίσης, ο δείκτης πολυδιασποράς είναι μεγαλύτερος σε σχέση με αυτών της 1A σύνθεσης. Το ζ-δυναμικό είναι μέσα στα όρια ώστε να χαρακτηριστεί το νανογαλακτώμα σταθερό. Ωστόσο στην δεύτερη μέτρηση, 21 ημέρες μετά την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων, παρατηρείται μείωση σε όλες τις τιμές συγκριτικά με αυτές της πρώτης μέτρησης. Αυτό, πιθανότατα να οφείλεται στην ανακίνηση των νανογαλακτωμάτων πριν την λήψη των μετρήσεων.

Τέλος, σύμφωνα με τις μετρήσεις, τα νανογαλακτώματα των συνθέσεων 3A και 5A εμφάνιζαν μεγαλύτερο μέγεθος και δείκτη πολυδιασποράς. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα νανογαλακτώματα της 3A έχουν υψηλό ζ-δυναμικό (σε απόλυτη τιμή) και αυτά της 5A με βάση τη βιβλιογραφία θεωρούνται οριακά σταθερά για τις μετρήσεις ζ-δυναμικού που λήφθηκαν.

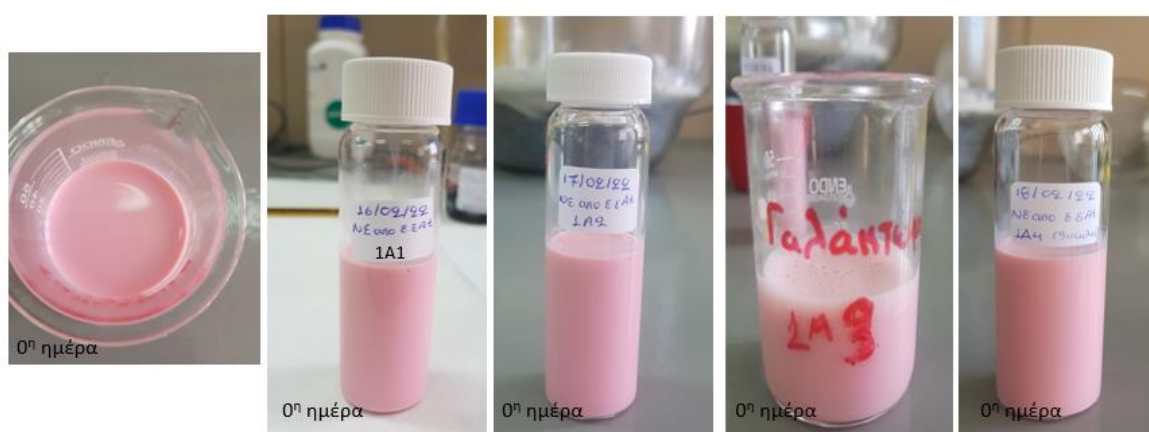
Με βάση τα παραπάνω βέλτιστη είναι η σύνθεση της 1A. Συγκεκριμένα παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 20 ημέρες με μέσο μέγεθος σταγονιδίων την πρώτη ημέρα 187±3 nm, δείκτη πολυδιασποράς 0.186±0.01 και ζ-δυναμικό -43.3±8.8 mV.

5.2 Οπτικές παρατηρήσεις νανογαλακτωμάτων

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μετά την εκτέλεση των συνταγών. Είναι χρήσιμο να επισημανθεί ότι για την οπτική παρατήρηση καθορίζεται μηδενική η ημέρα παρασκευής των νανογαλακτωμάτων.

Σύνθεση 1A

Τα νανογαλακτώματα της παρασκευής 1A με επιφανειοδραστικές ουσίες Tween 80/Span 80 και HLB 8.5 μετά το τέλος της υπερήχησης έχουν ροζ-ανοιχτό χρώμα και έχουν γαλακτωματοποιηθεί πλήρως. Την ημέρα παρασκευής τα νανογαλακτώματα φαίνονται σταθερά (Σχήμα 5.2) χωρίς κανένα ορατό φαινόμενο αποσταθεροποίησης.



Σχήμα 5.2 Νανογαλακτώματα 1A1, 1A2, 1A3 και 1A4 την 0 ημέρα.

Την 12^η ημέρα παρατήρησης τα νανογαλακτώματα συνεχίζουν να είναι ομογενοποιημένα, χωρίς να έχει λάβει χώρα κανένα φαινόμενο αποσταθεροποίησης.

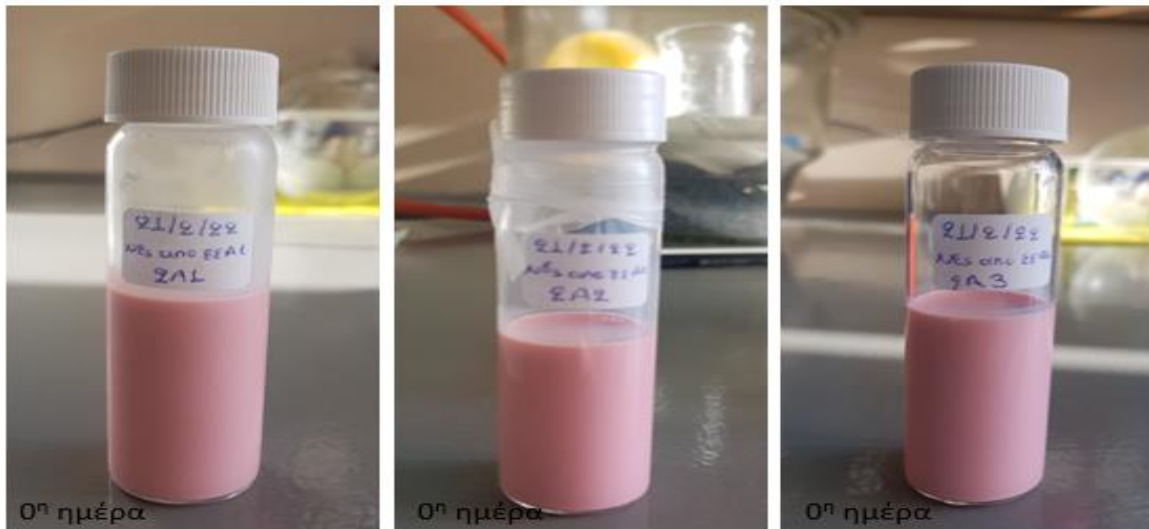
Την 20^η ημέρα παρατηρείται έλαιο στα τοιχώματα της επιφάνειας των νανογαλακτωμάτων σχηματίζοντας δαχτυλίδι. Ωστόσο έπειτα από ανακίνηση αυτό εξαφανίζεται και το σύστημα επανέρχεται στην σταθερή του κατάσταση (Σχήμα 5.3).



Σχήμα 5.3 Νανογαλακτώματα 1A1, 1A2, 1A3 και 1A4 την 12η και 20η ημέρα.

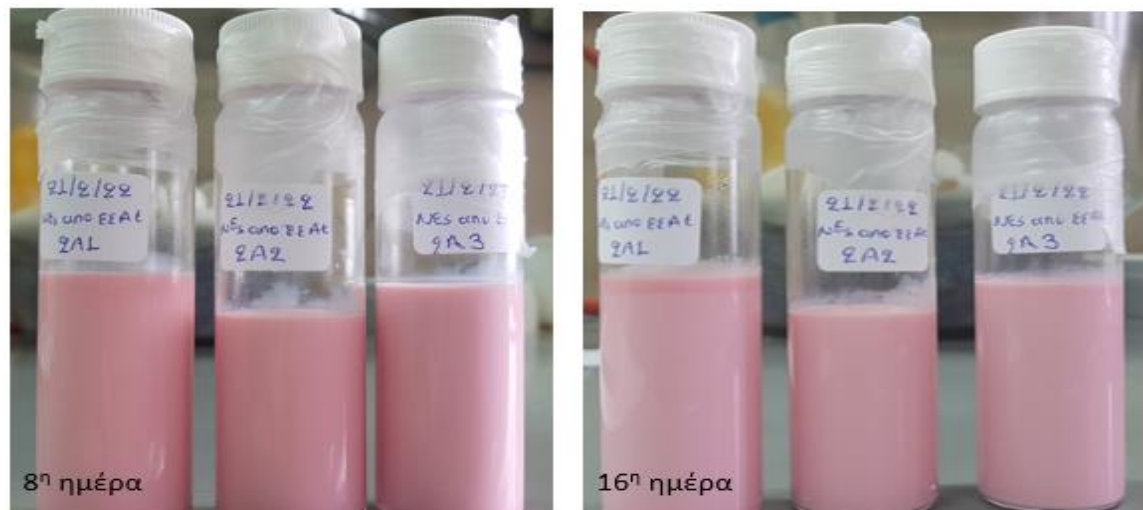
Σύνθεση 2A

Στη σύνθεση 2A το σύστημα γαλακτωματοποιητών είναι Tween 80/Span 80 και η τιμή HLB 7.0. Στο τέλος της ομογενοποίησης υπερήχων τα νανογαλακτώματα της σύνθεσης 2A έχουν ροζ-ανοιχτό χρώμα και έχουν πλήρως ομογενοποιηθεί. Φαίνονται σταθερά (Σχήμα 5.4), καθώς δεν παρατηρούνται σταγονίδια ελαίου στην επιφάνεια.



Σχήμα 5.4 Νανογαλακτώματα 2A1, 2A2 και 2A3 την 0^η ημέρα.

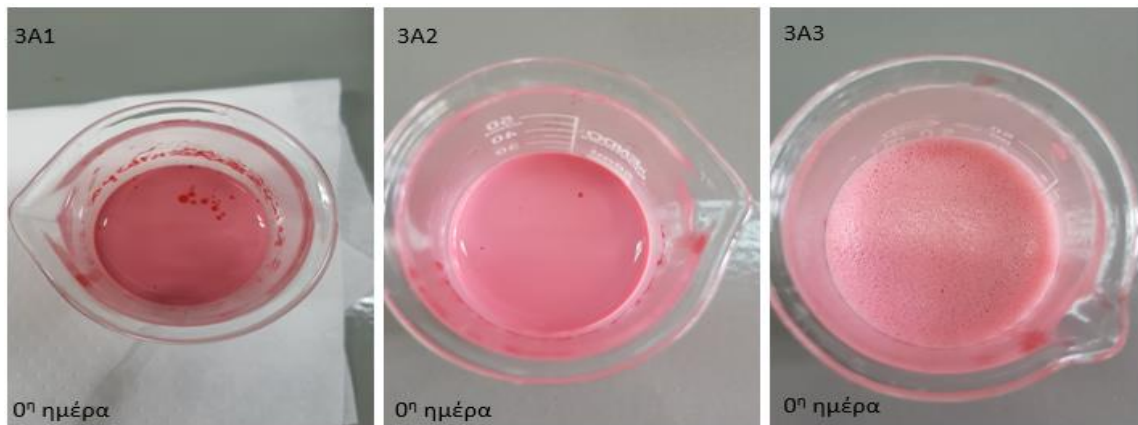
Την 8^η ημέρα παρατήρησης τα νανογαλακτώματα παραμένουν σταθερά. Ωστόσο την 16^η ημέρα παρατηρείται μία πιο σκουρόχρωμη στρώση υγρού σε σχέση με το υπόλοιπο υγρό. Η στρώση αυτή οφείλεται στο φαινόμενο κρέμωση (Σχήμα 5.5). Η εμφάνισή του στο νανογαλακτώμα υποδηλώνει αστάθεια αυτού. Με ανακίνηση επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση.



Σχήμα 5.5 Νανογαλακτώματα 2A1, 2A2 και 2A3 την 8^η και 16^η ημέρα παρατήρησης.

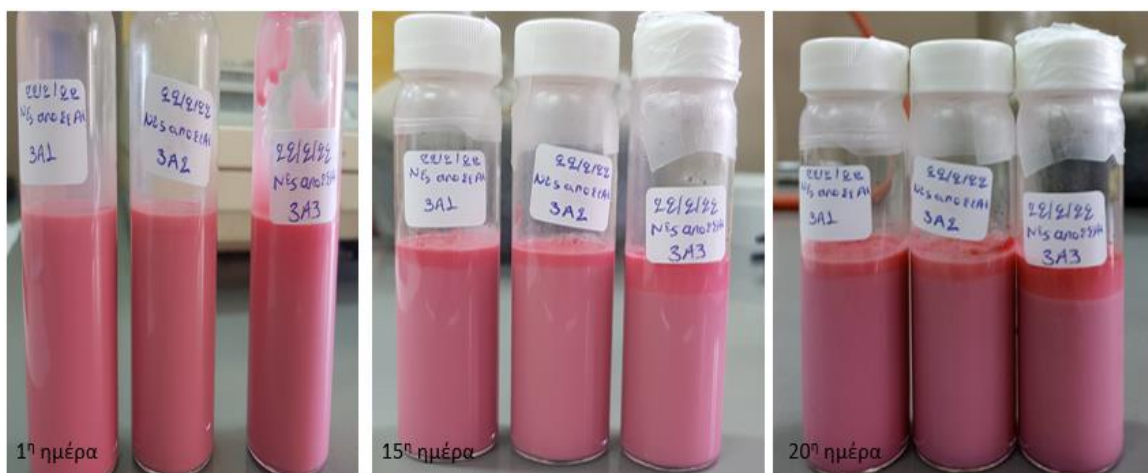
Σύνθεση 3A

Στη 3A σύνθεση το σύστημα γαλακτωματοποιητών είναι Tween 80/λεκιθίνη και HLB 7. Λόγω διαφορετικής απορρόφησης (μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αλκανίνες και σικονίνες) του ελαιώδους εκχυλίσματος *Alkanna tinctoria* σε σχέση με τις συνταγές 1A και 2A, το χρώμα των τελικών νανογαλακτωμάτων μετά τον 7^ο κύκλο υπερήχησης είναι ροζ-σκούρο. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.6 στα 3A1 και στο 3A2 νανογαλάκτωμα, στην επιφάνεια υπάρχουν σταγόνες ελαίου, γεγονός που επιδεικνύει μη γαλακτωματοποίηση των δύο φάσεων. Στο 3A3 έχει σχηματιστεί αφρός, ο οποίος πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση της θερμοκρασίας κατά την ομογενοποίηση με υπερήχους και τις επιφανειοδραστικές ουσίες.



Σχήμα 5.6 Νανογαλακτώματα 3A1, 3A2 και 3A3 την 0η ημέρα.

Την πρώτη ημέρα οπτικής παρατήρησης στην επιφάνεια των νανογαλακτωμάτων σχηματίζεται μία πιο σκούρα κηλίδα, η οποία υποδεικνύει την εμφάνιση του φαινομένου της κρέμωσης. Η κρέμωση είναι περισσότερο εμφανής την 15^η ημέρα. Ταυτόχρονα την 20^η ημέρα παρατηρούνται στην επιφάνεια και σταγόνες ελαίου. Το φαινόμενο αυτό με τη πάροδο του χρόνου οδηγεί το νανογαλάκτωμα στην αποσταθεροποίησή του (Σχήμα 5.7).



Σχήμα 5.7 Νανογαλακτώματα 3A1, 3A2 και 3A3 την 1η, 15η και 20η ημέρα.

Σύνθεση 3B1

Στη 3B1 σύνθεση το σύστημα γαλακτωματοποιητών είναι Tween 80/λεικιθίνη και HLB 8.5. Μετά την υπερήχηση των 7 κύκλων το τελικό νανογαλάκτωμα έχει χρώμα ροζ-σκούρο. Τα σταγονίδια ελαίου είναι περισσότερο εμφανή στην επιφάνεια του νανογαλακτώματος. Η εμφάνιση αυτών προμηνύει την μελλοντική αποσταθεροποίησή του. Στην 1^η κιόλας ημέρα επέρχεται το φαινόμενο της κρέμωσης μιας και είναι εμφανής η στρώση ελαίου στην επιφάνεια. Την 8^η ημέρα το φαινόμενο είναι ορατό και πιο έντονο. Την 20^η ημέρα παρατηρούνται και σταγόνες ελαίου στα τοιχώματα του φιαλιδίου (Σχήμα 5.8).



Σχήμα 5.8 Νανογαλάκτωμα 3B1 την 0η, 1η, 8η και 20η ημέρα.

Σύνθεση 3Γ

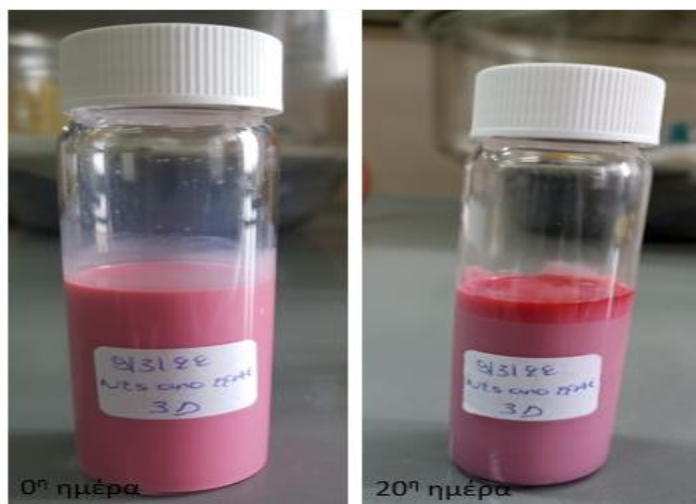
Στη 3Γ σύνθεση το σύστημα γαλακτωματοποιητών είναι Tween 80/λεικιθίνη και HLB 7. Μετά τον 7^ο κύκλο υπερήχησης το νανογαλάκτωμα 3Γ εμφανίζει ακόμα σταγόνες ελαίου. Γι' αυτό το λόγο χωρίζεται ισομερώς στα νανογαλακτώματα 3Γα και 3Γβ. Στο 3Γβ εφαρμόζονται 2 επιπλέον κύκλοι υπερήχησης. Ωστόσο οι σταγόνες συνεχίζουν να υπάρχουν. Τα τελικά νανογαλακτώματα έχουν χρώμα ροζ-σκούρο χρώμα. Στο Σχήμα 5.9 φαίνονται τα νανογαλακτώματα 3Γα και 3Γβ την ημέρα παρασκευής τους και την 20^η ημέρα.



Σχήμα 5.9 Νανογαλακτώματα 3Γα και 3Γβ την 0η και 20η ημέρα.

Σύνθεση 3Δ

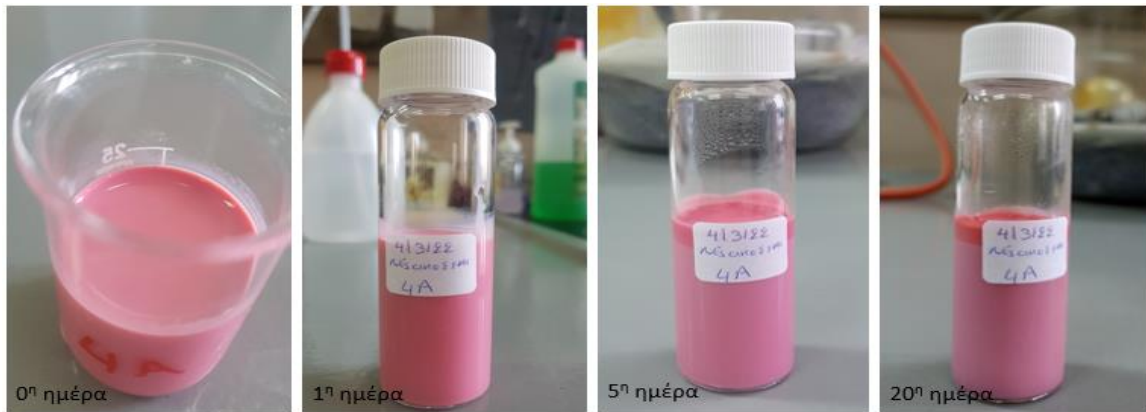
Στη 3Δ σύνθεση το σύστημα γαλακτωματοποιητών είναι Tween 80/λεικιθίνη και HLB 7. Η διαφορά με την παρασκευή 3Γ είναι η χρήση PBS αντί HPLC-Grade H₂O. Στο νανογαλάκτωμα 3Δ μετά το τέλος της υπερήχησης υπάρχουν σταγόνες στην επιφάνεια του. Όπως και στις προηγούμενες συνθέσεις η ύπαρξη αυτών είναι ένδειξη μελλοντικής αποσταθεροποίησης, πράγμα που συμβαίνει από τις πρώτες μέρες παρατήρησης, καθώς λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της κρέμωσης, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.10.



Σχήμα 5.10 Νανογαλάκτωμα 3Δ την 0^η και 20^η ημέρα.

Σύνθεση 4A

Στη 4A σύνθεση το σύστημα γαλακτωματοποιητών είναι Tween 80/Span 80-λεκιθίνη και HLB 7. Στο νανογαλάκτωμα 4A παρατηρούνται σταγόνες ελαίου μετά το τέλος του 7ου κύκλου υπερήχησης. Το χρώμα του είναι ροζ-σκούρο. Την επόμενη ημέρα παρατηρείται να έχει επέλθει το φαινόμενο της κρέμωσης το οποίο γίνεται πιο εμφανές από την 5η ημέρα. Τελικά, την 20η ημέρα παρατήρησης του νανογαλακτώματος υπάρχουν σταγόνες ελαίου στην επιφάνεια και τα τοιχώματα του φιαλιδίου (Σχήμα 5.11).



Σχήμα 5.11 Νανογαλάκτωμα 4A την 0η, 1η, 5η και 20η ημέρα.

Σύνθεση 4B

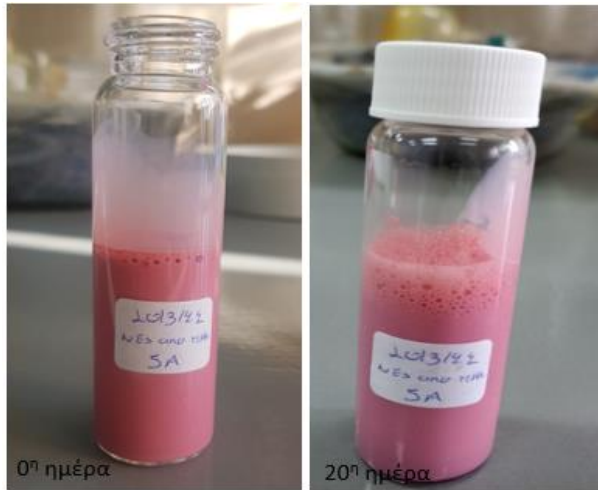
Στη 4B σύνθεση το σύστημα γαλακτωματοποιητών είναι Tween 80/Span 80-λεκιθίνη και HLB 8.5. Το νανογαλάκτωμα 4B έχει ροζ-σκούρο χρώμα. Δεν εμφανίζει σταθερότητα καθώς έχει επέλθει κρέμωση από τις πρώτες κιάλες ημέρες παρασκευής του η οποία είναι σημαντικά έντονη την 20^η ημέρα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.12.



Σχήμα 5.12 Νανογαλάκτωμα 4B την 0^η και 20^η ημέρα.

Σύνθεση 5A

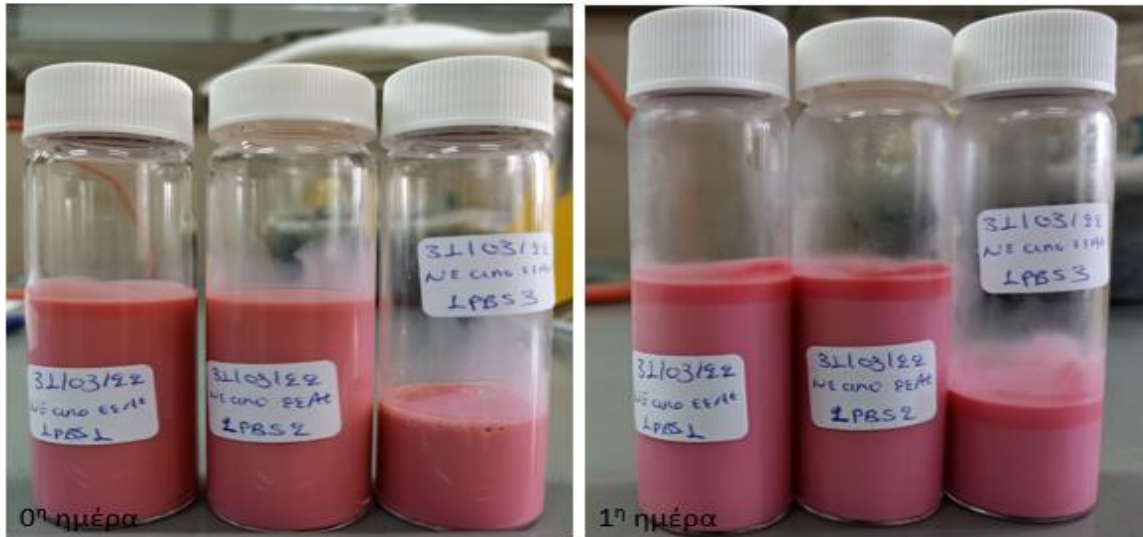
Στη 5A σύνθεση το σύστημα γαλακτωματοποιητών είναι Tween 80/Brij 72 και HLB 8.5. Το νανογαλάκτωμα 5A στο τέλος της υπερήχησης εμφανίζει αφρισμό. Έχει ροζ-σκούρο χρώμα και δεν είναι διακριτές σταγόνες ελαίου λόγω του αφρού. Με ήπια ανακίνηση από την επόμενη ημέρα υπάρχουν σταγόνες ελαίου. Ωστόσο ο αφρός παραμένει και 20 ημέρες αργότερα, ενώ με παρατήρηση στα τοιχώματα υπάρχουν σταγόνες ελαίου (Σχήμα 5.13).



Σχήμα 5.13 Νανογαλάκτωμα 5A την 0^η και 20^η ημέρα.

Σύνθεση 1PBS

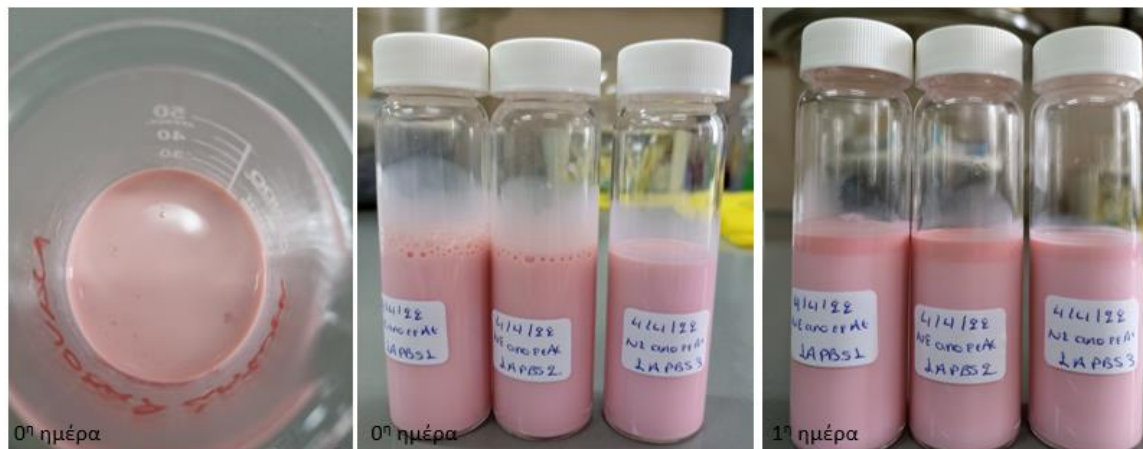
Στη 1PBS σύνθεση το σύστημα γαλακτωματοποιητών είναι Tween 80/Span 80 και HLB 8.5. Το χρώμα των νανογαλακτωμάτων της συνταγής 1PBS είναι ροζ-σκούρο. Σε σχέση με τα νανογαλακτώματα της συνταγής 1A παρουσιάζουν διαφορετικό χρώμα. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική απορρόφηση του ελαιώδους εκχυλίσματος *Alkanna tinctoria* και όχι στο PBS. Η κρέμωση λαμβάνει χώρα από την πρώτη κιόλας ώρα μετά την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων 1PBS1, 1PBS2 και 1PBS3. Ήδη την 1^η ημέρα παρατήρησης η κρέμωση είναι πολύ έντονη (Σχήμα 5.14).



Σχήμα 5.14 Νανογαλακτώματα 1PBS1, 1PBS2 και 1PBS3 την 0η και 1η ημέρα.

Σύνθεση 1APBS

Στη 1APBS σύνθεση το σύστημα γαλακτωματοποιητών είναι tween 80/Span 80 και HLB 8.5. Τα νανογαλακτώματα έχουν ροζ-ανοιχτό χρώμα όπως και αυτά της συνταγής 1A. Η αλλαγή στο χρώμα των νανογαλακτωμάτων 1APBS σε σχέση με αυτά της συνταγής 1PBS οφείλεται στην αλλαγή της απορρόφησης του ελαιώδους εκχυλίσματος *Alkanna tinctoria*. Τα τελικά νανογαλακτώματα 1APBS1, 1APBS2 και 1APBS3 εμφανίζουν σταγόνες ελαίου, οι οποίες δεν είναι πολύ έντονες αλλά υπάρχουν. Επίσης, υπάρχει αφρός στο τέλος της υπερήχησης. Την 1^η ημέρα παρατήρησης επέρχεται κρέμωση στα νανογαλακτώματα, φαινόμενο αστάθειας (Σχήμα 5.15).



Σχήμα 5.15 Νανογαλακτώματα 1APBS1, 1APBS2 και 1APBS3 την 0η και 1η ημέρα.

6. Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη τις μετρήσεις και τις οπτικές παρατηρήσεις από τα παρασκευαζόμενα νανογαλακτώματα προκύπτουν κάποια συμπεράσματα.

Αρχικά, οι συνθέσεις 1A και 2A είναι οι μοναδικές που παρουσίασαν σταθερότητα. Και οι δύο έχουν ως επιφανειοδραστικές ουσίες τα συστατικά Tween 80 και Span 80. Η διαφορά των δύο συνθέσεων είναι στη τιμή της υδρόφιλης λιπόφιλης ισορροπίας (HLB), η οποία στην 1A είναι 8.5 και στη 2A είναι 7. Επίσης, τα νανογαλακτώματα και αυτών των συνθέσεων εμφάνισαν σταθερότητα για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, τουλάχιστον 20 ημέρες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μετά την ανακίνησή τους τείνουν να επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά και να διατηρήσουν την σταθερότητα για περαιτέρω διάστημα.

Οι υπόλοιπες συνθέσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν εμφάνισαν σταθερότητα στη πάροδο του χρόνου. Όπως φαίνεται κυρίως στο κεφάλαιο των οπτικών παρατηρήσεων στα νανογαλακτώματα των συνθέσεων 3A, 3B1, 3Γ, 3Δ, 4A, 4B, 5A, 1PBS, 1APBS επέρχεται αποσταθεροποίηση καθώς στην επιφάνεια των νανογαλακτωμάτων εμφανίζεται το φαινόμενο της κρέμωσης, το οποίο μπορεί να είναι αποτέλεσμα συνένωσης σταγονιδίων.

Στις παρασκευές των 3A, 3B1, 3Γ, 3Δ, 4A, 4B, 5A, 1PBS η απορρόφηση του ελαιώδους εκχυλίσματος *Alkanna tinctoria* είναι μεγαλύτερη από αυτές των συνθέσεων 1A και 2A, πράγμα που δικαιολογεί το ροζ σκούρο χρώμα που εμφάνιζαν. Επίσης, ακόμα και μετά το τέλος της ομογενοποίησης με υπερήχους παρατηρήθηκαν σταγονίδια ελαίου στο νανογαλακτώμα.

Στο νανογαλακτώματα 1APBS η απορρόφηση του ελαιώδους εκχυλίσματος *Alkanna tinctoria* είναι η ίδια με αυτή της 1A και 2A. Ακόμα η σύσταση είναι ίδια με τη διαφορά ότι στα πρώτα χρησιμοποιείται PBS ενώ στα δεύτερα HPLC-Grade H₂O.

Στα νανογαλακτώματα της σύνθεσης 3AH και 3BH πραγματοποιήθηκε κατά την παρασκευή του προγαλακτώματος ομογενοποίηση με ομογενοποιητή. Ωστόσο δεν παρουσιάστηκε καμία βελτίωση στη σταθερότητα του τελικού νανογαλακτώματος.

Στην προσπάθεια να λυθεί το πρόβλημα αποσταθεροποίησης επαναλήφθηκε η σύνθεση 1A, όμως το τελικό νανογαλακτώμα δεν ήταν σταθερό όπως αναμενόταν. Από αυτό εξάγεται ως συμπέρασμα ότι ίσως το πρόβλημα εντοπίζεται στο ελαιώδες εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* μιας και είναι το μόνο που άλλαξε μεταξύ των δύο συνθέσεων.

Βέλτιστο νανογαλακτώμα αποδείχθηκε το 1A3, το οποίο παραμένει σταθερό για τουλάχιστον 20 ημέρες με μέσο μέγεθος σταγονιδίων 187 nm, δείκτη πολυδιασποράς 0.186 και ζ-δυναμικό -43.3 mV.

7. Βιβλιογραφία

- Akgun, I., Ganzera, M., Gur, C., Senol, S., Korkmaz, K., & Bedir, E. (2009). Determination of Naphthazarin Derivatives in 16 Alkanna Species by RP-LC Using UV and MS for Detection. *Chromatographia*, *70*(5–6), 963–967. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1261-2>
- Anton, N., & Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmaceutical Research*, *28*(5), 978–985. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>
- Assimopoulou, A. N., Karapanagiotis, I., Vasiliou, A., Kokkini, S., & Papageorgiou, V. P. (2006). Analysis of alkannin derivatives from Alkanna species by high-performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, *20*(12), 1359–1374. <https://doi.org/10.1002/bmc.705>
- Azmi, N. A. N., Elgharbawy, A. A. M., Motlagh, S. R., Samsudin, N., & Salleh, H. M. (2019). Nanoemulsions: Factory for Food, Pharmaceutical and Cosmetics. *Processes*, *7*(9), 617. <https://doi.org/10.3390/pr7090617>
- Barradas, T. N., & de Holanda e Silva, K. G. (2020). Nanoemulsions as Optimized Vehicles for Essential Oils. In A. Saneja, A. K. Panda, & E. Lichtfouse (Eds.), *Sustainable Agriculture Reviews 44* (Vol. 44, pp. 115–167). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41842-7_4
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., & Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, *280*(1–2), 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.016>

- Chang, Y.-S., Kuo, S.-C., Weng, S.-H., Jan, S.-C., Ko, F.-N., & Teng, C.-M. (1993). Inhibition of Platelet Aggregation by Shikonin Derivatives Isolated from *Arnebia euchroma*. *Planta Medica*, 59(05), 401–404. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959718>
- Choi, S. J. (2020). 20.
- Choi, S. J., & McClements, D. J. (2020). Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic nutraceuticals: Strategies for improving their formulation, stability, functionality and bioavailability. *Food Science and Biotechnology*, 29(2), 149–168. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00731-4>
- Demetzos, C. (2016). *Pharmaceutical Nanotechnology: Fundamentals and Practical Applications*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0791-0>
- Fisher, R. (2012). Panagiotou, T. and R.J. Fisher, "Improving Product Quality with Entrapped Stable Emulsions: From Theory to Industrial Application", *Challenges*, Vol. 3, pp 1-39, (2012).
- Foo, K. S., Bavoh, C. B., Lal, B., & Mohd Shariff, A. (2020). Rheology Impact of Various Hydrophilic-Hydrophobic Balance (HLB) Index Non-Ionic Surfactants on Cyclopentane Hydrates. *Molecules*, 25(16), 3725. <https://doi.org/10.3390/molecules25163725>
- Gadhve, A. (2014). *Determination of Hydrophilic-Lipophilic Balance Value*. 3(4), 3.
- Gharibzahedi, S. M. T., & Jafari, S. M. (2018). Fabrication of Nanoemulsions by Ultrasonication. In *Nanoemulsions* (pp. 233–285). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00009-6>
- Huang, K.-F., Hsu, Y.-C., Lin, C.-N., Tzeng, J.-I., Chen, Y.-W., & Wang, J.-J. (2004). Shiunko Promotes Epithelization of Wounded Skin. *The American Journal of Chinese Medicine*, 32(03), 389–396. <https://doi.org/10.1142/S0192415X04002041>

- Jintapattanakit, A. (2018). Preparation of nanoemulsions by phase inversion temperature (PIT). *Pharmaceutical Sciences Asia*, 42(1), 1–12. <https://doi.org/10.29090/psa.2018.01.001>
- K., S., & Kumar, A. (2022). Nanoemulsions: Techniques for the preparation and the recent advances in their food applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 76, 102914. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102914>
- Klang, V., & Valenta, C. (2011). Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), 55–76. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50006-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50006-1)
- Kralchevsky, P. A., Danov, K. D., & Denkov, N. D. (2009). *7 Chemical Physics of Colloid Systems and Interfaces*. 181.
- Luykx, D. M. A. M., Peters, R. J. B., van Ruth, S. M., & Bouwmeester, H. (2008). A Review of Analytical Methods for the Identification and Characterization of Nano Delivery Systems in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8231–8247. <https://doi.org/10.1021/jf8013926>
- Maali, A., & Mosavian, M. T. H. (2013). Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000-2010). *Journal of Dispersion Science and Technology*, 34(1), 92–105. Scopus. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.648498>
- Mahdi Jafari, S., He, Y., & Bhandari, B. (2006). Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 475–485. <https://doi.org/10.1080/10942910600596464>
- Marzuki, N. H. C., Wahab, R. A., & Hamid, M. A. (2019). An overview of nanoemulsion: Concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1), 779–797. Scopus. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1620124>
- McClements, D. J. (2004). Food Emulsions. *Contemporary Food Science*, 113.

- McClements, D. J. (2007). Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649.
<https://doi.org/10.1080/10408390701289292>
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719–1729. Scopus. <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>
- McClements, D. J., & Jafari, S. M. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 251, 55–79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.001>
- Nanoemulsions Market*. (2020). <https://www.reportsanddata.com/report-detail/nanoemulsions-market>
- Nour, A. H. (2018). *Emulsion Types, Stability Mechanisms and Rheology: A Review* (SSRN Scholarly Paper No. 3324905). Social Science Research Network.
<https://papers.ssrn.com/abstract=3324905>
- Pandey, V., Shukla, R., Garg, A., Kori, M. L., & Rai, G. (2020). Nanoemulsion in cosmetic: From laboratory to market. In *Nanocosmetics* (pp. 327–347). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822286-7.00021-8>
- Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., Couladouros, E. A., Hepworth, D., & Nicolaou, K. C. (1999). The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 31.
- Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., Samanidou, V. F., & Papadoyannis, I. N. (2006). Recent advances in chemistry, biology and biotechnology of Alkannins and Shikonins. *Current Organic Chemistry*, 10(16), 2123–2142. Scopus.
<https://doi.org/10.2174/138527206778742704>

- Qadir, A., Faiyazuddin, M. D., Talib Hussain, M. D., Alshammari, T. M., & Shakeel, F. (2016a). Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. *Journal of Molecular Liquids*, 214, 7–18.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.050>
- Qadir, A., Faiyazuddin, M. D., Talib Hussain, M. D., Alshammari, T. M., & Shakeel, F. (2016b). Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. *Journal of Molecular Liquids*, 214, 7–18.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.050>
- Rai, V. K., Mishra, N., Yadav, K. S., & Yadav, N. P. (2018). Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *Journal of Controlled Release*, 270, 203–225.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.049>
- Safaya, M., & Rotliwala, Y. C. (2020). Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. *Materials Today: Proceedings*, 27, 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.267>
- Sharif, A. A. M., Astaraki, A. M., Azar, P. A., Khorrami, S. A., & Moradi, S. (2012). The effect of NaCl and Na₂SO₄ concentration in aqueous phase on the phase inversion temperature O/W nanoemulsions. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(1), 41–44.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.07.021>
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 252, 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>

- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(3), 102–110.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>
- Sonneville-Aubrun, O., Yukuyama, M. N., & Pizzino, A. (2018). Application of Nanoemulsions in Cosmetics. In *Nanoemulsions* (pp. 435–475). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00014-X>
- Tadros. (2013). Emulsion Formation, Stability, and Rheology. In Tadros (Ed.), *Emulsion Formation and Stability* (1st ed., pp. 1–75). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527647941.ch1>
- Tadros, Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 303–318.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
- Taha, A., Ahmed, E., Ismaiel, A., Ashokkumar, M., Xu, X., Pan, S., & Hu, H. (2020). Ultrasonic emulsification: An overview on the preparation of different emulsifiers-stabilized emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 105.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.024>
- Wilson, R. J., Li, Y., Yang, G., & Zhao, C.-X. (2022). Nanoemulsions for drug delivery. *Particuology*, 64, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2021.05.009>
- Βραγοτέρης, Ε. (2013). *Παρασκευή και χαρακτηρισμός γαλακτωμάτων και νανογαλακτωμάτων με ελαιώδες εκχύλισμα ριζών *Alkanna tinctoria**. ΑΠΘ, Διπλωματική εργασία.
- Κοντογιαννόπουλος. (2011). *Τεχνολογία δευτερογενών μεταβολιτών: Σχεδιασμός, ανάπτυξη και φαρμακολογική αξιολόγηση καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς και αποδέσμευσης αλκαννινών/σικονινών*. Διδακτορική εργασία.

Κυριάκου, Γ. (2016). *Ανάπτυξη μεθόδου αέριας χρωματογραφίας μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (GC-SPME) για τον προσδιορισμό πτητικών οξεών σε φυσικά προϊόντα και σκευάσματα.*

Παπαβδής, Θ. (2014). *Μικρογαλακτώματα παρασκευή και μελέτη φυσικών ιδιοτήτων.* Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Διπλωματική εργασία.