



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών

Διπλωματική Εργασία

Μελέτη εγκλεισμού του εκχυλίσματος πρόπολης σε
β-κυκλοδεξτρίνη και λιποσώματα

Σιδέρη Ιωάννα Ελένη

Επιβλέπων :

Αν. Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

Φεβρουάριος 2019

Πρόλογος και ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ε.Μ.Π Δρ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019.

Η ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας αποτελεί το επιστέγασμα του 5ετούς κύκλου σπουδών μου και οφείλω να ομολογήσω πως ήταν η πιο δημιουργική περίοδος κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου. Ως εκ τούτου, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους, των οποίων η συμβολή υπήρξε σημαντική σε αυτή μου τη προσπάθεια.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αν. Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση, που μου έδωσε την ευκαιρία να καταπιαστώ με ένα τέτοιο θέμα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις κατευθυντήριες συμβουλές και όλη την επιστημονική υποστήριξη που αφειδώς μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην Επίκουρη Καθηγήτρια Ε.Μ.Π Σταματίνα Βουγιούκα και στον Επίκουρο Καθηγητή Άγγελο Τσακανίκα, για την συμμετοχή τους στη τριμελή εξεταστική επιτροπή και για τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης οφείλω στην υποψήφια διδάκτωρ του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ελένη Καβέτσου για την ανιδιοτελή βοήθεια και όλες τις υποδείξεις, που με τις γνώσεις και την εμπειρία της με καθοδήγησε όλους αυτούς τους μήνες καθώς και για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Ευχαριστώ επίσης, την υποψήφια διδάκτωρ του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ιωάννα Πιττερού για την απεριόριστη βοήθεια και προθυμία της να αντιμετωπίσουμε όποιο πρόβλημα και αν προέκυψε μέσα από μια άψογη συνεργασία.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. για το αρμονικό και πάντα ευχάριστο κλίμα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους συνοδοιπόρους μου σε αυτό το ταξίδι. Παναγιώτη, Ευαγγελία, Κωνσταντίνα, σας ευχαριστώ για όλα, για της αναρίθμητες φορές που με στηρίζατε και την έμπρακτη αγάπη σας όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στην μητέρα μου Καίτη και τον πατέρα μου Βαγγέλη που μου έδωσαν όλα τα εφόδια και καλλιέργησαν μέσα μου την αγάπη για τη γνώση, μαζί με την αδερφή μου Μαρία που στηρίζουν αδιάκοπα κάθε μου επιλογή μέχρι και σήμερα.

Γιανναλένα Σιδέρη,

11 Φεβρουαρίου 2019

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια τα προϊόντα μέλισσας έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τις ενδιαφέρουσες εφαρμογές τους στον τομέα της υγείας. Εντούτοις ένα προϊόν ξεχωρίζει και αυτό είναι η πρόπολη η οποία συγκαταλέγεται στα «θαύματα» της φύσης. Είναι μία ουσία υψηλής πολυπλοκότητας, πλούσια σε φλαβονοειδή, κινναμικά οξέα και εστέρες ικανή να χαρίσει ανοσία σε πολλές παθήσεις.

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι μία οικογένεια κυκλικών ολιγοσακχαριτών αποτελούμενες από επαναλαμβανόμενα μόρια α-D-γλυκοπυρανόζης. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των κυκλοδεξτρινών είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με ένα ευρύ φάσμα στερεών, υγρών και αερίων ενώσεων.

Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά κυστίδια, αποτελούμενα από λιπιδικά αμφίφιλα, συνήθως φωσφολιπίδια, τα οποία οργανώνονται στο νερό σχηματίζοντας υδατικούς πυρήνες περιβαλλόμενους από διπλοστοιβάδες λιπιδίων. Αυτή η μοναδική δομή, επιτρέπει στα λιποσώματα να εγκλείουν τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα μόρια. Λόγω των ιδιοτήτων τους, είναι σε θέση να επηρεάζουν και να ενισχύουν τις βιολογικές ιδιότητες των εγκλειόμενων μορίων, να αυξάνουν τη διαλυτότητά τους και να βελτιώνουν τη βιοδιθεσιμότητα τους ενισχύοντας τη φαρμακοκινητική σταθερότητα τους τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση πρόπολης υποβοηθούμενη από υπερήχους σε διαλύτη EtOH-H₂O και στη συνέχεια ο εγκλεισμός του εκχυλίσματος της πρόπολης (ΕΠ) σε β-CD και λιποσώματα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εγκλεισμοί: i) παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού του ΕΠ σε β-CD με τη μέθοδο συν-καταβύθισης (IC), ii) εγκλεισμός του ΕΠ σε λιποσώματα σχηματιζόμενα από φωσφατιδυλοχολίνη (PC), (PP) και iii) εγκλεισμός του ΕΠ σε λιποσώματα PC με χρήση χοληστερόλης (CHOL) ως σταθεροποιητικό μέσο (PPC).

Προκειμένου να αυξηθεί ο χρόνος απελευθέρωσης και η ικανότητα των νανοσωματιδίων να διαπερνούν τη στιβάδα του δέρματος πραγματοποιήθηκε η παρασκευή διπλών συστημάτων που αποτελούνται από λιποσώματα και σύμπλοκα εγκλεισμού β-CD-ΕΠ ή/και με ΕΠ: i) εγκλεισμός συμπλόκου β-CD-πρόπολης σε λιποσώματα με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού υμενίου (LCP), εγκλεισμός του ΕΠ και συμπλόκου β-CD-πρόπολης σε λιποσώματα με τη μέθοδο έγχυσης αιθανόλης (DLL) και ο εγκλεισμός συμπλόκου β-CD-πρόπολης σε λιποσώματα για τη δημιουργία αιθοσωμάτων με την ψυχρή μέθοδο (ETH).

Τα σύμπλοκα εγκλεισμού και οι διάφοροι τύποι λιποσωμάτων χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος και το ζ-δυναμικό μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), δομικά μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR και τις Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), και θερμικά μέσω της Διαφορικής θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC). Η μορφολογία τους μελετήθηκε μέσω της Μικροσκοπίας Ηλεκτρονικής Σάρωσης (SEM). Από τις διάφορες μεθόδους χαρακτηρισμού προέκυψε η επιτυχής παρασκευή των συμπλόκων εγκλεισμού και

των διαφορετικών τύπων λιποσωμάτων με εγκλεισμένο το εκχύλισμα της πρόπολης. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή (β-CD) και φιλοξενούμενου μορίου (στη συγκεκριμένη περίπτωση μίγματος μορίων, ΕΠ), όπως και στους διαφόρους τύπους λιποσωμάτων αποδείχθηκαν από τις παραπάνω αναλύσεις.

Όλοι οι τύποι εγκλεισμού χαρακτηρίστηκαν από ικανοποιητική σταθερότητα σε εναιώρημα, καλή διασπορά μεγέθους και παρουσίασαν μέγεθος της τάξεως της νανοκλίμακας.

Η εφαρμογή των λιποσωμάτων με εγκλεισμένα βιοδραστικά εκχυλίσματα που προορίζεται για διαδερμική χορήγηση αποτελεί μία από τις πιο σύγχρονες προσεγγίσεις στον τομέα της Ιατρικής αλλά και της Κοσμετολογίας. Ακολουθώντας αυτή την προσέγγιση πραγματοποιήθηκε η ενσωμάτωση των λιποσωμάτων με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά σε καλλυντική κρέμα, προκειμένου να αξιοποιηθούν οι ευεργετικές ιδιότητες του εκχυλίσματος.

Λέξεις κλειδιά: πρόπολη, εγκλεισμός, β-κυκλοδεξτρίνη, λιποσώματα, αιθοσώματα

Abstract

In recent years bee products have stimulated the interest of the scientific community for their interesting applications in the health sector. Nonetheless one product stands out, and this is propolis, which is called one of nature's "wonders". It is a substance of high complexity, rich in flavonoids cinnamic acids and esters capable of giving immunity to many diseases.

Cyclodextrins are a family of cyclic oligosaccharides composed of repeating α -D-glucopyranose molecules. The most important feature of cyclodextrins is their ability to form inclusion complexes with a wide range of solid, liquid and gaseous compounds.

Liposomes are spherical vesicles comprised of lipid amphiphiles, usually phospholipids, which are organized into water to form aqueous cores surrounded by lipid bilayers. This unique structure allows liposomes to incorporate both hydrophilic and lipophilic molecules. Because of their properties, they are able to influence and enhance the yield of encapsulated molecules, increase their solubility and improve bioavailability by enhancing pharmacokinetic stability both *in vitro* and *in vivo*.

In the context of this thesis, the ultrasound-assisted propolis extraction was carried out in EtOH-H₂O solvent and the inclusion of propolis extract (PE) in β -cyclodextrin and liposomes was performed. In particular, the following inclusions were created: i) preparation of encapsulation complexes of PE in β -CD by the co-precipitation method (IC), ii) encapsulation of the PE in liposomes formed by phosphatidylcholine (PC), (PP) and iii) encapsulation of PE in liposomes formed by PC using cholesterol (CHOL) as stabilizer (PPC).

In order to increase the release time and the ability of the nanoparticles to penetrate the skin layer, the preparation of double systems consisting of liposomes and inclusion complexes was carried out with the following inclusions: i) encapsulation of β -CD-propolis complex in liposomes by the thin film method (LCP), encapsulation of PE and β -CD-propolis complex into liposomes by the ethanol injection method (DLL) and encapsulation of β -CD-propolis complex in liposomes to create ETH.

Different liposomes formations and inclusion complexes were characterized by their size and z-potential by Dynamic Light Scattering (DLS), structurally via FT-IR spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR) spectroscopy, and thermally by Differential Calorimetry Scanning (DSC). Their morphology was studied through the Electronic Scanning Microscope (SEM). From the various characterization methods, the

successful preparation of the inclusion complexes and the different types of liposomes with encapsulated propolis extract resulted. The interactions between host (β -CD) and hosted molecule (PE), as well as the different types of liposomes, were demonstrated by the above analyzes.

All types of encapsulation were characterized by satisfactory stability in suspension, good size dispersion and presented nanoscale size.

The application of liposomes with encapsulated bioactive extracts for transdermal administration is one of the most modern approaches in the field of Medicine and Cosmetology. Following this approach, the incorporation of liposomes with optimal characteristics into cosmetic cream was performed in order to exploit the beneficial properties of the extract.

Key words: propolis, encapsulation, β -cyclodextrin, liposomes, ethosomes.

Περιεχόμενα

Πρόλογος και ευχαριστίες	
Περίληψη.....	1
Abstract	3
1 Θεωρητικό Μέρος.....	10
1.1 Πρόπολη.....	10
1.2 Κυκλοδεξτρίνες	18
1.3 Λιποσώματα	28
1.4 Αιθωσώματα.....	36
2 Πειραματικό Μέρος.....	47
2.1 Σκοπός.....	47
2.2 Όργανα & συσκευές.....	48
2.3 Υλικά.....	48
2.4 Κατεργασία πρόπολης.....	49
2.5 Διεργασία εκχύλισης πρόπολης.....	49
2.6 Μελέτη εκχύλισης πρόπολης.....	50
2.7 Παρασκευή Συμπλόκων εγκλεισμού β-CD-πρόπολης (IC).....	51
2.8 Εγκλεισμός πρόπολης σε λιποσώματα (PP,PPC)	51
2.9 Εγκλεισμός IC προς το σχηματισμό διαφορετικών τύπων λιποσωμάτων	52
2.10 Δημιουργία κρέμας με περιεκτικότητα DLL λιποσωμάτων	53
2.11 Χαρακτηρισμός συμπλόκων εγκλεισμού και λιποσωμάτων.....	55
3 Αποτελέσματα-Σχολιασμοί.....	59
3.1 Υπολογισμός απόδοσης διεργασίας εκχύλισης	59
3.2 Μέγεθος, κατανομή μεγέθους και ζ-δυναμικό (DLS)	60
3.3 Μελέτη δομής συμπλόκων μέσω φασματομετρίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	66
3.4 Μελέτη δομής συμπλόκων εγκλεισμού και λιποσωμάτων μέσω Υπέρυθρης φασματομετρίας (FT-IR).....	68
3.5 Θερμική ανάλυση Διαφορικής Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) και Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA) (IC,LCP,DLL & ETH).....	74
3.6 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)	77

4	Συμπεράσματα	80
5	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	82
6	Βιβλιογραφία	83
7	Παράρτημα εικόνων	90

Κατάλογος Σχημάτων:

Σχήμα 1: Αριστερά, Μέλισσα συλλέγει πρόπολη από πολικό ανθό. Δεξιά, Μέλισσα συλλέγει πρόπολη από <i>Baccharis</i>	11
Σχήμα 2: Αριστερά, Καφέ πρόπολη όπως λαμβάνεται από τον παραγωγό. Δεξιά, Καφέ πρόπολη μετά από κατεργασία αύξησης επιφάνειας	13
Σχήμα 3: Ευεργετικές ιδιότητες της πρόπολης.....	14
Σχήμα 4: Θεραπεία πρόπολης σε βαθύ τραύμα.....	18
Σχήμα 5: Χημική δομή της β-Κυκλοδεξτρίνης	20
Σχήμα 6: Σχηματική παράσταση της διάταξης των φωσφολιπιδίων (φωσφατιδυλοχολίνη), της δομής των διπλοστιβάδων και του σχηματισμού των λιποσωμάτων	29
Σχήμα 7: Σχηματική παράσταση τομής ενός πολυστιβαδικού λιποσώματος	29
Σχήμα 8: Διάκριση των λιποσωμάτων ανάλογα με το μέγεθος τους και το πλήθος των διπλοστιβάδων τους	30
Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση του μορίου της χοληστερόλης και διευθέτησή του στην φωσφολιπιδική.....	32
Σχήμα 10: Διάταξη των μορίων της χοληστερόλης στην στοιβάδα των λιποσωμάτων	32
Σχήμα 11: Απλός εγκλεισμός λιποσώματος (αριστερά), διπλός εγκλεισμός λιποσώματος (δεξιά).....	33
Σχήμα 12: Διπλά φορτωμένα λιποσώματα-ελεύθερη μορφή στη διπλοστιβάδα και εγκλεισμένη μορφή στο εσωτερικό-(αριστερά), Διπλά εγκλεισμένη δραστικής ουσίας -στην εσωτερική κοιλότητα-(Δεξιά).....	35
Σχήμα 13: Τρεις τύποι αιθοσωμικών συστημάτων, ταξινομημένων ανάλογα τις συνθέσεις τους.	39
Σχήμα 14:Προτεινόμενος μηχανισμός διείσδυσης μορίων από αιθοσωμικό σύστημα μέσω του δέρματος.	42
Σχήμα 15: Μηχανισμός διείσδυσης αιθοσωμικού συστήματος παράδοσης δραστικής ουσίας	43
Σχήμα 16: Κοκκοποιημένη πρόπολη προς διάλυση	49
Σχήμα 17: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος ETH	64
Σχήμα 18: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος DLL μετά από φύλαξη 8 εβδομάδων στους 4 °C	65
Σχήμα 19: Φάσμα ¹ H NMR του συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνη-πρόπολη	66
Σχήμα 20: Φάσμα ¹ H NMR β-CD	67
Σχήμα 21: Φάσμα FT-IR πρόπολης.....	68
Σχήμα 22: Φάσμα FT-IR β-CD.....	69
Σχήμα 23: Φάσμα FT-IR PC	69
Σχήμα 24: Συγκριτικά τα φάσματα FT-IR a)πρόπολης, b)PPC,c) PP.....	70
Σχήμα 25: Συγκριτικά τα φάσματα FT-IR a)πρόπολης, b)β-CD,c) ICs	71
Σχήμα 26: Συγκριτικά τα φάσματα FT-IR a) ICs, b) PC, c) LCP	72
Σχήμα 27: Συγκριτικά τα φάσματα FT-IR a) πρόπολης, b) ICs, c) DLL.....	73
Σχήμα 28: Συγκριτικά τα φάσματα FT-IR a) ICs, b) PC, c) ETH.....	74

Σχήμα 29: Συνολικό διάγραμμα DSC των DDL (μπλε χρώμα), ETH (πράσινο χρώμα), LCP (κόκκινο χρώμα), β-CD-ΕΠ (μαύρο χρώμα) & PC (μοβ χρώμα).....	75
Σχήμα 30: Διάγραμμα TGA των λιποσωμάτων LCP	76
Σχήμα 31: SEM των συμπλόκων β-CD-ΕΠ σε μεγέθυνση (a) x1000, (b) x1500, (c) x2500 και (d) x3000	77
Σχήμα 32: SEM των ETH σε μεγέθυνση (a) x1000, (b) x1500, (c) x2500 και (d) x3000.....	78
Σχήμα 33: SEM των LCP σε μεγέθυνση (a) x1000, (b) x1500, (c) x2500 και (d) x3000	78
Σχήμα 34: SEM των DLL σε μεγέθυνση (a) x1000, (b) x1500, (c) x2500 και (d) x3000.....	79
Σχήμα 35: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος PP	90
Σχήμα 36: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος PPC.....	90
Σχήμα 37: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος LCP.....	90
Σχήμα 38: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος LCP μετά το πέρας 2 μηνών	91
Σχήμα 39: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος ETH μετά το πέρας 2 μηνών.....	91
Σχήμα 40: Κατανομή ζ-δυναμικού του συμπλόκου β-CD-ΕΠ.....	91
Σχήμα 41: Κατανομή ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων DLL.....	92
Σχήμα 42: Κατανομή ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων ETH.....	92
Σχήμα 43: Κατανομή ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων LCP	92
Σχήμα 44: Φάσμα FT-IR φυσικού μίγματος β-CD, PC.....	93
Σχήμα 45: Φάσμα FT-IR φυσικού μίγματος β-CD-ΕΠ	93
Σχήμα 46: Φάσμα FT-IR φυσικού μίγματος ΕΠ, PC.....	93
Σχήμα 47: Διάγραμμα TGA του συμπλόκου β-CD-ΕΠ.....	94
Σχήμα 48: Διάγραμμα TGA των λιποσωμάτων ETH.....	94
Σχήμα 49: Διάγραμμα TGA των λιποσωμάτων DLL.....	94
Σχήμα 50: Διάγραμμα DSC β-CD	95

Κατάλογος Πινάκων:

Πίνακας 1. Γεωγραφική προέλευση, κύριες πηγές φυτών και χημικά στοιχεία.....	12
Πίνακας 2. Διαφορετικοί διαλύτες για την εκχύλιση της πρόπολης.....	13
Πίνακας 3. Ιδιότητες Κυκλοδεξτρινών	19
Πίνακας 4. Εκχύλιση πρόπολης υποβοηθούμενη από υπερήχους.....	50
Πίνακας 5. Εκχύλιση πρόπολης υπό μαγνητική ανάδευση.....	50
Πίνακας 6 Δραστικές ουσίες και φάσεις καλλυντικής κρέμας.....	54
Πίνακας 7. Πειραματικά δεδομένα νανοσωματιδίων στο σύστημα SOP.	56
Πίνακας 8. Πειραματικές συνθήκες ανάλυσης DSC	57
Πίνακας 9. Πειραματικές συνθήκες ανάλυσης TGA	58
Πίνακας 10. Απόδοση διεργασίας για την εκχύλιση πρόπολης με χρήση υπερήχων	59
Πίνακας 11 Απόδοση διεργασίας για την εκχύλιση πρόπολης με χρήση μαγνητικής ανάδευσης	59
Πίνακας 12 Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού συμπλόκων εγκλεισμού β-CD-πρόπολης.....	60

Πίνακας 13 Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού PPC & PP	62
Πίνακας 14 Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού LCP,DLL & ETH.....	63
Πίνακας 15 Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού μορίων διπλού εγκλεισμού μετά από φύλαξη 8 εβδομάδων στους 4 °C	65
Πίνακας 16. Διαφορά χημικών μετατοπίσεων (ppm) β-CD σε ελεύθερη μορφή και στο σύμπλοκο β-CD-πρόπολης	67

1 Θεωρητικό Μέρος

1.1 Πρόπολη

1.1.1 Εισαγωγή

Η πρόπολη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τις τελευταίες δεκαετίες λόγω των πολλών βιολογικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων, όπως ανοσορρυθμιστικό, αντινεοπλασματικό, αντιμικροβιακό, αντιφλεγμονώδες και αντιοξειδωτικό μεταξύ άλλων (Bankova et al., 2000). Εκτός αυτού, τα προϊόντα που περιέχουν πρόπολη έχουν προωθηθεί έντονα από τη φαρμακευτική βιομηχανία και τα καταστήματα υγιεινής διατροφής (Bankova et al., 2000).

Έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για την πρόπολη. Η χρήση της πηγαίνει πίσω στους αρχαίους χρόνους, τουλάχιστον μέχρι το 300 π.Χ. όπου χρησιμοποιούταν ως δημοφιλές φάρμακο σε πολλά μέρη του κόσμου. Αιγύπτιοι, Έλληνες και Ρωμαίοι ανέφεραν τη χρήση πρόπολης για το θεραπευτικό της εύρος. Κύρια ιδιότητα είναι ο αντιφλεγμονώδης παράγοντας και η θεραπεία πληγών και ελκών. Ωστόσο, η χρήση της συνεχίζεται και σήμερα σε θεραπείες και καλλυντικά προϊόντα με μία συνεχή αύξηση των διαφορετικών παρασκευασμάτων και των εφαρμογών της.

Ετυμολογικά, η ελληνική λέξη πρόπολη προέρχεται από το συνθετικό προ-, για ή σε άμυνα, και πόλης, δηλαδή 'άμυνα της κυψέλης'. Οι μέλισσες τη χρησιμοποιούν ώστε να σφραγίσουν οπές και ανοίγματα στις κηρήθρες, να εξομαλύνουν τα εσωτερικά τοιχώματα όπως καθώς και για τη κάλυψη των εισβολέων που πέθαναν μέσα στη κυψέλη προκειμένου να αποφευχθεί η αποσύνθεσή τους. Η πρόπολης προστατεύει επίσης την αποικία από ασθένειες λόγω της αντισηπτικής αποτελεσματικότητας και των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων της.

1.1.2 Μέθοδοι συλλογής πρόπολης

Οι μέλισσες συγκεντρώνουν ρητινώδη εκκρίματα που προέρχονται κυρίως από ανθούς, αλλά και από φύλλα, κλαδιά και φλοιούς. Πρόσφατα, το θέμα αυτό, ιδίως ο ρόλος της πρόπολης στην υγεία των μελισσών, έχει αναθεωρηθεί.

Η πρόπολη συγκεντρώνεται κυρίως από τις μέλισσες *Apis mellifica*. Η *A. mellifica Caucasica* είναι πιο εργατική από όλες τις φυλές της *A. mellifica*. Οι ασιατικές μέλισσες *Apis florea* και *Apis cerana* δεν συλλέγουν πρόπολη. Τα τροπικά είδη μέλισσας χωρίς κεντρί συλλέγουν επίσης πρόπολη και το ενσωματώνουν σε κερί. Σε εύκρατες ζώνες η πρόπολη συγκεντρώνεται στα τέλη του καλοκαιριού και το φθινόπωρο, όταν οι μέλισσες προετοιμάζονται για το χειμώνα (Wyatt & Meyer, 1956) (Morse 1975). Σύμφωνα με αυτούς τους ερευνητές, λίγες μόνο από τις μέλισσες εργάτες, ηλικίας άνω των 15 ημερών, ειδικεύονται στην προμήθεια τροφής από πρόπολη. Οι μέλισσες συγκεντρώνουν την πρόπολη κατά τη ζεστή ώρα της ημέρας από τον ανθό και την τραβούν έξω, όταν η κόλλα είναι μαλακή. Η πρόπολη μεταφέρεται στην κυψέλη κατά τον ίδιο τρόπο με τη γύρη με τη μορφή φορτίου, το οποίο περιέχει επίσης προϊόντα έκκρισης από τον αδένα της κάτω γνάθου. Ένας φορτωτής συγκεντρώνει στην κυψέλη περίπου

10 mg πρόπολης ανά πτήση. Αν υποθεθεί ότι μια μέση αποικία μελισσών συγκεντρώνει περίπου 100 γραμμάρια πρόπολης ετησίως, τότε χρειάζονται περίπου 100,000 πτήσεις αναζήτησης τροφής για το σκοπό αυτό. Κατά μέσο όρο, μια αποικία συγκεντρώνει περίπου 50-150 γρ. πρόπολης ετησίως, αλλά οι ειδικοί της πρόπολης, οι μέλισσες του Καυκάσου μπορούν να συγκεντρώνουν 250 έως 1000 γρ. πρόπολης ανά έτος.



Σχήμα 1: Αριστερά, Μέλισσα συλλέγει πρόπολη από πολικό ανθό. Δεξιά, Μέλισσα συλλέγει πρόπολη από *Baccharis*

Μετά τη χορήγηση σε ανθρώπους, η πρόπολη δεν φαίνεται να έχει παρενέργειες (Kaneeda and Nishina, 1994; Sforcin et al., 1995, 2002b; Jasprica et al., 2007). Σύμφωνα με τον Burdock (1998) η πρόπολη είναι μη τοξική και πρότεινε ότι η ασφαλή συγκέντρωση για τον άνθρωπο θα μπορούσε να είναι 1.4 mg/kg ή περίπου 70 mg/day.

1.1.3 Τεχνικές σύνθεσης πρόπολης

Η πρόπολη αποτελείται κυρίως από φυτικές ρητίνες και εκκρίματα που συγκεντρώνουν οι μέλισσες, οι οποίες προσθέτουν κεριά, μερικές εκκρίσεις και γύρη σε αυτό το μίγμα. Η σύνθεση της πρόπολης εξαρτάται από τη βοτανική της και επομένως από τη γεωγραφική της προέλευση. Αρκετές εκατοντάδες διαφορετικές ενώσεις έχουν χαρακτηριστεί στους διαφορετικούς τύπους πρόπολης. Για παράδειγμα, τα τυπικά συστατικά της λευκής πρόπολης είναι τα φαινολικά: φλαβονοειδή αγλυκόνια (φλαβόνες και φλαβανόνες), φαινολικά οξέα και εστέρες τους, ως πτητικά. Οι τυπικές ενώσεις της βραζιλιάνικης πρόπολης είναι προνυλιωμένα παράγωγα του ρ-κουμαρικού οξέος και της ακετοφαινόνης, καθώς και διτερπένια και λιγνάνες.

Η πρόπολης είναι λιποφιλική στη φύση, σκληρό και δυσπροσάρμοστο υλικό και μετατρέπεται σε μαλακό, εύπλαστο και κολλώδες όταν θερμανθεί. Κατέχει μία χαρακτηριστική και ευχάριστη οσμή και διαφέρει ως προς το χρώμα σε κίτρινο, πράσινο, κόκκινο και σκούρο καφέ ανάλογα την ηλικία της. Γενικά, η σύσταση μίας ακατέργαστης πρόπολης είναι 50% ρητίνη, 30% κεριά, 10% αιθέρια έλαια, 5% γύρη και 5% διάφορες οργανικές ενώσεις. Περισσότερες από 300 συστατικά έχουν χαρακτηριστεί προερχόμενα από διαφορετικά δείγματα.

Πίνακας 1. Γεωγραφική προέλευση, κύριες πηγές φυτών και χημικά στοιχεία

Propolis type	Geographic Origin	Plant Source	Main bioactive Compound
Poplar	Europe, North America and nontropic regions of Africa	Populus spp, most often P.nigra L.	Flavones, flavanones, cinnamic acids and their esters
Green	Brazil	Baccharis spp., predominantly B. dracunculifolia	Prenylated p-coumaric acids, diterpenic acids
Birch	Russia	Betula verrucosa Ehrh	Flavones and flavanols (not the same as in Poplar type)
Red	Cuba, Venezuela	Dalbergia spp.	Isoflavonoids (isoflavones, pterocarpanes)
Mediterranean	Sicily, Greece, Crete, Malta	Cupressaceae (species unidentified)	Polyprenylated benzophenones
Clusia	Canary Islands	Clusia spp.	Furofuran lignans
Pacific	Pacific region (Okinawa, Taiwan)	Macaranga tanarius	C-prenyl-flavanones

1.1.4 Εκχυλίσματα πρόπολης

Πολλές αναλυτικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό τον διαχωρισμό και χαρακτηρισμό των ουσιών ομαδοποιημένων χημικά όμοιων μορίων όπως, βενζοϊκά οξείδια, και παράγωγα, κινναμικό αλκοόλη, κινναμικό οξύ και τα παράγωγά, σεσκιτερπενικές αλκοόλες, αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, ορυκτές στερόλες, και στεροειδής υδρογονάνθρακες, σάκχαρα και αμινοξέα. Όπως είναι αναμενόμενο, πτητικές ουσίες που προέρχονται από τα φυτά, παρουσιάζονται σε μικρές συγκεντρώσεις.

Η χρήση διαφορετικών διαλυτών επιφέρει αλλαγή στη δραστηριότητα στη βασική ενεργή ουσία που εμπεριέχει. Η πρόπολη, κυρίως λόγω της ρητινώδους φύσης της τείνει να είναι αδιάλυτη στην πλειοψηφία των άπολων ή πολικών διαλυτών. Συνεπώς η αξιοποίησή της στη μη-επεξεργασμένη μορφή της είναι δύσκολη. Η ερευνητική κοινότητα στρέφει το ενδιαφέρον της στη βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης της πρόπολης, ώστε να μπορέσει να απομονώσει και να αξιοποιήσει όσο τον δυνατόν μεγαλύτερο μέρος των βιοδραστικών συστατικών της. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα εκχυλίσματα της πρόπολης έχουν ως διαλύτη, αιθανόλη, μεθανόλη, νερό ή μίγματά τους. Ωστόσο βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί και εκχύλιση με χλωριωμένους διαλύτες υπό ειδικές συνθήκες, προκειμένου να ευνοείται η απομόνωση συγκεκριμένων συστατικών (Negri et al., 2003).

Από τα εκχυλίσματα αυτά, ανάλογα τα συστατικά που έχουν απομονωθεί, βρίσκουν πλήθος εφαρμογών. Παρακάτω παρουσιάζονται οι βιοδραστικές ενώσεις που εκχυλίζονται ανάλογα με τη εκάστοτε χρήση του ανάλογου διαλύτη.

Πίνακας 2. Διαφορετικοί διαλύτες για την εκχύλιση της πρόπολης

Water	Methanol	Ethanol	Chloroform	Dichloromethane	Ether	Acetone
Anthocyanins starches, tannins, saponins, terpenoids, polypeptides, and lectins	Anthocyanins tannins, saponins, terpenoids, xanthoxylane, totarol, quassinoids, lactones, flavones, phenones, polyphenols, polypeptides, and lectins	Tannins, polyphenol, polyacetylenes, terpenoids, sterols and alkaloids	Terpenoids, flavonoids	Terpenoids, tannins, polyphenols, polyacetylenes, sterols, and alkaloids	Alkaloids, terpenoids, coumarins, and fatty acids	Flavonols

1.1.5 Καφέ πρόπολη

Αυτό το είδος πρόπολης αποτελεί τον πιο πολύ-μελετημένο τύπο, τόσο από χημικής όσο και από φαρμακολογικής άποψης. Σε περίπτωση που δείγμα πρόπολης χαρακτηριστεί ως καφέ, τότε ως επί το πλείστον τα κύρια βιοδραστικά συστατικά του είναι γνωστά (Πίνακας 1). Ωστόσο, οποιαδήποτε προσπάθεια για ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό της βιολογικής δράσης έρχεται αντιμέτωπη με το γεγονός ότι πάνω από 25 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν σε αυτό τον τύπο φαίνεται να διαθέτουν διαφορετικό είδος βιολογικής δράσης (Banskota et al., 2001). Στην παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται η μελέτη του εκχυλίσματος καφέ πρόπολης από το νησί της Κιμόλου.

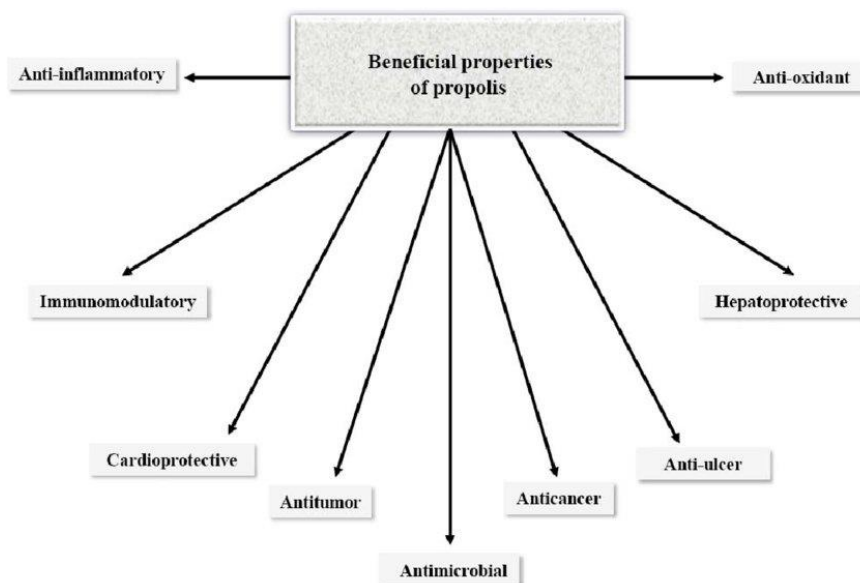


Σχήμα 2: Αριστερά, Καφέ πρόπολη όπως λαμβάνεται από τον παραγωγό. Δεξιά, Καφέ πρόπολη μετά από κατεργασία αύξησης επιφάνειας

1.1.6 Ιδιότητες πρόπολης

Η πρόπολη και ορισμένα από τα συστατικά της έχουν πολλές βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Μόλις τα τελευταία χρόνια δημιουργήθηκε ειδικός κλάδος, γνωστός ως Μελισσοθεραπεία (Apitherapy), αφιερωμένος στη μελέτη των θεραπευτικών αυτών ιδιοτήτων και στις εφαρμογές τους για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής.

Σε γενικές γραμμές, η πρόπολη μπορεί να θεωρηθεί ως μία πολύ σταθερή ουσία όσον αφορά τη μεταβολή των δράσεων της (Meresta, 1997), παρόλα αυτά η σωστή αποθήκευση είναι αναγκαία για τη διατήρηση των βιοδραστικών συστατικών της. Η πρόπολη και τα εκχυλίσματα της πρέπει να φυλάσσονται σε αεροστεγή δοχεία σε σκοτεινό μέρος μακριά από υπερβολική και άμεση ζέση. Σε διάστημα φύλαξης μεγαλύτερων των 12 μηνών η πρόπολη θα χάσει πολύ λίγα ή καθόλου από τις αντιβακτηριακές της δραστηριότητες. Αποδείχθηκε ότι τα εκχυλίσματα αιθανόλης-πρόπολης παρουσίασαν αμετάβλητη αντιμικροβιακή δράση μετά από 15 χρόνια αποθήκευσης (Meresta, 1997).



Σχήμα 3: Ευεργετικές ιδιότητες της πρόπολης

Αντιβακτηριακή δράση της πρόπολης

In vitro δράση της πρόπολης έναντι μεγάλου φάσματος βακτηρίων έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνητών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτέλεσε η μελέτη των Tereza et al., (2010) καθώς υψηλή ευαισθησία παρουσίασαν 75 στελέχη βακτηρίων σε εκχυλίσματα πρόπολης. Δεδομένα προερχόμενα από μελέτες σχετικά με τη δράση αυτή της πρόπολης υποστηρίζουν ότι είναι κυρίως ενάντια των Gram-positive βακτηρίων και παρουσιάζουν ήπια δράση έναντι στα Gram-negative είτε σε μικρό ποσοστό είτε δεν έχουν καμία επίδραση. Μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα διαφορετικά είδη πρόπολης από διαφορετική τοπογραφική προέλευση κατά τα βακτήρια των Σταφυλόκοκκου και E.coli έδειξε ότι όλα τα δείγματα παρουσίασαν σημαντική αντιβακτηριακή δράση τόσο στο σταφυλόκοκκο όσο και έναντι στο βακτήριο E.coli (Valera et al., 2010).

Τα εκχυλίσματα πρόπολης έχει παρατηρηθεί ότι έχουν συνεργιστική επίδραση με ορισμένα

αντιβιοτικά όπως η στρεπτομυκίνη και η οξακυλλίνη ενάντια στον *Staphylococcus aureus* και με αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ενάντια στα μυκοβακτήρια. Η παρουσία της πρόπολης αποτρέπει ή μειώνει οποιαδήποτε βαθμιαία αύξηση της ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων στα αντιβιοτικά. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρόπολης και των αντιμικροβιακών παραγόντων θα μπορούσαν να μειώσουν τις κλινικές συγκεντρώσεις αυτών των φαρμάκων μειώνοντας έτσι την εμφάνιση παρενεργειών. Μπορούν επίσης να συμβάλλουν στον έλεγχο των ανθεκτικών στελεχών και βακτηρίων και να ενδυναμώσουν την αντιβιοτική θεραπεία (Orsi, Fernandes, Bankova, & Sforcin, 2012).

Η διάχυση δισκίου είναι η επικρατέστερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της αντιβακτηριακής δράσης. Η αντιμικροβιακή δράση της πρόπολης οφείλεται στα περιεχόμενα συστατικά της που εξαρτώνται από τη χημική της σύνθεση και μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη περιοχή και την εποχή. Τα κύρια συστατικά τα οποία εκδηλώνουν αυτές τις ιδιότητες είναι τα φλαβονοειδή, οι εστέρες και ορισμένα αρωματικά οξέα. Οι Kedzia et al., (1990), αναφέρουν ότι ο μηχανισμός με τον οποίο εκδηλώνεται η αντιμικροβιακή δράση της πρόπολης είναι περίπλοκος και μπορεί να αποδοθεί στη συνέργεια των υδρόξυ-οξέων των φλαβονοειδών και σεσκιτερπενίων.

Αντιοξειδωτική δράση της πρόπολης

Το δέρμα βρίσκεται σε συνεχή έκθεση στις ελεύθερες ρίζες οι οποίες παράγονται μέσω της εξελικτικής διαδικασία γήρανσης καθώς και μέσω εξωτερικών ερεθισμάτων όπως ιονίζουσας και υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ηλιακή ακτινοβολία σε συνδυασμό με άφθονη παροχή οξυγόνου προκαλεί ανεπιθύμητες και επιβλαβείς επιπτώσεις στο δέρμα κατά του φαινομένου του οξειδωτικού στρες (ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών σε βάρος των δεύτερων), καθιστώντας τα ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα ανεπαρκή.

Λαμβάνοντας υπόψη τις βιολογικές δράσεις της πρόπολης, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της είναι άξια μελέτης καθώς είναι ικανές να προστατεύσουν και να θεραπεύσουν βλάβες που εμφανίζονται στο δέρμα μέσω της επίδρασης των ελευθέρων ριζών (Reactive Oxygen Species, ROS). Η χορήγηση πρόπολης ως συμπλήρωμα διατροφής έχει την ικανότητα να ρυθμίσει τη δράση των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (AOE) και οδηγεί σε μείωση της υπεροξειδωσίας του λίπους στο πλάσμα, το ήπαρ, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο των πειραματόζωων στα οποία χορηγήθηκαν και η επίδραση αυτή είναι δόσο-εξαρτώμενη (Τρουλλίδου Έλενα, 2007).

Τα δείγματα πρόπολης που εκδηλώνουν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, είναι εκείνα που περιέχουν, σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού GC-MS, τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες. Σύμφωνα με τους Ahn et al., (2007) το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση περιέχει αυξημένες συγκεντρώσεις σε καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, και φαιλαιθύλ-εστέρα του καφεϊκού οξέος (CAPE). Η αντιοξειδωτική ικανότητα της πρόπολης μπορεί να προσδιοριστεί και μέσω φασματομετρικών μεθόδων, όπως ο αποχρωματισμός της ρίζας ABTS⁺, καθώς και μέσω του συστήματος β-καροτένιου -λινελαϊκού οξέος, με αποχρωματισμό του β-καροτένιου.

Αντικαρκινική δράση της πρόπολης

Τα φλαβονοειδή που εμπεριέχονται στη πρόπολη, εκδηλώνουν αντικαρκινικές ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* καταπολεμώντας την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων με

διάφορους μηχανισμούς. Η αντινεοπλασματική δράση της πρόπολης σε ζωικά μοντέλα και κυτταρικές καλλιέργειες είναι πιθανό να οφείλεται στην ικανότητά της να αναστέλλει τη σύνθεση του DNA σε ογκολογικά κύτταρα στην ικανότητά της να επάγει απόπτωση και στην ικανότητα ενεργοποίησης των μακροφάγων για την παραγωγή παραγόντων ικανών να ρυθμίζουν τη λειτουργία συγκεκριμένων τύπου κυττάρων (B, T και NK), αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν επίσης ότι τα φλαβονοειδή που περιέχονται στη πρόπολη παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στην τοξικότητα των χημειοθεραπευτικών παραγόντων και / ή την ακτινοβολία σε ποντίκια, δίνοντας την ελπίδα ότι μπορεί να έχουν παρόμοια προστατευτική λειτουργία στους ανθρώπους. Ο συνδυασμός με μια ανοσοενισχυτική αντιοξειδωτική θεραπεία μπορεί να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας βελτιώνοντας τις παρενέργειες των λευκοκυττάρων, του ήπατος και των νεφρών και κατά συνέπεια επιτρέποντας κλιμάκωση της δόσης (Orsolie N., 2010). Παρόλο που πολλές πολυφαινόλες έχουν αντιμεταστατική δράση, το CAPE (λευκή πρόπολη) και η αρτεπιλλίνη C (πρόπολη Baccaris) έχουν αναγνωρισθεί ως οι ισχυρότεροι αντικαρκινικοί παράγοντες (Bankova, 2009). Οι Barlak et al., (2015) διερεύνησαν εάν το προφίλ έκφρασης πρωτεΐνης στις κυτταρικές σειρές PC-3 του καρκίνου του προστάτη μπορούσε να διαφοροποιηθεί όταν επώαστηκε με διμεθυλοσουλφοξείδιο και εκχυλίσματα νερού από την τουρκική πρόπολη. Το διμεθυλοσουλφοξείδιο και τα εκχυλίσματα ύδατος της πρόπολης των 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ βρέθηκαν να μειώνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε 24,5% και 17,7% αντίστοιχα. Το συμπέρασμα ήταν ότι το διμεθυλοσουλφοξείδιο και τα εκχυλίσματα ύδατος της τουρκικής πρόπολης μπορούν να έχουν αντί-πολλαπλασιαστική δράση μέσω της διαμόρφωσης του προφίλ έκφρασης πρωτεΐνης στις κυτταρικές σειρές PC-3 του καρκίνου του προστάτη μαζί με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε η κυτταροτοξική δράση του καφεϊκού οξέος φαινολικού εστέρα σε πολλούς μηχανισμούς (επαγωγή απόπτωσης των αλλοιωμένων κυττάρων, αναστολή του παράγοντα μεταγραφής NF-kB). Πιο συγκεκριμένα, αποκαλύφθηκε η δράση του στην αποκατάσταση της δια κυτταρικής επικοινωνίας δια των χασματοσυνδέσεων (Gap Junctional Intercellular communication/ GJIC), παράγοντας που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την αρχική φάση της καρκινογένεσης. Εντούτοις, η παρουσία του είναι στενά συνδεδεμένη με την καταστολή των καρκινικών φαινοτύπων (Lee et al., 2008).

Τέλος, η πρόπολη βελτιώνει την ποιότητα του αίματος κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Οι επιπτώσεις της χημειοθεραπείας στο αίμα είναι ιδιαίτερες γνωστές με σημαντική μείωση του αριθμού των λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ο συνδυασμός πρόπολης και χημειοθεραπείας οδηγεί σε εντυπωσιακά αποτελέσματα καθώς, παρόλο που ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων συνεχίζει να μειώνεται, ο ρυθμός είναι 50% χαμηλότερος και παράλληλα το επίπεδο των ερυθρών αιμοσφαιρίων επανέρχεται συνήθως στο φυσιολογικό έπειτα οι 35 ημέρες θεραπείας. Συνοπτικά, είναι δυνατό να επιβεβαιωθεί ότι η χρήση της πρόπολης συμβάλει σημαντικά και είναι αναπόσπαστος παράγοντας της πρόληψης και θεραπείας του καρκίνου χωρίς, βέβαια, να καταργείται η κλασική ιατρική (J. C. Ahn et al., 2013).

Αντιμυκητιακή δράση της πρόπολης

Στη δερματολογία και κοσμετολογία, η πρόπολη, εξασφαλίζει την λάμψη και τη στιλπνότητα του δέρματος καθώς αποδεικνύεται αποτελεσματική ενάντια των προσβολών της επιδερμίδας από παθογόνους μύκητες. Ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα με αποτέλεσμα να παράγει μεγαλύτερο αριθμό μακροφάγων, απαραίτητων για την εξολόθρευση των μυκήτων γένους *Candida* και *Microsporum* και των βακτηριών.

Οι Sonmez et al., (2005) μελέτησαν την αντιμυκητιακή δράση σε 5 διαφορετικά δείγματα πρόπολης διαφορετικής προέλευσης όπου και αποδείχθηκε η αποτελεσματικότητά τους ως διαλύματα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις στη παρεμπόδιση της δράσης των *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* και *Candida glabrata*. Τα διαλύματα αυτά δεν προκάλεσαν τοξικότητα, μετά από χορήγησή τους, στους ινοβλάστες της στοματικής κοιλότητας.

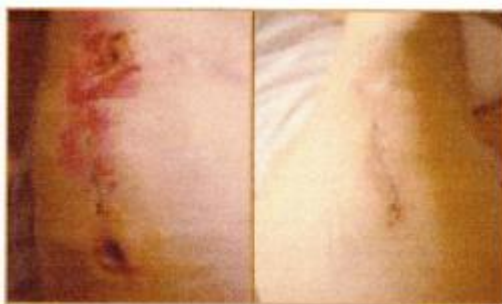
Αναισθητική δράση της πρόπολης

Κατά τη δεκαετία του 1950 αποδείχθηκε μέσω πειραμάτων σε ζώα ότι το εκχύλισμα πρόπολης συμπεριφερόταν ως επιφανειοδραστικό αναισθητικό με μικρή διεισδυτική ισχύ που ήταν ικανό να χρησιμοποιηθεί σε οδοντιατρικές πρακτικές (Prokhorovich & NN, 1957). Οι Paintz και Metzner σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης και κάποιων συστατικών που απομονώθηκαν από αυτήν, δοκιμάστηκαν στον κερατοειδή χιτώνα κουνελιού και ποντικού, έλαβαν ολική αναισθησία τόσο με το εκχύλισμα όσο και με τις ενώσεις 5,7 διυδροξυφλαβάνον (pinocembrin), 5 υδροξυ-7-μεθοξυφλαβάνης (pinostrobin) και με μίγμα εστέρων καφεϊκού οξέος. Κάθε μία από αυτές τις ενώσεις ήταν κατά προσέγγιση 3 φορές ισχυρότερη από το ολικό εκχύλισμα (Paintz & Metzner, 1979).

Η δράση αυτή της πρόπολης προκύπτει λόγω των πτητικών της ελαίων και συστατικών όπως ενδεικτικά η πινοσεμπρίνη, το καφεϊκό οξύ και η πινοστρομίνη.

Επουλωτική δράση της πρόπολης

Σημαντική φαίνεται να είναι η επουλωτική δράση της πρόπολης σε οστά καθώς όπως έδειξαν μελέτες Πολωνών ερευνητών από την ομάδα του Scheller το εκχύλισμα πρόπολης σε αιθανόλη προάγει τις διαδικασίες επούλωσης σε κατεστραμμένο χόνδρο (Scheller S et al., 1977) καθώς επίσης ενισχύει την οστεοποίηση σε τεχνητά ελαττωματικά οστά (Stojko et al., 1978). Οι ιδιότητες αυτές προέρχονται από την περιεκτικότητα σε αιθέρια έλαια και με αυτόν τον τρόπο κατεστραμμένοι ιστοί, μπορούν να επουλωθούν γρηγορότερα. Παράλληλα, λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης, η πρόπολη έχει επίδραση στην αναγέννηση των κατεστραμμένων κυττάρων (Marquele et al., 2006). Η πρόπολη παρεμποδίζει τη σήψη, γεγονός που εξηγεί την ταρίχωση των μικρών εισβολών μετά από κάλυψή τους με αυτήν. Παρακάτω φαίνεται η έντονη επουλωτική και θεραπευτική επίδραση σε δερματοπάθεια μετά από 30 ημέρες νοσηλείας (Dr Franco Feraboli, Cremona Hospital).



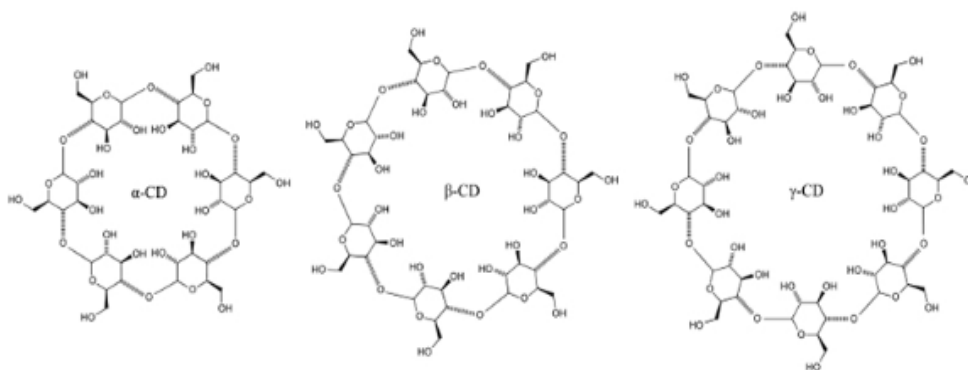
Σχήμα 4: Θεραπεία πρόπολης σε βαθύ τραύμα

1.2 Κυκλοδεξτρίνες

1.2.1 Εισαγωγή

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που σχηματίζονται από ενζυματική κατεργασία του αμύλου. Το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση της κυκλοδεξτρίνης προέρχεται από μικροοργανισμούς ή φυτά και αποικοδομεί το άμυλο με ενδομοριακό σπάσιμο της αλυσίδας. Είναι μη τοξικές και δεν απορροφώνται στην ανώτερη γαστρεντερική οδό καθώς μεταβολίζονται από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου.

Από χημικής άποψης αποτελούν κυκλικά ολιγομερή της γλυκόζης με 6,7 ή 8 μονάδες γλυκόζης και ονομάζονται α-,β- και γ- κυκλοδεξτρίνες αντίστοιχα, συνδεόμενα με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Clarot eta al.,2000). Είναι γνωστές και ως κυκλοαμυλόζες, κυκλομαλτόζες και Schardinger δεξτρίνες και παράγονται ως αποτέλεσμα της ενδομοριακής αντίδρασης τρανσγλυκοζυλίωσης από την αποικοδόμηση του αμύλου από το ένζυμο γλυκαντοτρανσφεράσης κυκλοδεξτρίνης (CGTase).



Εικόνα 1. Δομή α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνης

1.2.2 Ιστορική αναδρομή

Πρωτοανακαλύφθηκαν από τον Franz Villiers (1891), όταν κατά τη μείωση των δεξτρινών ελήφθη μικρή ποσότητα κρυσταλλικού υλικού από τη πέψη του αμύλου *Bacillus amylobacter*, με τη σύνθεση να αντιπροσωπεύεται από ένα πολλαπλάσιο του τύπου $(C_6H_{10}O_3) \cdot H_2O$. Σύμφωνα με τον Villiers πιθανόν χρησιμοποίησε ακάθαρτες καλλιέργειες και οι κυκλοδεξτρίνες παρήχθησαν με μόλυνση από *Bacillus macerans* (Franz. Schardinger, 1905)..

Ο Villiers ονόμασε το κρυσταλλικό του προϊόν "κυτταρίνη". Το 1903, ο Schardinger ήταν σε θέση να απομονώσει δύο κρυσταλλικά προϊόντα, δεξτρίνες Α και Β, οι οποίες περιεγράφηκαν σε σχέση με την έλλειψη μειωτικής ισχύος τους, το βακτηριακό στέλεχος όμως ικανό να παράγει αυτά τα προϊόντα από άμυλο δεν διατηρήθηκε (Schardinger, 1903). Το 1904 ο Schardinger απομόνωσε έναν νέο οργανισμό ικανό να παράγει ακετόνη και αιθυλική αλκοόλη από φυτικά υλικά που περιέχουν ζάχαρη και άμυλο. Το 1911, περιέγραψε ότι αυτό το στέλεχος, που ονομάζεται *Bacillus macerans*, παράγει επίσης μεγάλες ποσότητες κρυσταλλικών δεξτρινών (25-30%) από άμυλο (Schardinger, 1911). Ο Schardinger ονόμασε την κρυσταλλική του κρυσταλλική ρητίνη α' και την κρυσταλλωμένη δεξτρίνη β' και χρειάστηκε έως το 1935 πριν από την απομόνωση της γ' δεξτρίνης.

1.2.3 Δομή κυκλοδεξτρινών

Όπως απαντώνται στη φύση α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνες μαζί με τα υψηλότερα ομόλογά τους σχηματίζουν κολοβωμένα μόρια με κοίλη, κωνική κοιλότητα 7.9 Å βάθους. Ήταν ένα από τα πρώτα μόρια-υποδοχέας του οποίου η ικανότητα δέσμευσης οργανικών μορίων αναγνωρίστηκε και μελετήθηκε από διάφορες πειραματικές τεχνικές. Οι διάμετροι κορυφής και πυθμένα της κοιλότητας των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων κυκλοδεξτρινών είναι 4.7 και 5.3 Å για α-κυκλοδεξτρίνη, 6.0 και 6.5 Å για την β-κυκλοδεξτρίνη και 7.5 και 8.3 Å για την γ-κυκλοδεξτρίνη αντιστοίχως. Διαθέτουν μία υδρόφοβη κεντρική κοιλότητα κατάλληλη για τον εγκλωβισμό διάφορων οργανικών μορίων. Οι βασικές ιδιότητες παρατίθενται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Ιδιότητες Κυκλοδεξτρινών

Ιδιότητα	α-Cyclodextrin	β-Cyclodextrin	γ-Cyclodextrin
Αριθμός μονάδων γλυκοκυρανόζης	6	7	8
Μοριακό Βάρος(g/mol)	972	1135	1297
Διαλυτότητα σε νερό στους 25°C (% w/v)	14.5	1.85	23.2
Εξωτερική διάμετρος (Å)	14.6	15.4	17.5
Διάμετρος κοιλότητας (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Ύψος στροφεία (Å)	7.9	7.9	7.9
Όγκος κοιλότητας(Å ³)	174	262	427

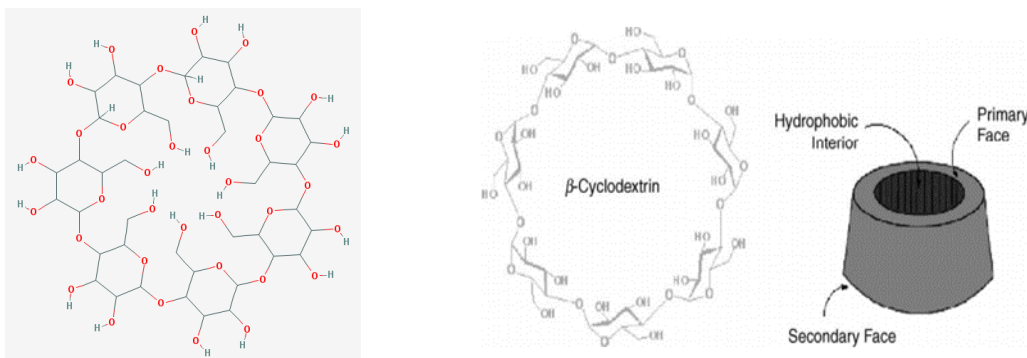
Η εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών είναι υδρόφοβη ενώ η εξωτερική επιφάνεια του μορίου είναι υδρόφιλη (Yuliani et al., 2006). Με αυτήν την ιδιότητα οι κυκλοδεξτρίνες σχηματίζουν με ευκολία σύμπλοκα με μία μεγάλη ποικιλία μορίων καθώς και ιόντα μορίων. Ο

πιο πιθανός τρόπος δέσμευσης περιλαμβάνει την εισαγωγή του λιγότερου πολικού μέρους του επισκεπτόμενου μορίου μέσα στη κοιλότητα, ενώ η πιο πολική -και η πιο φορτισμένη-ομάδα του επισκεπτόμενου μορίου να βρίσκεται εκτεθειμένο στο μεγαλύτερο μέρος του διαλύτη ακριβώς έξω από το ευρύτερο άνοιγμα τη κοιλότητας. Ο εγκλεισμός φιλοξενούμενων μορίων με κυκλοδεξτρίνες σε υδατικά διαλύματα οδηγεί σε ουσιαστική αναδιάταξη και αφαίρεση των μορίων του νερού. Σε αυτή τη διαδικασία προκαλείται επίσης απελευθέρωση μορίων νερού από την κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.

1.2.4 β-Κυκλοδεξτρίνη

Οι κύριες ιδιότητες που τη ξεχωρίζουν από τις υπόλοιπες είναι η μικρότερη ευαισθησία από την α-κυκλοδεξτρίνη μετά από εμβολιασμό, η ευκολότερη δέσμευση της χοληστερόλης, η απορρόφηση πολύ μικρών ποσοτήτων (1-2%) στην ανώτερη εντερική οδό μετά από χορήγηση από το στόμα, ο μη μεταβολισμός στον ανώτερο εντερικό σωλήνα, και η μεταβολισή της από βακτήρια στο τυφλό και στο κόλον. Επί του παρόντος η πιο συνήθης κυκλοδεξτρίνη σε φαρμακευτικές συνθέσεις και, επομένως, πιθανώς η καλύτερα μελετημένη κυκλοδεξτρίνη σε ανθρώπους.

Στη β-κυκλοδεξτρίνη, 21 υδροξυλομάδες μπορούν να τροποποιηθούν υποκαθιστώντας το άτομο υδρογόνου ή την ομάδα υποκατάστασης όπως αλκυλο-, υδροξυαλκυλο-, καρβοξυαλκυλο-, αμινο-, θειο-, τοσυλο-, γλυκοσυλο-, μαλτοσυλο-, αιθέρες, εστέρες, ανυδροδεοξυ-, όξινα, βασικά, κλπ, χιλιάδες. παράγωγα μπορούν να παρασκευαστούν με χημικές ή ενζυμικές αντιδράσεις.



Σχήμα 5: Χημική δομή της β-Κυκλοδεξτρίνης

1.2.5 Παράγωγα κυκλοδεξτρινών

Εκτός από αυτές τις φυσικώς απαντημένες κυκλοδεξτρίνες, πολλά συνθετικά παράγωγα κυκλοδεξτρίνης έχουν συντεθεί. Αυτά τα παράγωγα συνήθως παράγονται με αμινοποιήσεις, εστεροποιήσεις ή αιθεροποιήσεις πρωτοταγών και δευτεροταγών υδροξυλομάδων των κυκλοδεξτρινών. Ανάλογα με τον υποκαταστάτη, η διαλυτότητα των παραγώγων κυκλοδεξτρίνης είναι συνήθως διαφορετική από εκείνη των μητρικών κυκλοδεξτρινών τους. Ουσιαστικά όλα τα παράγωγα έχουν έναν μεταβαλλόμενο όγκο υδρόφοβης κοιλότητας και

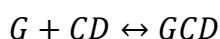
επίσης αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να βελτιώσουν τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα έναντι του φωτός ή του οξυγόνου και να βοηθήσουν στον έλεγχο της χημικής δραστηριότητας των φιλοξενούμενων μορίων.

Ο σκοπός σύνθεσης αυτών των παραγώγων είναι κυρίως η βελτίωση της διαλυτότητας του παραγώγου της κυκλοδεξτρίνης (και των συμπλόκων της), η βελτίωση στη τοποθέτηση και συσχέτιση μεταξύ της κυκλοδεξτρίνης και του μορίου ξενιστή, με παράλληλη σταθεροποίηση του δεύτερου, μειώνοντας την αντιδραστικότητα και την κινητικότητά του. Παράλληλα, είναι εφικτός ο σχηματισμός αδιάλυτων ακινητοποιημένων δομών που περιέχουν κυκλοδεξτρίνη και πολυμερή.

1.2.6 Μέθοδος σχηματισμού

Ο εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνη είναι ένα στοιχειομετρικό μοριακό φαινόμενο στο οποίο συνήθως μόνο ένα φιλοξενούμενο μόριο αλληλεπιδρά με την κοιλότητα του μορίου κυκλοδεξτρίνης για να παγιδευτεί. Γενικά, ένα μόριο προσκεκλημένου περιλαμβάνεται σε ένα μόριο κυκλοδεξτρίνης, αν και στην περίπτωση ορισμένων μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, περισσότερα από ένα μόρια προσκεκλημένων μπορούν να εισχωρήσουν στην κοιλότητα και στην περίπτωση μερικών μορίων υψηλού μοριακού βάρους, περισσότερα από ένα μόρια κυκλοδεξτρίνης μπορεί να δεσμεύσουν τον επισκέπτη. Κατ' αρχήν, μόνο ένα μέρος του μορίου πρέπει να ταιριάζει στην κοιλότητα για να σχηματίσει ένα σύμπλεγμα. Ως αποτέλεσμα, οι γραμμομοριακές αναλογίες ενός προς ένα δεν επιτυγχάνονται πάντοτε, ειδικά σε άτομα με υψηλό ή χαμηλό μοριακό βάρος.

Η ισορροπία σχηματισμού μεταξύ κυκλοδεξτρίνης και φιλοξενούμενου μορίου μπορεί να περιγραφεί από τη χημική εξίσωση:



με την σταθερά σχηματισμού συμπλόκου να περιγράφεται ως εξής:

$$K_c = \frac{[GCD]}{[G][CD]} \quad (\text{Εξ. 1})$$

Όπου:

G : Το «φιλοξενούμενο» μόριο

CD : Το μόριο «ξενιστής», κυκλοδεξτρίνη

GCD : Το σύμπλοκο εγκλεισμού

K_c : Η σταθερά ισορροπίας.

Οι παράγοντες που εμπλέκονται στη δέσμευση είναι κατά κύριο λόγο van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, μολονότι η δέσμευση υδρογόνου έχει μεγάλη βαρύτητα. Οι

θερμοδυναμικές ποσότητες που αποκτήθηκαν με τον εγκλεισμό από τις κυκλοδεξτρίνες είναι συνέπεια των σταθμισμένων συνεισφορών αυτών των αλληλεπιδράσεων.

Οι αντιδράσεις συμπλοκοποίησης που περιλαμβάνουν κυκλοδεξτρίνες είναι πολύ σημαντικές για την επιστήμη της Ιατρικής και συγκεκριμένα για την τεχνολογία συστημάτων χορήγησης φαρμάκων καθώς και στις βιομηχανίες διαχωρισμού τροφίμων. Αυτές οι αντιδράσεις χρησιμεύουν επίσης ως εξαιρετικά μοντέλα για την κατανόηση των γενικών φαινομένων εγκλεισμού όπως και για αλληλεπιδράσεις ενζύμου-υποστρώματος.

Διάφορες κατηγορίες των ενώσεων που μπορούν να συμπεριληφθούν σε φυσικές α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνες έχουν υποβληθεί σε συστηματικές θερμοδυναμικές μελέτες, οι οποίες καλύπτουν σχεδόν κάθε κατηγορία ενώσεων όπως υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, παράγωγα κυκλοεξανίου, αμινοξέα, αρχικά πεπτίδια, σάκχαρα φαινόλες, αρωματικές αμίνες, παράγωγα ναφθαλινίου και άλλες αρωματικές ενώσεις. Ωστόσο, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός συστηματικών θερμοδυναμικών μελετών που χρησιμοποιούν τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες έχει μελετηθεί.

Ενώ το ύψος της κοιλότητας κυκλοδεξτρίνης είναι το ίδιο και για τους τρεις τύπους, ο αριθμός των μονάδων γλυκόζης καθορίζει την εσωτερική διάμετρο της κοιλότητας και τον όγκο της. Με βάση αυτές τις διαστάσεις, η α-κυκλοδεξτρίνη μπορεί τυπικά να συμπλέξει μόρια χαμηλού μοριακού βάρους ή ενώσεις με αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες, η β-κυκλοδεξτρίνη θα σχηματίζει σύμπλοκο αρωματικών και ετεροκυκλικών ενώ η γ-κυκλοδεξτρίνη μπορεί να φιλοξενήσει μεγαλύτερα μόρια όπως μακροκυκλικά και στεροειδή.

Γενικά, υπάρχουν τέσσερις ενεργειακά ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις που συμβάλλουν στην μετατόπιση της ισορροπίας ώστε να σχηματιστεί το σύμπλεγμα εγκλεισμού:

1. Η μετατόπιση των πολικών μορίων ύδατος από την αποστειρωμένη κοιλότητα κυκλοδεξτρίνης.
2. Ο αυξημένος αριθμός δεσμών υδρογόνου που σχηματίζεται καθώς το εκτοπισμένο νερό επιστρέφει στην μεγαλύτερη δεξαμενή.
3. Μείωση των απωθητικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υδρόφοβου ξενιστή και του υδατικού περιβάλλοντος.
4. Μία αύξηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων καθώς το φιλοξενούμενο μόριο εισέρχεται στην αποφρακτική κοιλότητα κυκλοδεξτρίνης

1.2.7 Δυναμική διαλύματος

Στην κρυσταλλική μορφή, μόνο τα επιφανειακά μόρια του κρυστάλλου κυκλοδεξτρίνης είναι διαθέσιμα για συμπλοκοποίηση. Σε διάλυμα, κυκλοφορούν περισσότερα μόρια κυκλοδεξτρίνης. Η θέρμανση αυξάνει τη διαλυτότητα της κυκλοδεξτρίνης καθώς και εκείνη του επισκέπτη και αυτό αυξάνει την πιθανότητα σχηματισμού συμπλόκου. Η συμπλοκοποίηση συμβαίνει ταχύτερα όταν η φιλοξενούμενη ένωση είναι είτε σε διαλυτή μορφή είτε σε διασκορπισμένα λεπτά σωματίδια.

Επιδράσεις θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία επηρεάζει το σύστημα συμπλοκών κυκλοδεξτρίνης με ποικίλους τρόπους. Η θέρμανση μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητα του συμπλόκου, αλλά ταυτόχρονα αποσταθεροποιεί το σύμπλοκο. Αυτές οι επιπτώσεις συχνά πρέπει να είναι ισορροπημένες.

Καθώς η θερμική σταθερότητα του συγκροτήματος ποικίλλει από μόρια ξενιστές σε φιλοξενούμενα μόρια, τα περισσότερα σύμπλοκα αρχίζουν να αποσυντίθενται στους 50-60 ° C, ενώ μερικά συγκροτήματα είναι σταθερά σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ειδικά αν ο επισκέπτης συνδέεται ισχυρά ή το σύμπλοκο είναι εξαιρετικά αδιάλυτο.

Χρήση διαλυτών

Το νερό είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος διαλύτης στον οποίο διεξάγονται αντιδράσεις συμπλοκοποίησης. Όσο πιο διαλυτή είναι η κυκλοδεξτρίνη στον διαλύτη, τόσο περισσότερα μόρια καθίστανται διαθέσιμα για συμπλοκοποίηση. Ο το φιλοξενούμενο μόριο πρέπει να είναι σε θέση να εκτοπίσει τον διαλύτη από την κοιλότητα κυκλοδεξτρίνης εάν ο διαλύτης σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την κυκλοδεξτρίνη. Το νερό, για παράδειγμα, μετατοπίζεται πολύ εύκολα. Ο διαλύτης πρέπει να απομακρύνεται εύκολα εάν είναι επιθυμητά σύμπλοκα χωρίς διαλύτες. Στην περίπτωση φιλοξενουμένων πολλών συστατικών, ένα από τα συστατικά μέρη μπορεί να λειτουργήσει ως διαλύτης και να συμπεριληφθεί ως επισκέπτης.

Όλοι τα φιλοξενούμενα μόρια δεν διαλυτοποιούνται εύκολα στο νερό, καθιστώντας τη συμπλοκοποίηση πολύ αργή ή αδύνατη. Σε τέτοιες περιπτώσεις, είναι επιθυμητή η χρήση οργανικού διαλύτη για τη διάλυση του επισκέπτη. Ο διαλύτης δεν θα πρέπει να είναι πολύπλοκος με την κυκλοδεξτρίνη και να απομακρύνεται εύκολα με εξάτμιση. Η αιθανόλη και ο διαιθυλαιθέρας είναι καλά παραδείγματα τέτοιων διαλυτών.

Επιδράσεις του νερού

Καθώς αυξάνεται η ποσότητα του νερού, η διαλυτότητα τόσο της κυκλοδεξτρίνης όσο και του προσκεκλημένου αυξάνεται έτσι ώστε ο εγκλεισμός να εμφανίζεται πιο εύκολα. Ωστόσο, καθώς η ποσότητα του νερού αυξάνεται περαιτέρω, η κυκλοδεξτρίνη και το φιλοξενούμενος μόριο μπορεί να είναι τόσο αραιωμένα ώστε να μην έρχονται σε επαφή τόσο εύκολα όπως σε ένα πιο συμπυκνωμένο διάλυμα. Ως εκ τούτου, είναι επιθυμητό να διατηρηθεί η ποσότητα του νερού αρκετά χαμηλή για να εξασφαλιστεί ότι ο εγκλεισμός λαμβάνει χώρα με έναν αρκετά γρήγορο ρυθμό.

Ορισμένες ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους, όπως τα έλαια, έχουν την τάση να συσχετίζονται με τον εαυτό τους παρά να αλληλοεπιδρούν με την κυκλοδεξτρίνη. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η χρήση περισσότερων υδάτων που συνδυάζονται με καλή ανάμειξη θα επιτρέψει καλύτερη διασπορά και διαχωρισμό ή απομόνωση των μορίων του ελαίου μεταξύ τους. Όταν τα μόρια ελαίου έλθουν σε επαφή με την κυκλοδεξτρίνη, σχηματίζουν ένα πιο σταθερό σύμπλεγμα από ό, τι εάν έμεναν λιγότερο νερό.

1.2.8 Τεχνικές συμπλοκοποίησης

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι-τεχνικές σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού, εξαρτώμενη από τη φύση της χρησιμοποιούμενης κυκλοδεξτρίνης και τις ιδιότητες της ουσίας που εγκλείεται.

Η τεχνική που χρησιμοποιείται μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα και αποδοτικότητα του συμπλόκου. Παρακάτω αναφέρονται επιλεκτικά μερικές από τις πιο βασικές τεχνικές.

Συν-καταβύθιση (co-precipitation)

Αυτή η μέθοδος είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος στο εργαστήριο. Η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται σε διάλυμα νερό-αιθανόλη 2:1 και ο επισκέπτης προστίθεται ενώ αναδεύεται το διάλυμα κυκλοδεξτρίνης. Η συγκέντρωση της β-κυκλοδεξτρίνης μπορεί να είναι τόσο υψηλή όσο περίπου 20% εάν ο επισκέπτης μπορεί να ανεχθεί υψηλότερες θερμοκρασίες. Εάν επιλεχθεί επαρκώς υψηλή συγκέντρωση, η διαλυτότητα του συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης-φιλοξενούμενου θα ξεπεραστεί καθώς η αντίδραση συμπλοκοποίησης προχωρά ή εφαρμόζεται ως ψύξη. Σε πολλές περιπτώσεις, το διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης και του προσκεκλημένου πρέπει να ψύχεται ενώ αναδεύεται πριν σχηματιστεί ένα ίζημα.

Το ίζημα μπορεί να συλλεχθεί με απόχυση, φυγοκέντρηση ή διήθηση. Στη συνέχεια ξεπλένεται με μια μικρή ποσότητα νερού ή άλλου αναμίξιμου με το νερό διαλύτη όπως αιθυλική αλκοόλη, μεθανόλη ή ακετόνη. Η έκπλυση διαλυτών μπορεί να είναι επιζήμια με ορισμένα σύμπλοκα, επομένως πρέπει να εξεταστεί πριν από την κλιμάκωση.

Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου έγκειται στην κλιμάκωση. Λόγω της περιορισμένης διαλυτότητας της κυκλοδεξτρίνης, πρέπει να χρησιμοποιηθούν μεγάλες ποσότητες νερού. Η χωρητικότητα των δεξαμενών, ο χρόνος και η ενέργεια για θέρμανση και ψύξη μπορεί να αποτελέσουν σημαντικούς παράγοντες κόστους. Η επεξεργασία και η απόρριψη του μητρικού υγρού που λαμβάνεται μετά τη συλλογή του συμπλόκου μπορεί επίσης να αποτελεί ανησυχία. Αυτό μπορεί να μειωθεί σε πολλές περιπτώσεις με την ανακύκλωση του μητρικού υγρού. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι τα μη ιονικά επιφανειοδραστικά μειώνουν την συμπλοκοποίηση της κυκλοδεξτρίνης με τη διαζεπάμη και τα συντηρητικά να μειώνουν τη συμπλοκοποίηση των διαφόρων στεροειδών με κυκλοδεξτρίνη. Από την άλλη πλευρά, τα πρόσθετα όπως η αιθανόλη μπορούν να προωθήσουν το σχηματισμό συμπλόκου στη στερεά ή ημιστερεά κατάσταση. Τα μη ιονισμένα φάρμακα συνήθως σχηματίζουν ένα περισσότερο σταθερό σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης από ότι τα ιοντικά αντίστοιχά τους και επομένως η αποτελεσματικότητα συμπλοκοποίησης βασικών φαρμάκων μπορεί να ενισχυθεί με την προσθήκη αμμωνίας στο υδατικό μέσο συμπλοκοποίησης. Για παράδειγμα, η διαλυτοποίηση της παγκρεστατίνης με υδροξυπροπυλ-κυκλοδεξτρίνες βελτιστοποιήθηκε κατά την προσθήκη υδροξειδίου του αμμωνίου.

Λυοφιλοποίηση (Freeze drying)

Η μέθοδος αυτή οδηγεί σε πολύ υψηλές αποδόσεις σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού και είναι κατάλληλη και για διεργασίες μεγάλης κλίμακας. Αποτελεί μία από τις πιο κατάλληλες μεθόδους αφυδάτωσης σχεδόν όλων των θερμο-ευαίσθητων υλικών και αρωμάτων, λόγω των χαμηλότερων θερμοκρασιών λειτουργίας, του αργού ρυθμού ξήρανσης και της χρήσης κενού. Το προς εγκλεισμό μόριο διαλύεται σε νερό παρουσία αμμωνίας, όπου αυτή κρίνεται απαραίτητη. Στην συνέχεια γίνεται η προσθήκη της κυκλοδεξτρίνης στο διάλυμα σε κατάλληλη αναλογία και αναδεύεται μέχρι τη πλήρη διαλυτοποίησή της. Το διάλυμα

λυοφιλοποιείται και στη περίπτωση που τα λυοφιλοποιημένα σωματίδια χρειστεί, ξεπλένονται με διαιθυλαιθέρα και το υπόλειμμα ξηραίνεται υπό κενό. Η διεργασία αυτή οδηγεί στον σχηματισμό συμπλόκων που έχουν πορώδη δομή (Shahgaldian & Piele, 2006).

Μέθοδος ζύμωσης (Kneading Method)

Η προς εγκλεισμό ένωση βρίσκεται σε υγρή κατάσταση ή διαλυμένη σε κάποιο διάλυμα όπου και προστίθεται σε ένα πολύ κυκλοδεξτρίνης και ζυμώνεται προσεκτικά μέσα σε γουδί, προκειμένου να σχηματιστεί μία πάστα, η οποία εν συνέχεια θα ξηραθεί. Το ανακτώμενο στερεό ξεπλένεται με ορισμένη ποσότητα διαλύτη με σκοπό την απομάκρυνση της απορροφούμενης μη-συμπλοκοποιημένης ένωσης από το σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Έπειτα, το στερεό επαναξηραίνεται υπό κενό. Αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για δυσδιάλυτα στο νερό μόρια, καθώς με το σχηματισμό των ενώσεων εγκλεισμού εξασφαλίζεται η αργή διάλυσή τους. Αποδίδει υψηλές αποδόσεις και αποτελεί τη πιο κοινή και απλή μέθοδο παρασκευής συμπλόκων εγκλεισμού με πολύ χαμηλό κόστος (Saravana et al., 2013)

1.2.9 Απελευθέρωση

Μόλις σχηματιστεί και ξηραθεί ένα σύμπλεγμα, είναι πολύ σταθερό, παρουσιάζοντας μεγάλη διάρκεια αποθήκευσης σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος υπό ξηρές συνθήκες. Η μετατόπιση του επισκέπτη από άλλο επισκέπτη απαιτεί θέρμανση. Σε πολλές περιπτώσεις, το νερό μπορεί να αντικαταστήσει τον επισκέπτη. Έτσι, η απελευθέρωση του εγκλεισμένου μορίου πραγματοποιείται όταν το σύμπλοκο τοποθετείται σε περίσσεια νερού, με αντιστροφή της θερμοδυναμικής ισορροπίας (Kant et al., 2004).

Όταν ένα συγκρότημα τοποθετείται στο νερό, δύο βήματα εμπλέκονται στην απελευθέρωση του συμπλέγματος επισκέπτη. Πρώτον, το σύμπλοκο διαλύεται. Το δεύτερο βήμα είναι η απελευθέρωση του εγκλωβισμένου επισκέπτη όταν μετατοπίζεται από μόρια νερού. Θα επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης κυκλοδεξτρίνης, του φιλοξενούμενου, του διαλυμένου και αδιάλυτου συμπλόκου.

Στην περίπτωση συμπλοκών που περιέχουν πολλαπλές συνιστώσες επισκέπτη ή τύπους κυκλοδεξτρίνης, τα φιλοξενούμενα μόρια δεν απελευθερώνονται απαραίτητως στην ίδια αναλογία όπως στο αρχικό μίγμα επισκεπτών. Κάθε συγκρότημα φιλοξενούμενων μπορεί να έχει διαφορετική διαλυτότητα και ρυθμό απελευθέρωσης από το σύμπλεγμα. Εάν οι ρυθμοί απελευθέρωσης είναι διαφορετικοί για κάθε συστατικό, είναι δυνατόν να επιτευχθεί ένα προτεινόμενο σχέδιο απελευθέρωσης με μεταβολή της φόρμουλας φιλοξενίας.

1.2.10 Εφαρμογές Κυκλοδεξτρινών

Δεδομένου ότι κάθε φιλοξενούμενο μόριο περιβάλλεται χωριστά από μία κυκλοδεξτρίνη (παράγωγο) το μόριο είναι εγκλεισμένο από μικροσκοπική άποψη. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε πλεονεκτικές αλλαγές στις χημικές και φυσικές ιδιότητες των φιλοξενούμενων μορίων. Παρακάτω αναφέρονται κάποιες ιδιότητες από πρόσφατες ερευνητικές μελέτες.

Πιθανή χρήση κυκλοδεξτρινών σε σύνθεση πεπτιδίων και πρωτεϊνών

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την εξάλειψη ανεπιθύμητων ιδιοτήτων των πεπτιδίων και των πρωτεϊνικών φαρμάκων όπως η χημική και ενζυματική αστάθεια, κακή μεταφορά μέσω

βιολογικών μεμβρανών, ταχεία κάθαρση πλάσματος, ανοσογονικότητα, κλπ. Οι κυκλοδεξτρίνες φαίνεται να είναι μία ελκυστική εναλλακτική λύση σε αυτές τις προσεγγίσεις (Brewster et al., 1991; Irie & Uekama, 1999). Οι υδρόφιλες κυκλοδεξτρίνες βελτιώνουν τη ρινική και υποδόρια βιοδιαθεσιμότητα των πεπτιδικών και πολυπεπτιδικών φαρμάκων, λόγω της ενισχυμένης μεμβράνης, της διείσδυσης και ενζυμικής σταθεροποίησης. Οι διακλαδισμένες β-κυκλοδεξτρίνες είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές στην αναστολή της συσσωμάτωσης πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνικών φαρμάκων όπως η ινσουλίνη και ανασυνδυασμένη ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (rhGH).

Παράδοση φαρμάκων σε συγκεκριμένο όργανο

Ένα σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης βρίσκεται σε ισορροπία με τα φιλοξενούμενα μόρια σε υδατικό διάλυμα, με το βαθμό της διάστασης να καθορίζεται από το μέγεθος της σταθερότητας συνεχούς συστήματος. Αυτή η ιδιότητα είναι επιθυμητή επειδή στις κατάλληλες συνθήκες το σύμπλοκο μπορεί να διαχωριστεί σε κυκλοδεξτρίνη και ελεύθερη μορφή του φαρμάκου στο σημείο απορρόφησης με αποτέλεσμα μόνο το φάρμακο σε ελεύθερη μορφή να εισέρχεται στη συστηματική κυκλοφορία (Stella & Rajewski, 1997).

Εφαρμογές σε γονιδιακές θεραπείες

Η γνώση της μοριακής και γενετικής βάσης πολλών ασθενειών έχει αυξηθεί και δημιούργησε μία μοναδική ευκαιρία για τη θεραπεία τους. Το γονίδιο, το αντιπληροφοριακό ολιγονουκλεοτίδιο (ODN) και οι μικρές επεμβάσεις RNA (siRNA) επιχειρούν να διορθώσουν την παθοβιολογική διαδικασία είτε διορθώνοντας είτε αναστέλλοντας τις παρεκκλίνουσες κυτταρικές λειτουργίες στο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Δεδομένου ότι το DNA, τα αντινοσηματικά ODNs και το siRNA είναι υδατοδιαλυτά και ευαίσθητα σε νουκλεάσες, επιχειρήθηκαν διάφορες στρατηγικές για την επίτευξη αποτελεσματικής παροχής αυτών των λειτουργικών νουκλεϊνικών οξέων. Η ανάπτυξη μη ιογενών φορέων, που έχουν πολύ μεγαλύτερη ικανότητα μεταμόσχευσης, έχει προχωρήσει. Μέχρι σήμερα, αρκετές στρατηγικές για την ενίσχυση της γονιδιακής έκφρασης των μη ιικών φορέων έχουν αναπτυχθεί, όπως για παράδειγμα, η εφαρμογή βοηθητικών και ευαίσθητων στο pH λιπιδίων, πεπτιδίων που προκαλούν διάσπαση σε ενδοσώματα, πυρηνικών πρωτεϊνών και σημάτων πυρηνικής εντοπισμού (Pouton & Seymour, 2001). Πρόσφατα, τα σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών έχουν εφαρμοστεί στη μεταφορά γονιδίων. Croyle et al. ανέφερε ότι το τα κατιονικά β-κυκλοδεξτρίνης ενήργησαν ως υικά διασπαρτικά, με αποτέλεσμα την αύξηση της αδενοϊκής μεταγωγής σε κύτταρα Caco-2 (Pouton et al., 2001). Ως εκ τούτου, η κυκλοδεξτρίνη μπορεί να βελτιώσει τη δραστηριότητα μεταφοράς γονιδίων του ιού και του ιού φορείς.

Αξιοποιώντας την ικανότητα ένταξής τους, η χρήση και εφαρμογή των κυκλοδεξτρινών τις καθιστούν κατάλληλες για εφαρμογές στην αναλυτική χημεία, στη γεωργία, στον φαρμακευτικό τομέα και στα είδη τροφίμων.

Εφαρμογές κυκλοδεξτρινών στη κοσμετολογία

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται στον τομέα των καλλυντικών για τη διαλυτοποίηση αρωμάτων και την καταστολή πτητικότητας τους. Χρησιμοποιούνται επίσης ως σταθεροποιητές, γαλακτωματοποιητές και αποσμητικά, σε αρώματα και κρέμες μακρίας

διαρκειας. Ιδιαίτερα σημαντική είναι επίσης η χρήση των κυκλοδεξτρινών σε αντηλιακές κρέμες. Με τον εγκλεισμό των φίλτρων UV, επιτυγχάνεται ελεγχόμενη αποδέσμευσή τους. Επιπλέον, η κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης περιορίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ των φίλτρων UV και του δέρματος, μειώνοντας τυχόν παρενέργειες που μπορεί να επιφέρει το σκεύασμα (Bilensoy, 2011).

1.2.11 Εφαρμογές κυκλοδεξτρινών στη βιομηχανία τροφίμων

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων για να σταθεροποιήσουν ή να προσδώσουν γεύση καθώς και για απομάκρυνση δυσάρεστων οσμών και γεύσεων. Παράλληλα η χρήση κυκλοδεξτρινών μπορεί να προσδώσει και άλλες ιδιότητες όπως αντιοξειδωτική, σταθεροποιητική και βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα. Πολλές βιταμίνες, λιπαρά οξέα, χρωστικές ουσίες και διάφορες άλλες φυσιολογικά δραστικές ουσίες είναι ασταθείς και καταστρέφονται εύκολα με θερμότητα, φως ή οξέα και δεν απορροφώνται αποτελεσματικά στον οργανισμό. Με τη προσθήκη τέτοιων φυσιολογικών δραστικών συμπληρωμάτων, η τεχνολογία συμπερίληψης κυκλοδεξτρίνης μπορεί να είναι ιδανική για τη χρησιμοποίηση για την επίλυση διαφόρων προβλημάτων όπως δυσάρεστη γεύση, δυσάρεστη οσμή, αστάθεια, χαμηλό ποσοστό απορρόφησης και χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Δεδομένου ότι οι βιταμίνες είναι ασταθείς και εύκολα καταστρεφόμενες, είναι απαραίτητο να σχεδιαστεί ένα σκεύασμα που θα τους σταθεροποιήσει. Μια αποτελεσματική μέθοδος επίτευξης αυτού είναι η χρήση διαφόρων συμπλεγμάτων κυκλοδεξτρίνης. Συγκεκριμένα, η γ-κυκλοδεξτρίνη γίνεται δημοφιλής για τους σκοπούς της παρασκευής λιποδιαλυτών βιταμινών διαλυτών στο νερό, κωνιοποίησης τους, ή τη σταθεροποίησή τους και την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους (Astray et al., 2009).

Εφαρμογές κυκλοδεξτρινών στη φαρμακοβιομηχανία

Οι κυκλοδεξτρίνες, εφαρμόζονται ευρέως σε φαρμακευτικές συνθέσεις για την ενίσχυση της διαλυτότητας, της σταθερότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των μορίων του φαρμάκου (Duchene & Editor, 1991). Ωστόσο, οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες έχουν σχετικά χαμηλή διαλυτότητα, τόσο σε νερό όσο και σε οργανικούς διαλύτες, γεγονός που περιορίζει τις χρήσεις τους σε φαρμακευτικές συνθέσεις. Διάφορα είδη παραγώγων αυτών όπως υδρόφιλα, υδρόφοβα και ιοντικά παράγωγα έχουν αναπτυχθεί για να επεκτείνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες και την ικανότητα συμπερίληψης φυσικών κυκλοδεξτρινών (Kim et al., 1995). Είναι εφαρμόσιμοι ως λειτουργικοί φορείς φαρμάκων για τον έλεγχο της κατανομής του ρυθμού και/ή του χρόνου απελευθέρωσης φαρμάκου (Uekama, 1999). Οι υδροφιλικές κυκλοδεξτρίνες μπορούν να τροποποιήσουν το ρυθμό απελευθέρωσης ελαφρώς υδατοδιαλυτών φαρμάκων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση της απορρόφησης φαρμάκων σε βιολογικά εμπόδια, χρησιμεύοντας ως ισχυροί φορείς φαρμάκων σε συνταγοποιήσεις άμεσης έκλυσης. Άμορφες κυκλοδεξτρίνες όπως υδροξυαλκυλιωμένες-β-κυκλοδεξτρίνες είναι χρήσιμες για την παρεμπόδιση των πολυμορφικών μεταβάσεων και των ποσοστών κρυσταλλώσεως των φαρμάκων που δεν είναι επαρκώς υδατοδιαλυτά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, τα οποία συνεπώς διατηρούν υψηλότερα χαρακτηριστικά διαλυτοποίησης και από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων. Από την άλλη πλευρά, οι υδρόφοβες

κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμεύσουν ως φορείς παρατεταμένης απελευθέρωσης για υδατοδιαλυτά φάρμακα συμπεριλαμβανομένων πεπτιδίων και πρωτεϊνικών φαρμάκων.

Συνοπτικά παρουσιάζονται τα βασικά πλεονεκτήματα χρήσης κυκλοδεξτρινών:

- Σταθεροποίηση ευαίσθητων σε φως ή οξυγόνο ουσιών
- Τροποποίηση της χημικής αντιδραστικότητας των φιλοξενούμενων μορίων
- Στερέωση πολύ πτητικών ουσιών
- Βελτίωση της διαλυτότητας των ουσιών
- Τροποποίηση υγρών ουσιών σε σκόνες
- Προστασία από την υποβάθμιση των ουσιών από μικροοργανισμούς
- Περιορισμό άσχημης οσμής και γεύσης
- Δέσμευση Χρωστικών ουσιών ή το χρώμα των ουσιών
- Καταλυτική δραστηριότητα κυκλοδεξτρινών με φιλοξενούμενα μόρια

1.3 Λιποσώματα

1.3.1 Εισαγωγή

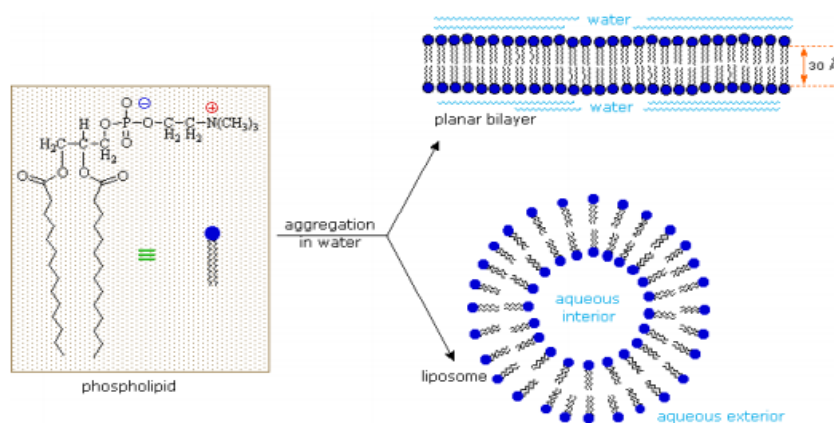
Τα λιποσώματα είναι κολλοειδή σωματίδια σφαιρικού σχήματος αποτελούμενα από μια μεμβράνη λιπιδικής διπλοστιβάδας. Μόρια φωσφολιπιδίων εγκλείουν στο εσωτερικό ένα μέρος από την υδατινή φάση στην οποία τα λιποσώματα διασπείρονται. Επειδή τα λιπίδια είναι αμφιπαθή μόρια (υδρόφοβο και λιπόφιλο τμήμα), σε ένα υδατινό περιβάλλον, επιδιώκουν η εντροπία του συστήματος να είναι η μικρότερη δυνατή, απομονώνοντας τις υδρόφοβες περιοχές σε σφαιρικές διπλοστιβάδες. Αυτές οι στοιβάδες αναφέρονται ως lamellae. Οι ιδιότητες των λιποσωμάτων πρώτα έχουν περιγραφεί το 1965 από τους Bangham, Standish, & Watkins .

Βρίσκονται στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος, ως φορείς φαρμάκων και βιολογικά δραστικών ουσιών καθώς και για τη βελτίωση της απόδοσής τους στους οργανισμούς. Μελετώνται για την απόδοση βιολογικά δραστικών ουσιών οι οποίες παρουσιάζουν αδυναμία να επιτύχουν την επιθυμητή συγκέντρωση σε συγκεκριμένη περιοχή, έχουν υψηλή κυτταροτοξικότητα και εμφανίζουν προβλήματα που σχετίζονται με τη χορήγησή τους.

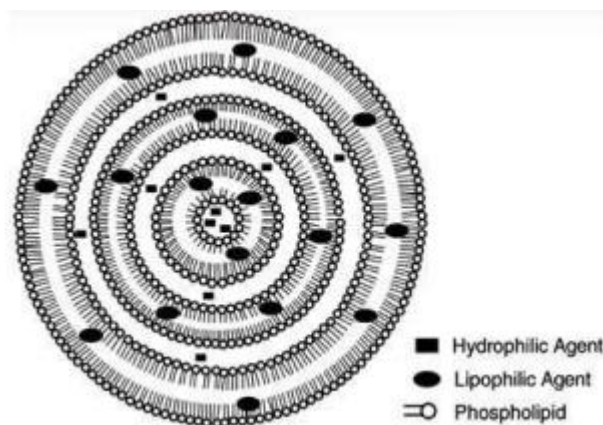
1.3.2 Δομή και μορφολογία λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους. Έως σήμερα ταξινομούνται κυρίως με βάση τη σύστασή τους και με βάση το μέγεθος τους. Αποτελούνται από φυσικά ή/και συνθετικά λιπίδια (φωσφο- και σφίγγο-λιπίδια) και ίσως περιέχουν και άλλα συστατικά, όπως χοληστερόλη και υδρόφιλα πολυμερή. Η διασπορά των αμφιφιλικών μορίων σε υδατικά

διαλύματα έχει σαν αποτέλεσμα την αυτοοργάνωση τους και το σχηματισμό αρκετά σταθερών διπλοστιβάδων δηλαδή υπερμοριακών δομών, οι οποίες αποτελούνται από δύο παράλληλες στοιβάδες στις οποίες τα μόρια είναι διατεταγμένα με τέτοιον τρόπο, ώστε τα υδρόφιλα τμήματα τους να βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια και να αλληλεπιδρούν με τα μόρια του νερού, ενώ αντίθετα τα υδρόφοβα τμήματα τους να βρίσκονται προστατευμένα στο εσωτερικό τους. Οι διπλοστιβάδες, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, είναι δυνατόν να καμφθούν και να κλείσουν, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο τα σφαιρικού σχήματος κυστίδια ή λιποσώματα (Patel, 1990) , όπως φαίνεται στο Σχήμα.6.



Σχήμα 6: Σχηματική παράσταση της διάταξης των φωσφολιπιδίων (φωσφατιδυλοχολίνη), της δομής των διπλοστιβάδων και του σχηματισμού των λιποσωμάτων



Σχήμα 7: Σχηματική παράσταση τομής ενός πολυστιβαδικού λιποσώματος

Ο πιο συνήθης τρόπος ταξινόμησης και χαρακτηρισμού των λιποσωμάτων βασίζεται στη μορφολογία τους:

Α) Πολυστιβαδικά Λιποσώματα (Multilamellar liposomes MLVs).

Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει λιποσώματα τα οποία καλύπτουν μεγάλο εύρος μεγεθών, από 100-1000 nm, όπου κάθε λιποσώμα αποτελείται από πέντε ή περισσότερες ομόκεντρες στοιβάδες. Λιποσώματα με σχετικά μικρό αριθμό στοιβάδων ονομάζονται και ολιγο-στιβαδικά λιποσώματα. Λιποσώματα που αποτελούνται από λίγες μόνο λιποστιβάδες ονομάζονται ολιγοστιβαδικά λιποσώματα (oligo-lamellar liposomes, OLVs). Η απόσταση μεταξύ των

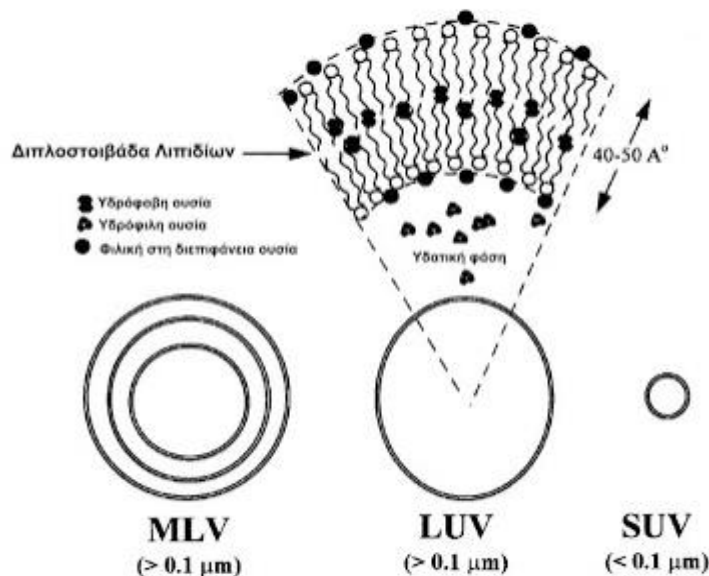
διαδοχικών διπλοστιβάδων καθορίζεται από την ισορροπία των ελκτικών δυνάμεων Van der Waals, ηλεκτροστατικών και άλλων δυνάμεων άπωσης. Η κυριότερη μέθοδος παρασκευής για τα MLVs είναι η μέθοδος του Bangham (hand-shaken method) (Deamer & Bangham, 1976).

B) Μεγάλα μονοστιβαδικά λιποσώματα (large unilamellar vesicles LUVs).

Τα λιποσώματα αυτά έχουν διάμετρο περίπου 100 nm και είναι μονοστιβαδικά. Ανάλογα με το επιθυμητό μέγεθος, τα LUVs μπορούν να παρασκευαστούν με διάφορους μεγέθους, όπως η απομάκρυνση απορρυπαντικού, η έγχυση αιθανολικού διαλύματος φωσφολιπιδίων, η εξάτμιση διαλύτη και η έγχυση αιθερικού διαλύματος φωσφολιπιδίων

Γ) Μικρά μονοστιβαδικά λιποσώματα (small unilamellar vesicles SUVs)

Διαθέτουν το μικρότερο δυνατό μέγεθος στο οποίο μπορεί ένα φωσφολιπίδιο να σχηματίσει λιποσωμική μορφή. Η δυνατότητα αυτή εξαρτάται από την ιοντική ισχύ του διαλύματος στην οποία διαλύονται τα φωσφολιπίδια, καθώς και από τη λιπιδική σύσταση των μεμβρανών. Ανάλογα με τα μεγέθη τους χωρίζονται σε μικρά μονοστιβαδικά κυστίδια όπου πλησιάζουν στο χαμηλότερο όριο μεγέθους στο οποίο μπορούν να υπάρξουν φωσφολιπιδικά κυστίδια, δηλαδή οι διάμετροι τους κυμαίνονται από 10 έως 30 nm και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το είδος των λιπιδίων και την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Μιας και αυτά τα λιποσώματα είναι ή πλησιάζουν κοντά στο κατώτερο όριο μεγέθους, θα έχουν και έναν σχετικά ομογενή



Σχήμα 8: Διάκριση των λιποσωμάτων ανάλογα με το μέγεθος τους και το πλήθος των διπλοστιβάδων τους

πληθυσμό όσο αφορά το μέγεθος. Οι μέθοδοι παρασκευής SUVs είναι η κατεργασία με υπέρηχους, η γαλλική πρέσα (French press) και η ψύξη-θέρμανση (Freeze-thaw).

1.3.3 Λιποσώματα ως μεταφορείς βιοδραστικών ουσιών

Τις τελευταίες δεκαετίες, η χορήγηση φαρμάκων σε λιποσώματα ως συστήματα μεταφοράς παρείχαν επιλογές σχεδιασμού θεραπείας. Τα λιποσωμικά συστήματα μπορούν να παραδώσουν βιοδραστικές ουσίες στη θέση δραστηριότητας, με προκαθορισμένο ποσοστό εκκαθάρισης και διανομής (Sihorkar & Vyas, 2001). Ωστόσο, με περιορισμένο χώρο

υδροφοβης περιοχής, οι φορείς μπορούν να φιλοξενήσουν μόνο μία περιορισμένη ποσότητα υδροφοβικού δραστικού φαρμάκου και η αναλογία φαρμάκου/λιπιδίου μπορεί να είναι ιδιαίτερα χαμηλή για φάρμακα χαμηλής συγγένειας με λιπίδια (McCormack & Gregoriadis, 1994). Κατά συνέπεια, μπορεί να απαιτείται μεγάλη ποσοτικά χορήγηση φορέα ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή θεραπευτική συγκέντρωση. Επιπλέον, η σταθερότητα των λιποσωμάτων μπορεί να είναι προβληματική λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ λιπόφιλων φαρμάκων και λιπιδίων (Parisov, Maksimenko, & Torchilin, 1985).

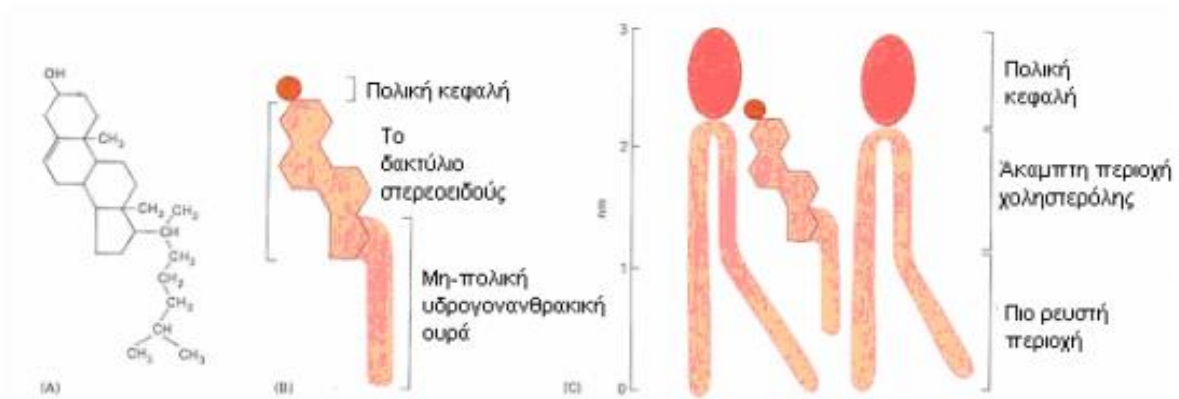
Αποδοτικά συστήματα παράδοσης βιοδραστικών ουσιών βασισμένα στα λιποσώματα πρέπει να κατέχουν έναν μεγάλο αριθμό ειδικών ιδιοτήτων. Η καλή κολλοειδής, χημική και βιολογική σταθερότητα απαιτείται. Το γεγονός ότι τα λιποσώματα είναι δομές μη ισορροπίας απαραίτητως δεν σημαίνει ότι είναι ακατάλληλα για την παράδοση βιοδραστικών ουσιών. Αντίθετα, μία κολλοειδής σταθερή δομή μη ισορροπίας είναι λιγότερο ευαίσθητη στις εξωτερικές αλλαγές από ισορροπημένες δομές, όπως τα μικκύλια. Ως εκ τούτου, κολλοειδώς σταθερά λιποσώματα λειτουργούν συχνά καλά στις φαρμακευτικές εφαρμογές. Τα λιποσωμικά συστήματα παράδοσης βιοδραστικών ουσιών όχι μόνο επιτρέπουν την παράδοση υψηλότερων συγκεντρώσεων βιοδραστικών ουσιών, αλλά και μια πιθανή στόχευση των συγκεκριμένων κυττάρων ή των οργάνων. Οι επιβλαβείς παρενέργειες μπορούν επομένως να μειωθούν εξαιτίας της ελαχιστοποιημένης διανομής της βιοδραστικής ουσίας στους μη-στοχευμένους ιστούς.

Τα συστήματα αυτά χαρακτηρίζονται από σχετικά μικρό χρόνο κυκλοφορίας στο αίμα. Όταν χορηγούνται *in vivo* (συχνά ενδοφλέβια) έχουν την τάση να συσσωρεύονται γρήγορα στα φαγοκύτταρα του μονοκυτταρικού συστήματος φαγοκυττάρων με κύρια όργανα συσσώρευσης το ήπαρ και τη σπλήνα. Το γεγονός αυτό έχει αποτελέσει στόχο για διάθεση βιοδραστικών ενώσεων μέσω λιποσωμάτων σε μολυσμένα μακροφάγα. Επιπλέον, τα συμβατικά λιποσώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για μεταφορά αντιγόνων. Λιποσωμικά εμβόλια έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά κατά ιικών, βακτηριακών και παρασιτικών μολύνσεων καθώς επίσης και εναντίον όγκων.

1.3.4 Χοληστερόλη

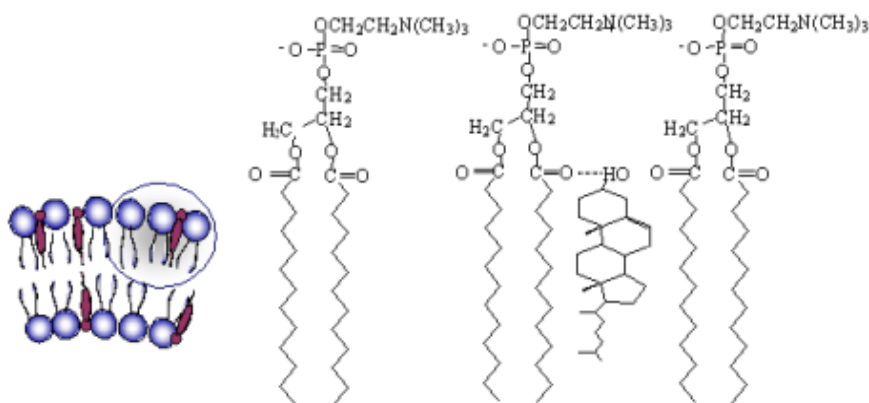
Η χοληστερόλη αποτελεί ένα πολύ σημαντικό συστατικό των μεμβρανών και η ενσωμάτωσή της στη λιποσωμική διπλοστιβάδα είναι ικανή να επιφέρει πολλές αλλαγές στις ιδιότητες αυτών των μεμβρανών σχετικά με τη ρευστότητα, ελαστικότητα και τη διαπερατότητα. Η ύπαρξη χοληστερόλης στη διπλοστιβάδα σε σχετικώς μικρά γραμμομοριακά κλάσματα ως προς τη φωσφατιδυλοχολίνη, επιφέρει μικρή αύξηση θερμοκρασίας και μικρή μείωση του ενθαλικού περιεχομένου. Όταν το ποσοστό της χοληστερόλης πλησιάζει το 50%, παρατηρείται δραματική μείωση της ενθαλπίας μετάβασης και αύξηση του εύρους θερμοκρασίας που ολοκληρώνεται η διαδικασία, ενώ σε ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρείται ουσιαστικά μηδενισμός την ενθαλπίας και της θερμοκρασίας μετάπτωσης καθώς και η στοιβάδα των κυστιδίων λαμβάνει την υγρή κρυσταλλική διάταξη (Taylor & Morris, 1995).

Η χοληστερόλη περιέχει έναν ογκώδη στεροειδή πυρήνα ο οποίος έχει ένα υδροξύλιο στη μια άκρη και μια ευέλικτη υδρογονανθρακική ουρά στην άλλη πλευρά. Η χοληστερόλη εισχωρεί στις διπλοστιβάδες με τον επιμήκη της άξονα κάθετο προς το μεμβρανικό επίπεδο. Η υδροξυλομάδα της χοληστερόλης σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο από την πολική κεφαλή ενός φωσφολιπιδίου ενώ η υδρογονανθρακική ουρά της χοληστερόλης βρίσκεται μέσα στον μη πολικό πυρήνα της διπλοστιβάδας.



Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση του μορίου της χοληστερόλης και διεύθεσής του στην φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα.

Το 3β-υδροξύλιο της χοληστερόλης αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου με τις καρβοξυλομάδες των εστερικών συνδέσμων των φωσφολιπιδίων, προκαλώντας πολύ μικρή κατακόρυφη ελευθερία κινήσεων. Η παρουσία της χοληστερόλης παράλληλα στους πρώτους δέκα περίπου άνθρακες της αλυσίδας του φωσφολιπιδίου έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της ευκινησίας αυτών των ανθράκων, ενώ ταυτόχρονα δημιουργείται χώρος για ευρεία μετακίνηση των υπόλοιπων ανθράκων προς το τέλος της αλυσίδας, όπως φαίνεται στο Σχήμα. 13 με αποτέλεσμα όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της χοληστερόλης στην διπλοστιβάδα αυτή να γίνεται πιο ρευστή.

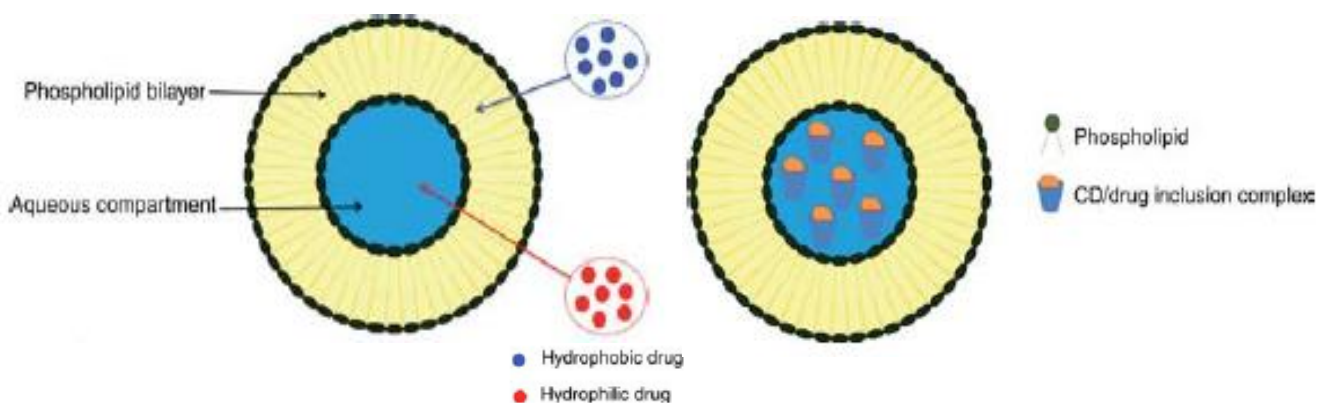


Σχήμα 10: Διάταξη των μορίων της χοληστερόλης στην στοιβάδα των λιποσωμάτων

Έτσι μέσω της αλληλεπίδρασης των φωσφολιπιδίων των αλυσίδων των λιπαρών οξέων, η χοληστερόλη αυξάνει την ανθεκτικότητα της μεμβράνης και συντελεί στη μείωση της ρευστότητάς της. Για το λόγο αυτό η χοληστερόλη χρησιμοποιείται ευρύτατα για την παρασκευή λιποσωμάτων με σκοπό τη βελτίωση των χαρακτηριστικών της διπλοστιβάδας τους.

1.3.5 Σύμπλοκο βιοδραστικής ουσίας σε κυκλοδεξτρίνη, εγκλωβισμένο σε λιποσώματα (drug-in-cyclodextrin-in-liposomes)

Η παγίδευση υδροφοβων φαρμάκων στον υδατικό πυρήνα των λιποσωμάτων ως διαλυτά σύμπλοκα εγκλεισμού με κυκλοδεξτρίνη έχει προταθεί ως ενδιαφέρουσα στρατηγική το 1994 (Hatzi et al., 2007). Ο εγκλεισμός του συμπλόκου δραστικής ουσίας-κυκλοδεξτρίνης σε λιποσώματα συνδυάζει τα πλεονεκτήματα που αφορούν και οι δύο τύποι εγκλεισμού. Οι κυκλοδεξτρίνες αυξάνουν τη διαλυτότητα και τη διαθεσιμότητα των φαρμάκων, διατηρώντας τη λιποσωμική δομή ακέραιη από τα μόρια της ουσίας και εισχωρούν στη μεμβράνη της λιπιδικής διπλοστιβάδας (σχ.13), ενώ τα λιποσώματα προλαμβάνουν τη διάσπαση των συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης λόγω αραίωσης από το πλάσμα ή την εύκολη νεφρική απέκκριση μορίων κυκλοδεξτρίνης. Κατά συνέπεια, η στρατηγική αυτή μπορεί να είναι χρήσιμη για τον καλύτερο έλεγχο της *in vivo* πορείας υδροφοβικών δραστικών θεραπευτικών ουσιών, αποφεύγοντας την ταχεία απελευθέρωση που παρατηρείται έπειτα από συμβατική ενσωμάτωση στη λιπιδική φάση του λιποσώματος. Επιπλέον, η ελαστικότητα των διπλά εγκλεισμένων μορίων φαίνεται να είναι ικανή να αυξήσει τη διαλυτότητα της ουσίας και τη διάχυση της στο δέρμα, βελτιώνοντας έτσι, τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου μέσω διαδερμικών διαδρομών (Jain et al., 2008).



Σχήμα 11: Απλός εγκλεισμός λιποσώματος (αριστερά), διπλός εγκλεισμός λιποσώματος (δεξιά)

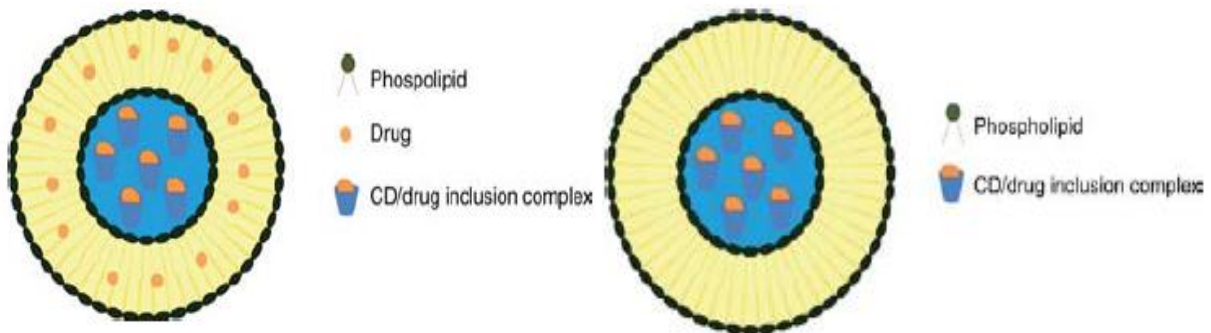
Οι προσεγγίσεις των μορίων αυτών αποδείχθηκαν ότι βελτιώνουν τη σταθερότητα του κυστιδίου του λιποσώματος στις περισσότερες περιπτώσεις. Οι κυκλοδεξτρίνες ωστόσο, και ιδιαίτερα τα μεθυλιωμένα παράγωγα αυτών, είναι γνωστά στο να απομακρύνουν λιπιδικά συστατικά από τη μεμβράνη των κυττάρων και λιποσωμάτων με το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού με αυτά, ειδικά της χοληστερόλης. Λόγω αυτού είναι πιθανό ότι κατά τη διάρκεια ή στο τέλος της δημιουργίας των διπλά εγκλεισμένων σωματιδίων, τα λιπίδια μπορούν να εισβάλλουν στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της δραστικής ουσίας. Αυτό, θα μπορούσε να οδηγήσει στην αποσταθεροποίηση της διπλοστιβάδας μέχρι ένα βαθμό, επιτρέποντας μερική ή και πλήρη διάχυση του φαρμακευτικού περιεχομένου του λιποσώματος. Γρήγορη απελευθέρωση της ουσίας αφαιρεί τις ιδιότητες των διπλά εγκλεισμένων σωματιδίων.

Το γεγονός ότι μεγάλη πλειοψηφία των λιποσωμικών συστημάτων απορροφάται από το ήπαρ δημιουργεί σημαντικό πρόβλημα στο σχεδιασμό θεραπευτικών μεθόδων. Αλλά, σε περίπτωση ασθενειών του ήπατος, η φυσική στόχευση των λιποσωμάτων δημιουργεί μεγάλη δυναμική αξία. Τα λιποσώματα μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν για τη μείωση της τοξικότητας των θεραπευτικών μέσων σε άλλα όργανα, ενώ ταυτόχρονα ενισχύεται η συγκέντρωση του φαρμάκου των μέσων αυτών, οι οποίοι εμφανίζουν επιδράσεις στο ήπαρ.

Επιπλέον, η β-κυκλοδεξτρίνη μπορεί να αναμιχθεί σε οποιαδήποτε αναλογία με ένα τυπικό μίγμα φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης με σκοπό τη δημιουργία σταθερών, σφαιρικών και μονοστοιβαδικών κυστιδίων (Kauscher et al., 2013). Η παρεμβατική χρήση του HP-b-CD (2-υδροξείλο β-κυκλοδεξτρίνη) έχει μελετηθεί και έχει δείξει εξαιρετικό προφίλ ασφαλείας (Pitha et al., 1994). Λαμβάνοντας υπόψιν τα μειονεκτήματα των λιποσωμάτων και τα προβλήματα που σχετίζονται με τα σύμπλοκα κυκλοδεξτρίνης (τοξικότητα στα νεφρά, ταχεία απελευθέρωση κτλ.), αυτά εξαλείφονται μετά από συνδυασμό των πλεονεκτημάτων των λιποσωμάτων και κυκλοδεξτρινών (Vyas et al., 2008).

1.3.6 Διπλά φορτωμένα λιποσώματα (Double loaded liposomes)

Τα διπλά φορτωμένα λιποσώματα είναι κυστίδια που εμπεριέχουν ένα λιπόφιλο φάρμακο τόσο στην ελεύθερή του μορφή στην λιπόφιλη περιοχή του λιπιδίου (διπλοστιβάδα), όσο και σε συμπλοκοποιημένη μορφή με κυκλοδεξτρίνη στην υδατική φάση (Shaji & Varkey, 2012). Ένα τέτοιας μορφολογίας διπλό σύστημα συμπλοκοποίησης αυξάνει αποτελεσματικά την αναλογία δραστικής ουσίας: λιπιδίου σε επίπεδα πολύ υψηλότερα από αυτά που επιτυγχάνονται με παγίδευση του φαρμάκου μόνο στη λιποσωμική διπλοστιβάδα ή αντίστοιχα μόνο στο εσωτερικό του λιπιδίου με τη συμπλοκοποιημένη μορφή του. Ο τελικός φορέας παρουσιάζει σημαντικά, για την ιατρική, πλεονεκτήματα όπως την γρήγορη απελευθέρωση κατά την έναρξη της δράσης όμως και παρατεταμένο αποτέλεσμα (Bragagni et al., 2010).



Σχήμα 12: Διπλά φορτωμένα λιποσώματα-ελεύθερη μορφή στη διπλοστιβάδα και εγκλεισμένη μορφή στο εσωτερικό-(αριστερά), Διπλά εγκλεισμένη δραστικής ουσίας -στην εσωτερική κοιλότητα-(Δεξιά)

Οι Chen et al (2014) μετά από μελέτη με σκοπό τον εντοπισμό αναλγητικής δράσης της πριλοκαΐνης σε διπλά φορτωμένα λιποσώματα αποκάλυψαν ότι η τεχνική αυτή ήταν η πιο αποτελεσματική, με μικρότερο χρόνο διάρκειας έναρξης και μεγαλύτερη διάρκεια του αναισθητικού. Η τεχνική αυτή, λόγω της απελευθέρωσης της ελεύθερης μορφής της ουσίας υπάρχει γρήγορη εμφάνιση του αναισθητικού. Εν τω μεταξύ, το σύμπλοκο της κυκλοδεξτρίνης στον υδατικό πυρήνα παρέχει παρατεταμένη απελευθέρωση του φαρμάκου (Bragagni et al., 2010).

1.3.7 Εφαρμογές λιποσωμάτων

Νέα συστήματα χορήγησης φαρμάκων αναπτύσσονται εφόσον η υπάρχουσα διατύπωση δεν είναι ικανοποιητική και η αναδιατύπωση προσφέρει ανώτερα θεραπευτικά αποτελέσματα και ασφάλεια έναντι των υφιστάμενων συστημάτων. Πράγματι, φάρμακα εγκλεισμένα σε λιποσώματα έχουν παρουσιάσει σημαντική αύξηση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας σε ανθρώπους, σε σύγκριση με τα μη-λιποσωμικά τους σκευάσματα.

Υδρόφοβα φάρμακα όπως κυκλοσπορίνη και πακλιταξέλη συνήθως συνταγοποιούνται σε επιφανειοδραστικές ουσίες και οργανικούς συνδιαλύτες για συστηματική χορήγηση σε ανθρώπους. Αυτοί οι διαλυτοποιητές μπορεί να προκαλέσουν τοξικότητα στις δόσεις που απαιτούνται για την απελευθέρωση του φαρμάκου. Σε αντίθεση, τα λιποσώματα αποτελούνται από λιπίδια τα οποία είναι σχετικά μη τοξικά, μη ανοσογόνα, βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα μόρια και μπορούν εγκλείσουν ένα ευρύ φάσμα αδιάλυτων στο νερό (λιπόφιλα) φάρμακα.

Τα λιποσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών για ενδοκυτταρική χορήγηση. Τα φάρμακα με ενδοκυτταρικούς υποδοχείς είναι εκείνα που απαιτούνται για τη προσπέλαση της μεμβράνης πλάσματος για φαρμακολογική δραστηριότητα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν λιποσώματα με σκοπό να αυξάνουν την κυτταρολυτική απελευθέρωση ορισμένων φαρμάκων.

Κατά τη γονιδιακή θεραπεία ορισμένες συστηματικές ασθένειες προκαλούνται από έλλειψη ενζύμων που οφείλονται σε έλλειψη ή ελαττωματικά γονίδια. Τα τελευταία χρόνια, έγιναν

αρκετές προσπάθειες για την αποκατάσταση της γονιδιακής έκφρασης με την παράδοση του σχετικού εξωγενούς DNA ή γονίδια σε κύτταρα (Crystal, 1995).

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία ασθενειών όπως ο καρκίνος έχουν συνήθως ένα στενό θεραπευτικό δείκτη (TI) το οποίο μπορεί να είναι ιδιαίτερα τοξικό για τους φυσιολογικούς ιστούς. Η τοξικότητα αυτών των φαρμάκων μπορεί να ελαχιστοποιηθεί μειώνοντας την χορήγηση τους στα κρίσιμα φυσιολογικά όργανα. Έχει αποδειχθεί ότι ακόμη και μια μικρή μείωση της κατανομή του φαρμάκου στα κρίσιμα όργανα με ενθυλάκωση στα λιποσώματα μπορεί να μειώσει σημαντικά την τοξικότητα του φαρμάκου (Jr, 1996). Τα λιποσώματα απορροφώνται ανεπαρκώς από ιστούς όπως η καρδιά, το νεφρό και η γαστρεντερική οδό, οι οποίες είναι σημαντικές θέσεις για τοξικές παρενέργειες μιας ποικιλίας αντινεοπλασματικών φαρμάκων. Έτσι, το σκεύασμα λιποσώματος μπορεί να βελτιώσει το TI μεταβάλλοντας τη βιοκατανομή του φαρμάκου μακριά από φυσιολογικούς ιστούς που είναι ευαίσθητοι στο φάρμακο.

1.4 Αιθοσώματα

1.4.1 Εισαγωγή

Η βελτιστοποίηση της χορήγησης φαρμάκων μέσω του ανθρώπινου δέρματος είναι σημαντική στη σύγχρονη θεραπεία (Schaefer et al., 1996). Πρόσφατα, η διαδερμική οδός αποτέλεσε τη βάση της στοματικής θεραπείας ως το πιο επιτυχημένο ερευνητικό πεδίο για την παροχή φαρμάκων.

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι τα κλασσικά λιποσώματα έχουν μικρή ή καθόλου αξία ως φορείς για διαδερμική χορήγηση φαρμάκων επειδή δεν είναι ικανοί να διαπεράσουν σε μεγάλος βάθος το δέρμα, παραμένοντας περιορισμένοι στο ανώτερο στρώμα της κεράτινης στιβάδας. Μόνο ειδικά σχεδιασμένα κυστίδια αποδείχθηκαν ότι είναι σε θέση να επιτρέψουν τη διαδερμική παροχή. Η αιθανόλη είναι γνωστή ως αποτελεσματικός ενισχυτής διείσδυσης. Παρόλα αυτά εξαιτίας της αλληλεπίδρασης της, στις λιπιδικές διπλοστιβάδες πιστεύεται ότι τα κυστίδια δεν μπορούν να συνυπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Οι Touitou et al., 2000 ανακάλυψαν φυσαλιδώδες σύστημα λιπιδίων που ενσωματώνει αιθανόλη σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση, το οποίο ονομάστηκε αιθοσώματα. Διαπίστωσε ότι τα αιθοσώματα διεισδύουν στο δέρμα και ενισχύουν τη χορήγηση σύνθετων ουσιών σε βαθιά δερματικά στρώματα ή συστηματικά και πρότειναν ότι η αιθανόλη ρευστοποιεί τόσο τα αιθοσωμικά λιπίδια όσο και τις διπλοστιβάδες του κονιάματος. Τα μαλακά κυστίδια διεισδύουν έπειτα διαμέσου των αποδιοργανωμένων λιπιδίων διπλής στιβάδας.

Οι βελτιωμένες μέθοδοι χορήγησης φαρμάκων για βιοφαρμακευτικά προϊόντα είναι σημαντικές για δύο λόγους, τα φάρμακα αυτά αντιπροσωπεύουν το ταχέως αναπτυσσόμενο τομέα της θεραπευτικής ιατρικής και συχνά προσφέρονται σε ενέσιμη μορφή. Η ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών παραγόντων και η σχετική καινοτομία στο σύστημα χορήγησης φαρμάκων δεν επέτρεψαν μόνο την επιτυχή εφαρμογή νέων φαρμάκων, αλλά επέτρεψαν επίσης την ανάπτυξη νέας ιατρικής θεραπείας με υπάρχοντα φάρμακα. Κατά τη διάρκεια των

τελευταίων δύο δεκαετιών, τα διαδερμικά έμπλαστρα έχουν γίνει μία αποδεδειγμένη τεχνολογία υποσχόμενη για ασφαλή και ανεμπόδιο τρόπο θεραπείας (Ainbinder & Touitou, 2005).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, αποκτήθηκε μεγαλύτερη γνώση κυστιδίων και πολλοί εξ αυτών όπως και κυστίδια παράγωγα έχουν δοκιμαστεί για τις ικανότητές τους για διαδερμική απελευθέρωση φαρμάκου. Τα περισσότερα πειράματα ωστόσο έχουν επικεντρωθεί στα λιπосώματα, καθώς τα παράγωγα προσθέτουν μόνο στις βασικές τους ιδιότητες. Οι φυσαλίδες είναι κλειστές, σφαιρικές μεμβράνες που διαχωρίζουν έναν πυρήνα διαλύτη από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Συνήθως αποτελούνται από φωσφολιπίδια, κυρίως φωσφοτιδυλική χολίνη (PC) όπως στα λιπосώματα, ενώ έχει προταθεί ότι το εξωτερικό περίβλημα ενός λιπосώματος θα του επέτρεπε να διέλθει από το λιπόφιλο δέρμα. Οι περισσότερες έρευνες δείχνουν ότι τα λιπосώματα παγιδεύονται εντός του άνω στρώματος των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας. Τα κυστιδικά συστήματα είναι σύστημα χορήγησης φαρμάκων για την απελευθέρωση του φαρμάκου δερματικά και διαδερμικά.

1.4.2 Σύνθεση των αιθοσωμάτων

Τα αιθοσώματα είναι κυστιδικοί φορείς οι οποίοι περιλαμβάνουν υδροαλκοολικό ή υδρο/αλκοολικό/γλυκολικό φωσφολιπίδιο του οποίου η συγκέντρωση σε αλκοόλες ή ο συνδυασμός τους είναι σχετικά υψηλός. Τυπικά, μπορεί να περιέχουν φωσφολιπίδια με διάφορες χημικές δομές όπως φωσφατιδυλοχολίνη (PC), υδρογονωμένο PC, φωσφατιδικό οξύ (PA), φωσφατιδυλοσερίνη (PS), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), φωσφατιδυλογλυκερόλη (PPG) αιθανόλη ή ισοπροπυλική αλκοόλη), νερό και προπυλενογλυκόλη (ή άλλες γλυκόλες). Μία τέτοια σύνθεση επιτρέπει την παροχή υψηλής συγκέντρωσης δραστικών συστατικών μέσω του δέρματος. Η χορήγηση φαρμάκου μπορεί να διαμορφωθεί με μεταβολή της αναλογίας αλκοόλης: νερού ή αλκοόλης-πολύλης: νερού. Τα πιο διαδεδομένα φωσφολιπίδια είναι τα φωσφολιπίδια σόγιας όπως Phospholipon 90 (PL-90). Συνήθως χρησιμοποιείται σε μία περιοχή από 0,5-10% βάρος κατά βάρος. Η χοληστερόλη σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0,1-1% μπορεί επίσης να προστεθεί στο παρασκεύασμα (Hadgraft, 2001).

Παραδείγματα αλκοολών, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, περιλαμβάνουν αιθανόλη και ισοπροπυλική αλκοόλη. Μεταξύ γλυκολών χρησιμοποιούνται γενικά προπυλενογλυκόλη και Transcutol. Επιπλέον, μη ιονικά επιφανειοδραστικά (PEG-αλκυλαιθέρες) μπορούν να συνδυαστούν με τα φωσφολιπίδια. Μπορούν επίσης να προστεθούν κατιονικά λιπίδια όπως κοκοαμίδιο, αλκυλαμίνες, δωδεκυλαμίνη, κετριμίδιο κλπ. Η συγκέντρωση αλκοόλης στο τελικό προϊόν μπορεί να κυμαίνεται από 20 έως 50% ενώ η συγκέντρωση της μη υδατικής φάσης (συνδυασμός αλκοόλης και γλυκόλης) μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 22 έως 70%.

1.4.3 Επίδραση αιθανόλης σε σύστημα αιθοσωμάτων

Η αιθανόλη είναι ένας αποτελεσματικός ενισχυτής διείσδυσης (Finnin & Morgan, 1999). Παίζει σημαντικό ρόλο στα αιθοσωμικά συστήματα δίνοντας στα κυστίδια μοναδικά χαρακτηριστικά από την άποψη του μεγέθους, του δυναμικού ζ, της σταθερότητας, της

αποτελεσματικότητας της παγίδευσης και της ενισχυμένης διαπερατότητας του δέρματος. Οι συγκεντρώσεις αιθανόλης σε αιθοσωμικά συστήματα έχουν αναφερθεί ότι είναι ~ 10% -50% (Puri & Jain, 2012; Τουίτου et al., 2000). Πολλοί ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όταν αυξηθεί η συγκέντρωση της αιθανόλης, το μέγεθος των αιθοσωμάτων θα μειωθεί (Zhaowu et al., 2009). Οι Bendas & Tadros (2007) διαπίστωσαν ότι η μέση διάμετρος κυστιδίων μίας αιθοσωματικής διαμόρφωσης που περιείχε 40% αιθανόλη ήταν 44,6% μικρότερη από την κλασσική λιποσωμική σύνθεση, η οποία δεν είχε αιθανόλη. Ωστόσο, η αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης πέρα από το βέλτιστο επίπεδο προκαλεί διεισδύσεις και οδηγεί σε ελαφρά αύξηση του μεγέθους των κυψελίδων και σοβαρή μείωση της αποτελεσματικότητας της παγίδευσης και με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης τα κυστίδια διαλυτοποιούνται. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης προκαλούν αλληλοδιείσδυση της αλυσίδας υδρογονάνθρακα αιθανόλης, γεγονός που οδηγεί σε μείωση του πάχους της μεμβράνης και συνεπώς μειώνει το μέγεθος των κυστιδίων. Άλλοι ερευνητές πρότειναν ότι η αιθανόλη τροποποιεί το καθαρό φορτίο των συστημάτων σε κάποιο βαθμό στερεοχημικής σταθεροποίησης, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση του μέσου μεγέθους των κυψελών (Fang et al., 2008; Zhou et al., 2010).

Το φορτίο των σωματιδίων είναι μια σημαντική παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει τις σωματιδιακές ιδιότητες, όπως η σταθερότητα και η αλληλεπίδραση σωματιδίου-δέρματος. Η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης στα αιθοσώματα έχει μετατοπίσει το σωματιδιακό φορτίο από θετικό σε αρνητικό (Rao et al., 2008). Οι Dayan και Τουίτου διαπίστωσαν ότι το αρνητικό φορτίο των κενών αιθοσωμάτων αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης (Dayan & Τουίτου, 2000). Η αιθανόλη δρα ως αρνητικός φορέας παροχής για την επιφάνεια των αιθοσωμάτων, αποφεύγοντας έτσι τη συσσωμάτωση του κυστιδικού συστήματος λόγω ηλεκτροστατικής απόθησης. Επιπλέον, η αιθανόλη έχει αναφερθεί ότι έχει σταθεροποιητικές επιδράσεις (Dubey et al., 2007).

Η αιθανόλη έχει επίσης σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότητα εγκλεισμού του αιθοσωμικού συστήματος και γενικά η αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης οδηγεί σε πιο αποτελεσματικό εγκλεισμό. Αυτή η επίδραση ισχύει για μόρια μεταβλητής λιποφιλίας, όπου η αιθανόλη αυξάνει τη διαλυτότητα των λιπόφιλων και αμφιφιλικών φαρμάκων και ως εκ τούτου αυξάνει το φορτίο του φαρμάκου. Η σχέση αυτή βρέθηκε να είναι γραμμική, με συγκεντρώσεις αιθανόλης μεταξύ 20% και 40% (Prasanthi & Lakshmi, 2012). Για το λόγο αυτό, η συγκέντρωση της αιθανόλης θα πρέπει να βελτιστοποιηθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας διαμόρφωσης, καθώς σε χαμηλές συγκεντρώσεις η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού θα είναι ελάχιστη και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις η αιθοσωμική μεμβράνη θα είναι περισσότερο διαπερατή επειδή τα φωσφολιπίδια μπορούν εύκολα να διαλυθούν σε αιθανόλη, οδηγώντας σε σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας εγκλεισμού.

1.4.4 Είδη αιθοσωμικών συστημάτων

Κλασσικά αιθοσώματα (Classic ethosomes)

Τα κλασσικά αιθοσώματα είναι μια τροποποίηση των κλασσικών λιποσωμάτων και αποτελούνται από φωσφολιπίδια, υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης έως και 45% w/w και νερό.

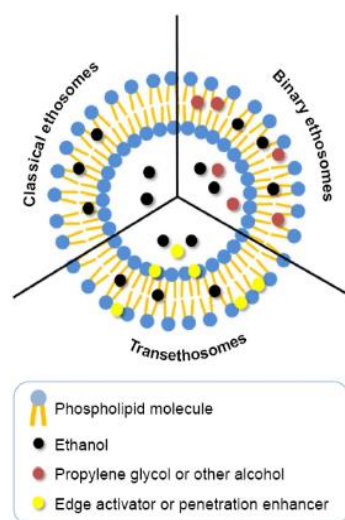
Τα κλασσικά αιθοσώματα αναφέρθηκαν ότι είναι ανώτερα από τα κλασσικά λιποσώματα για διαδερμική χορήγηση φαρμάκου επειδή ήταν μικρότερα και είχαν αρνητικό ζ-δυναμικό και υψηλότερη αποτελεσματικότητα παγίδευσης. Επιπλέον, τα κλασσικά αιθοσώματα έδειξαν καλύτερη διαπερατότητα του δέρματος και προφίλ σταθερότητας σε σύγκριση με τα κλασσικά λιποσώματα (S. Jain et al., 2015; Touitou et al., 2000). Τα μοριακά βάρη των φαρμάκων που παγιδεύονται στα κλασσικά αιθοσώματα κυμαίνονται από 130.077g/mol σε 24 kg/mol.

Δυαδικά αιθοσώματα(Binary ethosomes)

Τα δυαδικά αιθοσώματα έγιναν γνωστά από τους Zhou et al. (2010). Αναπτύχθηκαν με τη προσθήκη άλλου τύπου αλκοόλης στα κλασσικά αιθοσώματα. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αλκοόλες στα δυαδικά αιθοσώματα είναι η προπυλενογλυκόλη (PG) και η ισοπροπυλική αλκοόλη (IPA) (Li et al., 2012).

Διατοσοσώματα (Transethosomes)

Αυτό το είδος αιθοσωμάτων είναι η νέα γενιά αιθοσωμικών συστημάτων και πρωτοαναφέρθηκαν από τον Ascenso et al., (2015). Αυτό το αιθοσωματικό σύστημα περιέχει τα βασικά συστατικά των κλασσικών αιθοσωμάτων και μια πρόσθετη ένωση όπως ένας ενισχυτής διείσδυσης ή ένας ενεργοποιητής άκρων (επιφανειοδραστική ουσία) στη φόρμουλά τους. Αυτά τα νέα κυστίδια αναπτύχθηκαν σε μια προσπάθεια συνδυασμού των πλεονεκτημάτων των κλασσικών αιθοσωμάτων και των παραμορφώσιμων λιποσωμάτων (μεταμοσχεύματα) σε μία φόρμουλα για την παραγωγή διαστεωμάτων. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει ανώτερες ιδιότητες των διατοσοσώματα πάνω από τα κλασσικά αιθοσώματα. Διαφορετικοί τύποι ενεργοποιητών άκρων και ενισχυτές διείσδυσης έχουν διερευνηθεί για την παραγωγή αιθοσωμικών συστημάτων με καλύτερα χαρακτηριστικά. Τα διατοσοσωματίδια αναφέρθηκαν να παγιδεύουν φάρμακα με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 130.077 g/mol έως 200-325 kg/mol (Ainbinder & Touitou, 2011).



Σχήμα 13: Τρεις τύποι αιθοσωμικών συστημάτων, ταξινομημένων ανάλογα τις συνθέσεις τους.

1.4.5 Μέθοδοι προετοιμασίας αιθοσωμάτων

Το αιθοσωμικό σύστημα μπορεί να δημιουργηθεί με δύο βασικές μεθόδους τη θερμή ή τη ψυχρή όπως παρουσιάζεται παρακάτω. Και οι δύο μέθοδοι δεν απαιτούν εξελιγμένο εξοπλισμό, είναι σχετικά γρήγορες και είναι εύκολο να κλιμακωθούν σε βιομηχανικό επίπεδο.

Ψυχρή μέθοδος

Αυτή είναι η συνηθέστερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των αιθοσωμικών σωματιδίων. Σε αυτή τη μέθοδο φωσφολιπίδια, φάρμακα και άλλα λιπιδικά υλικά διαλύονται σε αιθανόλη σε καλυμμένο δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου με έντονη ανάδευση με χρήση αναμικτήρα. Στην διάρκεια της ανάδευσης προστίθεται προπυλενογλυκόλη ή άλλη πολυόλη. Αυτό το μίγμα θερμαίνεται στους 300 °C σε υδατόλουτρο. Το νερό που θερμαίνεται στους 300 °C σε ξεχωριστό δοχείο προστίθεται στο μείγμα, το οποίο κατόπιν αναδεύεται για 5 λεπτά σε ένα καλυμμένο δοχείο. Το μέγεθος κυψελίδων των αιθοσωμάτων μπορεί να ελαττωθεί για χρησιμοποιώντας μέθοδο υπερήχων. Τέλος, η σύνθεση αποθηκεύεται υπό ψύξη.

Θερμή μέθοδος

Στη μέθοδο αυτή, τα φωσφολιπίδια διασπείρεται σε νερό με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 400 °C μέχρις ότου ληφθεί ένα κολλοειδές διάλυμα. Σε ένα ξεχωριστό δοχείο, η αιθανόλη και η προπυλενογλυκόλη αναμιγνύονται και θερμαίνονται στους 400 °C. Μόλις και τα δύο μίγματα φθάσουν τους 400 °C, η οργανική φάση προστίθεται στην υδατική. Το φάρμακο διαλύεται σε νερό ή αιθανόλη ανάλογα με τις υδρόφιλες / υδρόφοβες ιδιότητες του. Το μέγεθος κυστιδίων των αιθοσωμάτων μπορεί να μειωθεί στην επιθυμητή έκταση χρησιμοποιώντας μέθοδο υπερήχων.

1.4.6 Επιδράσεις φαρμακευτικής ουσίας στις ιδιότητες του αιθοσωμικού συστήματος

Ο σημαντικότερος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη σε αιθοσωμικές συνθέσεις είναι η φύση και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου το οποίο πρόκειται να ενσωματωθεί. Αυτό συμβαίνει επειδή το φάρμακο μπορεί να επηρεάσει το σύστημα των αιθοσωμάτων, ιδιαίτερα το μέγεθος σωματιδίων και το ζ-δυναμικό.

Γενικά τα αιθοσωμικά σωματίδια τείνουν να έχουν αρνητικό φορτίο. Ωστόσο, ορισμένοι ερευνητές έχουν παρατηρήσει ότι η δραστική ουσία που εγκλείεται σε αιθόσωμα είναι ικανό να μετατοπίσει το σωματιδιακό φορτίο από αρνητικό σε θετικό. Οι Shumilov & Touitou (2010) ανέφεραν ότι η φόρτιση ενός κενού αιθοσωμικού σωματιδίου ήταν αρνητική (-8.8mV) και υπήρξε θετική μετατόπιση σε (7.16mV) μετά την ενσωμάτωση μικρής ποσότητας υδροχλωρικής βουσπιρόνης στο σύστημα. Παρόμοιο εύρημα παρατηρήθηκε επίσης με προσθήκη υδροχλωρικού τριεξυφαινιδυλίου 0.5%w/w, όπου το αρνητικό φορτίο των κενών αιθοσωμάτων (-4.5mV) μετατοπίστηκε σε θετικό φορτίο (4.8mV). Το αποτέλεσμα σε αυτή την έρευνα εξαρτήθηκε από την συγκέντρωση του υδροχλωρικού τριεξυφαινιδυλίου που προστέθηκε. Η αύξηση του ποσοστού του φαρμάκου σε 1% και 3% w/w είχε ως αποτέλεσμα αντίστοιχη αύξηση των τιμών των δυναμικών ζ 7.2mV και 10.4mV αντίστοιχα (Dayan & Touitou, 2000). Το σωματιδιακό φορτίο που μετατοπίζεται από αρνητικό σε θετικό αναφέρθηκε επίσης σε ένα αιθοσωμικό σύστημα ενός συνθετικού λιπόφιλου φαρμάκου

acyclovir (ACV-C16). Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε στη προσθήκη μίας ομάδας καρβονυλίου κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του ACV-C16. Η ομάδα καρβονυλίου ενήργησε ως ομάδα απομάκρυνσης ηλεκτρονίων και ως εκ τούτου είχε ως αποτέλεσμα τα αιθωσώματα ACV-C16 να είναι θετικά φορτισμένα. Αντίθετα, το ζ-δυναμικό του ενεργού ατοκυλοϊκού (μη-οιστρογόνου) φορτωμένου αιθωσωμικού συστήματος που αναφέρθηκε στην ίδια μελέτη ήταν αρνητικό ($-22,3 \pm 1,7$ mV) (Zhou et al., 2010).

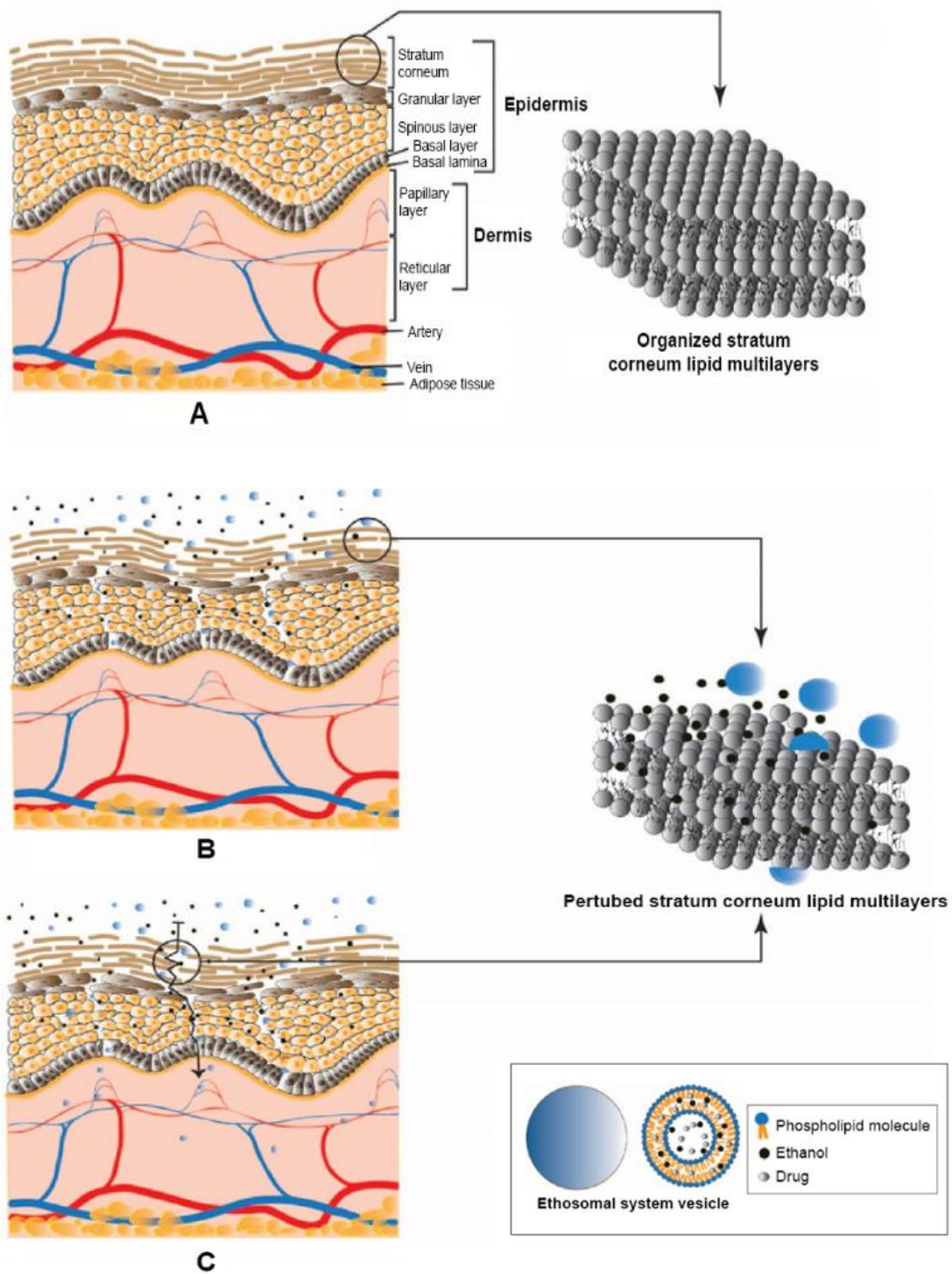
1.4.7 Μηχανισμός διείσδυσης αιθωσωμάτων

Αν και η ακριβής διαδικασία χορήγησης φαρμάκων από τα αιθωσώματα παραμένει ζήτημα προβληματισμού, πιθανότατα, ένας συνδυασμός διαδικασιών συμβάλλει στην ενίσχυση της επίδρασης. Οι πολυστρωματική λιπιδική μορφή στη στιβάδα κερατοειδούς σε φυσιολογική θερμοκρασία είναι πυκνά συσκευασμένα και διατεταγμένα με μεγάλη διαμόρφωση. Η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης καθιστά τα αιθωσώματα μοναδικά, καθώς η αιθανόλη είναι γνωστή για τη διαταραχή της οργάνωσης της διπλοστιβάδας λιπιδίων του δέρματος.

Η αιθανόλη αλληλεπιδρά με μόρια λιπιδίων στην πολική περιοχή σκληρής ομάδας, με αποτέλεσμα τη μείωση της ακαμψίας των λιπιδίων της κεράτινης στιβάδας, αυξάνοντας τη ρευστότητα τους. Η παρεμβολή αιθανόλης στο περιβάλλον πολικής ομάδας κεφαλής μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης. Εκτός από την επίδραση της αιθανόλης στη δομή κερατοειδούς, το ίδιο το αιθωσώμα μπορεί να αλληλεπιδρά με το φραγμό της κερατοειδούς. Ενώ το εγκλεισμένο φάρμακο σε κλασσικά λιποσώματα παρέμεινε κυρίως στην επιφάνεια του δέρματος, το αιθωσωματικό σύστημα αποδείχθηκε ότι είναι υψηλής αποτελεσματικότητας φορέας για ενισχυμένη απελευθέρωση φαρμάκου μέσω του δέρματος.

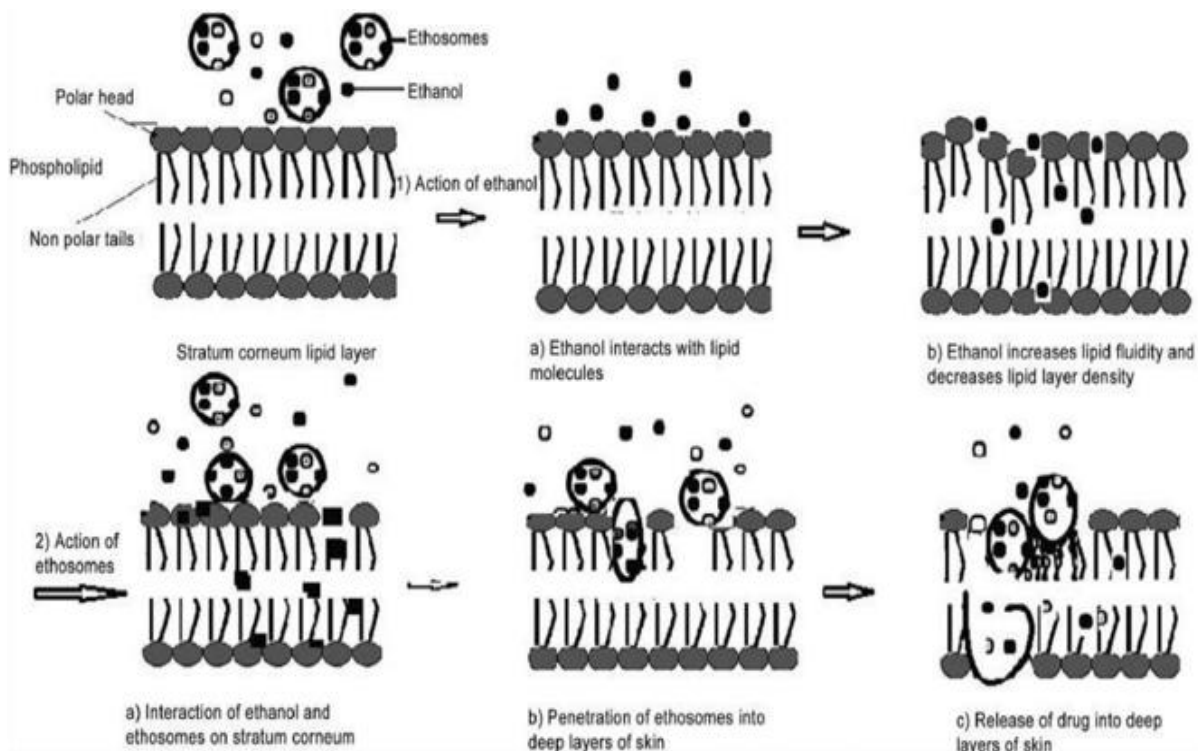
Η αποτελεσματική απελευθέρωση φαρμάκου που παρουσιάζεται, μαζί με τη μακροπρόθεσμη σταθερότητα των αιθωσωμάτων, καθιστά αυτό το σύστημα έναν υποσχόμενο για τη διαδερμική απελευθέρωση του φαρμάκου. Επομένως, όταν ενσωματώνεται σε μια μεμβράνη κυστιδίων, υποδεικνύει ότι τα κυστίδια έχουν την ικανότητα να διεισδύσουν στην κεράτινη στιβάδα. Επίσης, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης, η λιπιδική μεμβράνη συσκευάζεται λιγότερο σφιχτά από τα συμβατικά κυστίδια αλλά έχει ισοδύναμη σταθερότητα, επιτρέποντας μια περισσότερο εύπλαστη δομή. Με αυτόν τον τρόπο δίνει μεγαλύτερη ελευθερία στη μεμβράνη και ικανότητα συμπίεσης μέσω μικρών θέσεων όπως τα ανοίγματα που δημιουργήθηκαν για να διαταράξουν την λιπιδική κεράτινη στιβάδα.

Γενικά, έχει μελετηθεί πως τα διατοσοσώματα έχουν ανώτερες ιδιότητες διείσδυσης σε σύγκριση με τα κλασσικά αιθωσώματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα διατοσοσώματα περιέχουν τόσο την αιθανόλη όσο και τον ενεργοποιητή άκρων ή τον ενισχυτή διείσδυσης, τα οποία και τα δύο δρουν μαζί για να αυξήσουν την ακεραιότητα και την διαταραχή του δέρματος-λιπιδίου (M. Bragagni et al., 2012). Ένας προτεινόμενος μηχανισμός απεικονίζεται στην Σχήμα 14.



Σχήμα 14: Προτεινόμενος μηχανισμός διείσδυσης μορίων από αισθησιακό σύστημα μέσω του δέρματος.

(Α) Απλό δέρμα, (Β) Διατάραξη κεράτινης στιβάδας από λιπίδια, (Γ) Διείσδυση από μαλακά ελατά αισθησιακά σωματίδια.



Σχήμα 15: Μηχανισμός διείσδυσης αιθοσωμικού συστήματος παράδοσης δραστικής ουσίας

1.4.8 Χαρακτηρισμός διαφόρων παραμέτρων σε φυσικοχημικές ιδιότητες αιθοσωμάτων

Τα αιθοσωμικά συστήματα αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια, σχετικά υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (20-50%) και νερό. Είναι γενικά γνωστό ότι υψηλές συγκεντρώσεις αλκοόλης είναι καταστροφικές για τα φυσαλιδώδη συστήματα λιπιδίων εξαιτίας του φαινομένου αλληλεπίδρασης. Συνεπώς, τις περισσότερες φορές γίνεται η απομάκρυνση της αιθανόλης μετά το τέλος της παρασκευής με εξάτμιση (Zath et al., 1990). Η ρευστοποιητική επίδραση της αιθανόλης στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα συμβάλλει στη δημιουργία κυστιδίων με μαλακή ελατή δομή. Αποτελέσματα από P-NMR μελέτες (Benson & McElInay, 1994) έδειξαν ότι σε συγκεντρώσεις αιθανόλης έως 45%, η φωσφατιδυλοχολίνη εμφανίζεται οργανωμένη σε διστιβάδες με τη μορφή κλειστών κυστιδίων. Οι τιμές της αποτελεσματικής χημικής μετατόπισης της ανισοτροπίας ήταν χαμηλότερες από αυτές των λιποσωμάτων, επιβεβαιώνοντας ότι στα αιθοσωμικά συστήματα η κίνηση των πολικών φωσφολιπιδικών ομάδων είναι υψηλότερη από ότι στα λιποσώματα (Touitou et al., 2000). Τα φωσφολιπίδια των αιθοσωμάτων είναι λιγότερο πυκνά δομημένα και η αιθοσωμική μεμβράνη χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη διαπερατότητα κατιόντων.

1.4.9 Μορφή λήψης αιθοσωμάτων

Η πλειοψηφία των δημοσιευμένων άρθρων έχουν μελετήσει τα αιθοσωμικά συστήματα στην αρχική τους μορφή ως εναιωρήματα. Αυτά τα εναιωρήματα περιέχουν υψηλή συγκέντρωση αλκοόλης και επομένως η περαιτέρω ενσωμάτωση του συστήματος σε κατάλληλο φορέα για δερματική/διαδερμική χορήγηση έχει ορισμένα πλεονεκτήματα όπως, η αποτροπή της εξάτμισης της αιθανόλης, παράταση του χρόνου επαφής με το δέρμα, ενίσχυση της

θεραπευτικής αποτελεσματικότητας του παγιδευμένου φαρμάκου, βελτίωση της σταθερότητας και της διάρκειας ζωής της τελικής μορφής δοσολογίας και τη συμβατότητα του ασθενούς. Τα αιθωσωμικά συστήματα έχουν ενσωματωθεί σε διαφορετικούς φορείς για να παραχθούν νέες φαρμακευτικές συνταγοποιήσεις, όπως αιθωσωματικές γέλες, διαδερμικά έμπλαστρα και κρέμες.

Αιθωσωμικές γέλες

Τα αιθωσωματικά πηκτώματα χαρακτηρίζονται ως προς το pH, το ιζώδες, την ικανότητα διασκορπισμού και την δυνατότητα εξώθησης. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι παράγοντες σχηματισμού πηκτής για την ενσωμάτωση σε αιθωσωμικά συστήματα είναι ο Carborol και η υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη με όλες τις σχετικές ποιότητες τους. Αυτά τα πολυμερή έχουν δειχθεί ότι είναι συμβατά με τα αιθωσωμικά συστήματα, παρέχοντας τις απαιτούμενες ιδιότητες ιζώδους και βίο-προσκόλλησης.

Αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει τις ιδιότητες διείσδυσης του δέρματος από τις αιθωσωμικές γέλες σε σύγκριση με τα παραδοσιακά πηκτώματα ή κρέμες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι ο βαθμός απελευθέρωσης του φαρμάκου από το εναιώρημα ήταν γρηγορότερος από ότι το αιθωσωμικό πηκτώμα, λόγω του υψηλού ιζώδους της γέλης (Elnaggar et al., 2014; Esposito et al., 2004).

Αιθωσωμικά έμπλαστρα

Η παρασκευή και η αξιολόγηση των αιθωσωμικών επιθεμάτων είναι πιο περίπλοκη από ότι για τα αιθωσωμικά πηκτώματα, καθώς απαιτούνται καλούπια για την παρασκευή τους. Στη μέχρι και σήμερα σχετική βιβλιογραφία, μόνο επτά ερευνητικά άρθρα είχαν αναφέρει τυποποιήσεις αιθωσωμικού εμπλάστρου για διάφορα φάρμακα.

Διαφορετικά πολυμερή χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αιθωσωμικών έμπλαστρων, συμπεριλαμβανομένης της πολυβινυλοπυρρολιδόνης/οξικού βινυλίου, της ακρυλικής ρητίνης και της υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνης E15. Το κιτρικό τριαιθύλιο προστέθηκε στο σκεύασμα ως πλαστικοποιητής. Τα αιθωσωμικά επιθέματα έχουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα αιθωσωμικά πηκτώματα και τις κρέμες, επειδή προσφέρουν την εφαρμογή αιθωσωμάτων υπό απόμφρακτικές συνθήκες και επομένως αναμένεται μεγαλύτερη διείσδυση (R., et al., 2009).

Αιθωσωμικές κρέμες

Έχουν υπάρξει μόνο δύο μελέτες που αναφέρουν τη σύνθεση των αιθωσωμικών καλλυντικών κρεμών. Και οι δύο αφορούν την ενσωμάτωση αιθωσωμικών συστημάτων με εκχυλίσματα *Curcuma longa* σε βάση κρέμας ως φωτοπροστατευτικό και αντιρυτιδικό παράγοντα. Και στις δύο μελέτες εφαρμόστηκαν αιθωσωμικές κρέμες φορτωμένες με εκχύλισμα *C. longa* σε εθελοντές ανθρώπους και έδειξαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα είτε ως φωτοπροστατευτικό ή αντιρυτιδικό παράγοντα (Kaur & Saraf, 2011)

1.4.10 Πλεονεκτήματα αιθωσωμάτων

- Τα αιθωσωματα βελτιώνουν τη διαπερατότητα του φαρμάκου μέσω διαδερμικής και δερματικής διανομής. Τα αιθωσωματα είναι πλατφόρμες για την παροχή μεγάλων και ποικίλων ομάδων φαρμάκων (πεπτίδια, πρωτεϊνικά μόρια). Τα αιθωσωμικά συστήματα είναι πολύ πιο αποτελεσματικά στην παροχή ενός φθορίζοντος ανιχνευτή (κβαντικές κουκίδες) στο δέρμα όσον αφορά την ποσότητα και το βάθος.
- Χαμηλό προφίλ κινδύνου - Η τεχνολογία δεν παρουσιάζει μεγάλης κλίμακας κίνδυνο ανάπτυξης φαρμάκων, καθώς τα τοξικολογικά προφίλ των συστατικών των αιθωσωμάτων είναι καλά τεκμηριωμένα στην επιστημονική βιβλιογραφία.
- Υψηλή συμμόρφωση των ασθενών-Τα αιθωσωμικά φάρμακα χορηγούνται σε ημιστερεά μορφή (γέλη ή κρέμα), παράγοντας υψηλή συμμόρφωση του ασθενούς. Αντίθετα, η ιοντοφόρηση και η φωνοφόρηση είναι σχετικά περίπλοκη στη χρήση, γεγονός που επηρεάζει τη συμμόρφωση του ασθενούς.
- Υψηλή ελκυστικότητα της αγοράς. Σχετικά απλή κατασκευή χωρίς περίπλοκες τεχνικές επενδύσεις που απαιτούνται για την παραγωγή αιθωσωμάτων.
- Το σύστημα αιθωσωμάτων είναι παθητικό, μη παθητικό και διαθέσιμο για άμεση εμπορική χρήση.
- Διάφορες εφαρμογές στον φαρμακευτικό, διατροφικό και καλλυντικό τομέα.

1.4.11 Μειονεκτήματα αιθωσωμάτων

- Κακή απόδοση.
- Σε περίπτωση που ο εγκλεισμός του δραστικού μορίου στο μόριο είναι αναποτελεσματικός, τότε είναι πιθανή η συσσωμάτωση των αιθωσωμάτων και η υποχώρησή τους κατά τη μεταφορά σε υδατικό περιβάλλον.
- Απώλεια προϊόντος κατά τη μεταφορά από οργανικό σε υδατικό περιβάλλον.

1.4.12 Εφαρμογές αιθωσωμάτων

Η διαδερμική οδός προσφέρει πολλά πιθανά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών οδών όπως η αποφυγή του μεταβολισμού πρώτης διέλευσης, η προβλέψιμη και εκτεταμένη διάρκεια δραστηριότητας, η ελαχιστοποίηση των ανεπαρκών παρενεργειών, η χρησιμότητα των βραχέων φαρμάκων ημιζωής, η βελτίωση της φυσιολογικής και φαρμακολογικής απόκρισης, η αποφυγή των διακυμάνσεων των επιπέδων των φαρμάκων, εσωτερικές και εσωτερικές εκτιμήσεις ασθενών, και το σημαντικότερο, παρέχει την πεποίθηση των ασθενών. Τα αιθωσωματα είναι γνωστά για τη σημασία τους στην κυτταρική επικοινωνία και τη μεταφορά σωματιδίων.

Διαδερμική χορήγηση ορμονών

Η στοματική χορήγηση ορμονών συνδέεται με προβλήματα όπως ο υψηλός πρώτος μεταβολισμός, η χαμηλή από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα και αρκετές παρενέργειες που

εξαρτώνται από τη δόση. Επιπλέον, μαζί με αυτές τις ανεπιθύμητες ενέργειες από του στόματος χορηγούμενα ορμονικά παρασκευάσματα βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στη συμμόρφωση του ασθενούς. Ο κίνδυνος αποτυχίας της θεραπείας είναι γνωστό ότι αυξάνεται με κάθε χάπι που χάθηκε.

Τοπική χορήγηση DNA

Πολλά περιβαλλοντικά παθογόνα επιχειρούν να εισέλθουν στο σώμα μέσω του δέρματος. Κατά συνέπεια, το δέρμα έχει εξελιχθεί σε ένα εξαιρετικό προστατευτικό φράγμα, το οποίο είναι επίσης ανοσολογικά ενεργό και ικανό να εκφράζει το γονίδιο. Με βάση τα ανωτέρω γεγονότα μια άλλη σημαντική εφαρμογή των αιθοσωμάτων είναι η χρήση τους για τοπική απελευθέρωση μορίων DNA για την έκφραση γονιδίων στα κύτταρα του δέρματος. Έχει προταθεί ότι τα αιθωσώματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς για εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας που απαιτούν παροδική έκφραση γονιδίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης τη δυνατότητα χρήσης αιθωσωμάτων για αποτελεσματική διαδερμική ανοσοποίηση. Ως εκ τούτου, η καλύτερη ικανότητα διείσδυσης του δέρματος στα αιθωσώματα ανοίγει τη δυνατότητα χρήσης αυτών των μορφών δοσολογίας για τη χορήγηση ανοσοποιητικών παραγόντων.

Χορήγηση αντιβιοτικών

Η τοπική χορήγηση αντιβιοτικών είναι μια καλύτερη επιλογή για την αύξηση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας αυτών των παραγόντων. Η συμβατική στοματική θεραπεία προκαλεί διάφορες αλλεργικές αντιδράσεις μαζί με πολλές παρενέργειες. Τα συμβατικά εξωτερικά παρασκευάσματα έχουν χαμηλή διαπερατότητα σε βαθιά στρώματα δέρματος και υποδερμικούς ιστούς. Τα αιθωσώματα μπορούν να παρακάμψουν αυτό το πρόβλημα παρέχοντας επαρκή ποσότητα αντιβιοτικού στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος. Τα αιθωσώματα διεισδύουν ταχέως μέσω της επιδερμίδας και φέρνουν αισθητή ποσότητα φαρμάκων στο βαθύτερο στρώμα του δέρματος και καταστέλλουν τη λοίμωξη στη ρίζα τους. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η αιθωσωματική σύνθεση του αντιβιοτικού θα μπορούσε να είναι εξαιρετικά αποτελεσματική και θα ξεπερνούσε τα προβλήματα που σχετίζονται με τη συμβατική θεραπεία.

Χορήγηση προβληματικών φαρμακευτικών μορίων

Η χορήγηση από το στόμα μεγάλων βιογενών μορίων, όπως πεπτιδίων ή πρωτεϊνών, είναι δύσκολη επειδή είναι πλήρως αποικοδομημένη στη γαστρεντερική οδό. Η μη επεμβατική παράδοση πρωτεϊνών είναι μια καλύτερη επιλογή για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που σχετίζονται με την στοματική χορήγηση. Οι ερευνητές έχουν διερευνήσει την επίδραση της χορήγησης αιθωσωματικής ινσουλίνης στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης αίματος *in vivo* σε φυσιολογικούς και διαβητικούς αρουραίους. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι η ινσουλίνη που χορηγήθηκε από αυτό το έμπλαστρο προκάλεσε σημαντική μείωση (έως 60%) στο γλυκαιμικό δείκτη τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε διαβητικούς αρουραίους. Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή ινσουλίνης από ένα σκεύασμα ελέγχου δεν ήταν σε θέση να μειώσει το δείκτη αυτόν.

2 Πειραματικό Μέρος

2.1 Σκοπός

Στόχος της ερευνητικής εργασίας είναι αρχικά η εκχύλιση πρόπολης υποβοηθούμενη από υπερήχους όπως και μαγνητικής ενέργειας σε διαλύτη EtOH-H₂O και στη συνέχεια ο εγκλεισμός του εκχυλίσματος της πρόπολης (ΕΠ) σε β-CD και λιποσώματα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εγκλεισμοί: i) παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού του ΕΠ σε β-CD με τη μέθοδο συν-καταβύθισης, ii) εγκλεισμός του ΕΠ σε λιποσώματα σχηματιζόμενα από φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και iii) εγκλεισμός του ΕΠ σε λιποσώματα PC με χρήση χοληστερόλης (CHOL) ως σταθεροποιητικό μέσο. Προκειμένου να αυξηθεί ο χρόνος απελευθέρωσης και η ικανότητα των νανοσωματιδίων να διαπερνούν τη στιβάδα του δέρματος πραγματοποιήθηκε η παρασκευή διπλών συστημάτων που αποτελούνται από λιποσώματα και σύμπλοκα εγκλεισμού β-CD-ΕΠ ή/και με ΕΠ, μέσω διαφόρων τεχνικών. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ενσωμάτωση των λιποσωμάτων με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά σε καλλυντική κρέμα, προκειμένου να αξιοποιηθούν οι ευεργετικές ιδιότητες του εκχυλίσματος.

Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων εγκλεισμού ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) ενώ ο προσδιορισμός των θερμικών ιδιοτήτων των συμπλόκων, μέσω της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) και της Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA). Ο χαρακτηρισμός της δομής των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε μέσω των μεθόδων φασματοσκοπίας υπέρυθρου (FT-IR) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ενώ η μορφολογία των συμπλόκων μελετήθηκε με χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM).

2.2 Όργανα & συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό, αλλά και τον χαρακτηρισμό του εκχυλίσματος της πρόπολης αλλά και των νανοσωματιδίων είναι:

- Φασματόμετρο UV/Vis/NIR Jasco V770
- Φασματόμετρο FT-IR/FT-IR – 4200 Jasco NMR Varian 600 MHz (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών)
- Vibra-Cell VCX 750 (20 kHz, 750 W) εξοπλισμένο με επεξεργαστή υπερήχων (Sonics and Materials Inc., Newtown USA) και probe διαμέτρου 13 mm από κράμα τιτανίου Ti-6Al-4V
- RV-5 Edwards αντλία υψηλού κενού
- Buchi Rotavapor® R-210, περιστροφικός εξατμιστήρας
- Φασματοφωτόμετρο NMR, 600 MHz, Varian V600.
- TGA/DSC 1 STAR System Thermobalance (Mettler Toledo)
- DSC 1 STAR System (Mettler Toledo)
- Όργανο μέτρησης Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering – DLS) Zetasizer Nano ZS της Malvern

Η μελέτη δομής των συμπλόκων εγκλεισμού με τη β-CD πραγματοποιείται μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Τα φάσματα ^1H (πρωτονίου) NMR, έχουν καταγραφεί με τα όργανα Varian V300 MHz και V600 MHz του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε οξείδιο του δευτερίου (D_2O). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm, ενώ η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR αναφέρεται ως: s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), q (quartet, τετραπλό), m (multiplet, πολλαπλό), br (broad, ευρύ), dd (doublet of doublets, διπλή διπλών), tt (triplet of triplets, τριπλή τριπλών) και td (triplet of doublets, τριπλή διπλών).

2.3 Υλικά

Η πρόπολη προήλθε από το νησί της Κιμώλου, η β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) με καθαρότητα >99% και MW=1134.98 g/mol αγοράστηκε από την εταιρία Fluka (Gillingham, England), L-a-Phosphatidylcholine (PC) και η χοληστερόλη, με καθαρότητα >99% και MW=386.65 g/mol αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich -Life science (Product of USA). Η αιθανόλη 99.8% αγοράστηκε από την εταιρία ACROS ORGANICS. Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό.

Για τη δημιουργία καλλυντικής κρέμας εμπλουτισμένης με λιποσώματα DLL, όλες οι βασικές πρώτες ύλες ήταν ευγενική προσφορά της εταιρίας χημικών CELLCO Χημικά (Ενότητα 2.10, Πίνακας 6).

Τα προαναφερθέντα υλικά χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

2.4 Κατεργασία πρόπολης

Η πρόπολη που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας συλλέχθηκε από Ελληνικό νησί και συγκεκριμένα το νησί της Κιμώλου κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου 2017. Πριν την διαδικασία εκχύλισης, η πρόπολη φυλάσσεται σε προστατευμένο από ηλιακή ακτινοβολία μέρος στους 4°C. Κατά την ανάλυση, τα δείγματα πρόπολης διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Η ρητινώδης φύση της ακατέργαστης πρόπολης δυσχεραίνει την αξιοποίησή της σε αυτή τη μορφή (ενότητα 1.1.4). Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας της, η πρόπολη τεμαχίζεται (Σχήμα 16) με σκοπό την αύξηση της επιφάνειάς της και την ευκολότερη εκχύλιση των συστατικών της στο διαλύτη.

2.5 Διεργασία εκχύλισης πρόπολης

2.5.1 Γενική Μέθοδος

1 ή 2 g μη επεξεργασμένης πρόπολης Κιμώλου κοκκοποιείται για την επίτευξη μεγαλύτερης επιφάνειας διαβροχής και ευκολότερη διάλυση των συστατικών της στο διαλύτη (Σχήμα 16.) Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 40 mL (ή 20 mL για το 1 gr πρόπολης), περιεκτικότητας 70% σε αιθανόλη (EtOH) και 30% σε απιονισμένο H₂O. Στη συνέχεια γίνεται ανάμειξη του διαλύτη και της πρόπολης και ακολουθεί η εκχύλιση της πρόπολης είτε με τη χρήση υπερήχων είτε με την επιβολή μαγνητικής ανάδευσης. Ακολουθεί διήθηση του αιωρήματος σε Bach με ηθμό Whatman No 1 με την χρήση αντλίας κενού με σκοπό την απομάκρυνση των μεγαλύτερων μορίων και στη συνέχεια διήθηση με ηθμό πορώδους 3 dnm. Στη συνέχεια το αιώρημα οδηγείται σε φυγοκέντρηση με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων μεγάλων μορίων πρόπολης. Για την απομάκρυνση του διαλύτη και τη ζύγιση της εκχυλισμένης πρόπολης χρησιμοποιείται περιστροφικός εξατμιστήρας Rotary υπό κενό σε θερμοκρασία 60 °C. Λόγω της υψηλής υδατικής περιεκτικότητας του διαλύτη απαιτείται περισσότερος χρόνος εξάτμισης του, συγκριτικά με τον χρόνο της EtOH. Για αυτόν τον λόγο η εξάτμιση υποβοηθάται με χρήση επιπλέον 20 mL EtOH. Για την πλήρη εξάτμιση των διαλυτών, το φιλμ που έχει δημιουργηθεί οδηγείται σε αντλία υψηλού κενού.



Σχήμα 16: Κοκκοποιημένη πρόπολη προς διάλυση

2.6 Μελέτη εκχύλισης πρόπολης

2.6.1 Εκχύλιση με Υπερήχους

Η εκχύλιση με τεχνικές υψηλής ενέργειας αποτελεί μία σύγχρονη διεργασία η οποία επηρεάζεται από πληθώρα παραμέτρων. Σε αυτήν τη μελέτη οι παράμετροι που μελετήθηκαν είναι (i) ο χρόνος εκχύλισης (min), (ii) η ισχύς των υπερήχων (W), (iii) η ποσότητα πρόπολης προς εκχύλιση (g). Στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 4) παρουσιάζονται οι διαφορετικοί συνδυασμοί που πραγματοποιήθηκαν.

Η αναλογία του διαλύτη EtOH/H₂O (v/v) που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ήταν σταθερή και ίση με 70:30.

Πίνακας 4. Εκχύλιση πρόπολης υποβοηθούμενη από υπερήχους

A/A	Χρόνος (min)	% Ισχύς Υπερήχων (W)	Πρόπολη (g)	Κωδικός
1	45	26	2	GS1
2	45	35	2	GS2
3	60	38	1	GS3
4	60	40	1.5	GS4
5	30	30	1	GS5
6	45	38	1	GS6
7	45	38	1.5	GS7

2.6.2 Εκχύλιση υπό μαγνητική ανάδευση

Η εκχύλιση υπό μαγνητική ανάδευση πραγματοποιήθηκε με σκοπό να συγκριθεί η αποδοτικότητά της σε σχέση με αυτή της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους. Το εκχύλισμα πρόπολης δημιουργήθηκε έπειτα από ανάδευση σε συγκεκριμένη ένταση και για καθορισμένο χρονικό διάστημα και ακολούθησε ένας κύκλος τριών ψύξεων. Πιο συγκεκριμένα το ΕΠ διατηρήθηκε στην υπερ-κατάψυξη (-40 °C) για μία ημέρα και ακολούθησε διήθησή με σκοπό την απομάκρυνση κάθε ίχνους ελαίων και ρητινών αδιάλυτων στο διαλύτη αιθανόλης-νερού. Ο κύκλος ψύξης επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε δείγμα της συγκεκριμένης μεθόδου.

Οι παράμετροι που μελετήθηκαν είναι (i) η ποσότητα της πρόπολης προς εκχύλιση (g), (ii) η ένταση της μαγνητικής ανάδευσης (rpm) και ο χρόνος (min) ανάδευσης. Οι διαφορετικοί συνδυασμοί που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Εκχύλιση πρόπολης υπό μαγνητική ανάδευση

A/A	Χρόνος (h)	Ένταση ανάδευσης (rpm)	Πρόπολη (g)	Κωδικός
1	72	500	2	GS8
2	72	800	1	GS9
3	96	1000	1.5	GS10
4	96	500	1	GS11

2.7 Παρασκευή Συμπλόκων εγκλεισμού β-CD-πρόπολης (IC)

Μέθοδος εγκλεισμού – Συν-καταβύθιση

Η μέθοδος που εφαρμόζεται στην παρούσα εργασία για την δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού σε β-CD είναι αυτή της συν-καταβύθισης σύμφωνα με τη περιγραφή των Sun et al., (2014) με μικρή διαφοροποίηση (Kotronia et al., 2017). Σε μία εσφυρισμένη κωνική φιάλη προστίθενται 200 mg β-CD και 2.5 mL διαλύματος αιθανόλη-υπερκάθαρου νερού σε αναλογία 1:2 με σκοπό την πλήρη διάλυση της ουσίας στους 55 ± 1 °C υπό έντονη μαγνητική ανάδευση σε αναρροή. Το διάλυμα παραμένει σε μαγνητική ανάδευση υπό θερμότητα για 20-45 λεπτά ώσπου να μεταφερθεί από την θολή σε πλήρως διαυγή κατάσταση.

Παράλληλα, σε μία σφαιρική φιάλη 49 mg εκχυλισμένης πρόπολης διαλύονται σε 10 mL διαλύτη αιθανόλης-νερού σύστασης 70-30% υπό συνεχή ανάδευση στους 40 °C και ακολουθείται ανάδευση Vortex για 2 λεπτά. Η διαλυμένη πρόπολη προστίθεται στάγδην στο διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης με ροή 1 mL/min όπου και παρατηρείται η δημιουργία γαλακτώματος. Μετά το πέρας της ανάμειξης το σχηματιζόμενο γαλάκτωμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 25 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας και μεταφέρεται στους 4 °C για 24 ώρες.

Ακολουθεί διήθηση και παραλαβή του συμπλόκου εγκλεισμού, το οποίο τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού προς πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας και παραλαβή του ξηρού συμπλόκου σε μορφή λευκής σκόνης. Τέλος, ζυγίζεται η ποσότητα του συμπλόκου που συλλέγεται και φυλάσσεται σε ξηραντήρα.

2.8 Εγκλεισμός πρόπολης σε λιποσώματα (PP,PPC)

2.8.1 Εγκλεισμός πρόπολης σε λιποσώματα (PP)

Μέθοδος εγκλεισμού – Δημιουργία και ενυδάτωση λεπτού φιλμ

Για την παρασκευή των λιποσωμάτων με εκχύλισμα πρόπολης ακολουθείται η τεχνική της δημιουργίας λιπιδικού φιλμ και η μετέπειτα ενυδάτωσή του με εκχύλισμα πρόπολης. Πιο συγκεκριμένα, σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 250 mL προστίθενται 250 mg φωσφατιδυλοχολίνης (PC). Η PC διαλύεται 40 mL διχλωρομεθανίου μετά από χρήση αναδευτήρα Vortex. Ακολουθεί η απομάκρυνση του διαλύτη σε εξατμιστήρα Rotary σε θερμοκρασία δωματίου και χρήση αντλίας κενού 4-5 ώρες για την απομάκρυνση κάθε ίχνους διαλύτη. Παράλληλα 49 mg πρόπολης ζυγίζονται και διαλύονται σε 30 mL διαλύτη αιθανόλης-νερού αναλογίας 70-30% v/v. Η πλήρης διάλυση υποβοηθάτε με χρήση θερμού λουτρού στους 50 °C. Το διάλυμα πρόπολης προστίθεται στο φιλμ στους 42 °C σε ήπια ανάδευση για μία ώρα.

Τα λιποσώματα που έχουν δημιουργηθεί οδηγούνται προς μείωση του μεγέθους τους με τη χρήση υπερήχων. Στη συνέχεια ακολουθεί λυοφιλοποίηση των δειγμάτων και φύλαξή τους, σε ξηρή μορφή στους 4 °C μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας.

2.8.2 Εγκλεισμός πρόπολης σε λιποσώματα με χρήση CHOL ως σταθεροποιητικό μέσο (PPC)

Μέθοδος εγκλεισμού – Δημιουργία και ενυδάτωση λεπτού φιλμ

Για την παρασκευή των λιποσωμάτων ακολουθείται η τεχνική δημιουργίας λιπιδικού φιλμ όπως περιγράφεται παραπάνω με τη μόνη διαφορά πως γίνεται χρήση χοληστερόλης ως σταθεροποιητικό μέσο. Πιο συγκεκριμένα, σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 250 mL προστίθενται 250 mg φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και 107 mg χοληστερόλης αναλογίας 10:3. Τα λιπίδια διαλύονται σε 40 mL διχλωρομεθανίου μετά από χρήση αναδευτήρα Vortex. Ακολουθεί η απομάκρυνση του διαλύτη σε εξατμιστήρα Rotary σε θερμοκρασία δωματίου και χρήση αντλίας κενού 4-5 ώρες για την απομάκρυνση κάθε ίχνους διαλύτη.

Παράλληλα η ενυδάτωση πραγματοποιείται με διάλυμα 62.7 mg πρόπολης σε 30 mL EtOH-H₂O αναλογίας 70-30%, η πλήρης διάλυση του οποίου υποβοηθάτε με τη χρήση θερμού λουτρού στους 50 °C. Το διάλυμα προστίθεται στο λεπτό λιπιδικό φιλμ και το μίγμα παραμένει σε ανάδευση για μία ώρα στους 42±1 °C.

Τα λιποσώματα που έχουν δημιουργηθεί οδηγούνται προς μείωση του μεγέθους τους με τη χρήση υπερήχων. Στη συνέχεια ακολουθεί λυοφιλοποίηση των δειγμάτων και φύλαξή τους, σε ξηρή μορφή στους 4 °C μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας.

2.9 Εγκλεισμός IC προς το σχηματισμό διαφορετικών τύπων λιποσωμάτων

2.9.1 Εγκλεισμός συμπλόκου β-CD-πρόπολης σε PC-CHOL (Thin film hydration, LCP)

Ο εγκλεισμός αυτός πραγματοποιείται με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού υμενίου λιπιδίων με παρόμοιο τρόπο όπως εκείνο του εγκλεισμού εκχυλίσματος πρόπολης σε λιποσώματα.

Αρχικά, ζυγίζονται 60 mg PC και 40 mg CHOL και μεταφέρονται σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη όπου προστίθεται 1 mL οργανικού διαλύτη διχλωρομεθάνιο (ελάχιστη ποσότητα διαλύτη για πλήρη διάλυση των λιποσωμάτων). Το αιώρημα αναδεύεται σε αναδευτήρα τύπου Vortex για 5-6 λεπτά. Για το σχηματισμό του λεπτού φιλμ το διάλυμα εξατμίζεται σε Rotary στους 55 °C και στη συνέχεια μεταφέρεται σε αντλία υψηλού κενού για 3 ώρες προς απομάκρυνση κάθε ίχνος διαλύτη.

Παράλληλα, 10 mg συμπλόκου β-CD-πρόπολης διασπείρονται σε 4 mL υπερκάθαρου νερού υπό μαγνητική ανάδευση για μία ώρα. Με μία σύριγγα και υπό ανάδευση μεταφέρεται στάγδην το διεσπαρμένο σύμπλοκο στο λιπιδικό φιλμ και αφήνεται για ανάδευση στα 550 rpm για επτά ώρες. Τα λιποσώματα λυοφιλοποιούνται και φυλάσσονται σε ξηρή μορφή στους 4 °C.

2.9.2 Εγκλεισμός εκχυλίσματος πρόπολης και IC σε PC-CHOL (Ethanol Injection Method, DLL)

Ο εγκλεισμός πραγματοποιείται με τη μέθοδο έγχυσης αιθανόλης. Η αναμενόμενη ποσότητα PC (50 mg) και χοληστερόλης (25 mg) διαλύονται σε καθαρή αιθανόλη (5 mL) υπό ανάδευση. Για την πραγματοποίηση του πρώτου εγκλεισμού του εκχυλίσματος της πρόπολης στη

διπλοστοιβάδα προστίθεται πρόπολη συγκέντρωσης 12.5 mg στο παραπάνω διάλυμα αιθανόλης-λιπιδίων. Αυτή η οργανική φάση προστίθεται σε ικανή ποσότητα υδατικού διαλύματος (20 mL) που εμπεριέχει ποσότητα συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνης-πρόπολης (10 mg) με ροή 1 mL/min υπό μαγνητική ανάδευση (400 rpm) στους 55 °C, θερμοκρασία ανώτερη της θερμοκρασίας αλλαγής φάσης της φωσφατιδυλοχολίνης.

Ο αυθόρμητος σχηματισμός των λιποσωμάτων επιτυγχάνεται τη στιγμή ενοποίησης της οργανικής και της υδατικής φάσης. Στη συνέχεια, το λιπιδικό αιώρημα αναδεύεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικά, η αιθανόλη και μέρος υπερκάθαρου νερού απομακρύνονται με εξάτμιση Rotary στους 40 °C σε μειωμένη πίεση και η διασπορά φυλάσσεται στους 4 °C. Ακολουθεί λυοφιλοποίηση και διατήρηση των διπλά φορτωμένων λιποσωμάτων σε ξηρή μορφή σε χαμηλή θερμοκρασία (4 °C).

2.9.3 Εγχειρισμός IC σε PC-CHOL για τη δημιουργία αιθοσωμάτων (Cold method, ETH)

Το αιθοσωμικό σύστημα που μελετήθηκε συντέθηκε από 2-5% με PC, 20-50% αιθανόλη, σύμπλοκο β-CD-πρόπολης και απιονισμένο νερό 100% w/w και ακολουθήθηκε η ψυχρή μέθοδος.

Αρχικά γίνεται η ζύγιση των λιπιδίων (10 mg PC και 3 mg CHOL) σε ύαλο και έπειτα ακολουθεί η διαλύση τους σε 4 mL EtOH. Λόγω της μικρής διαλυτότητας των λιπιδίων στην αιθανόλη απαιτείται μαγνητική ανάδευση στα 700 rpm μέχρι τη πλήρη διάλυση τους για 3-4 ώρες. Στην συνέχεια προστίθενται 10 mg συμπλόκου β-CD-πρόπολης και το μίγμα τοποθετείται για 45 λεπτά σε μαγνητική ανάδευση στους 35 °C σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη σε αναρροή.

Παράλληλα θερμαίνονται 6 mL υπερκάθαρου νερού στους 35 °C. Μετά το πέρας των 45 λεπτών γίνεται η προσθήκη νερού στάγδην στην οργανική φάση όπου και το μίγμα αφήνεται σε μαγνητική ανάδευση για 24 ώρες. Μετά το τέλος της επεξεργασίας η διασπορά λυοφιλοποιείται και τα ξηρά λιποσώματα φυλάσσονται στους 4 °C.

2.10 Δημιουργία κρέμας με περιεκτικότητα DLL λιποσωμάτων

Με σκοπό την αξιοποίηση των ευεργετικών ιδιοτήτων της πρόπολης πραγματοποιείται η παρασκευή καλλυντικής κρέμας με ενσωματωμένα λιποσώματα. Η επιλογή των λιποσωμάτων που ενσωματώθηκαν στην καλλυντική κρέμα έγινε βάση τη σταθερότητας τους αλλά και της υψηλής περιεκτικότητας τους σε εκχύλισμα πρόπολης (ενότητα 3.2.4). Συνεπώς επιλέχθηκαν τα διπλά φορτωμένα λιποσώματα (DLL) καθώς εμπεριέχουν ΕΠ στην λιπόφιλη διπλοστοιβάδα αλλά και στο σύμπλοκο β-CD-πρόπολης στον υδρόφιλο πυρήνα.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την δημιουργία της καλλυντικής κρέμας εμπλουτισμένης με λιποσώματα τύπου DLL ήταν η δημιουργία γαλακτώματος όπου διασπορά νερού-γλυκερίνης προστίθεται στάγδην σε διάλυμα ελαίου (Πίνακας 6, Φάση Β). Επιπλέον για την ομογενοποίηση των δύο φάσεων χρησιμοποιούνται υπέρηχοι σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.

Πίνακας 6 Δραστικές ουσίες και φάσεις καλλυντικής κρέμας

	Δραστική ουσία	Βάρος (%)	Ποσότητα (gr)
ΦΑΣΗ Α			
1	Aqua	67,050	248,200
2	Glycerin	2,000	8,000
ΦΑΣΗ Β			
3	C12-20 Acid PEG-8 Esters	6,000	24,000
4	Glyceryl Stearate, PEG-100 Stearate	4,500	18,000
5	Glyceryl Stearate	2,500	10,000
6	Cetearyl Alcohol	2,400	9,600
7	Dimethicone	0,500	2,000
8	Cetearyl Ethylhexanoate	1,150	4,600
9	Hydrogenated Polydecene	3,000	12,000
10	Hydrogenated Ethylhexyl Olivat, Hydrogenated Olive Oil Unsaponifiables	2,000	8,000
11	Coco-Caprylate/Caprata	3,400	13,600
12	Sesamum Indicum (Sesame) Seed Oil	1,000	4,000
13	Tocopheryl Acetate	0,200	0,800
ΦΑΣΗ Γ			
14	Butylene Glycol	3,000	12,000
15	Phenoxyethanol, Chlorphenesin	1,000	4,000
ΦΑΣΗ Δ			
16	Parfum Olive care	0,300	1,200
	Σύνολο	100,000	400,000

Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούνται οι διαφορετικές φάσεις, απαραίτητες για την δημιουργία της καλλυντικής κρέμας. Η φάση Α αντιστοιχεί στην υδατική φάση ενώ η φάση Β στη ελαιώδη φάση. Απαραίτητη είναι η παρουσία γαλακτωματοποιητών (φάση Γ) με σκοπό την ομογενοποίηση μεταξύ των φάσεων Α και Β. Τέλος, γίνεται η προσθήκη ελαίων και αρωμάτων (Parfum Olive care και Sesamum Indicum Seed Oil) όπου προσδίδεται η χαρακτηριστική ευχάριστη οσμή.

Σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία για την υδατική φάση, σε μία εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 250 mL προστίθενται το υπερκάθαρο νερό και η γλυκερίνη και θερμαίνονται στους 72 ± 1 °C υπό έντονη μαγνητική ανάδευση σε αναρροή. Το διάλυμα παραμένει σε μαγνητική ανάδευση υπό θερμότητα για 20-45 λεπτά ώσπου να διαλυθεί πλήρως η γλυκερίνη. Στην προετοιμασία της ελαιώδη φάσης, οι δραστικές ουσίες 3-11 (Πίνακας 6) ζυγίζονται σε ποτήρι ζέσεως και μεταφέρονται σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 250 mL όπου τήκονται σε θερμοκρασία 78 ± 1 °C για 30-40 λεπτά. Μετά την πλήρη τήξη των ουσιών γίνεται η προσθήκη του Sesame seed oil και της Vitamin E (12 και 13 του πίνακα αντίστοιχα) με τελική θερμοκρασία 72 ± 1 °C.

Ακολουθεί η ανάμιξη των φάσεων Α και Β με την υδατική φάση να προστίθεται στάγδην στη ελαιώδη με ροή 1 mL/min όπου και παρατηρείται η δημιουργία γαλακτώματος. Η

ομογενοποίηση του γαλακτώματος πραγματοποιείται με χρήση υπερήχων έντασης 30% της μέγιστης έντασης (750 W) με παλμό 9 sec ενεργό και 5 sec ανενεργό για 2.5 λεπτά. Η ομογενοποίηση ολοκληρώνεται με τη προσθήκη της φάσης Γ σε θερμοκρασία 45 °C καθώς και τη προσθήκη αρώματος υπό συνεχή ανάδευση με μεταλλική σπάτουλα. Τέλος, για την ενσωμάτωση των λιποσωμάτων στην κρέμα προστίθενται σε αυτή 20 mL από τη διασπορά των λιποσωμάτων DLL υπό συνεχή ανάδευση για 5 λεπτά.

Η κρέμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι περαιτέρω χρήση σε σκιαρό μέρος και θερμοκρασία όχι υψηλότερη από 35 °C.



Σχήμα 17: Καλλυντική κρέμα εμπλουτισμένη σε λιποσώματα DLL

2.11 Χαρακτηρισμός συμπλόκων εγκλεισμού και λιποσωμάτων

2.11.1 Απόδοση διεργασίας

Η απόδοση της διεργασίας της εκχύλισης υπολογίζεται από τη ποσότητα της εκχυλισμένης πρόπολης προς την αρχική ποσότητα της πρόπολης που χρησιμοποιήθηκε, όπως παρουσιάζεται στην Εξίσωση 2.

$$\text{Απόδοση διεργασίας} = \frac{\text{μάζα εκχυλισμένης πρόπολης}(mg)}{\text{μάζα ακατέργαστης πρόπολης}(mg)} 100\% \quad (\text{Εξ. 2})$$

2.11.2 Προσδιορισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς, PDI και ζ-δυναμικού

Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων εγκλεισμού και των λιποσωμάτων ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) με χρήση του οργάνου Zetasizer Nano ZS. Για τη μέτρηση δημιουργείται κατάλληλο δείγμα όπου 1 mg ξηρού συμπλόκου β-CD-πρόπολης και 20 mL υπερκάθαρου νερού αφήνονται υπό μαγνητική ανάδευση για 5 ώρες.

Πριν από κάθε μέτρηση απαιτείται η δημιουργία μίας τυποποιημένης λειτουργικής διαδικασίας (Standard Operating Procedure, SOP). Δημιουργούνται δύο αρχεία SOP για κάθε μετρούμενο δείγμα ένα ως προς μέγεθος και ένα ως προς το ζ-δυναμικό. Στα αρχεία αυτά συμπληρώνονται πληροφορίες για το δείγμα, την κυψελίδα και το πρωτόκολλο μέτρησης. Ειδικότερα, απαιτείται μέτρηση του δείκτη διάθλασης και προσδιορισμός της απορρόφησης της διασποράς μέσω φασματομετρίας ορατού-υπεριώδους στο μήκος κύματος που εκπέμπει το laser της συσκευής που χρησιμοποιείται (633 nm). Τόσο για τη μέτρηση του μεγέθους όσο και για τη μέτρηση του ζ-δυναμικού χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής κυψελίδα τύπου DTS1070, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25±1 °C εις τριπλούν. Τα παραπάνω στοιχεία παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Πειραματικά δεδομένα νανοσωματιδίων στο σύστημα SOP.

Δείγμα	pH	Δείκτης Διάθλασης	Απορρόφηση(633nm)	Θερμοκρασία(°C)
LP	7	1.3327	0.08	25±1
IC	7	1.3334	0.71	25±1
LCP	7	1.3332	0.26	25±1
DLL	7	1.3329	0.07	25±1
ETH	7	1.3335	0.01	25±1

Με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού λαμβάνονται οι μετρήσεις που αφορούν το μέγεθος, το δείκτη διάθλασης και το ζ-δυναμικό. Για κάθε ένα από τα μεγέθη πραγματοποιείται 1 σετ των τριών μετρήσεων και η τιμή λαμβάνεται ως ο μέσος όρος ±SD.

2.11.3 Μελέτη δομής μέσω υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Με τη φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι δυνατή η μελέτη των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται με το σχηματισμό των νανοσωματιδίων. Αρχικά λαμβάνονται τα φάσματα απορρόφησης FT-IR της β-CD, της πρόπολης, της φωσφατιδυλοχολίνης καθώς και τα φυσικά μείγματα β-CD-πρόπολης, πρόπολης-λιποσώματα, β-CD-λιποσώματα σε αναλογίες αντίστοιχες με αυτές που εφαρμόστηκαν για την δημιουργία των συμπλόκων εγκλεισμού. Η αξιολόγηση των φασμάτων λαμβάνει μέρος με σκοπό τον εντοπισμό των διαφορών που υπάρχουν μεταξύ αυτών, επιβεβαιώνοντας την επιτυχία του κάθε εγκλεισμού. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος παρασκευής δισκίων βρωμιούχου καλίου (KBr pellets) με τη χρήση κατάλληλης πρέσας.

Προκειμένου να παρασκευαστούν οι παστίλιες, αναμειγνύονται ελάχιστες ποσότητες από το προς ανάλυση δείγμα με βρωμιούχο κάλιο σε ιγδίο από αχάτη. Το άλας αυτό χρησιμοποιείται, διότι τα άλατα έχουν πολύ μικρή απορρόφηση στο IR. Η αναλογία της ουσίας προς ανάλυση και του χλωριούχου βρωμίου είναι περίπου 1:20-1:40. Η αναλογία αυτή είναι εμπειρική και εξαρτάται από το δείγμα. Για παράδειγμα, εάν η προς ανάλυση ουσία δίνει μεγάλες και έντονες κορυφές, απαιτείται μικρότερη ποσότητα δείγματος.

Αφού το παραπάνω μίγμα ομογενοποιηθεί και κονιορτοποιηθεί πολύ καλά στο ιγδίο, τοποθετείται σε κατάλληλο φορέα ανάμεσα σε δύο μικρούς ατσάλινους κυλίνδρους, ο οποίος με τη σειρά του εισέρχεται στην ειδική θέση της πρέσας, όπου και παραμένει για 2 λεπτά ώστε

να δημιουργηθεί το επιθυμητό δισκίο. Το δισκίο που παρασκευάζεται πρέπει να είναι ομοιόμορφο, με μη ορατές ακαθαρσίες ή στίγματα. Σημαντικό ρόλο στη λήψη του φάσματος έχει και η ποιότητα του δισκίου. Πολύ μικρή ποσότητα ουσίας δεν δίνει ικανοποιητικό φάσμα, ενώ πολύ μεγάλη ποσότητα αποδίδει μεγάλες κορυφές απορρόφησης οι οποίες είναι εκτός κλίμακας, με αποτέλεσμα το φάσμα να είναι μη αναγνώσιμο.

Το δισκίο μεταφέρεται σε κατάλληλο υποδοχέα και προσαρμόζεται στη θέση του φασματοφωτόμετρου, έτσι ώστε η εξερχόμενη από τη πηγή ακτινοβολία να διέρχεται από το κέντρο της παστίλιας.

2.11.4 Μελέτη δομής συμπλόκου εγκλεισμού IC μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Στην προετοιμασία των δειγμάτων πριν τη μέτρηση, ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν το οξείδιο του δευτερίου (D₂O) και οι μετρήσεις καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Varian 300 MHz (Varian, Palo Alto, CS, USA). Οι σταθερές σύζευξης (*J*) εκφράζονται σε Hertz (Hz) και οι χημικές μετατοπίσεις (*δ*) αναφέρονται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm) σε σχέση με τον διαλύτη. Στην περίπτωση των συμπλόκων εγκλεισμού με τη β-CD υπολογίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της ελεύθερης β-CD και της β-CD στο σύμπλοκο, και η διαφορά των οποίων προσφέρει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φιλοξενούμενου μορίου-μορίου ξενιστή.

2.11.5 Θερμική ανάλυση μέσω Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης είναι μία θερμική τεχνική, όπου η διαφορά ροής θερμότητας προς μία ένωση-δείγμα και προς μία ένωση αναφοράς καταγράφεται, ως συνάρτηση του δείγματος, όταν οι δύο ενώσεις υπόκεινται σε ένα ελεγχόμενο πρόγραμμα θερμοκρασίας. Ειδικότερα, σε δύο θερμαινόμενους υποδοχείς τοποθετούνται κατάλληλες κυψελίδες, η μία περιέχει το δείγμα και άλλη είναι η κυψελίδα αναφοράς (κενή). Στο περιβάλλον των υποδοχέων δημιουργείται αδρανής ατμόσφαιρα με ροή αζώτου και ο θερμικός ελεγκτής αρχίζει να θερμαίνει τους υποδοχείς με προκαθορισμένο, σταθερό ρυθμό θέρμανσης. Η μέθοδος αυτή στην περίπτωση των συστημάτων εγκλεισμού απεικονίζει τη διαφορετική θερμική συμπεριφορά των νανοσωματιδίων σε σχέση με το φυσικό μείγμα των συστατικών του καθώς και τα επιμέρους συστατικά τους.

Πίνακας 8. Πειραματικές συνθήκες ανάλυσης DSC

Παράμετροι	
Αρχική Θερμοκρασία (°C)	25
Τελική Θερμοκρασία (°C)	400
Ρυθμός θέρμανσης (°C/min)	10
Ρυθμός Ροής Αζώτου (mL/min)	20

2.11.6 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) των συμπλόκων εγκλεισμού

Με τη χρήση της μεθόδου θερμοσταθμικής ανάλυσης καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός της θερμικής σταθερότητας των νανοσωματιδίων.

Αρχικά ζυγίζεται ποσότητα από το δείγμα, και τοποθετείται μέσα στο καψίδιο. Στη συνέχεια το καψίδιο που περιέχει το δείγμα σφραγίζεται αεροστεγώς και τοποθετείται στο ζυγό μέσα στον φούρνο του οργάνου TGA. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για καθένα από τα δείγματα, β-CD πρόπολης, του συμπλόκου εγκλεισμού β- CD -πρόπολης σε κάθε μία από τις τρεις μορφές λιποσωμάτων.

Πίνακας 9. Πειραματικές συνθήκες ανάλυσης TGA

Παράμετροι	
Αρχική Θερμοκρασία (°C)	25
Τελική Θερμοκρασία (°C)	600
Ρυθμός θέρμανσης(°C/min)	10
Ρυθμός Ροής Αζώτου (mL/min)	10

2.11.7 Ηλεκτρονική μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Όλα τα δείγματα εγκλεισμού χαρακτηρίστηκαν με Ηλεκτρονική μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Ο χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με επιτραπέζιο PhenomWorld ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (PhenomWorld, Eindhoven, Ολλανδία) με νήμα βολφραμίου (10 kV) και δειγματοφορέα μείωσης φορτίου. Το μέγεθος 100 σωματιδίων από κάθε εικόνα SEM μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το ενσωματωμένο λογισμικό ανάλυσης εικόνας (Phenom Pro Suite / ParticleMetric) και προσδιορίστηκε το μέσο μέγεθος σωματιδίων.

3 Αποτελέσματα-Σχολιασμοί

3.1 Υπολογισμός απόδοσης διεργασίας εκχύλισης

Παρακάτω παρουσιάζονται οι αποδόσεις διεργασίας των δύο μεθόδων εκχύλισης με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Απόδοση διεργασίας} = \frac{\text{μάζα εκχυλισμένης πρόπολης(mg)}}{\text{μάζα ακατέργαστης πρόπολης(mg)}} 100\%$$

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται οι αποδόσεις διεργασίας για τις εκχυλίσεις πρόπολης που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση υπερήχων.

Πίνακας 10. Απόδοση διεργασίας για την εκχύλιση πρόπολης με χρήση υπερήχων

Κωδικός	Αρχική ποσότητα πρόπολης (g)	% Συχνότητα Υπερήχων	Χρόνος (min)	Ποσότητα εκχυλισμένης πρόπολης (mg)	Απόδοση Διεργασίας %
GS1	2	26	45	125.5	6
GS2	2	35	45	135.5	7
GS3	1	38	60	143.6	14
GS4	1	40	60	163.1	16
GS5	1	30	30	55.2	5.5
GS6	1	38	45	155.2	15.5
GS7 (2xV)	1	38	45	165.3	16.5

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται οι αποδόσεις διεργασίας για τις εκχυλίσεις πρόπολης που πραγματοποιήθηκαν υπό μαγνητική ανάδευση.

Πίνακας 11 Απόδοση διεργασίας για την εκχύλιση πρόπολης με χρήση μαγνητικής ανάδευσης

Κωδικός	Αρχική ποσότητα πρόπολης (g)	Ένταση ανάδευσης(rpm)	Χρόνος (h)	Ποσότητα εκχυλισμένης πρόπολης (mg)	Απόδοση Διεργασίας %
GS8	2	500	72	135.7	7
GS9 (2xV)	1	800	72	98.5	10
GS10	1.5	1000	96	120.8	8
GS11	1	500	96	115.9	12

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι η απόδοση της διεργασίας εκχύλισης τόσο με τη χρήση υπερήχων όσο και με μαγνητική ανάδευση δεν είναι υψηλή. Η παρατήρηση αυτή είναι αναμενόμενη και δικαιολογείται από την δυσκολία της ακατέργαστης πρόπολης να επεξεργαστεί (ενότητα 1.1.4).

Η μέγιστη απόδοση παρατηρείται στην περίπτωση της εκχύλισης με την χρήση υπερήχων και ανέρχεται σε ποσοστό 16.5% (GS7). Σε αυτό το δείγμα ο όγκος του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διπλάσιος ενώ η ένταση και η χρονική διάρκεια επιβολής υπερήχων είχαν υψηλές τιμές 38% και 45 λεπτά αντίστοιχα. Παρατηρείται επίσης ότι για τις τιμές έντασης 30% και χρονικής διάρκειας υπερήχων 30 λεπτών η απόδοση διεργασίας εκχύλισης είναι η ελάχιστη με ποσοστό 5.5%. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι το εκχύλισμα που επιλέχθηκε για να αξιολογηθεί περαιτέρω ήταν το GS6 με απόδοση 15.5% εξαιτίας της διαύγειας και της καθαρότητας του.

Στην περίπτωση εκχύλισης με χρήση μαγνητικής ανάδευσης η απόδοση διεργασίας παρουσιάζει επίσης χαμηλές τιμές. Τα εκχυλίσματα που λήφθηκαν από αυτήν την μέθοδο ήταν διαυγή με υψηλή καθαρότητα εξαιτίας της διατήρησης των δειγμάτων σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία (-40 °C) πριν από κάθε διήθηση. Με αυτόν τον τρόπο τα έλαια που εμπεριέχονται στη πρόπολη και δεν μπορούν να διαλυθούν στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη EtOH-H₂O απομακρύνονται κατά τη διήθηση με αποτελέσματα ένα πιο καθαρό εκχύλισμα.

3.2 Μέγεθος, κατανομή μεγέθους και ζ-δυναμικό (DLS)

Προκειμένου να επιτευχθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός, τόσο των συμπλόκων εγκλεισμού όσο και των διαφόρων τύπων λιποσωμάτων, μετράται το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) καθώς και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).

Για κάθε ένα από τα παραπάνω μεγέθη λαμβάνονται τρεις μετρήσεις. Στους παρακάτω πίνακες που ακολουθούν, παρουσιάζονται όλες οι μετρήσεις ως ο μέσος όρος τριών τιμών με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση.

3.2.1 Σύμπλοκα εγκλεισμού β-CD-ΕΠ

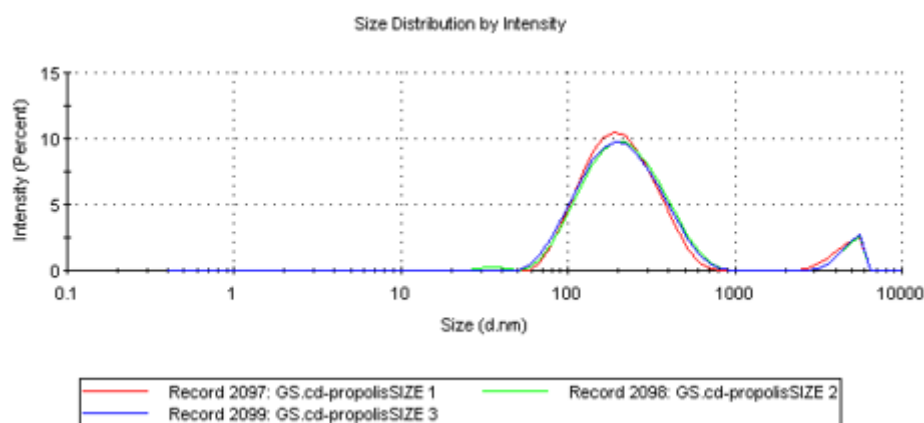
Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 12), παρουσιάζονται οι μετρήσεις και οι τυπικές αποκλίσεις της μέσης διαμέτρου και του δείκτη πολυδιασποράς των συμπλόκων εγκλεισμού.

Πίνακας 12 Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού συμπλόκων εγκλεισμού β-CD-πρόπολης

Σύμπλοκο Εγκλεισμού	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
IC	208.2±3	0.378±0.02	-41.4±2.4

Σχολιασμός μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς των συμπλόκων β-CD-ΕΠ

Το σύμπλοκο β-CD-ΕΠ παρουσιάζει μία κατανομή μεγέθους στα 208.3 nm με πολύ μικρή τιμή τυπικής απόκλισης γεγονός που αποδεικνύει τη ομοιομορφία του δείγματος. Όπως παρατηρείται και στο Σχήμα 18 και οι τρεις μετρήσεις ακολουθούν την ίδια καμπύλη κανονικής κατανομής, παρατήρηση που συμφωνεί με ικανοποιητική τιμή του δείκτη πολυδιασποράς με τιμή 0.378 με εξίσου μικρή απόκλιση.



Σχήμα 18: Κατανομή μεγέθους του συμπλόκου β-CD-πρόπολης

Σχολιασμός ζ-δυναμικού των συμπλόκων β-CD-ΕΠ

Γενικά, όταν το ζ-δυναμικό είναι σχετικά χαμηλό (θετικό ή αρνητικό), η έλξη υπερβαίνει την άπωση και τα σωματίδια τείνουν να δημιουργήσουν συσσωματώματα ενώ οι διασπορές με ένα υψηλό ζ-δυναμικό (θετικό ή αρνητικό) είναι ηλεκτρικά σταθερές. Το ζ-δυναμικό είναι ένα σημαντικό μέσο για την κατανόηση της κατάστασης της επιφάνειας των νανο-σωματιδίων και την πρόβλεψη της μακροπρόθεσμης σταθερότητας του.

Το ζ-δυναμικό των συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης παρουσιάζει αρνητική τιμή η οποία είναι αναμενόμενη και οφείλεται στην παρουσία υδροξυλίων -OH στην επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης. Η τιμή του ζ-δυναμικού ανέρχεται στα -41.4 mV και σε αυτή τη περίπτωση η άπωση υπερβαίνει την έλξη και τα σωματίδια αποκλίνουν από τα να σχηματίσουν συσσωματώματα. Ειδικότερα, βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων διαλύματα διασποράς με δυναμικό ζ μεγαλύτερο από +30 mV ή μικρότερο από -30 mV θεωρούνται σταθερά (Kwak, 2014). Λαμβάνοντας υπόψιν τη συγκεκριμένη τιμή δίνεται μία ένδειξη δυναμικής σταθερότητας του κolloειδούς συστήματος.

3.2.2 Εγκλεισμός εκχυλίσματος πρόπολης σε PC/PC-CHOL (PP/PPC)

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μετρήσεις καθώς και ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση τους για τα σωματίδια εγκλεισμού εκχυλίσματος πρόπολης σε λιποσώματα με και χωρίς την παρουσία χοληστερόλης ως σταθεροποιητικό μέσο .

Πίνακας 13 Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού PPC & PP

Τύπος Εγκλεισμού	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
PP	281.3±17.6	0.461±0.033	-40.1±1.3
PPC	73.93±7.4	0.590±0.016	-26.6±2.8

Σχολιασμός μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς των λιποσωμάτων με εγκλεισμένο ΕΠ (PPC, PP)

Τα λιποσώματα που δημιουργήθηκαν με εγκλεισμό εκχυλίσματος πρόπολης φαίνεται να διαφοροποιούνται έντονα συγκριτικά με εκείνα που εμπεριέχουν χοληστερόλη ως προς το μέγεθός τους.

Για τα λιποσώματα PP παρατηρείται μέγεθος 281 nm με απόκλιση ± 17.6 nm. Παράλληλα το μέγεθος που αποκτούν τα λιποσώματα PPC με χρήση χοληστερόλης ως σταθεροποιητικό μέσο μετά από χρήση υπερήχων, φαίνεται να βρίσκονται στη νανο-κλίμακα στα 73.93 nm με μικρή απόκλιση, με αποτέλεσμα την χρήση τους σε διαφορετικό εύρος εφαρμογών.

Όπως φαίνεται στα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των δειγμάτων (Σχήμα 33,34), και οι δύο τύποι εγκλεισμού, παρουσιάζουν ευρεία κατανομή μεγέθους καθώς τα δείγματα εμφανίζουν περισσότερες της μίας κορυφής. Η ευρεία αυτή κατανομή μεγέθους έχει ως αποτέλεσμα, ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) ως μέτρο ομοιομορφίας, να παρουσιάζει σχετικά υψηλές τιμές. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές PDI των δύο διασπορών (0.590 και 0.461 αντίστοιχα), υποδεικνύουν ότι υπάρχει μέτρια ομοιογένεια στην κατανομή μεγέθους των δειγμάτων αν ληφθεί υπόψη ότι οι τιμές που μπορεί να πάρει ο PDI είναι από 0 μέχρι 1 και οι τιμές μεγαλύτερες από 0.2 υποδηλώνουν την ύπαρξη ικανοποιητικής κατανομής μεγέθους (Hill et al., 2013).

Επιπλέον, στην κατανομή μεγέθους των σωματιδίων των λιποσωμάτων έχει παρατηρηθεί και η εμφάνιση κάποιων επιπλέον κορυφών που αντιστοιχούν σε σωματίδια μικρότερου μεγέθους. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο φαινόμενο πολλαπλής σκέδασης (multiple scattering) κατά το οποίο φωτόνια που είναι διασκορπισμένα από την προς ανάλυση ουσία επανασκεδάζονται από γειτονικά σωματίδια πριν φθάσουν στον ανιχνευτή οργάνων. Για την αποφυγή αυτού του φαινομένου απαιτείται περαιτέρω αραίωση των δειγμάτων.

Σχολιασμός ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων με εγκλεισμένο ΕΠ (PPC, PP)

Όπως παρατηρείται από τις τιμές που λήφθηκαν για τους δύο διαφορετικούς εγκλεισμούς PPC και PP, στην περίπτωση του εγκλεισμού με χοληστερόλη η τιμή του ζ-δυναμικού ανέρχεται σε -26.6 mV ενώ η τιμή ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων που δεν περιέχουν χοληστερόλη σε -40.1 mV. Οι τιμές αυτές δικαιολογούνται λόγω της ύπαρξης χοληστερόλης στα λιποσώματα σε περιεκτικότητα 30% και 0% αντίστοιχα. Η μείωση (κατά απόλυτη τιμή) του ζ-δυναμικού, οφείλεται στο τμήμα της χοληστερόλης με θετικά φορτισμένη ομάδα κεφαλής και κατ' επέκταση την αντικατάσταση των ισχυρά δεσμευμένων ομάδων της PC από ομάδες ασθενέστερων υδροξυλικών ομάδων χοληστερόλης. Επιπλέον, με την αυξανόμενη συσχέτιση

της PC και χοληστερόλης συσχετίζονται όλο και περισσότερο οι πολικές ομάδες, μειώνοντας περαιτέρω τον αριθμό των θέσεων δέσμευσης για τα κατιόντα. Η αύξηση της περιεκτικότητας της χοληστερόλης στη μεμβράνη αυξάνει την υδροφοβικότητα της μεμβράνης, μειώνοντας περαιτέρω τη συγγένεια της με τα κατιόντα.

3.2.3 Εγκλεισμένα σύμπλοκα IC και ΕΠ σε λιποσώματα (LCP, DLL & ETH)

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 14) παρουσιάζονται οι τιμές της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού των τριών διαφόρων ειδών λιποσωμάτων, που περιέχουν εγκλεισμένο το σύμπλοκο β-CD-ΕΠ και το ΕΠ και παρασκευάστηκαν με διαφορετικές μεθόδους. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται τα λιποσώματα με εγκλεισμένο σύμπλοκο β-CD-ΕΠ (LCP), τα διπλά φορτωμένα λιποσώματα με ΕΠ στη διπλοστιβάδα λιπιδίων και σύμπλοκο β-CD-ΕΠ στον υδρόφιλο πυρήνα των λιποσωμάτων (DDL) και τέλος τα αιθοσώματα (ETH).

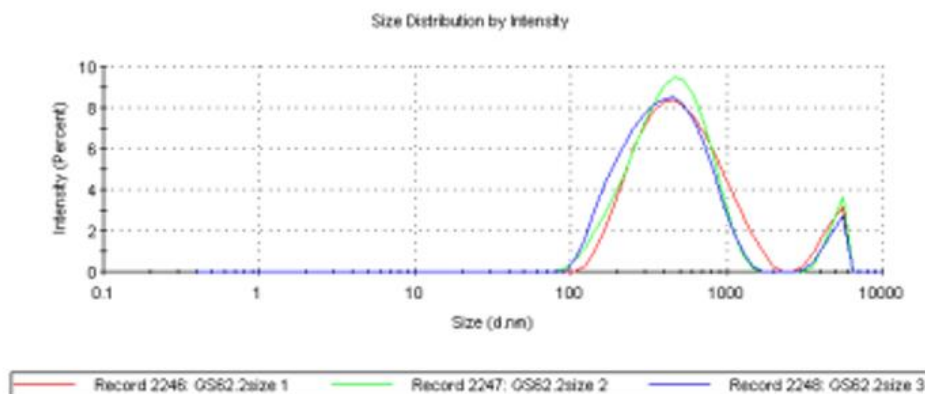
Πίνακας 14 Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού LCP, DLL & ETH

Τύπος Εγκλεισμού	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
LCP	204.3±16.1	0.542±0.11	-34.7±1.3
DLL	221.5±2	0.366±0.013	-36.6±2.5
ETH	428.2±42.6	0.393±0.049	-39.4±1.8

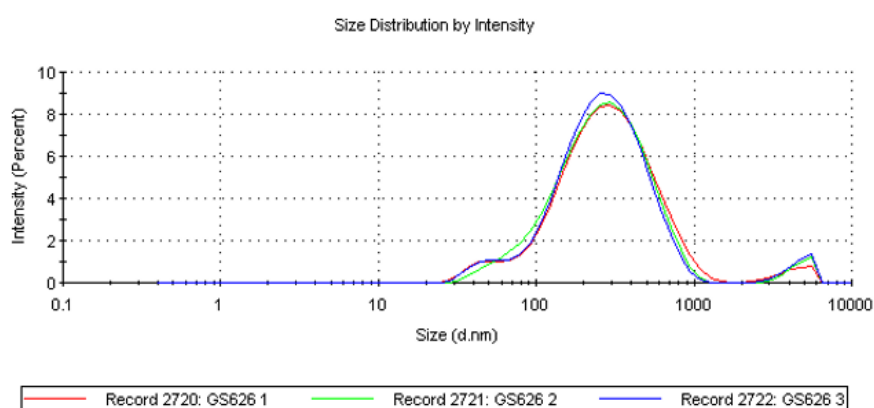
Σχολιασμός μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς των λιποσωμάτων LCP, DLL & ETH

Τα παραπάνω λιποσώματα φαίνεται να παρουσιάζουν μία ευρεία κατανομή μεγέθους, καθώς το μέγεθός τους κυμαίνεται κατά μέσο όρο από 204.3 nm έως 428 nm. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος των σωματιδίων όπως αυτός του ποσού του χοληστερόλης στο σύμπλοκο, φαίνεται να μην έχει παρόμοια επίδραση στη συγκεκριμένη περίπτωση. Η περιεκτικότητα της χοληστερόλης στα λιποσώματα ανέρχεται σε ποσοστό 66%, 50% και 30% (LCP, DLL & ETH αντίστοιχα) χωρίς αντίστοιχη αύξηση ή μείωση του μεγέθους.

Λαμβάνοντας υπόψη το δείκτη πολυδιασποράς PDI των δειγμάτων, παρατηρείται ότι τα σωματίδια των DLL, ETH παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιομορφία όπως γίνεται φανερό και από τα Σχήματα 18 & 19, που παρουσιάζουν την ομοιομορφία της κανονικής κατανομής των σωματιδίων αλλά και την τιμή του PDI (0.366 και 0.393 αντίστοιχα). Η αυξημένη τιμή του PDI των λιποσωμάτων LCP (0.542) υποδεικνύει την ανομοιομορφη κατανομή των λιποσωμάτων στο σύστημα με την εμφάνιση δύο κορυφών (Σχήμα 36). Στην περίπτωση αυτή, η διασπορά περιέχει σωματίδια πολλών διαφορετικών μεγεθών με αποτέλεσμα την αυξανόμενη τάση συσσώματωσης συγκριτικά με τα λιποσώματα DLL και ETH.



Σχήμα 17: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος ETH



Σχήμα 20: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος DLL

Σχολιασμός ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων LCP, DLL & ETH

Το ζ-δυναμικό των σωματιδίων διπλού εγκλεισμού παρουσιάζει αρνητική τιμή και για τις τρεις μορφές σωματιδίων γεγονός που αποδίδεται στα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της PC αλλά και των υδροξυλίων της κυκλοδεξτρίνης. Οι τιμές από τις μετρήσεις δεν παρουσιάζουν μεγάλο εύρος αφού κυμαίνονται στα -37.4 mV, -36.6 mV και -36.5 mV για τα LCP, DLL και ETH αντίστοιχα. Και οι τρεις τιμές μπορούν να θεωρηθούν ικανοποιητικές με συνέπεια τα παραπάνω λιποσώματα να είναι σχετικά σταθερά και να μην έχουν τάση συσσωμάτωσης κατά το χρονικό διάστημα της αποθήκευσής τους.

3.2.4 Ανασκόπηση αποτελεσμάτων LCP, DLL & ETH

Στην αυτήν την υπό-ενότητα, θα μελετηθούν οι τιμές της μέσης διαμέτρου, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού των διαφόρων τύπων λιποσωμάτων μετά από διατήρησή τους για διάστημα δύο μηνών. Πιο συγκεκριμένα, μετά την πρώτη σειρά μετρήσεων DLS, τα δείγματα παρέμειναν σε φύλαξη στους 4°C για οκτώ εβδομάδες και επανεξετάστηκαν με σκοπό την καταγραφή τυχόν μεταβολών αυτών των σωματιδίων. Αξίζει να σημειωθεί πως τα

σωματίδια των LCP και DLL διατηρήθηκαν σε διαλύτη υπερκάθαρου νερού ενώ τα ETH σε διαλύτη EtOH-υπερκάθαρο νερό. Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται οι νεότερες μετρήσεις των LCP, DLL και ETH.

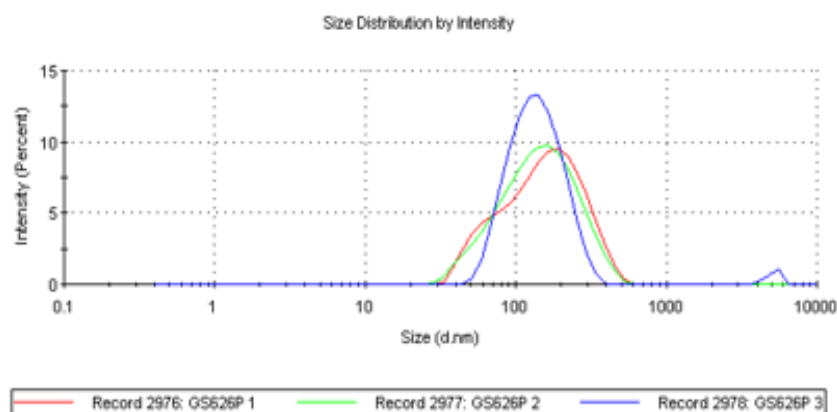
Πίνακας 15 Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού μορίων διπλού εγκλεισμού μετά από φύλαξη 8 εβδομάδων στους 4 °C

Τύπος Εγκλεισμού	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
LCP	392.5±8.77	0.595±0.02	-32.1±0.6
DLL	124.87±3.63	0.248±0.006	-37.5±1.1
ETH	507.9±64.9	0.615±0.065	-38.6±1.8

Σχολιασμός μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς των LCP, DLL & ETH

Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα με τα αρχικά, παρατηρούνται πολλές διαφορές στις τόσο στις τιμές μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου όσο και στο δείκτη πολυδιασποράς. Αρχικά για τα σωματίδια LCP υπάρχει αύξηση στα 392.5 nm. Το φαινόμενο αυτό συνοδεύεται και με μικρή αύξηση του δείκτη πολυδιασποράς σε 0.595 που όμως αντικατοπτρίζεται άρτια στο αντίστοιχο διάγραμμα (Σχήμα 36). Σχετική αύξηση παρουσιάζουν και τα σωματίδια ETH με αύξηση του δείκτη πολυδιασποράς σε 0.615. Η αύξηση αυτή οδηγεί αφενώς σε αύξηση της ανομοιομορφίας του συστήματος, αφετέρου σε αύξηση των πιθανοτήτων δημιουργίας συσσωματωμάτων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τιμές που λήφθηκαν για τις μετρήσεις των λιποσωμάτων DLL. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται μείωση του μεγέθους των σωματιδίων στα 124 nm με μικρή απόκλιση μετρήσεων. Η μείωση αυτή έχει ως επακόλουθο τη μείωση του δείκτη πολυδιασποράς στα 0.248 με αποτέλεσμα την εξασφάλιση ακόμα πιο ομοιόμορφου δείγματος και καθορισμένων σωματιδίων (Σχήμα 18). Αυτή η μεταβολή μπορεί να οφείλεται στην πολικότητα της πρόπολης και της ικανότητάς της να συνδεέται με τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων της διπλοστοιβάδας δημιουργώντας μία πιο πυκνή δομή με τη πάροδο του χρόνου.



Σχήμα 18: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος DLL μετά από φύλαξη 8 εβδομάδων στους 4 °C

Για τις τιμές του ζ-δυναμικού παρατηρούνται αντίστοιχες μεταβολές κατά κανόνα της κίνησης Brown (αύξηση μεγέθους, PDI -μείωση ζ-δυναμικού και αντίστροφα). Τα σωματίδια

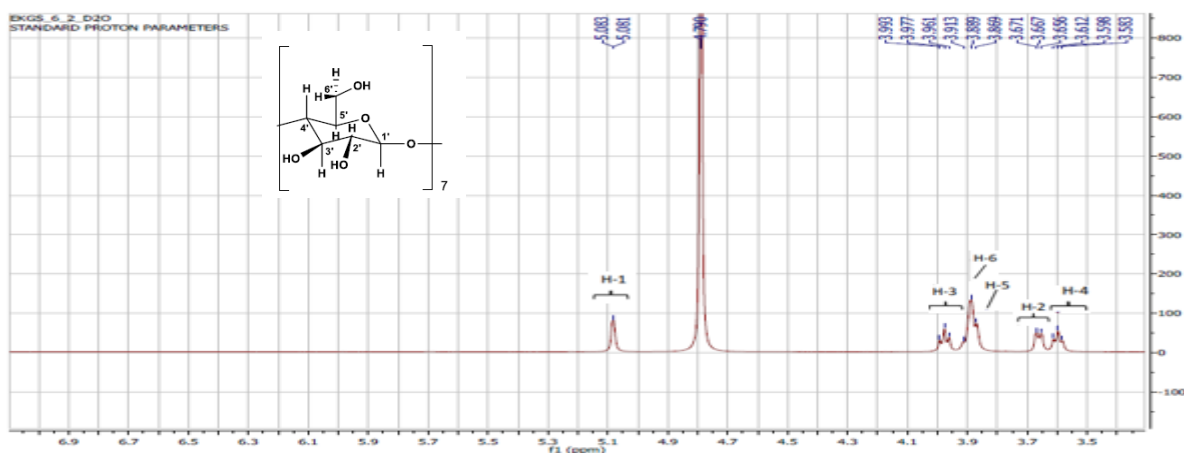
διατήρησαν ωστόσο τη σταθερότητά τους μετά το πέρας των οκτώ εβδομάδων ανεξάρτητα από τη μεταβολή του μεγέθους τους, με αποδεκτές τιμές ζ-δυναμικού.

Οι ικανοποιητικές τιμές του ζ-δυναμικού φανερώνουν ότι τόσο τα σύμπλοκα όσο και τα συσσωματώματα συμπλόκων είναι σχετικά σταθερά για μετέπειτα χρήση.

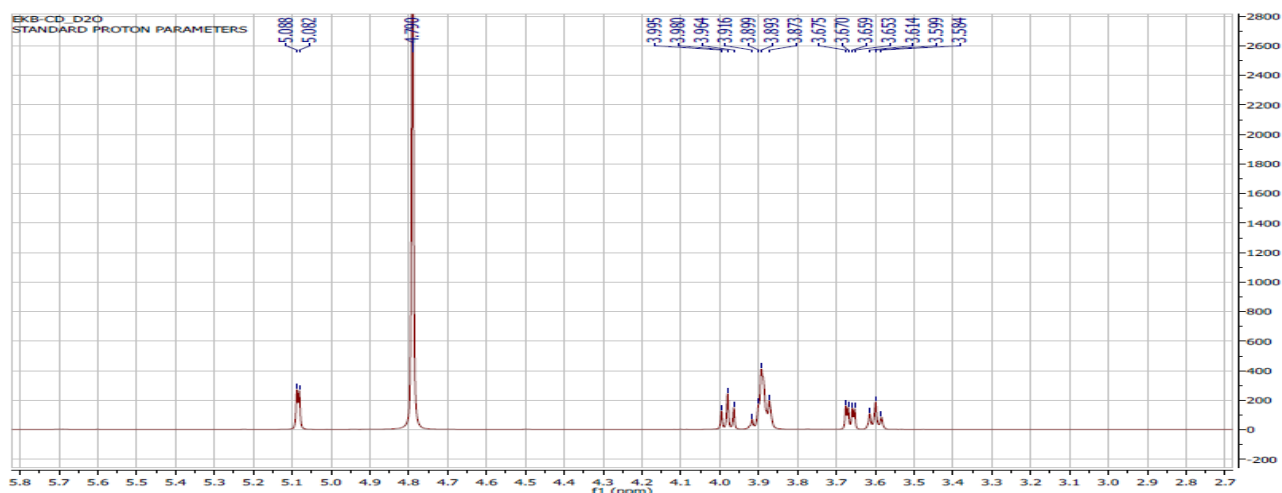
3.3 Μελέτη δομής συμπλόκων μέσω φασματομετρίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Το NMR μπορεί να παρέχει χρήσιμες ενδείξεις για να υποστηρίξει το σχηματισμό των συμπλόκων εγκλεισμού και να βοηθήσει στον χαρακτηρισμό της δομής (Song et al., 2008; T. Pessine et al., 2012). Στην εν λόγω μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φασμάτων ^1H NMR του σχηματισμένου συμπλόκου εγκλεισμού β -CD-πρόπολης καθώς και της β -CD ώστε να ληφθεί μία πρώτη ένδειξη για πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων. Η ύπαρξη διαφορετικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να αποδοθεί στις μετατοπίσεις των αντίστοιχων κορυφών στα δύο φάσματα.

Το πλήθος των κορυφών σε ένα φάσμα ^1H NMR αντικατοπτρίζει τον αριθμό των διαφορετικών πυρήνων πρωτονίου. Πρωτόνια τα οποία χαρακτηρίζονται από το ίδιο χημικό περιβάλλον (χημικά ισοδύναμα) εμφανίζουν την ίδια χημική μετατόπιση και επομένως δίνουν κοινή κορυφή στο φάσμα ^1H NMR. Είναι γνωστό ότι τα μόρια β -κυκλοδεξτρίνης υιοθετούν τη διαμόρφωση ενός τοιχώματος στο οποίο τα πρωτόνια H-3 και H-5 βρίσκονται εντός της κοιλότητας ενώ τα H-2 και H-4 βρίσκονται εξωτερικά αυτού. Τα πρωτόνια H-6 της ομάδας πρωτοταγούς αλκοόλης βρίσκεται σε ενδιάμεση θέση ενώ το πρωτόνιο H-1 είναι στο επίπεδο γλυκοσιδικού δεσμού της β -CD.



Σχήμα 19: Φάσμα ^1H NMR του συμπλόκου β -κυκλοδεξτρίνη-πρόπολη



Σχήμα 20: Φάσμα ^1H NMR β -CD

Πίνακας 16. Διαφορά χημικών μετατοπίσεων (ppm) β -CD σε ελεύθερη μορφή και στο σύμπλοκο β -CD-πρόπολης.

<i>Protons</i>	<i>Chemical shifts of β-cd $\delta 1$(ppm)</i>	<i>Chemical shifts of the complex $\delta 2$(ppm)</i>	<i>Difference in chemical shifts $\delta 1-\delta 2$ (ppm)</i>
<i>H'1</i>	5.085	5.082	0.003
<i>H'2</i>	3.980	3.977	0.003
<i>H'3</i>	3.980	3.977	0.003
<i>H'4</i>	3.599	3.598	0.001
<i>H'5</i>	3.873	3.869	0.004
<i>H'6</i>	3.899	3.889	0.010

Όπως προκύπτει από τη συγκριτική μελέτη των μετατοπίσεων της β -κυκλοδεξτρίνης και της β -κυκλοδεξτρίνης στο σύμπλοκο τα πρωτόνια των θέσεων 3'- και 6'-, τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό της κοιλότητας της β -κυκλοδεξτρίνης εμφανίζουν ελαφρώς μεγαλύτερη διαφορά μετατοπίσεων από τα υπόλοιπα. Οι διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις που παρατηρούνται επιβεβαιώνουν το σχηματισμό σύμπλοκο εγκλεισμού μεταξύ της πρόπολης και της β -κυκλοδεξτρίνης. Η παρατηρούμενη θωράκιση μπορεί να αποδοθεί στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα φιλοξενούμενα μόρια τα οποία βρίσκονται εντός της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης. Η μετατόπιση των H-6 είναι επίσης ενδεικτική μίας αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστατικών της πρόπολης, τα οποία πιθανόν να προσανατολίζονται προς την εξωτερική επιφάνεια της β -CD, Συμπερασματικά, ένα μικρό μέρος της πρόπολης έχει εισχωρήσει εντός της κοιλότητας της β -CD, όπως υποδεικνύουν και οι μικρές μετατοπίσεις των εσωτερικών

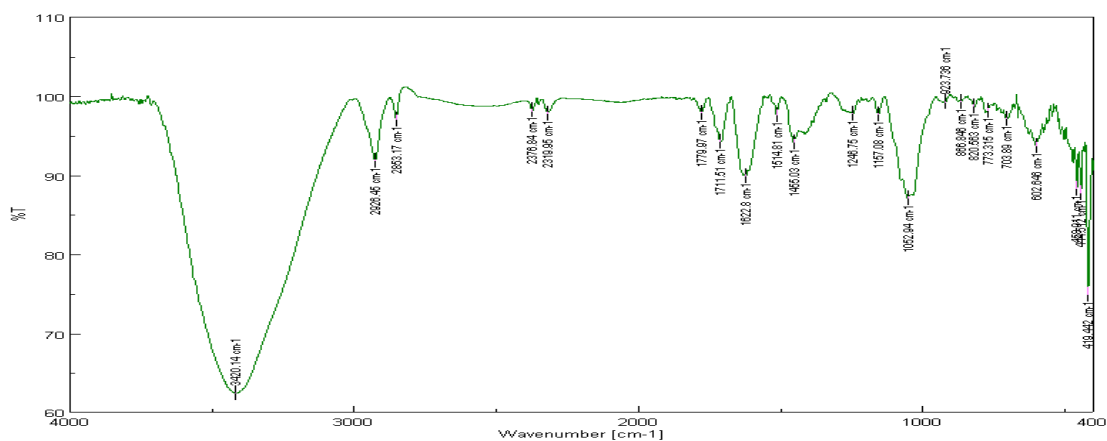
πρωτονίων, H-3 και H-5. Πιθανώς, το μεγαλύτερο μέρος της ένωσης προσανατολίζεται προς το εξωτερικό του μορίου της β- CD όπως προκύπτει από τις διαφορές των μετατοπίσεων των πρωτονίων H-6της β- CD, σχηματίζοντας διαμοριακούς δεσμούς με τα συστατικά της πρόπολης.

3.4 Μελέτη δομής συμπλόκων εγκλεισμού και λιποσωμάτων μέσω φασματομετρίας Υπερύθρου (FT-IR)

Η φασματοσκοπία FT-IR είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του «φιλοξενούμενου» μορίου και του μορίου «ξενιστή» καθώς και της δομής των συμπλόκων εγκλεισμού (Rakmai et al., 2017; Roussaki et al., 2014). Πραγματοποιείται συγκριτική μελέτη των φασμάτων FT-IR της β-CD, των ενώσεων, καθώς και των εγκλεισμένων σε λιποσώματα εκχυλισμάτων πρόπολης. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί πως ο χαρακτηρισμός του FT-IR του εκχυλίσματος πρόπολης είναι δύσκολος καθώς αποτελεί μίγμα πολλών ενώσεων και γι' αυτό τον λόγο δίνεται περισσότερη έμφαση στα φάσματα των διαφόρων εγκλεισμών.

3.4.1 Μελέτη δομής φασμάτων πρόπολης, β-CD & PC FT-IR

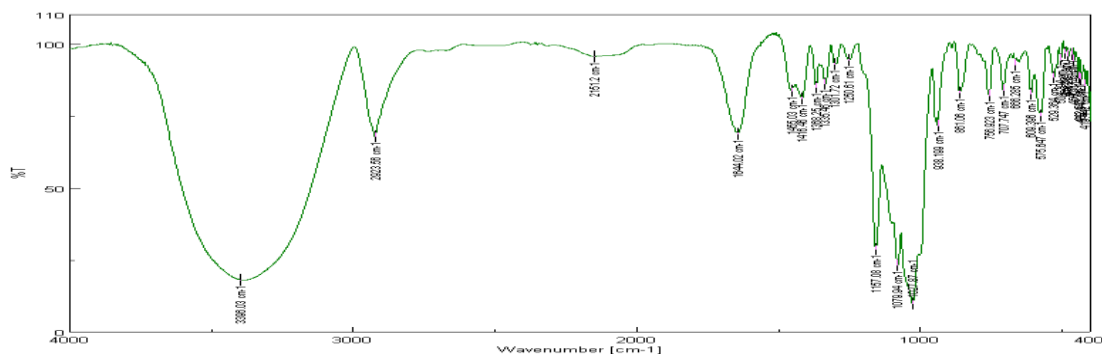
Παρατηρώντας το FT-IR φάσμα της πρόπολης (Σχήμα 21) οι πιο χαρακτηριστικές απορροφήσεις παρουσιάζονται στα 3420.14 cm^{-1} , 2926.45 cm^{-1} , 2853.17 cm^{-1} , 1622.8 cm^{-1} και 1052.94 cm^{-1} . Η πρώτη απορρόφηση αποδίδεται στη δόνηση τάσης O-H, η απορρόφηση στους 2926.45 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης των αλειφατικών C-H, ενώ οι κορυφές στους 1622.8 cm^{-1} και 1052.94 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν στη δόνηση τάσης του δεσμού C-C του αρωματικού δακτυλίου των φλαβονοειδών της πρόπολης.



Σχήμα 21: Φάσμα FT-IR πρόπολης

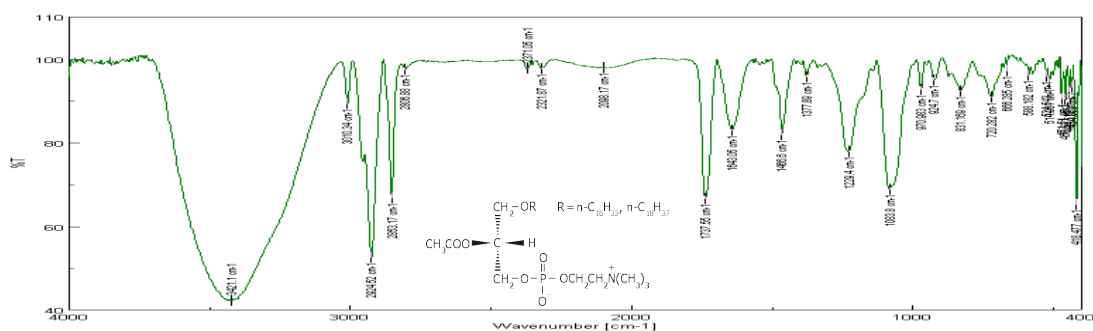
Αντίστοιχα στο FT-IR φάσμα της β-CD (Σχήμα 22), οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές παρουσιάζονται στους 3396.03 cm^{-1} που αποδίδεται στη δόνηση τάσης -OH, στους 2923.56 cm^{-1} η οποία ανήκει στη δόνηση τάσης του δεσμού C-H, στους 1644.02 cm^{-1} που ανήκει στη

ασύμμετρη τάση του CH_2 , όπως και στους 1416.46 cm^{-1} της δόνησης τάσης του δεσμού O-H. Επιπλέον η απορρόφηση στους 1027.87 cm^{-1} αποδίδεται στη τάση δόνησης του C-O των δευτερεύων ομάδων αλκοολών που βρίσκονται στο μόριο της $\beta\text{-CD}$.



Σχήμα 22: Φάσμα FT-IR $\beta\text{-CD}$

Μελετώντας το FT-IR φάσμα της PC (Σχήμα 23) παρουσιάζονται χαρακτηριστικές κορυφές στους 3421.1 cm^{-1} , 2924.52 cm^{-1} , 2853.17 cm^{-1} , 1737.55 cm^{-1} , 1643.05 cm^{-1} , 1466.6 cm^{-1} , 1229.4 cm^{-1} και 1083.8 cm^{-1} . Η κορυφή στα 3421.1 cm^{-1} αποδίδεται στη τάση δονήσεις O-H ενώ η κορυφή στα 1083.8 cm^{-1} ανήκει στη δόνηση τάσης του δεσμού P-O-C. Στα 1229.4 cm^{-1} η χαρακτηριστική κορυφή αντιπροσωπεύει το P=O δεσμό.

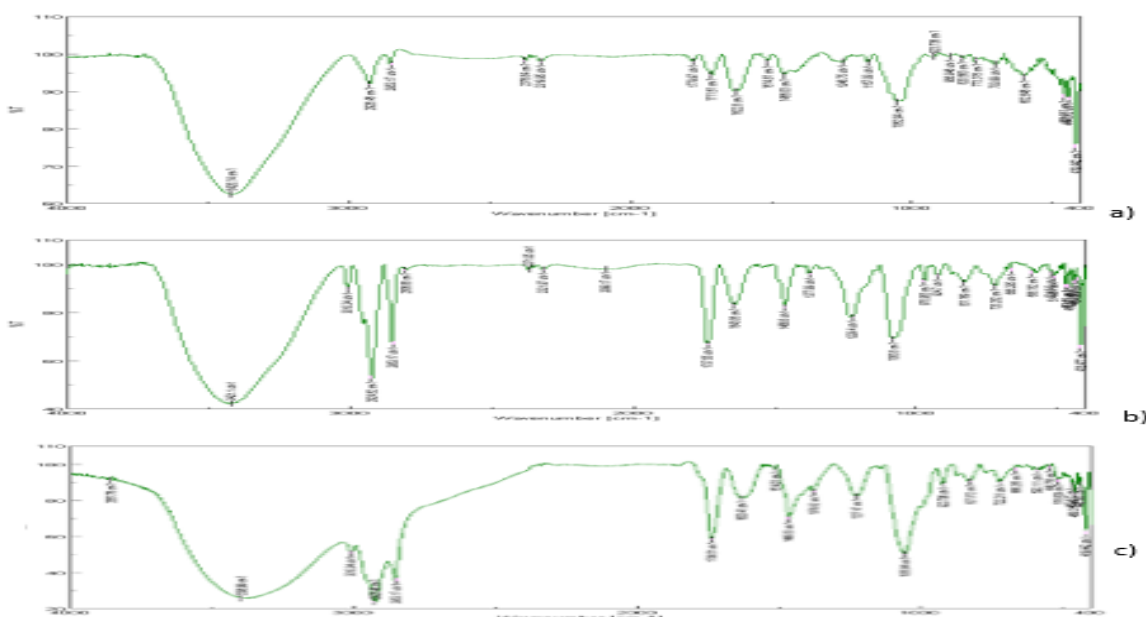


Σχήμα 23: Φάσμα FT-IR PC

3.4.2 Μελέτη δομής εγκλεισμού πρόπολης σε λιποσώματα (PPC) FT-IR

Κατά την ερμηνεία του FT-IR φάσματος των λιποσωμάτων PPC παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση από τα φάσματα της πρόπολης και της PC. Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος βρίσκονται στους 3396.99 cm^{-1} , 2853.17 cm^{-1} , 1738.51 cm^{-1} , 1465.63 cm^{-1} , και 1055.84 cm^{-1} . Η απορρόφηση στους 3396.99 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση τάσης του δεσμού -OH και η μετατόπιση σε μικρότερο κυματαριθμό, υποδεικνύει το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του δεσμού O-H των φαινολικών ομάδων της πρόπολης και του φωσφολιπιδίου PC συγκριτικά και με τη μελέτη των Damle & Mallya (2016). Η κορυφή στους

1083.8 cm^{-1} που ανήκει στο P-O-C δεσμό στο φάσμα της PC δεν εμφανίζεται στο φάσμα PPC, γεγονός που υποδεικνύει ότι κάποιες χαρακτηριστικές ομάδες του εκχυλίσματος της πρόπολης αλληλεπίδρασαν με τη ομάδα P-O-C των φωσφολιπιδίων. Οι χαρακτηριστικές κορυφές 1738.51 cm^{-1} και 1465.63 cm^{-1} έχουν μετατοπισθεί ελαφρώς από 1737.55 cm^{-1} και 1466.6 cm^{-1} αντίστοιχα όπως λαμβάνονται από το φάσμα των λιπιδίων. Ακόμη, η διαφορετική μορφή του φάσματος των λιποσωμάτων με το φυσικό μίγμα (Σχήμα 37), υποδεικνύουν τον σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού.



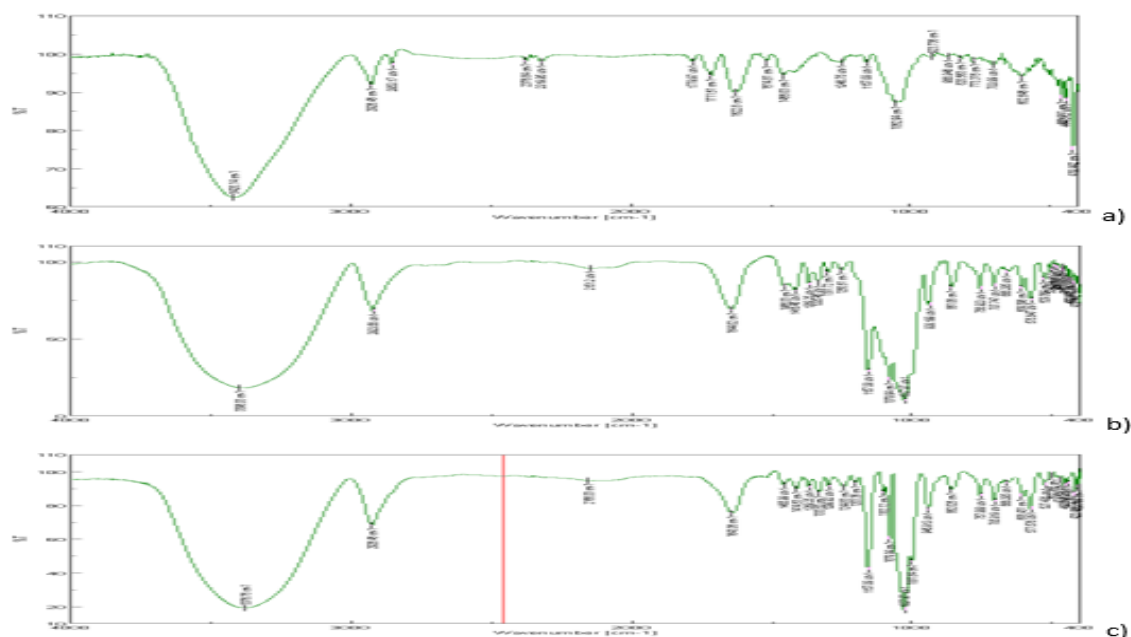
Σχήμα 24: Συγκριτικά τα φάσματα FT-IR a)πρόπολης, b)PPC, c) PP

3.4.3 Μελέτη δομής συμπλόκου εγκλεισμού β-CD-ΕΠ FT-IR

Το FT-IR φάσμα του συμπλόκου β-CD-ΕΠ (ICs) διαφέρει σημαντικά από τα αντίστοιχα των επιμέρους της πρόπολης και της β-κυκλοδεξτρίνης. Στο συγκεκριμένο φάσμα οι πιο χαρακτηριστικές απορροφήσεις παρουσιάζονται στους 3376.76 cm^{-1} , 2926.45 cm^{-1} , 1643.05 cm^{-1} , 1157.08 cm^{-1} και 1027.87 cm^{-1} .

Πρακτικά η απορρόφηση στους 3376.76 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης -OH της β-CD και η απορρόφηση στους 2926.45 cm^{-1} στη δόνησης τάση C-H της β-CD. Ακόμα, είναι προφανές ότι η χαρακτηριστική απορρόφηση της πρόπολης στους 2926.45 cm^{-1} φαίνεται να είναι η δόνηση τάση των αλειφατικών C-H της πρόπολης. Σημαντική διαφοροποίηση είναι η παρουσία της απορρόφησης στους 2853.17 cm^{-1} που αποτελεί χαρακτηριστική κορυφή στο φάσμα της πρόπολης παύει να απορροφά στο συνολικό φάσμα. Η κορυφή στα 1643.05 cm^{-1} , είναι αποτέλεσμα των μετατοπίσεων της χαρακτηριστικής κορυφής στα 1644.02 cm^{-1} που ανήκει στη ασύμμετρη τάση -CH₂. Παρομοίως, οι χαρακτηριστικές κορυφές της πρόπολης στα 1622.8 cm^{-1} και 1052.94 cm^{-1} που αποδίδονται στην δόνηση τάσης C-C δεσμού του αρωματικού δακτυλίου των φλαβονοειδών της, δεν απορροφούν στο φάσμα του συμπλόκου.

Με αυτόν τον τρόπο αποδεικνύεται ο εγκλεισμός της πρόπολης στη β -CD υποδεικνύοντας την παρουσία αλληλεπιδράσεων μεταξύ φιλοξενούμενων μορίων-μορίων ξενιστή.



Σχήμα 25: Συγκριτικά τα φάσματα FT-IR a) πρόπολης, b) β -CD, c) ICs

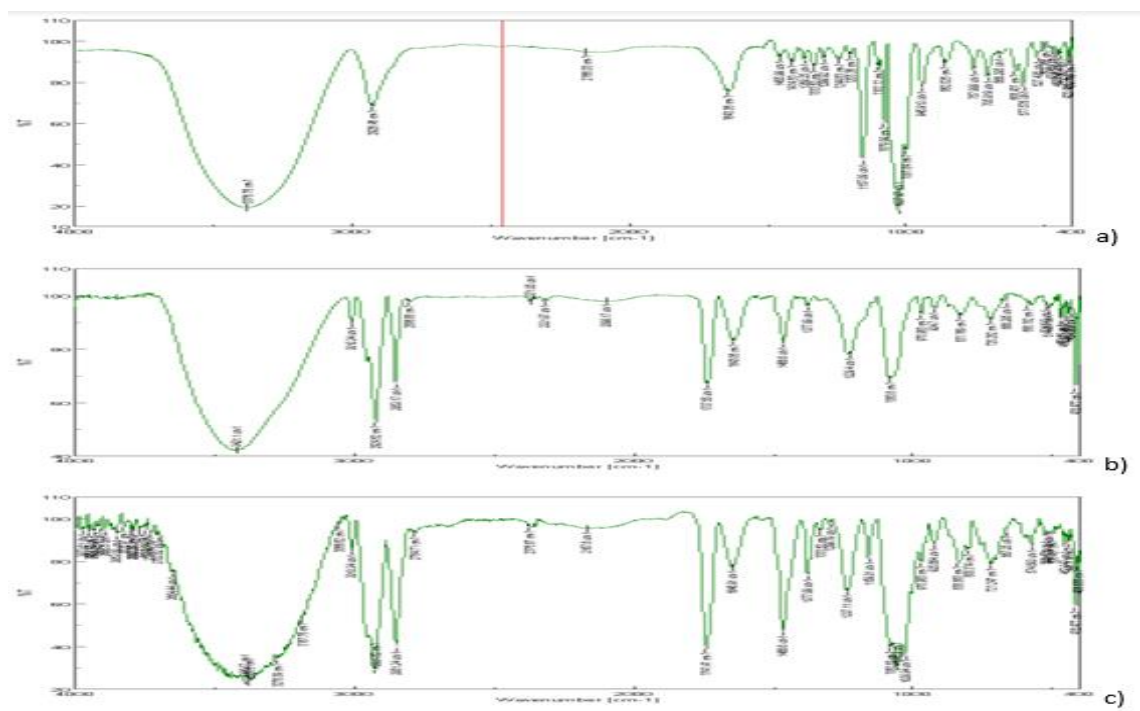
3.4.4 Μελέτη δομής συμπλόκων εγκλεισμένων σε λιποσώματα FT-IR

Συμπλοκο β -CD-πρόπολης σε λιποσώματα LCP

Στο FT-IR φάσμα του συμπλόκου β -CD-ΕΠ εγκλεισμένο σε λιποσώματα παρατηρούνται κορυφές σε διαφορετικούς κυματαριθμούς σε σχέση με τα επιμέρους φάσματα του συμπλόκου β -CD-ΕΠ και PC. Πιο συγκεκριμένα οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές βρίσκονται στους 3360.6 cm^{-1} , 1646.91 cm^{-1} , 2851.24 cm^{-1} , 1741.41 cm^{-1} , 1466.6 cm^{-1} , 1082.83 και 1028.84 cm^{-1} . Η μετατόπιση του δεσμού -OH (3396.03 cm^{-1}) του φάσματος συμπλόκου εγκλεισμού IC, σε μικρότερο κυματαριθμό, υποδεικνύει το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλίου του συμπλόκου και του φωσφολιπιδίου PC (Damle & Mallya 2016).

Η χαρακτηριστική κορυφή του β -CD-ΕΠ στους 2923.56 cm^{-1} η οποία ανήκει στη δόνηση τάσης του δεσμού C-H φαίνεται να έχει επικαλυφθεί από εκείνη της φωσφατιδυλοχολίνης η οποία είναι μετατοπισμένη υποδεικνύοντας την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Ο δεσμός P=O στα 1229.4 cm^{-1} δεν απορροφά στο φάσμα των λιποσωμάτων. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι χαρακτηριστικές ομάδες του συμπλόκου β -CD-ΕΠ αλληλεπίδρασαν με τη ομάδα P=O των φωσφολιπιδίων. Η κορυφή στους 1083.8 cm^{-1} η οποία ανήκει στο P-O-C δεσμό της PC έχει μετατοπισθεί σε 1082.83 cm^{-1} ενώ η κορυφή απορρόφησης στους 831.169 cm^{-1} στο φάσμα της PC έχει μετατοπισθεί σε 838.883 cm^{-1} . Παράλληλα η απορρόφηση στους 1027.87 cm^{-1} που αποδίδεται στη δόνησης τάση του δεσμού C-O των δευτερέων ομάδων αλκοολών που βρίσκονται στο μόριο της β -CD παρουσιάζεται μετατοπισμένη στους 1028.84

cm^{-1} , όπως και η 1644.02 cm^{-1} που ανήκει στη ασύμμετρη δόνηση τάσης του $-\text{CH}_2$ έχει μετατοπισθεί στα 1646.91 cm^{-1} . Τέλος, συγκρίνοντας το φάσμα που αντιστοιχεί στο φυσικό μίγμα $\beta\text{-CD-PC}$ (Σχήμα 38) και συγκρίνοντας τις χαρακτηριστικές κορυφές με αυτές στο φάσμα των λιποσωμάτων LCP, δεν παρατηρούνται οι ίδιες απορροφήσεις, ένδειξη επιτυχής αλληλεπίδρασης του συμπλόκου και λιποσωμάτων.



Σχήμα 26: Συγκριτικά τα φάσματα FT-IR a) ICs, b) PC, c) LCP

Οι μετατοπίσεις που σημειώθηκαν παραπάνω πιστοποιούν την εγκυρότητα του εγκλεισμού του συμπλόκου $\beta\text{-CD-EP}$ σε λιποσώματα LCP καθώς και την αλληλεπίδραση μεταξύ του φιλοξενούμενου μορίου και του μορίου ξενιστή.

Σύμπλοκο $\beta\text{-CD-EP}$ και EP εγκλεισμένα σε λιποσώματα (DLL)

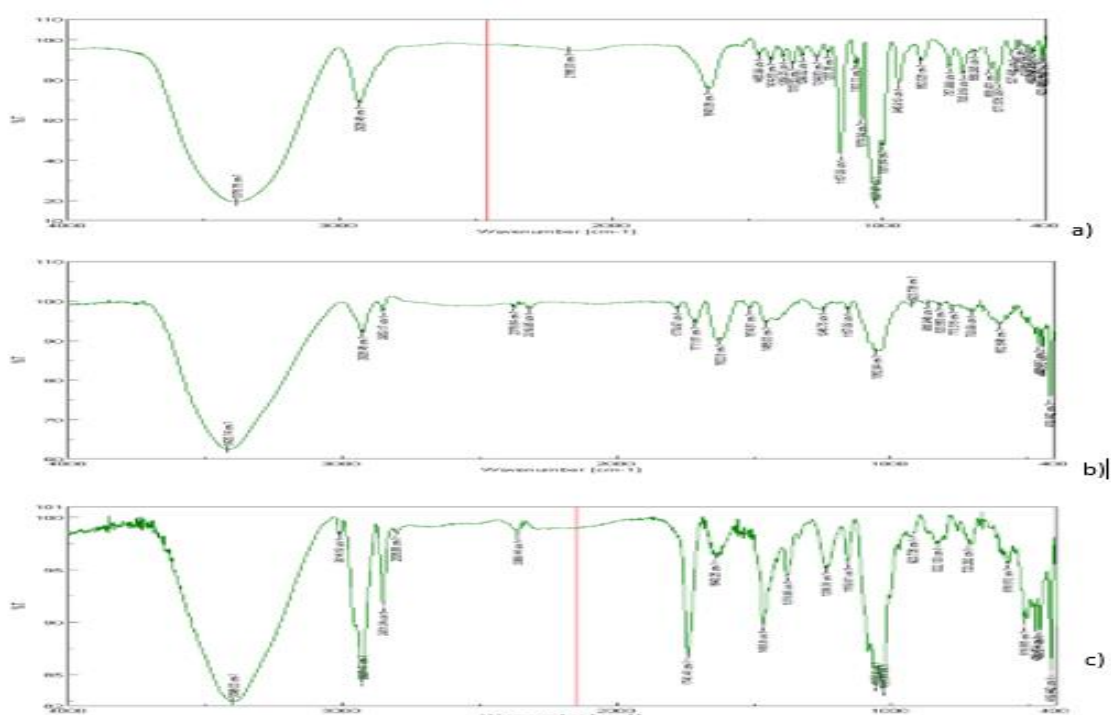
Όπως και στις δύο προηγούμενες περιπτώσεις το FT-IR φάσμα των εγκλεισμένων DLL διαφέρει σημαντικά από των επιμέρους της πρόπολης, του συμπλόκου $\beta\text{-CD-πρόπολης}$ και των λιποσωμάτων. Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές παρουσιάζονται στους 3396.03 cm^{-1} , 2927.41 cm^{-1} , 2851.24 cm^{-1} , 1741.41 cm^{-1} , 1466.6 cm^{-1} , 1058.8 cm^{-1} και 1028.84 cm^{-1} . Η μετατόπιση της χαρακτηριστικής απορρόφησης της πρόπολης στους 3420.14 cm^{-1} ($-\text{OH}$) σε μικρότερο κυματάρημο (3396.03 cm^{-1}), υποδεικνύει το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του $-\text{OH}$ των φαινολικών ομάδων της πρόπολης και του φωσφολιπιδίου της PC.

Σύμφωνα με τις χαρακτηριστικές κορυφές της πρόπολης στους 2926.45 cm^{-1} και της κορυφής στους 1052.94 cm^{-1} που αποδίδονται στο C-C δεσμό του αρωματικού δακτυλίου των

φλαβονοειδών της πρόπολης, φαίνεται να είναι μετατοπισμένες στο τελικό φάσμα DLL στους 2927.41 cm^{-1} και 1058.8 cm^{-1} αντίστοιχα.

Ως προς το σύμπλοκο β-CD- ΕΠ, οι χαρακτηριστικές κορυφές στους 2926.75 cm^{-1} , 1157.08 cm^{-1} και 1027.87 cm^{-1} , έχουν μετατοπισθεί στους 2927.41 cm^{-1} , 1159.01 cm^{-1} και 1028.84 cm^{-1} . Η μετατόπιση αυτή αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με τα λιποσώματα. Ο δεσμός P=O στα 1229.4 cm^{-1} δεν απορροφά και σε αυτή τη περίπτωση στο το φάσμα DLL και αντιπροσωπεύει την αλληλεπίδραση των χαρακτηριστικών ομάδων του συμπλόκου β-CD-ΕΠ με τη ομάδα P=O των φωσφολιπιδίων.

Συνδυαστικά με της παρατηρούμενες μετατοπίσεις των επιμέρους φασμάτων συμπεραίνεται ότι ο εγκλεισμός τόσο της πρόπολης όσο και του συμπλόκου παρουσιάζει προφανείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συμπλόκου και των λιποσωμάτων.

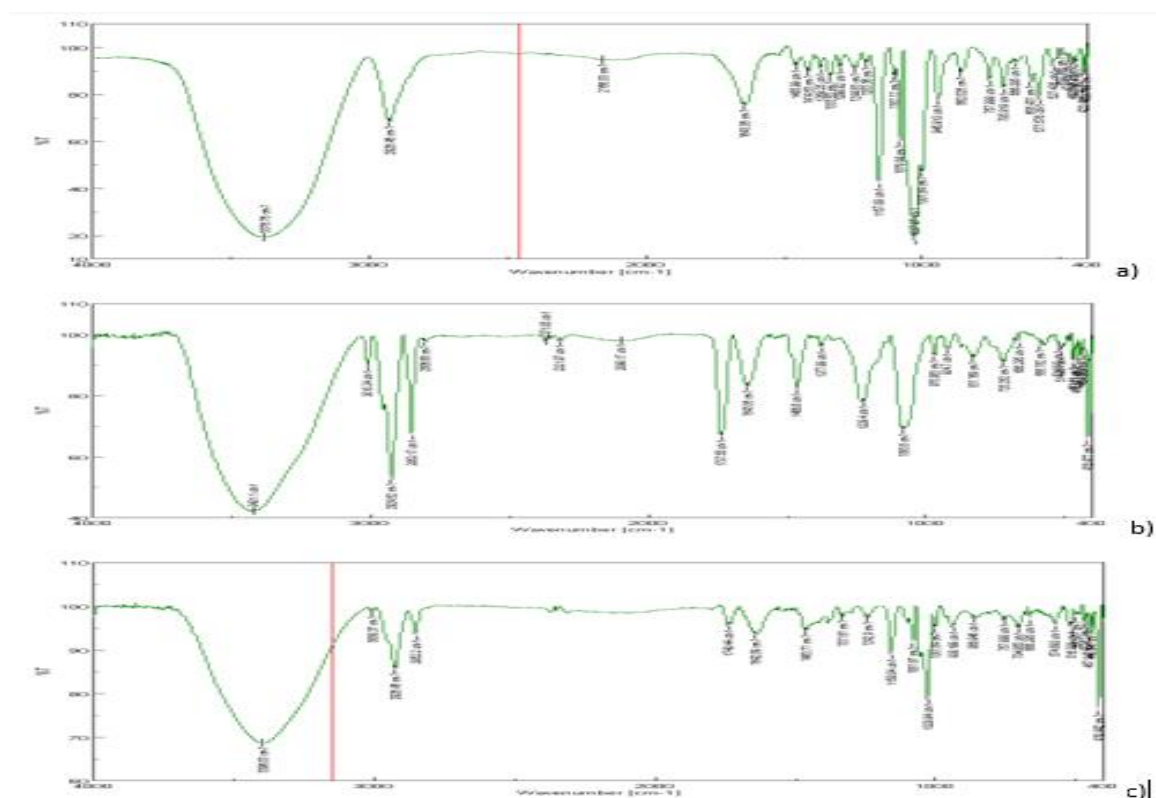


Σχήμα 27: Συγκριτικά τα φάσματα FT-IR a) πρόπολης, b) ICs, c) DLL

Σύμπλοκο β-CD-ΕΠ σε λιποσώματα για τη δημιουργία αιθοσωμάτων (ΕΤΗ)

Για το φάσμα των αιθοσωμάτων παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές στους 1158.04 cm^{-1} , 2926.45 cm^{-1} , 2852.2 cm^{-1} , 1028.84 cm^{-1} και 1642.09 cm^{-1} . Σύμφωνα και με όσα έχουν αναφερθεί παραπάνω ο δεσμός P=O στους 1229.4 cm^{-1} δεν απορροφά στο φάσμα των ΕΤΗ. Η απουσία αυτή υποδεικνύει την αλληλεπίδραση χαρακτηριστικών ομάδων του συμπλόκου β-CD-ΕΠ με τη ομάδα P=O των φωσφολιπιδίων. Το ίδιο ισχύει για την κορυφή στους 2924.52 cm^{-1} των λιπιδίων όπου δεν εμφανίζεται στο φάσμα των ΕΤΗ γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ακόμα μίας αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Η χαρακτηριστική κορυφή της PC

στους 1643.05 cm^{-1} έχει μετατοπισθεί στους 1642.09 cm^{-1} όπως και η απορρόφηση στους 1027.87 cm^{-1} που αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-C του αρωματικού δακτυλίου των φλαβονοειδών της πρόπολης. Παρόμοια, οι κορυφές στους 2852.2 cm^{-1} , 1463.71 cm^{-1} και 1081.87 cm^{-1} έχουν μετατοπιστεί από τις αντίστοιχες χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα της PC (2853.17 cm^{-1} , 1466.6 cm^{-1} και 1083.8 cm^{-1} αντίστοιχα). Επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβολή των κυματηρίθμων οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις των προς εγκλεισμό συμπλόκων και των λιποσωμάτων.



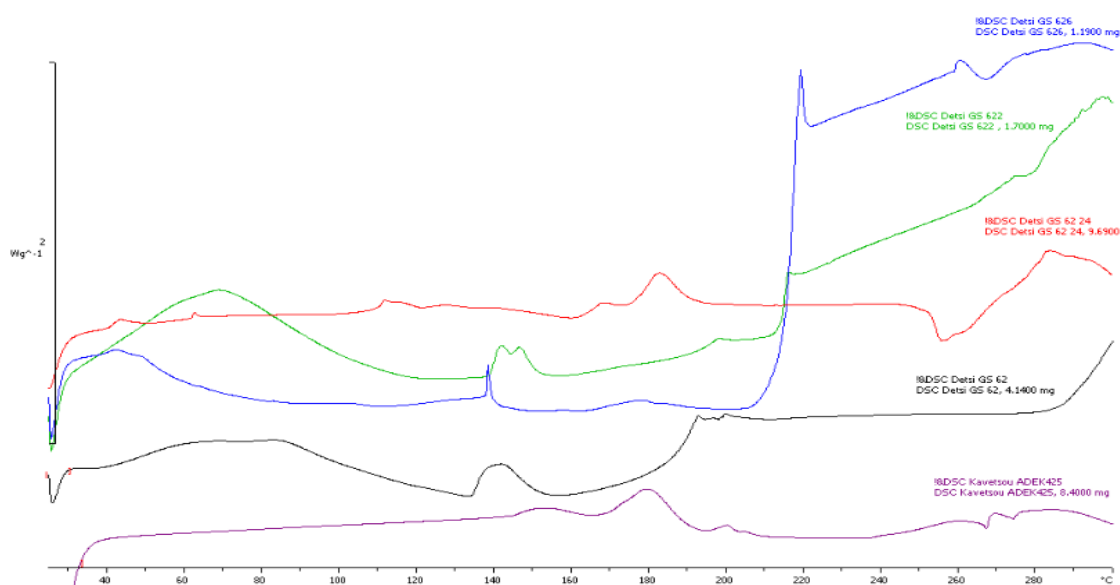
Σχήμα 28: Συγκριτικά τα φάσματα FT-IR a) ICs, b) PC, c) ETH

3.5 Θερμική ανάλυση Διαφορικής Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) και Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA) (IC,LCP,DLL & ETH)

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC), ως τεχνική θερμικής ανάλυσης, χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό της πολυμορφίας και του σημείου τήξης των συστημάτων χορήγησης λιποσωμικών φαρμάκων (Demetzos, 2008). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα διαγράμματα DSC των τριών διαφορετικών ειδών λιποσωμάτων (LCP,DLL & ETH), καθώς και το σύμπλοκο β-CD-πρόπολης (β-CD-ΕΠ) και PC (Σχήμα 32).

Για την σύγκριση των παρακάτω διαγραμμάτων αξίζει να σημειωθεί ότι βιβλιογραφικά το διάγραμμα DSC του εκχυλίσματος πρόπολης παρουσιάζει ενδόθερμη κορυφή σε θερμοκρασία $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ που αποδίδεται στο σημείο τήξης του εκχυλίσματος της πρόπολης (Chawalinee.A. et

al., 2015). Παράλληλα, το διάγραμμα DSC της β -CD παρουσιάζει μία ενδόθερμη κορυφή σχεδόν στην ίδια θερμοκρασία με το ΕΠ (100-130 °C) που οφείλεται στην απώλεια μορίων νερού που βρίσκονται στην εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης (Σχήμα 45). Λαμβάνοντας υπόψιν αυτές τις δύο ενδόθερμες κορυφές και παρατηρώντας το διάγραμμα DSC του συμπλόκου β -CD-ΕΠ, συμπεραίνεται πως ο εγκλεισμός του συμπλόκου είναι επιτυχής καθώς η μικρότερη κορυφή της β -CD υποδεικνύει πως μόρια νερού αντικαταστάθηκαν από το ΕΠ.



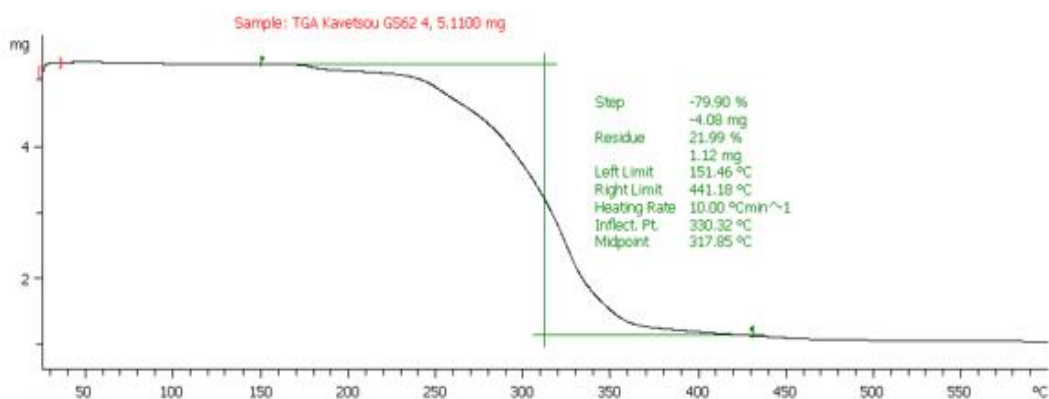
Σχήμα 29: Συνολικό διάγραμμα DSC των DDL (μπλε χρώμα), ETH (πράσινο χρώμα), LCP (κόκκινο χρώμα), β -CD-ΕΠ (μαύρο χρώμα) & PC (μοβ χρώμα)

3.5.1 Θερμική ανάλυση λιποσωμάτων LCP

Από το συγκριτικό διάγραμμα, στην περίπτωση των LCP λιποσωμάτων παρατηρείται η απουσία της χαρακτηριστικής ενδόθερμης κορυφής του συμπλόκου β -CD-ΕΠ σε θερμοκρασία 140 °C που αποδίδεται στην τήξη του ΕΠ. Από αυτή την παρατήρηση, γίνεται προφανής μία σημαντική αλληλεπίδραση του συμπλόκου με τα λιποσώματα και η προστασία των συμπλόκων στην υδρόφιλη εσωτερική κοιλότητα των LCP. Η ενδόθερμη κορυφή σε θερμοκρασία 180 °C που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία τήξης της φωσφατιδυλοχολίνης δεν παρουσιάζει καμία μετατόπιση σε σύγκριση με την ελεύθερη φωσφατιδυλοχολίνη ενώ η μικρότερη ενδόθερμη κορυφή σε θερμοκρασία 155 °C που επίσης αντιστοιχεί σε θερμοκρασία τήξης έχει μετατοπισθεί στους 170 °C. Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στις παραπάνω αλληλεπιδράσεις και έχει ως αποτέλεσμα την προστασία του συμπλόκου για μεγαλύτερο θερμοκρασιακό εύρος.

Η αποδόμηση των σωματιδίων πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 150 °C όπως φαίνεται και από το διάγραμμα TGA των LCP σωματιδίων (Σχήμα 30) με αποτέλεσμα να καθίστανται ικανά να χρησιμοποιηθούν ως φορείς βιοδραστικών ουσιών καθώς τόσο οι

θερμοκρασίες που αναπτύσσεται στο σύστημα κατά την παρασκευή της κρέμας όσο και στον ανθρώπινο οργανισμό δεν αναμένεται να υπερβούν τους 60-70 °C.



Σχήμα 30: Διάγραμμα TGA των λιποσωμάτων LCP

3.5.2 Θερμική ανάλυση λιποσωμάτων ΕΤΗ

Μελετώντας το διάγραμμα DSC των αιθοσωμάτων, ΕΤΗ, παρατηρείται μία πολύ διαφορετική καμπύλη τόσο συγκριτικά με το σύμπλοκο β-CD-ΕΠ όσο και με την ελεύθερη PC.

Στο θερμοκρασιακό εύρος από 20 °C έως 120 °C παρατηρείται μία ενδόθερμη μεταβολή που αντιστοιχεί σε απώλεια μάζας και συγκεκριμένα απώλεια αιθανόλης καθώς η αιθανόλη βρίσκεται σε υψηλό ποσοστό σε αυτού του τύπου τα λιποσώματα.

Η χαρακτηριστική κορυφή της φωσφατιδυλοχολίνης παρουσιάζεται στο διάγραμμα DSC των αιθοσωμάτων με διαφορετική μορφή διπλής κορυφής (140 °C και 150 °C) από αρχική θερμοκρασία στους 178 °C. Η εμφάνιση διπλής κορυφής είναι πιθανό να οφείλεται στην ιδιότητα των παρεμβαλλόμενων συμπλόκων β-CD-ΕΠ να διαταράσσουν τους δεσμούς υδρογόνου που εκτείνονται σε γειτονικές ομάδες κεφαλής, καταστρέφοντας έτσι τη δομική διάταξη της συγκεκριμένης πολικής περιοχής και μειώνοντας περαιτέρω το σημείο τήξης των λιπιδικών συστατικών των λιποσωμάτων (Sainz et al., 1993). Το φαινόμενο επίσης, της παρουσίας διπλής κορυφής, υποδεικνύει ότι η κρυσταλλικότητα του συμπλόκου έχει αλλάξει μετά των εγκλεισμό στα λιποσώματα (Jia et al., 2016). Η μεταβολή αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η χαρακτηριστική κορυφή του συμπλόκου απουσιάζει από το διάγραμμα με την χαρακτηριστική κορυφή της PC να την έχει αντικαταστήσει μετά από τον εγκλεισμό.

3.5.3 Θερμική ανάλυση λιποσωμάτων DLL

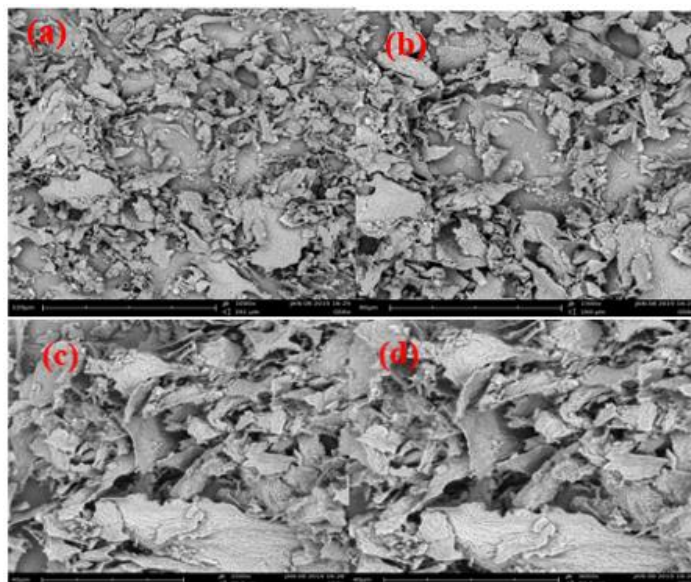
Από το διάγραμμα DSC των DLL σωματιδίων παρατηρούνται και σε αυτήν την περίπτωση διαφορετικές κορυφές συγκριτικά με εκείνες των επιμέρους συμπλόκου β-CD-ΕΠ και PC.

Αρχικά παρατηρείται μία ενδόθερμη ευρεία κορυφή σε θερμοκρασιακό εύρος 20-40 °C όπου είναι πιθανό να οφείλεται σε μικρή απώλεια νερού. Στη συνέχεια παρατηρείται όξυνση της χαρακτηριστικής ενδόθερμης κορυφής της φωσφατιδυλοχολίνης σε μικρότερη θερμοκρασία

(138 °C) γεγονός που αποδίδεται στη μεγάλη ποσότητα του συμπλόκου αλλά και του ελεύθερου εκχυλίσματος πρόπολης στα λιποσώματα αυτού του είδους (Demetzos, 2008). Ωστόσο η οξεία αυτή ενδόθερμη κορυφή είναι πιθανόν να υποδεικνύει ένα όχι και τόσο σταθερό σύστημα που ίσως να οφείλεται στην ιδιότητα της εγκλεισμένης λιπόφιλης πρόπολης να απελευθερώνεται πολύ γρηγορότερα χρονικά σε σχέση με το υδρόφιλο εγκλεισμένο σύμπλοκο.

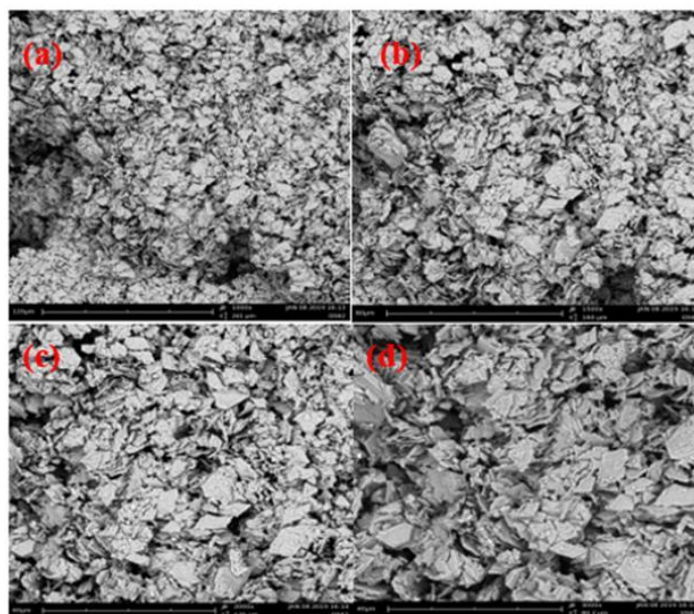
3.6 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται σε διάφορες μεγεθύνσεις η μορφολογία του συμπλόκου εγκλεισμού β-CD-ΕΠ (IC), των αιθοσωμάτων (ETH), των απλών λιποσωμάτων (LCP) και τέλος των διπλά φορτωμένων λιποσωμάτων (DDL). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των σχηματιζόμενων σωματιδίων φαίνεται να διαφοροποιούνται σημαντικά από τον ένα τύπο λιποσωμάτων στον άλλον. Οι μεγεθύνσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν σε x1000, x1500, x2500 και x3000.



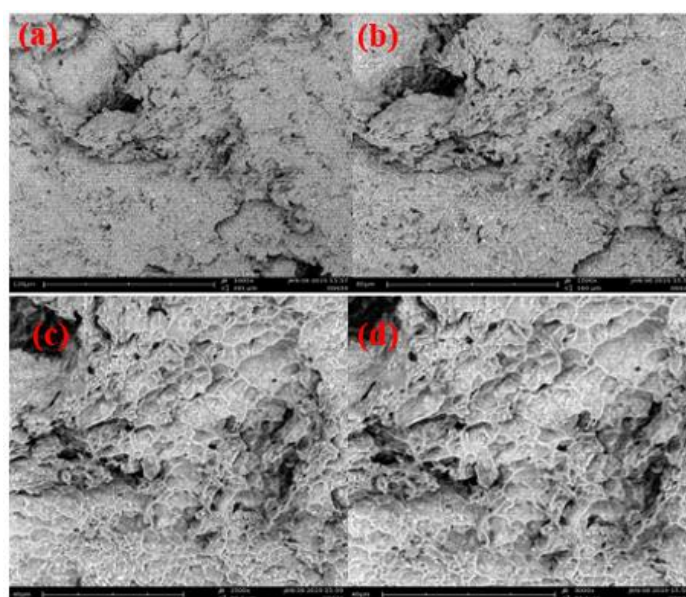
Σχήμα 31: SEM των συμπλόκων β-CD-ΕΠ σε μεγέθυνση (a) x1000, (b) x1500, (c) x2500 και (d) x3000

Όπως παρατηρείται από τις εικόνες του SEM (Σχήμα 31) τα σύμπλοκα παρουσιάζουν μία μη σφαιρική μορφολογία η οποία μοιάζει με πρίσμα με παράλληλες και πιθανόν ομαλές πλευρές. Οι εικόνες επίσης δείχνουν ότι τα σύμπλοκα εγκλεισμού σχηματίζουν συσσωματώματα διαφόρων μεγεθών με πιθανότητα τα μεγαλύτερα σωματίδια να προσελκύουν τα μικρότερα επιβεβαιώνοντας τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρονται στην τάση των κυκλοδεξτρινών να σχηματίζουν συσσωματώματα (Kotronia et al., 2017).



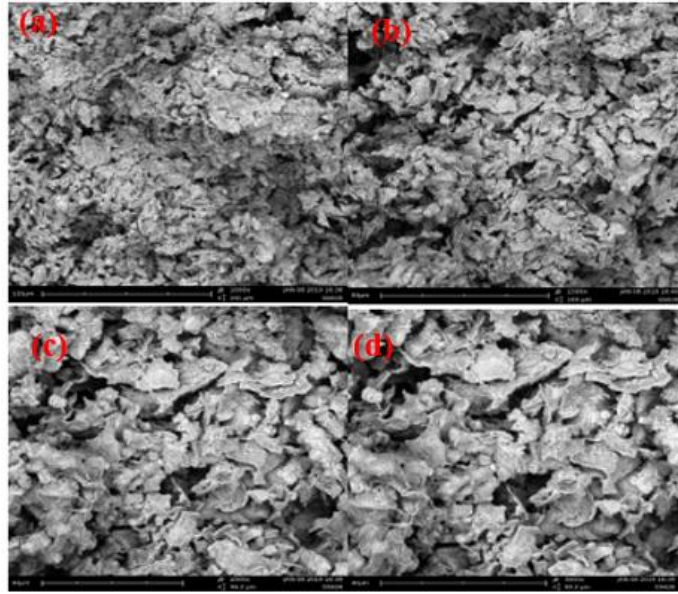
Σχήμα 32: SEM των ETH σε μεγέθυνση (a) x1000, (b) x1500, (c) x2500 και (d) x3000

Μελετώντας τις εικόνες που λήφθηκαν για τα αιθωσώματα (Σχήμα 32) δεν παρατηρείται σφαιρική μορφολογία όπως και στην περίπτωση του συμπλόκου β-CD-ΕΠ. Τα αιθωσώματα φαίνεται να μοιάζουν με πρίσμα με ομαλές πλευρές και ομοιομορφία στην κατανομή του μεγέθους.



Σχήμα 33: SEM των LCP σε μεγέθυνση (a) x1000, (b) x1500, (c) x2500 και (d) x3000

Σύμφωνα με τις εικόνες SEM που λήφθηκαν για τα λιπωσώματα τύπου LCP δεν είναι ικανή η μεμονωμένη απεικόνιση τους. Ωστόσο, γίνεται φανερό πως κατέχουν μία εντελώς διαφορετική μορφολογία συγκριτικά τόσο με το σύμπλοκο όσο και με τα υπόλοιπα είδη λιπωσμάτων με μία δομή που μοιάζει με εκείνη της κηρήθρας. Η ακριβής μορφολογία θα είναι δυνατόν να μελετηθεί με εικόνες μικροσκοπίου μεγαλύτερης μεγέθυνσης.



Σχήμα 34: SEM των DLL σε μεγέθυνση (a) x1000, (b) x1500, (c) x2500 και (d) x3000

Όπως παρατηρείται από τις εικόνες SEM των δίπλα φορτωμένων λιποσώματα DLL, τα λιποσώματα παρουσιάζουν μία μη σφαιρική μορφολογία και σε αυτήν την περίπτωση με πολύ διαφορετική, ωστόσο, όψη. Συγκριτικά με τα αποτελέσματα SEM των ETH & LCP, τα δίπλα φορτωμένα λιποσώματα δεν παρουσιάζουν παράλληλες και ομαλές πλευρές αλλά μοιάζουν περισσότερο με ανάγλυφα φυλλώματα.

4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση ακατέργαστης πρόπολης υποβοηθούμενη από υπερήχους και μαγνητική ανάδευση. Τα εκχυλίσματα πρόπολης που παρασκευάστηκαν από τις δύο τεχνικές συγκρίθηκαν ως προς την απόδοση διεργασίας αλλά και την καθαρότητά τους. Οι δύο μέθοδοι παρουσίασαν χαμηλές αποδόσεις διεργασίας με μέγιστη τιμή 16.5 % για τη μέθοδο των υπερήχων σε συνθήκες έντασης 38% της μέγιστης και για χρονικό διάστημα 45 λεπτών. Ωστόσο βέλτιστο εκχύλισμα θεωρήθηκε το GS6 λόγω της υψηλής καθαρότητας και διαύγειας του, απαλλαγμένο από ρητινώδεις εκκρίσεις, προσμίξεις και έλαια. Τα εκχυλίσματα υποβοηθούμενα από μαγνητική ανάδευση παρουσίασαν παρόμοια καθαρότητα με τα εκχυλίσματα υποβοηθούμενα από υπερήχους, παρόλα αυτά παρατηρήθηκε χαμηλότερη απόδοση διεργασίας. Παράλληλα, η συνολική διάρκεια παρασκευής των εκχυλισμάτων υπό μαγνητική ανάδευσης ήταν ένας ανασταλτικός παράγοντας στην επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου ως βέλτιστης.

Ο εγκλεισμός του εκχυλίσματος πρόπολης (ΕΠ) σε β -CD επιτεύχθηκε με τη μέθοδο της συν-καταβύθισης, με σκοπό τη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εγκλεισμένων ουσιών και την στοχευμένη και ελεγχόμενη χορήγηση των βιοδραστικών ουσιών του ΕΠ. Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού παρουσίασαν εξαιρετικά αποτελέσματα όσον αφορά το μέγεθός τους (208.2 ± 3 nm), τη σταθερότητα τους (-41.4 ± 2.4 mV) και τη μορφολογία τους σύμφωνα με τις μετρήσεις DLS και τις εικόνες SEM που λήφθηκαν. Ο επιτυχής σχηματισμός των συμπλόκων εγκλεισμού β -CD-ΕΠ και ο εγκλεισμός του ΕΠ επιβεβαιώθηκε μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR, της φασματοσκοπίας NMR και τις θερμικές αναλύσεις των DSC και TGA. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώνουν την παρουσία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ξενιστή (β -CD) και του φιλοξενούμενου μορίου (ΕΠ).

Ο εγκλεισμός του ΕΠ σε λιποσώματα PC/CHOL πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου. Τα λιποσώματα PPC και PP (με και χωρίς χρήση χοληστερόλης ως σταθεροποιητικό μέσο αντίστοιχα) δεν παρουσίασαν ικανοποιητική κατανομή ωστόσο τα αποτελέσματα κατά την μέτρηση του μεγέθους τους (281.3 ± 17.6 nm και 73.93 ± 7.4 nm αντίστοιχα) ήταν αποδεκτά. Η σταθερότητα των σωματιδίων ήταν ικανοποιητική (-40.1 ± 1.3 mV και -26.6 ± 2.8 mV). Ο σχηματισμός των λιποσωμάτων PP και PPC επιβεβαιώθηκε μέσω φασματοσκοπίας FT-IR με προφανείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφολιπιδίων και του ΕΠ.

Βασικός στόχος αυτής της εργασίας ήταν επίσης και ο εγκλεισμός του εκχυλίσματος σε β -CD με τη μέθοδο της συν-καταβύθισης και στη συνέχεια και η παρασκευή διπλών συστημάτων εγκλεισμού, που φέρουν το σύμπλοκο εγκλεισμού β -CD-ΕΠ με σκοπό την διατήρηση των σημαντικών βιολογικών ιδιοτήτων της πρόπολης. Η δημιουργία των διπλών συστημάτων εγκλεισμού επιτεύχθηκε με την παρασκευή των λιποσωμάτων (LCP), των διπλά φορτωμένων λιποσωμάτων (DLL) και των αιθοσωμάτων (ETH) με τις μεθόδους ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου, έγχυσης αιθανόλης και κρύας μεθόδου, αντίστοιχα.

Τα σχηματιζόμενα λιποσώματα DLL και ETH παρουσίασαν ικανοποιητικό μέγεθος (221.5 ± 2 nm και 428.2 ± 42.6 nm αντίστοιχα) καθώς και ικανοποιητική σταθερότητα (-36.6 ± 2.5 mV και -39.4 ± 1.8 mV) όπως προέκυψε από τις μετρήσεις DLS. Η μορφολογία τους βάσει των εικόνων SEM φαίνεται να παραπέμπει σε ομοιομορφία των συστημάτων χωρίς τάση συσσωμάτωσης. Τα λιποσώματα LCP, δεν παρουσίασαν ομοιόμορφη κατανομή, ωστόσο είχαν ικανοποιητικές τιμές μεγέθους (204.3 ± 16.1 nm) και σταθερότητας (-34.7 ± 1.3 mV).

Οι μετρήσεις DLS που πραγματοποιήθηκαν έπειτα από διάστημα δύο μηνών έδειξαν την διατήρηση της σταθερότητας των διπλά φορτωμένων λιποσωμάτων (DLL) παρουσιάζοντας δείκτη πολυδιασποράς 0.248 και ζ-δυναμικό -37.5 mV υποδεικνύοντας σταθερή διασπορά σωματιδίων.

Ο επιτυχής σχηματισμός των λιποσωμάτων επιβεβαιώθηκε από τη φασματοσκοπία FT-IR, και τις θερμικές αναλύσεις DSC και TGA. Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων παρουσιάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συμπλόκου β-CD-ΕΠ και των λιποσωμάτων.

Με αυτόν τον τρόπο η δημιουργία διπλών συστημάτων εγκλεισμού είναι εν δυνάμει αποτελεσματική προσέγγιση για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της υψηλής ευαισθησίας του ΕΠ καθώς και για να ενισχυθεί η βιοδιαθεσιμότητά του, παρέχοντας τα μέσα για την ανάπτυξη προϊόντων με καινοτόμα χαρακτηριστικά. Γι' αυτόν τον σκοπό, τα διπλά συστήματα εγκλεισμού αξιοποιήθηκαν περαιτέρω με τη δημιουργία καλλυντικής κρέμας εμπλουτισμένης σε λιποσώματα DLL ώστε να διατηρηθούν οι σημαντικές για την υγεία ιδιότητες της πρόπολης και να αυξηθεί η ικανότητα διαπέρασης των ουσιών του ΕΠ δια του δέρματος. Επιπλέον, το διπλό σύστημα εγκλεισμού προσφέρει τη γρήγορη απελευθέρωση του ΕΠ που βρίσκεται στη διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων αλλά και την παρατεταμένη απελευθέρωση των ουσιών της πρόπολης που βρίσκονται εγκλεισμένες στο σύμπλοκο με τη β-CD.

5 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η παρούσα μελέτη προσέφερε ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά στην δημιουργία διπλών συστημάτων, με το σύμπλοκο β-CD-ΕΠ να εγκλείεται επιτυχώς στα λιποσώματα. Πρόκειται ωστόσο για ένα σχετικά καινούργιο ερευνητικό πεδίο με προοπτικές στον τομέα υγείας με σκοπό στην στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων. Προτείνονται λοιπόν παρακάτω ορισμένες δυνατότητες εξέλιξης της έρευνας στον τομέα αυτό.

- Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης του εκχυλίσματος της πρόπολης από τα διπλά συστήματα εγκλεισμού (LCP, DLL και ETH). Η κατανόηση του ρυθμού απελευθέρωσης είναι κομβικής σημασίας για την τελική εφαρμογή των συστημάτων αυτών.
- Σημαντική παράμετρο για τη ανάπτυξη μιας καλλυντικής κρέμας αποτελεί η μελέτη της σταθερότητας της. Στο πλαίσιο αυτό η καλλυντική κρέμα που παρασκευάστηκε με ενσωματωμένα τα DLL θα μπορούσε να μελετηθεί ως προς τη σταθερότητά της σύμφωνα με τις διαδικασίες που ακολουθούνται κατά τον ποιοτικό έλεγχο μιας κρέμας.
- Αξιολόγηση της *in vitro* βιολογικής δράσης των συμπλόκων β-CD-ΕΠ και των διαφόρων ειδών λιποσωμάτων προκειμένου να εξεταστεί αν η διεργασία του εγκλεισμού συνέβαλε στην βελτίωση της δράσης τους (αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη).
- Η περαιτέρω διερεύνηση της εκχύλισης για τη βελτίωση της απόδοσης της διεργασίας. Επιπλέον, χρήσιμη θα ήταν η πλήρης ταυτοποίηση του χημικού προφίλ των παραλαμβανόμενων εκχυλισμάτων με χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και η σύγκριση της σύστασης τόσο των εκχυλισμάτων που παραλαμβάνονται από διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης όσο και από διαφορετικές αναλογίες των διαλυτών εκχύλισης.
- Δεδομένου ότι τα αιθωσώματα παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα διαπέρασης της στιβάδας του δέρματος, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η παρασκευή καλλυντικής κρέμας εμπλουτισμένης με αιθωσώματα και στη συνέχεια η μελέτη της σταθερότητάς της όπως επίσης και της ικανότητας διαπέρασης τεχνητού φραγμού που προσομοιάζει αυτό του δέρματος.

6 Βιβλιογραφία

- Ahn, J. C., Biswas, R., & Chung, P. S. (2013). Synergistic effect of radachlorin mediated photodynamic therapy on propolis induced apoptosis in AMC-HN-4 cell lines via caspase dependent pathway. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.01.005>
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., & Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf048726s>
- Ainbinder, D., & Touitou, E. (2005). Testosterone ethosomes for enhanced transdermal delivery. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*. <https://doi.org/10.1080/10717540500176910>
- Ainbinder, D., & Touitou, E. (2011). A new approach for skin tumor treatment: From delivery system characterization to in vivo evaluation. *Drug Delivery and Translational Research*. <https://doi.org/10.1007/s13346-010-0006-y>
- Ascenso, A., Raposo, S., Batista, C., Cardoso, P., Mendes, T., Praça, F. G., ... Simões, S. (2015). Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: Transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S86186>
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.001>
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
- Bankova, V. (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.2.01>
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.1029>
- Barlak, Y., Değer, O., Uçar, M., & Çakiroğlu, T. N. (2015). Effects of Turkish propolis extract on secretion of polymorphonuclear elastase following respiratory burst. *Turkish Journal of Biology*. <https://doi.org/10.3906/biy-1402-48>
- Bendas, E. R., & Tadros, M. I. (2007). Enhanced Transdermal Delivery of Salbutamol Sulfate via Ethosomes. *Spectrum*. <https://doi.org/10.1208/pt0804107>
- Benson, H. A., & McElnay, J. C. (1994). Topical Non-steroidal Anti-inflammatory Products as Ultrasound Couplants: Their Potential in Phonophoresis. *Physiotherapy (United Kingdom)*. [https://doi.org/10.1016/S0031-9406\(10\)61010-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9406(10)61010-3)
- Bilensoy, E. (2011). *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*. *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*. <https://doi.org/10.1002/9780470926819>

- Bragagni, M., Maestrelli, F., Mennini, N., Ghelardini, C., & Mura, P. (2010). Liposomal formulations of prilocaine: Effect of complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin on drug anesthetic efficacy. *Journal of Liposome Research*. <https://doi.org/10.3109/08982100903544169>
- Bragagni, M., Mennini, N., Maestrelli, F., Cirri, M., & Mura, P. (2012). Comparative study of liposomes, transfersomes and ethosomes as carriers for improving topical delivery of celecoxib. *Drug Delivery*. <https://doi.org/10.3109/10717544.2012.724472>
- Brewster, M. E., Hora, M. S., Simpkins, J. W., & Bodor, N. (1991). Use of 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a Solubilizing and Stabilizing Excipient for Protein Drugs. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. <https://doi.org/10.1023/A:1015870521744>
- Chawalinee Asawahame [a], Krit Sutjarittangtham [b], Sukum Eitssayeam [b], Yingmanee Tragoolpua [c], B. S. [a] and J. S. (2015). Formation of Orally Fast Dissolving Fibers Containing Propolis by Electrospinning Technique. *Chiang Mai J. Sci.*
- Chen, J., Lu, W.-L., Gu, W., Lu, S.-S., Chen, Z.-P., Cai, B.-C., & Yang, X.-X. (2014). Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes: a promising delivery system for hydrophobic drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.884557>
- Clarot, I., Clédat, D., Battu, S., & Cardot, P. J. P. (2000). Chromatographic study of terpene derivatives on porous graphitic carbon stationary phase with β -cyclodextrin as mobile phase modifier. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00907-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00907-9)
- Crystal, R. G. (1995). The gene as the drug. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm0195-15>
- Damle, M., & Mallya, R. (2016). Development and Evaluation of a Novel Delivery System Containing Phytospholipid Complex for Skin Aging. *AAPS PharmSciTech*. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0386-x>
- Dayan, N., & Touitou, E. (2000). Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: Ethosomes vs. liposomes. *Biomaterials*. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00063-6)
- Deamer, D., & Bangham, A. D. (1976). Large volume liposomes by an ether vaporization method. *BBA - Biomembranes*. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90483-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90483-1)
- Demetzos, C. (2008). Differential Scanning Calorimetry (DSC): A tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *Journal of Liposome Research*. <https://doi.org/10.1080/08982100802310261>
- Dubey, V., Mishra, D., & Jain, N. K. (2007). Melatonin loaded ethanolic liposomes: Physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.03.007>
- Duchene, D., & Editor. (1991). New Trends in Cyclodextrins and Derivatives. *Section Title: Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.1149/06123.0025ecst>
- Elnaggar, Y. S. R., El-Refaie, W. M., El-Massik, M. A., & Abdallah, O. Y. (2014). Lecithin-based nanostructured gels for skin delivery: An update on state of art and recent applications. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.02.004>
- Esposito, E., Menegatti, E., & Cortesi, R. (2004). Ethosomes and liposomes as topical vehicles

- for azelaic acid: a preformulation study. *J Cosmet Sci.* https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2004.00233_2.x
- F., L., F., G., & G., B. (2010). Noninvasive ventilation for acute respiratory failure: State of the art (II part). *Italian Journal of Medicine.* <https://doi.org/10.1016/j.itjm.2010.01.006>
- Fang, Y. P., Tsai, Y. H., Wu, P. C., & Huang, Y. Bin. (2008). Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.020>
- Finnin, B. C., & Morgan, T. M. (1999). Transdermal penetration enhancers: Applications, limitations, and potential. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* <https://doi.org/10.1021/js990154g>
- Hadgraft, J. (2001). Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics.* [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00731-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00731-1)
- Hatzi, P., Mourtas, S., G. Klepetsanis, P., & Antimisiaris, S. G. (2007). Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. *International Journal of Pharmaceutics.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.059>
- Hill, L. E., Gomes, C., & Taylor, T. M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology.* <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.011>
- Irie, T., & Uekama, K. (1999). Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00057-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00057-X)
- Jain, S. K., Gupta, Y., Jain, A., & Amin, S. (2008). Elastic liposomes bearing meloxicam-beta-cyclodextrin for transdermal delivery. *Current Drug Delivery.* <https://doi.org/10.2174/156720108784911677>
- Jain, S., Patel, N., Madan, P., & Lin, S. (2015). Quality by design approach for formulation, evaluation and statistical optimization of diclofenac-loaded ethosomes via transdermal route. *Pharmaceutical Development and Technology.* <https://doi.org/10.3109/10837450.2014.882939>
- Jia, J., Song, N., Gai, Y., Zhang, L., & Zhao, Y. (2016). Release-controlled curcumin proliposome produced by ultrasound-assisted supercritical antisolvent method. *Journal of Supercritical Fluids.* <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.03.026>
- Jr, F. S. (1996). Preparation of liposome and lipid complex compositions. *US Patent 5,567,434.*
- Kant, A., Linforth, R. S. T., Hort, J., & Taylor, A. J. (2004). Effect of β -Cyclodextrin on Aroma Release and Flavor Perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* <https://doi.org/10.1021/jf0307088>
- Kaur, C. D., & Saraf, S. (2011). Topical vesicular formulations of Curcuma longa extract on recuperating the ultraviolet radiation-damaged skin. *Journal of Cosmetic Dermatology.* <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2011.00586.x>
- Kauscher, U., Stuart, M. C. A., Drücker, P., Galla, H. J., & Ravoo, B. J. (2013). Incorporation of amphiphilic cyclodextrins into liposomes as artificial receptor units. *Langmuir.* <https://doi.org/10.1021/la3045434>

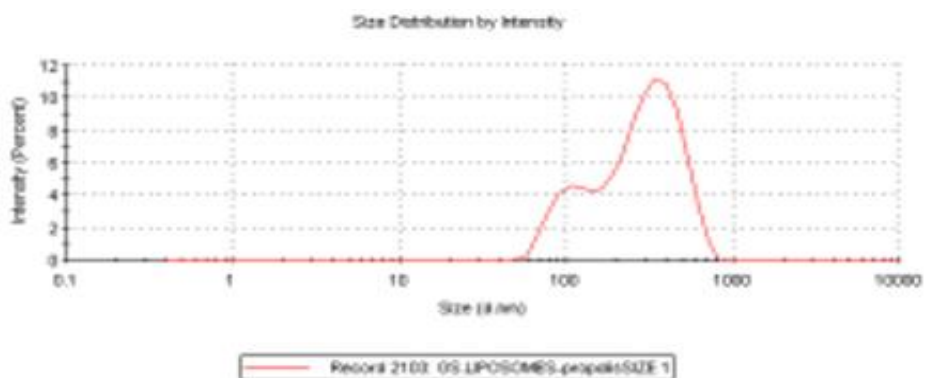
- Kedzia B, Geppert B, I. J. (1990). Pharmacological Investigations of ethanolic extract of propolis. *Phytothérapie*.
- Kim, J., Jung, I.-S., Kim, S.-Y., Lee, E., Kang, J.-K., Sakamoto, S., ... Kim, K. (1995). Comprehensive Supramolecular Chemistry. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* <https://doi.org/10.1109/RoMoCo.2013.6614577>
- Kotronia, M., Kavetsou, E., Loupassaki, S., Kikionis, S., Vouyiouka, S., & Detsi, A. (2017). Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) Essential Oil in β -Cyclodextrin (β -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes. *Bioengineering*. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030074>
- Kwak, H. S. (2014). Overview of Nano- and Microencapsulation for Foods. In *Nano- and Microencapsulation for Foods*. <https://doi.org/10.1002/9781118292327.ch1>
- Lee, K. W., Kang, N. J., Kim, J. H., Lee, K. M., Lee, D. E., Hur, H. J., & Lee, H. J. (2008). Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B. *Genes and Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s12263-007-0067-9>
- Li, G., Fan, Y., Fan, C., Li, X., Wang, X., Li, M., & Liu, Y. (2012). Tacrolimus-loaded ethosomes: Physicochemical characterization and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.05.011>
- Marquele, F. D., Oliveira, A. R. M., Bonato, P. S., Lara, M. G., & Fonseca, M. J. V. (2006). Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.12.022>
- McCormack, B., & Gregoriadis, G. (1994). Drugs-in-cyclodextrins-in liposomes: a novel concept in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90361-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90361-1)
- Meresta, T. (1997). Changes in antibacterial activity of propolis extracts during long storage.
- Morse theory. (1975). *North-Holland Mathematical Library*. [https://doi.org/10.1016/S0924-6509\(08\)70209-5](https://doi.org/10.1016/S0924-6509(08)70209-5)
- Negri, G., Salatino, M. L. F., & Salatino, A. (2003). 'Green propolis': Unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. *Journal of Apicultural Research*. <https://doi.org/10.1080/00218839.2003.11101087>
- Orsi, R. O., Fernandes, A., Bankova, V., & Sforcin, J. M. (2012). Antibacterial effects of Brazilian and Bulgarian propolis and synergistic effects with antibiotics acting on the bacterial DNA and folic acid. *Natural Product Research*, 26(4), 344–349. <https://doi.org/10.1080/14786411003754355>
- Orsolich N. (2010). A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science*. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.02.1.01>
- Paintz, M., & Metzner, J. (1979). On the local anaesthetic action of propolis and some of its constituents. *Die Pharmazie*.
- Papisov, M. I., Maksimenko, A. V., & Torchilin, V. P. (1985). Optimization of reaction conditions during enzyme immobilization on soluble carboxyl-containing carriers. *Enzyme and Microbial Technology*. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90003-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90003-1)

- Patel, H. M. (1990). Liposomes: A practical approach. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81487-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81487-9)
- Pitha, J., Gerloczy, A., & Olivi, A. (1994). Parenteral hydroxypropyl cyclodextrins: Intravenous and intracerebral administration of lipophiles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1002/jps.2600830615>
- Pouton, C. W., & Seymour, L. W. (2001a). Key issues in non-viral gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00133-2)
- Pouton, C. W., & Seymour, L. W. (2001b). Key issues in non-viral gene delivery1PII of original article: S0169-409X(98)00048-9. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 34 (1998) 3–19.1. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00133-2)
- Prasanthi, D., & Lakshmi, P. K. (2012). Development of ethosomes with taguchi robust design-based studies for transdermal delivery of alfuzosin hydrochloride. *International Current Pharmaceutical Journal*. <https://doi.org/10.3329/icpj.v1i11.12063>
- PROKOPOVICH, & NN. (1957). Propolis a new anesthetic. *Vrach Delo.*, 10, 1077–1080. Retrieved from <https://ci.nii.ac.jp/naid/10012545100/>
- Puri, R., & Jain, S. (2012). Ethogel topical formulation for increasing the local bioavailability of 5-fluorouracil: A mechanistic study. *Anti-Cancer Drugs*. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3283534051>
- R., H., H., G., S., S., S., L., & V., K. (2009). Ethosomes and its applications in transdermal drug delivery. *Current Drug Therapy*.
- Rakmai, J., Cheirsilp, B., Torrado-Agrasar, A., Simal-Gándara, J., & Mejuto, J. C. (2017). Encapsulation of yarrow essential oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: physiochemical characterization and evaluation of bio-efficacies. *CyTA - Journal of Food*. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1286523>
- Rao, Y., Zheng, F., Zhang, X., Gao, J., & Liang, W. (2008). In Vitro Percutaneous Permeation and Skin Accumulation of Finasteride Using Vesicular Ethosomal Carriers. *AAPS PharmSciTech*. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9124-y>
- Roussaki, M., Gaitanarou, A., Diamanti, P. C., Vouyiouka, S., Pappaspyrides, C., Kefalas, P., & Detsi, A. (2014). Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability*. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.08.004>
- Sainz, M. C., Chantres, J. R., Elorza, B., & Elorza, M. A. (1993). DSC study of the action of phenylbutazone on phospholipid phase transitions. *International Journal of Pharmaceutics*. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90414-B](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90414-B)
- Saravana Kumar, K., Sushma, M., & Prasanna Raju, R. (2013). Dissolution enhancement of poorly soluble drugs by using complexation technique - A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*.
- Schaefer, H., Redelmeier, T. E., Schaefer, H., & Redelmeier, T. E. (1996). *Skin barrier: Principles of percutaneous absorption*. *Skin barrier: Principles of percutaneous absorption*. <https://doi.org/10.1001/archderm.1997.03890430146031>
- Schardinger, F. (1903). ??ber thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch -

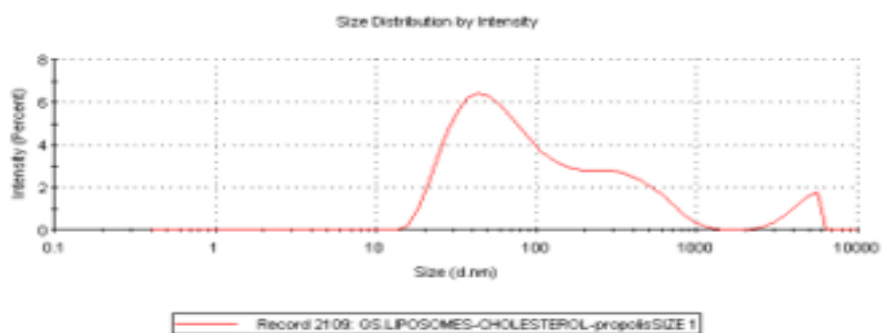
- sowie ber einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nhrslungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Strke. *Zeitschrift fR Untersuchung Der Nahrungs- Und GenuMittel*. <https://doi.org/10.1007/BF02067497>
- Schardinger, F. (1905). *Bacillus macerans*, a bacillus which produces acetone. *Centr. Bakt. Par.*
- Schardinger, F. (1911). The Formation of Crystallin Polysaccharides (Dextrins) from Starch Paste by Microorganisms. *Centr. Bakt. Parasitenk.*
- Scheller S, Stojko A, Szwarnowiecka, I., Tustanowski, J., Obuszko, Z., & Arzneimittel-Forschung. (1977). Biological properties and clinical application of propolis. VI. Investigation of the influence of ethanol extracts of propolis (EEP) on cartilaginous tissue regeneration. *Arzneimittel-Forschung*. <https://doi.org/10.1108/02656710810898649>
- Shahgaldian, P., & Piele, U. (2006). Cyclodextrin derivatives as chiral supramolecular receptors for enantioselective sensing. *Sensors*. <https://doi.org/10.3390/s6060593>
- Shaji, J., & Varkey, D. (2012). Recent advances in physical approaches for transdermal penetration enhancement. *Current Drug Therapy*. <https://doi.org/10.2174/157488512803988030>
- Shumilov, M., & Touitou, E. (2010). Buspirone transdermal administration for menopausal syndromes, in vitro and in animal model studies. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.029>
- Sihorkar, V., & Vyas, S. P. (2001). Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- Song, L. X., Wang, H. M., Xu, P., Yang, Y., & Zhang, Z. Q. (2008). Experimental and Theoretical Studies on the Inclusion Complexation of Syringic Acid with α -, β -, γ - and Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.468>
- Sonmez, S., Kirilmaz, L., Yucesoy, M., Yücel, B., & Yilmaz, B. (2005). The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.035>
- Stella, V. J., & Rajewski, R. A. (1997). Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1023/A:1012136608249>
- Stojko, A., Scheller, S., Szwarnowiecka, I., Tustanowski, J., Ostach, H., & Obuszko, Z. (1978). Biological properties and clinical application of propolis. VIII. Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on the regeneration of bone tissue. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*
- Sun, X., Sui, S., Ference, C., Zhang, Y., Sun, S., Zhou, N., ... Zhou, K. (2014). Antimicrobial and mechanical properties of β -cyclodextrin inclusion with essential oils in chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf5027873>
- T. Pessine, F. B., Calderini, A., & L., G. (2012). Review: Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. In *Magnetic Resonance Spectroscopy*. <https://doi.org/10.5772/32029>
- Taylor, K. M. G., & Morris, R. M. (1995). Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochimica Acta*. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)01884-J](https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)01884-J)

- Tereza N.C. Dantas, Hélio S.R.C. Silva, Afonso Avelino Dantas Neto, Maria C. Marcucci, M. A. M. M. (2010). Development of a new propolis microemulsion system for topical applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300013>
- Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., & Eliaz, M. (2000). Ethosomes - Novel vesicular carriers for enhanced delivery: Characterization and skin penetration properties. *Journal of Controlled Release*. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00222-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00222-9)
- Uekama, K. (1999). Cyclodextrins in drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00051-9)
- Valera, M. C., Da Rosa, J. A., Maekawa, L. E., De Oliveira, L. D., Carvalho, C. A. T., Kogaito, C. Y., & Jorge, A. O. C. (2010). Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.01.029>
- Villiers, A. (1891). Fermentation of starch by the butyric ferment. *Compt. Rend.*
- Vyas, A., Saraf, S., & Saraf, S. (2008). Cyclodextrin based novel drug delivery systems. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s10847-008-9456-y>
- Wyatt, G. R., & Meyer, W. L. (1956). The chemistry of insect hemolymph. *The Journal of General Physiology*. <https://doi.org/10.1085/jgp.42.5.1005>
- Yuliani, S., Torley, P. J., D'Arcy, B., Nicholson, T., & Bhandari, B. (2006). Extrusion of mixtures of starch and D-limonene encapsulated with β -cyclodextrin: Flavour retention and physical properties. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.08.005>
- Zath, J. L., Kushla, G. P., Gels, in Lieberman, H. A., Lachman, L., & Schwatz, J. B. P. (1990). Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems. In *Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2557>
- Zhaowu, Z., Xiaoli, W., Yangde, Z., & Nianfeng, L. (2009). Preparation of matrine ethosome, its percutaneous permeation in vitro and anti-inflammatory activity in vivo in rats. *Journal of Liposome Research*. <https://doi.org/10.1007/s40574-016-0097-6>
- Zhou, Y., Wei, Y. H., Zhang, G. Q., & Wu, X. A. (2010). Synergistic penetration of ethosomes and lipophilic prodrug on the transdermal delivery of acyclovir. *Archives of Pharmacal Research*. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0411-2>
- Zhou, Y., Wei, Y., Liu, H., Zhang, G., & Wu, X. (2010). Preparation and In vitro Evaluation of Ethosomal Total Alkaloids of *Sophora alopecuroides* Loaded by a Transmembrane pH-Gradient Method. *AAPS PharmSciTech*. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9509-6>
- Τρουλλίδου Έλενα. Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων της και αξιολόγηση ενθυλακωμένων μορών της σε βιοπολυμερή, με έμφαση στις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητές της και στην απελευθέρωσή της (2007). Retrieved from <http://estia.hua.gr/file/lib/default/data/4309/theFile>

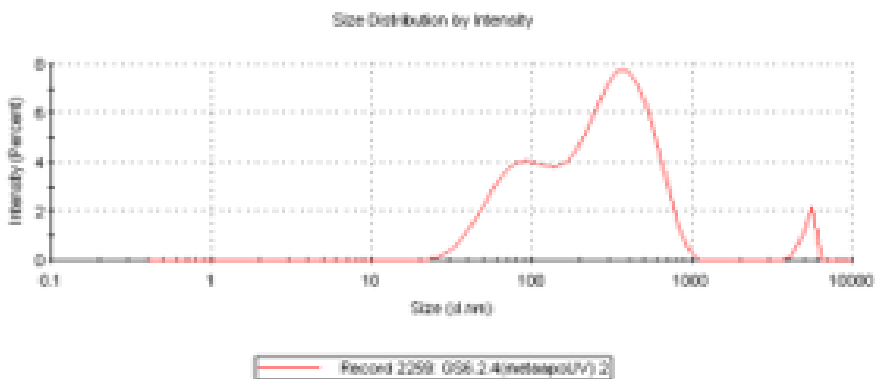
7 Παράρτημα εικόνων



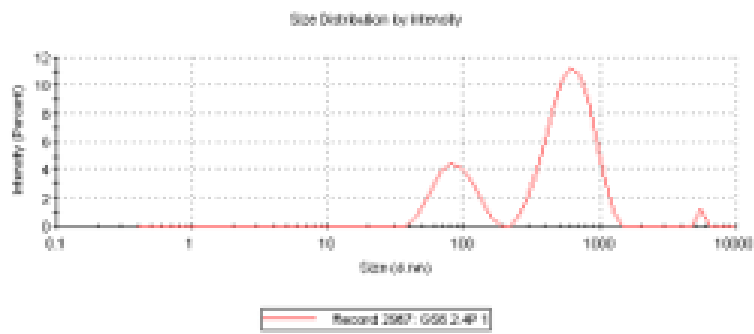
Σχήμα 35: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος PP



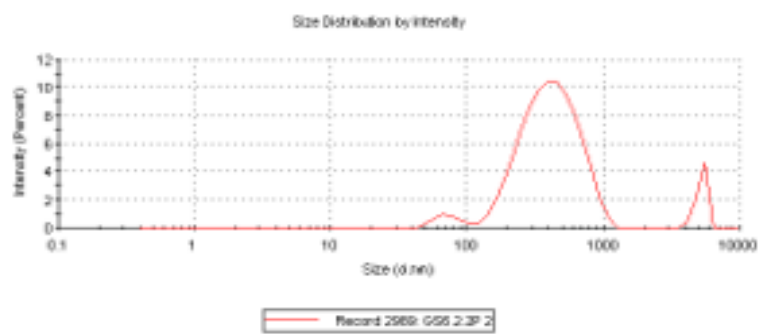
Σχήμα 36: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος PPC



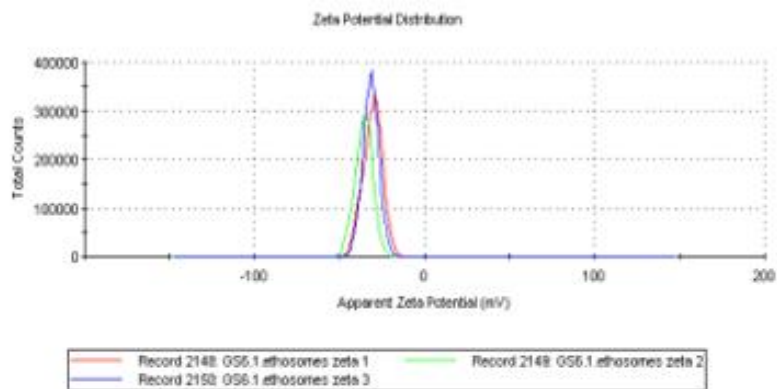
Σχήμα 37: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος LCP



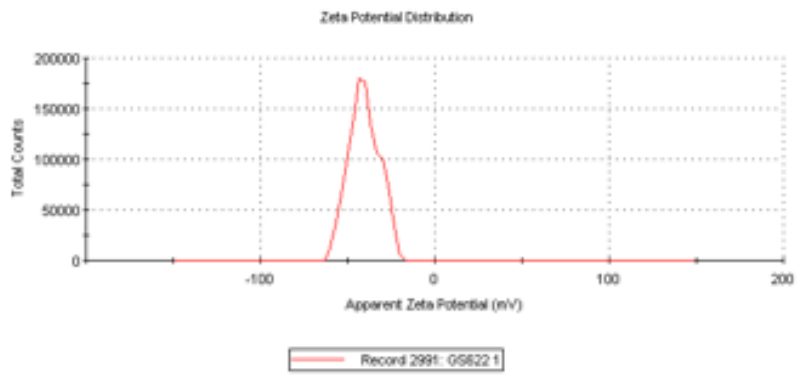
Σχήμα 38: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος LCP μετά το πέρας 2 μηνών



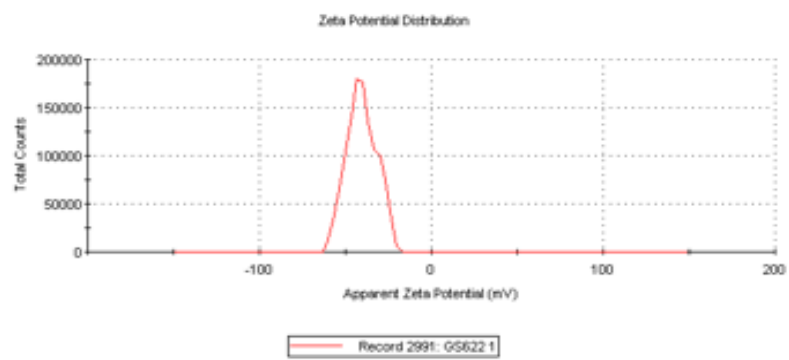
Σχήμα 39: Κατανομή μεγέθους του λιποσώματος ETH μετά το πέρας 2 μηνών



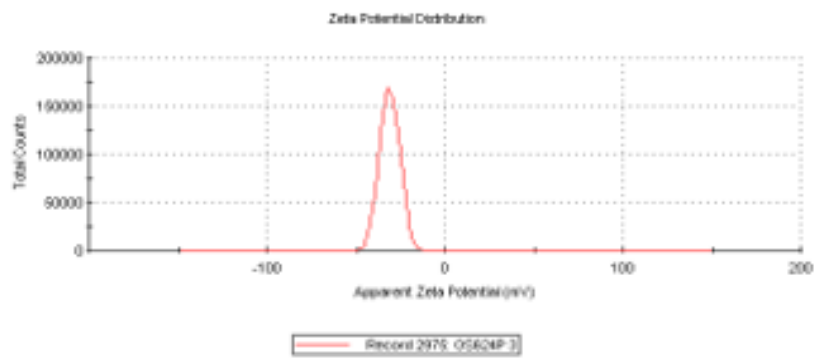
Σχήμα 40: Κατανομή ζ-δυναμικού του συμπλόκου β-CD-ΕΠ



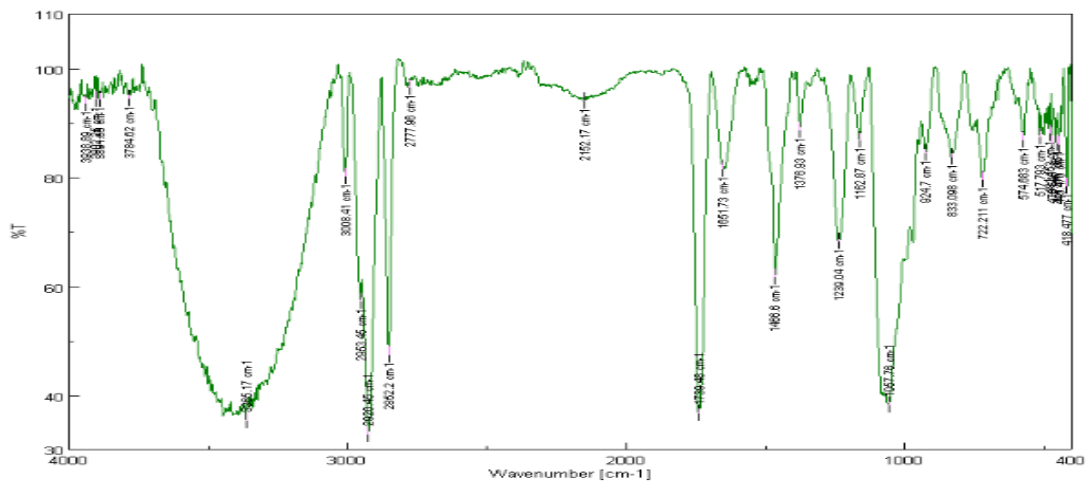
Σχήμα 41: Κατανομή ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων DLL



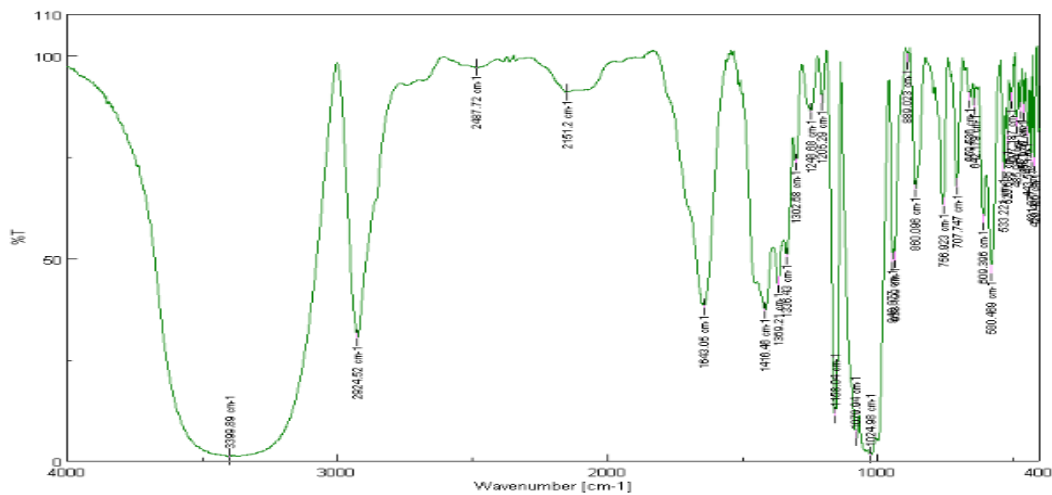
Σχήμα 42: Κατανομή ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων ETH



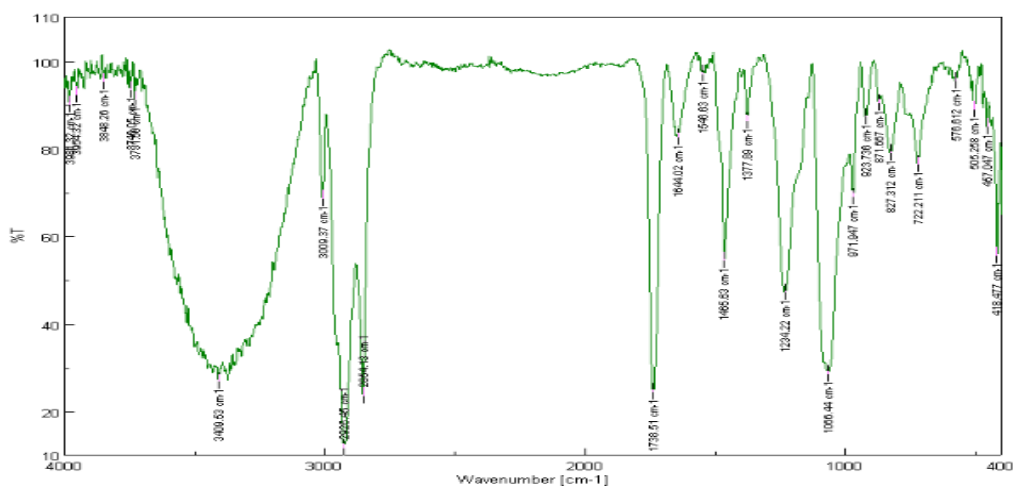
Σχήμα 43: Κατανομή ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων LCP



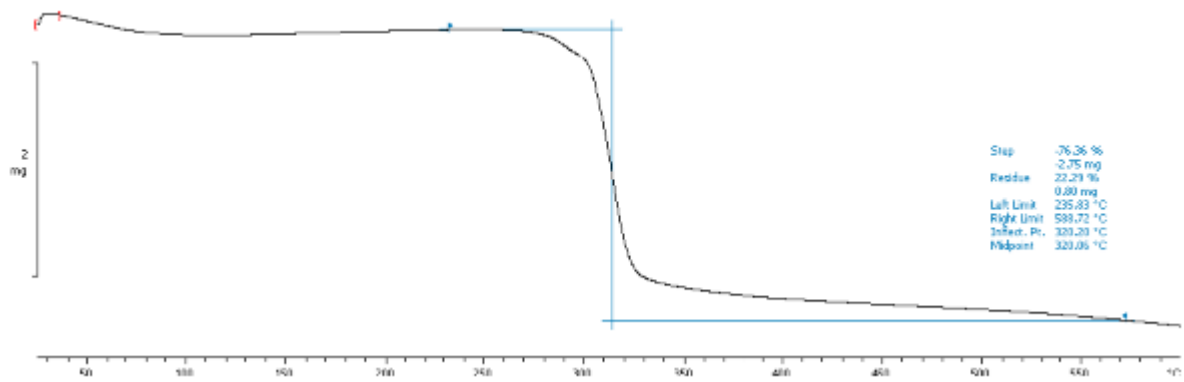
Σχήμα 44: Φάσμα FT-IR φυσικού μίγματος β -CD, PC



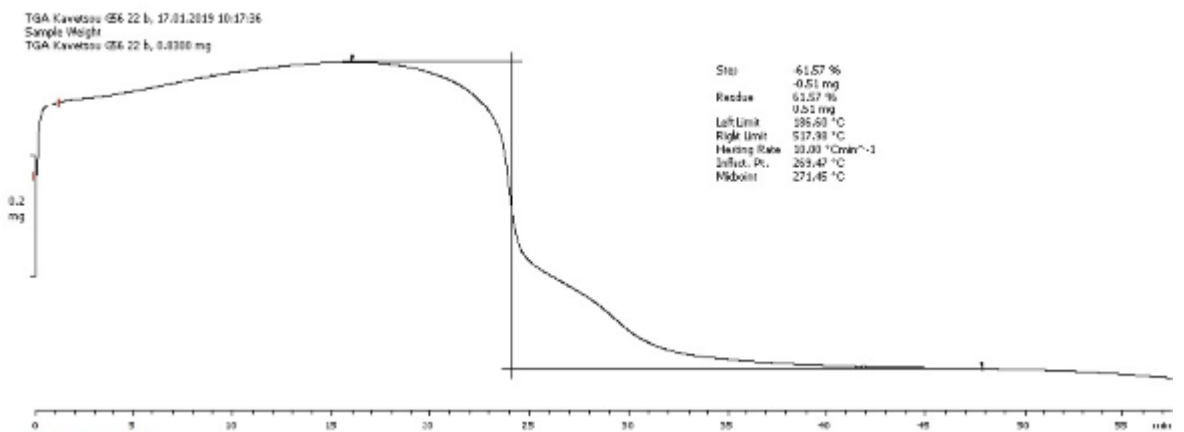
Σχήμα 45: Φάσμα FT-IR φυσικού μίγματος β -CD-ΕΠ



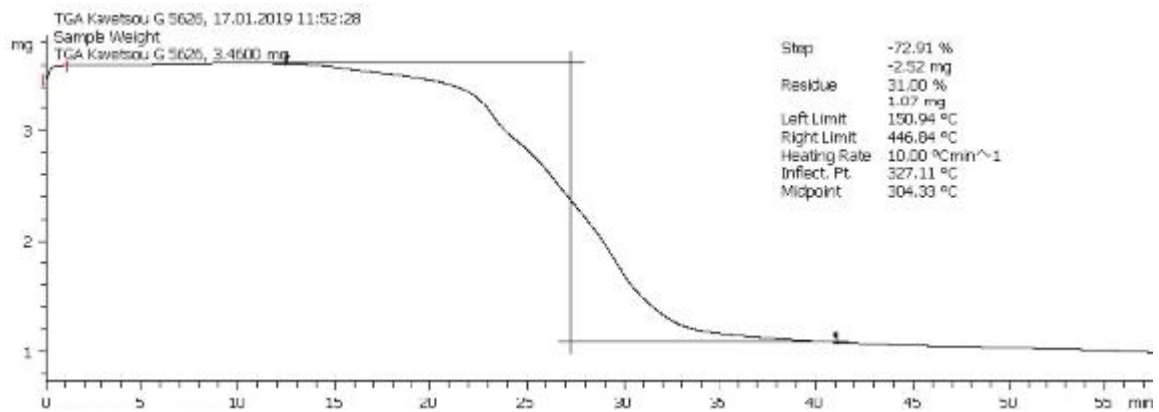
Σχήμα 46: Φάσμα FT-IR φυσικού μίγματος ΕΠ, PC



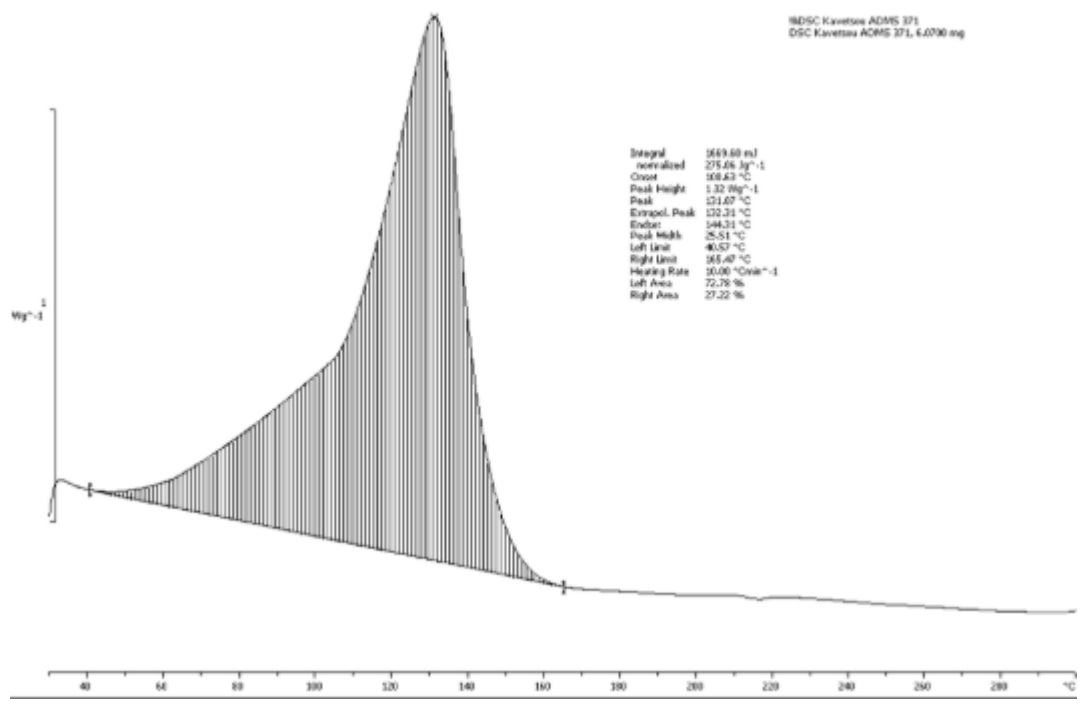
Σχήμα 47: Διάγραμμα TGA του συμπλόκου β-CD-ΕΠ



Σχήμα 48: Διάγραμμα TGA των λιποσωμάτων ETH



Σχήμα 49: Διάγραμμα TGA των λιποσωμάτων DLL



Σχήμα 50: Διάγραμμα DSC β-CD