



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας II: Ανάλυσης, Σχεδιασμού & Ανάπτυξης Διεργασιών και Συστημάτων

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου, Αθήνα 157 80

Εργαστήριο Σχεδιασμού & Ανάλυσης Διεργασιών

Διπλωματική Εργασία

Αξιοποίηση καινοτόμων συστημάτων εγκλεισμού ως
εναλλακτικών στρατηγικών λίπανσης και φυτοδιέγερσης

Λυδία Μαντά

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Μαγδαληνή Κροκίδα

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2024

Αναρτημένες Ανακοινώσεις σε Συνεδριά

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΔΕΡΕΙΑ ΜΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ:

1) L. Manta, E. Kavetsou, G. Frakolaki, S. Papadaki, M. Krokida, Development of innovative electrospun salicylic acid-zein microparticles as promising priming system, 27th International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA), 25-29 August 2024, Prague, Czechia.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΣΥΝΕΔΡΕΙΑ ΜΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ:

1) M. Dimoula, L. Manta, E. Kavetsou, M. Krokida, S. Papadaki, DEVELOPMENT OF MARINE BASED FORMULATIONS USING EFFICIENT EXTRACTION AND ENCAPSULATION TECHNIQUE, 14ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, 29-31 Μαΐου 2024, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.

2) Manta L., Vasaliev V., Romito F., Kavetsou E., Tricha N., Krokida M., Papadaki S., DEVELOPMENT OF ZEIN ELECTROSPUN PARTICLES FOR THE POTENTIAL DELIVERY OF VARIOUS EXTRACTS AND THEIR USE AS INNOVATIVE FEED ADDITIVE 5th International Congress on Applied Ichthyology, Oceanography, and Aquatic Environment (HydroMediT 2024), 30th of May to the 2nd of June 2024, Mytilene, Greece.

Πρόλογος και Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στη σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών κατά την διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2023 – 2024. Πρόλογος και Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα, Δρ. Μαγδαληνή Κροκίδα, καθηγήτρια του Ε.Μ.Π., για την πολύτιμη βοήθειά της, την εμπιστοσύνη της, τις ουσιαστικές συμβουλές της στο διάστημα εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας και την αποφασιστικότητα που επέδειξε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Δρ. Ελένη Καβέτσου, μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, για την εξαιρετική συνεργασία, το κλίμα προσφοράς που δημιούργησε, τις γνώσεις βάσει των οποίων καθοδηγήθηκε αυτή η έρευνα και την υποστήριξη της σε κάθε βήμα.

Παράλληλα, ευχαριστώ ιδιαιτέρως τους Υποψήφιες Διδάκτορες του Εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών για την βοήθεια τους και τις συμβουλές τους πάνω στην διεξαγωγή των πειραμάτων και τα άτομα που εκπονήσαμε παράλληλα τις διπλωματικές μας για το κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν και την στήριξή τους σε αυτή την πορεία.

Η παρούσα διπλωματική εργασία κινούνταν σε δύο άξονες έρευνας. Σε πρώτο στάδιο μελετάται η εφαρμογή της μεθόδου του ηλεκτροστατικού ψεκασμού για την δημιουργία μικρο-σωματιδίων εγκλεισμένου σαλικυλικού οξέος σε μήτρα ζεΐνης, μικρο-σωματιδίων που περιέχουν χιτοζάνη και πολυβινυλική αλκοόλη και η αξιολόγηση των χαρακτηριστικών τους με βάση διάφορες μεθόδους. Η βιωσιμότητα του προϊόντος κατά την παραγωγή, μεταφορά, αποθήκευση και κατανάλωση ενισχύεται μέσω της μεθόδου της ενθυλάκωσης και ταυτόχρονα ελέγχεται ο τρόπος απελευθέρωσης τους στο νερό με σκοπό την ομαλή απορρόφηση της ουσίας και την διατήρηση της ισορροπίας του φυτού κατά την εφαρμογή. Σε δεύτερο στάδιο μελετάται η παραγωγή στερεών εκχυλισμάτων, μετά από ξήρανση υπό κατάψυξη, από το θαλάσσιο φυτό *Saccharina Latissima* με συμβατικό τρόπο εκχύλισης και με χρήση υπερήχων. Το θαλάσσιο φυτό, *Saccharina Latissima*, λόγω των βιοδραστικών συστατικών που περιέχει και μπορεί να εκχυλιστούν, και το χαμηλό κόστος καλλιέργειας και παραγωγής εκχυλισμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά των συνθετικών λιπασμάτων, ανοίγοντας τον δρόμο για πιο βιώσιμες πρακτικές γεωργίας. Τα εκχυλίσματα αξιολογούνται για την βιοδραστικότητά τους, μελετώντας την περιεκτικότητά τους σε ευεργετικές ουσίες όπως οι φαινολικές ενώσεις, ουσίες με ικανότητα αντιοξειδωτικής δράσης, χλωροφύλλες, καροτενοειδή, φυκοκυανίνες και πρωτεΐνες. Το επιστημονικό και εμπορικό ενδιαφέρον είναι αυξημένο στο αντικείμενο της παρούσας έρευνας, μιας και αναδεικνύουν έναν νέο και περισσότερο φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο ενίσχυσης της ανάπτυξης των φυτών και προστασίας τους χωρίς να συνοδεύονται από τις επιπτώσεις που έχουν οι συμβατικές χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα.

Περίληψη

Η παγκόσμια γεωργία σήμερα αντιμετωπίζει σημαντικές προκλήσεις λόγω της αυξανόμενης ζήτησης για τρόφιμα, της κλιματικής αλλαγής, της απώλειας βιοποικιλότητας ως απόρροια των προηγούμενων και της διαχείρισης των βιοτικών και αβιοτικών πιέσεων που δέχονται τα φυτά. Η ανάγκη για νέες βιώσιμες πρακτικές έχει οδηγήσει στην έρευνα και ανάπτυξη νέων τεχνολογιών, όπως ο εγκλεισμός δραστικών φυσικών ουσιών σε βιοαποικοδομήσιμα συστήματα αλλά και εκχυλίσμάτων από θαλάσσια φυτά, για την ενίσχυση της φυτικής παραγωγής χωρίς την επιβάρυνση του περιβάλλοντος.

Στη συγκεκριμένη εργασία, μελετάται η ανάπτυξη μικρο-συστημάτων για την προώθηση της φυτικής ανάπτυξης χρησιμοποιώντας το σαλικυλικό οξύ ως εγκλεισμένο φυσικό παράγοντα σε μικρο-σωματίδια ζεΐνης, καθώς και μικρο-σωματίδια χιτοζάνης, τα οποία παρουσιάζουν εγγενή δράση στην ανάπτυξη του φυτού, ενώ τα εκχυλίσματα από θαλάσσια φυτά χρησιμοποιούνται ως πιθανοί βιοδιεγέρτες. Το σαλικυλικό οξύ, ως φυτοορμόνη, έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει ευεργετικές ιδιότητες στην ανάπτυξη και προστασία των φυτών. Η ζεΐνη είναι μια φυτικής προέλευσης πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται ως μήτρα εγκλεισμού για την προστασία των βιοδραστικών ουσιών και την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους. Η χιτοζάνη αποτελεί έναν φυσικό πολυσακχαρίτη με βιοδιεγερτική δράση, που προάγει την ανάπτυξη των φυτών και ενισχύει την αντοχή τους στο περιβαλλοντικό στρες. Τα εκχυλίσματα θαλάσσιων φυτών όπως η *Saccharina Latissima* έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια ως πλούσιες πηγές βιοδραστικών ενώσεων, με αποτελεσματική δράση στην ενίσχυση της ανάπτυξης διαφόρων καλλιεργειών.

Ειδικότερα, στην παρούσα έρευνα μελετάται ο εγκλεισμός διαφόρων ποσοστών του σαλικυλικού οξέος σε μήτρα ζεΐνης μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού, καθώς και η παραγωγή σωματιδίων χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης με την ίδια τεχνική. Πραγματοποιείται βελτιστοποίηση της μεθόδου του ηλεκτροστατικού ψεκασμού ενώ τα προς εγκλεισμό διαλύματα που περιέχουν ζεΐνη και σαλικυλικό οξύ αξιολογούνται για τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως την ηλεκτρική αγωγιμότητα και την επιφανειακή τάση. Εν συνεχεία, τα παραγόμενα σωματίδια χαρακτηρίζονται μέσω διαφόρων αναλυτικών τεχνικών για την ικανότητα εγκλεισμού και τις νέες ιδιότητές τους μέσω Φασματομετρίας Ορατού-Υπεριώδους με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR), την συμπεριφορά του κατά την θερμική καταπόνηση και τις νέες θερμικές ιδιότητες των σχηματισμένων σωματιδίων μέσω Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC), την μορφολογία των νέων σωματιδίων μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) και την μέτρηση της υδροδυναμικής διαμέτρου μέσω Δυναμική Σκέδασης Φωτός (Microtrack). Ο εγκλεισμός φαίνεται να έχει γίνει επαρκώς και τα νέα σωματίδια χρήζουν βελτιωμένων θερμικών ιδιοτήτων. Όπως προκύπτει από την ανάλυση SEM τα σωματίδια ζεΐνης με εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ παρουσιάζουν σφαιρική δομή διαμέτρου 1.925 μm. Τα σωματίδια χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης παρουσιάζουν άμορφο σχήμα με διάμετρο της τάξης των 20 – 200 μm, ενώ η υδροδυναμική διάμετρος επιβεβαιώνει την μέτρηση. Τα σωματίδια με εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ μελετώνται με βάση την απόδοση εγκλεισμού του και βρέθηκε πως η απόδοση φτάνει το 60.3% για ποσοστό φόρτωσης 40%. Σε μικρότερα ποσοστά

φόρτωσης (10, 20 και 30%) η απόδοση εγκλεισμού είναι μικρότερη. Ταυτόχρονα, το προφίλ απελευθέρωσης του σαλικυλικού οξέος ακολουθεί το κινητικό μοντέλο των Korsmeyer – Peppas, μέσα στις 4 πρώτες ώρες απελευθερώνεται το 41.5% που σε 48 ώρες μπορεί να απελευθερωθεί το 65% του συνολικού σαλικυλικού οξέος.

Στην ίδια έρευνα μελετάται η βιοδιεγερτική δράση των εκχυλισμάτων από το φύκος *Saccharina Latissima*. Ειδικότερα, αναλύονται οι μέθοδοι της συμβατικής εκχύλισης και της υποβοηθούμενης από υπερήχους σε συνδυασμό με τη χρήση διαφόρων διαλυτών (οργανικών και μη), θερμοκρασίας, χρόνου εκχύλισης και μάζας ξηρής πρώτης ύλης στο πως επιδρούν στην ανάκτηση ουσιών υψηλής αξίας. Τα εκχυλίσματα που λήφθηκαν αναλύθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση (αναστολή δράσης ελεύθερης ρίζας DPPH), το ολικό φαινολικό περιεχόμενό τους (TPC), το περιεχόμενο τους σε χλωροφύλλες, καροτενοειδή και φυκοκυανίνες καθώς και το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο.

Η υψηλότερη ανάκτηση στερεών από το ξηρό στερεό φύκος *Saccharina Latissima*, σημειώθηκε πως είναι 55.28% και επιτεύχθηκε κατά την συμβατική εκχύλιση σε αλκαλικό περιβάλλον (0.1 M NaOH). Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους σημείωσε μικρότερες ανακτήσεις. Συγκεκριμένα κατά την εκχύλιση με σύστημα διαλυτών νερό/μεθανόλη για 20 λεπτά ανακτήθηκε το 47.52 % των ολικών στερεών, ενώ σε διαλυτή νερό για 10 λεπτά σημειώθηκε 39.54%, ανάκτηση στερεών. Η ικανότητα αντιοξειδωτικής δράσης των υγρών εκχυλισμάτων αναλύθηκε μέσω της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και ποσοτικοποιήθηκαν σε ισοδύναμα Trolox. Η περιεκτικότητα τους κυμαίνεται ανάμεσα στο 0.22 - 0.8 mg Trolox/g ξηρής πρώτης ύλης. Επιπλέον η περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων εκτιμήθηκε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu και κυμαίνεται μεταξύ 0.08 - 4.81 mg GAE/g ξηρής πρώτης ύλης, με την συμβατική αλκαλική εκχύλιση να κατέχει την μεγαλύτερη τιμή. Τόσο οι συμβατικές εκχυλίσεις, όσο και οι υποβοηθούμενες από υπερήχους με διαλύτη το νερό παρουσίασαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλες και καροτενοειδή παρουσιάζεται μειωμένη, με την μέγιστη τιμή να εντοπίζεται στην εκχύλιση σε αλκαλικό περιβάλλον. Μέσω της εκχύλισης με υπερήχους (10 λεπτά, διαλύτης απιονισμένο νερό, 1g ξηρής πρώτης ύλης) ανακτήθηκε το 80.8% των ολικών φυκοκυανινών που περιέχονται στην πρώτη ύλη. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υγρών εκχυλισμάτων ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford σε ισοδύναμα αλβουμίνης, με την περιεκτικότητα να φτάνει το 1.49 mg BSA/g ξηρής πρώτης ύλης.

Λέξεις Κλειδιά: βιοδραστικές ουσίες, μέθοδος εγκλεισμού, ηλεκτροψεκασμός, συμβατική εκχύλιση, εκχύλιση με υπερήχους

Abstract

In our days global agriculture faces great challenges attributable to the increasing demand for food, climate changes, loss of biodiversity as a consequence of the climate crisis, and the management of biotic and abiotic stresses on plants. The aroused need for sustainable practices has led searching for novel technologies, such as the encapsulation of bioactive natural compounds within biodegradable systems. In particular, marine plant extracts have garnered significant attention for their potential to enhance plant growth without harming the environment.

This study investigates the development of micro-systems with the scope to promote plant growth, using bioactive substances such as salicylic acid encapsulated in zein microparticles, and chitosan microparticles. Additionally, marine plant extracts extracted from *Saccharina Latissima*, are explored as potential biostimulants. Salicylic acid is a phytohormone that has been demonstrated to promote plant growth and protect plants from various stresses. Zein is a plant-based protein that is used often as an encapsulation matrix to protect bioactive compounds and facilitate their controlled release. Chitosan is a natural polysaccharide that exhibits biostimulant properties, promoting plant growth and increasing stress tolerance. Marine plant extracts, particularly from *Saccharina Latissima*, have attracted considerable interest in recent years as rich sources of bioactive compounds with demonstrated efficacy in enhancing the growth of various crops.

Specifically, this research investigates the encapsulation via electrospraying of varying amounts of salicylic acid within a zein matrix, as well as the production of chitosan/polyvinyl alcohol particles using the same technique. The encapsulation of solutions containing zein and salicylic acid were optimized for the electrospraying process. The resulting solutions are evaluated for their physicochemical properties, such as electrical conductivity and surface tension. Subsequently, the produced particles are characterized using various analytical techniques with the hope to assess the encapsulation efficiency and their novel properties through Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) to evaluate thermal behavior and thermal properties, scanning electron microscopy (SEM) to analyze the morphology, and dynamic light scattering (Microtrack) to measure the hydrodynamic diameter. Encapsulation appears to have been done successfully, and the new particles exhibit improved thermal properties. SEM analysis reveals that zein particles encapsulating salicylic acid possess a spherical structure with a diameter of 1.925 μm , while the hydrodynamic diameter is larger. The chitosan/polyvinyl alcohol particles, on the other hand, exhibit an amorphous shape with a diameter ranging from 20 to 200 μm , with the hydrodynamic diameter to be align with these measurements. The encapsulation efficiency of salicylic acid-loaded particles was investigated and found to reach 60.3% for loading percentage of 40%. At lower drug loading percentages

Abstract

(10, 20, and 30%), the encapsulation efficiency observed to be lower. The release profile of salicylic acid from the encapsulated particles follows the Korsmeyer-Peppas kinetic model, with 41.5% released within the first 4 hours, and up to 65% of the total salicylic acid released within 48 hours.

The biostimulant activity of extracts from the seaweed *Saccharina Latissima* was also investigated in this study. More specific, conventional and ultrasound-assisted extraction methods were analyzed in combination with various solvents (organic and inorganic), temperatures, extraction duration, and dry matter masses with the aim to determine their impact on recovering high-value compounds. The obtained extracts were analyzed for their antioxidant activity (DPPH radical scavenging assay), total phenolic content (TPC), chlorophyll, carotenoid, and phycocyanin content, as well as protein content.

The highest solid recovery from dried *Saccharina Latissima*, 55.28%, was achieved using conventional extraction under alkaline conditions (0.1 M NaOH). The ultrasound-assisted extraction achieved lower recoveries, with 47.52% of total solids recovered using a water/methanol solvent system for 20 minutes, and 39.54% using water as a solvent for 10 minutes. The antioxidant activity of the liquid extracts was analyzed using the DPPH assay and quantified into Trolox equivalents, the values was ranging from 0.22 to 0.8 mg Trolox/g dry matter. Furthermore, the phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method and the content ranges from 0.08 to 4.81 mg GAE/g dry matter, with the highest value obtained from conventional extraction in alkaline environment. Both conventional and ultrasound-assisted extractions using water as a solvent achieved satisfactory results. The content of chlorophylls and carotenoids was lower, with the highest values observed in alkaline extraction. Ultrasound-assisted extraction (10 minutes, distilled water, 1g dry matter) resulted in the recovery of 80.8% of the total phycocyanin content in the dry raw material. The protein content of the liquid extracts was quantified using the Bradford method, with a content of 1.49 mg BSA/g dry matter.

Keywords: bioactive compounds, encapsulation methods, electrospraying, conventional extraction, ultrasound extraction

Περιεχόμενα

Αναρτημένες Ανακοινώσεις σε Συνέδριά.....	3
Πρόλογος και Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη	5
Abstract.....	7
Περιεχόμενα Πινάκων	12
Περιεχόμενα Διαγραμμάτων.....	14
Περιεχόμενα Εικόνων	15
Περιεχόμενα Σχημάτων	16
1. Εισαγωγή.....	17
1.1. Προκλήσεις στον Αγροτικό Τομέα	17
1.2. Βιοδιεγέρτες	18
1.3. Εγκλεισμός	20
1.3.1. Διεργασίες Εγκλεισμού.....	21
1.3.2. Εφαρμογές του Εγκλεισμού.....	25
1.4. Σαλικυλικό Οξύ.....	26
1.4.1. Χημική Σύσταση και Ιδιότητες Σαλικυλικού Οξέος.....	26
1.4.2. Εφαρμογές Σαλικυλικού Οξέος	26
1.5. Ζεΐνη.....	28
1.5.1. Εφαρμογές της Ζεΐνης	29
1.6. Χιτοζάνη και Πολυβινυλική Αλκοόλη.....	31
1.6.1. Εφαρμογές της χιτοζάνης	31
1.7. Φυτοδιεγέρτες από Φύκια.....	35
1.7.1. Φύκος <i>Saccharina Latissima</i>	36
1.7.2. Εφαρμογές Εκχυλισμάτων <i>Saccharina's Latissima</i>	38
1.8. Εκχύλιση	38
1.8.1. Συμβατική Εκχύλιση	39
1.8.2. Εκχύλιση με Υπερήχους	39
1.9. Τεχνικές Ανάλυσης Μικρο-Σωματιδίων.....	40
1.9.1. Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR).....	40
1.9.2. Σάρωση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου (SEM).....	42
1.9.3. Τεχνική Σκέδασης Φωτός (Microtrack).....	43

1.9.4. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)	43
1.10. Τεχνικές Ανάλυσης Εκχυλισμάτων από <i>Saccharina Latissima</i>	44
1.10.1. Μέθοδος Bradford – Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνικού Περιεχομένου	44
1.10.2. Μέθοδος Folin-Ciocalteu – Ποσοτικοποίηση Ολικών Φαινολικών Ενώσεων	46
1.10.3. Μέθοδος Trolox – Ποσοτικοποίηση Αντιοξειδωτικής Δράσης	47
2. Σκοπός.....	48
3. Πειραματικό Μέρος	49
3.1. Υλικά.....	49
3.1.1. Υλικά για την Παραγωγή Εγκλεισμένων Σωματιδίων	49
3.1.2. Υλικά για την Ανάλυση των Εγκλεισμένων Σωματιδίων	49
3.1.3. Υλικά για την Εκχύλιση Φυκιών	49
3.1.4. Υλικά για τον Χαρακτηρισμό των Εκχυλισμάτων	50
3.2. Όργανα και Συσκευές.....	51
3.3. Μέθοδοι.....	52
3.3.1. Προετοιμασία Διαλυμάτων για Εγκλεισμό	52
3.3.2. Χαρακτηρισμός Διαλυμάτων Ζείνης – Σαλικυλικού Οξέος.....	54
3.3.3. Εγκλεισμός μέσω Ηλεκτροψεκασμού.....	55
3.3.4. Απόδοση Ηλεκτρουδροδυναμικής Διεργασίας	57
3.3.5. Απόδοση Εγκλεισμού Σαλικυλικού Οξέος σε Ζεΐνη.....	57
3.3.6. Ανάλυση Μορφολογίας Σωματιδίων (SEM & DLS).....	59
3.3.7. Φασματομετρική Ανάλυση (FTIR/ATR).....	61
3.3.8. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσής (DSC)	61
3.3.9. Μελέτη Απελευθέρωσης Εγκλεισμένου Σαλικυλικού Οξέος.....	62
3.3.10. Συμβατική Μέθοδος Εκχύλισης.....	63
3.3.12. Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους.....	65
3.3.13. Χαρακτηρισμός Εκχυλισμάτων <i>Saccharina Latissima</i>	67
4. Αποτελέσματα.....	78
4.1. Χαρακτηρισμός Διαλυμάτων Ζείνης για τον Ηλεκτροψεκασμό	78
4.2. Χαρακτηρισμός Διαλυμάτων Χιτοζάνης/Πολυβινυλικής Αλκοόλης για τον Ηλεκτροψεκασμό	79
4.3. Βελτιστοποίηση Διεργασίας Ηλεκτροψεκασμού	80
4.4. Απόδοση Ηλεκτροϋδροδυναμικής Διεργασίας - Ανάκτηση Στερεού	81
4.4.1 Απόδοση Ηλεκτροϋδροδυναμικής Διεργασίας Ζείνης/Σαλικυλικού Οξέος.....	81
4.4.2. Απόδοση Ηλεκτροϋδροδυναμικής Διεργασίας Χιτοζάνης/Πολυβινυλικής Αλκοόλης	82
4.5. Απόδοση Εγκλεισμού Σαλικυλικού Οξέος σε Ζεΐνη.....	82
4.6. Χαρακτηρισμός Μορφολογίας και Υδροδυναμικής Διαμέτρου Εγκλεισμένων Σωματιδίων (SEM & Microtracking Analysis).....	84

4.6.1. Μορφολογία (SEM) και Διάμετρος Σωματιδίων Ζείνης.....	84
4.6.2. Μορφολογία και Διάμετρος Σωματιδίων Χιτοζάνης/Πολυβινυλικής Αλκοόλης ..	85
4.7. Φασματομετρική Ανάλυση (FTIR/ATR).....	86
4.7.1. Φασματομετρική Ανάλυση Σωματιδίων Ζείνης/Σαλικυλικού Οξέος.....	86
4.7.2. Φασματομετρική Ανάλυση Σωματιδίων Χιτοζάνης/Πολυβινυλικής Αλκοόλης ...	87
4.8. Θερμικές Ιδιότητες Σωματιδίων (DSC)	88
4.8.1. Θερμική Ανάλυση Σωματιδίων Ζείνης/Σαλικυλικού Οξέος.....	88
4.8.2. Θερμική Ανάλυση Σωματιδίων Χιτοζάνης/Πολυβινυλικής Αλκοόλης.....	91
4.9. Προφίλ Απελευθέρωσης Εγκλεισμένου Σαλικυλικού Οξέος από τα Μικροσωματίδια Ζείνης.....	92
4.10. Εκχύλιση Βιοδιεγερτών από το Φύκος <i>Saccharina Latissima</i>	94
4.10.1. Συμβατική Εκχύλιση Βιοδιεγερτών από το Φύκος <i>Saccharina Latissima</i> – Ανάκτηση Στερεών.....	94
4.10.2. Εκχύλιση με Υπερήχους Βιοδιεγερτών από το φύκος <i>Saccharina Latissima</i> – Ανάκτηση Στερεών.....	96
4.11. Αντιοξειδωτική Δράση – Ισοδύναμα Trolox	98
4.12. Συγκέντρωση Ολικών Φαινολικών Ενώσεων	100
4.13. Ολικά Καροτενοειδή και Χλωροφύλλες	103
4.14. Προσδιορισμός Φυκοκυανινών	104
4.15. Προσδιορισμός Πρωτεϊνικού Περιεχομένου	105
5. Συμπεράσματα	107
6. Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα	110
7. Βιβλιογραφία	111

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1. Διαλύματα ζεϊνης και σαλικυλικού οξέος για την βελτιστοποίηση του ηλεκτροψεκασμού.....	53
Πίνακας 2. Διαλύματα χιτοζάνης και πολυβινυλικής αλκοόλης για τη βελτιστοποίηση του ηλεκτροψεκασμού.....	54
Πίνακας 3. Δεδομένα συγκέντρωσης σαλικυλικού οξέος σε διάλυμα αιθανόλης σε σχέση με την απορρόφηση στα 234 nm για την καμπύλη βαθμονόμησης.....	59
Πίνακας 4. Πειραματικές συνθήκες συμβατικών εκχυλίσσεων σε υδατικό και οργανικών διαλυτών περιβάλλον.....	64
Πίνακας 5. Πειραματικές συνθήκες εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους σε υδατικό περιβάλλον.....	65
Πίνακας 6. Πειραματικές συνθήκες εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους με οργανικούς διαλύτες.....	66
Πίνακας 7. Δεδομένα συγκέντρωσης (C) γαλλικού οξέος και απορρόφησης για τη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.....	69
Πίνακας 8. Δεδομένα συγκέντρωσης Trolox συναρτήσει της απορρόφησης για τη καμπύλη αναφοράς.....	71
Πίνακας 9. Δεδομένα συγκέντρωσης αλβουμίνης βόειου ορού και απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm για την καμπύλη βαθμονόμησης με διαλύτη απιονισμένο νερό.....	75
Πίνακας 10. Δεδομένα συγκέντρωσης αλβουμίνης βόειου ορού και απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm για την καμπύλη βαθμονόμησης με διαλύτη νερό/μεθανόλη σε αναλογία 80/20.....	76
Πίνακας 11. Ηλεκτρική αγωγιμότητα και επιφανειακή τάση για τον χαρακτηρισμό των διαλυμάτων ζεινης.....	79
Πίνακας 12. Πειραματικές συνθήκες ηλεκτροψεκασμού-απόσταση βελόνας/δίσκου συλλογής, ηλεκτρικό δυναμικό και ροή υγρού- για το διάλυμα ζεϊνης.....	80
Πίνακας 13. Πειραματικές συνθήκες ηλεκτροψεκασμού-απόσταση βελόνας/δίσκου συλλογής, ηλεκτρικό δυναμικό και ροή υγρού- για το διάλυμα χιτοζάνης.....	80
Πίνακας 14. Απόδοση διεργασίας ηλεκτροψεκασμού εγκλεισμένου σαλικυλικού οξέος σε ζεϊνη σε σχέση με το ποσοστό φόρτωσης στην εγκλεισμένη ουσία και η τυπική απόκλιση...81	
Πίνακας 15. Απόδοση διεργασίας ηλεκτροψεκασμού παραγωγής σωματιδίων χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης και η τυπική απόκλιση τους.....	82
Πίνακας 16. Αποδόσεις εγκλεισμού σαλικυλικού οξέος συναρτήσει του ποσοστού φόρτωσης των σωματιδίων και η τυπική απόκλιση.....	83
Πίνακας 17. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης R^2 για κάθε κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης, εκθέτης (n), και η εξίσωση του Korsmeyer-Peppas για την απελευθέρωση του σαλικυλικού οξέος από μικρο-σφαιρίδια σε pH 7 και θερμοκρασία 35 °C.....	93
Πίνακας 18. Δεδομένα ανάκτησης για τις συμβατικές εκχυλίσσεις με υδατικά διαλύματα και διαλύματα με οργανικούς διαλύτες.....	94
Πίνακας 19. Ποσοστιαία απόδοση ανάκτησης και τυπική απόκλιση εκχυλίσσεων υποβοηθούμενες από υπερήχους με διαλύτη το απιονισμένο νερό συναρτήσει της μάζας της πρώτης ύλης σε θερμοκρασία 30 °C.....	97

Πίνακας 20. Ποσοστιαία απόδοση ανάκτησης και τυπική απόκλιση εκχυλίσεων υποβοηθούμενες από υπερήχους με οργανικούς διαλύτες σε θερμοκρασία 30 °C και αναλογία στερεού προς υγρό 1/40.....	98
Πίνακας 21. Αντιοξειδωτική δράση μετρούμενη σε Trolox (TEAC) για τα εκχυλίσματα συμβατικής και υποβοηθούμενης από υπερήχους εκχύλιση με διάφορους διαλύτες	99
Πίνακας 22. Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε ολικές φαινολικές ενώσεις και οι τυπικές αποκλίσεις για τα εκχυλίσματα από τις συμβατικές και τις υποβοηθούμενες από υπερήχους εκχυλίσεις με διάφορους διαλύτες.....	100
Πίνακας 23. Περιεκτικότητες καροτενοειδών και χλωροφυλλών στα εκχυλίσματα συμβατικών και υποβοηθούμενων από υπερήχους εκχυλίσεων με διαλύτη απιονισμένο νερό.....	103
Πίνακας 24. Συγκέντρωση σε φυκοκυανίνες της πρώτης ύλης και του στερεού εκχυλίσματος από εκχύλιση με υπερήχους για 10 λεπτά και μάζα φύκους 1 g και τυπική απόκλιση των μετρήσεων.....	104
Πίνακας 25. Περιεκτικότητες πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα συμβατικών και υποβοηθούμενων από υπερήχους εκχυλίσεων με διαλύτη απιονισμένο νερό και διάλυμα νερού/μεθανόλης αναλογίας 80/20.	105

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Καμπύλη βαθμονόμησης απορρόφησης σαλικυλικού οξέος σε διαλύτη την αιθανόλη στα 234 nm.	59
Διάγραμμα 2. Καμπύλη απορρόφησης γαλλικού οξέος - μέθοδος Folin-Ciocalteu.	69
Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς απορρόφησης διαλυμάτων Trolox συναρτήση της συγκέντρωσης.	72
Διάγραμμα 4. Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης βόειου ορού σε μήκος και απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm με διαλύτη απιονισμένο νερό.	76
Διάγραμμα 5. Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης βόειου ορού σε μήκος και απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm με διαλύτη νερό/μεθανόλη 80/20.	77
Διάγραμμα 6. Φασματομετρική ανάλυση FTIR σωματιδίων ζεΐνης με εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ, κενών, καθαρής ζεΐνης και καθαρού σαλικυλικού οξέος.	87
Διάγραμμα 7. Φασματομετρική ανάλυση FTIR εγκλεισμένων σωματιδίων χιτοζάνης (blank).	88
Διάγραμμα 8. DSC διάγραμμα καθαρής ζεΐνης.	89
Διάγραμμα 9. DSC διάγραμμα καθαρού σαλικυλικού οξέος.	90
Διάγραμμα 10. DSC διάγραμμα του φυσικού μίγματος ζεΐνης και σαλικυλικού οξέος.	90
Διάγραμμα 11. DSC διάγραμμα σωματιδίων ζεΐνης με εγκλεισμένο το σαλικυλικό οξύ (75/25 EtOH/AcOH %DL=40).	91
Διάγραμμα 12. DSC διάγραμμα καθαρής χιτοζάνης.	92
Διάγραμμα 13. DSC διάγραμμα παραγμένων σωματιδίων χιτοζάνης/PVA μέσω ηλεκτροψεκασμού.	92
Διάγραμμα 14. In vitro μελέτη του προφίλ αθροιστικής απελευθέρωσης του σαλικυλικού οξέος από τα σωματίδια ζεΐνης σε θερμοκρασία 35 °C (δείγμα: DL=40% σε 75/25 EtOH/H ₂ O).	93

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1. Δείγμα <i>Saccharina Latissima</i> σε μορφή τρίμματος.	50
Εικόνα 2. Φωτόμετρο – Spectrophotometer 211 UV-M51, Bel Photonics	52
Εικόνα 3. Πειραματική αναπαράσταση μέτρησης επιφανειακής τάσης σε διάλυμα που περιέχει ζεΐνη.	55
Εικόνα 4. Συσκευή electrospinning/electrospraying - BioInicia FLUIDNATEK LE-10.....	56
Εικόνα 5. Πειραματική διάταξη παραγωγής σωματιδίων μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού.	57
Εικόνα 6. Παραγωγή σωματιδίων μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού.....	57
Εικόνα 7. Συσκευή περίθλασης - Microtrac S3000/S3500 Series Light Scattering Particle Size Analyzer & Microtrac FLEX software.	61
Εικόνα 8. Φυγόκεντρος (NÜVE NF 400 Centrifuge).	65
Εικόνα 9. Διάταξη ξήρανσης με κατάψυξη – (BK-FD10S, BioBase, China).....	65
Εικόνα 10. Διάταξη συσκευών για εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture Co., Ltd., Nanjing, China).	67
Εικόνα 11. Διάταξη εξάτμισης υπό κενό – Buchi V-800 Vacuum Controller, Buchi Rotavapor R-200.....	67
Εικόνα 12. Μορφολογία των σωματιδίων ζεΐνης (α) με εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ, και (β) των blank σωματιδίων που λήφθηκαν από το SEM σε μεγέθυνση 5000x.	84
Εικόνα 13. Μορφολογία σωματιδίων χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης αναλογίας 1/3 διαλύματος νερού/οξικού οξέος αναλογίας 70/30 σε μεγεθύνσεις (α) x100, (β) x700 και (γ) x1100.....	86
Εικόνα 14. Στερεό εκχύλισμα που λήφθηκε μετά την λυοφιλοποίηση των δειγμάτων που προέκυψαν από τις συμβατικές εκχυλίσεις (α) με διαλύτη το νερό για 3 ώρες σε θερμοκρασία 30 °C (Πείραμα 3.A) και (β) με διαλύτη υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου 0.1 M για έξι ώρες σε θερμοκρασία 65 °C (Πείραμα 8.A).....	95
Εικόνα 15. Υγρά εκχυλίσματα οργανικών διαλυτών (α) ακετόνης, (β) οξικού αιθυλεστέρα, (γ) μεθανόλης και (δ) αιθανόλης μετά από συμβατική εκχύλιση για 3 ώρες σε θερμοκρασία 30 °C.	96
Εικόνα 16. Δείγματα με αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu από εκχύλιση (α) υποβοηθούμενη από υπερήχους για 10 λεπτά, με απιονισμένο νερό και μάζα πρώτης ύλης 2g, (β) υποβοηθούμενη από υπερήχους για 10 λεπτά και μάζα πρώτης ύλης 1g και (γ) συμβατική για 1 ώρα σε θερμοκρασία 30 °C με απιονισμένο νερό (λόγος μάζας πρώτης ύλης προς όγκο διαλύτη 1/20).....	102

Περιεχόμενα Σχημάτων

Σχήμα 1. Δράση βιοδιεγερτών στο αβιοτικό και βιοτικό στρες του περιβάλλοντος.	20
Σχήμα 2. Μορφολογία καψουλών με εγκλεισμένα μόρια (α) μονοπυρηνική, (β) τύπου μήτρας, (γ) πολύ-μεμβρανική, (δ) πολυπυρηνική και (ε) με ακανόνιστο σχήμα.	21
Σχήμα 3. Σχηματικά αναπαράσταση δημιουργίας κώνου Taylor κατά την ηλεκτροστατική παραγωγή.....	22
Σχήμα 4. Χημική δομή σαλικυλικού οξέος.	26
Σχήμα 5. Δράση σαλικυλικού οξέος κατά την εφαρμογή του σε καλλιέργειες φυτών.....	28
Σχήμα 6. Διαγραμματική αναπαράσταση της αρχή λειτουργίας του και της διάταξης του FTIR.	41
Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης της μεθόδου Bradford.....	45
Σχήμα 8. Αναπαράσταση αναγωγή αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu κατά την δέσμευση του με φαινολικές ουσίες σε αλκαλικό περιβάλλον.	46
Σχήμα 9. Χημική δομή γαλλικού οξέος.....	47
Σχήμα 10. Αναπαράσταση της δέσμευσης ουσιών με αντιοξειδωτική δράση με το DPPH.	47

1. Εισαγωγή

1.1. Προκλήσεις στον Αγροτικό Τομέα

Κατά τα τελευταία χρόνια, η υψίστης σημασίας πρόκληση που αντιμετωπίζει ο γεωργικός τομέας έχει αναδειχθεί πως είναι η διασφάλιση επαρκούς παραγωγής τροφίμων για τον διαρκώς αυξανόμενο πληθυσμό. Η περίπλοκη αυτή διαδικασία δυσχεραίνεται ακόμη περισσότερο από πλήθος παραγόντων, όπως η κλιματική αλλαγή και οι σχετιζόμενες αβεβαιότητες, οι παρατεταμένες περίοδοι ξηρασίας και οι διαταραχές στις βιολογικές αλυσίδες [1]. Η ζήτηση για προϊόντα γεωργικής καλλιέργειας έχει αυξηθεί διαθέτοντας λιγότερους πόρους [2]. Παρά τις γεωργικές επενδύσεις και τις τεχνολογικές καινοτομίες που συνεισφέρουν στην αύξηση της παραγωγικότητας, η παραγωγή παρουσιάζει επιβραδυντικούς ρυθμούς. Το φαινόμενο αυτό είναι απόρροια της συνεχούς υποβάθμισης που έχουν υποστεί οι φυσικοί πόροι, της μείωσης της βιοποικιλότητας και της εξάπλωσης ασθενειών που πλήττουν τις καλλιέργειες [3]. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών έχει προβλέψει σημαντική αύξηση του πληθυσμού κατά 34%, φτάνοντας τα 9.1 δισεκατομμύρια, ενώ η ανάγκη για παραγωγή τροφίμων θα αυξηθεί κατά 50%. Εκτιμήσεις έχουν δείξει ότι σχεδόν το 25% της καλλιεργήσιμης γης έχει υποβαθμιστεί λόγω γεωργικών δραστηριοτήτων [4]. Η γεωργία, όπως φαίνεται, είναι ένα σύνθετο κοινωνικό-οικολογικό σύστημα το οποίο βρίσκεται σε κρίσιμο σημείο καμπής, αντιμετωπίζοντας άνευ προηγουμένου προκλήσεις. Το πολυεπίπεδο αυτό φαινόμενο καθιστά αναγκαία μια λεπτή ισορροπία μεταξύ της διατήρησης της ισορροπίας του οικοσυστήματος, την κάλυψη των αναγκών τόσο των παρόντων γενεών όσο και των μελλοντικών, την διαφύλαξη της βιοποικιλότητας και παράλληλα την προσπάθεια για την ενίσχυση της παραγωγικότητας. Η κλιματική αλλαγή είναι ένα πολύπλευρο φαινόμενο που επηρεάζει το μικροκλίμα κάθε περιοχής με αρκετούς τρόπους, όπως με την αύξηση της θερμοκρασίας, τη διαφορετική χρήση των φυσικών πόρων (πχ. νερό και έδαφος), τη παραγωγικότητα των καλλιεργειών και την ικανότητα εύρεσης και ανάπτυξης ανθεκτικότερων ποικιλιών φυτών στην ξηρασία. Μέσα από αναλύσεις που έχουν διεξαχθεί όσον αφορά τις συνέπειες της κλιματικής αλλαγής διαφαίνεται πως οι επερχόμενες επιπτώσεις είναι σοβαρές και η λήψη μέτρων και νέων πρακτικών είναι πλέον επιτακτική ανάγκη για την προσαρμογή των αγροτικών συστημάτων στα νέα δεδομένα [5].

Τα λιπάσματα και τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται για την αύξηση της παραγωγικότητας, αλλά παρά τη θετική τους επιδράση, η αλόγιστη χρήση τους, η τοξικότητά τους, η διάρκεια έκθεσης και η χρησιμοποιούμενη δόση έχουν μακροχρόνιες, πολλές φορές, επιπτώσεις στο οικοσύστημα και στον άνθρωπο [2,6]. Περισσότερο από το 90% της χρησιμοποιούμενης ποσότητας χάνεται στο περιβάλλον κατά την εφαρμογή του, οδηγώντας τόσο στην υπερβολική χρήση όσο και στην αύξηση των υπολειμμάτων, τα οποία συμβάλλουν στη ρύπανση του περιβάλλοντος και στην υποβάθμιση της παραγωγικότητας και της ποιότητας των φυτών [7,8]. Στόχος της Ευρωπαϊκής Ένωσης έως το 2030 είναι η εφαρμογή πιο φιλικών προς το περιβάλλον γεωργικών πρακτικών. Αυτές οι προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τη σημαντική μείωση

1. Εισαγωγή

των χημικών φυτοφαρμάκων κατά 50%, τη μείωση της απώλειας θρεπτικών συστατικών κατά τουλάχιστον 50% και την αύξηση της βιολογικής γεωργίας. Η διασφάλιση τόσο της οικονομικής επιτυχίας όσο και των υπεύθυνων περιβαλλοντικών πρακτικών αποτελεί κρίσιμο στόχο για τον γεωργικό τομέα [9]. Η σύγχρονη γεωργία αποσκοπεί στη εύρεση εναλλακτικών λύσεων για τη βελτίωση της θρέψης των φυτών, της ανθεκτικότητας στις εξωτερικές πιέσεις και της παραγωγικότητας με πιο φιλικό προς το περιβάλλον και βιώσιμο τρόπο, χρησιμοποιώντας φυσικούς πόρους και ειδικότερα βιοδιεγέρτες [2,10,11].

1.2. Βιοδιεγέρτες

Όλο και περισσότεροι άνθρωποι πλέον στρέφονται στα προϊόντα οργανικής καλλιέργειας μιας και είναι καλύτερα και θρεπτικότερα για την ανθρώπινη υγεία. Οι βιολογικές καλλιέργειες όμως αντιμετωπίζουν την δυσκολία υψηλής παραγωγικότητας λόγω των βιοτικών και αβιοτικών πιέσεων που επηρεάζουν την καλλιέργεια. Η χαμηλή παραγωγικότητα οφείλεται στην μειωμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στο χώμα, αλλά και στην δυσκολία διαλυτοποίησης αυτών των θρεπτικών συστατικών στο έδαφος. Η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τα φυτά εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος του φυτού, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τους μικροοργανισμούς που σχετίζονται με τις ρίζες των φυτών. Η ανάπτυξη και η λειτουργία των ριζών μετέχουν θεμελιώδη ρόλο στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, ιδιαίτερα στη βιολογική γεωργία, όπου τα θρεπτικά συστατικά είναι συχνά διαθέσιμα στο έδαφος σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να λυθεί με την ενίσχυση της έκτασης του ριζικού συστήματος του φυτού. Οι φυτικοί βιοδιεγέρτες κερδίζουν συνεχώς έδαφος στη βιώσιμη γεωργία και φαίνεται να είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο λόγω των διεγερτικών τους επιδράσεων, οι οποίες μπορούν να βελτιώσουν την αποδοτικότητα διαχείριση των θρεπτικών συστατικών, την ποιότητα του προϊόντος και την ανοχή στο αβιοτικό στρες [12, 13, 14, 19]. Τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται μέχρι τώρα στον αγροτικό τομέα προμηθεύουν τις καλλιέργειες με θρεπτικά ιχνοστοιχεία για την αύξηση της παραγωγής. Το κόστος τους είναι σχετικά φθινό αλλά έχουν χαμηλή απόδοση λόγω της υψηλής ποσότητας που διαφεύγει στο περιβάλλον κατά την εφαρμογή. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην αυξημένη χρήση για να μπορέσουν τελικά να έχουν τα επιθυμητά αποτελέσματα, ενώ ήδη η παραγωγή λιπασμάτων και ενισχυτικών ουσιών είναι μία ενεργοβόρα διαδικασία με αυξημένο αποτύπωμα διοξειδίου του άνθρακα. Ο κύκλος αυτός που δημιουργείται συνοδεύεται από ένα αρνητικό περιβαλλοντικό αντίκτυπο.

Σύμφωνα με τον κανονισμό της ΕΕ, ως φυτικός βιοδιεγέρτης θεωρείται ένα προϊόν (ουσία ή μικροοργανισμός) που διεγείρει τις διεργασίες διατροφής των φυτών ανεξάρτητα από τη θρεπτική του σύσταση, με αποκλειστικό στόχο τη βελτίωση ενός ή περισσότερων χαρακτηριστικών του φυτού ή της ριζόσφαιρας του φυτού, της αποδοτικότητας χρήσης θρεπτικών συστατικών, την ανοχή στο αβιοτικό στρες, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και τη διαθεσιμότητα περιορισμένων θρεπτικών συστατικών στο έδαφος ή στη ριζόσφαιρα. Η βιομηχανία των βιοδιεγερτών εγείρετε ως μία πολλά υποσχόμενη οικονομικά βιομηχανία, με το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Βιομηχανίας Βιοδιεγερτών (European Biostimulant Industry Council – EBIC) να κάνει λόγο για αξία

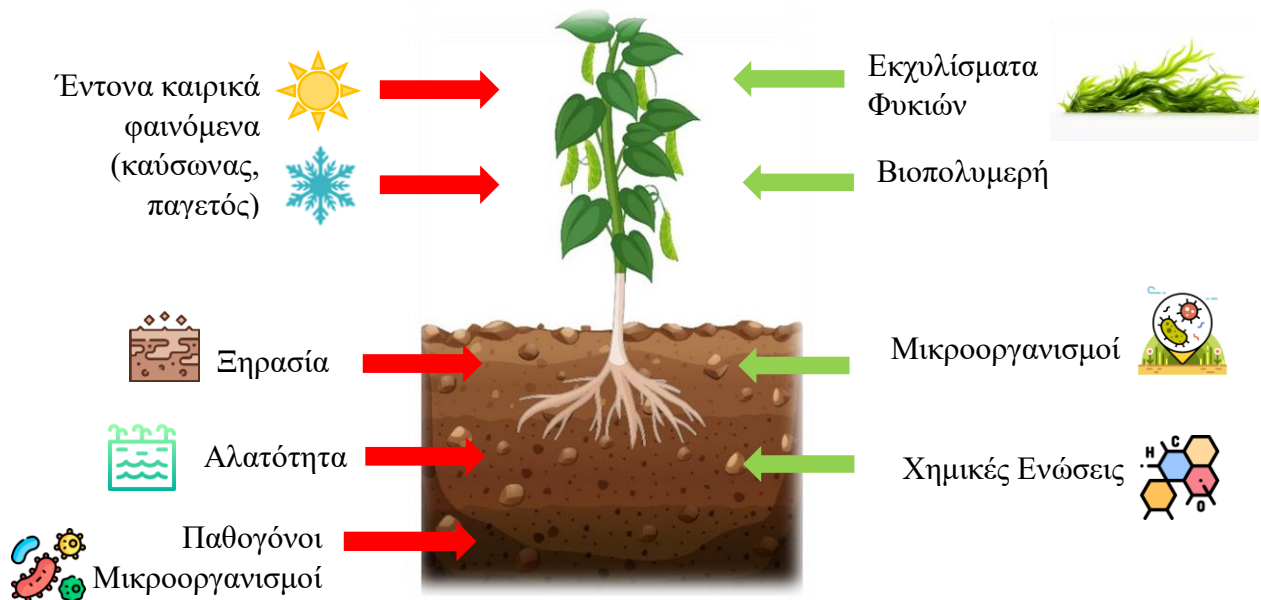
1. Εισαγωγή

της αγοράς από 1.5 έως 2 δις. δολάρια το 2022 και αναμεταδίνεται να φτάσει τα 2.6 δις. μέχρι το 2025 με ετήσιο ποσοστό ανάπτυξης περίπου 12% [2, 13].

Οι βιοδιεγέρτες είναι είτε ουσίες, είτε μικροοργανισμοί (μη μικροβιακοί και μικροβιακοί) που μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών όταν χρησιμοποιούνται σε μικρές ποσότητες. Υπάρχει πληθώρα φυσικών και συνθετικών βιοδιεγερτών, και προς το παρόν δεν έχει διαμορφωθεί νομικός ορισμός στην Ευρωπαϊκή Ένωση ή στις Ηνωμένες Πολιτείες που να καθορίζει σαφώς το πλαίσιο [10, 11]. Οι κυριότερες ουσίες που μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοδιεγέρτες είναι τα χουμικά οξέα, οι υδρολυμένες πρωτεΐνες, αμινοξέα, βιοπολυμερή όπως η χιτοζάνη, τα εκχυλίσματα από φύκια και φυτικά προϊόντα, χημικές ενώσεις και στοιχεία, οργανική ύλη καθώς και κάποιοι μικροοργανισμοί (ριζοβακτήρια). Τα εκχυλίσματα φυκιών έχουν τη δυνατότητα να ενισχύσουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη των ριζών, επιτρέποντας καλύτερη εξερεύνηση του εδάφους και απόκτηση πόρων [2, 11, 12, 15, 16]. Μικροοργανισμοί όπως ωφέλιμα βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (πχ. ριζοβακτήρια) και μύκητες (π.χ. μυκόρριζες arbusculares) μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως βιοδιεγερτικά συστατικά [10, 11].

Σε συνθήκες αγρού, τα βιοδιεγερτικά λόγω της σύστασής τους δρουν γρήγορα και μπορούν να αποικοδομηθούν από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, η θερμοκρασία, η υγρασία και οι οξειδωτικοί παράγοντες [17, 18, 20]. Λαμβάνοντας υπόψη τους εντοπισμένους περιορισμούς, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών για την προστασία των βιοδιεγερτικών συστατικών [21]. Η ενσωμάτωση βιοδιεγερτών σε βιο-αποικοδομήσιμα συστήματα φορέων αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την προστασία των ελεύθερων δραστικών ουσιών. Οι αναπτυγμένες συνθέσεις όχι μόνο προστατεύουν τη δραστική ένωση από πρόωρη αποικοδόμηση, αλλά και αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητά τους, γεγονός που διευκολύνει τη διασπορά και ελέγχει την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον [17, 18, 19]. Διάφορες μέθοδοι ενσωμάτωσης αναπτυχθήκαν για την προστασία των βιοδιεγερτικών και την επίτευξη αργής, ελεγχόμενης και στοχευμένης απελευθέρωσης στον αγρό με σκοπό τη διατήρηση του περιβάλλοντος και την αύξηση της παραγωγικότητας.

1. Εισαγωγή



Σχήμα 1. Δράση βιοδιεγερτών στο αβιοτικό και βιοτικό στρες του περιβάλλοντος.

1.3. Εγκλεισμός

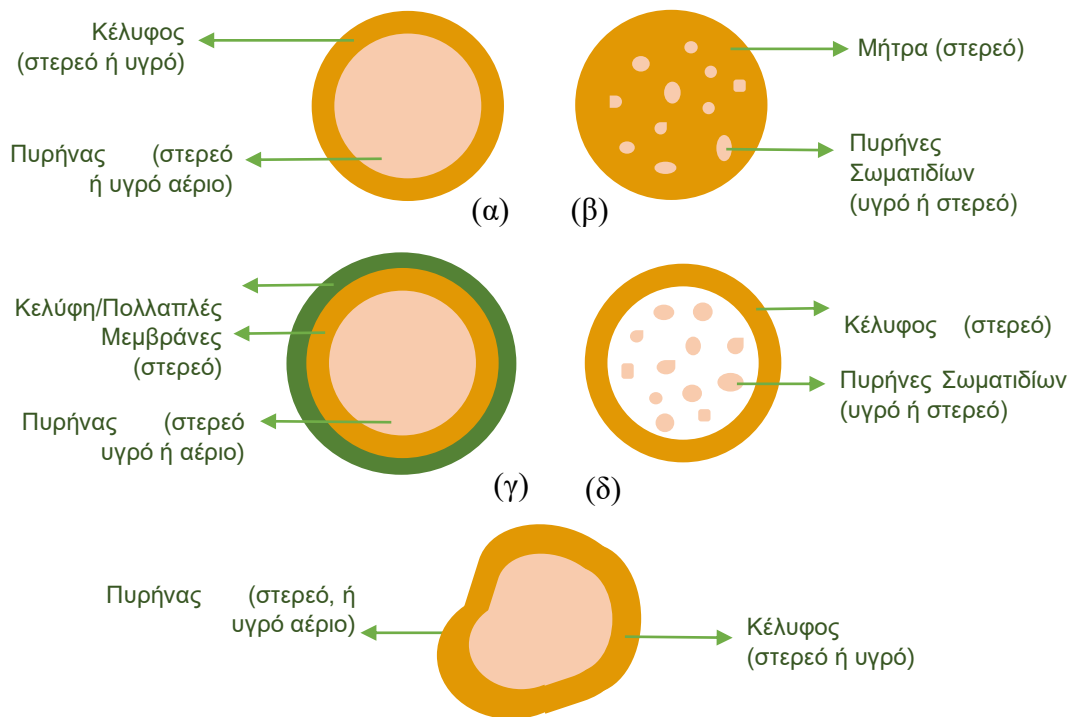
Η ανάπτυξη της τεχνολογίας ενσωμάτωσης (ή εγκλεισμού) χρονολογείται από τη δεκαετία του 1950, κατά την εξερεύνηση υλικών τοιχωμάτων ευαίσθητων στην πίεση για την παραγωγή χαρτιού χωρίς άνθρακα [22]. Κατά την δεκαετία του 1970 η ιδέα του εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκε στην ανοσοπροστασία των μεταμοσχευμένων κυττάρων με σκοπό την παραγωγή «τεχνητών κυττάρων», έπειτα από αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες έρευνες για την θεραπείας διάφορων παθήσεων [23]. Έκτοτε, η εν λόγω τεχνολογία αυτή αναπτύχθηκε ταχέως και γνώρισε εκτεταμένες εφαρμογές σε ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών κλάδων, περιλαμβανομένων του γεωργικού τομέα, της ιατρικής και της φαρμακευτικής και των τροφίμων. Η ενθυλάκωση, τον τελευταίο καιρό, έχει λάβει ένα σημαντικό επιστημονικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον για την δημιουργία λειτουργικών συστημάτων διέγερσης για την παροχή φυτοχημικών και νέων θρεπτικών συστατικών.

Ο εγκλεισμός είναι μία διαδικασία κατά την οποία ένα υλικό ή ένα μείγμα υλικών επικαλύπτεται ή ενσωματώνεται μέσα σε ένα άλλο υλικό ή σύστημα. Το υλικό προς ενσωμάτωση, το οποίο συνήθως ονομάζεται ως πυρήνας, φορτίο, ενεργό συστατικό ή εσωτερική φάση, μπορεί να έχει την μορφή υγρού, στερεού αλλά και αέριου. Το υλικό που χρησιμοποιείται για να γίνει η επικάλυψη ονομάζεται υλικό τοιχώματος, μήτρα, φορέας, μεμβράνη, επικάλυψη ή περίβλημα [22, 24, 25]. Η εφαρμογή του έχει σκοπό την προστασία των δραστικών ουσιών από το περιβάλλον, την βελτίωση των ιδιοτήτων των ουσιών που εγκλείονται, καθώς και για τη μείωση της τοξικότητας κάποιων ουσιών [22, 25]. Δια μέσου του εγκλεισμού δίνεται η δυνατότητα ελέγχου της απελευθέρωσης του ενεργού συστατικού συναρτήσει του χρόνου [24]. Υπάρχει μία πληθώρα υλικών που χρησιμοποιούνται για να εγκλείσουν άλλες ουσίες και να προστατεύσουν τον πυρήνα. Τέτοια υλικά είναι η χιτοζάνη, οι κόμμες (όπως η αραβική, η ξανθανική, η ακακίας και η σέλακ), η μαλτοδεξτρίνη, η κηκτίνη, το άμυλο, οι οροί γάλακτος, το αλγινικό νάτριο, η κυτταρίνη, η ζείνη και η καζεΐνη μεταξύ άλλων [26].

1. Εισαγωγή

1.3.1. Διεργασίες Εγκλεισμού

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ενθυλάκωσης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συμβατότητα της μεθόδου με τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος και τις συνθήκες επεξεργασίας του, τη φύση της ουσίας προς εγκλεισμό, τα χαρακτηριστικά του συστήματος απελευθέρωσης και την επιθυμητή αποτελεσματικότητα εγκλεισμού [25,27]. Η μέθοδος ενσωμάτωσης που θα επιλεγθεί καθορίζει εν τέλει το σχήμα και τη δομή του υποστρώματος ενσωμάτωσης, χαρακτηριστικά που με τη σειρά τους, μπορούν να επιδράσουν στη διάχυση των ενσωματωμένων ή εξωτερικών ουσιών [22]. Στο Σχήμα 2 αναπαριστώνται τα διάφορα είδη καψουλών που μπορεί να παραχθούν. Οι απαιτήσεις πάνω στις προδιαγραφές του τελικού προϊόντος και οι τομείς εφαρμογής του καθορίζουν την τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί. Θα πρέπει να σημειωθεί πως κάθε μέθοδος φέρει και πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και αυτά αξιολογούνται με βάση το τελικό προϊόν [25,27].



Σχήμα 2. Μορφολογία καψουλών με εγκλεισμένα μόρια (α) μονοπυρηνική, (β) τύπου μήτρας, (γ) πολύ-μεμβρανική, (δ) πολυπυρηνική και (ε) με ακανόνιστο σχήμα.

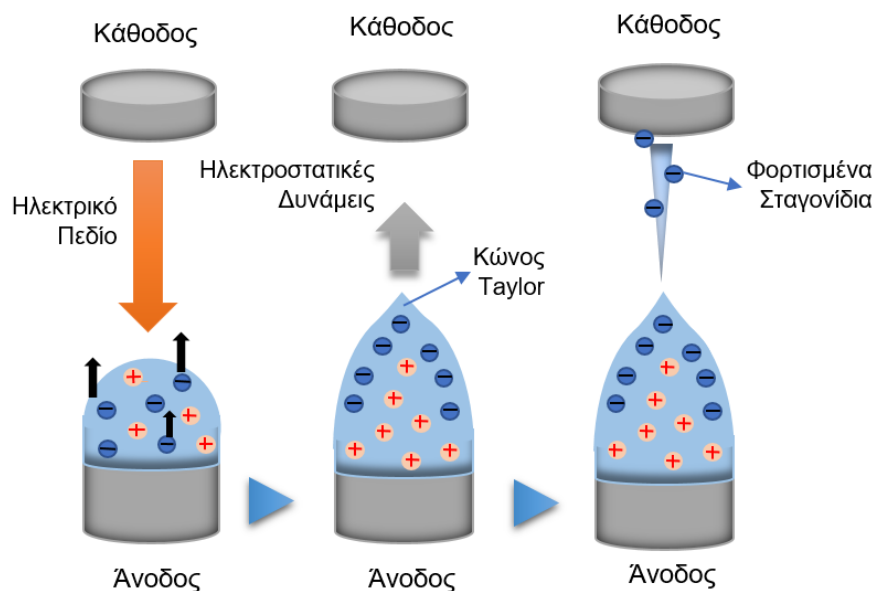
1.3.1.1. Ηλεκτρο-υδροδυναμικές Διεργασίες (electrospinning and electrospraying)

Η τεχνική της ηλεκτροϋδροδυναμικής παραγωγής σωματιδίων, είτε σφαιρών (ηλεκτροστατικός ψεκασμός), είτε ινών (ηλεκτροϊνοποίηση), φαίνεται να έχει τις απαρχές της στον 18ο αιώνα. Ωστόσο, η επιστημονική της εξέλιξη πραγματοποιήθηκε κυρίως τον 19ο αιώνα με πρωτοπόρους τον χημικό Christian Friedrich Schönbein και

1. Εισαγωγή

τον φυσικό Lord Rayleigh. Παρόλο που η πρόταση για τη μέθοδο αυτή δεν κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας μέχρι το 1900 από τον John Francis Cooley, ο Anton Formhals συνέβαλε σημαντικά στην ανάπτυξη της παρέχοντας 22 διπλώματα ευρεσιτεχνίας σχετικά με τη συγκεκριμένη τεχνική. Την ίδια περίοδο, ιστορία έγραψαν επίσης ο Igor' Vasil'evich Petryanov-Sokolov και η Natalya Rosenblum, οι οποίοι τιμήθηκαν με το Βραβείο Στάλιν για την κατασκευή του "φίλτρου Petryanov" από ίνες παραγόμενες με τη μέθοδο της νηματοπλέκτασης το 1938 [28]. Στη δεκαετία του 1960, ο Sir Geoffrey Ingram Taylor ανέπτυξε μαθηματικά μοντέλα σχετικά με τον κώνο που σχηματίζεται στη βελόνα υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Στη συνέχεια, αρκετοί επιστήμονες εργάστηκαν πάνω στις αρχές και την απόδοση αυτής της τεχνικής, η οποία έχει κερδίσει σημαντικό έδαφος στην έρευνα παραγωγής σωματιδίων.

Ο σχηματισμός των σωματιδίων βασίζεται στην εφαρμογή τάσης από εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο στο πολυμερικό μίγμα της μήτρας και του δραστικού συστατικού, με αποτέλεσμα να παράγονται ίνες, ή στερεά σφαιρικά σωματίδια. Ειδικότερα, το πολυμερικό υγρό φορτώνεται σε μία σύριγγα και τροφοδοτείται σε μία ηλεκτρικά φορτισμένη βελόνα. Το φορτισμένο υγρό και ο συλλέκτης των σωματιδίων είναι αντίθετα φορτισμένα. Στην άκρη της βελόνας με την τάση του ηλεκτρικού πεδίου η σχηματιζόμενη σταγόνα μετασχηματίζεται σε κώνο λόγω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων, τον κώνο Taylor, όπως παρουσιάζεται και σχηματικά στο Σχήμα 3. Καθώς η έντασή του ηλεκτρικού πεδίου υπερβαίνει την επιφανειακή τάση εκτοξεύονται φορτισμένα σωματίδια, τα οποία εναποτίθενται σε έναν συλλέκτη (κάθοδος). Ο ηλεκτροψεκασμός είναι μία απλή και ευέλικτη τεχνική με τις παραμέτρους της διεργασίας να μπορούν να μεταβάλλουν σημαντικά τα παραγόμενα σωματίδια. Οι παράμετροι της διεργασίας που επηρεάζουν το σχήμα των σωματιδίων είναι το εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο, η ροή του υγρού και η απόσταση ανάμεσα στη μύτη της βελόνας και τον συλλέκτη. Οι παράμετροι, τώρα, του διαλύματος που επηρεάζουν το σχήμα των σωματιδίων είναι η συγκέντρωση του διαλύματος, η ηλεκτρική αγωγιμότητα του και το ιξώδες [27,29].



Σχήμα 3. Σχηματικά αναπαράσταση δημιουργίας κώνου Taylor κατά την ηλεκτροστατική παραγωγή

1. Εισαγωγή

Ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός, σε αντίθεση με άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούν μηχανική δύναμη για την παραγωγή κλασικών σωματιδίων, απαιτεί μόνο την εφαρμογή ηλεκτροστατικού πεδίου. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, μπορούν να παραχθούν σωματίδια από διαφορετικούς τύπους πολυμερών, τα οποία διαθέτουν εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες και μεγάλη ειδική επιφάνεια επαφής [28].

1.3.1.2. Ζελατινοποίηση (gelatinization)

Η ζελατινοποίηση και ειδικότερα η ιοντοτροπική ζελατινοποίηση είναι μία τεχνική που παράγει σφαιρικά ομοιόμορφα σωματίδια της κλίμακα των μικρο- και νάνο-σωματιδίων, εκμεταλλευόμενη τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντίθετα φορτισμένων ιοντικών ειδών. Προϋπόθεση για την επιτυχή εφαρμογή της ιοντοτροπικής ζελατινοποίησης είναι η ύπαρξη ενός πολυμερούς. Το πολυμερές αυτό, μέσω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τα ιόντα, ενεργεί ως μήτρα που παγιδεύει τις προς εγκλεισμό ουσίες. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, οι πολυμερικές αλυσίδες συσσωματώνονται, σχηματίζοντας ένα τρισδιάστατο δίκτυο που περιβάλλει τα σωματίδια. Η υδρογέλη (gel) παράγεται με ρίψη του πολυμερικού διαλύματος που περιέχει όλα τα συστατικά για τον εγκλεισμό σε ένα υδατικό διάλυμα πολυδύναμων κατιόντων. Ένα τρισδιάστατο δίκτυο με ιοντικούς δεσμούς δημιουργείται καθώς τα ανιόντα και τα κατιόντα του μίγματος διαχέονται στα σταγονίδια που έχουν σχηματιστεί. Το μέγεθος των σωματιδίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της μήτρας πολυμερούς, του ηλεκτρολύτη, τη ταχύτητα ρίψης, τη θερμοκρασία, το pH και τη διατομή της σύριγγας που χρησιμοποιείται. Η μέθοδος αυτή ξεχωρίζει για το χαμηλό κόστος του εξοπλισμού, τη ταχεία παραγωγή και την απλότητα της συγκριτικά με άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούν ηλεκτροστατικές δυνάμεις, καθιστώντας την οικονομικά αποδοτική και αποτελεσματική [29, 30].

1.3.1.3. Ξήρανση με Ψεκασμό (spray drying)

Η ξήρανση με ψεκασμό είναι μία τεχνική που βρίσκει μεγάλη εφαρμογή σε διάφορους τομείς της βιομηχανία λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητας της με βάση τον ψεκασμό ενός διαλύματος ή εναιωρήματος που περιέχει την ουσία προς εγκλεισμό σε σταγονίδια, τα οποία εν συνεχεία ξηραίνονται με χρήση θερμού αέρα ή παράλογες ξήρανσης. Οι συνθήκες ψεκασμού και ξήρανσης καθορίζουν το σχήμα και το μέγεθος, σε επίπεδο μικρομέτρων, των ενθυλακωμένων σωματιδίων που σχηματίζονται. Κατά τη διάρκεια της ξήρανσης δημιουργείται εξωτερικά των σωματιδίων μία στερεή επίστρωση. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται τόσο για υδρόφοβες, όσο και για υδρόφιλες ουσίες οι οποίες μπορεί να είναι βιταμίνες, ένζυμα, λειτουργικά πρόσθετα και άλλα. Τέλος, είναι μία τεχνική που μπορεί με μεγάλη ευκολία να αναχθεί σε βιομηχανική κλίμακα παραγωγής [25]. Αν και αυτή η μέθοδος είναι οικονομική, παρέχει σταθερές, υψηλής συγκέντρωσης και ταχέως διαλυτές μικρο-κάψουλες, παρουσιάζει βέβαια μια σειρά μειονεκτημάτων που σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά του επιλεγμένου υλικού, που πρέπει να έχει χαμηλό ιξώδες, υψηλή συγκέντρωση και διαλυτότητα και ικανοποιητικό προφίλ ξήρανσης [30].

1.3.1.4. Εκβολή (Extrusion)

Η μέθοδος της εκβολής ή αλλιώς εξώθησης αποτελεί μία από τις πρωταρχικές μεθόδους εγκλεισμού για την παραγωγή υδροκολλοειδών καψουλών. Η διαδικασία ξεκινά με τη παρασκευή ενός υδατικού διαλύματος υδροκολλοειδούς πολυμερούς, στο οποίο προστίθενται οι επιθυμητές ουσίες. Το διάλυμα που προκύπτει τροφοδοτείται

1. Εισαγωγή

και εξωθείται στη συνέχεια μέσω μιας βελόνας σε ένα κατάλληλο λουτρό. Οι παραγόμενες κάψουλες έχουν σφαιρικό σχήμα, με το μέγεθος και το σχήμα να μεταβάλλεται από την διάμετρο της βελόνας και την απόσταση της από το λουτρό. Η μέθοδος αυτή έχει βρει ευρεία αποδοχή λόγω της απλότητας της, του χαμηλού κόστους και των ήπιων συνθηκών που χρησιμοποιούνται. Από την άλλη πλευρά όμως η αναγωγή της παραγωγής σωματιδίων σε μεγάλη κλίμακα φέρει δυσκολίες λόγω του αργού σχηματισμού των σωματιδίων [25, 31].

1.3.1.5. Γαλακτωματοποίηση (Emulsification)

Η τεχνική της γαλακτωματοποίησης είναι μία διαδομένη μέθοδος εγκλεισμού, κυρίως, υδρόφοβων ουσιών. Σε πρώτο στάδιο γίνεται διασπορά της ουσίας-στόχου (π.χ. σε σταγονίδια ελαίου ή στερεά σωματίδια) σε μία φάση μη αναμίξιμη με το διαλύτη. Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις αυτής της μεθόδου, η πρώτη αφορά την γαλακτωματοποίηση οργανικού διαλύτη σε υδατικό διάλυμα (oil-in-water) και η άλλη υδατικού διαλύματος σε οργανικό διάλυμα (water-in-oil), με τη διαφορά τους να έγκειται στο διάλυμα που πρώτα διαλυτοποιούνται τα συστατικά. Κατά τη πρώτη προσέγγιση της μεθόδου το υλικό της μήτρας διαλυτοποιείται σε έναν οργανικό διαλύτη μαζί με τη προς εγκλεισμό ουσία και έπειτα γίνεται διασπορά τους σε ένα υδατικό διάλυμα με τη βοήθεια ενός γαλακτωματοποιητή και μηχανικών δυνάμεων. Η επιτυχής εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει την επιλογή ενός ενεργού συστατικού και ενός οργανικού διαλύτη που παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συμβατότητας. Η τεχνική της γαλακτωματοποίησης υδατικού διαλύματος σε οργανικό διάλυμα η διαδικασία είναι η αντίστροφη. Αφού ολοκληρωθεί αυτό το στάδιο, ο διαλύτης εξατμίζεται, οδηγώντας έτσι σε παραγωγή στερεών μικρο-σωματιδίων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση τόσο στερεών, όσο και υγρών. Το μέγεθος των σωματιδίων καθορίζεται από τη ταχύτητα ανάδευσης και είναι γενικότερα μεγαλύτερο σε σχέση με τις άλλες τεχνικές. Τα παραγόμενα σωματίδια έχουν σφαιρική μορφή και λαμβάνουν μεγέθη σε κλίμακα μικρο- και νανο-σωματιδίων. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι πως η οργανική φάση θα πρέπει να ξεπλυθεί από τα παραγμένα σωματίδια, μέσω διάφορων κύκλων καθαρισμού. Ακόμη, η εκτεταμένη χρήση οργανικών διαλυτών και ουσιών που βοηθούν στην γαλακτωματοποίηση μπορεί να αποβεί τοξική για το περιβάλλον [25, 29, 30].

1.3.1.6. Ξήρανση υπό κατάψυξη – Λυοφιλίωση (Freeze drying)

Η ξήρανση υπό κατάψυξη βασίζεται στην εξάχνωση του διαλύτη (κυρίως νερού) από τον πάγο σε πιέσεις χαμηλότερες της ατμοσφαιρικής, χωρίς να απαιτείται αύξηση της θερμοκρασίας. Αυτή η διαδικασία διασφαλίζει τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας των ευαίσθητων ενώσεων, καθιστώντας τη μέθοδο κατάλληλη για την ενθυλάκωσή τους. Το διάλυμα με τα σωματίδια καταψύχεται πρώτα και έπειτα υποβάλλεται σε εξάχνωση, μέσω μείωσης της πίεσης. Ο διαλύτης έτσι απομακρύνεται και παραλαμβάνεται μία στερεή σκόνη που περιέχει τα σωματίδια. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το υψηλό χρονικό διάστημα που απαιτεί η ολοκλήρωση της διεργασίας, η ανάγκη παροχής σταθερών συνθηκών πίεσης μέσω αντλίας κενού και η υψηλή ενεργειακή απαίτηση, καθιστώντας τη χρονοβόρα και ενεργοβόρα [32].

1. Εισαγωγή

1.3.2. Εφαρμογές του Εγκλεισμού

1.3.2.1. Εφαρμογές του Εγκλεισμού στον Αγροτικό Τομέα

Παράλληλα, η εκτεταμένη χρήση φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες έχει αρκετές παράπλευρες επιπτώσεις τόσο στην ποσότητα του χόματος όσο και στην ανθρώπινη υγεία. Το πρόβλημα αυτό έχει καταδείξει την επιτακτική ανάγκη για πιο βιώσιμες στη γεωργία. Η παραγωγή δομών μικρής κλίμακας εμφανίζουν πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων διότι η απελευθέρωση των ουσιών μπορεί να ελεγχθεί χωρικά και χρονικά, ενώ οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις και η απώλεια προϊόντος μειώνονται σημαντικά. Έρευνες πάνω στην απελευθέρωση λόγω εξωτερικού ερεθίσματος των δραστικών ουσιών που είναι εγκλεισμένες είναι σε πρώιμο στάδιο αλλά τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά. Σταθερά σωματίδια πρωτεϊνικής φύσεως, για παράδειγμα, κατάφεραν να απελευθερώσουν την δραστική ουσία όταν στο περιβάλλον υπήρξε πρωτεολυτικό ένζυμο (όπως υπάρχουν στο έντερο των εντόμων). Κατ' αυτό τον τρόπο η βιώσιμη γεωργία φαίνεται να έχει πολλές προοπτικές [24]. Τα συστήματα εγκλεισμού προστατεύουν τις βιοδραστικές ουσίες και βελτιώνουν τη σταθερότητα, την απορροφητικότητα και την απόδοση της δράσης κατά των βλαβερών μικροοργανισμών. Άλλη μελέτη που διεξήχθη κατέδειξε πως σωματίδια με περιέχουν λάδι neem έχουν σταθερότητα για 90 ημέρες, υψηλή αποτελεσματικότητα κατά του αλευρόκοκκου των φασολιών (*A.obectus*) καθώς και παράπλευρη δράση κατά κάποιων ακόμα μικροοργανισμών. Η πρακτική αυτή φαίνεται να έχει προοπτική στην βιώσιμη γεωργία [33].

1.3.2.2. Εφαρμογές του Εγκλεισμού στην Συσκευασία Τροφίμων

Η τεχνολογία ενθυλάκωσης, στον τομέα των τροφίμων έχει αναδειχθεί σε κρίσιμο εργαλείο για την ενίσχυση της σταθερότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των απαραίτητων συστατικών. Παράλληλα, συμβάλλει ουσιαστικά στην αναβάθμιση της ποιότητας των προϊόντων και στον περιορισμό του κόστους παραγωγής [22]. Η συσκευασία, ως μέρος του τρόφιμου, έχει ζωτικό ρόλο στην αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων και αποτελεί βασικό μέρος της παραγωγικής διαδικασίας. Πλέον ο τομέας αυτός στρέφεται στην παραγωγή βρώσιμων συσκευασιών, η οποία αποτελεί μία βιώσιμη εναλλακτική, αποτελούμενες από λιπίδια, πρωτεΐνες, ρητίνες κ.α.. Η ενσωμάτωση ενεργών συστατικών σε εδωδιμες επικαλύψεις μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την διατροφική αξία του προϊόντος, τον ρυθμό οξείδωσης καθώς και την προστασία του προϊόντος από εξωγενείς παράγοντες, όπως το περιβάλλον, και το προφίλ της γεύσης. Η ελεγχόμενη απελευθέρωση των ενσωματωμένων συστατικών ενισχύει την διατηρησιμότητα του τρόφιμου [34].

1.3.2.3. Εφαρμογές του Εγκλεισμού στην Ιατρική και στην Κοσμητολογία

Στο τομέα της ανθρώπινης υγείας διάφορες θεραπευτικές χρήσεις φέρει η τεχνολογία αυτή όταν χρησιμοποιείται και διαθέτει ακόμα μεγαλύτερες θεραπευτικές δυνατότητες που αναμένεται να ανακαλυφθούν μελλοντικά. Για παράδειγμα, έρευνες για τη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και ειδικότερα την ενσωμάτωση κυττάρων που επικεντρώνονται στην αποκατάσταση και τη ρύθμιση της παροχής ινσουλίνης καθώς και έρευνες πάνω στην ηπατική ανεπάρκεια κατέδειξε πως η ευκολία απομόνωσης των βλαστοκυττάρων από ξένους οργανισμούς και η αποτελεσματική τους απελευθέρωση, όταν αυτά εγκλειστούν, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία νέα μέθοδο θεραπείας [35].

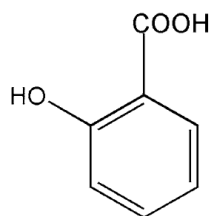
1. Εισαγωγή

Στην βιομηχανία των καλλυντικών και των ειδών προσωπικής περιποίησης, από την άλλη πλευρά, ο εγκλεισμός χρησιμοποιείται για να προστατεύσει ενεργά συστατικά από ανεπιθύμητες αντιδράσεις που μπορούν να συμβούν όταν αυτά εκτίθενται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως, η φωτεινή ακτινοβολία και η θερμοκρασία, με σκοπό να μπορέσουν να έχουν στοχευμένη και τοπική δράση στο δέρμα, να καλύψουν ανεπιθύμητες ιδιότητες κάποιων συστατικών και να βελτιωθούν χαρακτηριστικά όπως, η υφή και η οπτική εικόνα του προϊόντος [36].

1.4. Σαλικυλικό Οξύ

1.4.1. Χημική Σύσταση και Ιδιότητες Σαλικυλικού Οξέος

Το σαλικυλικό οξύ ή ο-υδροξυβενζοϊκό οξύ αποτελεί αντιπροσωπευτικό παράδειγμα μιας ποικίλης ομάδας φυτικών φαινολικών ενώσεων, χαρακτηριζόμενων από τη παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου (Σχήμα 4) [37, 38]. Η ονομασία «σαλικυλικό οξύ» προέρχεται από τη λατινική λέξη «*Salix*», που σημαίνει ιτιά, από τον φλοιό της οποίας ο Johann Buchner απομόνωσε το 1828 μια μικρή ποσότητα σαλικίνης. Το πιο γνωστό φυσικό παράγωγο που σχετίζεται με το σαλικυλικό οξύ είναι η σαλικίνη (β-γλυκοσιδική αλκοόλη του σαλικυλικού οξέος), η οποία εντοπίζεται στη λευκή ιτιά (*Salix alba*) και σε άλλα είδη ιτιάς, όπως η *S. purpurea*, *S. daphnoides* και *S. fragilis*. Η μέγιστη περιεκτικότητα σε σαλικίνη στο φυτό παρατηρείται κατά την άνοιξη ή το καλοκαίρι, ενώ η χαμηλότερη κατά το χειμώνα [38]. Παρά το γεγονός ότι παλαιότερα τα φυτικά φαινολικά θεωρούνταν δευτερεύοντες μεταβολίτες με περιορισμένη σημασία για το φυτό, η σύγχρονη επιστήμη αναγνωρίζει τον καθοριστικό τους ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης του φυτού και των αλληλεπιδράσεών τους με άλλους οργανισμούς [37, 38]. Για παράδειγμα, οι φαινολικές ενώσεις εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της λιγνίνης, δρουν ως αλληλοπαθητικές ενώσεις, ρυθμίζουν τις φυτικές αποκρίσεις σε αβιοτικούς παράγοντες και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντοχή των φυτών έναντι ασθενειών, είτε ως προϋπάρχουσες ή επαγόμενες αντιμικροβιακές ενώσεις (φυτοαλεξίνες), είτε ως μόρια σηματοδότησης για την ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών [38].



Σχήμα 4. Χημική δομή σαλικυλικού οξέος.

1.4.2. Εφαρμογές Σαλικυλικού Οξέος

1.4.2.1. Εφαρμογές Σαλικυλικού Οξέος στον Αγροτικό Τομέα

Οι συνεχείς περιβαλλοντικές προκλήσεις βιοτικού (πχ. ασθένειες) και αβιοτικού (πχ. ξηρασία) χαρακτήρα που αντιμετωπίζουν τα φυτά καθημερινά, τα έχουν καταστήσει πλέον ικανά να αναπτύσσουν σύνθετους μηχανισμούς προστασίας [39]. Οι παθογόνοι μύκητες προσβάλλουν όλα τα μέρη του φυτού και απειλούν την ανάπτυξη και την

1. Εισαγωγή

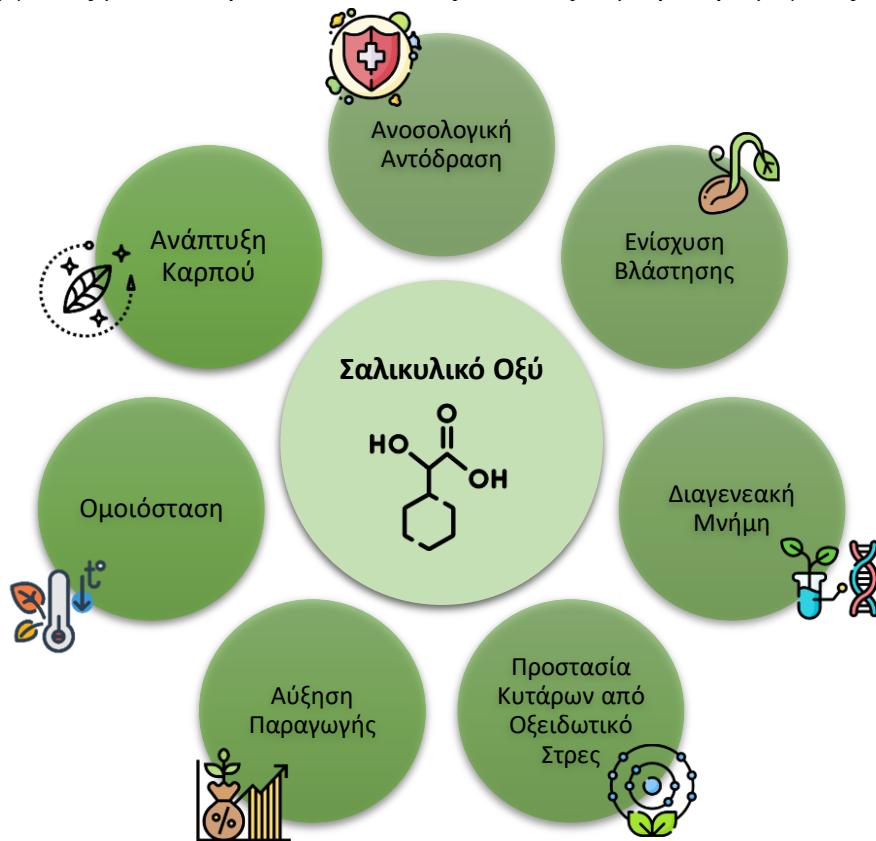
αποδοτικότητά του. Τα χημικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται για τη προστασία των φυτών είναι σκληρά και επηρεάζουν την αξία του ίδιου του φυτού, μολύνουν το περιβάλλον και η παρατεταμένη χρήση τους καθιστά τα στελέχη των μυκήτων πιο ανθεκτικά. Ο μετριασμός αυτού του φαινομένου μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση συνθετικών φυτοορμονών. Αυτές οι ενώσεις, που ονομάζονται ρυθμιστές φυτικής ανάπτυξης (PGR: Plant Growth Regulators) και προστατεύουν τα φυτά φυσικά σταθεροποιώντας το στρες που προκαλούν οι παθογόνοι οργανισμοί [40]. Το σαλικυλικό οξύ εντάσσεται σε αυτή τη κατηγορία ενώσεων. Η υδροξυλική ομάδα συνδέεται με τον φαινολικό δακτύλιο στη δομή του σαλικυλικού οξέος και έτσι μπορεί να συμμετέχει στη ρύθμιση διαφόρων διεργασιών και λειτουργεί ως φυτο-ορμόνη [42]. Αυτή η δομική διαμόρφωση επιτρέπει στο σαλικυλικό οξύ να συμμετέχει στη βλάστηση των σπόρων, τη φωτοσύνθεση, την ομοιοστασία οξειδοαναγωγής, τον γήρανση, την κυτταρική ανάπτυξη, την ανάπτυξη αμυντικών μηχανισμών και την παραγωγική ανάπτυξη [38, 41, 42, 43].

Για παράδειγμα, το σαλικυλικό οξύ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντοχή του καπνού απέναντι στο ιό του μωσαϊκού καπνού, στην αντοχή του αραβίδωσης (*Arabidopsis*) στο βακτήριο *Pseudomonas*, της πατάτας στο μύκητα *Alternaria* και στο *Phytophthora infestans* και του ρυζιού στον μύκητα *Pyricularia oryzae*. Εκτός από τη παρεμπόδιση της μόλυνσης από παθογόνα, η ενεργοποίηση της συστηματικής επίκτητης αντίστασης (SAR) μπορεί να καταστήσει το φυτό απρόσβλητο σε μελλοντικές προσβολές παθογόνων μέσω της τροποποίησης των προτύπων και της κατανομής της μόλυνσης σε τοπικό επίπεδο. Αυτές οι επιδράσεις μπορούν ακόμη να προκαλέσουν αλλαγές στη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων [43]. Το σαλικυλικό οξύ έχει αποδειχθεί πως έχει ευεργετικές ιδιότητες στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας των φυτών και μέσω μη-ενζυματικών αντιοξειδωτικών συστημάτων, σε διάφορες μορφές πιέσεων που προκαλούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η αλατότητα του εδάφους [44]. Το σαλικυλικό οξύ από πλευράς του μπορεί να προστατεύσει τα φυτά και τα κύτταρα της μεμβράνης των κυττάρων τους μειώνοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων, προσαρμόζοντας τη συγκέντρωση H_2O_2 κατά τις περιβαλλοντικές συνθήκες, αυξάνοντας τα φίλτρα στην υπεριώδη ακτινοβολία, μειώνοντας τα ιόντα νατρίου και χλωρίου, λαμβάνοντας μέρος στην πρόσληψη μετάλλων και στην ρύθμιση της διαπερατότητας της μεμβράνης καθώς και στην αύξηση των συγκεντρώσεων καροτενοειδών και χλωροφυλλών [38,45].

Από αναφορές για τη χρήση του σαλικυλικού οξέος σε ροδιές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού μπορεί να διαγραφούν τα οφέλη του στη ποιότητα των καρπών. Τα αποτελέσματα μελετών δείχνουν αύξηση τόσο στην παραγωγή όσο και στους ποιοτικούς δείκτες των καρπών (όπως σκληρότητα, ολική οξύτητα, συνολικές φαινόλες, χρώμα φλούδας και καρπού). Η ποιότητα του ροδιού είναι άμεσα συνυφασμένη με το μέγεθος του καρπού, το χρώμα της φλούδας και την έλλειψη οπτικών ελαττωμάτων. Ταυτόχρονα, η φυτοχημική σύνθεση του καρπού εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο γενότυπος του φυτού, η περιοχή φύτευσης, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι γεωργικές πρακτικές που χρησιμοποιούνται. Το γεγονός πως μετά την εφαρμογή σαλικυλικού οξέος σε δένδρα ροδιάς ενεργοποιήθηκε το σύστημα ανάπτυξης του καρπού και αυξήθηκε το βάρος του καρπού, η συγκέντρωση των χλωροφυλλών, καροτενοειδών και σακχάρων στο φύλλωμα καταδεικνύουν την αποτελεσματική φωτοσύνθεση που συνέβη που με την σειρά της

1. Εισαγωγή

ενισχύει τη βιωσιμότητα του δένδρου [42]. Μελέτες σε σπόρους μαρουλιού έχουν δείξει ότι η χρήση εγκλεισμένου σαλικυλικού οξέος παρουσιάζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την άμεση εφαρμογή του στα φυτά, μέσω της ισορροπίας φωτοσυνθετικών και βιολογικών αντιδράσεων, διότι η τεχνική του εγκλεισμού συμβάλλει στη μείωση των παρενεργειών που σχετίζονται με τη χορήγηση υψηλών δόσεων συστατικού [46]. Ακόμη, μελέτες που διερευνούν την επίδραση της ελεύθερης μορφής του σαλικυλικού οξέος στην αραβίδωση (*Arabidopsis Thaliana*) έδειξαν ότι προκαλεί στρες στο φυτό. Αυτό το στρες οφείλεται στην ανάγκη άμεσης διαχείρισης της συνολικής δόσης σαλικυλικού οξέος, με αποτέλεσμα τη βλάβη των ριζικών κυττάρων. Αντιστρόφως, η απελευθέρωση της δόσης θα ήταν ελεγχόμενη όταν το σαλικυλικό οξύ είναι εγκλεισμένο, για να μετριαστούν οι παρενέργειες. Επιπλέον, οι κατεργασίες με ελεύθερο σαλικυλικό οξύ επέδειξαν μικρότερο μέγεθος ανθού [47].



Σχήμα 5. Δράση σαλικυλικού οξέος κατά την εφαρμογή του σε καλλιέργειες φυτών.

1.5. Ζεΐνη

Η ζεΐνη είναι ένα μίγμα πρωτεϊνών διαφορετικού μοριακού βάρους και διαλυτότητας, η οποία απαντάται κυρίως στα δημητριακά. Το 75% της συνολικής ποσότητας της ζεΐνης ανιχνεύεται στο ενδοσπέρμιο του σπόρου του καλαμποκιού, με το υπόλοιπο να βρίσκεται στο φλοιό και το φύτρο. Ως ουσία ανήκει στη κατηγορία των προλαμινών, συγκεκριμένα αποτελείται από τις δομές α, β, γ και δ ζεΐνη, με τη πρώτη εξ' αυτών να βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία. Στο σύνολο της είναι υδρόφοβη, διότι οι πρωτεΐνες που την αποτελούν είναι και αυτές υδρόφοβες (λεκιθίνη, προλίνη, αλανίνη και φαινυλαλανίνη) και η δομή της έχει υψηλό ποσοστό ελίκων. Η εμπορική ζεΐνη αποτελείται κυρίως από τη πρωτεΐνη α-ζεΐνη πράγμα που οφείλεται στη κατεργασία

1. Εισαγωγή

παραγωγής της [48, 49, 50]. Η λειτουργία της είναι αποθηκευτική, δηλαδή αποθηκεύει άτομα αζώτου που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη του φυτού. Η α-ζεΐνη είναι ένα αρκετά υδρόφοβο μόριο, όπως και όλες οι άλλες τάξεις ζεΐνης και για αυτό το λόγο είναι αδιάλυτες στο νερό [51].

Η ζεΐνη, ως ουσία, παρουσιάζει μία πληθώρα εφαρμογών σε διάφορους τομείς όπως, η ιατρική, η γεωργία, η βιομηχανία και η παραγωγή καλλυντικών λόγω των χαρακτηριστικών της. Η ποικίλα υιοθέτηση της ζεΐνης βασίζεται στη βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα, ασφάλεια και ποικιλομορφία ιδιοτήτων που τη συνοδεύουν. Τα χαρακτηριστικά αυτά τη καθιστούν χρήσιμη σε εφαρμογές ανάπτυξης βιο-υλικών, συστημάτων χορήγησης φαρμάκων και ουσιών όπως βιταμίνες, αντιοξειδωτικά και πολυφαινόλες και ειδικότερα σε φάρμακα που δεν είναι διαλυτά στο νερό, συσκευασίες τροφίμων, επικαλύψεις και βιοπλαστικά, καθώς και σε βιολιπάσματα, φυτοφάρμακα, επικαλύψεις σπόρων και σε συστατικά καλλυντικών προϊόντων. Παρόλα αυτά η χρήση της θέλει προσοχή διότι οι συνθήκες απομόνωσης της ζεΐνης μπορεί να είναι ευνοϊκές σε μύκητες και να παραχθούν μυκοτοξίνες, οι οποίες είναι βλαβερές για την ανθρώπινη υγεία [52].

1.5.1. Εφαρμογές της Ζεΐνης

1.5.1.1. Συσκευασίες Τροφίμων

Η παγκοσμιοποίηση διεύρυνε τα όρια της αγορά προϊόντων, με αποτέλεσμα παραγωγοί να μπορούν πλέον να διανέμουν σε διάφορες χώρες και πόλεις τα προϊόντα τους. Ταυτόχρονα, οι αλλαγές στην περιβαλλοντική νομοθεσία και η περιβαλλοντική συνείδηση των πολιτών κατέδειξε πως οι παραδοσιακές συσκευασίες δεν μπορούν να καλύψουν πλέον το προϊόν. Σκοπός των νέων συσκευασιών που αναπτύσσονται είναι η παρεμπόδιση της αλλοίωσης από τους εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η υγρασία, η ακτινοβολία του φωτός, η θερμοκρασία και τα μικρόβια μέσω της ενεργής αντίδρασης με αυτούς του παράγοντες. Οι συσκευασίες που μπορούν να παρακολουθήσουν και να καταγράψουν τις συνθήκες στις οποίες βρίσκεται το προϊόν ή το εξωτερικό περιβάλλον καλούνται έξυπνες συσκευασίες [53].

Από την άλλη πλευρά, η ζεΐνη έχει την ικανότητα να διαμορφώσει φιλμ λόγω της δομής των αμινοξέων που την απαρτίζουν. Αυτό το χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης από το καλαμπόκι έχει δώσει τη δυνατότητα για περαιτέρω έρευνα στο κατά πόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο τομέα της συσκευασίας τροφίμων. Εντούτοις, όμως έχουν χαμηλές μηχανικές ιδιότητες και υψηλό βαθμός θραύσης. Η διατήρηση των τροφίμων και ο χρόνος ζωής τους στο ράφι εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συσκευασία. Η πλαστική συσκευασία που μέχρι τώρα χρησιμοποιείται αντικαταστάται από βιοδιασπώμενες από φυσικά πολυμερή. Τέτοια βιοπολυμερή είναι οι πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να προστατεύουν το τρόφιμο από τη φυσική καταστροφή, τη περιβαλλοντική ρύπανση και την αλλοίωση. Η αύξηση της διατηρησιμότητας και της ποιότητας μπορεί να γίνει και με επικάλυψη της επιφάνειας του προϊόντος, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η επαφή του τροφίμου με το ενεργό οξυγόνο της ατμόσφαιρας και την υγρασία. Μέχρι τώρα για τέτοιες εφαρμογές έχουν χρησιμοποιηθεί πολυσακχαρίδια, λιπίδια και πρωτεΐνες, με την τελευταία να υπερέχει των άλλων λόγω της αυξημένης εμποδισής αερίων και των μηχανικών ιδιοτήτων που φέρει. Για παράδειγμα, επικάλυψη που περιέχει ζεΐνη έχει χρησιμοποιηθεί για τη

1. Εισαγωγή

διατήρηση ξεφλουδισμένου σκόρδου σε θερμοκρασία 15°C με ικανοποιητική προστασία του από το ενεργό οξυγόνο, τους ατμούς νερού και διατήρηση του χρώματος του. Ομοίως, φιλμ κατασκευασμένο από ζεΐνη παρουσιάζει υψηλή διαφάνεια, παρεμπόδιση του οξυγόνου και της υγρασίας και μειωμένη ελαστικότητα και αντοχή σε μηχανική καταπόνηση [54]. Μία άλλη έρευνα έδειξε πως φιλμ ενισχυμένο με νανο-σωματίδια ζεΐνης που περιέχουν πρόπολη μπορούν επιτυχώς να χρησιμοποιηθούν στην συσκευασία τυριού τσενταρ. Με αυτή τη τροποποίηση της συσκευασίας βελτιώθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητά της, οι μηχανικές ιδιότητες, η θερμική σφράγιση της, η υδροφοβικότητα και η παρεμπόδιση της υπέρυθρης ακτινοβολίας, καθώς και ο βαθμός διόγκωσής της [55].

1.5.1.2. Ιατρική και Βιο-Υλικά

Μία ιατρική εφαρμογή της ζεΐνης είναι η δημιουργία συστημάτων χορήγησης και στοχευμένη δράσης βιοδραστικών ουσιών. Τα πρωτεϊνικής βάσης συστήματα φαίνεται να είναι καλύτερα από άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται, όπως λιπίδια, υδρογονάνθρακες, συνθετικά πολυμερή και ανόργανα κolloειδή συστήματα επειδή είναι βιο-αποικοδομήσιμα συστήματα και τα αμινοξέα που περιέχονται στην ζεΐνη είναι μη πολικά μόρια που μπορούν να δομήσουν σταθερά συστήματα πρωτεΐνης και φαρμάκου. Ταυτόχρονα η ζεΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποστηρικτική δομή στη δημιουργία ιστών. Για να μπορέσει βέβαια να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα στην ιατρική απαιτείται να γίνουν περισσότερες έρευνες [56]. Μεγάλο ενδιαφέρον εμφανίζει η εφαρμογή της ζεΐνης στην μηχανική ιστών λόγω των ιδιοτήτων που έχει. Η ενσωμάτωση ζεΐνης σε ιστό που περιέχει πολυϋδροξυβουτυρικό οξύ έχει ικανοποιητικές ιδιότητες ως προς την αντοξειδωτικότητα, την αποδόμηση και τη βιωσιμότητα των κυττάρων του οστικού ιστού [57].

1.5.1.3. Βιομηχανία Τροφίμων

Η αύξηση της ζήτησης για προϊόντα χωρίς γλουτένη τα τελευταία χρόνια αύξησαν τη έρευνα για ανάκτηση πρωτεϊνών από σπόρους που δεν περιέχουν γλουτένη, όπως το καλαμπόκι. Η αντικατάσταση της ζύμης από αλεύρι σίτου είναι μία δύσκολη διαδικασία επειδή οι πρωτεΐνες κάθε καρπού είναι διαφορετικές και αυτό επιδρά στην εμφάνιση του προϊόντος, την υφή, την ικανότητα να συγκρατά αέριο και να είναι αφράτο και μη ξεραθεί. Η ζεΐνη είναι μία πρωτεΐνη που φαίνεται ικανή να αντικαταστήσει τη γλουτένη, διότι είναι ιζωδοελαστική, έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες και τύπο αμινοξέων [58].

1.5.1.4. Καλλυντική Βιομηχανία

Η ζεΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί καλλυντική βιομηχανία και ειδικότερα στην δημιουργία αποδοτικότερων χρωστικών συστημάτων. Το σύστημα ζεΐνης και χρωστικής έχει έντονο χρώμα, υδατοαπωθητικότητα και φωτοσταθερότητα, ιδιότητες αναγκαίες για τις χρωστικές ουσίες στα καλλυντικά [59].

1.5.1.5. Ζεΐνη και Αγροτικός Τομέας

Η ζεΐνη, λόγω των ιδιοτήτων της όπως, η βιοαποικοδομησιμότητα, βιοσυμβατότητα, υψηλή θερμική αντοχή και η μη τοξικότητάς της, αποτελεί ένα ιδανικό φορέα για τη δημιουργία σωματιδίων. Τα σωματίδια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιώσιμο υπόστρωμα για τον εγκλεισμό και την απελευθέρωση ποικίλων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων υδρόφοβων ενώσεων, ανοίγοντας έτσι νέους δρόμους για την

1. Εισαγωγή

ανάπτυξη φιλικών προς το περιβάλλον εφαρμογών [60]. Ο ρόλος αυτό θεωρείται κατάλληλος για την δημιουργία φορέων εγκλεισμένων φυτοφαρμάκων για τη στοχευμένη δράση και την ελεγχόμενη απελευθέρωση κατά την εφαρμογή τους στο έδαφος. Τα σωματίδια αυτά σχεδιάζονται ώστε να έχουν καθορισμένες επιφανειακές ιδιότητες και να μπορούν να αλληλοεπιδρούν με το ριζικό σύστημα του φυτού [61]. Ο εγκλεισμός ουσιών με δράση προστασίας από παθογόνους οργανισμού μπορεί να προσδώσει μεγαλύτερη προστασία στις δραστικές ουσίες, σταθερότητα στο σχεδιασμένο σύστημα, απορροφητική ικανότητα και υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι του στόχου, και παράλληλα να ελαχιστοποιήσει τα ανεπιθύμητα φαινόμενα που συνοδεύουν τη δράση αυτή [33]. Βιβλιογραφική έρευνα πάνω στο σχηματισμό σωματιδίων ζεϊνης, στην οποία έχει εγκλειστεί αιθέριο έλαιο σιτρονέλας, κατάφεραν να πετύχουν ποσοστό ενθυλάκωσης της τάξης του 90%, φυσικοχημική σταθερότητα και αποτελεσματική προστασία έναντι της υπερϊώδης ακτινοβολίας [21].

1.6. Χιτοζάνη και Πολυβινυλική Αλκοόλη

Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικής προέλευσης γραμμικό ημικρυσταλλικό πολυσακχαρίδιο ευδιάλυτο σε όξινα υδατικά διαλύματα, που συναντάται σε πολλά είδη στη φύση όπως στα καρκινοειδή (γαρίδες, καβούρι, αστακός), στους μύκητες, στα έντομα (κοριός, πεταλούδα) και στα μαλάκια (κέλυφος στρειδιών) [62, 63, 64]. Οι φυσικοχημικές της ιδιότητες καθορίζονται από το μοριακό βάρος (μικρό, μεσαίου και υψηλό) και τον βαθμό ακετυλίωσης της [62]. Ο κύριος τρόπος παραγωγής της χιτοζάνης είναι μέσω θερμο-χημικής υδρόλυσης των αμιδικών δεσμών της χιτίνης. Ως ουσία έχει πληθώρα φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων όπως υψηλή απορροφητικότητα, μη τοξικότητα, βιοδιεγερτική δράση, βιοαποικοδομησιμότητα, αντι-μικροβιακή δράση και θερμοστατική καθώς και προσομοίωσης του ανοσοποιητικού [63, 65, 66]. Έτσι, έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σε τομείς όπως τα τρόφιμα, η βιοιατρική, η γεωργία, η κοσμηματολογία και η βιοτεχνολογία. Τα υλικά που περιέχουν χιτοζάνη βασίζονται στο γεγονός πως η ουσία αυτή έχει την ικανότητα να ξανά φτιαχτεί φυσικά, με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλές επιλογές εφαρμογής. Η πρόκληση που συναντάται είναι κατά τη παραγωγή σωματιδίων μέσω ηλεκτροψεκασμού, διότι είναι μία ουσία πολυκατιονική με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου και υψηλό ιζώδες και επιφανειακή τάση. Η λύση σε αυτό το πρόβλημα δύναται από τον συνδυασμό με άλλες ουσίες όπως η πολυβινυλική αλκοόλη (PVA) και το πολυαιθυλενοξείδιο (PEO) [65].

1.6.1. Εφαρμογές της χιτοζάνης

1.6.1.1. Γεωργικός Τομέας

Η χρήση της χιτοζάνης και των παραγώγων της στον τομέα της γεωργίας κερδίζει συνεχώς έδαφος χάρη στην ευρεία διαθεσιμότητα, το χαμηλό κόστος και στο γεγονός πως είναι φιλική προς το περιβάλλον. Η πλούσια παρουσία αμινοξέων και υδροξυλικών ομάδων στη δομή της ενισχύει τις ευεργετικές της ιδιότητες. Η χιτοζάνη μπορεί να αξιοποιηθεί στην επικάλυψη σπόρων, στον εμπλουτισμό του εδάφους και στην προστασία των φυτών [65, 72]. Η βιοδιεγερτική της δράση συνδέεται άμεσα με την υποστήριξη της φωτοσύνθεσης του φυτού, την ανάπτυξη των ριζών και των σπόρων, την αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των ενζύμων του φυτού, και την ενίσχυση της αντοχής σε αβιοτικούς παράγοντες όπως η ξηρασία, η αλκαλικότητα του εδάφους και

1. Εισαγωγή

η αύξηση της θερμοκρασίας και σε βιοτικούς παράγοντες όπως οι ασθένειες. Η θετική της επίδραση στην αντιμετώπιση ασθενειών των φυτών οφείλεται στις αντιμικροβιακές της ιδιότητες και στην ικανότητά επιβιώσής της σε δύσκολες συνθήκες [65, 66, 72]. Η πραγματική δράση της χιτοζάνης κατά την εφαρμογή εξαρτάται από τη δόση, το χρόνο εφαρμογής και το τύπο προϊόντος που επιλέχθηκε. Στις καλλιέργειες χρησιμοποιείται με τη προοπτική της προστασίας του φυτού από παθογόνους οργανισμούς και παράσιτα που το βλάπτουν και της ανάπτυξης του συστήματος αμύνης [65]. Τα υλικά με βάση τη χιτοζάνη παρουσιάζουν τεράστιες δυνατότητες όσον αφορά την εφαρμογή τους στη προστασία και την ανάπτυξη των φυτών [62]. Η δράση της αυτή οφείλεται στις ελεύθερες αμινο-ομάδες και εξαρτάται από το βαθμό της από-ακετυλίωσης κατά τη παραγωγή της [65]. Ο εγκλεισμός άλλων ουσιών υψηλής αξίας στο φυτό μέσω της χιτοζάνης χρησιμοποιείται για να μεταφέρει παράλληλα το φυτό άλλες ουσίες [8, 63, 65,]. Ως προς τη βελτίωση της εδαφικής λειτουργίας, λόγω της βιοαποικοδομησιμότητας και της μη τοξικότητάς της, η χιτοζάνη αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση έναντι των συνθετικών λιπασμάτων, συμβάλλοντας στον περιορισμό της ρύπανσης. Ως πολυμερές που περιέχει άζωτο, η χιτοζάνη λειτουργεί ως υπόστρωμα σταδιακής απελευθέρωσης αζώτου, το οποίο μπορούν να απορροφήσουν απευθείας τα φυτά και ωφελείται η βλάστηση και η ανάπτυξη του σπόρου και του φυτού. Εναλλακτικά, μικροοργανισμοί μπορούν να το οξειδώσουν σε νιτρικά άλατα, καθιστώντας το και πάλι διαθέσιμο προς απορρόφηση από τα φυτά [65]. Πρόσφατα μελέτες υποδεικνύουν την υψηλή αποτελεσματικότητα της χρήσης χιτοζάνης στο έδαφος ή στα φύλλα για τη προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών και την επαγωγή της βιοσύνθεσης δευτερευόντων μεταβολιτών σε διάφορα είδη αρωματικών φυτών, βοτάνων και λαχανικών, όπως η αψιθιά (*Artemisia annua*), ο κουρκουμάς (*Curcuma longa*), το τριαντάφυλλο (*Catharanthus roseus*), η φράουλα (*Fragaria ananassa*), το γκίνγκο μπιλόμπα (*Ginkgo biloba*), το μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*), ο δυόσμος (*Mentha piperita*), ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*), η ρίγανη (*Origanum vulgare ssp. Hirtum*), το φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), η στεβία (*Stevia rebaudiana*) και το γαϊδουράγκαθο (*Sylibum marianum*), μεταξύ άλλων [67].

Η επιτυχημένη άμυνα των φυτών ενάντια σε παθογόνους οργανισμούς βασίζεται στην έγκαιρη ανίχνευσή τους. Κατά τη διάρκεια της εξελικτικής διαδικασίας, τα φυτά έχουν αναπτύξει ένα συνδυασμό μηχανισμών για τη καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων οργανισμών. Αυτή η αμυντική απόκριση των φυτών περιλαμβάνει την έκφραση γονιδίων και ενζύμων που σχετίζονται με την άμυνα σε πρωταρχικό στάδιο, την αυξημένη συσσώρευση φαινολικών ενώσεων και την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος. Η αντιμικροβιακή της δράση σχετίζεται με την συγγένεια που παρουσιάζει με την εξωτερική μεμβράνη αυτών των οργανισμών. Βέβαια, δεν παρουσιάζει μόνο αντιμικροβιακή δράση, αλλά ενισχύει την ανάπτυξη του φυτού, την ανοσολογική απόκριση του σε εξωτερικούς παράγοντες, και συμβάλει στην αύξηση της παραγωγικότητας. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι τα σωματίδια χιτοζάνης παρουσιάζουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά των μυκητιασικών από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς. Επομένως, μπορούν να αποτελέσουν μια ελπιδοφόρα εναλλακτική λύση για την καταπολέμηση των φυτικών παρασίτων, μειώνοντας την εξάρτηση από τοξικά φυτοφάρμακα και ενδεχομένως αυξάνοντας τη παραγωγικότητα των καλλιεργειών [62, 64]. Πειράματα που αξιολόγησαν την εφαρμογή σωματιδίων χιτοζάνης σε καλλιέργειες κατέδειξαν αξιοσημείωτη

1. Εισαγωγή

αντιμυκητιασική δράση έναντι συγκεκριμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων (*C. capsici*, *C. gloesporoides*, *A. alternata*, *M. phaseolina*, *R. solani*). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ενίσχυση της ανάπτυξης καφέ Robusta σε καλλιέργεια εντός θερμοκηπίου, τόνωση της ανοσολογικής απόκρισης των φυτών μέσω θετικών μηχανισμών, και λειτουργία ως βιολογικού φυτοφαρμάκου κατά του *Fusarium head blight*. Η εφαρμογή σωματιδίων χιτοζάνης συζευγμένων με στοιχεία όπως αργίλιο και χαλκό, καθώς και με ενώσεις όπως μεθυλοϊασιμονάτο και βωμίτη, οδήγησε σε αντιμυκητιασική δράση, θετική επίδραση στην ανάπτυξη του βλαστού και ενισχυμένη άμυνα των φυτών έναντι εξωγενών παραγόντων που απειλούν το φυτό. Σε εμπορικά σταφύλια για παραγωγή κρασιού, η χιτοζάνη όταν εφαρμόστηκε με υγρό μέσο ανέστειλε την ανάπτυξη του μύκητα *Botrytis cinerea* και τη γκρι μούχλα στα φύλλα και στα σταφύλια. Η χιτοζάνη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη συστηματική εξάπλωση των ιών σε ολόκληρο το φυτό μέσω διακοπής του πολλαπλασιασμού τους και ενισχύει την υψηλής ευαισθησίας απόκριση του ξενιστή στη μόλυνση, ωστόσο, δεν έχει αποδειχθεί πως αδρανοποιεί πλήρως τους ιούς. Αυτή η λειτουργία της σχετίζεται με το γεγονός ότι μετά την είσοδο των ιών στους φυτικούς ιστούς των κυττάρων, τα σωματίδια χιτοζάνης συνδέονται στενά με τα νουκλεϊκά οξέα, προκαλώντας μια σειρά βλαβών και επιλεκτικών αναστολών σε αυτά. Ο βαθμός καταστολής των ιογενών λοιμώξεων ποικίλλει ανάλογα με το μοριακό βάρος της χιτοζάνης [62].

Ένα άλλο πρόβλημα που παρουσιάζεται στις καλλιέργειες είναι πως το έδαφος συχνά έχει χαμηλή συγκράτηση λιπασμάτων λόγω του πορώδους και της άρδευσης, με ένα σημαντικό ποσοστό λιπασμάτων να χάνεται μέσω της απονιτροποίησης, εξαύλωσης, απορροής από την επιφάνεια και της έκπλυσης του χώματος, προκαλώντας απώλειες θρεπτικών συστατικών στον αέρα, στα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα. Τα λιπάσματα που περιέχουν ουρία βοηθούν στην αύξηση της απόδοσης, αλλά ταυτόχρονα επιδεινώνουν την ποιότητα του εδάφους. Μία λύση σε αυτό το πρόβλημα είναι λιπάσματα που απελευθερώνουν ελεγχόμενα ή αργά τις ευεργετικές ουσίες. Τα ελεγχόμενης απελευθέρωσης λιπάσματα που περιέχουν αζώτου μέσα σε μικροσφαίριδια χιτοζάνης παρατηρήθηκε πως επιδράσανε θετικά στην ανάπτυξη του κινέζικου λάχανου (*Brassica rapa ssp. pekinensis*), βελτίωσαν τις παραμέτρους της φωτοσύνθεσης και τη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη και αύξησαν τη συνολική περιεκτικότητα σε σάκχαρα, πρωτεΐνες, πολυφαινόλες και φλαβονοειδή [68].

Η χιτοζάνη, πέρα από τις μοναδικές ιδιότητες που παρουσιάζει ως υλικό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα λόγω της απλής της επεξεργασίας, το χαμηλό κόστος και τη συμβατότητά της με τις σύγχρονες τάσεις ανάπτυξης αντιβακτηριακών παραγόντων [62]. Τα παραπάνω αποτελέσματα μελετών μπορούν να ωφελήσουν τον αγροτικό τομέα. Ένα σημαντικό μειονέκτημα της χιτοζάνης για τη χρήση της ως φορέα μεταφοράς αποτελεί η περιορισμένη διαλυτότητά της σε ουδέτερο ή βασικό εύρος pH και σε ορισμένα μόνο οργανικά οξέα. Η βελτίωση της διαλυτότητας της χιτοζάνης στο νερό μπορεί να επιτευχθεί με τη χημική επίδραση της πολυβινυλικής αλκοόλης [70].

Η πολυβινυλαλκοόλη (PVA) αποτελεί ένα από τα συνηθέστερα πολυμερή που χρησιμοποιούνται για ενσωμάτωση στη χιτοζάνη. Αυτό το συνθετικό πολυμερές που είναι το προϊόν αλκοολόλυσης του οξικού πολυβινυλίου (PVAc) είναι υδατοδιαλυτό υδρόφιλο, και χρησιμοποιείται ευρέως εδώ και δεκαετίες σε διάφορες εφαρμογές λόγω των εξαιρετικών μηχανικών, βιοσυμβατών, βιοαποικοδομήσιμων, και μη τοξικών

1. Εισαγωγή

ιδιοτήτων της, καθώς και του χαμηλού κόστους, την ευκολίας σχηματισμού μεμβρανών και της εύκολης χρήσης της [69, 70]. Η εφαρμογή εγκλεισμένων σωματιδίων χιτοζάνης, πολυβινυλικής αλκοόλης που περιέχουν χαλκό, μέσα από μελέτη που έγινε κατέδειξε την αύξηση της διάμετρο του βλαστού των φυτών τομάτας που καλλιεργήθηκαν υπό κανονικές συνθήκες. Ενδιαφέρουσες είναι οι παρατηρήσεις ότι υπό συνθήκες αλατότητας, η εφαρμογή τόσο σωματιδίων χιτοζάνης με πολυβινυλική αλκοόλη άλλα και σωματιδίων χιτοζάνης με πολυβινυλική αλκοόλη που φέρει εγκλεισμένο χαλκό αύξησαν το ύψος και τη διάμετρο του βλαστού. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή αυτών των σωματιδίων επάγει την έκφραση των γονιδίων SOD και JA είτε παρουσία είτε απουσία αλατότητας [71].

1.6.1.2. Φαρμακευτική και Βιοϊατρική

Πέρα από τις εφαρμογές της στον αγροτικό τομέα, η χιτοζάνη διαθέτει ιδιότητες που την καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμη σε διάφορους άλλους τομείς, όπως η βιοϊατρική και η φαρμακευτική. Η χιτοζάνη είναι ένα βιοσυμβατό, βιοαποικοδομήσιμο, μη τοξικό και βλέννα-προσκολλητικό πολυμερές. Αυτά τα χαρακτηριστικά την καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστική για εφαρμογές στην ιατρική και στη φαρμακευτική [64]. Η χιτοζάνη παρουσιάζει την ιδιότητα να συνδέεται με την επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων και να επιταχύνει τη διαδικασία της πήξης του αίματος. Για αυτόν τον λόγο, η χιτοζάνη έχει βρει πρόσφατη εφαρμογή σε επιδέσμους και άλλες αιμοστατικές χρήσεις. Ως πολυμερές που είναι διαθέτει πολλές ομάδες αλκυλαμινών, οι οποίες της προσδίνουν θετικό φορτίο στην επιφάνειά της, ιδιαίτερα σε όξινο pH. Διαθέτει επίσης αντιμικροβιακή δράση αποσταθεροποιώντας την εξωτερική μεμβράνη των γραμμο-αρνητικών βακτηρίων και διαπερνώντας τη κυτταρική τους μεμβράνη. Αυτή η αντιμικροβιακή ιδιότητα της χιτοζάνης συμβάλλει στην απολύμανση της περιοχής του τραύματος, βελτιώνοντας περαιτέρω τη διαδικασία της επούλωσης. Η επούλωση κάποιων πληγών, όπως των διαβητικών ελκών και των εγκαυμάτων είναι μία αρκετά δύσκολη διαδικασία. Η χρήση όμως επιδεσμικών δομών από νανοίνες για την επώλωση αποτελεί μία νέα μέθοδο θεραπείας και είναι ιδανικές διότι έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την είσοδο παθογόνων οργανισμών στην πληγή, να επιτρέπουν την απαιτούμενη ανταλλαγή αερίων, να απορροφούν τις εκκρίσεις του τραύματος και να απελευθερώνουν ελεγχόμενα φάρμακα στην περιοχή. Σε μελέτη που έγινε για τη παρασκευή νανοϊνών μέσω της μεθόδου της ηλεκτροϊνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν, λόγω των ιδιοτήτων τους πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), χιτοζάνη και υαλουρονικό οξύ. Οι ίνες που δημιουργήθηκαν δεν παρουσίασαν καμία τοξικότητα προς τους ινοβλάστες του δέρματος και παρείχαν σταθερό μηχανισμό απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης, με απελευθέρωση του 64% εντός 2 ημερών [73].

1.6.1.3. Βιομηχανία Τροφίμων

Πέρα από τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς που απειλούν το φυτό στο στάδιο της καλλιέργειας και της ανάπτυξης, φυτοπαθογόνα βακτήρια επηρεάζουν αρνητικά μια μεγάλη μερίδα φρούτων και λαχανικών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης μετά τη συγκομιδής τους. Τα παραδοσιακά αντιμικροβιακά προϊόντα χρησιμοποιούνται ευρέως εδώ και δεκαετίες. Πρόσφατα όμως, η επίστρωση χιτοζάνης έχει παρουσιαστεί ως μια εξαιρετική εναλλακτική λύση στα χημικώς συνθετικά φυτοφάρμακα. Το βιοπολυμερές αυτό αναδεικνύεται ως πολλά υποσχόμενο παράγοντα επικάλυψης για φρούτα και λαχανικά λόγω των αντιμικροβιακών και αμυντικών ιδιοτήτων του.

1. Εισαγωγή

Ορισμένες μελέτες σε εργαστηριακό επίπεδο (in vitro) επιβεβαιώνουν ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων *Pseudomonas fluorescens* που προκαλεί σήψη στο μπρόκολο και του *Burkholderia seminalis* που προκαλεί σήψη στα βερίκοκα, αναστέλλεται σημαντικά από τη χιτοζάνη υπό διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε λεμόνια από την μούχλα του φυτοπαθογόνου μύκητα *Penicillium spp.*. Ενώ, δομές χιτοζάνης με σαλικυλικό οξύ εφαρμοσμένες σε αγγούρια μείωσαν τον κίνδυνο ψύξης και διατήρησαν τη ποιότητα του λαχανικού κατά τη ψυχρή αποθήκευση [62,66].

1.7. Φυτοδιεγέρτες από Φύκια

Κατά τη τελευταία δεκαετία, το θαλάσσιο οικοσύστημα έχει προσελκύσει τη προσοχή των ερευνητών, καθώς πολλοί οργανισμοί διαθέτουν ή παράγουν ενώσεις με υψηλή βιολογική δράση. Τα θαλάσσια προϊόντα που εξερευνούνται αποτελούν τα φύκια, μια ετερογενής ομάδα φωτοσυνθετικών οργανισμών διαφορετική από τα χερσαία φυτά που αναπτύσσονται στα θαλάσσια ύδατα. Η παγκόσμια παραγωγή εμπορικών υδρόβιων φυτών, συμπεριλαμβανομένων των μακροφυκών, έφτασε τους 31.2 εκατομμύρια τόνους το 2016, με τα καλλιεργούμενα μακροφύκη να αντιπροσωπεύουν το 96.5%. Έτσι, η παγκόσμια αγορά θαλάσσιων φυκιών φαίνεται να παρουσιάζει σημαντική δυναμική ανάπτυξης, με ετήσιο ποσοστό αύξησης της τάξης του 8.9%, αναμένεται δε να αποτιμηθεί σε περίπου 22.13 δις δολάρια έως το 2024. Τα μακροφύκη εκτίθενται συχνά σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ οι επιζήμιες επιδράσεις στο εσωτερικό τους δεν είναι ορατές, γεγονός που υποδηλώνει την ικανότητά τους να παράγουν διάφορους μεταβολίτες (ένζυμα, χρωστικές, πολυσακχαρίτες, βιταμίνες, φαινόλες, τοκοφερόλες, φωσφολιπίδια κ.λπ.) που τα προστατεύουν από εξωτερικούς παράγοντες [74, 75]. Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της πλούσιας σύστασής τους σε διαιτητικές ίνες, μέταλλα, πρωτεΐνες, στεροειδή και φαινολικές ενώσεις, οι οποίες συνδέονται άμεσα με τις προδιδόμενες ευεργετικές ιδιότητές τους [76]. Πολλά είδη μακροφυκών έχουν αποδειχθεί ότι διαθέτουν σημαντικά επίπεδα και ποιότητα πρωτεΐνης, συγκρίσιμα με συμβατικά τρόφιμα πλούσια σε πρωτεΐνες, ουσίες με αντιοξειδωτική δράση, φαινολικές ουσίες και χρωστικές όπως τα καροτενοειδή [74, 77, 78, 79, 80]. Οι παράμετροι όπως το βάθος και η φωτεινή ακτινοβολία που δέχονται, η τοποθεσία της καλλιέργειας και η κίνηση των ρευμάτων νερού, η συγκέντρωση του νερού σε θρεπτικά συστατικά και η εποχιακή διακύμανση επιδρούν στο προφίλ ουσιών που διαθέτουν. Η εποχική διακύμανση των βιοχημικών συστατικών, αποτελεί μια σημαντική πρόκληση για την εμπορευματοποίηση και τη παροχή βιομάζας σταθερής ποιότητας καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας [81]. Τα φύκια παρουσιάζουν ολοένα και μεγαλύτερη αναγνώριση ως μια βιώσιμη πηγή πρωτεΐνης και ενεργών συστατικών [82].

Οι βιοδιεγέρτες που περιέχονται στα εκχυλίσματα των φυκιών έχουν αναδειχθεί ως εμπορικές συνθέσεις για χρήση ως παράγοντες που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και ως μέθοδος για τη βελτίωση της ανοχής της καλλιέργειας στην αλατότητα, τη θερμότητα και τη ξηρασία του περιβάλλοντος. Τα εκχυλίσματα φυκιών στοχεύουν σε μια σειρά από μεταβολικές οδούς για να αυξήσουν την ανοχή υπό συνθήκες πίεσης. Τα θαλάσσια φύκια χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τα μικροφύκια και τα μακροφύκια, οι οποίες με τη σειρά τους έχουν διάφορες υποκατηγορίες, τα κόκκινα,

1. Εισαγωγή

πράσινα και καφέ μακρόφυκια. Τα μακροφύκια χρησιμοποιούνται ήδη ως οργανικά λιπάσματα εδώ και χιλιάδες χρόνια. Τα καφέ μακροφύκια περιέχουν συστατικά που λειτουργούν ως φυτο-ορμόνες (αυξίνες και κυτοκίνες) διότι περιέχουν πολυφαινόλες, αμινοξέα, στερόλες, πολυσακχαρίτες και μεταλλικά στοιχεία [83, 84]. Τα υγρά εκχυλίσματα είναι η πιο αποτελεσματική μορφή προϊόντος με βάση τα φύκια αυτά για τις καλλιέργειες. Η σύσταση και η συγκέντρωση των βιοδραστικών ουσιών στα υγρά εκχυλίσματα εξαρτώνται από τη δομή και τη σύσταση τους στην πρώτη ύλη κάθε φορά. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η εκχύλιση έχει σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση των μεγαλύτερων δυνατών ποσοτήτων [14]. Τα αποτελέσματα της εφαρμογής των βιοδιεγερτών αυτών σε μία καλλιέργεια εξαρτάται όμως από πληθώρα παραγόντων, όπως η χρησιμοποιούμενη δόση, ο τρόπος εφαρμογής, ο χρόνος εφαρμογής και η σύσταση τους [2]. Επίσης, η διαφορά στις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων είναι συχνή και οφείλεται στη διαφορετική ημερομηνία συγκομιδής και σποράς, μεθόδου εκχύλισης, τύπου καλλιέργειας, χρόνου και ρυθμού εφαρμογής του εκχυλίσματος στα φυτά, περιβαλλοντικών παραγόντων, τύπων καλλιέργειας [12]. Τα εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκιών παρουσιάζουν βιοδιεγερτικές ιδιότητες για τα χερσαία φυτά. Ωστόσο, τα ακατέργαστα εκχυλίσματα θεωρούνται συχνά πιο αποτελεσματικά από τα εκλεπτυσμένα, καθώς διατηρούν ένα ευρύ φάσμα βιοδραστικών ενώσεων που ενδέχεται να χάνονται κατά τις διεργασίες βελτίωσης και καθαρισμού [84].

1.7.1. Φύκος *Saccharina Latissima*

Το καφέ μακροφύκος *Saccharina Latissima* είναι ένα από τις πέντε μεγαλύτερες καλλιέργειες στην Ευρώπη [82]. Η καλλιέργεια του παρουσιάζει σημαντικό θετικό αντίκτυπο στο περιβάλλον, καθώς έχει την ικανότητα να απορροφά ποσότητες διοξειδίου του άνθρακα από την ατμόσφαιρα που υπερβαίνουν εκείνες που εκλύονται κατά τη καλλιέργειά του. Επιπλέον, η ενσωμάτωση των ουσιών που περιέχει σε καλλιέργειες εμπλουτίζει το έδαφος με θρεπτικά συστατικά, βελτιώνοντας τη γονιμότητά του και συμβάλλοντας στη μείωση της χρήσης χημικών λιπασμάτων [85]. Το ενδιαφέρον είναι αυξημένο εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το είδος θαλάσσιου φυτού *Saccharina Latissima* (*Linnaeus* ή sugar kelp), το οποίο καλλιεργείται εμπορικά είτε ως μονοκαλλιέργεια είτε ενσωματωμένο σε συστήματα πολυτροφικής υδατοκαλλιέργειας. Το φύκι αυτό αποτελεί είδος με ιστορικό ανθρώπινης κατανάλωσης εντός της ΕΕ, καθιστώντας το κατάλληλο για περαιτέρω εμπορική εκμετάλλευση. Η *Saccharina Latissima* θα μπορούσε θεωρητικά να καλλιεργηθεί όλο το έτος, ωστόσο, στην πράξη η καλλιέργειά της πραγματοποιείται από τον Απρίλιο έως το Σεπτέμβριο, όταν οι καιρικές συνθήκες επιτρέπουν τις εργασίες στη θάλασσα. Οι μεγάλες θερμοκρασιακές μεταβολές των εποχών στη χώρα καλλιέργειας της, οδηγεί σε διαφορετικές περιεκτικότητες βιοδραστικών ουσιών [81].

1.7.1.1. Πρωτεϊνικό Περιεχόμενο

Οι πρωτεΐνες είναι βιοχημικά μόρια που διευκολύνουν μια βιολογική λειτουργία στον οργανισμό. Όπως και άλλα βιολογικά μακρομόρια, όπως οι πολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες αποτελούν ζωτικά συστατικά των οργανισμών (φυτικών και ζωικών) και συμμετέχουν σε σχεδόν κάθε διαδικασία εντός των κυττάρων, ανεξάρτητα από το είδος του κυττάρου. Πολλές πρωτεΐνες είναι ένζυμα που καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις και είναι ζωτικής σημασίας για το μεταβολισμό [86]. Σε μελέτες που έγιναν για το προσδιορισμό των αμινοξέων που περιέχει το φύκος βρέθηκε

1. Εισαγωγή

πως αυτό που απαντάται σε μεγαλύτερη αφθονία είναι η ιστιδίνη και έπειτα σε μικρότερο βαθμό η βαλίνη και η ισολευκίνη [81].

Τα καφέ φύκια, όπως η *Saccharina Latissima*, προβάλλουν χαμηλή διαλυτότητα πρωτεϊνών πράγμα το οποίο αποτελεί πρόκληση για την εξαγωγή τους. Μέχρι τώρα, από μελέτες που έχουν διενεργηθεί η διαλυτότητα τους κυμαινόταν από 15 έως 24% βάσει των συνολικών αμινοξέων, ενώ η διαλυτότητα του συνολικού αζώτου κυμαινόταν ανάμεσα στο 29 έως 40%. Το διαφορετικό pH των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή των πρωτεϊνών αλλά και η εποχή συγκομιδής της βιομάζας επιδρά σημαντικά στα αποτελέσματα. Η εξαγωγή των πρωτεϊνών από θαλάσσια φύκια είναι γενικά μια δυσκολότερη διαδικασία σε σύγκριση με την εξαγωγή από σπόρους, όπως η σόγια και τα όσπρια, λόγω του υψηλού κλάσματος πρωτεϊνών μεμβράνης. Η *Saccharina Latissima* που εντάσσεται στη κατηγορία των καφέ φυκιών, έχει χαμηλότερη διαλυτότητα πρωτεϊνών σε σχέση με φύκια άλλων κατηγοριών, το οποίο οφείλεται στους σταυροδεσμούς των μορίων με τις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχουν υψηλή συγκέντρωση στα καφέ φύκια [87].

1.7.1.2. Αντιοξειδωτική Δράση και Πολυφαινόλες

Το φύκος *Saccharina Latissima* περιέχει ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών και βιοδραστικών ενώσεων. Τα κύρια συστατικά με αντιοξειδωτική δράση στα μακροφύκη είναι οι πολυσακχαρίτες, οι φαινολικές ενώσεις, οι τοκοφερόλες, τα καροτενοειδή και τα πεπτίδια [78]. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούνται από τις εξής δύο κατηγορίες, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή λειτουργούν ως προστατευτικοί παράγοντες έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας, μεταξύ άλλων σημαντικών λειτουργιών που μέχρι πρόσφατα είχαν εντοπιστεί μόνο σε χερσαία φυτά, παράλληλα έχουν αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση [76, 78, 88,]. Οι μεταβολές της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες έχουν αναφερθεί ότι επηρεάζονται από την ένταση της ακτινοβολίας, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, τις βροχοπτώσεις, την αλατότητα του νερού και την εποχή καλλιέργειας και συγκομιδής. Η καλλιέργεια θαλάσσιων φυκών κοντά σε πηγή θρεπτικών συστατικών θα μπορούσε ενδεχομένως να τροποποιήσει τη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις του φυτού και κατά συνέπεια την αντιοξειδωτική ικανότητα της βιομάζας [88].

1.7.1.3. Καροτενοειδή & Πολυσακχαρίτες

Το κύριο καροτενοειδές του φύκος αυτού είναι η φουκοξανθίνη. Η φουκοξανθίνη λαμβάνει μέρος στη συλλογή φωτός, αλλά πιθανώς ασκεί και φωτο-προστατευτική δράση στο θαλάσσιο φυτό. Το λιποδιαλυτό αυτό καροτενοειδές, που εντοπίζεται κυρίως σε καφέ φύκια (brown algae), παρουσιάζει εμπορικό ενδιαφέρον λόγω της αντιοξειδωτικής και προστατευτικής ικανότητας του έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας (UVB) [78, 88]. Το περιεχόμενο ποσοστό σε καροτενοειδή συνδέεται συνήθως με το κατά πόσο η καλλιέργεια του μπορεί να συλλέξει φωτεινή ακτινοβολία. Από την άλλη πλευρά, οι θειϊκοποιημένοι πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από τις φουκοειδίνες στα καφέ φύκια είναι δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Οι φουκοειδίνες διαφέρουν ως προς τη δομή και τη σύσταση τους ανάλογα με το είδος, τη τοποθεσία και την εποχή. Οι φουκοειδίνες θαλάσσιων φυκιών έχουν παρουσιάσει αντιοξειδωτικές και άλλες βιοδραστικές επιδράσεις [88].

1. Εισαγωγή

1.7.1.4. Μέταλλα και Ιχθυοστοιχεία

Στη *Saccharina Latissima* περιέχονται επίσης μέταλλα σε περιεκτικότητα που κυμαίνεται στα 20.4 g/100g ξηρής βάσης. Ο λόγος των μετάλλων καλίου προς νάτριο (K/Na) υπολογίστηκε πως είναι υψηλότερος της μονάδας, ενώ το καφέ αυτό φύκος περιέχει υψηλές ποσότητες ασβεστίου, μαγνησίου και σιδήρου. Η χημική σύσταση της *Saccharina latissima* έχει χαρακτηριστεί διεξοδικά μέσω πολλαπλών μελετών, με ιδιαίτερη έμφαση στην υψηλή περιεκτικότητα σε τέφρα (43.8%) [76].

1.7.1.5. Λιπίδια και λιπαρά

Παρά την γενικά χαμηλή περιεκτικότητα της σε λιπίδια, το λιπιδικό προφίλ της χαρακτηρίζεται συχνά από υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Μελέτες πάνω στο λιπιδικό προφίλ της *Saccharina Latissima* κατέδειξαν αφθονία, με τον λόγο ακόρεστων (παλμιτολεϊκό οξύ, ολεϊκό οξύ, λινολεϊκό οξύ, α-λινολενικό οξύ) προς κορεσμένα λιπαρών οξέων (μυριστικό οξύ, παλμιτικό οξύ, στεατικό οξύ) ήταν περίπου 0.75 [76].

1.7.2. Εφαρμογές Εκχύλισμάτων *Saccharina's Latissima*

Αναλύσεις καλλιεργειών (*Carpobrotus edulis*, *Kalanchoe daigremontiana* και *Kalanchoe tubiflora*) στις οποίες εφαρμόστηκε εκχύλισμα από το φύκι *Saccharina Latissima* έδειξαν σημαντική ενίσχυση των αγρονομικών παραμέτρων. Ειδικότερα, τα φυτά αυτά παρουσίασαν αύξηση στο ύψος και στον αριθμό των φύλλων ανά φυτό, αυξημένη βλάστηση και ανάπτυξη των ριζών καθώς και μειωμένη προσβολή από το παθογόνο μικροοργανισμό *Pythium debaryanum* [84]. Η εφαρμογή υγρού εκχυλίσματος φύκος *Saccharina Latissima* σε σπόρους σιταριού και αγγουριού αύξησε την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα της καλλιέργειας, με τα αποτελέσματα να εξαρτώνται από την συγκέντρωση της δόσης. Το ποσοστό των χλωροφυλλών παρουσιάστηκε αυξημένο στα δείγματα φυτών που κατεργάστηκαν με εκχυλίσματα αυτά. Τα φυτά στα οποία χρησιμοποιήθηκε υγρό εκχύλισμα αυξήθηκε σημαντικά η ξηρή μάζα των ριζών, το μέγεθος των φύλλων και το ύψος του φυτού [14]. Θετική επίδραση παρουσίασαν, επίσης, υδατικά εκχυλίσματα από το ίδιο φύκι κατά την εφαρμογή τους σε καλλιέργεια μαρουλιού (*Lactuca sativa* var. *Crispa* L.). Η ανάπτυξη του φυλλώματος και του βάρους τους ενισχύθηκε και αυξήθηκε η ανάπτυξη ριζών [89]. Μέσα από τις έρευνες αυτές διακρίνεται η δυναμικότητα της *Saccharina Latissima* ως βιολογικό λίπασμα για τη βιώσιμη γεωργία, λόγω του χαμηλού κόστους, του περιβαλλοντικού της ρόλου, της δυνατότητας μείωσης της χρήσης συνθετικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων, καθώς και της ενίσχυσης της γονιμότητας του εδάφους και της μικροβιολογικής του ποικιλότητας [84].

1.8. Εκχύλιση

Η εκχύλιση είναι μία διεργασία που χρησιμοποιείται αιώνες τώρα για την ανάκτηση ουσιών από υγρές ή στερεές ουσίες με χρήση υγρών διαλυτών. Η μέθοδος αυτή παρά την ευρεία εφαρμογή της σε πληθώρα βιομηχανιών, αντιμετωπίζει σήμερα αυξημένες προκλήσεις όπως το ενεργειακό κόστος, τον κίνδυνο της διεργασίας, το περιβαλλοντικό της αποτύπωμα και τα νομοθετικά όρια ρύπανσης. Αναδύεται, έτσι, η ανάγκη για πιο βιώσιμες μεθόδους εκχύλισης που θα ανταποκριθούν σε αυτές τις προκλήσεις. Νέες μέθοδοι εκχύλισης χρησιμοποιούνται πλέον, όπως η υποβοηθούμενη

1. Εισαγωγή

εκχύλιση από μικροκύματα, η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση, η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό και η υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση, για τη βελτίωση της ποσότητας και της ποιότητας των βιοδραστικών ενώσεων που εκχυλίζονται. Εντούτοις, οι βέλτιστες τεχνικές εκχύλισης συνήθως αποφεύγουν τις χημικές ή φυσικές επεμβάσεις επειδή προκαλούν διαταραχή του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο οδηγεί στην απώλεια βιοδραστικών ενώσεων [90]. Η μείωση του χρόνου εκχύλισης και κατανάλωσης οργανικών διαλυτών, η εξοικονόμηση ενέργειας και κόστους και η αύξηση της αποδοτικότητας είναι οι κύριες προϋποθέσεις για την αντικατάσταση των συμβατικών μεθόδων με νέες. Η μέθοδος της εκχύλισης είναι αρκετά ευαίσθητη στη μεταβολή των παραμέτρων, όπως ο τύπος του διαλύτη, η αναλογία φάσεων, η θερμοκρασία, ο χρόνος επαφής και η επιλεγμένη μέθοδος εκχύλισης. Μια διαφοροποίηση αυτών μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές διακυμάνσεις στα εκχυλίσματα και κατά συνέπεια στα αποτελέσματα των αναλύσεων [74, 80].

1.8.1. Συμβατική Εκχύλιση

Η διαβροχή ή αλλιώς διάλυση (maceration) και η διήθηση (percolation) αποτελούν συμβατικές μεθόδους εκχύλισης που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από βιομάζα φυκιών. Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την εμβάπτιση των φυκιών σε διαλύτη, συνήθως σε υγρό όπως νερό, αιθανόλη ή μίγμα οργανικών διαλυτών, για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, ασκώντας μηχανική δύναμη (ανάδευση). Κατά τη διάρκεια αυτής της εμβάπτισης, ο διαλύτης αλληλοεπιδρά με τα φύκια, διαλύοντας και εξάγοντας διάφορες ενώσεις στόχους. Η διαδικασία της διαβροχής είναι σχετικά απλή και απαιτεί ελάχιστο εξοπλισμό, καθιστώντας την προσιτή και οικονομικά αποδοτική. Συνηθίζεται να χρησιμοποιείται για εξαγωγές μικρής κλίμακας σε εργαστηριακά περιβάλλοντα. Ένα κύριο πλεονέκτημα αυτή της μεθόδου είναι η ευελιξία της, δηλαδή η δυνατότητα που έχει να εφαρμόζεται σε ένα ευρύ φάσμα ειδών φυκιών και βιοδραστικών ενώσεων, επιτρέποντας στους ερευνητές να εξάγουν διάφορες κατηγορίες ενώσεων όπως πολυσακχαρίτες, πολυφαινόλες και χρωστικές. Επιπλέον, η χρήση ποικίλων διαλυτών επιτρέπει την προσαρμογή της μεθόδου βάσει της διαλυτότητας της ένωσης στόχου και των ειδικών απαιτήσεων. Εντούτοις, η μέθοδος της διαβροχής του φύκου για την μεταφορά των ουσιών στόχος παρουσιάζει επίσης και κάποια μειονεκτήματα. Αποτελεί μια χρονοβόρα διαδικασία που απαιτεί παρατεταμένη εμβάπτιση, το οποίο μπορεί να οδηγήσει πιθανώς στην αποικοδόμηση θερμοευαίσθητων ενώσεων. Η αποδοτικότητα της εκχύλισης μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως η αναλογία διαλύτη προς στερεή μάζα φυκιών, η θερμοκρασία και η ανάδευση. Επιπλέον, λόγω της σχετικά χαμηλής απόδοσης και της χρονοβόρας φύσης της είναι δύσκολο να αναχθεί σε βιομηχανικής κλίμακας εφαρμογές εκχύλισης [91]. Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί ιστορικά σε έναν μεγάλο βαθμό για την απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων από φύκια, αλλά συχνά συνοδεύονται από εγγενείς περιορισμούς και περιβαλλοντικές ανησυχίες.

1.8.2. Εκχύλιση με Υπερήχους

Οι υπέρηχοι αποτελούν μια βασική τεχνολογία για την επίτευξη του στόχου της βιώσιμης «πράσινης» χημείας και εκχύλισης. Η μηχανική επίδραση των υπερήχων παρέχει μεγαλύτερη διείσδυση του διαλύτη στα κυτταρικά υλικά, μέσω φαινομένων σπηλαιώσης, βελτιώνοντας την απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου στο μέσο, λόγω των υψηλών δυνάμεων διάτμησης που δημιουργούνται σε αυτό. Πράγματι,

1. Εισαγωγή

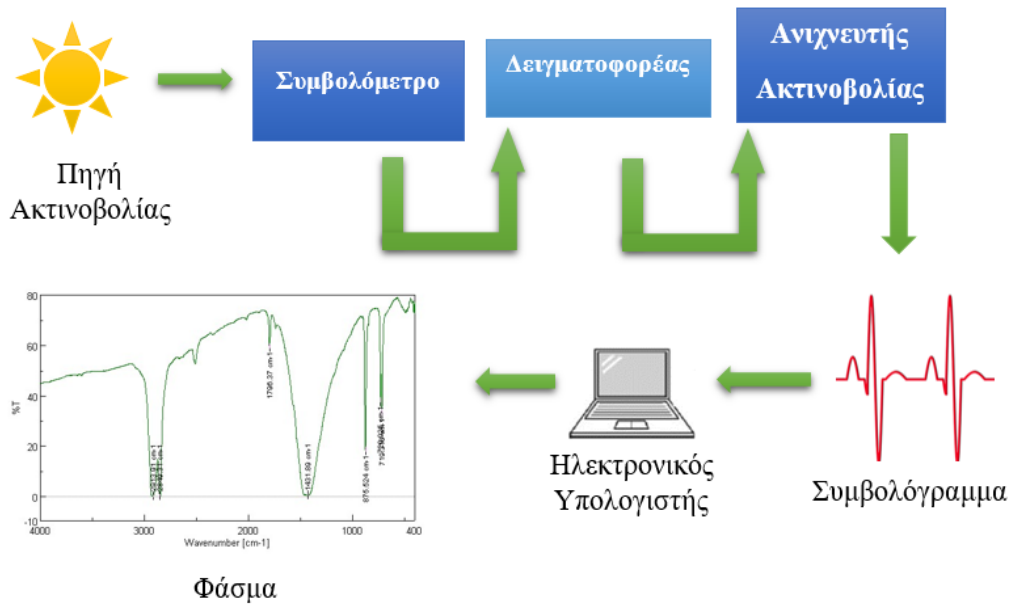
το φαινόμενο αυτό που παράγεται με τη χρήση υπερήχων είναι γνωστό ότι προκαλεί φυσικά φαινόμενα όπως ρεύματα κυκλοφορίας του υγρού και αναταράξεις, τα οποία αυξάνουν τους ρυθμούς μεταφοράς μάζας και διευκολύνουν την πρόσβαση του διαλύτη στο κυτταρικό περιεχόμενο. Από την άλλη πλευρά, η σπηλαίωση και η κατάρρευση φυσαλίδων μπορεί να οδηγήσει σε πρήξιμο των κυττάρων ή σε διάλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων, αυξάνοντας έτσι τους ρυθμούς διάχυσης διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος στην πρώτη περίπτωση ή σε απλή απομάκρυνση του κυτταρικού περιεχομένου στη δεύτερη. Με τη χρήση υπερήχων, μεγάλης διάρκειας εκχυλίσσεις μπορούν πλέον να ολοκληρωθούν σε λίγα μόνο λεπτά με υψηλή αναπαραγωγιμότητα, μειώνοντας την κατανάλωση διαλύτη και την απαιτούμενη θερμότητα, απλοποιώντας τους χειρισμούς και την επεξεργασία, παρέχοντας υψηλότερη καθαρότητα του τελικού προϊόντος, εξαλείφοντας την επεξεργασία των λυμάτων και καταναλώνοντας μόνο ένα κλάσμα της ορυκτής ενέργειας που απαιτείται συνήθως για μια συμβατική μέθοδο εκχύλισης. Επιπλέον, μειώνει το κίνδυνο θερμικής αποικοδόμησης, καθιστώντας την κατάλληλη για ευαίσθητες ουσίες [92, 93]. Η χρήση τεχνολογιών που μειώνουν τη χρήση οργανικών διαλυτών, το χρόνο και την απαιτούμενη θερμότητα προσφέρουν μια περιβαλλοντικά συνειδητή και πιο βιώσιμη προσέγγιση. Αυτή η προσέγγιση ευθυγραμμίζεται με την αυξανόμενη ζήτηση για φιλικότερες προς το περιβάλλον τεχνολογίες που ελαχιστοποιούν τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις και ενισχύουν τη βιωσιμότητα της βιομηχανίας λιπασμάτων [91].

1.9. Τεχνικές Ανάλυσης Μικρο-Σωματιδίων

1.9.1. Φασματομετρία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τον προσδιορισμό των λειτουργικών ομάδων σε ένα δείγμα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα και με υψηλή ακρίβεια, καθώς και των πιθανών μοριακών δεσμών μεταξύ των χημικών ενώσεων που το αποτελούν [94, 95]. Ειδικότερα, διερευνά το βασικό θερμικό φάσμα των υλικών, το οποίο οφείλεται κυρίως στις ταλαντώσεις και τις συνοδευτικές περιστροφικές ζώνες απορρόφησης των μορίων. Η ταυτοποίηση των μορίων που αποτελούν ένα υλικό γίνεται μέσα από την ταυτοποίηση των ζωνών, δεδομένου ότι οι ζώνες απορρόφησης συνδέονται με τις ταλαντώσεις συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων εντός του μορίου [95]. Γενικά, η φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας εφαρμόζεται σε ένα ευρύ φάσμα υλικών και συνθηκών, επιτρέποντας ποιοτική ανάλυση. Πρόσφατα, η τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) έχει προσελκύσει αυξημένο ενδιαφέρον για χαρακτηρισμό, λόγω της πρόσβασής της στις ταλαντώσεις επιφανειακών μορίων, σε αντίθεση με το όγκο του υλικού [94].

1. Εισαγωγή



Σχήμα 6. Διαγραμματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας του και της διάταξης του FTIR.

Το φασματοφωτόμετρο μετασχηματισμού Fourier παρέχει το φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας πολύ ταχύτερα σε σύγκριση με το παραδοσιακό φασματοφωτόμετρο. Το Σχήμα 6 απεικονίζει σχηματικά τα κύρια μέρη ενός απλού φασματοφωτόμετρου FTIR. Το όργανο παράγει μια δέσμη υπέρυθρης ακτινοβολίας που εκπέμπεται από μια πηγή μαύρου σώματος. Στη συνέχεια, η δέσμη διέρχεται από το συμβολόμετρο Μίκελσον όπου πραγματοποιείται η κωδικοποίηση του φάσματος. Η επανένωση των δεσμών με διαφορετικά μήκη διαδρομής στο συμβολόμετρο δημιουργεί μία διάταξη παρεμβολών προσθετικής και αφαιρετικής φύσης, που ονομάζονται συμβολόγραμμα. Η δέσμη εισέρχεται στη συνέχεια στο θάλαμο δειγμάτων και το δείγμα απορροφά συγκεκριμένες συχνότητες ενέργειας, οι οποίες είναι μοναδικά χαρακτηριστικές του κάθε δείγματος και αφαιρούνται από το συμβολόγραμμα. Όταν ένα μόριο εκτίθεται σε υπέρυθρη ακτινοβολία, απορροφά την ενέργεια της ακτινοβολίας που ισούται με την ενέργεια μιας ταλάντωσης του μορίου. Στη συνέχεια, ο ανιχνευτής μετρά το ειδικό σήμα συμβολογράμματος σε ενέργεια ως προς το χρόνο για όλες τις συχνότητες ταυτόχρονα. Ταυτόχρονα, μια δέσμη χρησιμοποιείται για να παρέχει μια αναφορά (απορρόφηση περιβάλλοντος) για τη λειτουργία του οργάνου. Τελικά, το επιθυμητό φάσμα αποκτήθηκε μετά την αυτόματη αφαίρεση του φάσματος του περιβάλλοντος από το φάσμα του δείγματος μέσω λογισμικού μετασχηματισμού Fourier. Το φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας που αποκτάται από το φασματοφωτόμετρο FTIR εντοπίζεται στην περιοχή του μέσου υπέρυθρου, μεταξύ 4000 και 666 cm^{-1} , με μήκος κύματος της τάξης των $2.5 \times 10^{-15} \text{ m}$. Οι ενεργειακές μεταβάσεις που αντιστοιχούν σε αλλαγές της

1. Εισαγωγή

κατάστασης δόνησης για πολλές λειτουργικές ομάδες εντοπίζονται στην περιοχή του μέσου υπέρυθρου ($4000-400\text{ cm}^{-1}$), συνεπώς η εμφάνιση μιας ζώνης απορρόφησης σε αυτήν την περιοχή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ύπαρξης συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων στο μόριο [94, 95]. Παρά το γεγονός ότι η καταγραφή ενός φάσματος σε συνάρτηση με το χρόνο αποτελεί μια μη συμβατική προσέγγιση, ο μετασχηματισμός Fourier επιτρέπει την αποτελεσματική μετατροπή του φάσματος σε σχέση με τον χρόνο, σε ένα φάσμα σε σχέση με τις εκπεμπόμενες συχνότητες, παρέχοντας έτσι ένα φάσμα που είναι άμεσα συγκρίσιμο με τα παραδοσιακά φάσματα υπέρυθρης απορρόφησης. Η φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας, είτε μέσω της κλασικής είτε της τεχνικής μετασχηματισμού Fourier, αποτελεί ένα αποτελεσματικό εργαλείο τόσο για την ποιοτική όσο και για την ποσοτική ανάλυση όλων των τύπων δειγμάτων (αέρια, στερεά, υγρά) οργανικών και ανόργανων υλικών, επιτρέποντας τον προσδιορισμό της ταυτότητας και της καθαρότητας ενός δείγματος. Η ευρεία εφαρμογή των υπέρυθρων φασματοφωτόμετρων, τόσο σε σταθερές όσο και σε φορητές εκδόσεις, υπογραμμίζει τη σημασία τους σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών και βιομηχανικών τομέων. Η ανάλυση των φασμάτων υπέρυθρης απορρόφησης παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη μοριακή σύσταση ενός δείγματος, επιτρέποντας τον προσδιορισμό των παρόντων λειτουργικών ομάδων και την εκτίμηση των σχετικών συγκεντρώσεών τους. Ανάμεσα στα διάφορα είδη υπέρυθρων φασματοφωτόμετρων, τα φασματοφωτόμετρα FTIR κυριαρχούν λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρουν σε όρους ταχύτητας, ευαισθησίας και ευκολίας χρήσης [98].

1.9.2. Σάρωση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου (SEM)

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) είναι πλέον μία από τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ανάλυση της μικροδομής υλικών. Το μικροσκόπιο αυτό χρησιμοποιείται για τη τρισδιάστατη απεικόνιση σύνθετων επιφανειών σε μεγάλο βάθος με υψηλή λεπτομέρεια. Έχει αποκτήσει ευρεία χρήση λόγω της εύκολης λειτουργίας του και των χαμηλών απαιτήσεων προετοιμασίας του δείγματος. Η ανάλυση των επιφανειών γίνεται μέσω μίας δέσμης ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας, σε αντίθεση με τα κοινά οπτικά μικροσκόπια που χρησιμοποιούν φως (φωτόνια). Τα ηλεκτρόνια, λόγω της κυματικής τους φύσης, έχουν την ικανότητα να εστιάζουν σε πολύ μικρότερη επιφάνεια καθώς σαρώνουν το δείγμα. Η διακριτική ικανότητα ενός οπτικού μικροσκοπίου είναι έως και $0.1\text{ }\mu\text{m}$ με επίπεδο μεγέθυσής $\times 1000$, αλλά η ανάγκη για μεγαλύτερα επίπεδα μεγέθυνσης της τάξης $\times 10000$ οδήγησε στην ανακάλυψη των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων σάρωσης. Τα ηλεκτρόνια της δέσμης αλληλοεπιδρούν με τα άτομα του υλικού του δείγματος, με αποτέλεσμα να εκπέμπονται δευτερογενή και οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, καθώς και ακτίνες-X. Τα χαρακτηριστικά της μορφολογίας και της σύστασης της επιφάνειας του υλικού προσδιορίζονται από την ένταση των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων, μέσω ενός ανιχνευτή ηλεκτρονίων. Ένα σύστημα ανίχνευσης ακτίνων X που δημιουργούνται από τη προσπίπτουσα δέσμη ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την ημιποσοτική στοιχειακή ανάλυση της επιφάνειας του προς εξέταση αντικειμένου [96, 97]. Η απεικόνιση της μορφολογίας των σωματιδίων δίνει πληροφορίες τόσο για το μέγεθός τους, όσο και για τα εξωτερικά τους χαρακτηριστικά, κυρίως για το σχήμα, το πορώδες, τη τραχύτητά και τις πιθανές συσσωματώσεις. Το περιβάλλον της μέτρησης ενός οργάνου SEM πρέπει να βρίσκεται υπό κενό για να μπορεί να παραχθεί και διατηρηθεί σταθερή η

1. Εισαγωγή

ακτίνα των ηλεκτρονίων, αλλιώς τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται από αυτόν.

1.9.3. Τεχνική Σκέδασης Φωτός (Microtrack)

Η τεχνική της σκέδασης του φωτός (Microtrack) αποτελεί μια από τις σημαντικότερες πειραματικές τεχνικές για το χαρακτηρισμό του μεγέθους και των ιδιοτήτων σωματιδίων σε αραιά διαλύματα. Ο γενικός άξονα που ακολουθεί η μέθοδος είναι πως μία μονοχρωματική ακτινοβολία φωτός αλληλοεπιδρά με την ύλη και το εκπεμπόμενο σήμα ανιχνεύεται από κατάλληλο ανιχνευτή. Μέσα σε ένα διάλυμα τα σωματίδια κινούνται σύμφωνα με τη κίνηση Brown, η οποία προκαλείται από τα μόρια του διαλύτη που κινούνται λόγω της θερμικής τους ενέργειας. Το φως, ως μια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που αποτελείται από ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό πεδίο, τα οποία είναι κάθετα μεταξύ τους. Όταν μια δέσμη φωτός προσπέσει σε ένα υλικό, τα ηλεκτρόνια του υλικού αλληλεπιδρούν με το φως, διεγείρονται και γίνονται δευτερογενείς πηγές ακτινοβολίας, επανεκπέμποντας την απορροφούμενη ενέργεια προς όλες τις κατευθύνσεις με το ίδιο ακριβώς μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, το μέγεθος και το σχήμα των κέντρων σκέδασης, τις οπτικές ιδιότητες των σκεδαστών και τη γωνία παρατήρησης. Αν εφαρμοστεί στο διάλυμα μία φωτεινή ακτινοβολία, αυτή διασκορπίζεται προς όλες τις κατευθύνσεις, η ένταση του διασκορπισμένου στο διάλυμα φωτός μεταβάλλεται με ένα ρυθμό που εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων. Τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια κινούνται ταχύτερα από τα μόρια του διαλύτη. Έτσι, με βάση την κατανομή της έντασης του φωτός, που εξαρτάται από την κίνηση Brown των σωματιδίων, μπορεί να υπολογιστεί το μέγεθος των σωματιδίων. Η σχέση Stokes – Einstein, περιγράφει σε μαθηματικό μοντέλο αυτή τη συσχέτιση με βάση τον συντελεστή διάχυσης που συνδέεται με την κίνηση Brown των σωματιδίων σε συγκεκριμένο διαλύτη. Βέβαια, ο συντελεστής διάχυσης εξαρτάται τόσο από το μέγεθος, όσο και από τη δομή της επιφάνειας και τη συγκέντρωση ιόντων στο διάλυμα. Ο τρόπος παρασκευής των διαλυμάτων αλλά και οι συνθήκες διεξαγωγής της μέτρησης, επηρεάζουν τα αποτελέσματα. Η τεχνική της σκέδασης του φωτός είναι μια γρήγορη και απλή μέθοδος, απόλυτη γιατί δε χρειάζεται βαθμονόμηση και μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα διαλύματα με μεγάλο αριθμό σωματιδίων και απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος [98, 99, 100].

1.9.4. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Οι θερμικές αναλυτικές μέθοδοι αποτελούν αναπόσπαστο εργαλείο σε διάφορους πλέον τομείς, διότι πρόκεινται για ακριβείς τεχνικές με μικρές απαιτήσεις σε ποσότητες δείγματος παρέχοντας αξιόπιστα δεδομένα σχετικά με τις θερμικές ιδιότητες των υλικών. Αρχή της μεθόδου της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) είναι η μελέτη της ενδόθερμης ή εξώθερμης συμπεριφοράς των δειγμάτων συνάρτηση της θερμοκρασίας ή του χρόνου σε σχέση με ένα δείγμα αναφοράς. Η πειραματική διάταξη αποτελείται από ένα θάλαμο-φούρνο, όπου τοποθετούνται σε συγκεκριμένες θέσεις το δείγμα προς εξέταση και το δείγμα αναφοράς, μέσα σε ειδικά προ-ζυγισμένα αλουμινένια δισκία. Ο θάλαμος τροφοδοτείται με αδρανές αέριο για να μη λάβουν χώρα οξειδωτικές αντιδράσεις ή επιμολύνσεις. Τα δείγματα προετοιμάζονται προσεκτικά για να μην υπάρξουν επιμολύνσεις ή απορρόφηση υγρασίας, διότι θα επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Ανάλογα με το θερμοκρασιακό πρόγραμμα στο οποίο

1. Εισαγωγή

θα υποβληθεί το δείγμα, λαμβάνονται και διαφορετικές πληροφορίες από τις μεταβολές που υφίσταται. Αποτέλεσμα αυτών των μεταβολών είναι η συλλογή τόσο ποιοτικών πληροφοριών όσο και στην συλλογή ποσοτικών πληροφοριών σχετικά με το υλικό το οποίο εξετάζεται. Οι θερμικές μεταπτώσεις που συχνά παρατηρούνται κατά την θερμική κατεργασία είναι η τήξη, κρυστάλλωση, βρασμός, εξάχνωση, αφυδάτωση, υαλώδεις μεταπτώσεις, πολυμορφισμός και αποικοδόμηση. Οι μεταβολές αυτές παρατηρούνται μέσω ενδόθερμων και εξώθερμων κορυφών καθώς και ισοθερμοκρασιακές καμπύλες

1.10. Τεχνικές Ανάλυσης Εκχυλισμάτων από *Saccharina Latissima*

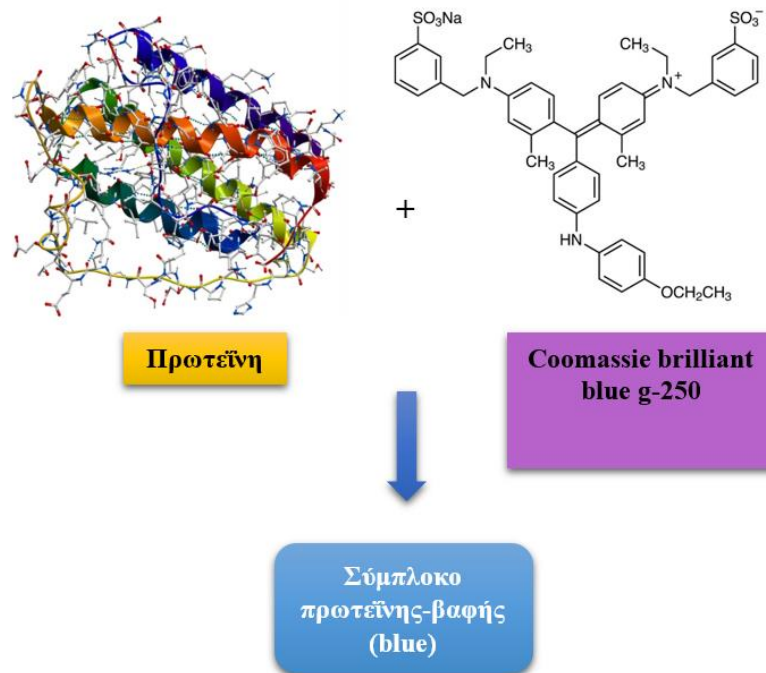
1.10.1. Μέθοδος Bradford – Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνικού Περιεχομένου

Οι πρωτεΐνες συχνά περιέχουν στο μόριό τους αρωματικούς δακτυλίους με αποτέλεσμα να απορροφούν στο φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας μεταξύ μήκος κύματος 200 – 280 nm. Τα φωτόνια με την υψηλότερη ενέργεια έχουν μικρότερο μήκος κύματος και έτσι όσα διεγείρονται στα 280 nm εμφανίζουν μειωμένη ενέργεια. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός πως τα ηλεκτρόνια που απορροφούν σε αυτό το μήκος κύματος εντοπίζονται κυρίως στα αμινοξέα που περιέχουν αρωματικό δακτύλιο, τέτοια είναι η φαινυλαλανίνη, η τρυπτοφάνη, η ιστιδίνη και η τυροσίνη. Επομένως, όσες πρωτεΐνες περιέχουν αμινοξέα με χαμηλό αριθμό δακτυλίων δεν απορροφούν ισχυρά κοντά στα 280 nm. Κάποιοι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση σε αυτή την περιοχή είναι η αλληλεπίδραση με άλλα αμινοξέα, δηλαδή η στερεοδομή της πρωτεΐνης, η πολικότητα του διαλύματος και η ιοντική ισχύς. Ο πεπτιδικός δεσμός είναι ο δεσμός που ενώνει τα αμινοξέα μεταξύ τους και απορροφά σε μήκη κύματος μικρότερα των 210 nm. Σε ένα πρωτεϊνικό μόριο περιέχεται μεγάλο ποσό πεπτιδικών δεσμών οπότε η απορρόφηση αυξάνεται. Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος επηρεάζεται από την απορρόφηση των διπλών δεσμών μεταξύ ανθράκων και μεταξύ οξυγόνου και άνθρακα οδηγώντας σε λανθασμένα αποτελέσματα.

Ο χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων ως προς το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο, ακολουθεί τη μέθοδο Bradford που στηρίζεται στο γεγονός πως η χρωστική ουσία Coomassie Brilliant Blue G 250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα (Σχήμα 7). Το σύμπλοκο ιόν που σχηματίζεται απορροφά χαρακτηριστικά σε μήκος κύματος 595 nm. Η μέθοδος αυτή έχει τα εξής πλεονεκτήματα [101, 102]:

- Χαρακτηρίζεται από απλότητα .
- Η τεχνική είναι γρήγορη, λόγω ταχείας δέσμευσης της πρωτεΐνης από τη βαφή.
- Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και επιτρέπει τον προσδιορισμό έως και 5 μg πρωτεΐνης.
- Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-βαφής παραμένει διασπαρμένο στο διάλυμα για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, περίπου 1 ώρα.
- Οι παράγοντες που επηρεάζουν την μέθοδο είναι λιγότεροι.

1. Εισαγωγή



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης της μεθόδου Bradford.

Ένα σημαντικό μειονέκτημα που φέρει όμως η μέθοδος Bradford συνίσταται στη διαφοροποίηση της απόκρισής σε διαφορετικές πρωτεΐνες. Ωστόσο, για κάθε συγκεκριμένη πρωτεΐνη, μπορεί να παρατηρηθούν πρόσθετες αποκλίσεις λόγω παρεμβολών από μη-πρωτεϊνικά συστατικά. Αυτές οι παρεμβολές μπορούν να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση, υποεκτίμηση της πρωτεΐνης και μείωση του εύρους γραμμικής απόκρισης του δείγματος. Κατά την απουσία παρεμβατικών συστατικών, η μέθοδος Bradford μετράει τη ποσότητα του αρνητικά φορτισμένου τύπου της βαφής σε μήκος κύματος 595 nm σε σύγκριση με ένα λευκό δείγμα (blank). Καθώς η συγκέντρωση του ελεύθερου αρνητικά φορτισμένου ιόντος είναι αμελητέα στο pH 0.77 του αντιδραστηρίου, η απόκριση του υπό εξέταση δείγματος οφείλεται στο αρνητικά φορτισμένο τύπο της βαφής που έχει δεσμευτεί στην πρωτεΐνη. Η απορρόφηση στα 595 nm, αφαιρεθείσα από τη τιμή του blank δείγματος, είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του δεσμευμένου αρνητικά φορτισμένου τύπου της βαφής, υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχει αρκετή περίσσεια ελεύθερου θετικά φορτισμένου ιόντος για να σχηματιστούν περισσότερα αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Υπερεκτίμηση της πρωτεΐνης θα συμβεί όταν κάποια μη-πρωτεϊνική ουσία απορροφά στα 595 nm και αυτή η απορρόφηση δεν αντισταθμίζεται από το blank δείγμα. Οι πρωτεΐνες δεν είναι τα μόνα μόρια που μπορούν να δημιουργήσουν το αρνητικά φορτισμένο είδος της βαφής στο pH του υπό εξέταση δείγματος, αλλά και αρκετές ουσίες (κυρίως φλαβονοειδή) που ευνοούν τη σταθεροποίηση του ουδέτερου είδους της βαφής. Αυτή η σταθεροποίηση οδηγεί έμμεσα σε παρεμβολή [101].

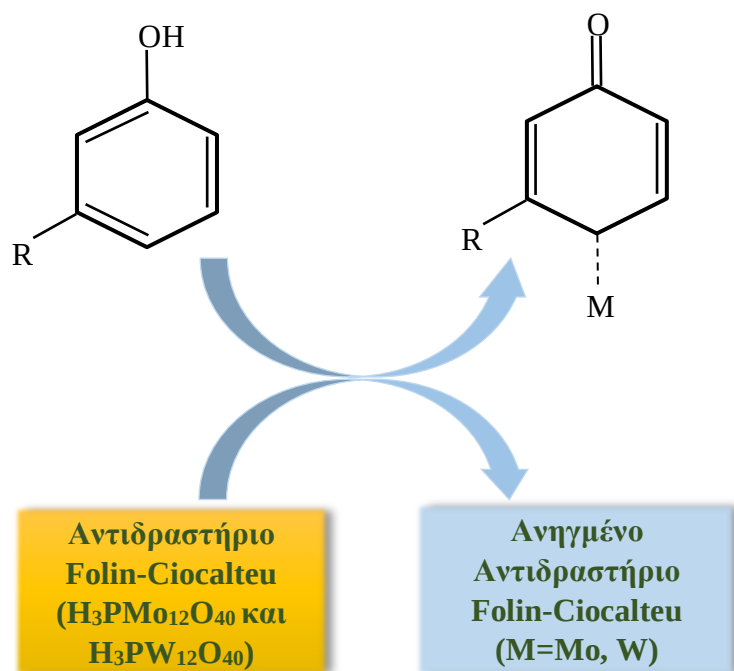
Η μέθοδος Bradford για το προσδιορισμό πρωτεϊνών μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί με εκχυλίσματα που περιέχουν οργανικούς διαλύτες, ωστόσο υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί και ζητήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη:

1. Εισαγωγή

- **Παρεμβολή οργανικών διαλυτών:** Ορισμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν να απορροφήσουν άμεσα φως στα 595 nm (μήκος κύματος μέτρησης) ή να αλληλοεπιδράσουν με τη βαφή, οδηγώντας σε ανακριβείς μετρήσεις.
- **Διαλυτότητα πρωτεϊνών:** Οι οργανικοί διαλύτες μπορούν να επηρεάσουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Εάν η πρωτεΐνη σας καθιζήσει στο διάλυμα δοκιμασίου, δεν θα μετρηθεί με ακρίβεια.
- **Αποπτυξικοποίηση:** Ανάλογα με τον διαλύτη και τη συγκέντρωσή του, μπορεί να αποπτυχξει (ξεδιπλώσει) τις πρωτεΐνες, επηρεάζοντας την ικανότητά τους να δεσμεύσουν τη βαφή.

1.10.2. Μέθοδος Folin-Ciocalteu – Ποσοτικοποίηση Ολικών Φαινολικών Ενώσεων

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu χρησιμοποιείται για τη ποσοτικοποίηση των ολικών φαινολών ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) σε εκχυλίσματα. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφοβολφραμικά ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Συγκεκριμένα το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}), όπως φαίνεται στο Σχήμα 8. Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου σε μήκος κύματος 765 nm και η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων.

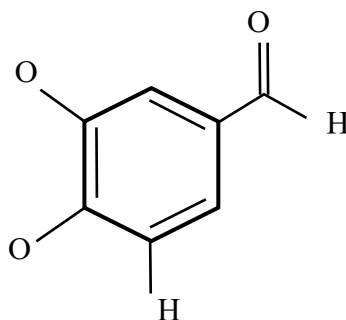


Σχήμα 8. Αναπαράσταση αναγωγή αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu κατά την δέσμευσή του με φαινολικές ουσίες σε αλκαλικό περιβάλλον.

Η ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων αναφέρεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Το γαλλικό οξύ είναι μία φαινολική ένωση, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 9, διαλυτοποιείται ικανοποιητικά τόσο σε νερό, όσο και σε οργανικούς διαλύτες (πχ.

1. Εισαγωγή

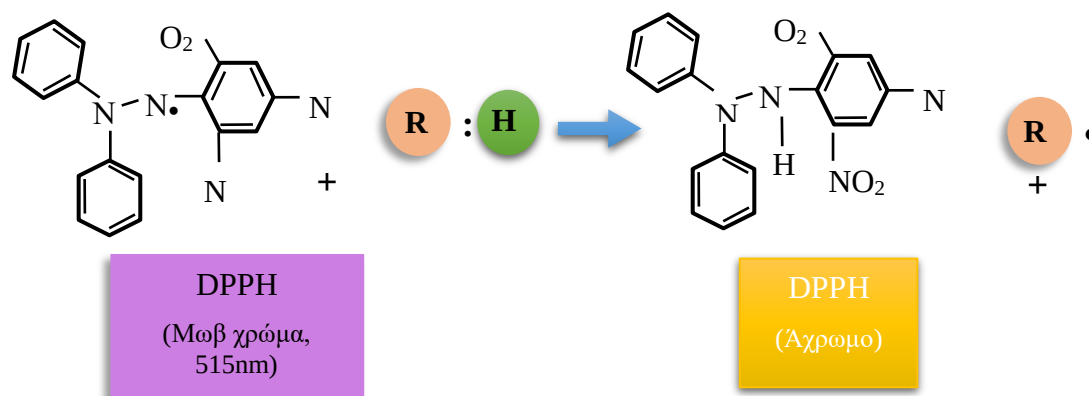
αιαθνόλη και ακετόνη, αλλά παρουσιάζει μειωμένη διαλυτότητα σε άπολους διαλύτες (πχ. αιθέρας κα χλωροφόρμιο) και συναντάται στα φυτά.



Σχήμα 9. Χημική δομή γαλλικού οξέος.

1.10.3. Μέθοδος Trolox – Ποσοτικοποίηση Αντιοξειδωτικής Δράσης

Η μέθοδος με χρήση DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλδραζύλιο) για την μέτρηση της ικανότητας αντιοξειδωτικής δράσης ενός εκχυλίσματος από θαλάσσια φύκια είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών ενώσεων με τη ρίζα (DPPH•) του 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα αυτή έχει χαρακτηριστικό μωβ χρώμα και απορροφά ακτινοβολία σε μήκος κύματος 515 nm. Όταν η ρίζα αυτή έρθει σε επαφή με κάποια ένωση που έχει αντιοξειδωτική δράση, τότε ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζίνη (DPPH:H). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, τη ταυτόχρονη μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 10. Η ένταση και η μεταβολή είναι ανάλογες της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας στο διάλυμα. Συγχρόνως, μειώνεται η απορρόφηση στο μήκος κύματος 515 nm, η οποία προσδιορίζεται φωτομετρικά. Το Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ) αποτελεί ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό, με βάση το οποίο μπορεί να εκφραστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός εκχυλίσματος, όταν αυτό περιέχει ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση. Έτσι, η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μετράται σε ισοδύναμα Trolox (TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Content).



Σχήμα 10. Αναπαράσταση της δέσμευσης ουσιών με αντιοξειδωτική δράση με το DPPH.

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη νέων φιλικών προς το περιβάλλον συστημάτων ενίσχυσης της ανάπτυξης και της προστασίας των καλλιεργειών αξιοποιώντας φυσικές πρώτες ύλες. Αρχικά, μελετάται η ανάπτυξη του συστήματος εγκλεισμού σαλικυλικού οξέος σε μικρο-σωματίδια πολυμερικής μήτρας ζεΐνης και ο σχηματισμός σωματιδίων χιτοζάνης με πολυβινυλική αλκοόλη μέσω της ηλεκτρουδροδυναμικής διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού. Οι παράμετροι της διεργασίας του εγκλεισμού βελτιστοποιήθηκαν, εξετάστηκε η απόδοση της διεργασίας και τα σωματίδια αξιολογήθηκαν για τα χαρακτηριστικά τους επί τον εγκλεισμό, τη μορφολογία τους μέσω της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης, τη θερμική συμπεριφορά τους μέσω Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες μέσω Φασματομετρίας Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier και την ικανότητα τους να απελευθερώνουν ελεγχόμενα την εγκλεισμένη ουσία. Επι πρόσθετα η διπλωματική αυτή εργασία στόχευσε στην ανάκτηση βιοδιεγερτών από το φύκος *Saccharina Latissima* μέσω αποτελεσματικότερων μεθόδων εκχύλισης με αυξημένη απόδοση ανάκτησης στερεών εκχυλισμάτων μετά από ξήρανση υπό κατάψυξη και στην αξιολόγηση των ως προς τις βιοδραστικές ουσίες που περιέχει, όπως τις φαινολικές ουσίες, ουσίες με ικανότητα αντιοξειδωτικής δράσης, χλωροφύλλες, καροτενοειδή, φυκοκυανίνες και πρωτεΐνες.

3. Πειραματικό Μέρος

3.1. Υλικά

3.1.1. Υλικά για την Παραγωγή Εγκλεισμένων Σωματιδίων

Η ζεΐνη, προλαμίνη προερχόμενη από τον αραβόσιτο, με βαθμό Z3625 προμηθευτική από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Μαδρίτη, Ισπανία) και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Από την ίδια εταιρία προμηθεύτηκε και η χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους (50 – 190 kDa), η πολυβινυλική αλκοόλη (PVA) με μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 85.000 - 120.000 g/mol και βαθμό υδρόλυσης 88%, καθώς και η απόλυτη αιθανόλη (EtOH) (καθαρότητας 99,8%) και το οξικό οξύ (καθαρότητας >99,8%). Το σαλικυλικό οξύ (καθαρότητας >99,9%) προμηθεύτηκε από τη Thermo Fisher Scientific (Μασαχουσέτη, ΗΠΑ). Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ήταν αναλυτικής βαθμίδας και το νερό που χρησιμοποιήθηκε είναι απιονισμένο. Τα προαναφερθέντα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

3.1.2. Υλικά για την Ανάλυση των Εγκλεισμένων Σωματιδίων

Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε μέρος των πρώτων υλών, των διαλυτών και των αντιδραστηρίων. Αναλυτικότερα, κατά την ανάλυση της απόδοσης εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη (EtOH) (99,8%) που προμηθεύτηκε από τη Thermo Fisher Scientific (Μασαχουσέτη, ΗΠΑ). Για τη μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης του σαλικυλικού οξέος και το προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου μέσω της μεθόδου περίθλασης (DLS) χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Στις υπόλοιπες αναλύσεις δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιος διαλύτης.

3.1.3. Υλικά για την Εκχύλιση Φυκιών

3.1.3.1. Πρώτη Ύλη

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται το μακρο-φύκος *Saccharina Latissima* ή αλλιώς sugar kelp, το οποίο προμηθεύτηκε από την εταιρεία SINTEF (Νορβηγία) σε μορφή τρίματος, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1. Το φύκος έχει ήδη πλυθεί, για την της απομάκρυνση άμμου, του θαλασσινού νερού και τυχόν στερεών και ανεπιθύμητων ουσιών, και επεξεργαστεί κατάλληλα για την απομάκρυνση του νερού που είναι προσροφημένο. Η διεργασία ξήρανσης έγινε από τον προμηθευτή.

3. Πειραματικό Μέρος



Εικόνα 1. Δείγμα Saccharina Latissima σε μορφή τρίμματος.

3.1.3.2. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και τα τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Μαδρίτη, Ισπανία) και είναι τα εξής:

- Αιθανόλη (EtOH) (absolute και 99,8% καθαρότητας)
- Μεθανόλη (MeOH)
- Ακετόνη
- Οξικός αιθυλεστέρας (Ethyl acetate)

Για την εκχύλιση ακόμα χρησιμοποιήθηκαν μίγματα από τους παραπάνω διαλύτες, ειδικότερα 80/20 EtOH/H₂O και 80/20 H₂O/MeOH. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε είναι απιονισμένο. Τα προαναφερθέντα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

3.1.4. Υλικά για τον Χαρακτηρισμό των Εκχυλισμάτων

Τα αντιδραστήρια αλλά και τα τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Μαδρίτη, Ισπανία) και είναι τα εξής:

- 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλδραζύλιο (DPPH) (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλδραζύλιο)
- Γαλλικό οξύ (98% καθαρότητας) (τριδροξυβενζοϊκό οξύ)
- Βοωειδής Ορός Αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin) (βαθμός λυοφίλισης $\geq 96\%$)
- Έτοιμο αντιδραστήριο Bradford Dye
- Αιθανόλη (EtOH)
- Μεθανόλη (MeOH)
- Οξικός αιθυλεστέρας
- Ακετόνη

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν μίγματα από τους παραπάνω διαλύτες σε αναλογία 80/20 EtOH/H₂O και 80/20 H₂O/MeOH.

Τα παρακάτω αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από τη ThermoFisher Scientific (USA):

- Trolox 97% (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμάν-2-καρβοξυλικό οξύ)

3. Πειραματικό Μέρος

Τα παρακάτω αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από τη Scharlau:

- Αντιδραστήριο φαινολών Folin-Ciocalteu, ($D \cong 1.24 \text{ g/cm}^3$)

Τα παρακάτω αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από την Penta:

- Καυστικό νάτριο (Na_2CO_3)

Και τα παρακάτω αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από τη GPR RECTAPUR:

- Όξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4)
- Άνυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4)

3.2. Όργανα και Συσκευές

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα και το χαρακτηρισμό των παραγμένων προϊόντων παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων - KERN ABS 220
2. Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας - SELECTA MULTIMATIC-5N
3. Συσκευή λουτρού υπερήχων - ULTRASONIC cleaner, model 28H, 2.8L, 105-W power – Ney Dental, Inc., Bloomfield, Connecticut
4. Συσκευή ανάδευσης vortex - VORTEX-GENIE 2
5. Φυγόκεντρος- NÜVE NF 400 Centrifuge
6. Συσκευή ηλεκτροστατικού ψεκασμού - BioInicia FLUIDNATEK LE-10
7. Φωτόμετρο – Spectrophotometer 211 UV-M51, Bel Photonics
8. Συσκευή εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα - XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture Co., Ltd., Nanjing, China)
9. Διάταξη ξήρανσης με κατάψυξη – (BK-FD10S, BioBase, China)
10. Συσκευή μέτρησης επιφανειακής τάσης - Sigma 702 Standalone tensiometer (Biolin Scientific, Gothenburg, Sweden) by Du Noüy ring
11. Συσκευή μέτρησης ηλεκτρικής αγωγιμότητας - Mi 180 Bench
12. Συσκευή Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης - PERKIN ELMER DSC 6
13. Φασματόμετρο Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier - FT/IR-4200 & ATR PRO-410-S, JASCO International Co.
14. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με φασματόμετρο ενεργειακής διασποράς ακτινών X - Sem Quanta 200 FE
15. Συσκευή επιχρύσωσης - SC7620 Mini Sputter Coater/ Glow Discharge System
16. Συσκευή περίθλασης - Microtrac S3000/S3500 Series Light Scattering Particle Size Analyzer & Microtrac FLEX software
17. Αυτόματες πιπέτες των 100 μL – 1000 μL και 1 mL – 5 mL
18. Διάταξη εξάτμισης υπό κενό – Buchi V-800 Vacuum Controller, Buchi Rotavapor R-200

Άλλες συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν είναι η διάταξη για διήθηση υπό κενό, ψυγείο και κατάψυξη θερμοκρασίας -68°C .

3. Πειραματικό Μέρος



Εικόνα 2. Φωτόμετρο – Spectrophotometer 211 UV-M51, Bel Photonics

3.3. Μέθοδοι

3.3.1. Προετοιμασία Διαλυμάτων για Εγκλεισμό

3.3.1.1. Διαλύματα Ζεΐνης

Αρχικά, για το διάλυμα της μήτρας ζυγίζεται ποσότητας ζεΐνης σε αναλυτικό ζυγό, ώστε να έχει σταθερή περιεκτικότητα στα 10% (w/v), ενώ η ποσότητα του σαλικυλικού οξέος μεταβάλλεται. Διάφορα ποσοστά εγκλεισμένης ποσότητας (ποσοστό φόρτωσης, %DL) βιοδραστικής ουσίας ερευνώνται, ειδικότερα 10%, 20%, 30% και 40% σαλικυλικού οξέος και διαφορετικές αναλογίες διαλυτών όπως παρουσιάζονται στο Πίνακα 1. Ως περιεκτικότητα βιοδραστικής ουσίας (ποσοστό φόρτωσης) ορίζεται ο λόγος της μάζας της ποσότητας βιοδραστικής ουσίας που θα εγκλειστεί (σαλικυλικό οξύ) προς την μάζα της ποσότητας της μήτρας που χρησιμοποιείται (ζεΐνη). Ταυτόχρονα, παρασκευάζονται και τα blank διαλύματα που περιέχουν μόνο την μήτρα.

Για την παραγωγή σωματιδίων ζεΐνης με ή χωρίς εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού ακολουθείται η παρακάτω πειραματική πορεία:

1. Για την παρασκευή των διαλυμάτων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 ακολουθείται η δοθείσα αναλογία για τελικό όγκο 10 mL. Για παράδειγμα για την παρασκευή του Μίγματος 1 με αναλογία διαλυτών 90/10 EtOH/H₂O χρησιμοποιούνται 9 mL EtOH και 1 mL H₂O. Το ποσοστό φόρτωσης (%DL) καθορίζεται σε σχέση με την ποσότητα της μήτρας που χρησιμοποιείται, η οποία είναι πάντα σταθερά στο 1g. Για ποσοστό φόρτωσης 10%, ζυγίζονται 0.1 g σαλικυλικού οξέος και διαλυτοποιούνται στο μίγμα διαλυτών και έπειτα διαλυτοποιείται η ζεΐνη. Η σειρά αυτή διαλυτοποίησης ακολουθείται ώστε να μπορέσει όλη η ποσότητα του SA να διαλυτοποιηθεί με ευκολία. Τα παρασκευασμένα διαλύματα αποθηκεύονται σε γυάλινο φιαλίδιο (vial) των 25 mL, ασφαλίζονται με ειδική ταινία parafilm και μπορούν να συντηρηθούν σε ψυγείο στους 4 °C για λίγες ημέρες. Συνιστάται η χρήση τους να γίνεται την ίδια ημέρα που παρασκευάζονται για να μην υπάρξει αλλοίωση λόγω πτητικών διαλυτών. Η ίδια πορεία ακολουθείται και για τις υπόλοιπες αναλογίες διαλυτών.
2. Για υψηλότερα ποσοστά φόρτωσης 20, 30 και 40% ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και διαλυτοποιείται στο μίγμα διαλυτών 0.2, 0.3 και 0.4 g σαλικυλικού οξέος αντίστοιχα.
3. Τα λευκά, ή αλλιώς κενά (blank) διαλύματα παρασκευάζονται με τον ίδιο τρόπο αλλά δεν περιέχουν διαλυμένο σαλικυλικό οξύ και χρησιμοποιούνται ως υλικά αναφοράς.

3. Πειραματικό Μέρος

- Μετά την παρασκευή τους κάθε διαλύματος από τον Πίνακα 1, τοποθετείται εντός του γυάλινο φιαλίδιο (vial) μαγνήτης και τα διαλύματα αναδεύονται σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα στους 40 °C σε χαμηλές στροφές για δύο ώρες. Έπειτα όλα τα διαλύματα αφήνονται μέσα σε λουτρό υπερήχων 105 W και 28 Hz για έξι λεπτά.
- Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος τα διαλύματα ελέγχονται οπτικά για την αποτελεσματική διαλυτοποίηση των στερεών υλικών έως ότου να μην υπάρχουν διασπαρμένοι κόκκοι.

Πίνακας 1. Διαλύματα ζεΐνης και σαλικυλικού οξέος για την βελτιστοποίηση του ηλεκτρομεκασμού.

Μίγμα	Διαλύτες	Αναλογία Ανάμιξης (% v/v)	Ποσοστό Φόρτωσης (%DL)
1	EtOH/ H ₂ O	90/10	DL=10%
2	AcOH/H ₂ O	90/10	DL=10%
3	EtOH/AcOH	75/25	DL=10%
4	EtOH/AcOH	75/25	DL=20%(30%, 40%)
5	EtOH/AcOH	65/35	DL=10%
6	EtOH/AcOH	90/10	DL=10%
7	EtOH/AcOH	65/35	blank (1 g zein)
8	EtOH/AcOH	75/25	blank (1 g zein)
9	EtOH/AcOH	90/10	blank (1 g zein)
10	EtOH/ H ₂ O	90/10	blank (1 g zein)
11	AcOH/ H ₂ O	90/10	blank (1 g zein)

Για την εύρεση του κατάλληλου διαλύματος προς εγκλεισμό γίνονται διάφορες δοκιμές με διαφορετική αναλογία διαλυτών και πρώτων υλών, όπως φαίνεται και στο Πίνακα 1, παρασκευάζονται διαλύματα με βάση την αιθανόλη, το οξικό οξύ και το νερό. Κάθε διάλυμα εξετάστηκε ως προς την επιφανειακή τάση και την ηλεκτρική αγωγιμότητά του, αλλά και με βάση την οπτική του μορφή.

3.3.1.2. Διαλύματα Χιτοζάνης

Τα σωματίδια της χιτοζάνης που θα παραχθούν δεν περιέχουν εγκλεισμένη κάποια ουσία, οπότε παρασκευάζεται μόνο το διάλυμα της μήτρας. Το διάλυμα της μήτρας περιέχει χιτοζάνη, πολυβινυλική αλκοόλη, απιονισμένο νερό και οξικό οξύ σε κατάλληλες αναλογίες. Για να εντοπιστεί το κατάλληλο μίγμα διαλυτών εκτελείται μια σειρά από πειράματα και μέσω οπτικής αξιολόγησης επιλέγεται το βέλτιστο. Παρακάτω περιγράφεται η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε:

- Για την παρασκευή των διαλυμάτων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 ακολουθείται η δοθείσα αναλογία για τελικό όγκο 10 mL. Για παράδειγμα για τη παρασκευή του Μίγματος 1 με αναλογία διαλυτών 95/5 H₂O/AcOH χρησιμοποιούνται 9.5 mL H₂O και 0.5 mL AcOH. Η συγκέντρωση της χιτοζάνης είναι 3% w/v, δηλαδή στα 10 mL διαλύματος η μάζα της χιτοζάνης είναι 0.3 g.
- Αφού ζυγιστούν σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων οι στερεές ουσίες και ογκομετρηθούν οι διαλύτες τότε αναμιγνύονται σε γυάλινο φιαλίδιο, αναδεύονται μηχανικά μέσω μαγνητικού αναδευτήρα σε χαμηλές

3. Πειραματικό Μέρος

στροφές σε θερμοκρασία 40 °C για κάποιες ώρες και τέλος διηθούνται μέσω φίλτρου πορώδους 0.45 μm ώστε να απομακρυνθούν τυχόν μη διαλυμένα μέρη. Η ογκομέτρηση των διαλυτών επιτυγχάνεται με σιφώνια πλήρωσης των 5 και 10 mL που είναι υψηλής ακρίβειας.

3. Τα παρασκευασμένα διαλύματα αποθηκεύονται σε γυάλινο φιαλίδιο (vial) των 25 mL, ασφαλίζονται με ειδική ταινία parafilm και μπορούν να συντηρηθούν σε ψυγείο στους 4 °C για λίγες ημέρες. Συνιστάται η χρήση τους να γίνεται την ίδια ημέρα που παρασκευάζονται για να μην υπάρξει αλλοίωση λόγω πτητικών διαλυτών. Η ίδια πορεία ακολουθείται και για τις υπόλοιπες αναλογίες διαλυτών και συστατικών.

Πίνακας 2. Διαλύματα χιτοζάνης και πολυβινυλικής αλκοόλης για τη βελτιστοποίηση του ηλεκτροψεκασμού.

Μίγμα	Διαλύτες	Αναλογία Ανάμιξης (% v/v)	Συγκέντρωση Χιτοζάνης (%)	Συγκέντρωση Πολυβινυλικής Αλκοόλης (%)
1	H ₂ O/AcOH	95/5	3.00	-
2	H ₂ O/AcOH	95/5	2.00	-
3	H ₂ O/AcOH	95/5	0.10	-
4	H ₂ O/AcOH	99/1	0.20	-
5	H ₂ O/AcOH	99/1	0.01	-
6	H ₂ O/AcOH	70/30	3.50	3.50
7	H ₂ O/AcOH	50/50	0.50	0.50
8	H ₂ O/AcOH	50/50	0.25	0.75
9	H ₂ O/AcOH	70/30	0.25	0.75

Μέσω προκαταρτικών ελέγχων που έγιναν για τη διαλυτοποίηση της χιτοζάνης σε μίγματα οργανικών διαλυτών παρατηρήθηκε πως σε διαλύματα που περιέχουν οξικό οξύ και αιθανόλη για διάφορες αναλογίες (70/30, 50/50) δεν είναι δυνατή η διαλυτοποίηση. Ενώ αν το διάλυμα περιέχει οξικό οξύ και νερό τότε είναι δυνατόν να διαλυθεί.

3.3.2. Χαρακτηρισμός Διαλυμάτων Ζείνης – Σαλικυλικού Οξέος

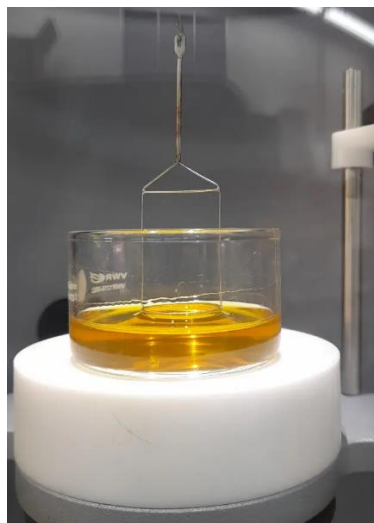
Πριν από τη διεξαγωγή της διαδικασίας ηλεκτροψεκασμού, προηγήθηκε λεπτομερής χαρακτηρισμός των διαλυμάτων με μήτρα την ζεΐνη ως προς την επιφανειακή τάση και την ηλεκτρική αγωγιμότητα. Ο σκοπός του χαρακτηρισμού είναι να βρεθεί μια συσχέτιση μεταξύ του διαλυτότητας της ζεΐνης και του σαλικυλικού οξέος και των φυσικών ιδιοτήτων τους. Η επιφανειακή τάση των υγρών διαλυμάτων προσδιορίζεται μέσω ειδικού οργάνου που προσδιορίζει την κάθετη δύναμη σε οποιοδήποτε τμήμα της επιφάνειας του υγρού και σε σχέση με το μήκος του (Sigma Force Tensiometer 702ET, Biolin Scientific, Finland). Η διεπιφανειακή ένταση ποσοτικοποιείται ως δύναμη ανά μονάδα μήκους, ισοδύναμη με την ενέργεια ανά μονάδα επιφάνειας υγρού. Ο προσδιορισμός γίνεται με τον δακτύλιο Du Noüy που εμβαπτίζεται πρώτα στο διάλυμα και έπειτα εκτιμά τη διεπιφανειακή τάση. Ο δακτύλιος είναι κατασκευασμένος από λεπτό σύρμα πλατίνας με διαμέτρου 9.545 mm και τοποθετείται σε συγκολλημένο άγκιστρο, κατασκευασμένο από σύρμα πλατίνας. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται ο δακτύλιος που ακουμπά στην επιφάνεια του διαλύματος, αφού έχει εμβαπτιστεί στο

3. Πειραματικό Μέρος

υγρό για να προσδιοριστεί η επιφανειακή του τάση. Το επί προσδιορισμό διάλυμα πρώτα εισάγεται σε ειδικό γυάλινο φορέα συγκεκριμένων διαστάσεων και έπειτα μεταφέρεται στην ειδική πλατφόρμα προς μέτρηση. Πρώτα η πλατφόρμα ανυψώνεται ώστε να διαβραχεί ο δακτύλιος και έπειτα γίνεται έναρξη της μέτρησης μέσα από το λογισμικό. Ο δακτύλιος, μετά την έναρξης της μέτρησης, εμβαπτίζεται μέχρι ενός σημείου στο διάλυμα και ανυψώνεται με σκοπό να ανιχνευτεί η επιφάνεια. Αφού βρεθεί η επιφάνεια, εκτελούνται 10 μετρήσεις. Για να μπορέσει να γίνει η μέτρηση θα πρέπει πρώτα να εισαχθεί στο λογισμικό, κατά προσέγγιση, το ιξώδες, το μοριακό βάρος και η πυκνότητα. Μετά την ολοκλήρωση της μέτρησης, ο δακτύλιος ξεπλένεται και αιθανόλη και καίγεται σε φλόγα ώστε να μην απομείνουν υπολείμματα από τα διαλύματα.

Για τη μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας χρησιμοποιήθηκε το επιτραπέζιο αγωγιμόμετρο Mi 180 Bench Mi 180 Bench (Milwaukee Instruments, Inc.m Rocky Mount, USA). Τα διαλύματα εισάγονται σε ειδικό γυάλινο φιαλίδιο ώστε να διαβρέχεται μέχρι ένα συγκεκριμένο σημείο το αγωγιμόμετρο. Μετά από κάθε μέτρηση ξεπλένεται με αιθανόλη, πρώτα, και έπειτα με νερό ώστε να μην μείνουν υπολείμματα που θα παρεμβάλουν την επόμενη μέτρηση. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλά δείγματα υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας στους 25 °C. Οι πειραματικά προσδιορισμένες τιμές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και της επιφανειακής τάσης των διαλυμάτων δίνονται στον Πίνακα 1 στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

.



Εικόνα 3. Πειραματική αναπαράσταση μέτρησης επιφανειακής τάσης σε διάλυμα που περιέχει ζεΐνη.

3.3.3. Εγκλεισμός μέσω Ηλεκτροψεκασμού

Για τον εγκλεισμό μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού (Εικόνα 4) για τα διαφορετικά διαλύματα που παράχθηκαν ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική πορεία. Αφού επιλεγθεί το καταλληλότερο διάλυμα για την διεργασία του εγκλεισμού κατά την παραγωγή στερεών σωματιδίων, τότε:

3. Πειραματικό Μέρος

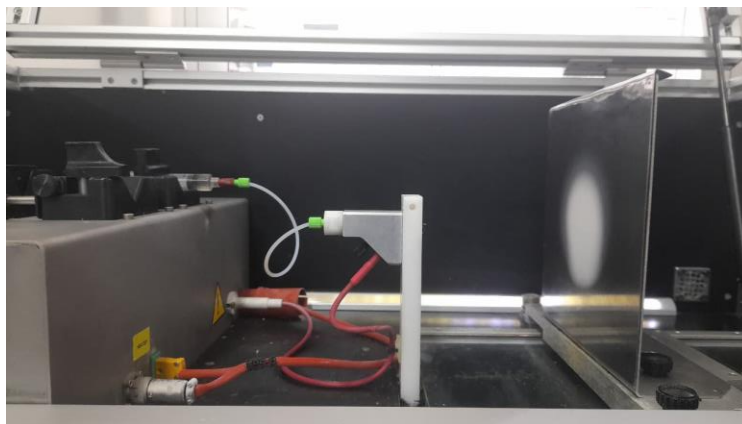
1. Σε μία σύριγγα των 10 mL αντλείται μέρος από το παρασκευασμένο διάλυμα για ηλεκτροστατικό ψεκασμό (Εικόνα 5), τοποθετείται οριζόντια στη θέση πρόσδεσης και συναρμολογείται η απαιτούμενη διάταξη αξονικής ροής.
2. Η ροή της σύριγγας και κατά συνέπεια η ροή στη μύτη της βελόνας ελέγχεται ψηφιακά με κατάλληλη ρύθμιση στη συσκευή.
3. Η άνοδος συνδέεται με τη βελόνα που είναι κατασκευασμένη από ανοξείδωτο ατσάλι και έχει εσωτερική διάμετρο 0.9 mm, τοποθετώντας το πόλο στη κατάλληλη οπή. Η σχετική θέση της βελόνας σε σχέση με το δίσκο συλλογής είναι κατακόρυφα.
4. Η εφαρμοζόμενη ηλεκτρική τάση ρυθμίζεται ψηφιακά με τη κατάλληλη ρύθμιση στην συσκευή.
5. Η σύριγγα με τη βελόνα συνδέονται μέσω πλαστικού σωλήνα εσωτερικής διαμέτρου 14.2 mm κατασκευασμένο από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE).
6. Ρυθμίζεται χειροκίνητα η απόσταση που θα έχει ο δίσκος συλλογής από τη μύτη της βελόνας.
7. Σημειώνεται ο όγκος φόρτωσης της σύριγγας, ο όγκος της σύριγγας αφού επέλθει σταθερή ροή και ο χρόνος που αρχίζει ο ηλεκτροψεκασμός με σταθερή ροή.
8. Μετά το τέλος του ηλεκτροψεκασμού, τα σωματίδια συλλέγονται από το δίσκο μέσω σπάτουλας και συλλέγονται σε προζυγισμένο πλαστικό σωληνάριο (Falcon), το οποίο ζυγίζεται και έπειτα σφραγίζεται με parafilm και αποθηκεύεται στο ψυγείο.
9. Σημειώνεται ο όγκος που περιέχει η σύριγγα μετά το τέλος του πειράματος και ο χρόνος λήξης, ώστε να υπολογισθεί ο όγκος που καταναλώθηκε.



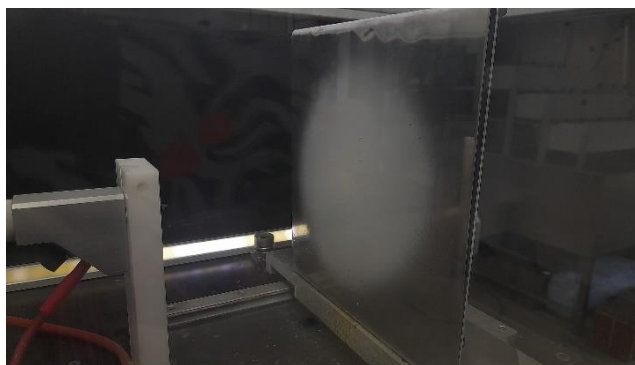
Εικόνα 4. Συσκευή electrospinning/electrospraying - BioInicia FLUIDNATEK LE-10.

Οι παράμετροι που μπορούν να μεταβληθούν με σκοπό τη βέλτιστη πειραματική λειτουργία είναι η ροή του υγρού, η απόσταση της βελόνας από το δίσκο συλλογής. Ως βέλτιστη πειραματική λειτουργία θεωρείται η σταθερή ροή του ηλεκτροψεκασμού στον κώνο Taylor και η έλλειψη σταγονιδίων στον δίσκο συλλογής. Οι δοκιμές σχετικά με την βελτιστοποίηση των παραμέτρων της μεθόδου εγκλεισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 11 και 12 στην ενότητα των αποτελεσμάτων. Στις Εικόνες 5 και 6 αναπαρίσταται η πειραματική διάταξη της διαδικασίας παραγωγής σωματιδίων μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού και η όψη των σωματιδίων που συλλέγονται στο δίσκο συλλογής, αντίστοιχα.

3. Πειραματικό Μέρος



Εικόνα 5. Πειραματική διάταξη παραγωγής σωματιδίων μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού.



Εικόνα 6. Παραγωγή σωματιδίων μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού.

3.3.4. Απόδοση Ηλεκτρουδροδυναμικής Διεργασίας

Ως απόδοση της ηλεκτρουδροδυναμικής της διεργασίας (production yield) ονομάζεται η παράμετρος που εκτιμά την ανάκτηση στερεών σωματιδίων από τη διεργασία και κατά συνέπεια την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Ο ορισμός της είναι ο λόγος της μάζας στερεών σωματιδίων που συλλέχθηκαν προς την ολική μάζα στερεών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν και δίνεται σύμφωνα με τη παρακάτω σχέση:

$$\%A = \frac{\text{μάζα μικροσωματιδίων ηλεκτροψεκασμού [g]}}{\text{ολική μάζα στερεών που χρησιμοποιήθηκαν στον ηλεκτροψεκασμό [g]}} \times 100\% \quad (1)$$

Η ολική μάζα των στερεών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του ηλεκτροψεκασμού υπολογίζεται με βάση τον όγκο που καταναλώθηκε αφού έχει επέλθει σταθερή ροή (σημείο έναρξης). Ειδικότερα, για τον υπολογισμό αυτό ανάγεται η μάζα των συστατικών του αρχικού διαλύματος με βάση τον αρχικό όγκο στον όγκο που καταναλώθηκε.

3.3.5. Απόδοση Εγκλεισμού Σαλικυλικού Οξέος σε Ζεΐνη

Η απόδοση της διεργασίας του εγκλεισμού σαλικυλικού οξέος σε ζεΐνη (%EE: encapsulation efficiency) σχετίζεται με την ικανότητα του συστήματος να απελευθερώσει την ουσία που εγκλεισθηκε στα σωματίδια που παράχθηκαν μέσω ηλεκτροψεκασμού. Τα σωματίδια που σχηματίστηκαν μέσω του ηλεκτροψεκασμού διασπείρονται σε διαλύτη αιθανόλη. Ως απόδοση εγκλεισμού ορίζεται ο λόγος της μάζας του εγκλεισμένου σαλικυλικού οξέος στα μικρο-σωματίδια προς τη μάζα

3. Πειραματικό Μέρος

σαλικυλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε προς εγκλεισμό, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω σχέση:

$$\%EE = \frac{\text{μάζα εγκλεισμένου σαλικυλικού οξέος [mg]}}{\text{μάζα σαλικυλικού οξέος προς εγκλεισμό [mg]}} \quad (2)$$

Η απόδοση του εγκλεισμού μετριέται με χρήση φασματόμετρου ορατού-υπεριώδες σε μήκος κύματος 234 nm. Με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των διαλυμάτων το διάλυμα που επιλέγεται για την παραγωγή μικρο-σωματιδίων είναι τα Μίγματα 3, 4 και 8 του Πίνακα 1 με αναλογία διαλυτών 75/25 EtOH/AcOH. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της απόδοσης είναι η ακόλουθη:

1. Τα σωματίδια που παρασκευάστηκαν από το Μίγμα 8 μέσω του ηλεκτροψεκασμού χρησιμοποιούνται για ανάλυση της απόδοσης εγκλεισμού. Ειδικότερα, ζυγίζονται 20 mg μικρο-σωματιδίων και διασπείρονται σε 10 mL EtOH μέσα σε γυάλινο φιαλίδιο (vial).
2. Μέσα στο φιαλίδιο εισάγεται μαγνήτης και τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) για 48 ώρες. Θα πρέπει να σημειωθεί πως επειδή η ζεϊνη δεν μπορεί να διαλυτοποιηθεί πλήρως στην αιθανόλη τα παραγόμενα διαλύματα χρειάζονται συνεχή ανάδευση ώστε να απελευθερωθεί το σαλικυλικό οξύ.
3. Μετά το πέρας των 48 ωρών μερικά mL από το υγρό διάλυμα αιθανόλης απομονώνονται, φιλτράρονται μέσω φίλτρου που προσαρμόζεται στη σύριγγα με μέγεθος πόρων 0.45 μm και έπειτα μεταφέρονται σε ειδική κυψελίδα χαλαζία για τη μέτρηση στο φωτόμετρο.
4. Η μέτρηση γίνεται σε μήκος κύματος 234 nm αφού πρώτα μηδενιστεί η απορρόφηση της αιθανόλης στο ίδιο μήκος κύματος. Για το μηδενισμό της απορρόφησης του διαλύτη 3 mL αιθανόλης μεταφέρονται σε κυψελίδα χαλαζία.
5. Σε περίπτωση που η απορρόφηση είναι υψηλότερη της μονάδας, σημαίνει ότι το διάλυμα θα πρέπει να αραιωθεί.

Καμπύλη βαθμονόμησης

Σκοπός της καμπύλης βαθμονόμησης ή αλλιώς καμπύλης αναφοράς είναι η εύρεση άγνωστων συγκεντρώσεων που βρίσκονται μεταξύ ενός διαστήματος τιμών μέσω πρότυπων διαλυμάτων. Ο λόγος που υπάρχει αυτό το διάστημα είναι επειδή η γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης και της απορρόφησης, όπως αυτή καθορίζεται από την σχέση του Lambert-Beer, υπάρχει όταν η απορρόφηση είναι μεταξύ του μηδέν και της μονάδας. Άρα πρέπει να παρασκευαστούν διαλύματα σαλικυλικού οξέος γνωστής συγκέντρωσης και να φωτομετρηθούν. Ειδικότερα, μέσω προκαταρτικών μελετών επιλέγεται ως διαλύτης η αιθανόλη, λόγω της μικρής διαλυτότητας του σαλικυλικού οξέος στο νερό και επειδή το cutoff σημείο της είναι στα 205 nm. αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα (Δ_0) σαλικυλικού οξέος σε αιθανόλης συγκέντρωσης $C_0 = 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, το οποίο έχει απορρόφηση μεγαλύτερη από την μονάδα. Έτσι γίνονται κάποιες μελέτες για τον βαθμό αραιώσης που πρέπει να γίνει ώστε η απορρόφηση του διαλύματος (Δ_1) να είναι λίγο μικρότερη της μονάδας. Αυτή η συγκέντρωση είναι η $C_1 = 0.017 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$. γίνονται συνολικά πέντε αραιώσεις, τελικού όγκου 10 mL, από το διάλυμα Δ_1 . Οι αραιώσεις που ακολουθούνται είναι οι εξής, $0.8 \cdot C_1, 0.6 \cdot C_1, 0.4 \cdot$

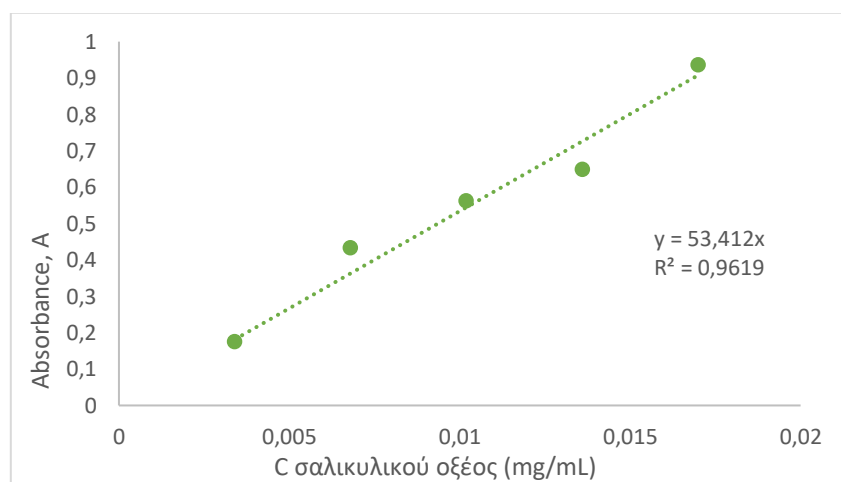
3. Πειραματικό Μέρος

$C_1, 0.2 \cdot C_1$, λαμβάνοντας όγκο 8, 6, 4, 1 mL από το Διάλυμα Δ_1 και προσθέτοντας 2, 4, 6 και 8 mL αιθανόλη αντίστοιχα.

Πίνακας 3. Δεδομένα συγκέντρωσης σαλικυλικού οξέος σε διάλυμα αιθανόλης σε σχέση με την απορρόφηση στα 234 nm για την καμπύλη βαθμονόμησης.

Διάλυμα	Συγκέντρωση (mg/ml)	Απορρόφηση
Δ_5	0.0034	0.174
Δ_4	0.0068	0.432
Δ_3	0.0102	0.561
Δ_2	0.0136	0.648
Δ_1	0.017	0.935

Οι τιμές των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων που παράχθηκαν καθώς και οι απορροφήσεις τους σε μήκος κύματος 234 nm παρουσιάζονται στο Πίνακα 3 και στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η γραφική τους σχέση. Η γραμμή τάσης που εισάγεται στα δεδομένα, διέρχεται από την αρχή των αξόνων επειδή σε αυτό το μήκος κύματος η αιθανόλη δεν απορροφά. Το cutoff σημείο της αιθανόλης είναι στα 205 nm. Η γραμμή τάση περιγράφεται από την εξής μαθηματική σχέση, $y = 53.142 \cdot x$, με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0.9619$.



Διάγραμμα 1. Καμπύλη βαθμονόμησης απορρόφησης σαλικυλικού οξέος σε διαλύτη την αιθανόλη στα 234 nm.

3.3.6. Ανάλυση Μορφολογίας Σωματιδίων (SEM & DLS)

Οι τεχνικές προσδιορισμού του μεγέθους των σωματιδίων είναι που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

- Η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering ή DLS),
- Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy ή SEM),

Η μορφολογία των παραγόμενων σωματιδίων είναι σημαντικό να προσδιοριστεί διότι καθορίζει τα λειτουργικά χαρακτηριστικά, όπως η αλληλεπίδραση του σε με το υγρό περιβάλλον. Έτσι, για το χαρακτηρισμό της μορφολογίας και της μικροδομής των εγκλεισμένων σωματιδίων καθώς και των σωματιδίων ζεϊνης επιλέχθηκε η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) (Quanta 200 FE, 2004, OR, USA), χρησιμοποιώντας ανιχνευτή μεγάλου πεδίου (LFD) που λειτουργεί σε τάση 20 kV.

3. Πειραματικό Μέρος

Πριν από τη διαδικασία SEM, τα δείγματα στερεής σκόνης τοποθετήθηκαν στην ειδική μεταλλική πλάκα και επιχρυσώθηκαν με τη συσκευή επίστρωσης Mini Sputter Coater SC7620 (Quorum Technologies, West Sussex, UK) για 120 δευτερόλεπτα (πλάσμα 18 mA), δημιουργώντας ένα λεπτό στρώμα χρυσού πάχους 15 nm. Η διάμετρος των σωματιδίων υπολογίστηκε με τη μέτρηση της διαμέτρου τυχαίων σωματιδίων από τις μικρογραφίες που δίνονται μέσω του λογισμικού του οργάνου SEM σε διαφορετική μεγέθυνση χρησιμοποιώντας το λογισμικό Image J.

Μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) υπάρχει η δυνατότητα να βρεθεί η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων που έχουν παρασκευαστεί καθώς και η μέση διάμετρος τους. Η πειραματική αυτή μέθοδος χρησιμοποιείται διότι δεν έχουν όλα τα σωματίδια που παράγονται το ίδιο μέγεθος, αλλά βρίσκονται μέσα σε ένα εύρος τιμών και μπορεί να επιβεβαιωθεί η υπολογισμένη από το SEM διάμετρος. Βέβαια είναι σημαντικό να σημειωθεί πως μέσω αυτής της μεθόδου δεν υπολογίζεται η πραγματική διάμετρος του σφαιριδίου, αλλά η υδροδυναμική διάμετρος η οποία εξαρτάται από τους δεσμούς των μορίων της εξωτερικής επιφάνειας με τα μόρια του νερού και είναι συνήθως μεγαλύτερη. Το όργανο που επιλέχθηκε για αυτή την μέτρηση είναι το Microtrac S3000/S3500 Series Light Scattering Particle Size Analyzer με δυνατότητα μέτρησης από 0.02 έως 2800 μικρόμετρα, το οποίο έχει συνδεθεί με ηλεκτρονικό υπολογιστή που φέρει το Microtrac FLEX λογισμικό για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων (Εικόνα 7). Ακολουθείται η παρακάτω πειραματική πορεία προσδιορισμού του μεγέθους:

1. Από τα στερεά δείγματα που έχουν παραχθεί μέσω του ηλεκτροψεκασμού παρασκευάζεται διάλυμα με απιονισμένο νερό σε γυάλινο φιαλίδιο vial σε θερμοκρασία 25 °C συγκέντρωσης 0.05 mg/mL ώστε να υπάρχει ικανοποιητική ευκρίνεια και διασπορά, εντός των προδιαγραφών του οργάνου, το οποίο αναδεύεται μηχανικά για μερικά λεπτά και έπειτα εισάγεται για 6 λεπτά σε λουτρό υπερήχων με σκοπό για γίνει ικανοποιητική διασπορά των σωματιδίων.
2. Σκοπός είναι να γίνει διασπορά των σωματιδίων και όχι διαλυτοποίηση τους, για αυτό το λόγο η μηχανική ανάδευση είναι ήπια.
3. Το όργανο πρώτα ξεπλένεται με απιονισμένο νερό μερικές φορές για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων που έχουν παραμείνει από προηγούμενα πειράματα και έπειτα εισάγεται το προς μέτρηση δείγμα.
4. Αφού έχει επέλθει ισορροπία στο όργανο γίνεται η σάρωση των δειγμάτων και μέσω του λογισμικού λαμβάνονται οι εκάστοτε μετρήσεις. Τα δείγματα που μετρήθηκαν είναι τα εγκλεισμένα σωματίδια ζεΐνης με ποσοστό φόρτωσης σε σαλικυλικό οξύ 40% και τα σωματίδια χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλά δείγματα.

3. Πειραματικό Μέρος



Εικόνα 7. Συσκευή περίθλασης - Microtrac S3000/S3500 Series Light Scattering Particle Size Analyzer & Microtrac FLEX software.

3.3.7. Φασματομετρική Ανάλυση (FTIR/ATR)

Η ποιοτική ταυτοποίηση των δομικών αλλαγών μελετήθηκε με φασματοσκοπία FTIR. Τα δείγματα που αναλύονται με Φασματομετρία Υπέρυθρου με Μετασχηματισμό Fourier, είναι η καθαρή ζεΐνη, σαλικυλικό οξύ, χιτοζάνη και τα εγκλεισμένα σωματίδια που παράχθηκαν με ηλεκτροψεκασμό φορτωμένα με σαλικυλικό οξύ (40% DL), τα μη φορτωμένα (blank) με αναλογία διαλύτη 75/25 αιθανόλη/οξικό οξύ, καθώς και τα σωματίδια χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης. Πριν τη φωτομέτρηση κάθε δείγματος πραγματοποιείται μια σάρωση χωρίς δείγμα προκειμένου να μηδενιστεί ο θόρυβος και ακολούθως, εισάγεται επαρκής ποσότητα δείγματος κάθε φορά, με σπαθίδα στο κέντρο της επιφάνειας μέτρησης του οργάνου, κλείνεται το καπάκι και πραγματοποιείται η σάρωση. Αφού διεξαχθεί η μέτρηση με υδροβολέα νερού και αιθανόλης καθαρίζεται η θέση εισαγωγής του δείγματος για την επόμενη μέτρηση. Στα Διαγράμματα 6 και 7 παρουσιάζονται τα φάσματα που λήφθηκαν από το πείραμα.

3.3.8. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσής (DSC)

Οι θερμικές ιδιότητες των εγκλεισμένων συστημάτων και των καθαρών ενώσεων διερευνήθηκαν με Διαφορική Σάρωση Θερμιδομετρία (DSC) χρησιμοποιώντας το φασματομετρικό σύστημα Perkin Elmer DSC 6, με λογισμικό Pyris 6. Τα δείγματα που αναλύονται με την μέθοδο αυτή είναι τα παραγμένα εγκλεισμένα σωματίδια με ποσοστό φόρτωσης 40%, καθαρή ζεΐνη, σαλικυλικό οξύ, το φυσικό μίγμα αυτών, καθαρή χιτοζάνη και τα παραγμένα σωματίδια χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης. Η πειραματική μέθοδος που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Ζυγίζονται 5 – 20 mg στερεού και τοποθετούνται σε προζυγισμένο δισκίο αλουμινίου. και σημειώνεται η ακριβής μάζα του κάθε ενός δείγματος. Το δισκίο καλύπτεται με καπάκι αλουμινίου. Ένα κενό κλειστό δισκίο χρησιμοποιείται ως δείγμα αναφοράς της μέτρησης. Το δείγμα αναφοράς και το προς ανάλυση κάθε φορά δείγμα τοποθετούνται στις δύο ειδικές θέσεις της συσκευής διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης.
2. Η αντλία του αέριου αζώτου ανοίγεται ώστε να υπάρχει κυκλοφορία στο θάλαμο για την δημιουργία αδρανούς περιβάλλοντος με ροή 20 mL/min.
3. Η αντλία του ψυκτικού μέσου ενεργοποιείται ώστε η ψύξη του θαλάμου να είναι ικανή.
4. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται είναι το ακόλουθο:

3. Πειραματικό Μέρος

- i) Ψύξη μέσω διατήρησης της θερμοκρασίας σταθερής για 1 λεπτό στους 0 °C.
- ii) Θέρμανση στους 400 °C με ρυθμό 5 °C/min.
- iii) Ψύξη στους 0 °C με ρυθμό 20 °C/min.

Οι θερμοκρασίες υαλώδους μετάβασης προσδιορίστηκαν από τα τις μεταβολές των ενθαλπιών στα διαγράμματα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τριπλά δείγματα.

3.3.9. Μελέτη Απελευθέρωσης Εγκλεισμένου Σαλικυλικού Οξέος

Η χρονική απελευθέρωση του σαλικυλικού οξέος από την εγκλεισμένη δομή σαλικυλικού οξέος σε ζεΐνη που δημιουργήθηκε μέσω του ηλεκτροψεκασμού, μελετήθηκε φασματοφωτομετρικά με την μέθοδο του ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) σε μήκος κύματος 234 nm. Το μήκος κύματος αυτό επιλέχθηκε διότι σε αυτό παρουσιάζεται η μέγιστη απορρόφηση ($\lambda_{\max}$), πράγμα που σημαίνει ότι παρουσιάζεται η μεγαλύτερη γραμμική περιοχή. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι επιθυμητό ώστε η μέθοδος να έχει υψηλή διαχωριστικότητα. Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί η ποσότητα σαλικυλικού οξέος που απελευθερώθηκε σε κάθε ένα χρονικό διάστημα μελέτης είναι ίδια με την καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για να μετρηθεί η απόδοση του εγκλεισμού, θεωρώντας πως τα σφάλματα της μεθόδου είναι πολύ μικρά.

Μια συγκεκριμένη ποσότητα σωματιδίων, 70 mg, διασπάρθηκε σε 25 mL απιονισμένου νερού σε σταθερή θερμοκρασία 30 ± 0.5 °C, χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα. Σε χρονικά διαστήματα 5, 30, 60 λεπτών, 24 και 48 ωρών, απομακρύνθηκαν 2 mL του διαλύματος και φυγοκεντρήθηκαν στις 2500 rpm στροφές για 6 λεπτά. Το ίζημα ξανά διασπάρθηκε σε 2 mL φρέσκου απιονισμένου νερού και επανατοποθετήθηκε στον κύριο διάλυμα που αναδεύεται, ενώ το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε σωλήνα και μετρήθηκε μέσω UV-Vis σε μήκος κύματος 234 nm. Η ποσότητα σαλικυλικού οξέος που απελευθερώθηκε μέχρι εκείνη την ώρα ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη καμπύλη βαθμονόμησης απορρόφησης σε μήκος κύματος 234 nm. Οι δοκιμές απελευθέρωσης πραγματοποιήθηκαν τριπλά. Τα δεδομένα ελεγχόμενης απελευθέρωσης αναλύθηκαν με βάση θεωρητικές (Higuchi), εμπειρικές (μηδενικής και πρώτης τάξης κινητικές, Hixson-Crowell) και ημι-εμπειρικές (Korsmeyer-Peppas) εξισώσεις, με σκοπό να βρεθεί το κινητικό μοντέλο που περιγράφει το φαινόμενο καλύτερα [29, 117, 121, 122, 123]. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν στις ακόλουθες εξισώσεις:

Μηδενικής Τάξης Μοντέλο

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = K_0 \cdot t \quad (3)$$

Πρώτης Τάξης Μοντέλο

$$\text{Log} \left(\frac{M_t}{M_{\infty}} \right) = - \frac{K_1 \cdot t}{2.303} \quad (4)$$

Korsmeyer- Peppas Μοντέλο

3. Πειραματικό Μέρος

$$\text{Log}\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = n \text{Log}t + \text{Log}K_{kp} \quad (5)$$

Higuchi Μοντέλο

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \cdot t^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

Hixson-Crowell Μοντέλο

$$M_\infty^{\frac{1}{3}} - M_t^{\frac{1}{3}} = K_{HC} \cdot t \quad (7)$$

Όπου M_t είναι η αθροιστική ποσότητα ουσίας που απελευθερώθηκε σε χρόνο t , M_∞ είναι η συνολική ποσότητα της εγκλωβισμένης ουσίας και K_0 , K_1 , K_{kp} , K_H & K_{HC} είναι οι σταθερές των ρυθμών των μοντέλων, αντίστοιχα. Τα συγκεκριμένα μοντέλα επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία σχετικά με τη μελέτη απελευθέρωσης από μήτρα την ζεΐνη [124]. Στο κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas (5) η σταθερά απελευθέρωσης K_{kp} περιγράφει τη διαμόρφωση των σωματιδίων, όπως το σχήμα, τη διαλυτότητα και την εσωτερική δομή. Ο μηχανισμός απελευθέρωσης ακολουθεί τη διάχυση Fickian όταν η τιμή n είναι 0.5, σύμφωνα με την απελευθέρωση της ουσίας του μοντέλου Higuchi. Εάν η τιμή n είναι ίση με 1, το μοντέλο είναι μη-Fickian και ο ρυθμός απελευθέρωσης φαρμάκου σηματοδοτεί κινητική απελευθέρωσης μηδενικής τάξης, και επίσης ο μηχανισμός απελευθέρωσης φαρμάκου είναι μέσω απορρόφησης διαλύτη. Εάν η τιμή n βρίσκεται μεταξύ 0.5 και 1, το μοντέλο είναι μη-Fickian και ο μηχανισμός απελευθέρωσης φαρμάκου είναι ένας συνδυασμός διάχυσης και πρηξίματος [125].

3.3.10. Συμβατική Μέθοδος Εκχύλισης

Για την εύρεση της αποδοτικότερης μεθόδου εκχύλισης, των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης του φύκος δοκιμάζονται οι μέθοδοι της συμβατικής εκχύλισης και υποβοηθούμενης από υπερήχους σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας, διάρκειας, μάζας πρώτης ύλης, διαλύτη και λόγος ξηρής πρώτης ύλης προς όγκο διαλύτη. Η έλλειψη τυποποιημένων μεθόδων εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών από φύκια είναι αυτό που καθιστά δυσκολότερη την διαδικασία επιλογής μεθόδου.

Εκτελούνται συνολικά τρεις διαφορετικές συμβατικές εκχυλίσεις σε υδατικό περιβάλλον (Πείραμα 1.Α έως 3.Α), με διαφορετική χρονική διάρκεια και θερμοκρασία, ώστε να βρεθεί μία συσχέτιση μεταξύ της απόδοσης, της θερμοκρασίας και του χρόνου με το ίδιο λόγο μάζας φύκος προς όγκο διαλύτη σε πρώτο στάδιο. Οι πειραματικές συνθήκες των πειραμάτων των συμβατικών εκχυλίσεων στο υδατικό περιβάλλον παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 4.

3. Πειραματικό Μέρος

Πίνακας 4. Πειραματικές συνθήκες συμβατικών εκχύλισεων σε υδατικό και οργανικών διαλυτών περιβάλλον.

Πείραμα	Διαλύτης	Αναλογία μάζας στερεού (g)/όγκο υγρό (mL)	Χρόνος (ώρες)	Θερμοκρασία (°C)
1.A	H ₂ O	1/25	3	80
2.A	H ₂ O	1/20	1	30
3.A	H ₂ O	1/20	3	30
4.A	EtOH	1/20	3	30
5.A	MeOH	1/20	3	30
6.A	Ethyl Acetate	1/20	3	30
7.A	Acetone	1/20	3	30
8.A	0.1M NaOH	1/20	6	65

Αντίστοιχα, για την εκχύλιση πολικών υδρόφοβων βιοδραστικών ουσιών χρησιμοποιούνται πολικοί οργανικοί διαλύτες. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας. Ο λόγος μάζας στερεού φύκος προς τον όγκο του διαλύτη είναι 1/20 και η εκχύλιση πραγματοποιείται σε συνθήκες περιβάλλοντος υπό ανάδευση για 3 ώρες, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Στους οργανικούς διαλύτες η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η εκχύλιση επιλέγεται να είναι η θερμοκρασία περιβάλλοντος λόγω της πτητικότητας που έχουν. Σε περίπτωση που θερμοκρασία ήταν μεγαλύτερη θα απαιτούνταν υψηλότερη ποσότητα διαλύτη για να καλύψει τη ποσότητα που εξατμίζεται αναπόφευκτα.

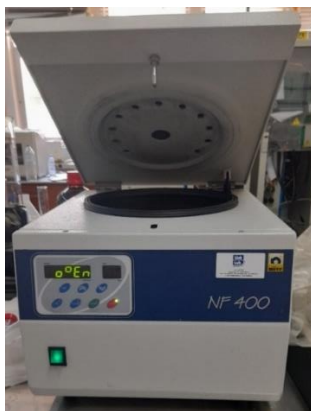
Ακόμη, για να μελετηθεί η διαφορετική επίδραση που έχει το περιβάλλον εκχύλισης δοκιμάστηκε αλκαλικό περιβάλλον για την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών με χρήση υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M στους 65 °C για 6 ώρες με λόγο 1/20, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται στα παραπάνω πειράματα είναι η εξής:

1. Σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων ζυγίζεται η απαιτούμενη ποσότητα από το φύκος *Saccharina Latissima* και εισάγεται σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως.
2. Ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος μεταφέρεται στο ποτήρι ζέσεως μέσω σιφωνίου πλήρωσης.
3. Τέλος, εισάγεται μαγνήτης για την ανάδευση και ασφαρίζεται με parafilm.
4. Αφού ολοκληρωθεί η εκχύλιση, το διάλυμα με τα στερεά μεταφέρεται σε φάλκον και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 3000 rpm (Εικόνα 8).
5. Το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται, ογκομετρείται, διηθείται σε διάταξη υπό κενό με χαρτί διήθησης, ογκομετρείται ξανά και τέλος συλλέγεται σε νέο καθαρό φάλκον. Το υγρό αυτό αποτελεί το υγρό εκχύλισμα. Το στερεό που έχει καθιζάνει στο πυθμένα, μετά τη φυγοκέντρωση, απορρίπτεται.
6. Μέρος από το υγρό εκχύλισμα χρησιμοποιείται για περαιτέρω πειράματα με σκοπό να χαρακτηριστεί ως προς τη ποιότητα του, ενώ το υπόλοιπο υγρό εκχύλισμα καταψύχεται στους -68 °C για μία ημέρα. Η κατάψυξη αφορά μόνο τα εκχυλίσματα με διαλύτη απιονισμένο νερό.

3. Πειραματικό Μέρος

7. Έπειτα, το διάλυμα που έχει καταψυχθεί ξηραίνεται υπό κατάψυξη (Εικόνα 9), ώστε να παραληφθεί στερεό δείγμα από το εκχύλισμα.
8. Τα εκχυλίσματα που περιέχουν οργανικούς διαλύτες εξατμίζονται υπό κενό σε κατάλληλη διάταξη (Εικόνα 11).
9. Το στερεό που λαμβάνεται χρησιμοποιείται για περαιτέρω ποιοτικές αξιολογήσεις.



Εικόνα 8. Φυγόκεντρος (NÜVE NF 400 Centrifuge).



Εικόνα 9. Διάταξη ξήρανσης με κατάψυξη – (BK-FD10S, BioBase, China).

3.3.12. Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους

Ως προς την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, τώρα, για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης γίνονται διάφορες δοκιμές με βάση τη μάζα του φύκου σκοπό την μεγαλύτερη ανάκτηση εκχυλίσματος σε πρώτη φάση και έπειτα ποσότητας βιοδραστικών ουσιών. Το πείραμα αυτό γίνεται για να εντοπιστεί η μάζα του ξηρού στερεού κατά την οποία λαμβάνουν χώρα αποτελεσματικότερα τα φαινόμενα μεταφοράς των ουσιών από το στερεό στο υγρό μέρος, σε υδατικό περιβάλλον (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Πειραματικές συνθήκες εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους σε υδατικό περιβάλλον.

Πείραμα	Διαλύτης	μάζα στερεού (g)	Αναλογία μάζας στερεού (g)/όγκο υγρό (mL)	Χρόνος (min)	Θερμοκρασία (°C)
1.B	H ₂ O	0.5	1/40	10	30
2.B	H ₂ O	1.0	1/40	10	30

3. Πειραματικό Μέρος

3.B	H ₂ O	1.5	1/40	10	30
4.B	H ₂ O	2.0	1/40	20	30

Πέρα από εκχυλίσσεις με βάση το νερό, εκτελείται και μία σειρά πειραμάτων που περιέχουν οργανικούς διαλύτες, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Κατά τις εκχυλίσσεις με βάση τους οργανικούς διαλύτες επιλέγεται μεγαλύτερη μάζας στερεού.

Πίνακας 6. Πειραματικές συνθήκες εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους με οργανικούς διαλύτες.

Πείραμα	Διαλύτης	μάζα στερεού (g)	Αναλογία μάζας στερεού (g)/όγκο υγρό (mL)	Χρόνος (min)	Θερμοκρασία (°C)
1.C	EtOH	2.0	1/40	20	30
2.C	80/20 EtOH/H ₂ O	2.0	1/40	20	30
3.C	80/20 H ₂ O/MeOH	2.0	1/40	20	30

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για όλες τις εκχυλίσσεις υποβοηθούμενε από υπερήχους είναι η εξής:

1. Σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων ζυγίζεται η απαιτούμενη ποσότητα από το φύκος *Saccharina Latissima* και εισάγεται στο ειδικό ποτήρι εκχύλισης.
2. Ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος μεταφέρεται πρώτα σε ογκομετρικό κύλινδρο μέσω σιφωνίου πλήρωσης.
3. Το ποτήρι της εκχύλισης, που περιέχει μόνο το στερεό, μεταφέρεται στην βάση της συσκευής και συνδέεται με την είσοδο και την έξοδο του ψυκτικού μέσου.
4. Ο διαλύτης μεταφέρετε με προσοχή στο ποτήρι, λίγο πριν αρχίσει ο πείραμα ώστε να αποφευχθεί η πρότερη εκχύλιση. Η εκχύλιση με υπερήχους αρχίζει μέσω ψηφιακού χειρισμού.
5. Αφού ολοκληρωθεί η εκχύλιση, το διάλυμα με τα στερεά μεταφέρεται σε φάλλον και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 3000 rpm (Εικόνα 8).
6. Το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται, ογκομετρείται, διηθείται σε διάταξη υπό κενό με χαρτί διήθησης, ογκομετρείται ξανά και τέλος συλλέγεται σε νέο καθαρό φάλλον. Το υγρό αυτό αποτελεί το υγρό εκχύλισμα. Το στερεό που έχει καθιζάνει στο πυθμένα, μετά τη φυγοκέντριση, απορρίπτεται.
7. Μέρος από το υγρό εκχύλισμα χρησιμοποιείται για περαιτέρω πειράματα με σκοπό να χαρακτηριστεί ως προς τη ποιότητα του. Το υπόλοιπο υγρό εκχύλισμα, αν ο διαλύτης είναι το νερό, καταψύχεται στους -68 °C για μία ημέρα. Τα υγρά εκχυλίσματα που περιέχουν οργανικούς διαλύτες μεταφέρονται σε κατάψυξη στους -14 °C, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση.
8. Έπειτα, τα υδατικά διαλύματα που έχει καταψυχθεί ξηραίνεται υπό κατάψυξη (Εικόνα 10), ώστε να παραληφθεί στερεό δείγμα από το εκχύλισμα.
9. Το στερεό που λαμβάνεται χρησιμοποιείται για περαιτέρω ποιοτικές αξιολογήσεις.

3. Πειραματικό Μέρος

10. Τα εκχυλίσματα που περιέχουν οργανικούς διαλύτες εξατμίζονται υπό κενό σε κατάλληλη διάταξη (Εικόνα 11).



Εικόνα 10. Διάταξη συσκευών για εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture Co., Ltd., Nanjing, China).



Εικόνα 11. Διάταξη εξάτμισης υπό κενό – Buchi V-800 Vacuum Controller, Buchi Rotavapor R-200.

3.3.13. Χαρακτηρισμός Εκχυλισμάτων *Saccharina Latissima*

3.3.13.1. Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Ενώσεων (TPC) – Μέθοδος Folin – Ciocalteu

Το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθείται εφαρμόζει την μέθοδο Folin – Ciocalteu. Πρώτα γίνεται επίτευξη του κατάλληλου περιβάλλοντος. Ειδικότερα, το αλκαλικό περιβάλλον στο διάλυμα της αντίδρασης επιτυγχάνεται με την προσθήκη κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Για την παρασκευή αυτού ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων ζυγίζονται 200 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου.
2. Σε ογκομετρική φιάλη του 1 L μεταφέρονται με ογκομετρικό κύλινδρο 800 mL απιονισμένο νερό και το άνυδρο ανθρακικό νατρίου. Με τη βοήθεια ήπιας ανάδευσης και θέρμανσης σε θερμαντική πλάκα διαλυτοποιείται. Η θέρμανση του διαλύματος συνεχίζεται έως ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως το ανθρακικό νάτριο και επιτευχθεί ήπιος βρασμός.
3. Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια τοποθετείται στο ψυγείο για 24 ώρες με σκοπό το σχηματισμό κρυστάλλων.

3. Πειραματικό Μέρος

4. Εάν δεν έχει υπάρξει καταβύθιση μετά από ορισμένες ώρες παραμονής στο ψυγείο, προστίθενται επιπλέον κρύσταλλοι ανθρακικού νατρίου για να επιταχυνθεί το φαινόμενο.
5. Το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, και υποβάλλεται σε διήθηση υπό κενό. Το διήθημα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη του 1 L. Το στερεό που απομένει στη χοάνη διηθήσεως κενού εκπλένεται (υπό κενό) με απιονισμένο νερό, και το έκπλυμα χρησιμοποιείται για την αραίωση έως τη χαραγή στην ογκομετρική φιάλη του 1 L.
6. Το διάλυμα αυτό μένει σταθερό και κατάλληλο για χρήση για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για τα δείγματα είναι η εξής:

1. Για κάθε μέτρηση δείγματος προστίθενται σε δοκιμαστικό σωλήνα με την αναγραφόμενη σειρά τα ακόλουθα αντιδραστήρια:
 - i. 7.9 mL απιονισμένο νερό
 - ii. 0.1 mL από το δείγμα (ή διαλύτης για το blank δείγμα)
 - iii. 0.5 mL διαλύματος Folin-Ciocalteu
 - iv. 1.5 mL κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (το καυστικό νάτριο προστίθεται οπωσδήποτε τελευταίο και μετά από χρονικό διάστημα επώασης 30 δευτερόλεπτα – 8 λεπτά κατόπιν της προσθήκης του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu)
2. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται σε vortex και αφήνονται σε σκιερό μέρος για 2 ώρες.
3. Η μέτρηση πραγματοποιείται σε φωτόμετρο σε μήκος κύματος 765 nm. Αρχικά τοποθετείται στο φωτόμετρο το blank δείγμα, γίνεται μηδενισμός του οργάνου για να αφαιρεθεί η απορρόφηση του περιβάλλοντος και του διαλύτη και στη συνέχεια πραγματοποιούνται οι μετρήσεις των υπόλοιπων δειγμάτων.

Για να μπορέσει να ποσοτικοποιηθεί η απορρόφηση των δειγμάτων απαιτείται η κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης. Το συνολικό φαινολικό φορτίο των εκχυλισμάτων θα μετρηθεί σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς είναι η εξής:

1. Ζυγίζεται γαλλικό οξύ σε ποσότητα της τάξης του 0.1 g σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και σημειώνεται το ακριβές της ζύγισης.
2. Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Η διάλυση του γαλλικού οξέος πραγματοποιείται εύκολα με την προσθήκη 10 mL αιθανόλης. Στη συνέχεια προστίθεται απιονισμένο νερό έως τη χαραγή και το διάλυμα ανακινείται για να ομογενοποιηθεί. Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος (stock) είναι 10 mg/mL.
3. Σε ειδική κυψελίδα χαλαζία εισάγεται καθαρός διαλύτης και μηδενίζεται η απορρόφηση (blank). Έπειτα, σε κυψελίδα χαλαζία εισάγεται το προς μέτρηση δείγμα και λαμβάνεται η μέτρηση.
4. Αν η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη της μονάδας, το διάλυμα υποβάλλεται σε σειρά αραιώσεων, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 7. Σκοπός είναι εντός του διαστήματος απορρόφησης 0.1 – 1 να έχουν γίνει μετρήσεις γνωστής συγκέντρωσης.

3. Πειραματικό Μέρος

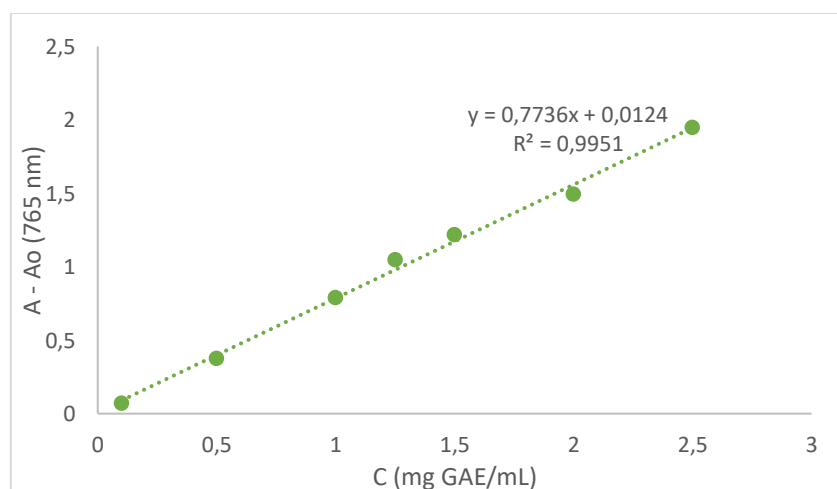
5. Τα διαλύματα αραιώσης παρασκευάζονται σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL (18 τεμάχια). Οι όγκοι παραλαμβάνονται με τη χρήση σιφωνίων πληρώσεως από το stock διάλυμα και είναι αντίστοιχα 5, 2.5, 2, 1.5, 1.25, 1, 0.5 και 0.1 mL. Κάθε ογκομετρική φιάλη αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό, πωματίζεται και ανακινείται.
6. Για την μέτρηση της απορρόφησης, πρώτα, σε κυψελίδα χαλαζία εισάγεται καθαρός διαλύτης και μηδενίζεται η απορρόφηση (A_0). Έπειτα, σε κυψελίδα χαλαζία εισάγεται το προς μέτρηση δείγμα και λαμβάνεται η μέτρηση (A).

Τα δεδομένα της καμπύλης αναφοράς παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 7. Δεδομένα συγκέντρωσης (C) γαλλικού οξέος και απορρόφησης για τη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.

C (mg GAE/mL)	A-A ₀
0.1	0.07
0.5	0.374
1	0.789
1.25	1.046
1.5	1.217
2	1.491
2.5	1.946
5	3.000
10	3.000

Από τα δεδομένα γίνεται φανερό πως σε συγκεντρώσεις 5 και 10 mg/mL η απορρόφηση φαίνεται να λαμβάνει την τιμή 3.00, πράγμα που σημαίνει πως η συγκέντρωση πλέον είναι εκτός γραμμικής περιοχής και δεν μπορεί να μετρηθεί με αυτή την τεχνική. Στο Διάγραμμα 2 αναπαρίσταται και σχηματικά η καμπύλη απορρόφησης.



Διάγραμμα 2. Καμπύλη απορρόφησης γαλλικού οξέος - μέθοδος Folin-Ciocalteu.

Η γραμμική γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς είναι η εξής: $y = 0.7736 \cdot x + 0.0124$ με συντελεστή γραμμικής παρεμβολής $R^2 = 0.9951$, ο οποίος δείχνει πως

3. Πειραματικό Μέρος

τα δεδομένα συγκέντρωσης παρουσιάζουν υψηλή γραμμική τάση με πολύ χαμηλό περιθώριο σφάλματος.

Ο υπολογισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε κάθε δείγμα γίνεται σε ισοδύναμες μονάδες γαλλικού οξέος κατ' όγκο. Για να μετατραπεί η συγκέντρωση αυτή σε περιεκτικότητα ισοδύναμων μονάδων γαλλικού οξέος στη μάζα του ξηρού φύκος ακολουθείται ο παρακάτω υπολογισμός:

$$\text{Total Phenolic Content (TPC)} \left[\frac{\text{mg GAE}}{\text{g raw material}} \right] = C \left[\text{mg} \frac{\text{GAE}}{\text{mL}} \right] \cdot \frac{\frac{\text{μάζα στερεού εκχυλίσματος [mg]}}{\text{μάζα πρώτης ύλης [g]}}}{\frac{\text{μάζα στερεού εκχυλίσματος [mg]}}{\text{όγκος εκχυλίσματος [mL]}}}$$

Όπου, C είναι η συγκέντρωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου όπως αυτό υπολογίζεται από τη καμπύλη αναφοράς. Η μάζα του στερεού εκχυλίσματος, η μάζα της πρώτης ύλης και ο όγκος του στερεού εκχυλίσματος είναι μετρήσεις που λαμβάνονται κατά την πειραματική διαδικασία.

3.3.13.2 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης με DDPH

Για να μπορέσει να ποσοτικοποιηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός εκχυλίσματος σε ισοδύναμα Trolox (TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Content), απαιτείται η κατασκευή μιας καμπύλης βαθμονόμησης με βάση την αδρανοποίηση των ελεύθερων ριζών διαλύματος DDPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο) από διαλύματα trolox διαφόρων συγκεντρώσεων και έπειτα η μέτρηση των δειγμάτων. Σε πρώτο βαθμό παράγεται και ελέγχεται η απορρόφηση του stock διαλύματος DDPH, σύμφωνα με την παρακάτω πειραματική διαδικασία:

1. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL προστίθενται 2.5 mg DPPH και προστίθεται μεθανόλη μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 25 mg/L (stock). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή το DPPH να διαλυτοποιηθεί πλήρως στη μεθανόλη. Το διάλυμα αναδεύεται μηχανικά για 10 λεπτά με μαγνητικό αναδευτήρα.
2. Ειδική κυψελίδα πληρώνεται με μεθανόλη και η απορρόφηση που προκύπτει στο φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται. Το περιεχόμενο της κυψελίδας στη συνέχεια απορρίπτεται, η κυψελίδα πλένεται για να επαναχρησιμοποιηθεί για τις φωτομετρικές μετρήσεις. Επειδή ο διαλύτης που περιέχεται είναι μεθανόλη, οι κυψελίδες που χρησιμοποιούνται είναι πλαστικές.
3. Λαμβάνονται, με σιφόνιο μετρήσεως των 5 mL, 3.9 mL διαλύματος DPPH και προστίθενται με αυτόματη πιπέτα (των 100 ή 200 μ L) ακόμα 0.1 mL μεθανόλης στην κυψελίδα. Το διάλυμα (control) που παράγεται φωτομετρείται στα 515 nm. Η απορρόφηση του διαλύματος θα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 0.7 και 0.8. Σε διαφορετική περίπτωση, έχει προκύψει σφάλμα κατά τη ζύγιση και το διάλυμα stock θα πρέπει να ξαναπαρασκευαστεί.
4. Όλα τα διαλύματα που περιέχουν DPPH απορρίπτονται σε ειδικό δοχείο συλλογής.

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων σε ισοδύναμα Trolox, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

3. Πειραματικό Μέρος

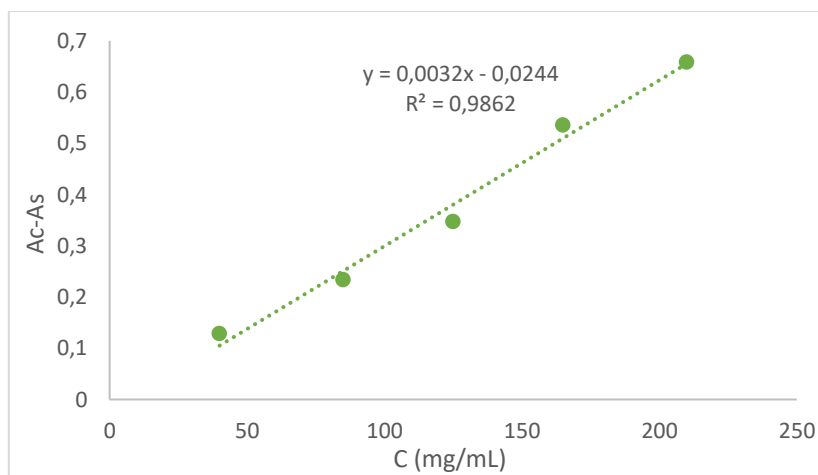
1. Ετοιμάζεται διάλυμα Trolox με ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό ποσότητα της τάξης των 0.02 g (σημειώνεται το ακριβές της μάζας με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων) και διαλυτοποίηση με μεθανόλη σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (μέχρι τη χαραγή). Η συγκέντρωση του διαλύματος που προκύπτει είναι 200 mg/L σε Trolox. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις (προτείνονται 4) του αρχικού διαλύματος Trolox. Η διαδικασία των αραιώσεων πραγματοποιείται σε ογκομετρικές φιάλες με τη χρήση σιφωνίων πληρώσεως.
2. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται με σιφόνιο 3.9 mL stock διαλύματος DPPH και με αυτόματη πιπέτα 0.1 mL από τα διαλύματα Trolox. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται ελαφρώς με το χέρι ή vortex. Τα διαλύματα φυλάσσονται σε σκιερό μέρος για 30 λεπτά, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση δέσμευσης των ελευθέρων ριζών του DPPH από το Trolox.
3. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, τα διαλύματα μεταγγίζονται από τους δοκιμαστικούς σωλήνες στην κυψελίδα και μετράται η απορρόφησή τους στα 515 nm. Ανά μέτρηση, η κυψελίδα θα πρέπει να ξεπλένεται με μεθανόλη. Στο σημείο αυτό προτείνεται επανάληψη της μέτρησης του control, διότι στο διάλυμα DPPH μειώνεται αυθόρμητα η απορρόφησή του με την πάροδο του χρόνου.
5. Κατασκευάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης Trolox με άξονα των x τη συγκέντρωση Trolox που χρησιμοποιήθηκε για την αδρανοποίηση των ριζών του DPPH και για άξονα των y τη διαφορά (Ac-As), όπου Ac η απορρόφηση του control και As η απορρόφηση των δειγμάτων DPPH-Trolox μετά το πέρας της αντίδρασης.

Η τυπική καμπύλη καθώς και οι μετρήσεις που λήφθηκαν παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 8. Δεδομένα συγκέντρωσης Trolox συναρτήσει της απορρόφησης για τη καμπύλη αναφοράς.

C (mg/mL)	Ac-As
40	0.128
85	0.233
125	0.347
165	0.535
210	0.658

3. Πειραματικό Μέρος



Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς απορρόφησης διαλυμάτων Trolox συναρτήση της συγκέντρωσης.

Με δεδομένη τη καμπύλη βαθμονόμησης Trolox, η αντιοξειδωτική ικανότητα οποιουδήποτε εκχυλίσματος μπορεί να εκφραστεί σε συγκέντρωση ισοδύναμου Trolox (TEAC). Η γραμμική γραφική παράσταση της απορρόφησης σε σχέση με τη συγκέντρωση του δείγματος σε αντιοξειδωτικά είναι η εξής: $y = 0.0032 \cdot x - 0.0244$ με συντελεστή γραμμικής παρεμβολής $R^2 = 0.9862$, πράγμα που δείχνει τη γραμμικότητα της συσχέτισης.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα δείγματα ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Σε ειδική πλαστική κυψελίδα προστίθενται με σιφώνιο πλήρωσης 3.9 mL stock διαλύματος DPPH και 01 mL από το διαλύτη του εκχυλίσματος με αυτόματη πιπέτα. Η απορρόφηση που λαμβάνεται αποτελεί την απορρόφηση του control, Ac. Υπόψιν πως θα πρέπει να έχει προηγηθεί ο μηδενισμός της απορρόφησης της κυψελίδας με μεθανόλη. Το περιεχόμενο της κυψελίδας απορρίπτεται και ξεπλένεται με μεθανόλη.
2. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 3.9 mL stock διαλύματος DPPH με σιφώνιο και 0.1 mL εκχυλίσματος με αυτόματη πιπέτα. Το διάλυμα αφήνεται σε σκιερό μέρος για 30 λεπτά, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση δέσμευσης των ελευθέρων ριζών του DPPH από τις αντιοξειδωτικές ενώσεις του εκχυλίσματος.
3. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, το διάλυμα μεταγγίζεται από το δοκιμαστικό σωλήνα στη πλαστική κυψελίδα και μετριέται η απορρόφηση του σε μήκος κύματος 515 nm. Η απορρόφηση αποτελεί την απορρόφηση του δείγματος, As.
4. Στο σημείο αυτό μπορεί να επαναπροσδιορισθεί η απορρόφηση του control για τυχόν απώλειες στην απορρόφηση του DPPH με την πάροδο του χρόνου.
5. Από τη διαφορά των απορροφήσεων του control και των δειγμάτων (Ac-As) μπορεί να προσδιορισθεί μέσω της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς η ισοδύναμη συγκέντρωση Trolox λύνοντας ως προς x. Η συγκέντρωση αυτή μπορεί στη συνέχεια να εκφραστεί είτε ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος είτε ανά μάζα ξηρού δείγματος πριν την εκχύλιση, εάν έχει προηγηθεί ο υπολογισμός της απόδοσης της εκχύλισης (ανάκτηση στερεών).

3. Πειραματικό Μέρος

3.3.13.4. Προσδιορισμός Ολικών Χλωροφυλλών και Καροτενοειδών

Το πρωτόκολλο προσδιορισμού των ολικών χλωροφυλλών και καροτενοειδών που ακολουθείται αναλύεται παρακάτω:

1. Πρώτα, 50 mg από το στερεό δείγμα (*Saccharina Latissima*) γνωστής υγρασίας ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό και τοποθετείται σε γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου.
2. Στον ίδιο σωλήνα προστίθεται 5 mL υδατικού διαλύματος ακετόνης 90% και ασφαρίζεται με parafilm για να μην εξατμιστεί.
3. Κάθε ένας σωλήνας αναδεύεται στο vortex για 3 λεπτά ώστε να ομογενοποιηθεί το δείγμα.
4. Οι γυάλινοι σωλήνες τοποθετούνται σε κατάψυξη στους -18°C για επώαση 24 ωρών.
5. Μετά το πέρας αυτών των ωρών αναδεύονται στο vortex για 2 λεπτά ώστε να ομογενοποιηθεί το δείγμα ξανά.
6. Αφού τα δείγματα έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρούνται στις 3000 στροφές για 10 λεπτά.
7. Το υπερκείμενο υγρό προσεκτικά μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία και φωτομετρείται στα μήκη κύματος 750, 664, 647, 630, 510 και 480 nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται το υδατικός διάλυμα ακετόνης 90% για το μηδενισμό της απορρόφησης πριν την μέτρηση του δείγματος.

Τα μήκη κύματος στα οποία μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων συνδέονται με την απορρόφηση διαφορετικών ενώσεων:

- 750 nm: έλεγχος, κανονικά έχουμε μηδενική απορρόφηση χλωροφυλλών
- 664, 647, 630 nm: μήκη κύματος που απορροφούν οι χλωροφύλλες
- 510, 480 nm: μήκη κύματος που απορροφούν τα καροτενοειδή

Οι τελικές απορροφήσεις (A) των δειγμάτων προέκυψαν μετά την αφαίρεση των απορροφήσεων κάθε δείγματος για το μήκος κύματος 750, από τις αρχικές απορροφήσεις που μετρήθηκαν στα διάφορα μήκη κύματος πλην των 750 nm.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης χρωστικών στον μετρούμενο όγκο καλλιέργειας έγινε με τη χρήση των παρακάτω εξισώσεων (Jeffrey and Humphrey, 1975). Οι συγκεντρώσεις C_a , C_b , C_c αφορούν τις διάφορες χλωροφύλλες που απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος και η συγκέντρωση C_p τα καροτενοειδή.

$$C_a \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) = 11.85 \cdot A_{664} - 1.54 \cdot A_{647} - 0.08 \cdot A_{630} \quad (8)$$

$$C_b \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) = 21.03 \cdot A_{647} - 5.43 \cdot A_{664} - 2.66 \cdot A_{630} \quad (9)$$

$$C_c \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) = 24.52 \cdot A_{630} - 1.67 \cdot A_{664} - 7.60 \cdot A_{647} \quad (10)$$

$$C_p \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) = 7.60 \cdot A_{480} - 1.49 \cdot A_{510} \quad (11)$$

3. Πειραματικό Μέρος

3.3.13.5. Προσδιορισμός Φυκοκυανών

Για το προσδιορισμό της φυκοκυανίνης που περιέχεται στο φύκος, καθώς και στα στερεά εκχυλίσματα που λήφθηκαν μετά από τη κατάψυξη υπό κενό των υδατικών εκχυλισμάτων ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο πειραματικής διαδικασίας:

1. Πρώτα παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων συγκέντρωσης 100 mM. Σε 1 L απιονισμένο νερό προστίθεται 8.66 g όξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) και 4.68 g δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4) και έπειτα αναδεύεται καλά μέχρι την πλήρη διάλυση των αλάτων.
2. Σε γυάλινο σωλήνα φυγόκεντρου τοποθετούνται 50 mg δείγματος γνωστής υγρασίας.
3. Σε κάθε σωλήνα προστίθεται 10 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM. Όλα τα δείγματα, έπειτα, ασφαλίζονται με parafilm ώστε να μην εξατμιστεί ο διαλύτης.
4. Τα δείγματα αναδεύονται καλά σε vortex για 2 λεπτά και αφήνονται στο ψυγείο για 24 ώρες.
5. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, αναδεύονται ξανά στο vortex για 2 λεπτά, μέχρι να ομογενοποιηθεί το δείγμα.
6. Αφού τα δείγματα έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($5 - 10^\circ\text{C}$), φυγοκεντρώνονται στις 5000 rpm για 5 λεπτά.
7. Πριν την φωτομέτρηση των δειγμάτων, ελέγχεται η απορρόφηση της ακετόνης σε μήκος κύματος 750 nm. Αν είναι μεγαλύτερη από 0.05 η μέτρηση αφαιρείται από την μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων.
8. Ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης τους στο φωτόμετρο. Αρχικά μεταφέρεται το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρωσης προσεκτικά σε κυψελίδα χαλαζία, η οποία μετά από κάθε μέτρηση ξεπλένεται και χρησιμοποιείται για την επόμενη μέτρηση. Είναι χρησιμότερο να χρησιμοποιείται μία κυψελίδα για όλα τα δείγματα για να αποφευχθούν σφάλματα ανάμεσα στις μετρήσεις που έχουν να κάνουν με την ποιότητα κατασκευής της κυψελίδας.
9. Η φωτομέτρηση γίνεται σε μήκος κύματος 620 nm. Ως τυφλό δείγμα, για την μέτρηση της απορρόφησης του διαλύτη, χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων.

Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας της φυκοκυανίνης ανά ξηρή μάζα φύκος C-Phycocyanin (PC) ακολουθείται η παρακάτω μαθηματική σχέση των Boussiba S & A Richmond (1979) [100]:

$$\% \text{pure C-PC} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{\left(A_{620} \cdot \frac{10 [\text{mL}]}{100} \right)}{7.3 \cdot \text{μάζα δείγματος} [\text{mg}] \cdot \% \text{ξηρό βάρος}} \quad (12)$$

Όπου % ξηρό βάρος βρίσκεται μέσα από το ποσοστό της υγρασίας περιέχεται στο δείγμα. Το κάθε δείγμα φύκος αποθηκεύεται σε ξηραντήρα και ξηραίνεται σε φούρνο μέχρι η μάζα να λάβει σταθερή τιμή, ώστε να μη περιέχεται υγρασία (μηδενική υγρασία).

3.3.13.6. Προσδιορισμός Πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford

Για το προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα υγρά εκχυλίσματα που παράχθηκαν ακολουθείται η μέθοδος Bradford, κατά την οποία η χρωστική ουσία (Coomassie Brilliant Blue G 250) συνδέεται με το μόριο της πρωτεΐνης το οποίο οδηγεί

3. Πειραματικό Μέρος

με την σειρά του σε ένα σύμπλοκο διαφορετικού χρώματος και απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Πρωτύτερα της μέτρησης των δειγμάτων, απαιτείται να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς πρότυπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Τα πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιούν ως πρωτεΐνη το πρότυπο αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin). Για κάθε εκχύλισμα που έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετικές διαλύτης από το νερό πρέπει να φτιαχτεί νέα καμπύλη αναφοράς. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για τα εκχυλίσματα που ο διαλύτης είναι το νερό είναι η εξής:

1. Παρασκευάζεται διάλυμα αλβουμίνης συγκέντρωσης 1 mg/mL διαλύοντας 100 mg αλβουμίνης βόειου ορού, αφού ζυγιστούν σε αναλυτικό ζυγό, σε 100 mL αφιονισμένου νερό σε σφαιρική φιάλη των 100 mL.
2. Από το αρχικό διάλυμα αλβουμίνης, λαμβάνεται 1 mL και αραιώνονται στα 25 mL αφιονισμένου νερού. Το διάλυμα αυτό είναι το πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης.
3. Σε έξι (6) δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται με την σειρά 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 mL πρότυπου διαλύματος. Ο δοκιμαστικός σωλήνας που δεν περιέχει αλβουμίνη χρησιμοποιείται ως το τυφλό δείγμα και δεν περιέχει αλβουμίνη.
4. Στη συνέχεια προστίθεται με την σειρά 5 4.5, 4, 3, 2, 1 mL αφιονισμένου νερού.
5. Σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 5 mL από το υγρό εκχύλισμα προς εξέταση.
6. Μόνο αφότου έχουν προετοιμαστεί τα διαλύματα στους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 5 mL από το αντιδραστήριο Bradford σε κάθε έναν από τους επτά πλέον δοκιμαστικούς, το οποίο πριν φυλάσσεται σε σκιερό μέρος.
7. Τα διαλύματα αναδεύονται ισχυρά σε vortex για μερικά λεπτά το κάθε ένα και έπειτα αφήνονται σε ηρεμία για 5 λεπτά.
8. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, τα διαλύματα μεταφέρονται σε κυψελίδες χαλαζία και φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 595 nm.
9. Οι μετρήσεις της απορρόφησης πρέπει να έχουν ολοκληρωθεί εντός μίας ώρας για αποφυγή αλλοίωσης του διαλύματος.
10. Η απορρόφηση του δείγματος σε μήκος κύματος 595 nm εισάγεται στη καμπύλη αναφοράς με σκοπό την εύρεση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.

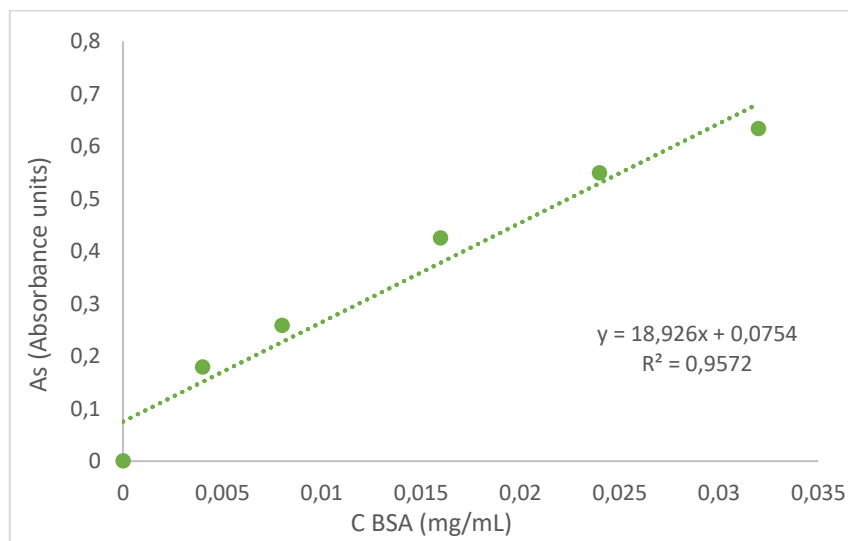
Τα δεδομένα της καμπύλης βαθμονόμησης με διαλύτη το νερό που λήφθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 9. Δεδομένα συγκέντρωσης αλβουμίνης βόειου ορού και απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm για την καμπύλη βαθμονόμησης με διαλύτη απιονισμένο νερό.

C_BSA (mg/mL)	As
0	0
0.004	0.179
0.008	0.258
0.016	0.424
0.024	0.548
0.032	0.633

3. Πειραματικό Μέρος

Η απορρόφηση του τυφλού δείγματος με νερό είναι $A_{\text{τυφλού}} = 0.396$ και έχει ήδη αφαιρεθεί από τις μετρήσεις της απορρόφησης. Το διάγραμμα της καμπύλης βαθμονόμησης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4.



Διάγραμμα 4. Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης βόειου ορού σε μήκος και απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm με διαλύτη απιονισμένο νερό.

Η γραμμική γραφική παράσταση της απορρόφησης σε σχέση με τη συγκέντρωση του δείγματος σε πρωτεΐνες είναι η εξής: $y = 18.926 \cdot x - 0.0754$ με συντελεστή γραμμικής παρεμβολής $R^2 = 0.9572$, πράγμα που δείχνει την γραμμικότητα της συσχέτισης.

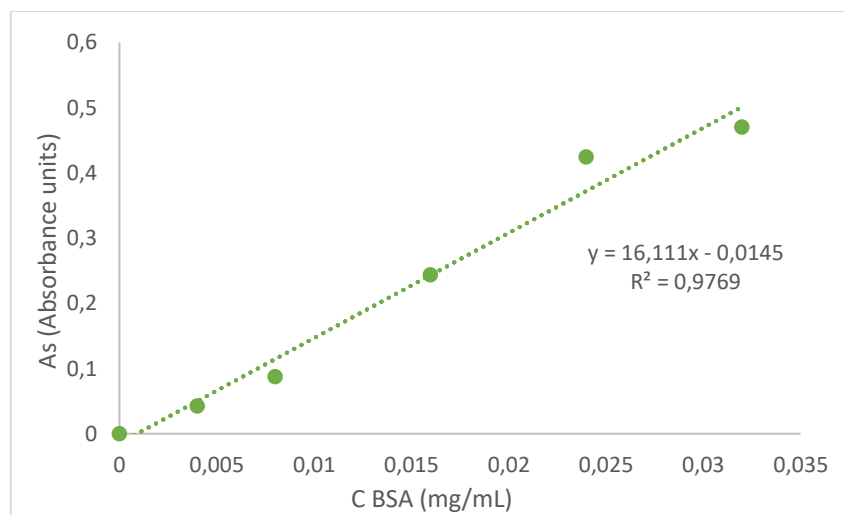
Τα δεδομένα της καμπύλης βαθμονόμησης με διαλύτη διάλυμα νερού/μεθανόλης αναλογίας 80/20 που λήφθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 10. Δεδομένα συγκέντρωσης αλβουμίνης βόειου ορού και απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm για την καμπύλη βαθμονόμησης με διαλύτη νερό/μεθανόλη σε αναλογία 80/20.

C_BSA (mg/mL)	As
0	0
0.004	0.042
0.008	0.087
0.016	0.243
0.024	0.424
0.032	0.470

Η απορρόφηση του τυφλού δείγματος με νερό/μεθανόλη 80/20 είναι $A_{\text{τυφλού}} = 0.559$ και έχει ήδη αφαιρεθεί από τις μετρήσεις της απορρόφησης. Το διάγραμμα της καμπύλης βαθμονόμησης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 5.

3. Πειραματικό Μέρος



Διάγραμμα 5. Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης βόειου ορού σε μήκος και απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm με διαλύτη νερό/μεθανόλη 80/20.

Για να ελεγχθεί σε ποια εκχυλίσματα από αυτά που εξετάστηκαν που περιέχουν οργανικούς διαλύτες μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος Bradford εξετάζεται το κατά πόσο μπορεί να διαλυτοποιηθεί η αλβουμίνη βόειου ορού σε κάθε έναν. Η μέθοδος που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

1. Οι διαλύτες που ελέγχονται είναι: καθαρή αιθανόλη, μεθανόλης, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, διάλυμα αιθανόλης/νερού αναλογίας 80/20 και διάλυμα νερού/μεθανόλης 80/20.
2. Παρασκευάζεται διάλυμα αλβουμίνης συγκέντρωσης 1 mg/mL διαλύοντας 20 mg αλβουμίνης βόειου ορού σε 20 mL από τους παραπάνω διαλύτες, αφού ζυγιστούν σε αναλυτικό ζυγό, μεταφέρονται σε γυάλινο φιαλίδιο που πωματίζεται.
3. Τα διαλύματα αναδεύονται μηχανικά μέσω μαγνητικού αναδευτήρα για μία μέρα και ελέγχονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

4. Αποτελέσματα

4.1. Χαρακτηρισμός Διαλυμάτων Ζεΐνης για τον Ηλεκτροψεκασμό

Αρχικά, οι οπτικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι το αποτελεσματικότερο μίγμα ήταν αυτό που περιείχε οξικό οξύ και αιθανόλη. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, το νερό χρησιμοποιήθηκε σε χαμηλή αναλογία λόγω της δυσκολίας διάλυσης της ζεΐνης. Τα Μίγματα 2 και 12 δεν ήταν κατάλληλα για τη μέθοδο ηλεκτροψεκασμού διότι ήταν θολά, ενώ τα Μίγματα 1 και 5 έως 11 δημιούργησαν διαυγές διάλυμα χωρίς αιωρούμενα στερεά. Τα διαλύματα που παρουσίασαν τη καλύτερη οπτική διαύγεια και διαλυτότητα της ζεΐνης και του σαλικυλικού οξέος ήταν τα Μίγματα 3, 4 και 8 όπου η αναλογία διαλυτών είναι 75/25 EtOH/AcOH. Μεγαλύτερες ποσότητες ζεΐνης παρουσιάζουν δυσκολία στην διάλυση, όπως προέκυψε από τα προκαταρκτικά πειράματα. Τα διαλύματα που είναι θολά ή που παρουσιάζουν αδιάλυτα στερεά σωματίδια δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον ηλεκτροστατικό ψεκασμό.

Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας ηλεκτροψεκασμού και ο επιτυχής σχηματισμός σωματιδίων επηρεάζονται από διάφορες παραμέτρους, όπως η επιφανειακή τάση και η ηλεκτρική αγωγιμότητα των παρασκευασμένων διαλυμάτων ζεΐνης. Ο σχηματισμός του κώνου Taylor στη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της επιφανειακής τάσης και του ηλεκτρικού πεδίου [103]. Το ακροφύσιο που σχηματίζει τζετ παράγει σταθερή ροή φορτισμένων σταγονιδίων όταν η επιφανειακή τάση του διαλύματος είναι χαμηλή. Κάθε υδατικό διάλυμα με αιθανόλη παρουσιάζει χαμηλότερη επιφανειακή τάση από το νερό. Η ζεΐνη, ως αμφιφιλική ένωση, επηρεάζει την επιφανειακή τάση του διαλύματος, μειώνοντάς την. Η επιφανειακή τάση επηρεάζει επίσης τη μορφολογία των σωματιδίων, καθώς υψηλότερες τιμές οδηγούν σε παραγωγή ινών αντί σφαιριδίων [104]. Η συγκέντρωση της μήτρας επηρεάζει την ηλεκτρική αγωγιμότητα λόγω των ιονισίμων ομάδων που περιέχονται στο μόριο [105]. Όπως παρατηρήθηκε στον Πίνακα 11, η αύξηση της ποσότητας οξικού οξέος οδήγησε σε αύξηση της επιφανειακής τάσης των διαλυμάτων, όπως παρατηρήθηκε στα Δείγματα 5, 6 και 10. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της επιφανειακής τάσης με την αύξηση του ποσοστού φόρτωσης σαλικυλικού οξέος (%DL) μεταξύ των Δειγμάτων 6 έως 9 και 11, καθώς και μεταξύ 5 και 12. Η παρουσία του σαλικυλικού οξέος δεν επηρέασε την επιφανειακή τάση σε σύγκριση με τα blank δείγματα που δεν περιέχουν σαλικυλικό οξύ. Η υψηλότερη τιμή επιφανειακής τάσης, 30.164 mN/m, παρουσιάστηκε στο Δείγμα 2 που περιέχει 90% οξικό οξύ και 10% ποσοστό φόρτωσης σε σαλικυλικό οξύ. Η δεύτερη υψηλότερη τιμή, 27.13 mN/m, παρουσιάστηκε στο Δείγμα 4 του ίδιου συστήματος διαλυτών αλλά χωρίς την παρουσία σαλικυλικού οξέος (blank). Ο σχηματισμός του βέλτιστου κώνου Taylor επιτεύχθηκε με τη χρήση αναλογίας διαλυτών αιθανόλη/οξικό οξύ 75/25.

4. Αποτελέσματα

Πίνακας 11. Ηλεκτρική αγωγιμότητα και επιφανειακή τάση για τον χαρακτηρισμό των διαλυμάτων ζείνης.

Δείγμα	Αναλογία Διαλυτών	% DL	Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (μS/cm)	Επιφανειακή Τάση (mN/m)
1	90/10 EtOH/H ₂ O	10	131.2	23.28
2	90/10 AcOH/ H ₂ O	10	119.4	30.16
3	90/10 EtOH/ H ₂ O	blank	97.3	23.25
4	90/10 AcOH/ H ₂ O	blank	99.8	27.13
5	90/10 EtOH/AcOH	10	93.7	22.37
6	75/25 EtOH/AcOH	10	98.1	23.47
7	75/25 EtOH/AcOH	20	96.1	23.49
8	75/25 EtOH/AcOH	30	95.7	23.64
9	75/25 EtOH/AcOH	40	94.5	23.71
10	65/35 EtOH/AcOH	10	94.4	24.11
11	75/25 EtOH/AcOH	blank	96.2	23.28
12	90/10 EtOH/AcOH	blank	63.4	22.17

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 11, μειώθηκε με την αύξηση του ποσοστού φόρτωσης σε σαλικυλικό οξύ, όπως παρατηρήθηκε στα Δείγματα 6 έως 9 και μεταξύ των 1 και 3. Η υψηλότερη τιμή ηλεκτρικής αγωγιμότητας παρατηρήθηκε στα Δείγματα 1 και 2, τα οποία περιέχουν την ίδια ποσότητα νερού, αλλά το πρώτο περιέχει αιθανόλη και το δεύτερο οξικό οξύ στο μίγμα. Με την αντικατάσταση του νερού με οξικό οξύ (Δείγμα 5), η ηλεκτρική αγωγιμότητα μειώθηκε. Τα blank δείγματα παρουσίασαν χαμηλότερη ηλεκτρική αγωγιμότητα σε σύγκριση με τα φορτωμένα με σαλικυλικό οξύ δείγματα. Το διάλυμα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε σαλικυλικό οξύ (40%) παρουσίασε το βέλτιστο συνδυασμό ηλεκτρικής αγωγιμότητας και επιφανειακής τάσης για τη συγκεκριμένη διαδικασία.

4.2. Χαρακτηρισμός Διαλυμάτων Χιτοζάνης/Πολυβινυλικής Αλκοόλης για τον Ηλεκτροψεκασμό

Από τα διαλύματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, αυτό που χρησιμοποιήθηκε προς παραγωγή σωματιδίων μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού είναι το Μίγμα 9. Τα Μίγματα 1 έως 4 είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθούν διότι η χιτοζάνη δεν μπορούσε να διαλυτοποιηθεί, ειδικότερα τα Μίγματα 1 και 2 είχαν την μορφή τζελ, ενώ στα 3 και 4 παρατηρήθηκε πως στον πυθμένα είχε καθιζάνει μέρος της ουσίας. Στο Μίγμα 5 είχαν διαλυτοποιηθεί επαρκώς οι ουσίες, κατά τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό δεν ήταν εφικτός όμως ο σχηματισμός σωματιδίων λόγω πολύ χαμηλής συγκέντρωσης. Πιο συγκεκριμένα αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως δεν μπορούσαν να συλληχθούν στερεά σωματίδια, αλλά μόνο σταγονίδια. Στο Μίγμα 6 παρατηρήθηκε πως η χιτοζάνη δεν μπορούσε να διαλυτοποιηθεί παρά την ανάμιξη με πολυβινυλική αλκοόλη, σχηματίζοντας τζελ. Στα Μίγματα 7 και 8 παρά την χαμηλή συγκέντρωση χιτοζάνης, ένα μικρό μέρος της καθίζανε στο πυθμένα, σχηματίζοντας θολό διάλυμα κατά την ανακίνηση.

4. Αποτελέσματα

4.3. Βελτιστοποίηση Διεργασίας Ηλεκτροψεκασμού

Η βελτιστοποίηση της διεργασίας του ηλεκτροψεκασμού γίνεται σε σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες μέσω δοκιμών μεταβάλλοντας την απόσταση της βελόνας από τον δίσκο συλλογής, την ροή του υγρού και την ηλεκτρική τάση. Στους παρακάτω δύο πίνακες, Πίνακας 12 και 13, παρουσιάζονται αναλυτικά οι διάφορες δοκιμές που έγιναν για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ηλεκτροψεκασμού με τις δύο διαφορετικές μήτρες.

Πίνακας 12. Πειραματικές συνθήκες ηλεκτροψεκασμού-απόσταση βελόνας/δίσκου συλλογής, ηλεκτρικό δυναμικό και ροή υγρού- για το διάλυμα ζεΐνης.

Απόσταση βελόνας-δίσκου συλλογής (cm)	Ηλεκτρική Τάση (kV)	Ροή Υγρού (mL/hr)
10	12	0.3
10	16	0.3
10	18	0.3
10	20	0.3
10	22	0.8
10	20	0.25
10	22	0.25
10	24	0.25
10	22	0.25
10	22	0.3

Αρχικά, κατά τη βελτιστοποίηση της διεργασίας του ηλεκτροψεκασμού των διαλυμάτων ζεΐνης με σαλικυλικό οξύ επιβάλλεται ηλεκτρικό πεδίο χαμηλής τάσης για να μεταβεί ισορροπημένα στο στάδιο του σχηματισμού του κώνου Taylor. Διάφορες τιμές ηλεκτρικής τάσης δοκιμάζονται μέχρι να βρεθεί σε ποια τιμή σχηματίζεται κώνος Taylor με σταθερή ροή ψεκασμού. Στις χαμηλές τιμές ηλεκτρικής τάσης που η ογκομετρική ροή του υγρού είναι 0.3 παρατηρείται πως η ροή δεν είναι σταθερή και στο δίσκο συλλογής ψεκάζονται σταγονίδια αντί για στερεά σωματίδια. Δοκιμάζεται επίσης και υψηλότερη ροή, 0.8 mL/hr για να ελεγχθεί η επίδραση της ροής στο ψεκασμό και παρατηρείται πως μικρά σταγονίδια ψεκάζονται και ο κώνος Taylor λαμβάνει κυκλικό σχήμα. Με μείωση της ροής στα 0.25 mL/hr ο κώνος Taylor διαμορφώνεται αλλά δεν εμφανίζει σταθερή ροή. Αντίθετα όταν η ηλεκτρική τάση και η ροή αυξάνονται στα 22 kV και 0.3 mL/hr, αντίστοιχα με τη ροή να σταθεροποιείται, σχηματίζεται κώνος Taylor και στερεά σωματίδια.

Πίνακας 13. Πειραματικές συνθήκες ηλεκτροψεκασμού-απόσταση βελόνας/δίσκου συλλογής, ηλεκτρικό δυναμικό και ροή υγρού- για το διάλυμα χιτοζάνης.

Απόσταση βελόνας-δίσκου συλλογής (cm)	Ηλεκτρική Τάση (kV)	Ροή Υγρού (mL/hr)
10	18	0.25
10	18	0.3
10	18.5	0.3
10	19.3	0.3
10	20	0.3

4. Αποτελέσματα

10	21	0.3
10	22	0.3
10	23.7	0.3
11	24	0.25
11	24.7	0.3
12	25	0.3
12	25.7	0.3

Επειδή το διάλυμα της χιτοζάνης περιέχει νερό απαιτείται μεγαλύτερη απόσταση ανάμεσα στον κώνο Taylor και του δίσκου συλλογής προκυμμένου ο διαλύτης να καταφέρει να εξατμιστεί, σε σχέση με το διάλυμα ζεΐνης. Η μεγαλύτερη ηλεκτρική τάση οφείλεται στη διαφορετική ηλεκτρική αγωγιμότητα που έχουν οι διαλύτες. Η ροή είναι μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους της διεργασίας, μιας και καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το σχήμα αλλά και το σχηματισμό σωματιδίων. Υψηλές τιμές ροής οδηγούν στο σχηματισμό μικρό-σταγονιδίων και όχι στερεών σωματιδίων, πράγμα που είναι ανεπιθύμητο. Οι διάφορες δοκιμές παραμέτρων που έγιναν με σκοπό την παραγωγή σωματιδίων κατέδειξαν πως οι βέλτιστες συνθήκες για τα διαλύματα ζεΐνης είναι ροή υγρού 0.3 mL/h, απόσταση κώνου Taylor από δίσκο συλλογής σωματιδίων 10 cm και ηλεκτρική τάση 22 kV, ενώ για τα διαλύματα χιτοζάνης είναι ροή υγρού 0.3 mL/h, απόσταση κώνου Taylor από δίσκο συλλογής σωματιδίων 12 cm και ηλεκτρική τάση 25.7 kV.

4.4. Απόδοση Ηλεκτροϋδροδυναμικής Διεργασίας - Ανάκτηση Στερεού

4.4.1 Απόδοση Ηλεκτροϋδροδυναμικής Διεργασίας Ζεΐνης/Σαλικυλικού Οξέος

Η ανάκτηση ή αλλιώς απόδοση της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας είναι μία πολύ σημαντική παράμετρος που εκτιμά της αποδοτικότητα της παραγωγής μικρο-σωματιδίων. Η απόδοση παραγωγής της διαδικασίας ηλεκτροψεκασμού υπολογίστηκε βάσει της Εξίσωσης 1. Η απόδοση παραγωγής των μικροσωματιδίων ζεΐνης φορτωμένων με σαλικυλικό οξύ μεταβλήθηκε ανάλογα με το ποσοστό φόρτωσης σε σαλικυλικό οξύ (%DL = 10, 20, 30, 40). Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται οι ποσοστιαίες ανακτήσεις των παραγμένων στερεών σωματιδίων συγκριτικά με τα στερεά συστατικά που περιέχονται στο διάλυμα που καταναλώθηκε στον ηλεκτροψεκασμό. Οι τιμές της απόδοσης παραγωγής κυμαίνονταν από 68.5% έως 96% και αυξήθηκαν με την αύξηση του ποσοστού φόρτωσης.

Πίνακας 14. Απόδοση διεργασίας ηλεκτροψεκασμού εγκλεισμένου σαλικυλικού οξέος σε ζεΐνη σε σχέση με το ποσοστό φόρτωσης στην εγκλεισμένη ουσία και η τυπική απόκλιση.

% Ποσοστό φόρτωσης SA	% Μέση Ανάκτηση Στερεών Σωματιδίων (%A)	% Τυπική Απόκλιση
10%	68.5%	1.5%
20%	74.2%	0.8%
30%	85.7%	0.6%
40%	96.0%	0.9%

4. Αποτελέσματα

Η μέγιστη απόδοση παραγωγής, 96%, επιτεύχθηκε στη μέγιστη τιμή φόρτωσης φαρμάκου (40%). Για ποσοστό φόρτωσης σε σαλικυλικό οξύ 10% ανακτάται μεγαλύτερη από το μισό ποσότητα των συστατικών σε μορφή εγκλεισμένων σωματιδίων. Ο λόγος που στα μικρότερα ποσοστά φόρτωσης η ανάκτηση είναι πιο μικρή είναι επειδή παρουσιάζει δυσκολία ανάκτησης από το μεταλλικό δίσκο συλλογής, με αποτέλεσμα να είναι υψηλές οι απώλειες. Σε υψηλότερα ποσοστά σαλικυλικού οξέος η συλλογή είναι ευκολότερη, διότι το σαλικυλικό οξύ ανασχηματίζεται μετά τον ηλεκτροψεκασμό πάλι σε κρύσταλλο. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, επίσης, παρατηρήθηκε πως τα διαλύματα που περιέχουν υψηλότερο ποσοστό σαλικυλικού οξέος επιδεικνύουν υψηλότερη ικανότητα για συνεχή σταθερή ροή του ψεκασμού, χωρίς να δημιουργούνται θρόμβοι που να διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία. Το γεγονός πως η τιμή της τυπικής απόκλισης των πειραμάτων που διεξήχθησαν είναι χαμηλή υποδηλώνει την καλή αναπαραγωγιμότητα της πειραματικής διαδικασίας.

4.4.2. Απόδοση Ηλεκτροϋδροδυναμικής Διεργασίας Χιτοζάνης/Πολυβινυλικής Αλκοόλης

Η απόδοση παραγωγής των μικροσωματιδίων χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης λαμβάνει μέση τιμή στα 19.9% με τυπική απόκλιση 1.6%, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Απόδοση διεργασίας ηλεκτροψεκασμού παραγωγής σωματιδίων χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης και η τυπική απόκλισή τους.

% Μέση Ανάκτηση Στερεών Σωματιδίων (%A)	% Τυπική Απόκλιση
19.9%	1.6%

Η διαδικασία ηλεκτροστατικού ψεκασμού για την παραγωγή σωματιδίων χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης χαρακτηρίζεται από χαμηλή απόδοση, γεγονός που περιορίζει την κλιμάκωση της παραγωγής και αυξάνει το κόστος παραγωγής ανά μονάδα προϊόντος. Προκειμένου να γίνει η μέθοδος οικονομικά βιώσιμη και ανταγωνιστική έναντι των συμβατικών μεθόδων ενίσχυσης της ανάπτυξης των φυτών, είναι επιτακτική η διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν την αποδοτικότητα της διεργασίας. Το γεγονός πως η τιμή της τυπικής απόκλισης των πειραμάτων που διεξήχθησαν είναι χαμηλή υποδηλώνει την καλή αναπαραγωγιμότητα της πειραματικής διαδικασίας.

4.5. Απόδοση Εγκλεισμού Σαλικυλικού Οξέος σε Ζεΐνη

Η απόδοση του εγκλεισμού του σαλικυλικού οξέος στα σωματίδια ζεΐνης προσδιορίστηκε με φασματομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-VIS) στα 234 nm, σύμφωνα με την Εξίσωση 2. Η αξιολόγηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των παρασκευασμένων διαλυμάτων που έγινε σε προηγούμενη ενότητα έδειξε ότι η αναλογία διαλυτών αιθανόλη/οξικό οξύ 75/25 ήταν η καταλληλότερη για τη διαδικασία ηλεκτροψεκασμού. Οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων είναι χαμηλές, επιβεβαιώνοντας

4. Αποτελέσματα

την εγγύτητα των αποτελεσμάτων και καθιστώντας την μέθοδο ιδιαίτερα αξιόπιστη. Εξετάζονται πλέον υψηλότερα ποσοστά φόρτωσης σαλικυλικού οξέος με στόχο τη περαιτέρω βελτιστοποίηση της μεθόδου. Οι τιμές φόρτωσης που εξετάστηκαν είναι 10%, 20%, 30% και 40% και οι αποδόσεις αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16. Αποδόσεις εγκλεισμού σαλικυλικού οξέος συναρτήσει του ποσοστού φόρτωσης των σωματιδίων και η τυπική απόκλιση.

% Ποσοστό φόρτωσης SA	% Απόδοση Εγκλεισμού Σαλικυλικού Οξέος (%EE)	% Τυπική Απόκλιση
10%	26.4%	5.8%
20%	42.1%	1.0%
30%	54.6%	3.2%
40%	60.3%	5.3%

Συγκεκριμένα, δείγματα με ποσοστό φόρτωσης 10% παρουσίασαν απόδοση εγκλεισμού $26\% \pm 5.8\%$. Με την αύξηση του ποσοστού φόρτωσης στο 20%, η απόδοση εγκλεισμού αυξήθηκε στο $42\% \pm 1.0\%$. Για ποσοστό φόρτωσης 30%, η απόδοση υπολογίστηκε στο $54\% \pm 3.2\%$, ενώ για ποσοστό φόρτωσης 40%, υπολογίστηκε στο $60\% \pm 5.3\%$. Φαίνεται ότι η απόδοση εγκλεισμού σχεδόν τριπλασιάστηκε με αύξηση του ποσοστού φόρτωσης στο 40%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ποσότητα του απελευθερωμένου σαλικυλικού οξέος αυξήθηκε με την αύξηση της ποσότητας του σαλικυλικού οξέος. Η παρατήρηση αυτή είναι λογική, διότι σε μεγαλύτερο ποσοστό φόρτωσης περιέχεται μεγαλύτερη ποσότητα σαλικυλικού οξέος στο σωματίδιο που σχηματίζεται και κατά συνέπεια τόσο εσωτερικά του σωματιδίου, όσο και στις στιβάδες του περιέχεται μεγαλύτερη αναλογία σαλικυλικού οξέος. Έτσι, η διαφορά δυναμικού μεταξύ της συγκέντρωσης είναι υψηλότερη και λαμβάνουν χώρα εντονότερα φαινόμενα διάχυσης. Η υψηλή απόδοση εγκλεισμού υποδηλώνει σημαντική ενσωμάτωση του σαλικυλικού οξέος εντός των μικρο-σωματιδίων, συμβάλλοντας στην ενίσχυση της φυσικοχημικής τους σταθερότητας και προστατεύοντάς την από δυσμενείς συνθήκες αποθήκευσης. Η διαδικασία εμφάνισε σημαντική απόδοση εγκλεισμού στην περίπτωση φόρτωσης 40% με το δείγμα αυτό να χρησιμοποιείται για περαιτέρω χαρακτηρισμό.

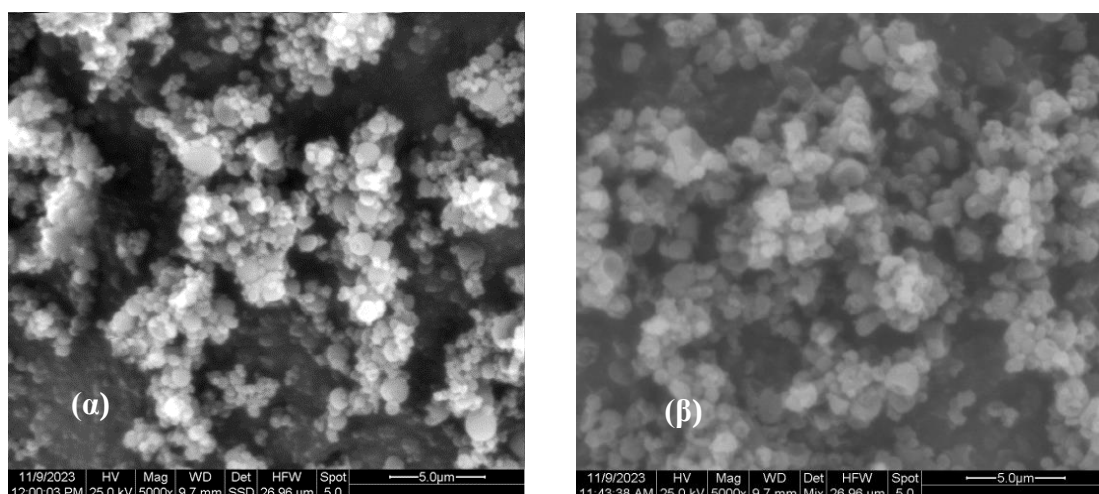
Η μέθοδος εγκλεισμού που επιλέγεται καθώς και το μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων επιδρούν στην απόδοση του εγκλεισμού [106]. Νανο-σωματίδια που παράχθηκαν και περιέχουν σαλικυλικό μεθύλιο, παράγωγο του σαλικυλικού οξέος, εγκλεισμένο σε ζεΐνη παρουσίασε απόδοση εγκλεισμού 99% [107]. Συγκεκριμένα, μικρότερο μέγεθος σωματιδίων οδηγεί σε μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής και, κατά συνέπεια, ταχύτερη απελευθέρωση σε σύγκριση με μεγαλύτερα σωματίδια. Κατά προτίμηση, το υλικό της μήτρας θα πρέπει να είναι αδιάλυτο, να μην αντιδρά με τα βιοδραστικά συστατικά, να παρουσιάζει καλές ιδιότητες σχηματισμού μεμβράνης και να προσφέρει επαρκή προστασία από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες [106].

4. Αποτελέσματα

4.6. Χαρακτηρισμός Μορφολογίας και Υδροδυναμικής Διαμέτρου Εγκλεισμένων Σωματιδίων (SEM & Microtracking Analysis)

4.6.1. Μορφολογία (SEM) και Διάμετρος Σωματιδίων Ζεΐνης

Οι εικόνες που λήφθηκαν από το λογισμικό του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM) και αναπαριστούν τη μορφολογία των σωματιδίων ζεΐνης είτε αυτά περιέχουν σαλικυλικό οξύ, είτε όχι παρουσιάζονται στην Εικόνα 12. Σε μεγέθυνση επί 5000 αποκαλύφθηκε η σφαιρική μορφολογία και η λεία επιφάνεια των παρασκευασμένων δομών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν ότι διαλύματα με συγκέντρωση ζεΐνης 10% παράγουν σφαίρες αντί ινών [108]. Η ανάλυση των εικόνων SEM έδειξε ότι το μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων κυμαίνεται από 0.6 μm έως 2 μm , επομένως, η διάμετρος ορισμένων σωματιδίων εμπίπτει στην υπο-μικρο κλίμακα.



Εικόνα 12. Μορφολογία των σωματιδίων ζεΐνης (α) με εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ, και (β) των blank σωματιδίων που λήφθηκαν από το SEM σε μεγέθυνση 5000x.

Η υδροδυναμική διάμετρος και η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων με εγκλεισμένο (DL=40%) σαλικυλικό οξύ και των κενών σωματιδίων ζεΐνης προσδιορίστηκε από τη διασπορά των μεγεθών που ανιχνευτήκαν (Microtrack). Η ανάλυση έδειξε ότι η μέση υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων που περιέχουν σαλικυλικό οξύ είναι $1.925 \pm 0.543 \mu\text{m}$ και η μέση διάμετρος των blank σωματιδίων είναι $1.843 \pm 0.64 \mu\text{m}$. Αυτό υποδηλώνει ότι τα σωματίδια που φέρουν εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ έχουν ευρύτερη υδροδυναμική διάμετρο λόγω της ποσότητας εγκλωβισμένου σαλικυλικού οξέος, γεγονός που αποτελεί ένδειξη της επιτυχούς παγίδευσης του σαλικυλικού οξέος στη ζεΐνη. Συγκρίνοντας τις τιμές διαμέτρου που μετρήθηκαν με τη μέθοδο σκέδασης φωτός (Microtrack) και την ανάλυση SEM, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο μέγεθος των μη φορτωμένων σωματιδίων.

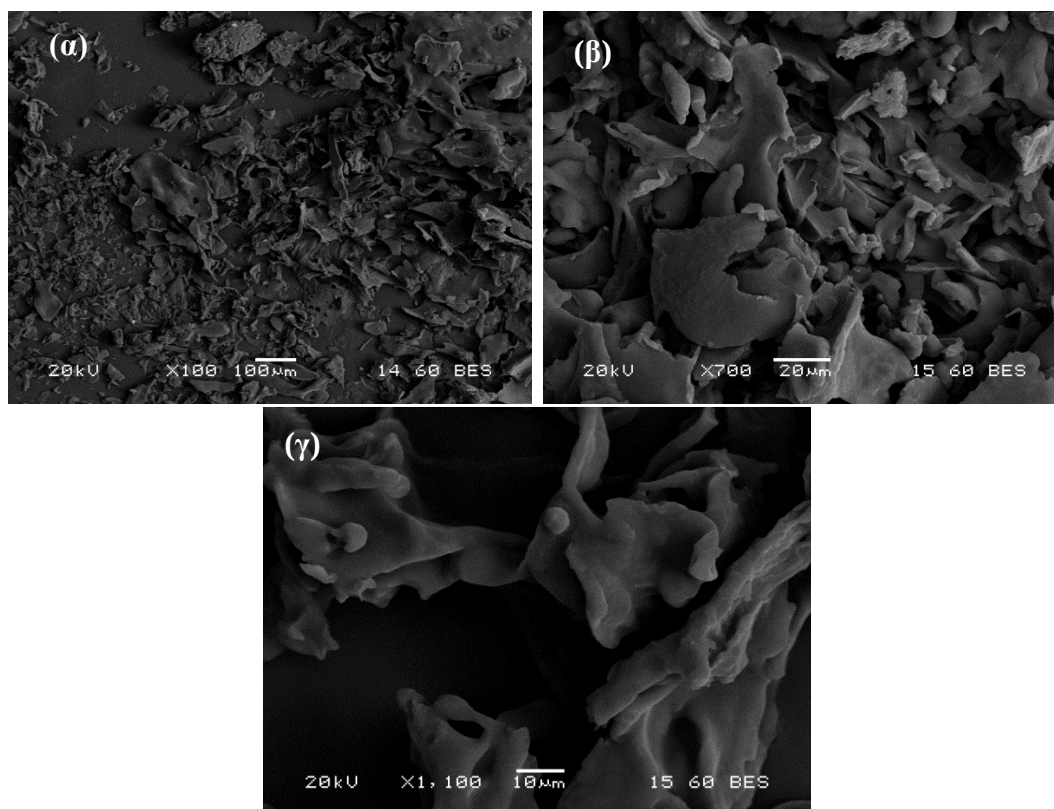
4. Αποτελέσματα

4.6.2. Μορφολογία και Διάμετρος Σωματιδίων Χιτοζάνης/Πολυβινυλικής Αλκοόλης

Οι εικόνες που λήφθηκαν από το λογισμικό του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM) και αναπαριστούν την μορφολογία των χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης, είτε όχι παρουσιάζονται στην Εικόνα 13. Η μορφολογία των σωματιδίων αυτών από τις εικόνες που λήφθηκαν μέσω του SEM αναπαριστούν σωματίδια ακανόνιστης δομής που κυμαίνονται μεταξύ των 20 με 200 μm . Από τις εικόνες που λήφθηκαν φαίνεται πως το μίγμα χιτοζάνη/πολυβινυλική αλκοόλη έχει την τάση να δημιουργεί μία ενιαία επίστρωση στερεών σωματιδίων, παρά σφαιρίδια ή ίνες. Με αποτέλεσμα κατά την λήψη τους από τον δίσκο συλλογής να το φύλλο επίστρωσης να τεμαχίζεται. Από τις εικόνες που λήφθηκαν φαίνεται πως το μίγμα χιτοζάνη/πολυβινυλική αλκοόλη αναλογίας 1/3 δημιουργεί άμορφου σχήματος σωματίδια με τραχειά επιφάνεια. Συγκρίνοντας τις εικόνες που λήφθηκαν από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με άλλες βιβλιογραφικές μελέτες φαίνεται πως η χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους έχει την ικανότητα να δημιουργεί εννιαία πλέγματα. Το αυξημένο ιξώδες του πολυμερικού διαλύματος οδηγεί σε ισχυρότερες δυνάμεις αλληλεπίδρασης των πολυμερικών αλυσίδων, το οποίο με τη σειρά του επιδρά στην μορφολογία. Η άκαμπτη δομή της χιτοζάνης μειώνεται με χρήση της πολυβινυλικής αλκοόλης [109, 111]. Η τραχειά επιφάνεια και ακανόνιστη δομή των σωματιδίων ενισχύει τις απορροφητικές ιδιότητες των σωματιδίων [110].

Η υδροδυναμική διάμετρος και η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων χιτοζάνης με πολυβινυλική αλκοόλη προσδιορίστηκε από τη διασπορά των μεγεθών που ανιχνεύτηκαν (Microtrack). Η ανάλυση έδειξε ότι η μέση διάμετρος των σωματιδίων είναι $247.7 \pm 4.98 \mu\text{m}$. Η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων είναι αρκετά μεγάλη λόγω των συσσωματωμάτων που δημιουργήθηκαν κατά τη συλλογή του στερεού από το φορέα συλλογής αλλά και των δεσμών που δημιουργεί η πολυβινυλική αλκοόλη της εξωτερικής επιφάνειας με το νερό.

4. Αποτελέσματα



Εικόνα 13. Μορφολογία σωματιδίων χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης αναλογίας 1/3 διαλύματος νερού/οξικού οξέος αναλογίας 70/30 σε μεγεθύνσεις (α) x100, (β) x700 και (γ) x1100.

4.7. Φασματομετρική Ανάλυση (FTIR/ATR)

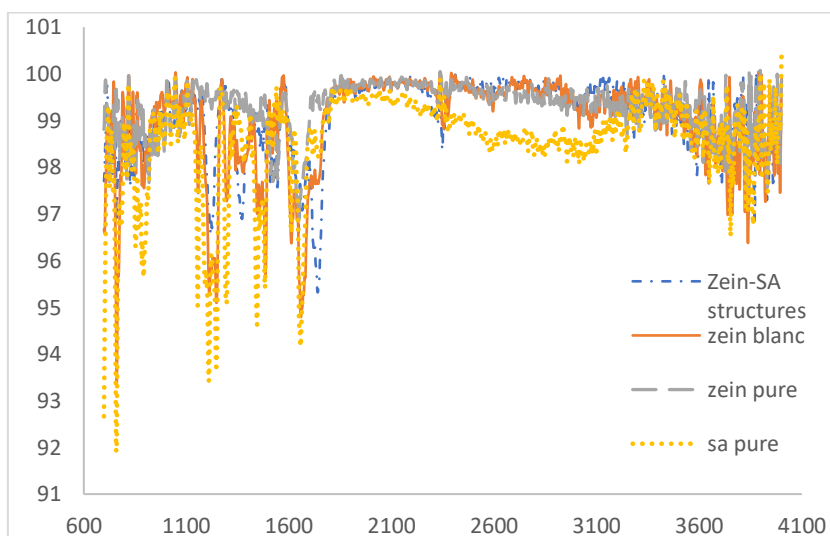
4.7.1. Φασματομετρική Ανάλυση Σωματιδίων Ζεΐνης/Σαλικυλικού Οξέος

Στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζεται το διάγραμμα της φασματομετρικής ανάλυσης FTIR των παραγμένων σωματιδίων εγκλεισμένου σαλικυλικού οξέος σε ζεΐνη, blank σωματιδίων ζεΐνης, καθώς και καθαρού σαλικυλικού οξέος και καθαρής ζεΐνης. Το FT-IR φάσμα του καθαρού σαλικυλικού οξέος, παρουσίασε μια χαρακτηριστική κορυφή στα 1656 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στην ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού $\text{C}=\text{O}$ στην καρβοξυλική ομάδα. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε κορυφή στα 1444 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσεως του δεσμού $\text{C}-\text{C}$. Οι δονήσεις τάσεως των δεσμών $\text{C}-\text{O}$ και $\text{C}-\text{OH}$ εντοπίστηκαν με κορυφές στους κυματαριθμούς 1209 και 1245 cm^{-1} αντίστοιχα, ενώ η εκτός επιπέδου δόνηση κάμψης του αρωματικού δεσμού $\text{C}-\text{H}$ αποδόθηκε με δύο κορυφές στα 698 και 757 cm^{-1} . Οι χαρακτηριστικές κορυφές του σαλικυλικού οξέος εντοπίζονται στους κυματαριθμούς 3435 cm^{-1} και 1659 cm^{-1} , οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης της ομάδας $-\text{OH}$ και του δεσμού $\text{C}=\text{O}$ της καρβοξυλικής ομάδας, αντίστοιχα. Η εκτός επιπέδου τάση του $-\text{CH}$ της ομάδας φαινόλης ταυτοποιήθηκε με κορυφές στην περιοχή κυματαριθμού $757\text{--}657\text{ cm}^{-1}$ [112, 113].

Το φάσμα FT-IR της καθαρής ζεΐνης στο Διάγραμμα 6 παρουσίασε μια χαρακτηριστική ευρεία κορυφή στα 1648 cm^{-1} που αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού $\text{C}=\text{O}$ και την αλληλεπίδραση με τους δεσμούς $\text{N}-\text{H}$ και $\text{C}-\text{N}$ στη

4. Αποτελέσματα

δευτερεύουσα δομή των α-ελικών και β-πτυχών του αμιδίου I [114, 115, 116, 117]. Η παρουσία του αμιδίου II ταυτοποιήθηκε με τις κορυφές στους κυματαριθμούς 1521 και 1544 cm^{-1} λόγω των δονήσεων του δεσμού N-H [114, 115]. Το φάσμα FT-IR των σωματιδίων εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ αποκάλυψε την απουσία των χαρακτηριστικών κορυφών στα 1209 cm^{-1} και 1245 cm^{-1} , ενώ η κορυφή στα 1444 cm^{-1} παρουσιάστηκε μετατοπισμένη στα 1509 cm^{-1} . Το φάσμα FT-IR των κενών σωματιδίων ζεΐνης παρουσίασε τις χαρακτηριστικές κορυφές του αμιδίου I κατατοπισμένες στα 1658 cm^{-1} και 1612 cm^{-1} [112]. Οι χαρακτηριστικές κορυφές του αμιδίου II της καθαρής ζεΐνης μετατοπίστηκαν στα 1457 και 1484 cm^{-1} αντίστοιχα, όταν παράχθηκαν σωματίδια, υποδηλώνοντας το σχηματισμό κενών μικροσωματιδίων. Τα σωματίδια με εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ παρουσιάζουν μια μετατοπισμένη κορυφή στο κυματαριθμό 1739 cm^{-1} που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση της αμινομάδας με την καρβοξυλική ομάδα. Οι μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών της ζεΐνης στο φάσμα της εγκλεισμένης δομής σε συνδυασμό με την απουσία της χαρακτηριστικής κορυφής του σαλικυλικού οξέος στα 1656 cm^{-1} θα μπορούσαν να αποδοθούν στον επιτυχή εγκλεισμό του σαλικυλικού οξέος στα μικρο-σφαιρίδια ζεΐνης.



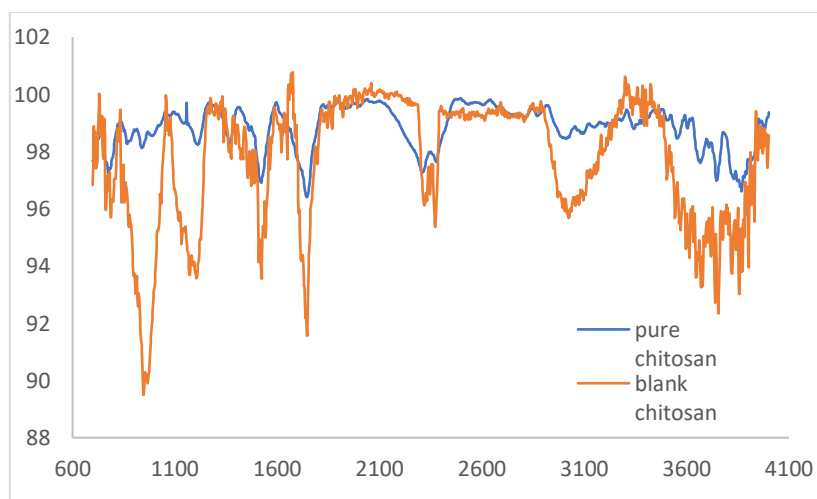
Διάγραμμα 6. Φασματομετρική ανάλυση FTIR σωματιδίων ζεΐνης με εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ, κενών, καθαρής ζεΐνης και καθαρού σαλικυλικού οξέος.

4.7.2. Φασματομετρική Ανάλυση Σωματιδίων Χιτοζάνης/Πολυβινυλικής Αλκοόλης

Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζεται το φάσμα υπερύθρου (FTIR) των παραγόμενων σωματιδίων χιτοζάνης/PVA (blank), σε σύγκριση με το φάσμα της καθαρής χιτοζάνης. Το φάσμα της καθαρής χιτοζάνης χαρακτηρίζεται από μια κορυφή σε κυματαριθμό 773 cm^{-1} , που αποδίδεται στις δονήσεις αιώρησης των ομάδων μεθυλενίου – CH_2 [118]. Επιπλέον, παρατηρείται μια κορυφή στα 1511 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης των trans-δευτεροταγών αμιδίων [119]. Τέλος, η περιοχή στους 3600-3900 cm^{-1} παρουσιάζει ευρείες ζώνες απορρόφησης, οι οποίες οφείλονται κυρίως στις δονήσεις τάσης των υδροξυλικών ομάδων O – H με σημαντική συνεισφορά από τις συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις τάσεως των δεσμών αμίνης N – H [119, 120].

4. Αποτελέσματα

Η ανάλυση FTIR των σωματιδίων χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης (Διάγραμμα 7) παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δομή των σωματιδίων που παρασκευαστήκαν. Συγκεκριμένα, η κορυφή στα 944 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών των C – H, ενώ η κορυφή στα 1135 cm^{-1} υποδεικνύει τη κρυσταλλική δομή της χιτοζάνης που διατηρήθηκε μετά την επεξεργασία με ηλεκτροπυκασμό [119, 129]. Σε κυματαριθμό 1203 cm^{-1} παρατηρείται κορυφή που αποδίδεται στις δονήσεις των άμινο-ομάδων του αμιδίου III [133]. Η παρουσία της αμιδικής ομάδας II επιβεβαιώνεται από την κορυφή στα 1521 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις κάμψης του δεσμού N – H και δείχνουν ότι η άμινο-ομάδα στο μόριο της χιτοζάνης περιέχει δεσμούς --NH_2 αντί για --NH_3^+ [126, 127, 128, 129, 133]. Επιπλέον, η κορυφή σε κυματαριθμό 1743 cm^{-1} αποδίδεται σε διμερή καρβοξυλικών οξέων, υποδεικνύοντας την παρουσία οξικού οξέος ως υπολείμματος από τη διαδικασία διαλύσεως της χιτοζάνης [128, 130]. Η πολυβινυλική αλκοόλη εντοπίζεται μέσω της κορυφής στα 2370 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις δονήσεις των ομάδων CH_2 [129]. Τέλος, οι ευρείες ζώνες απορρόφησης στις περιοχές $2900 - 3300\text{ cm}^{-1}$ και $3500 - 3900\text{ cm}^{-1}$ αποδίδονται στις δονήσεις των υδροξυλίων στο μόριο της πολυβινυλικής αλκοόλης και στους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των δύο πολυμερών, υποδηλώνοντας την επιτυχή δημιουργία σωματιδίων με δομή πλούσια σε υδρογόνο [131, 126, 127, 128, 129].



Διάγραμμα 7. Φασματομετρική ανάλυση FTIR εγκλεισμένων σωματιδίων χιτοζάνης (blank).

4.8. Θερμικές Ιδιότητες Σωματιδίων (DSC)

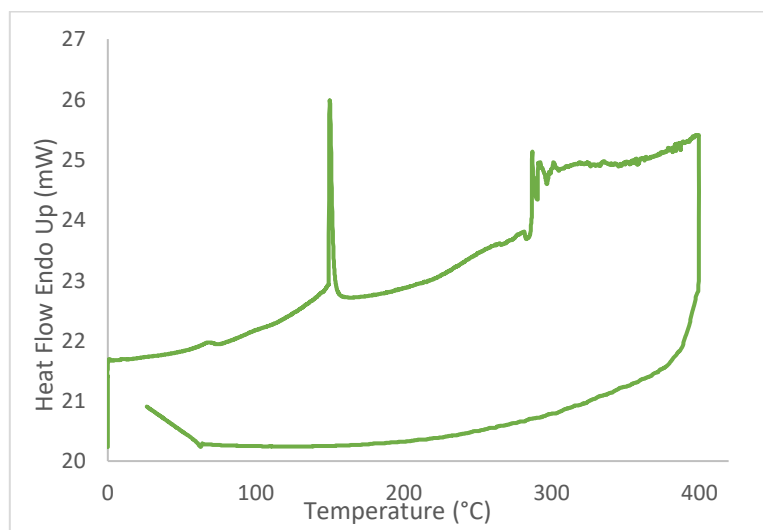
4.8.1. Θερμική Ανάλυση Σωματιδίων Ζεΐνης/Σαλικυλικού Οξέος

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) αποτελεί τεχνική ανάλυσης φυσικών και χημικών μεταβολών που συνοδεύονται από απορρόφηση ή απελευθέρωση θερμότητας. Ταυτόχρονα, καταγράφονται οι συναφείς μεταβολές θερμοκρασίας και η ποσότητα της εμπλεκόμενης θερμότητας στη διαδικασία. Τα Διάγραμματα 8 – 11 παρουσιάζει τα θερμοδιαγράμματα της καθαρής ζεΐνης, του καθαρού σαλικυλικού οξέος, του φυσικού μίγματος και των μικρο-σωματιδίων (DL=40%).

4. Αποτελέσματα

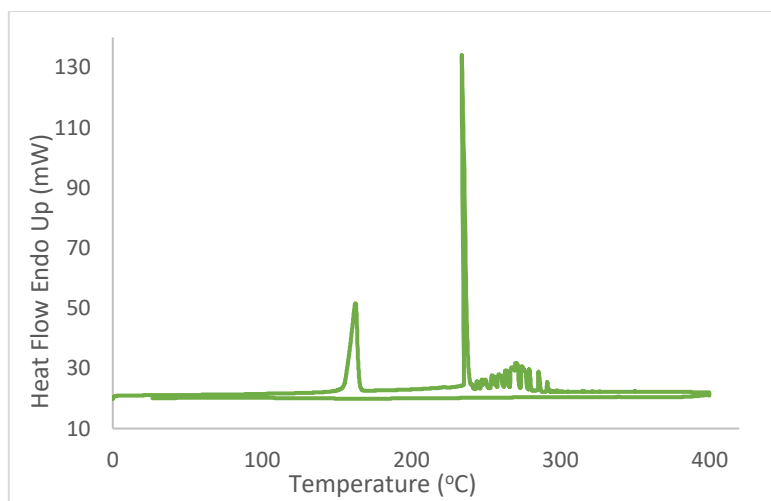
Το διάγραμμα DSC της καθαρής ζεΐνης (Διάγραμμα 8) αποκάλυψε δύο χαρακτηριστικές ενδόθερμες κορυφές. Η πρώτη, στους 68.41 °C με ενθαλπία 21.96 mW, αντιστοιχεί στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, ενώ η δεύτερη, στους 150.16 °C με ενθαλπία 25.98 mW, αποδίδεται στην αποδόμηση της πρωτεΐνης. Η αποδόμηση αυτή αντανακλά τις θερμικές αλλαγές που συνδέονται με το σπάσιμο των σταθεροποιητικών δεσμών του μορίου (δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις). Το καθαρό σαλικυλικό οξύ (Διάγραμμα 9) παρουσίασε επίσης δύο ενδόθερμες κορυφές. Η πρώτη, στους 162.66 °C με ενθαλπία 51.57 mW, αντιστοιχεί στο σημείο τήξης, ενώ η δεύτερη, στους 234.03 °C με ενθαλπία 134.09 mW, αντιστοιχεί στο σημείο αποσύνθεσης. Το φυσικό μίγμα των δύο συστατικών (Διάγραμμα 10) παρουσίασε τις χαρακτηριστικές ενδόθερμες κορυφές και των δύο, ωστόσο, με πλατύτερο προφίλ σε σύγκριση με τα προφίλ των καθαρών συστατικών [132]. Επίσης, παρατηρείται ότι δεν παρουσιάζει καμία ομοιότητα σε σχέση με το θερμικό προφίλ των σωματιδίων.

Τα εγκλεισμένα σωματίδια με 40% ποσοστό φόρτωσης σαλικυλικού οξέος παρουσίασαν τέσσερις ενδόθερμες κορυφές (Διάγραμμα 11). Η πρώτη, στους 44.75 °C με ενθαλπία 20.50 mW, αντιστοιχεί στη μετάβαση υαλώδους κατάστασης της ζεΐνης. Η δεύτερη, στους 150.64 °C με ενθαλπία 21.71 mW, αντιστοιχεί στην αποδόμηση της ζεΐνης. Η τρίτη, στους 173.27 °C με ενθαλπία 23.69 mW, αντιστοιχεί στο σημείο τήξης του σαλικυλικού οξέος, η οποία παρουσιάστηκε μετατοπισμένη σε σύγκριση με το φάσμα του καθαρού σαλικυλικού οξέος. Η τέταρτη ενδόθερμη κορυφή και αυτή μετατοπισμένη, στους 290.45 °C με ενθαλπία 26.79 mW, αντιπροσωπεύει το σημείο αποσύνθεσης του σαλικυλικού οξέος. Η μετατόπιση των κορυφών προς υψηλότερες θερμοκρασίες υποδηλώνει ενισχυμένη προστασία του σαλικυλικού οξέος εντός των σωματιδίων από την μήτρα.

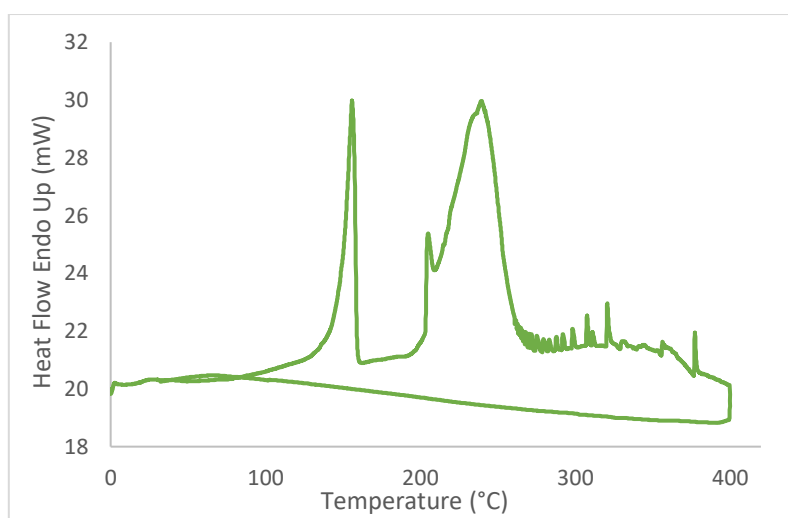


Διάγραμμα 8. DSC διάγραμμα καθαρής ζεΐνης.

4. Αποτελέσματα

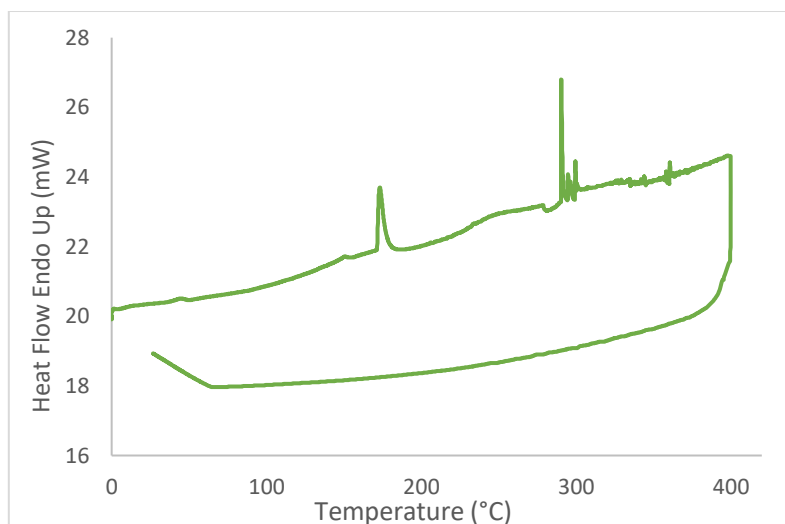


Διάγραμμα 9. DSC διάγραμμα καθαρού σαλικυλικού οξέος.



Διάγραμμα 10. DSC διάγραμμα του φυσικού μίγματος ζεϊνης και σαλικυλικού οξέος.

4. Αποτελέσματα



Διάγραμμα 11. DSC διάγραμμα σωματιδίων ζείνης με εγκλεισμένο το σαλικυλικό οξύ (75/25 EtOH/AcOH %DL=40).

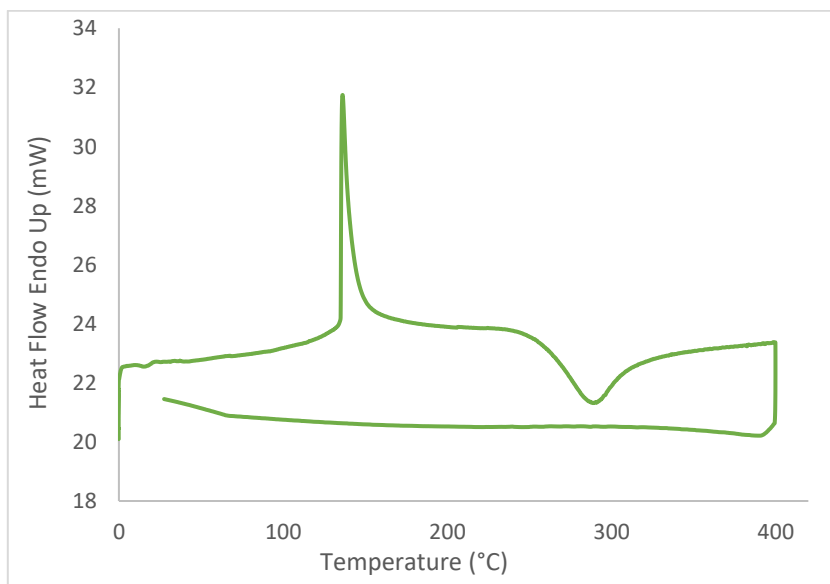
4.8.2. Θερμική Ανάλυση Σωματιδίων Χιτοζάνης/Πολυβινυλικής Αλκοόλης

Στη ίδια μελέτη, διερευνήθηκαν οι θερμικές ιδιότητες τόσο της καθαρής χιτοζάνης όσο και των σωματιδίων χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης χρησιμοποιώντας Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC). Η χιτοζάνη δεν είναι πλήρως άμορφο βιοπολυμερές, αλλά εν μέρει κρυσταλλικό [134]. Το DSC θερμογράφημα της σκόνης καθαρής χιτοζάνης όπως αυτό παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 13, προβάλλει μια ενδόθερμη κορυφή περίπου σε θερμοκρασία 136.22 °C, που αντιστοιχεί στην εξάτμιση του νερού, λόγω της ισχυρής συγγένειας της χιτοζάνης (αμινοπολυσακχαρίτης) προς το νερό, ενώ η απαιτούμενη ενθαλπία για την απελευθέρωσή του ήταν 21.31 mW [119, 135]. Το σημείο τήξης T_m της χιτοζάνης δεν παρατηρήθηκε πιθανώς λόγω της παρουσίας άμορφων περιοχών της χιτοζάνης [119]. Μετά από αυτή τη θερμοκρασία, παρατηρήθηκε μια σταθερή ροή θερμότητας στο δείγμα χιτοζάνης [131, 136].

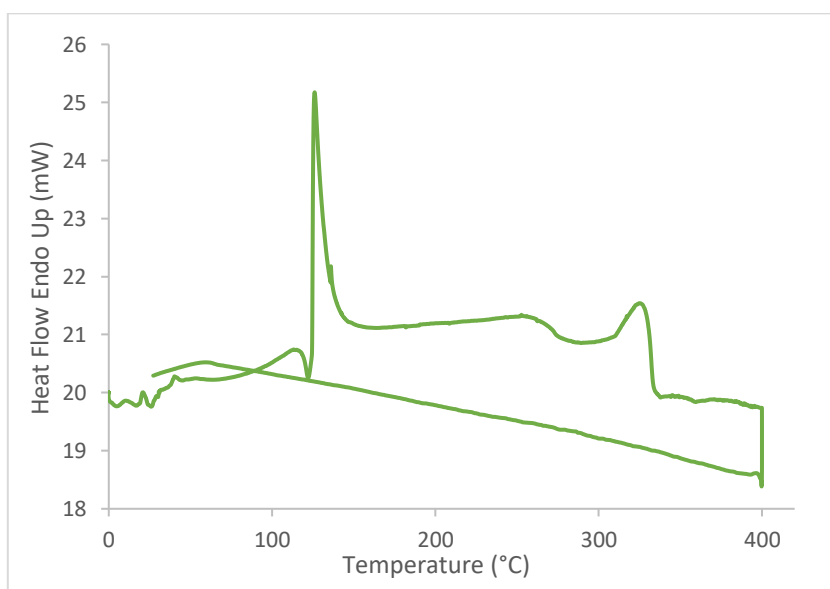
Το θερμογράφημα DSC των μικρο-σωματιδίων χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης αποκαλύπτει μια ενδόθερμη καμπύλη, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 12, σε θερμοκρασία 122.00 °C με ενθαλπία 20.25 mW, ακολουθούμενη από μια εξωθερμική κορυφή με ενθαλπία 25.17 mW, και οι δύο αποδίδονται στην εξάτμιση του νερού [137, 138]. Σε εύρος θερμοκρασίας 273 – 310 °C παρατηρήθηκε μια ευρεία ενδόθερμη κορυφή. Το σημείο αποσύνθεσης έρχεται μετά από αντιδράσεις που επιφέρουν το σχίσμα της αλυσίδας και αποσύνθεσης της χιτοζάνης (θερμικές και οξειδωτικές) συμπεριλαμβανομένου του διαχωρισμού των γλυκοζιτικών δεσμών των πολυσακχαριτών και της καταστροφής των αμινο ομάδων [126, 135, 136]. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα σωματίδια χιτοζάνης που προέκυψαν από τη διαδικασία του

4. Αποτελέσματα

ηλεκτροψεκασμού έχουν περισσότερες άμορφες περιοχές στη μικροδομή τους σε σχέση με την καθαρή [127, 131].



Διάγραμμα 12. DSC διάγραμμα καθαρής χιτοζάνης.

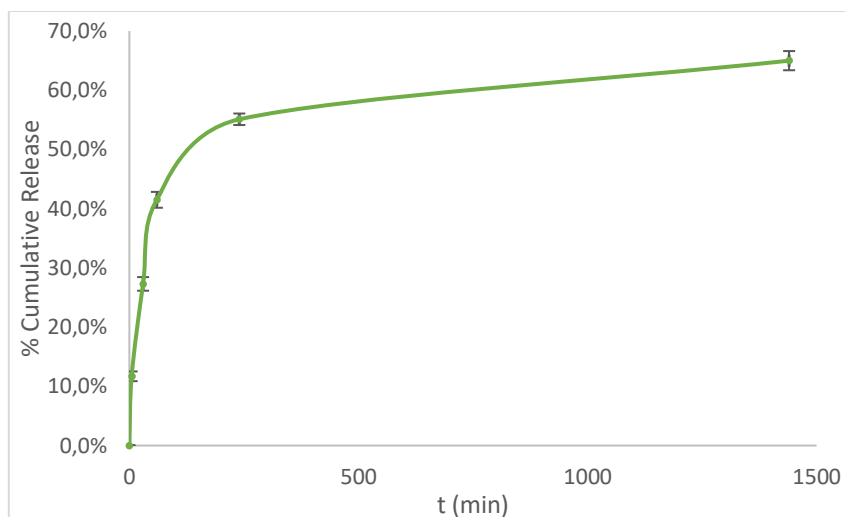


Διάγραμμα 13. DSC διάγραμμα παραγμένων σωματιδίων χιτοζάνης/PVA μέσω ηλεκτροψεκασμού.

4.9. Προφίλ Απελευθέρωσης Εγκλεισμένου Σαλικυλικού Οξέος από τα Μικροσωματίδια Ζεΐνης

Τα σφαιρικά μικρο-σωματίδια ζεΐνης-σαλικυλικού οξέος που παρασκευάστηκαν αναπτύχθηκαν ως συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης που θα μπορούσαν να βελτιώσουν την ανάπτυξη των καλλιιεργειών. Η μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης ενός εγκλεισμένου συστατικού είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό που επηρεάζει την τελική εφαρμογή. Στην εργασία αυτή, εξετάστηκε η απελευθέρωση του σαλικυλικού οξέος από τα σωματίδια ζεΐνης σε εργαστηριακή κίμακα (in vitro) και σε θερμοκρασία 35°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 14.

4. Αποτελέσματα



Διάγραμμα 14. In vitro μελέτη του προφίλ αθροιστικής απελευθέρωσης του σαλικυλικού οξέος από τα σωματίδια ζεΐνης σε θερμοκρασία 35 °C (δείγμα: DL=40% σε 75/25 EtOH/H₂O).

Η μελέτη απελευθέρωσης του σαλικυλικού πραγματοποιείται σε περιβάλλον που προσομοιάζει το περιβάλλον εφαρμογής. Ειδικότερα, η μελέτη της απελευθέρωσης του σαλικυλικού οξέος διεξήχθη σε υδρόφιλο μέσο, συγκεκριμένα σε νερό, ως προσομοίωση του συστήματος άρδευσης που χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες (συνθήκες αγρού). Μετά την πρώτη ώρα, απελευθερώθηκε το 27.3% του ποσού που έχει εγκλωβιστεί και το 41.5% απελευθερώθηκε κατά τις πρώτες τέσσερις ώρες, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 14. Η ταχεία απελευθέρωση κατά την πρώτη ώρα θα μπορούσε να αποδοθεί στο υψηλό πορώδες των σφαιριδίων και στο απορροφημένο στην επιφάνεια σαλικυλικό οξύ. Από την παρατήρηση του διαγράμματος, διαπιστώνεται ότι η απελευθέρωση φτάνει σε μια σταθερή φάση μετά από τέσσερις ώρες. Μετά από 48 ώρες στους 35 °C, απελευθερώθηκε το 65.0% του σαλικυλικού οξέος. Η σταδιακή αποδέσμευση συμβάλλει στην απορρόφησή της μέγιστης ποσότητας σαλικυλικού οξέος από το φυτό, λειτουργώντας ευεργετικά για αυτό.

Το κινητικό μοντέλο για την απελευθέρωση του παρουσιάζεται στον Πίνακα 17. Τα δεδομένα που λαμβάνονται από την απελευθέρωση αναλύθηκαν με βάση τις εξισώσεις (3) – (7) και το πιο κατάλληλο μοντέλο προκύπτει από τον υπολογισμένο συντελεστή συσχέτισης R^2 [125]. Το ημι-εμπειρικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas χρησιμοποιήθηκε για τα πρώτα 60% των δεδομένων απελευθέρωσης, πλησιάζοντας στην παρατηρούμενη απελευθέρωση του σαλικυλικού οξέος, και υπολογίστηκε η τιμή n με βάση αυτό [141]. Σε αυτή την περίπτωση, η τιμή n είναι ίση με 0.536, αριθμός που είναι κοντά στο 0.5, που οδηγεί κυρίως σε Fickian μοντέλο και ο ενδεικτικός μηχανισμός απελευθέρωσης της εγκλεισμένης ουσίας είναι μέσω διάχυσης.

Πίνακας 17. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης R^2 για κάθε κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης, εκθέτης (n), και η εξίσωση του Korsmeyer-Peppas για την απελευθέρωση του σαλικυλικού οξέος από μικρο-σφαιρίδια σε pH 7 και θερμοκρασία 35 °C.

Μηδενικής Τάξης	Πρώτης Τάξης	Higuchi	Korsmeyer-Peppas		Korsmeyer-Peppas
R^2	R^2	R^2	n	R^2	εξίσωση
0.514	0.219	0.7429	0.536	0.8032	$y=0.536x+0.4314$

4. Αποτελέσματα

4.10. Εκχύλιση Βιοδιεγερτών από το Φύκος *Saccharina Latissima*

4.10.1. Συμβατική Εκχύλιση Βιοδιεγερτών από το Φύκος *Saccharina Latissima* – Ανάκτηση Στερεών

Για την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών από το φύκος χρησιμοποιήθηκαν συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης και υποβοηθούμενες από υπερήχους. Σε πρώτο στάδιο αναλύεται η ανάκτηση στερεού από την πρώτη ύλη και έπειτα ο ποιοτικός χαρακτηρισμός του κάθε δείγματος ως προς τις βιοδραστικές ουσίες που αυτό περιέχει. Αρχικά, υπολογίζονται οι αποδόσεις ανάκτησης του ξηρού εκχυλίσματος με βάση την μάζα πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε για τις εκχυλίσεις με συμβατικές μεθόδους και αξιολογούνται οι επιλεγμένες συνθήκες. Στο Πίνακα 18, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάκτησης για κάθε συμβατική εκχύλιση που διεξήχθη σε υδατικό διάλυμα και σε διάλυμα οργανικών διαλυτών.

Πίνακας 18. Δεδομένα ανάκτησης για τις συμβατικές εκχυλίσεις με υδατικά διαλύματα και διαλύματα με οργανικούς διαλύτες.

Πείραμα	% Ανάκτηση	% Τυπική Απόκλιση
1.A	25.94%	4.30%
2.A	21.24%	3.84%
3.A	35.28%	14.22%
4.A	7.46%	7.29%
5.A	15.97%	12.08%
6.A	7.63%	5.88%
7.A	14.75%	6.30%
8.A	55.28%	11.32%

Από τις παραπάνω πειραματικές δοκιμές που έγιναν παρατηρείται πως το υψηλότερο ποσοστό ανάκτησης 55.28% εντοπίζεται στο Πείραμα 8.A που ως διαλύτης χρησιμοποιείται διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.1 M. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως στο εκχύλισμα αυτό περιέχονται πέρα από τις διάφορες ενώσεις που εκχυλίστηκαν και άλας καυστικού νατρίου, το οποίο κατά την εφαρμογή του σε καλλιέργειες θα αυξήσει τοπικά την αλατότητα του εδάφους. Το περιεχόμενο καυστικό νάτριο στο στερεό εκχύλισμα είναι της τάξης του 8.05%, το οποίο είναι χαμηλό. Έτσι και πάλι η εκχύλιση με διάλυμα NaOH κατάφερε να εκχυλίσει την μεγαλύτερη ποσότητα βιοδραστικών συστατικών από το φύκος (50.82%). Στα Πειράματα 1.A, 2.A και 3.A που ο διαλύτης είναι το νερό σημειώθηκαν οι δεύτερες κατά σειρά υψηλότερες αποδόσεις ανάκτησης στερεών. Συγκεκριμένα, κατά την εκχύλιση με νερό για 3 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Πείραμα 3.A) σημειώθηκε η δεύτερη υψηλότερη ανάκτηση 35.28% και κατά την εκχύλιση με νερό για 3 ώρες σε θερμοκρασία 80 °C (Πείραμα 1.A), σημειώθηκε το τρίτο υψηλότερο ποσοστό ανάκτησης 25.94%. Από τα δεδομένα που λήφθηκαν μέσω των εκχυλίσεων γίνεται φανερό πως η χρονική διάρκεια της εκχύλισης καθώς και η θερμοκρασία επιδρούν σημαντικά στο ποσοστό ανάκτησης. Με αύξηση της θερμοκρασίας στους 80°C διατηρώντας σταθερή την χρονική διάρκεια στις 3 ώρες το ποσοστό ανάκτησης

4. Αποτελέσματα

μειώθηκε κατά 4.7% και διατηρώντας σταθερή τη θερμοκρασία στους 30 °C αλλά μειώνοντας την χρονική διάρκεια της εκχύλισης στη μία ώρα, αντί για τρεις, το ποσοστό της ανάκτησης μειώθηκε κατά 14.04% (Πείραμα 2.Α). Οι μεταβολές αυτές είναι λογικές διότι κάποιες ουσίες απαιτούν υψηλότερο χρονικό διάστημα για να εκχυλιστούν. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, παρέχεται στο διάλυμα θερμική ενέργεια με αποτέλεσμα τα μόρια να μπορούν ευκολότερα να αποσυνδεθούν από την πρώτη ύλη. Ωστόσο, επειδή κάποιες ουσίες είναι θερμοευαίσθητες η θερμοκρασία πρέπει να μην ξεπερνά κάποια όρια. Οι διαφορές στις μετρήσεις του όγκου του εκχυλίσματος που με την σειρά του επηρεάζει την μέτρηση της απόδοσης της ανάκτησης οφείλεται σε απώλειες κατά την πειραματική διαδικασία.

Η μορφή των στερεών εκχυλισμάτων που λήφθηκαν μετά την ξήρανση υπό κενό μετά από κατάψυξη (λυοφιλίωση) για τις βέλτιστες αποδόσεις ανάκτησης που σημειώθηκαν στο Πείραμα 8.Α και 3.Α παρουσιάζονται στην Εικόνα 14. Το υδατικό εκχύλισμα έχει ένα ελαφρύ καφέ – πράσινο χρώμα και μετά την κατάψυξη και την ξήρανση υπό κενό λαμβάνεται ένα λευκό – κίτρινο στερεό, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 14(α). Από την άλλη πλευρά, το υγρό εκχύλισμα του υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M είναι βαθύ πράσινο και το τελικό στερεό που λαμβάνεται έχει ελαφρώς πράσινο χρώμα, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 14(β). Η διαφορά το χρώμα των στερεών εκχυλισμάτων που λαμβάνονται οφείλεται στις διαφορετικές χρωστικές ουσίες που εκχυλίζονται από την *Saccharina Latissima*.

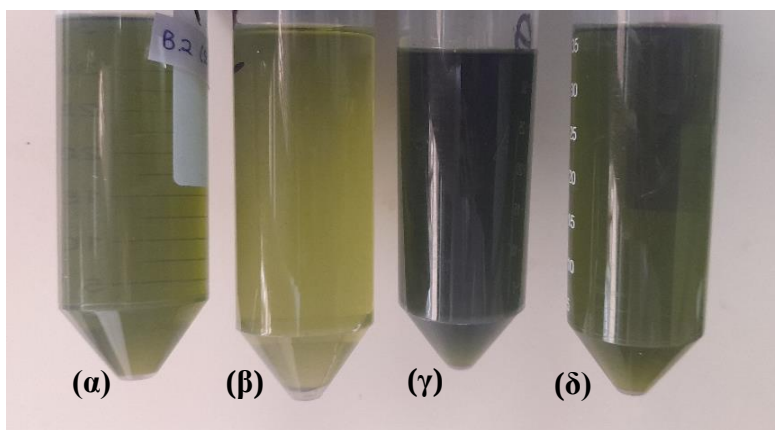


Εικόνα 14. Στερεό εκχύλισμα που λήφθηκε μετά την λυοφιλοποίηση των δειγμάτων που προέκυψαν από τις συμβατικές εκχυλίσεις (α) με διαλύτη το νερό για 3 ώρες σε θερμοκρασία 30 °C (Πείραμα 3.Α) και (β) με διαλύτη υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου 0.1 M για έξι ώρες σε θερμοκρασία 65 °C (Πείραμα 8.Α).

Στις εκχυλίσεις που χρησιμοποιήθηκαν καθαροί οργανικοί διαλύτες το ποσοστό της ανάκτησης στερεών μειώθηκε σημαντικά. Η υψηλότερη ανάκτηση που παρουσίασαν οι οργανικοί διαλύτες είναι 15.97% στο Πείραμα 5.Α κατά την εκχύλιση με μεθανόλη για τρεις ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 30 °C. Ταυτόχρονα υψηλή ανάκτηση της τάξης του 14.75% παρουσίασε και η εκχύλιση με διαλύτη την αιθανόλη για τρεις ώρες σε θερμοκρασία 30 °C στο Πείραμα 7.Α. Οι εκχυλίσεις με διαλύτες την αιθανόλη και τον οξικό αιθυλεστέρα (Πείραμα 4.Α και 6.Α) παρουσίασαν μειωμένη κατά το μισό ανάκτηση. Τα υγρά εκχυλίσματα των οργανικών διαλυτών που λαμβάνονται παρουσιάζονται στην Εικόνα 15 και έχουν όλα πράσινο χρώμα, με το εκχύλισμα της μεθανόλης (Εικόνα 15(γ)) και της αιθανόλης (Εικόνα 15(δ)) να έχουν βαθύ πράσινο

4. Αποτελέσματα

χρώμα. Το πράσινο αυτό χρώμα οφείλεται σε χρωστικές που έχουν εκχυλιστεί από το φύκος *Saccharina Latissima*.



Εικόνα 15. Υγρά εκχυλίσματα οργανικών διαλυτών (α) ακετόνης, (β) οξικού αιθυλεστέρα, (γ) μεθανόλης και (δ) αιθανόλης μετά από συμβατική εκχύλιση για 3 ώρες σε θερμοκρασία 30 °C.

4.10.2. Εκχύλιση με Υπερήχους Βιοδιεγερτών από το φύκος *Saccharina Latissima*

– Ανάκτηση Στερεών

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους ακολουθεί τις αρχές της πράσινης χημείας, μειώνοντας το χρονικό διάστημα εκχύλισης, την απαιτούμενη ενέργεια και την χρήση οργανικών διαλυτών. Η επιλογή αυτής της μεθόδου είναι μία πιο βιώσιμη πρακτική που έχει μελλοντικές προοπτικές, ως προς την ανάκτηση υψηλών ποσοτήτων βιοδραστικών συστατικών σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση που χρησιμοποιείται ως μέθοδος αναφοράς.

Για την εύρεση της βέλτιστης μεθόδου εκχύλισης μελετάται πέρα από τη συμβατική εκχύλιση και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους με υδατικά διαλύματα και συστήματα διαλυτών με οργανικούς διαλύτες. Οι υπερήχοι αποτελούν ισχυρό εργαλείο ενίσχυσης των διεργασιών απομόνωσης ουσιών-στόχος. Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στο σχηματισμό φυσαλίδων στο υγρό μέσο. Η κατάρρευση αυτών των φυσαλίδων δημιουργεί έντονες τοπικές αυξήσεις θερμοκρασίας, πίεσης και τάσης δημιουργίας στροβίλου. Το φαινόμενο αυτό συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της απόδοσης της εξαγωγής. Οι συνθήκες εκχύλισης που επιλέχθηκαν ήταν ένταση υπερήχων 450 Hz, θερμοκρασία 30 °C και διάφορες χρονικές διάρκειες. Η ανάδευση γίνεται λόγω υπερήχων, χωρίς να χρησιμοποιείται επί πρόσθετη μηχανική ανάδευση. Σε πρώτο στάδιο εξετάζεται η βέλτιστη αναλογία μάζας στερεής πρώτης ύλης προς τον όγκο του διαλύτη σε διαλύτη το νερό και έπειτα εξετάζεται η απόδοση ανάκτηση με χρήση οργανικών διαλυτών. Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται τα ποσοστά αποδόσεων ανάκτησης καθώς και η τυπική απόκλιση για τις εκχυλίσεις που διεξήχθησαν με διαλύτη το νερό υποβοηθούμενες από υπερήχους, συναρτήσει της μάζας της πρώτης ύλης.

4. Αποτελέσματα

Πίνακας 19. Ποσοστιαία απόδοση ανάκτησης και τυπική απόκλιση εκχυλίσεων υποβοηθούμενες από υπερήχους με διαλύτη το απιονισμένο νερό συναρτήσει της μάζας της πρώτης ύλης σε θερμοκρασία 30 °C.

Πείραμα	% Ανάκτηση	% Τυπική Απόκλιση
1.B	36.57%	6.96%
2.B	39.54%	9.53%
3.B	27.12%	11.92%
4.B	22.21%	2.76%

Η υψηλότερη απόδοση ανάκτησης που σημειώνεται συγκριτικά με όλες τις συμβατικές εκχυλίσεις που έχουν διεξαχθεί λήφθηκε κατά το πείραμα 2.B και είναι 39.54%, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 19. Κατά την εκχύλιση αυτή χρησιμοποιήθηκε λόγος μάζας στερεής πρώτης ύλης προς όγκο διαλύτη 1/40 με μάζα 1 g *Saccharina Latissima* και η χρονική διάρκεια της είναι 10 min. Η ποσότητα αυτή είναι η βέλτιστη για να ληφθεί η μέγιστη ανάκτηση στερεών. Παρόμοια απόδοση ανάκτησης, 36.57%, λήφθηκε χρησιμοποιώντας 0.5 g φύκος με τις ίδιες συνθήκες εκχύλισης. Παρά το γεγονός πως σε μικρότερη ποσότητα δείγματος η απόδοση ανάκτησης μειώθηκε παραμένει υψηλή σε σχέση με τις αποδόσεις ανάκτησης υψηλότερων ποσοτήτων ξηρής πρώτης ύλης. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην εξάντληση των εκχυλισίμων ουσιών στο δείγμα. Οι δύο αυτές τιμές αποδόσεων ανάκτησης εκχύλισης είναι σημαντικά υψηλότερες από αυτές που λήφθηκαν από τις συμβατικές εκχυλίσεις σε υδατικό φορέα. Αυξάνοντας τη μάζα της πρώτης ύλη στο 1.5 g και έπειτα στα 2 g, η απόδοση της ανάκτησης μειώνεται στο 27.12% και 22.21%, αντίστοιχα. Η μείωση αυτή είναι περίπου κατά το ήμισυ και είναι παρόμοια της ανάκτησης που λαμβάνεται από τις συμβατικές εκχυλίσεις. Η συμπεριφορά αυτή συμβαίνει διότι στα μικρότερα ποσά μάζας πρώτης ύλης σχηματίζεται αραιό μίγμα στερεού-υγρού και η ποσότητα του διαλύτη είναι ικανή να διαλύσει τα συστατικά που εκχυλίζονται. Αυξάνοντας τη μάζα της πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση το μίγμα γίνεται πυκνό, η ανάδευση με τους υπερήχους δυσχεραίνεται, απορροφάτε το μεγαλύτερο μέρος του διαλύτη και η μεταφορά ουσιών από την πρώτη ύλη στο υγρό μέσω μειώνεται διότι η διαφορά δυναμικού συγκέντρωσης μειώνεται. Επίσης κατά τις εκχυλίσεις των Πειραμάτων 2.B και 3.B που η μάζα της πρώτης ύλης φύκος είναι 1.5 g και 2 g παρουσιάστηκε δυσκολία ανάκτησης του εκχυλίσματος από τη διάταξη, με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρή απώλεια εκχυλίσματος και κατ' επέκταση απώλεια μέρους βιοδραστικών συστατικών. Το πλεονέκτημα που φέρουν τα υγρά εκχυλίσματα με διαλύτη το νερό είναι πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον αγρό αυτούσια, χωρίς να προηγηθεί απομάκρυνση του διαλύτη.

Τα ποσοστά των τυπικών αποκλίσεων, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 19, για τα περισσότερα πειράματα είναι χαμηλότερα του 10%, λόγω συστηματικών πειραματικών σφαλμάτων, πράγμα που επιβεβαιώνει την αξιοπιστία των μετρήσεων και την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Ωστόσο, στο Πείραμα 2.B το ποσοστό είναι χαμηλότερο του 20%, το οποίο οφείλεται σε πειραματικά σφάλματα κατά την πειραματική διαδικασία της μεταφοράς των εκχυλισμάτων και της ξήρανσης.

Εκτός από υδατικά διαλύματα ως διαλύτες εκχύλισης χρησιμοποιούνται και διαλύματα οργανικών διαλυτών. Ειδικότερα καθαρή αιθανόλη, μίγμα 80/20 αιθανόλης/νερού και μίγμα 80/20 νερού/μεθανόλης επιλέγονται ως διαλύτες και οι αποδόσεις των

4. Αποτελέσματα

ανακτήσεων καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 20. Η χρονική διάρκεια των εκχυλίσεων αυτών αυξήθηκε στα 20 min και η μάζα της πρώτης ύλης στα 2 g, μιας και παρουσιάζουν χαμηλές ανακτήσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Η αιθανόλη, ως διαλύτης, χρησιμοποιήθηκε στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους για να ελεγχθεί κατά πόσο μπορεί να αυξηθεί η απόδοση ανάκτησης στερεών ουσιών σε σχέση με την συμβατική εκχύλιση. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν μίγματα οργανικών διαλυτών με νερό, για να ελεγχθεί η επίδραση της πολικότητας του διαλύτη στην απόδοση ανάκτησης. Επιπλέον, επιλέγεται η μάζα της πρώτης ύλης να είναι 2 g παρά το γεγονός πως σημείωσε χαμηλές αποδόσεις ανάκτησης κατά τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες από υπερήχους με διαλύτη απιονισμένο νερό για να ελεγχθεί κατά πόσο μπορεί να βελτιωθεί η ανάκτηση σε οργανικούς διαλύτες και να είναι ικανά τα αποτελέσματα να συγκριθούν και τις ανακτήσεις των συμβατικών εκχυλίσεων με οργανικούς διαλύτες που έχουν την ίδια αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς όγκο διαλύτη.

Πίνακας 20. Ποσοστιαία απόδοση ανάκτησης και τυπική απόκλιση εκχυλίσεων υποβοηθούμενες από υπερήχους με οργανικούς διαλύτες σε θερμοκρασία 30 °C και αναλογία στερεού προς υγρό 1/40.

Πείραμα	% Ανάκτηση	% Τυπική Απόκλιση
1.C	12.33%	2.37%
2.C	30.45%	2.82%
3.C	47.52%	2.84%

Από τον Πίνακα 20 διαφαίνεται πως κατά την εκχύλιση με υπερήχους χρησιμοποιώντας ως διαλύτη την αιθανόλη η ανάκτηση διπλασιάστηκε σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση. Η εκχύλιση με διάλυμα αιθανόλης/νερού αναλογίας όγκου 80/20 σημείωσε ανάκτηση 30.45%. Το ποσοστό αυτό είναι ένα από τα υψηλότερα ποσοστά που έχει σημειωθεί και καταδεικνύει πως η πολικότητα τους διαλύτη έχει επίδραση στην ανάκτηση. Η μεθανόλη είναι πολικός διαλύτης αλλά η πολικότητα του είναι μικρότερη αυτής του νερού. Η εκχύλιση με διάλυμα νερού/μεθανόλης αναλογίας όγκου 80/20 παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό ανάκτησης απόδοσης, 47.52%.

4.11. Αντιοξειδωτική Δράση – Ισοδύναμα Trolox

Στη παρούσα εργασία τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν αρχικά για την απόδοση ανάκτησης στερεών ουσιών. Ο ποιοτικός έλεγχος των στερεών που εκχυλίζονται γίνεται με διάφορα πρωτόκολλα που επιλέχθηκαν και παρατίθενται στο Πειραματικό Μέρος. Ειδικότερα, τα στερεά που λήφθηκαν μετά την ξήρανση των υγρών εκχυλισμάτων αξιολογούνται ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο, το περιεχόμενο σε καροτενοειδή, σε χλωροφύλλες και σε φυκοκυανίνες, καθώς και ως προς το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο.

Η αντιοξειδωτική δράση των υγρών εκχυλισμάτων που λήφθηκαν προσδιορίστηκε σε ισοδύναμα Trolox (TEAC: Trolox Equivalents Antioxidant Activity) και τα αποτελέσματα μαζί με την τυπική απόκλιση αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 21.

4. Αποτελέσματα

Πίνακας 21. Αντιοξειδωτική δράση μετρούμενη σε Trolox (TEAC) για τα εκχυλίσματα συμβατικής και υποβοηθούμενης από υπερήχους εκχύλιση με διάφορους διαλύτες.

Πείραμα	C TEAC (mg TEAC/g raw material)	% Τυπική Απόκλιση (mg TEAC/g raw material)
1.A	0.51	7.68%
2.A	0.60	6.96%
3.A	0.48	3.40%
4.A	0.39	2.29%
5.A	0.58	3.01%
6.A	-	-
7.A	-	-
8.A	0.23	7.81%
1.B	0.55	3.79%
2.B	0.62	4.01%
3.B	0.53	3.55%
4.B	0.48	6.87%
1.C	0.47	0.90%
2.C	0.22	5.53%
3.C	0.80	2.57%

Πρωτίστως, θα πρέπει να σημειωθεί πως στα δείγματα της εκχύλισης που ως διαλύτης χρησιμοποιείται ο οξικός αιθυλεστέρας και η ακετόνη δεν ανιχνεύτηκε αντιοξειδωτική δράση, πράγμα που σημαίνει πως ο διαλύτης αυτός δεν κατάφερε να ανακτήσει ουσίες που έχουν αντιοξειδωτική δράση. Η υψηλότερη συγκέντρωση, 0.80 mg TEAC/g πρώτης ύλης, εντοπίζεται στο υγρό εκχύλισμα του Πειράματος 3.C που λαμβάνεται από την εκχύλιση με υπερήχους για 20 λεπτά και με διαλύτη διάλυμα νερού/μεθανόλης 80/20. Οι εκχυλίσσεις υποβοηθούμενες από υπερήχους αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποδοτικές, όπως διαφάνηκε στο Πείραμα 2.B, κατά την εκχύλιση 1 g πρώτης ύλης (λόγος μάζας προς όγκο διαλύτη 1/40) για 10 λεπτά σε απιονισμένο νερό που παρήγαγε εκχύλισμα με αντιοξειδωτική δράση 0.62 mg TEAC/g. Αξιόλογη ήταν και η απόδοση του Πειράματος 1.A, που παρά τη μικρότερη ποσότητα πρώτης ύλης (0.5g), το εκχύλισμα κατάφερε να παρουσιάσει υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Έτσι, φαίνεται πως καθοριστικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος έχει η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση, καθώς και η επιλεγμένη μάζα συστατικού σε δεδομένο όγκο διαλύτη. Έπειτα, υψηλή συγκέντρωση παρουσιάζουν τα υδατικά εκχυλίσματα των συμβατικών εκχυλίσεων. Ειδικότερα, κατά την συμβατική εκχύλιση για μία ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε διαλύτη απιονισμένο νερό (Πείραμα 2.A) η αντιοξειδωτική δράση σημειώθηκε στα 0.60 mg TEAC/g πρώτης ύλης. Παρόμοια τιμή λαμβάνει η περιεκτικότητα 0.58 mg TEAC/g πρώτης ύλης που λαμβάνεται από την συμβατική εκχύλιση για τρεις ώρες με διαλύτη την μεθανόλη (Πείραμα 5.A). Η συγκέντρωση ύλης που λαμβάνεται από την εκχύλιση για τρεις ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Πείραμα 1.A) παρουσιάζεται μειωμένη στο 0.51 mg TEAC/g πρώτης. Η συμβατική εκχύλιση με διαλύτη διάλυμα καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M παρά την υψηλή ανάκτηση που παρουσίασε, στο εκχύλισμα περιέχεται η μικρότερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ουσιών σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα (Πείραμα 8.A). Οι τυπικές αποκλίσεις των πειραματικών

4. Αποτελέσματα

μετρήσεων είναι όλες μικρότερες του 8% με κάποιες από αυτές να είναι της τάξης του 2%, υποδεικνύοντας πως οι μετρήσεις εμφανίζουν επαναληψιμότητα και εγκυρότητα.

Σε προηγούμενη βιβλιογραφική μελέτη, η εκχύλιση της *Saccharina Latissima* για 4 ώρες στους 80 °C, με χρήση υπερήχων και με λόγο στερεού/υγρού 1:30, οδήγησε στην παραγωγή εκχυλισμάτων με σταθερή αντιοξειδωτική ικανότητα (22-23 mg TEAC/g) κατά τη διάρκεια των πρώτων 90 λεπτών. Στη συνέχεια, η αντιοξειδωτική δράση δεν μεταβλήθηκε ουσιαστικά μέχρι το τέλος της διαδικασίας [77]. Η διαφορετική κατεργασία καθαρισμού, ξήρανσης και αποθήκευσης μετά την συγκομιδή της, πράγμα που επενεργεί στα ποιοτικά της χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης. Επίσης, η τοποθεσία καλλιέργειας και η εποχή καλλιέργειας έχουν καθοριστικό ρόλο στα ποιοτικά προφίλ του φύκος. Συγκρίνοντάς τις περιεκτικότητες των ουσιών με αντιοξειδωτική ικανότητα που υπολογίστηκαν στην παρούσα έρευνα με βιβλιογραφικές αναφορές, φαίνεται οι πρώτες εξ' αυτών να αρκετά μειωμένες [78]. Έτσι, παρατηρείται πως ο χρόνος της εκχύλισης παρουσιάζει και αυτός σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση.

4.12. Συγκέντρωση Ολικών Φαινολικών Ενώσεων

Ο ποιοτικός έλεγχος των στερεών εκχυλισμάτων συνεχίστηκε με προσδιορισμό της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών ενώσεων με βάση το πρωτόκολλο που παρεντίθεται στο Πειραματικό Μέρος. Οι περιεκτικότητες των συνολικών φαινολικών ενώσεων κατά μάζα ξηρής πρώτης ύλης μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 22. Για κάθε ένα εκχύλισμα πρώτα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο υγρό εκχύλισμα και έπειτα ανάχθηκε ανά μάζα πρώτη ύλης. Όλα τα δείγματα παρουσίασαν τιμές συγκεντρώσεων ολικών φαινολικών ενώσεων χαμηλότερες του 10 mg TPC/mL εκχυλίσματος, πράγμα που υποδεικνύει πως οι βιοδραστικές ουσίες που εκχυλίζονται από την *Saccharina Latissima* δεν είναι ικανές να εγκλειστούν, λόγω της χαμηλής τους ποσότητας, αλλά να χρησιμοποιηθούν αμέσως στα φυτά.

Πίνακας 22. Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε ολικές φαινολικές ενώσεις και οι τυπικές αποκλίσεις για τα εκχυλίσματα από τις συμβατικές και τις υποβοηθούμενες από υπερήχους εκχυλίσεις με διάφορους διαλύτες.

Πείραμα	C TPC (mg GAE/g πρώτης ύλης)	% Τυπική Απόκλιση (mg GAE/g πρώτης ύλης)
1.A	2.17	3.73%
2.A	2.32	2.08%
3.A	1.23	7.01%
4.A	0.92	6.28%
5.A	0.71	5.19%
6.A	0.14	8.65%
7.A	0.08	12.09%
8.A	4.81	10.18%
1.B	1.81	4.98%
2.B	2.28	5.27%
3.B	1.89	6.74%
4.B	1.63	26.30%
1.C	-	-
2.C	3.82	5.80%

4. Αποτελέσματα

3.C	1.44	6.58%
-----	------	-------

Η υψηλότερη περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων, 4.81 mg TPC/g πρώτης ύλης, εντοπίζεται στο εκχύλισμα του Πειράματος 8.A, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 22, κατά την συμβατική εκχύλιση για 6 ώρες, σε θερμοκρασία 65 °C με διαλύτη διάλυμα καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M. Η δεύτερη υψηλότερη τιμή περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων 3.82 mg GAE/g πρώτης ύλης εντοπίζεται στο εκχύλισμα του Πειράματος 3.C κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με διαλύτη διάλυμα αιθανόλης/νερού σε αναλογία 80/20. Επίσης, υψηλές τιμές παρουσιάζουν και οι συμβατικές εκχυλίσσεις των Πειραμάτων 1.A και 2.A με ολικά φαινολικά 2.17 και 2.32 mg GAE/g πρώτης ύλης, αντίστοιχα, πράγμα που δείχνει πως ο χρόνος και η θερμοκρασία επιδρούν στην εκχύλιση φαινολικών ενώσεων. Τα εκχυλίσματα των εκχυλίσεων υποβοηθούμενες από υπερήχους εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές από τις συμβατικές εκχυλίσσεις. Το Πείραμα 2.B όπου 1 g πρώτης ύλης (λόγος μάζας πρώτης ύλης προς όγκο διαλύτη 1/40) αποδίδει εκχύλισμα με ολικές φαινολικές ενώσεις 2.28 mg GAE/g πρώτης ύλης. Τα εκχυλίσματα των συμβατικών εκχυλίσεων με τους οργανικούς διαλύτες παρουσίασαν μειωμένη περιεκτικότητα μικρότερη της μονάδας. Ειδικότερα τα εκχυλίσματα των Πειραμάτων 6.A και 7.A που ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε ο οξικός αιθυλεστέρας και η ακετόνη, αντίστοιχα, παρουσίασαν περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων 0.14 και 0.08 mg GAE/g πρώτης ύλης. Ταυτόχρονα, στο εκχύλισμα του Πειράματος 1.C της εκχύλισης με υπερήχους με διαλύτη καθαρή αιθανόλη δεν ανιχνεύτηκαν φαινολικές ενώσεις. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως σε μικρό χρονικό διάστημα εκχύλισης με διαλύτη αιθανόλη δεν μπορούν να εκχυλιστούν φαινολικές ενώσεις. Στο Πείραμα 3.C κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους για 20 λεπτά σε διαλύτη μίγμα νερού/μεθανόλης 80/20 και λόγο μάζας στερεού προς όγκο διαλύτη 1/40, η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις παρουσιάστηκε μειωμένη σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.

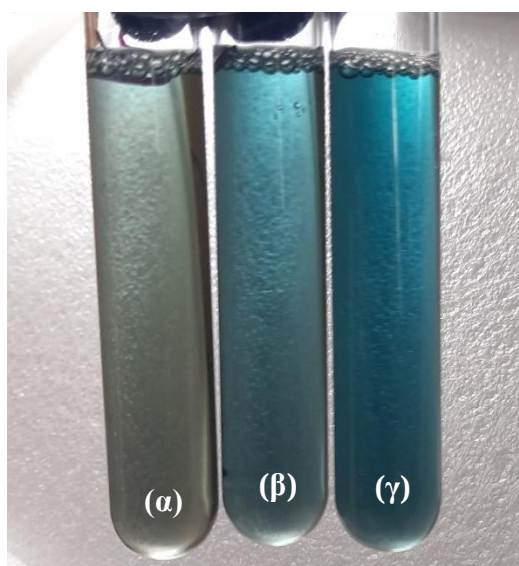
Βιβλιογραφικές μελέτες αναφέρουν ότι εκχυλίσματα που προέκυψαν από εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων έντασης 40 kHz, για 30 λεπτά με λόγο μάζας ξηρής πρώτης ύλης προς όγκο διαλύτη 1/100, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες νερό, αιθανόλη, μεθανόλη και μίγμα νερού/μεθανόλης 80/20, παρουσίασαν περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις της τάξης των 1 - 2 mg GAE/g ξηρής πρώτης ύλης. Επίσης, τα αιθανολικά εκχυλίσματα παρουσίασαν μειωμένη αντιοξειδωτική δράση, όπως παρατηρήθηκε και σε αυτή την εργασία. Τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση δεν παρουσιάζουν στατιστικά μεγάλη απόκλιση. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα εμφανίζουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις σε σχέση με άλλα διαλύματα. Στην παρούσα μελέτη, αν και η ένταση των υπερήχων ήταν υψηλότερη και ο χρόνος εκχύλισης ήταν μικρότερος (10 και 20 λεπτά), τα αποτελέσματα που προέκυψαν συμφωνούν με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας [78, 79]. Μελέτες που χρησιμοποίησαν δείγμα που λήφθηκε από την Γαλλία, το οποίο εκχυλίστηκε με νερό, αιθανόλη/νερό 80/20 και ακετόνη/νερό 70/30 σημείωσαν περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων μεταξύ 1.9 - 7.8 mg GAE/g ξηρής πρώτης ύλης. Δείγμα από την Ιρλανδία που εκχυλίστηκε συμβατικά μέσω κατακόρυφης ανακίνησης (shaking) για 2 ώρες, σε θερμοκρασία 40 °C, με διαλύτη

4. Αποτελέσματα

μεθανόλη/νερό 60/40 αλλά διαφορετικό λόγο στερεού προς διαλύτη σημείωση σημαντικότερα αυξημένη περιεκτικότητα, 66.75 και 43.50 mg GAE/g ξηρής πρώτης ύλης, αντίστοιχα [74]. Ενώ έρευνες πάνω σε υδατικά εκχυλίσματα και αιθανολικά 96% v/v βρέθηκε πως η περιεκτικότητα στις ολικές φαινολικές ενώσεις κυμαίνεται μεταξύ 0.09 – 0.595 mg/g ξηρής πρώτης ύλης [139]. Άλλες έρευνες αναφέρουν ότι η εφαρμογή υψηλής πίεσης σε συνδυασμό με την υψηλή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εκχύλισης οδηγεί σε υψηλότερα αποτελέσματα περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων σε σχέση με την παρούσα μελέτη, γεγονός που καταδεικνύει τις προοπτικές της εκχύλισης [80].

Σε σχέση με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα αποτελέσματα της παρούσα έρευνας παρουσιάζουν συμφωνία πάνω στην περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα. Επί, πρόσθετα γίνεται φανερό πως η τοποθεσία του δείγματος και οι συνθήκες εκχύλισης επιδρούν σε μεγάλο βαθμό στα αποτελέσματα.

Η οπτική παρατήρηση του χρώματος στα δείγματα μετά την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων και την ταυτόχρονη αναγωγή των ιόντων του διαλύματος Folin-Ciocalteu παρέχει μια ποιοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης τους. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο υγρό εκχύλισμα, τόσο πιο έντονη μεταβολή του χρώματος προς κυανό. Στην Εικόνα 16, όπου παρουσιάζονται τα εκχυλίσματα των Πειραμάτων 2.A, 2.B και 4.B, παρατηρείται διαφορετική απόδοση χρώματος. Το δείγμα της Εικόνας 16(α) (Πείραμα 4.B) έχει πολύ μικρή ένταση μπλε χρώματος, ενώ τα δείγματα των Εικόνων 16(β) και 16(γ) (Πειράματα 2.B και 2.A) έχουν λάβει πιο έντονο κυανό χρώμα, με το δεύτερο να είναι πιο σκούρο. Η αυξημένη ένταση του κυανού χρώματος υποδηλώνει αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Αυτή η οπτική εκτίμηση επιβεβαιώνεται από τις ποσοτικές μετρήσεις που παρουσιάστηκαν προηγουμένως.



Εικόνα 16. Δείγματα με αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu από εκχύλιση (α) υποβοηθούμενη από υπερήχους για 10 λεπτά, με απιονισμένο νερό και μάζα πρώτης ύλης 2g, (β) υποβοηθούμενη από υπερήχους για 10 λεπτά και μάζα πρώτης ύλης 1g και (γ) συμβατική για 1 ώρα σε θερμοκρασία 30 °C με απιονισμένο νερό (λόγος μάζας πρώτης ύλης προς όγκο διαλύτη 1/20).

4. Αποτελέσματα

4.13. Ολικά Καροτενοειδή και Χλωροφύλλες

Μέρος των εκχυλισμάτων αξιολογούνται ως προς τη συνολική ποσότητα των καροτενοειδών και χλωροφυλλών με βάση τα πρωτόκολλα που παρατίθενται στο Πειραματικό Μέρος. Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιούνται είναι αυτά που έχουν παρουσιάσει τις υψηλότερες ανακτήσεις, τέτοια είναι τα υδατικά εκχυλίσματα από εκχυλίσσεις με υπερήχους και συμβατικές με διαλύτες απιονισμένο νερό και διάλυμα καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 23.

Πίνακας 23. Περιεκτικότητες καροτενοειδών και χλωροφυλλών στα εκχυλίσματα συμβατικών και υποβοηθουμένων από υπερήχους εκχυλίσσεων με διαλύτη απιονισμένο νερό.

Πείρα μα	Ca (μg/g πρώτ ης ύλης)	% Τυπικ ή Απόκλ ιση Ca (μg/g πρώτ ης ύλης)	Cb (μg/g πρώτ ης ύλης)	% Τυπικ ή Απόκλ ιση Cb (μg/g πρώτ ης ύλης)	Cc (μg/g πρώτ ης ύλης)	% Τυπική Απόκλι ση Cc (μg/g πρώτ ης ύλης)	Cc (μg/g πρώτ ης ύλης)	% Τυπικ ή Απόκλ ιση Cp (μg/g πρώτ ης ύλης)
1.A	0.0159	1.32%	0.0196	1.85%	0.0287	3.70%	0.00476	0.316%
2.A	0.000431	0.403%	0.000553	0.013%	0.0012	0.00229%	0.00186	0.370%
8.A	0.0250	0.472%	0.0143	1.54%	0.00887	0.896%	0.00564	0.174%
2.B	-	-	0.863	1.79%	-	-	-	-

Στον Πίνακα 23 παρατίθενται οι περιεκτικότητες των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών όπως αυτές υπολογίστηκαν με βάση τις Εξισώσεις (8) – (11) αφού πρώτα ανάχθηκαν στη μάζας της πρώτης ύλης. Για τα διάφορα είδη χλωροφυλλών αντιστοιχούν οι περιεκτικότητες C_a , C_b και C_c και για τα καροτενοειδή η περιεκτικότητα C_p . Το στερεό εκχύλισμα που παρουσιάζει την υψηλότερη περιεκτικότητα β-χλωροφύλλης, 0.863 μg/g πρώτης ύλης, είναι αυτό που λαμβάνεται από το Πείραμα 2.B από την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με διαλύτη απιονισμένο νερό. Στο εκχύλισμα αυτό πρέπει να σημειωθεί πως δεν εντοπίζεται κάποιο άλλο είδος χλωροφύλλης και καροτενοειδούς, δηλαδή δεν εμφάνισε απορρόφηση της ακτινοβολίας στα υπόλοιπα μήκη κύματος. Το στερεό εκχύλισμα του Πειράματος 8.A από την συμβατική εκχύλιση για 6 ώρες σε θερμοκρασία 65°C με διαλύτη διάλυμα καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M παρουσίασε περιεκτικότητες μία τάξης μικρότερης από την μέγιστη τιμή. Στο δείγμα αυτό περιέχονται τόσο χλωροφύλλες όσο και καροτενοειδή σε περιεκτικότητες, 0.025 α-χλωροφύλλης, 0.0143 μg/g πρώτης ύλης β-χλωροφύλλης, 0.00887 μg/g πρώτης ύλης γ-χλωροφύλλης και 0.000564 μg/g πρώτης ύλης καροτενοειδούς. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του Πειράματος 8.A παρουσιάζει το δείγμα του Πειράματος 1.A, με τριπλάσια αυξημένη περιεκτικότητα γ-χλωροφύλλης 0.0287 μg/g πρώτης ύλης και υψηλότερη τιμή β-χλωροφύλλης στα 0.0196 μg/g πρώτης

4. Αποτελέσματα

ύλης, ενώ το δείγμα του Πειράματος 2.A. παρουσιάζει πολύ χαμηλότερες περιεκτικότητες, λόγω μικρότερου χρόνου εκχύλισης και χαμηλότερης θερμοκρασίας. Οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων που έγιναν λαμβάνουν χαμηλές τιμές πράγμα που καταδεικνύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από τις απορροφήσεις.

Οι τιμές που λήφθηκαν από τα παραπάνω πειράματα επιβεβαιώνονται βιβλιογραφικά, μέσω μελετών που έχουν γίνει για την περιεκτικότητα του φυκιού αυτού σε χρωστική (β-καροτένιο). Ειδικότερα, μέσω εκχύλισης με διαλύτη την ακετόνη και ανάλυσης σε HPLC βρέθηκε πως η περιεκτικότητα του φύκος σε β-καροτένιο κυμαίνεται ανάμεσα στο 0.01 – 0.03 mg/g ξηρής πρώτης ύλης. Η διακύμανση αυτή οφείλεται στην διαφορετική τοποθεσία συλλογής του δείγματος και το βάθος της καλλιέργειας [140]. Εκχυλίσματα φύκος *Saccharina Latissima* από διάφορες τοποθεσίες της Δανίας αναλύθηκαν με HPLC και βρέθηκε πως η περιεκτικότητα τους σε β-καροτένιο κυμαίνονται μεταξύ 0.01 – 0.03 mg/g ξηρής πρώτης ύλης [142].

4.14. Προσδιορισμός Φυκοκυανινών

Ο προσδιορισμός του περιεχομένου του φύκος *Saccharina Latissima* σε φυκοκυανίνες καθώς και του στερεού εκχυλίσματος από την εκχύλιση με υπερήχους για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με διαλύτη απιονισμένο νερό και μάζα πρώτης ύλης 1 g γίνεται με βάση το πρωτόκολλο που παρεντίθενται στο Πειραματικό Μέρος. Επιλέγεται μόνο ένα εκχύλισμα, αυτό που παρουσίασε τα βέλτιστα ποιοτικά χαρακτηριστικά καθώς και η πρώτη ύλη. Τα αποτελέσματα των αξιολογήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 24.

Πίνακας 24. Συγκέντρωση σε φυκοκυανίνες της πρώτης ύλης και του στερεού εκχυλίσματος από εκχύλιση με υπερήχους για 10 λεπτά και μάζα φύκους 1 g και τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Πείραμα	%pure C-PC (μg/mL)	% Τυπική Απόκλιση C-PC (μg/mL)
2.B	0.201	1.84%
Πρώτη Ύλη	0.248	6.24%

Η πρώτη ύλη, δηλαδή το καθαρό φύκος, χωρίς να έχει υποστεί κάποια επιπλέον κατεργασία αξιολογήθηκε για το περιεχόμενό του σε φυκοκυανίνες, με την συγκέντρωση να υπολογίζεται στα 0.248 μg/mL. Από την άλλη πλευρά το στερεό εκχύλισμα του Πειράματος 2.B έχει συγκέντρωση φυκοκυανινών 0.201 μg/mL. Η αναγωγή της συγκέντρωσης αυτής σε περιεκτικότητα φυκοκυανινών ανά μάζα ξηρής πρώτης ύλης είναι 3.33 ± 0.31 μg/g πρώτης ύλης. Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος, όπως υπολογίστηκε, είναι πολύ κοντά στην συγκέντρωση της πρώτης ύλη γεγονός που καταδεικνύει πως με την εκχύλιση με υπερήχους και διαλύτη απιονισμένο νερό κατορθώνεται να απομονωθεί το 80.8% των περιεχόμενων φυκοκυανινών. Η υψηλή απόδοση ανάκτησης φυκοκυανίνης καθιστά τη διαδικασία αυτή ιδιαίτερα ελκυστική για τη παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων αυτών των συστατικών.

4. Αποτελέσματα

4.15. Προσδιορισμός Πρωτεϊνικού Περιεχομένου

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford για τον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου των εκχυλίσμάτων. Η μέθοδος Bradford δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για όλα τα εκχυλίσματα που έχουν παραχθεί διότι δεν είναι όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ικανοί να διαλυτοποιήσουν την αλβουμίνη βόειου ορού που χρησιμοποιείται για τα πρότυπα διαλύματα. Έτσι δεν μπορεί να δημιουργηθούν καμπύλες αναφοράς της απορρόφησης για όλα τα εκχυλίσματα. Από τα πειράματα που έγιναν διαφάνηκε πως μόνο δύο διαλύτες είναι ικανοί να διαλυτοποιήσουν την αλβουμίνη και κατά συνέπεια τα εκχυλίσματα. Οι διαλύτες αυτοί είναι το απιονισμένο νερό και το διάλυμα νερού/μεθανόλης αναλογίας 80/20. Τα αποτελέσματα των περιεκτικοτήτων των εκχυλίσμάτων σε πρωτεΐνες παρουσιάζονται στο Πίνακα 25.

Πίνακας 25. Περιεκτικότητες πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα συμβατικών και υποβοηθούμενων από υπερήχους εκχυλίσεων με διαλύτη απιονισμένο νερό και διάλυμα νερού/μεθανόλης αναλογίας 80/20.

Πείραμα	C BSA (mg/g πρώτης ύλης)	% Τυπική Απόκλιση (mg/g πρώτης ύλης)
1.A	0.48	0.48%
2.A	0.46	0.64%
3.A	0.61	0.78%
2.B	0.95	1.24%
4.B	0.35	0.88%
3.C	1.49	1.94%

Μεταξύ των δειγμάτων που εξετάστηκαν, το υγρό εκχύλισμα του Πειράματος 3.C παρουσίασε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, με τιμή 1.49 mg/g πρώτης ύλης. Αυτό το αποτέλεσμα επιτεύχθηκε με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χρησιμοποιώντας μίγμα νερού και μεθανόλης σε αναλογία 80/20. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους για διάρκεια 10 λεπτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη απιονισμένο νερό και δείγμα μάζας 1 g (Πείραμα 2.B), κατέδειξε τη δεύτερη υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, ανερχόμενη σε 0.95 mg/g πρώτης ύλης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τόσο η επιλογή του διαλύτη όσο και ο χρόνος επεξεργασίας ασκούν σημαντική επίδραση στην αποδοτικότητα της απομόνωσης πρωτεϊνών. Εκτός από τον διαλύτη και τον χρόνο εκχύλισης, η μάζα του δείγματος φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την αποδοτικότητα της απομόνωσης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η χρήση δείγματος πρώτης ύλης 2 g στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους οδήγησε σε σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, 0.35 mg/g πρώτης ύλης, χαμηλότερη ακόμη και από τις τιμές που καταγράφηκαν στις συμβατικές εκχυλίσεις με απιονισμένο νερό. Αντίθετα, η συμβατική εκχύλιση για διάρκεια τριών ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, χρησιμοποιώντας απιονισμένο νερό, απέδωσε την τρίτη υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης (0.61 mg BSA/g πρώτης ύλης). Τα ποσοστά των τυπικών αποκλίσεων είναι μικρότερα της μονάδας, γεγονός που επιβεβαιώνει την αξιοπιστία των μετρήσεων.

Βιβλιογραφικές μελέτες αναφέρουν ότι η υδρόλυση με υδροχλωρικό οξύ 6M με την βοήθεια μικροκυμάτων, για μία ώρα σε θερμοκρασία 110 °C επιτρέπει την απομόνωση υψηλών ποσοστών πρωτεϊνών από την πρώτη ύλη, της τάξης του 2.9 – 5.9% της ξηρής μάζας. Οι διακυμάνσεις οφείλονται κυρίως στην εποχή συγκομιδής. Αντίθετα, στην παρούσα πειραματική μελέτη, εφαρμόζοντας ήπιες συνθήκες εκχύλισης για την ταυτόχρονη απομόνωση και άλλων βιοδραστικών συστατικών, τα ποσοστά πρωτεϊνών σημείωσαν σημαντικότερα χαμηλότερες τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 0,048-0,14% της ξηρής μάζας. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι συνθήκες υδρόλυσης με ισχυρά οξέα, όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία, ευνοούν την απομόνωση υψηλότερων ποσοστών πρωτεϊνών [81].

Ξηρή μάζα φύκους *Saccharina Latissima* από διάφορες τοποθεσίες της Δανίας υδρολύθηκε και βρέθηκε πως η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες κυμαίνεται ανάμεσα στο 1.4 - 7.5% ξηρής μάζας. Στην παρούσα έρευνα τα ποσοστά πρωτεΐνης στα υγρά εκχυλίσματα κυμαίνονται μεταξύ 0.048 – 0.149% ξηρής μάζας. Οι τιμές είναι λογικό να είναι μειωμένες διότι μέσω της μεθόδου Bradford μετρούνται μόνο όσα αμινοξέα αλληλοεπιδρούν με τη χρωστική ουσία και συγχρόνως δεν μπορούν να απομονωθούν μέσω της εκχύλισης όλες οι πρωτεΐνες [139].

5. Συμπεράσματα

Η ολοένα αυξανόμενη τάση για μεγαλύτερη προστασία και ενίσχυση καλλιεργειών έχει οδηγήσει στην μελέτη διαφόρων ουσιών με βιοδιεγερτική δράση. Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκε ο σχηματισμός μικρο-σωματιδίων ζεΐνης με εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ και χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού με σκοπό την ανάπτυξη καινοτόμων συστημάτων που προορίζονται για την προστασία και την ανάπτυξη του φυτού. Ο εγκλεισμός των επιθυμητών δραστικών ουσιών συνιστά σημαντική καινοτομία, καθώς εξασφαλίζει τη διατήρηση της ποιότητας και της βιωσιμότητάς τους και συνεισφέρει στην ελεγχόμενη αποδέσμευση και στοχευμένη δράση των ουσιών. Ταυτόχρονα, ο σχηματισμός σωματιδίων μεγέθους εντός της μικρο-κλίμακας ενισχύει την βιοδιαθεσιμότητα και την δέσμευση τους από τα φυτά κατά την εφαρμογή.

Η μέθοδος του ηλεκτροστατικού ψεκασμού, μία καινοτόμα μέθοδος, φέρει πληθώρα πλεονεκτημάτων έναντι άλλων τεχνικών παραγωγής σωματιδίων, καθώς παρουσιάζει υψηλή απόδοση εγκλεισμού και ικανότητα διαμόρφωσης ομοιόμορφων σωματιδίων. Από τα πειράματα που διεξήχθησαν παρατηρήθηκε πως το βέλτιστο διάλυμα επιτυγχάνεται με αναλογία διαλυτών αιθανόλης/οξικού οξέος 75/25 και ποσοστό φόρτωσης σε σαλικυλικό οξύ 40%, για το οποίο προσδιορίστηκε η ηλεκτρική του αγωγιμότητα και η επιφανειακή του τάση έναντι άλλων διαλυμάτων.

Από την άλλη πλευρά, το βέλτιστο διάλυμα χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης αναλογίας 1/3 επιτυγχάνεται με αναλογία διαλυτών νερού/οξικού οξέος 70/30. Οι συνθήκες, όπως η ροή του ρευστού, η απόσταση από τον δίσκο συλλογής και η ηλεκτρική τάση, της διεργασίας του ηλεκτροψεκασμού για κάθε ένα διάλυμα βελτιστοποιείται ώστε να υπάρχει σταθερή ροή ψεκασμού σωματιδίων, αφού σχηματιστεί κώνος Taylor. Η διεργασία παραγωγής σωματιδίων ζεΐνης εγκλεισμένου σαλικυλικού οξέος αξιολογείται ως προς την απόδοσή της εντοπίζοντας πως για ποσοστό φόρτωσης 30% είναι 85.7% και για 40% αυξάνεται στο 96%, πράγμα που σημαίνει πως οι απώλειες της διεργασίας είναι αρκετά μειωμένες. Η απόδοση της διεργασίας για τα σωματίδια χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης φτάνει στο 19.9%. Ο εγκλεισμός του σαλικυλικού οξέος αξιολογείται ως προς την απόδοση του μέσω φασματομετρίας υπεριώδους-ορατού, για ποσοστό φόρτωσης 10% η απόδοση του εγκλεισμού φτάνει το $26\% \pm 5.8\%$, για 20% αυξάνεται στα $42\% \pm 1.0\%$, για 30% αυξάνεται περαιτέρω στα $54\% \pm 3.2\%$, και τέλος για 40% καταλήγει στο $60\% \pm 5.3\%$. Όσο αυξάνεται το περιεχόμενο σαλικυλικό οξύ στο διάλυμα, τόσο περισσότερη ουσία θα βρίσκεται μέσα στις στιβάδες των σωματιδίων ζεΐνης. Τα σωματίδια με ποσοστό φόρτωσης 40% σε σαλικυλικό οξύ μελετήθηκαν περαιτέρω για το προφίλ απελευθέρωσής τους σε συνθήκες άρδευσης και βρέθηκε πως μετά την πρώτη ώρα, απελευθερώθηκε το 27% του ποσού που έχει εγκλωβιστεί και το 41% απελευθερώθηκε κατά τις πρώτες τέσσερις ώρες λόγω του πορώδους των σωματιδίων και στο απορροφημένο στην επιφάνει σαλικυλικό οξύ. Σε διάρκεια 48 ωρών και θερμοκρασία 35 °C, απελευθερώθηκε το 65%. Το κινητικό μοντέλο της απελευθέρωσης ακολουθεί το ημι-εμπειρικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas και ο ενδεικτικός μηχανισμός απελευθέρωσης της εγκλεισμένης ουσίας είναι μέσω διάχυσης.

5. Συμπεράσματα

Η μορφολογία των σωματιδίων εξετάστηκε με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) αποδεικνύοντας τη σφαιρική μορφή των σωματιδίων με βάση την ζεΐνη και την ακανόνιστη μορφή των σωματιδίων χιτοζάνης. Η διάμετρος, όπως αυτή υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα από το ηλεκτρομικό μικροσκόπιο σάρωσης των σωματιδίων ζεΐνης με εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ κυμαίνεται μεταξύ 0.6 – 2.0 μm , ενώ η μέση υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων βρέθηκε μέσω του Microtrack πως είναι $1.925 \pm 0.543 \mu\text{m}$. Τα blank σωματίδια ζεΐνης παρουσίασαν μικρότερη μέση υδροδυναμική σε σχέση με τα σωματίδια που έχουν εγκλεισμένο σαλικυλικό οξύ διάμετρο στα $1.843 \pm 0.64 \mu\text{m}$. Από την άλλη πλευρά, τα σωματίδια χιτοζάνης παρουσίασαν άμορφο σχήμα με διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 20 – 200 μm , ενώ η μέση υδροδυναμική διάμετρος υπολογίστηκε πως είναι $247.7 \pm 4.98 \mu\text{m}$.

Οι καθαρές πρώτες ύλες και τα σωματίδια που παράχθησαν αναλύονται φασματομετρικά με FTIR. Αναφορικά με το σύστημα εγκλεισμού ζεΐνη-σαλικυλικό οξύ η ανάλυση υπέδειξε πως οι χαρακτηριστικές κορυφές του σαλικυλικού οξέος στα εγκλεισμένα σωματίδια παρουσιάζονται μετατοπισμένες ενώ, ενώ άλλες δεν εμφανίζονται. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στον επιτυχή εγκλεισμό του σαλικυλικού οξέος στη μήτρα της ζεΐνης. Ακόμη, τα σωματίδια χιτοζάνης/πολυβινυλικής αλκοόλης επέδειξαν την διατήρηση της κρυσταλλικής δομής της χιτοζάνης και την παρουσία πολυβινυλικής αλκοόλης. Τα σωματίδια και οι καθαρές στερεές πρώτες ύλες αναλύθηκαν θερμικά μέσω Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης και βρέθηκε πως στα σωματίδια ζεΐνης με σαλικυλικό οξύ οι κορυφές της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης και αποδόμησης μετατοπίστηκαν σε υψηλότερες θερμοκρασίες, πράγμα που δείχνει αυξημένη θερμική προστασία, ενώ τα σωματίδια χιτοζάνης παρουσίασαν περισσότερες άμορφες περιοχές σε σχέση με την καθαρή χιτοζάνη, λόγω της αναδιαμόρφωσής της.

Ακόμη, στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν η μελέτη της ανάκτησης ουσιών με βιοδιεγερτική δράση από το θαλάσσιο φυτό *Saccharina Latissima* με συμβατική και υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση και η αξιολόγηση αυτών. Η υψηλότερες ανακτήσεις στερεών συστατικών επιτυγχάνονται κατά το Πείραμα 8.A της συμβατικής εκχύλισης με διαλύτη υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M (6 ώρες, 65 °C), 55.28%, κατά το Πείραμα 3.C της υποβοηθούμενης από υπερήχους εκχύλισης με διαλύτη μίγμα νερού/μεθανόλης 80/20 (20 λεπτά, 450 Hz, 30 °C, 2 g πρώτης ύλης) 47.52% και κατά το Πείραμα 2.B της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους (10 λεπτά, 450 Hz, 30 °C, 1 g πρώτης ύλης), 39.54%. Οι εκχυλίσσεις υποβοηθούμενες από υπερήχους φαίνεται να μπορούν να ανακτήσουν ικανοποιητικές ποσότητες στερεών ουσιών σε μικρότερο χρονικό διάστημα.

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε σε ισοδύναμα Trolox μέσω της ικανότητας των ουσιών να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH. Η μέγιστη ικανότητα αντιοξειδωτικής δράσης, 0.80 mg TEAC/g πρώτης ύλης, εντοπίζεται στο υγρό εκχύλισμα του Πειράματος 3.C της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους με διαλύτη νερό/μεθανόλη 80/20. Οι εκχυλίσσεις υποβοηθούμενες από υπερήχους με διαλύτη απιονισμένο νερό παρουσιάστηκαν ιδιαίτερα αποδοτικές με τις τιμές τους να είναι συγκρίσιμες με τις περιεκτικότητες από την συμβατική εκχύλιση με διαλύτη απιονισμένο νερό. Έτσι, μπορεί να επιτευχθεί σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα όμοια ανάκτηση αντιοξειδωτικών ουσιών, χωρίς την κατανάλωση θερμικής και

5. Συμπεράσματα

μηχανικής ενέργειας. Επίσης, τα εκχυλίσματα με διαλύτη ακετόνη και οξικό αιθυλεστέρα δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη αντιοξειδωτική δράση. Η ικανότητα αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων βρέθηκε πως είναι διαφορετική σε σχέση με άλλες βιβλιογραφικές έρευνες λόγω διαφορετικής τοποθεσίας και εποχής συγκομιδής, βάθος καλλιέργειας, συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών στο νερό και συνθηκών επεξεργασίας και αποθήκευσης.

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε με βάση την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η μέγιστη περιεκτικότητα, 4.81 mg TPC/g πρώτης ύλης, σημειώθηκε κατά το Πείραμα 8.A της συμβατικής εκχύλισης με διάλυμα καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M (6 ώρες, 65 °C), ενώ κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους του Πειράματος 2.C εκχυλίστηκε 3.82 mg TPC/g πρώτης ύλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη αιθανόλη/νερό 80/20. Έπειτα τόσο η συμβατική εκχύλιση του Πειράματος 2.A (νερό, 1 ώρα, 30 °C, 1/20) όσο και η υποβοηθούμενη από υπερήχους του Πειράματος 2.B (νερό, 10 λεπτά, 30 °C, 1/40, 1 g) σημείωσαν παρόμοιες τιμές 2.32 και 2.28 mg TPC/g πρώτης ύλης, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έρχονται σε συμφωνία με άλλες βιβλιογραφικές έρευνες.

Τα βέλτιστα υδατικά εκχυλίσματα (Πειράματα 1.A, 2.A, 8.A και 2.B) εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε χλωροφύλλες, με το Πείραμα 2.B εμφανίζει μόνο β-χλωροφύλλες 0.863 μg/g ξηρής πρώτης ύλης. Τα υπόλοιπα εμφανίζουν κυμαινόμενες περιεκτικότητες που φτάνουν μέχρι 0.0287 μg/g ξηρής πρώτης ύλης. Τα ίδια εκχυλίσματα αναλύθηκαν για την περιεκτικότητά τους σε καροτενοειδή, τα οποία εμφανίστηκαν μειωμένα σε σχέση με την βιβλιογραφία. Η μέγιστη ποσότητα καροτενοειδών εντοπίστηκε στο Πείραμα 8.A και είναι 0.0564 μg/g ξηρής πρώτης ύλης. Η ξηρή πρώτη ύλη και το στερεό εκχύλισμα από το Πείραμα 2.B αξιολογείται για το περιεχόμενο του σε φυκοκυανίνες. Μέσω της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους επιτυγχάνεται 80.8% ανάκτηση των φυκοκυανών που περιέχονται στην πρώτη ύλη.

Τέλος, εφαρμόζοντας την μέθοδο Bradford, βάση της οποίας οι πρωτεΐνες απορροφούν ακτινοβολία σε συγκεκριμένο μήκος κύματος υπολογίζεται πως η περιεκτικότητά τους κυμαίνεται στα 0.351 – 1.49 mg BSA/g πρώτης ύλης. Η υψηλότερη τιμή σημειώθηκε κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Πείραμα 3.C) με διαλύτη μίγμα νερού/μεθανόλης 80/20. Η χαμηλότερη πολικότητα αυτού του διαλύτη βοηθά στην εκχύλιση περισσότερων υδρόφοβων πρωτεϊνών.

6. Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Από τα πειράματα που διεξήχθησαν εντοπίστηκαν διάφορα σημεία που χρήζουν επί πρόσθετη μελέτη με στόχο την εξοικείωσής της ερευνητικής κοινότητας με τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές και ουσίες και την εφαρμογή τους σταδιακά σε πραγματικές μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες. Οι προτάσεις που δίνονται κινούνται πάνω στον άξονα της βελτίωσης της απόδοσης της παραγωγής σωματιδίων μέσω ηλεκτροψεκασμού και βελτίωσης της μεθόδου εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών. Οι υπο-άξονες μελέτης που δημιουργούνται είναι, έτσι:

- Παραμετρική μελέτη των παραγόντων που επιδρούν στην απόδοση του εγκλεισμού με σκοπό την βελτιστοποίηση της διεργασίας.
- Ενδεδειγμένη μελέτη των παραγόντων που επενεργούν στο σχηματισμό μικρο-σωματιδίων και το μέγεθος των σωματιδίων με χρησιμοποιώντας ως μήτρα την ζεΐνη και την χιτοζάνη.
- Οικονομο-τεχνολογική μελέτη της διεργασίας και μελέτη σκοπιμότητας παραγωγικής μονάδας παραγωγής προϊόντων υψηλής καινοτομίας για προστασία και ενίσχυση καλλιεργειών.
- Μελέτη περισσότερων υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρες βιοδραστικών συστατικών και είναι παραπροϊόντα άλλων διεργασιών ώστε να ενισχυθεί η κυκλική οικονομία.
- Έρευνα στην παραγωγή σωματιδίων με βάση το νερό και την μείωση των οργανικών διαλυτών.
- Βελτιστοποίηση της διεργασίας ηλεκτροστατικού ψεκασμού διαλύματος χιτοζάνης και πολυβινυλικής αλκοόλης με στόχο την αύξηση της απόδοσης.
- Αξιολόγηση της δράσης των μικρο-συστημάτων σε συνθήκες αγρού.
- Μελέτη εναλλακτικών διαλυτών που καθιστούν πράσινη την τεχνολογία της εκχύλισης.
- Μελέτη εκχύλισης με εναλλακτικές μεθόδους, χρήση μικροκυμάτων και υψηλής πίεσης (PLE) για σύγκριση αποδόσεων.
- Μελέτη της επίδρασης της προέλευσης και της εποχής συγκομιδής στο προφίλ θρεπτικών συστατικών των εκχυλισμάτων.
- Στοιχειακή ανάλυση της περιεκτικότητας των θρεπτικών συστατικών που περιέχεται στο φύκος *Saccharina Latissima* και τα εκχυλίσματα της.
- Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών που περιέχονται στα εκχυλίσματα του φύκος μέσω HPLC.
- Αξιολόγηση της βιοδιεγερτικής δράσης της *Saccharina Latissima* σε συνθήκες αγρού.

7. Βιβλιογραφία

- [1] Pereira, L.S., “Water, Agriculture and Food: Challenges and Issues”, *Water Resour Manage* 31: 2985–2999 (2017) <https://doi.org/10.1007/s11269-017-1664-z>
- [2] Baltazar, M., Correia, S., Guinan, K.J.; Sujeeth, N., Bragança, R., Gonçalves, B., “Recent Advances in the Molecular Effects of Biostimulants in Plants: An Overview”, *Biomolecules* 11: 1096 (2021) <https://doi.org/10.3390/biom11081096>
- [3] Abdulgani Devlet, “Modern agriculture and challenges”, *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies* 2(1): 21-29 (2021) <https://doi.org/10.51753/flsrt.856349>
- [4] Food and Agriculture Organization of the United Nations [Online], Rome, (2020). Available: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cb1447en>
- [5] Devendra, C., “Climate Change Threats and Effects: Challenges for Agriculture and Food Security”. Academy of Sciences Malaysia, Kuala Lumpur. (2012) https://agrilinks.org/sites/default/files/resource/files/climate_change_threats_effects_strategies.pdf
- [6] Fatima El Amerany, Abdelilah Meddich, Said Wahbi, Andrea Porzel, Moha Taourirte, Mohammed Rhazi, Bettina Hause, “Foliar Application of Chitosan Increases Tomato Growth and Influences Mycorrhization and Expression of Endochitinase-Encoding Genes”, *Int. J. Mol. Sci.* 21(2): 535 (2020) <https://doi.org/10.3390/ijms21020535>
- [7] Yujiao Jia, Lu Kang, Yangliu Wu, Chunran Zhou, Dong Li, Jiaqi Li, Canping Pan, “Review on Pesticide Abiotic Stress over Crop Health and Intervention by Various Biostimulants”, *J. Agric. Food Chem.* 2023 (71) 13595–13611 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04013>
- [8] Magnabosco, P., Masi, A., Shukla, R. et al., “Advancing the impact of plant biostimulants to sustainable agriculture through nanotechnologies”, *Chem. Biol. Technol. Agric.* 10: 117 (2023) <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00491-8>
- [9] Lin Xu, Danny Geelen, “Developing Biostimulants From Agro-Food and Industrial By-Products”, *Front. Plant Sci.* 9:1567 (2018) <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01567>
- [10] Patrick du Jardin, “Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and Regulation”, *Scientia Horticulturae* 196: 3–14 (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- [11] Youssef Rouphael, Giuseppe Colla, “Editorial: Biostimulants in Agriculture”, *Front. Plant Sci.* 11:40 (2020) <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>
- [12] S. De Pascale, Y. Rouphael, G. Colla, “Plant biostimulants: innovative tool for enhancing plant nutrition in organic farming”, *Eur. J. Hortic. Sci.* 82(6), 277–285 (2017) <https://doi.org/10.17660/eJHS.2017/82.6.2>

7. Βιβλιογραφία

- [13] Youssef Roupheal, Giuseppe Colla, “Toward a Sustainable Agriculture Through Plant Biostimulants: From Experimental Data to Practical Applications”, *Agronomy* 10(10): 1461 (2020) <https://doi.org/10.3390/agronomy10101461>
- [14] Tatjana G. Shibaeva, Elena G. Sherudilo, Khurshed B. Mamatmurodov, Anastasia E. Parshina, “Assessment of Four White Sea Brown Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth”, *E3S Web of Conferences* 411: 01067 (2023) <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202341101067>
- [15] R. Bulgari, G. Cocetta, A. Trivellini, P. Vernieri & A. Ferrante (2015), “Biostimulants and crop responses: a review”, *Biological Agriculture & Horticulture*, 31(1): 1-17, <https://doi.org/10.1080/01448765.2014.964649>
- [16] Calvo Pamela, Nelson Louise, Kloepper W. Joseph, “Agricultural uses of plant biostimulants”, *Plant Soil* 383: 3–41 (2014) <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- [17] Jiménez-Arias D., Morales-Sierra S., Silva P., Carrêlo H., Gonçalves A.; Ganança J.F.T., Nunes N., Gouveia C.S.S., Alves S., Borges J.P. et al. “Encapsulation with Natural Polymers to Improve the Properties of Biostimulants in Agriculture”, *Plants* 12: 55 (2023) <https://doi.org/10.3390/plants12010055>
- [18] Sílvia Castro Coelho, Berta Nogueiro Estevinho, Fernando Rocha, “Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying – A review”, *Food Chemistry* 339:127850 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127850>
- [19] Bell C. Jessica, Bound A. Sally, Buntain Michele, “Biostimulants in Agricultural and Horticultural Production”. In *Horticultural Reviews*, I. Warrington (Ed.). 35-95 (2022) <https://doi.org/10.1002/9781119851981.ch2>
- [20] Estefânia V.R. Campos, Anderson do E.S. Pereira, Ivan Aleksieienko, Giovanna C. do Carmo, Gholamreza Gohari, Catherine Santaella, Leonardo F. Fraceto, Halley C. Oliveira, “Encapsulated plant growth regulators and associative microorganisms: Nature-based solutions to mitigate the effects of climate change on plants” *Plant Science* 331: 111688 (2023) <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111688>
- [21] Jhones L. de Oliveira, Estefânia V. R. Campos, Anderson E. S. Pereira, Tatiane Pasquoto, Renata Lima, Renato Grillo, Daniel Junior de Andrade, Fabiano Aparecido dos Santos, and Leonardo Fernandes Fraceto, “Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (6): 1330-1340 (2018) <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05552>
- [22] Yaguang Xu, Xinxin Yan, Haibo Zheng, Jingjun Li, Xiaowei Wu, Jingjing Xu, Zongyuan Zhen, Chuanlai Du, “The application of encapsulation technology in the food Industry: Classifications, recent Advances, and perspectives”, *Food Chemistry: X* 21:101240 (2024) <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101240>
- [23] Gorka Orive, Rose Maria Hernández, Alicia Rodríguez Gascón, Riccardo Calafiore, Thomas Ming Swi Chang, Paul de Vos, Gonzalo Hortelano, David Hunkeler,

7. Βιβλιογραφία

- Igor Lacík and José Luis Pedraz, “History, challenges and perspectives of cell microencapsulation”, *TRENDS in Biotechnology* 22(2) (2004) <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.11.004>
- [24] Sara J. Risch, “Encapsulation: Overview of Uses and Techniques”, *ACS Symposium Series* (590), *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* Chapter 1:2-7 <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0590.ch001>
- [25] Samah M. El-Sayed, Hoda S. El-Sayed, Ahmed M. Youssef, “Recent developments in encapsulation techniques for innovative and high-quality dairy products: Demands and challenges”, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 31: 100406 (2024) <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2024.100406>
- [26] Zabet G.L., Schaefer Rodrigues F., Polano Ody L., Vinícius Tres M., Herrera E., Palacin H., Córdova-Ramos J.S., Best I., Olivera-Montenegro L., “Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications”, *Polymers* 14: 4194 (2022) <https://doi.org/10.3390/polym14194194>
- [27] Travis J. Sill, Horst A. von Recum, “Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering” *Biomaterials* 29: 1989-2006 (2008) <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011>
- [28] S Meraz-Dávila et al., “Challenges and advantages of electrospun nanofibers in agriculture: a review”, *Mater. Res. Express* 8(4): 2001 (2021) <https://doi.org/10.1088/2053-1591/abee55>
- [29] Roohallah Saberi Riseh, Mohadeseh Hassanisaadi, Masoumeh Vatankhah, Fatemeh Soroush, Rajender S. Varma, “Nano/microencapsulation of plant biocontrol agents by chitosan, alginate, and other important biopolymers as a novel strategy for alleviating plant biotic stresses”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 222 (A): 1589-1604 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.278>
- [30] Balla A., Silini A., Cherif-Silini H., Chenari Bouket A., Alenezi F.N., Belbahri L., “Recent Advances in Encapsulation Techniques of Plant Growth-Promoting Microorganisms and Their Prospects in the Sustainable Agriculture”, *Appl. Sci.* 12:9020 (2022) <https://doi.org/10.3390/app12189020>
- [31] Pravin Vejan, Tumirah Khadiran, Rosazlin Abdullah, Salmah Ismail & Arezoo Dadrasnia, “Encapsulation of plant growth promoting Rhizobacteria—prospects and potential in agricultural sector: a review”, *Journal of Plant Nutrition*, 42(19): 2600-2623 (2019) <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659330>
- [32] Amir Rezvankhah, Zahra Emam-Djomeh & Gholamreza Askari, “Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review”, *Drying Technology*, 38(1-2) 235-258 (2020) <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1653906>
- [33] Mônica Pascoli, Felícia Pereira de Albuquerque, Anderson Kikuchi Calzavara, Bruno Tinoco-Nunes, Wanderson Henrique Cruz Oliveira, Kelly Cristina Gonçalves, Ricardo Antônio Polanczyk, Jaqueline Franciosi Della Vechia, Sidnéia Terezinha Soares de Matos, Daniel Júnior de Andrade, Halley Caixeta Oliveira, Jayme A.

7. Βιβλιογραφία

Souza-Neto, Renata de Lima, Leonardo Fernandes Fraceto¹, “The potential of nanobiopesticide based on zein nanoparticles and neem oil for enhanced control of agricultural pests”, *Journal of Pest Science* 93:793–806 (2020) <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01194-x>

[34] Vandana Chaudhary, Neha Thakur, Priyanka Kajla, Shubham Thakur, Sneha Punia, “Application of Encapsulation Technology in Edible Films: Carrier of Bioactive Compounds”, *Front. Sustain. Food Syst.* 5:734921. (2021) | <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.734921>

[35] Haritz Gurruchaga, Laura Saenz del Burgo, Jesús Ciriza, Gorka Orive, Rosa Mariá, Hernández, Jose Luis Pedraz, “Advances in cell encapsulation technology and its application in drug delivery”, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(8), 1251–1267 (2015) <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1001362>

[36] Francisca Casanova, Lúcia Santos “Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review”, *Journal of Microencapsulation*, 33(1): 1-17 (2016), <https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1115900>

[37] Raskin I., “Role of Salicylic Acid in Plants”, *Annual Review of Plant Biology*, 43: 439- 463. (1992) <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.002255>

[38] Hanna Bandurska, “Salicylic Acid: An Update on Biosynthesis and Action in Plant Response to Water Deficit and Performance Under Drought” In: Shamsul Hayat, Aqil Ahmad, Mohammed Nasser Alyemeni, (eds) “Salicylic Acid- Plant Growth and Development”, *Salicylic Acid*, https://doi.org/10.1007/978-94-007-6428-6_1

[39] Magda Pál, Tibor Janda, Imre Majláth, Gabriella Szalai, “Involvement of Salicylic Acid and Other Phenolic Compounds in Light-Dependent Cold Acclimation in Maize”, *Int. J. Mol. Sci.* 21(6): 1942 (2020) <https://doi.org/10.3390/ijms21061942>

[40] Jimmy Sampedro-Guerrero, Vicente Vives-Peris, Aurelio Gomez-Cadenas, Carolina Clausell-Terol, “Improvement of salicylic acid biological effect through its encapsulation with silica or chitosan”, *International Journal of Biological Macromolecules* 199: 108–120 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.124>

[41] Ioana Ignat, Alina Stingu, Irina Volf, V.I.Popa “NATURAL BIOACTIVE COMPOUNDS AS PLANT GROWTH REGULATORS”, *Lucrări Științifice* (52), seria Agronomie https://www.uaiasi.ro/revagrois/PDF/2009_1_189.pdf

[42] García-Pastor ME, Zapata PJ, Castillo S, Martínez-Romero D, Guillén F, Valero D and Serrano M., “The Effects of Salicylic Acid and Its Derivatives on Increasing Pomegranate Fruit Quality and Bioactive Compounds at Harvest and During Storage”, *Front. Plant Sci.* 11:668 (2020) <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00668>

[43] Filgueiras CC, Martins AD, Pereira RV, Willett DS., “The Ecology of Salicylic Acid Signaling: Primary, Secondary and Tertiary Effects with Applications in Agriculture”, *International Journal of Molecular Sciences.* 20(23): 5851 (2019) <https://doi.org/10.3390/ijms20235851>

7. Βιβλιογραφία

- [44] Figen Eraslan, Ali Inal, Aydin Gunes, Mehmet Alpaslan, “Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity”, *Scientia Horticulturae* 113: 120–128 (2007) <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.03.012>
- [45] Aydin Gunes, Ali Inal, Mehmet Alpaslan, Figen Eraslan, Esra Guneri Bagci, Nuray Cicek, “Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity”, *Journal of Plant Physiology* 164: 728—736 (2007)
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.12.009>
- [46] Busra Arikan, Evren Yildiztugay, Ceyda Ozfidan-Konakci, “Responses of salicylic acid encapsulation on growth, photosynthetic attributes and ROS scavenging system in *Lactuca sativa* exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon pollution”, *Plant Physiology and Biochemistry* 203: 108026 (2023)
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108026>
- [47] Sampedro-Guerrero J., Vives-Peris V., Gomez-Cadenas A., Clausell-Terol C., “Encapsulation Reduces the Deleterious Effects of Salicylic Acid Treatments on Root Growth and Gravitropic Response”, *Int. J. Mol. Sci.* 23: 14019 (2022)
<https://doi.org/10.3390/ijms232214019>
- [48] John W. Lawton, “Zein: A History of Processing and Use”, *Cereal Chem.* 79(1):1–18 (2002) <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.1.1>
- [49] Rishi Shukla, Munir Cheryan, “Zein: the industrial protein from corn”, *Industrial Crops and Products*, 13(3):171-192 (2001)
[https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00064-9)
- [50] Patrick Argos, Karl Pedersen, M. David Marks, Brian A. Larkins, “A Structural Model for Maize Zein Proteins”, *Journal of Biological Chemistry*, 257 (17):9984-9990 (1982) [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)33974-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33974-7)
- [51] Frank A. Momany, David J. Sessa, John W. Lawton, Gordon W. Selling, Sharon A. H. Hamaker, Julious L. Willett, “Structural Characterization of r-Zein”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2):543-547 (2006)
<https://doi.org/10.1021/jf058135h>
- [52] Hongxia Tan, Hongyuan Zhou, Ting Guo, Ying Zhou, Shuo Wang, Yuhao Zhang, Ruo Yuan, Liang Ma, “Investigating the effects of zein preparation conditions on its structure, functional properties and zearalenone contamination”, *Food Control* 159:110297 (2024)
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110297>
- [53] Qianyun Ma, Lin Du, Lijuan Wang, “Tara gum/polyvinyl alcohol-based colorimetric NH₃ indicator films incorporating curcumin for intelligent packaging”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 244:759-766 (2017)
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.035>

7. Βιβλιογραφία

- [54] Xiang Lan, Xinyu Zhang, Lei Wang, Haiyan Wang, Zhe Hu, Xiaochen Ju, Yongkai Yuan, “A review of food preservation based on zein: The perspective from application types of coating and fil”, *Food Chemistry* 424: 136403 (2023)
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136403>
- [55] Damla Dag, Jooyeoun Jung, Yanyun Zhao, “Development and characterization of cellulose nanofiber reinforced hydroxypropyl methylcellulose films functionalized with propolis-loaded zein nanoparticles and its application for cheddar cheese storage” *International Journal of Biological Macromolecules* 261(2): 129790 (2024)
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129790>
- [56] Rishi Paliwal, Srinath Palakurthi, “Zein in controlled drug delivery and tissue engineering”, *Journal of Controlled Release* 189: 108–122 (2014)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.036>
- [57] Saeid Ghasemi, Afshin Alibabaei, Reyhane Saberi, Mahdie Esmaeili, Dariush Semnani, Saeed Karbasi, “Evaluation of the effects of zein incorporation on physical, mechanical, and biological properties of polyhydroxybutyrate electrospun scaffold for bone tissue engineering applications”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 253(3): 12684331 (2023)
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126843>
- [58] Yingying Zhang, Miaojie Xu, Xinrui Zhang, Yayun Hu, Guangzhong Luan, “Application of zein in gluten-free foods: A comprehensive review”, *Food Research International* 160: 111722 (2022)
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111722>
- [59] Shuang Zhang, Ying Tang, Ruiying Wang, Qi Liu, Xi Zhang, Hua Zhao, “Design of hydrophobic zein/dye-LDHs biohybrid pigments for cosmetic applications”, *Applied Clay Science* 250: 107256 (2024)
<https://doi.org/10.1016/j.clay.2024.107256>
- [60] Li Hao, Guanquan Lin, Chuangyu Chen, Hongjun Zhou, Huayao Chen, and Xinhua Zhou, “Phosphorylated Zein as Biodegradable and Aqueous Nanocarriers for Pesticides with Sustained-Release and anti-UV Properties” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (36), 9989-9999 (2019) <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03060>
- [61] Tímea Kacs, Ioan O. Neaga, Arnold Erincz, Carlos E. Astete, Cristina M. Sabliov, Radu Oprean, Ede Bodoki, “Perspectives in the design of zein-based polymeric delivery systems with programmed wear down for sustainable agricultural applications”, *Polymer Degradation and Stability* 155: 130-135 (2018)
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.07.014>
- [62] Al-Dhabaan, F.A., Mostafa, M., Almoammar, H., Abd-Elsalam, K.A. (2018). Chitosan-Based Nanostructures in Plant Protection Applications. In: Abd-Elsalam, K., Prasad, R. (eds) *Nanobiotechnology Applications in Plant Protection*. Nanotechnology in the Life Sciences. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91161-8_13
- [63] Shahrajabian M.H., Chaski C., Polyzos N., Tzortzakis N., Petropoulos S.A., “Sustainable Agriculture Systems in Vegetable Production Using Chitin and Chitosan as Plant Biostimulants”, *Biomolecules* 11:819 (2021)
<https://doi.org/10.3390/biom11060819>

7. Βιβλιογραφία

- [64] Javier Perez Quipones, Yamilet Coll Garcva, Harold Curiel, Carlos Peniche Covas, “Microspheres of chitosan for controlled delivery of brassinosteroids with biological activity as agrochemicals”, *Carbohydrate Polymers* 80: 915–921 (2010) <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.006>
- [65] Jianlong Wang, Shuting Zhuang, “Chitosan-based materials: Preparation, modification and application”, *Journal of Cleaner Production* 355: 131825 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131825>
- [66] Massimo Malerba, Raffaella Cerana, “Chitosan Effects on Plant Systems”, *Int. J. Mol. Sci.* 17, 996 (2016) <https://doi.org/10.3390/ijms17070996>
- [67] Sun W., Shahrajabian M.H., Petropoulos, S.A.,Shahrajabian, N., “Developing Sustainable Agriculture Systems in Medicinal and Aromatic Plant Production by Using Chitosan and Chitin-Based Biostimulants”, *Plants* 12: 2469 (2023) <https://doi.org/10.3390/plants12132469>
- [68] Jiahua Ma, Yahya Faqir, Yunlong Chai, Sanmei Wu, Tong Luo, Shiyu Liao, Abdul Rasheed Kaleri, Chengjia Tan, Yuxin Qing, Mohammad Talib Kalhoro, Niaz Umer, Wazir Hadir, “Chitosan microspheres-based controlled release nitrogen fertilizers enhance the growth, antioxidant, and metabolite contents of Chinese cabbage”, *Scientia Horticulturae* 308: 111542 (2023) <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111542>
- [69] Ivo Diego de Lima Silva, Luiz Emilio Pessoa Timeni de Moraes Filho, Viviane Fonseca Caetano, Michelle Félix de Andrade, Fernando Hallwass, Andréa Monteiro Santana Silva Brito, Glória Maria Vinhas, “Development of antioxidant active PVA films with plant extract of *Caesalpinia ferrea* Martius”, *LWT* 144:111215 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111215>
- [70] Hamidreza Shagholani, Sayed Mehdi Ghoreishi, Mohammad Mousazadeh,, “Improvement of interaction between PVA and chitosan via magnetite nanoparticles for drug delivery application”, *International Journal of Biological Macromolecules* 78:130-136 (2015) <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.042>
- [71] Hernández-Hernández H, Juárez-Maldonado A, Benavides-Mendoza A, Ortega-Ortiz H, Cadenas-Pliego G, Sánchez-Aspeytia D, González-Morales S., “Chitosan-PVA and Copper Nanoparticles Improve Growth and Overexpress the SOD and JA Genes in Tomato Plants under Salt Stress”, *Agronomy* 8(9):175 (20218) <https://doi.org/10.3390/agronomy8090175>
- [72] Maluin Fahatun Najat, Hussein Mohd Zobir, “Chitosan-Based Agronanochemicals as a Sustainable Alternative in Crop Protection”, *Molecules.* 25(7):1611 (2020) <https://doi.org/10.3390/molecules25071611>
- [73] Hosseini H, Shahraky MK, Amani A, Landi FS., “Electrospinning of polyvinyl alcohol/chitosan/hyaluronic acid nanofiber containing growth hormone and its release investigations”, *Polym Adv Technol.* 32 (2):574–581 <https://doi.org/10.1002/pat.5111>
- [74] Generalić Mekinić I, Skroza D, Šimat V, Hamed I, Čagalj M, Popović Perković Z., “Phenolic Content of Brown Algae (Pheophyceae) Species: Extraction, Identification, and Quantification”, *Biomolecules* 9(6):244 (2019)

7. Βιβλιογραφία

<https://doi.org/10.3390/biom9060244>

[75] Xianglu Zhu, Laura Healy, Janith Wanigasekara, Ming Zhao, Ramesh Babu Padamati, Shanmugapriya Karuppusamy, James F. Curtin, Saravana Periaswamy Sivagnanam, Dilip K. Rai, Da-Wen Sun, Brijesh K. Tiwari, “Characterisation of laminarin extracted from brown seaweed *Laminaria digitata*, using optimized ultrasound- and ultrafiltration-assisted extraction method”, *Algal Research* 75: 103277 (2023) <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103277>

[76] Neto RT, Marçal C, Queirós AS, Abreu H, Silva AMS, Cardoso SM., “Screening of *Ulva rigida*, *Gracilaria* sp., *Fucus vesiculosus* and *Saccharina latissima* as Functional Ingredients”, *International Journal of Molecular Sciences*. 19(10):2987 (2018) <https://doi.org/10.3390/ijms19102987>

[77] Flórez-Fernández N., Ferreira-Anta T.; Queffelec J., Inguez, I.B., Buján, M., Muiños A., Domínguez H., Torre, M.D, “Biocosmetics Made with *Saccharina latissima* Fractions from Sustainable Treatment: Physicochemical and Thermorheological Features”, *Mar. Drugs* 21: 618 (2023) <https://doi.org/10.3390/md21120618>

[78] J. Mildenerberger, J.K. Stangeland, C. Rebours, “Antioxidative activities, phenolic compounds and marine food allergens in the macroalgae *Saccharina latissima* produced in integrated multi-trophic aquaculture systems”, *Aquaculture* 546:737386 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737386>

[79] Magdalena M. Stefaniak, María Gudjónsdóttir, Gudrun Marteinsdóttir, Sesselja Omarsdóttir, Elena Bravo, Olafur Eysteinn Sigurjónsson, Kristberg Kristbergsson, “Determination of bioactive properties of food grade extracts from Icelandic edible brown seaweed sugar kelp (*Saccharina latissima*) with in vitro human cell cultures (THP-1)”, *Functional Foods in Health and Disease* 9(1): 1-15 (2019) <https://doi.org/10.31989/ffhd.v9i1.546>

[80] Lafeuille B., Tamigneaux É., Berger K., Provencher V., Beaulieu L., “Variation of the Nutritional Composition and Bioactive Potential in Edible Macroalga *Saccharina latissimi* Cultivated from Atlantic Canada Subjected to Different Growth and Processing Conditions”, *Foods* 12:1736 (2023) <https://doi.org/10.3390/foods12081736>

[81] Urd Grandorf Bak, Cecilie Wirenfeldt Nielsen, Gonçalo Silva Marinho, Ólavur Gregersen, Rósa Jónsdóttir, Susan Løvstad Holdt, “The seasonal variation in nitrogen, amino acid, protein and nitrogen-to-protein conversion factors of commercially cultivated Faroese *Saccharina latissimi*”, *Algal Research* 42:101576 (2019) <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101576>

[82] L. Juul, L. Stødkilde, A.K. Ingerslev, A. Bruhn, S.K. Jensen, T.K. Dalsgaard,, “Digestibility of seaweed protein from *Ulva* sp. and *Saccharina latissima* in rats”, *Algal Research*, 63: 102644 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102644>

[83] Van Oosten, M.J., Pepe, O., De Pascale, S. et al. “The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants”, *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4: 5 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>

7. Βιβλιογραφία

[84]] Damiano Spagnuolo, Domenico Prisa, “Evaluation of Growth Parameters on *Carpobrotus edulis*, *Kalanchoe daigremontiana* and *Kalanchoe tubiflora* in Relation to Different Seaweed Liquid Fertilizer (SLF) as a Biostimulant”, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 10(10): 67-76 (2021)

<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1010.010>

[85] Sterner, M., Gröndahl, F., “Extraction of laminarin from *Saccharina latissima* seaweed using cross-flow filtration”, *J Appl Phycol* 33: 1825–1844 (2021)

<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02398-z>

[86] S. O. Okeniyi, J. Ogbodabri, A. O. Oyedeji, P. E. Omale, M. M. Adeyemi, S. Garba, J. A. Lori, “Modified Bradford Assay Method of Protein Quantification Utilising Dye Reagents from Four Nigerian Plants”, *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)* 3(12):79-87 (2015)

<https://www.researchgate.net/profile/Abdelkader-Bouaziz/post/Is-Bradford-protein-quantification-adequate-for-polysaccharides/attachment/5f6b7028828e0b000156e2bf/AS%3A938958603182084%401600876584893/download/Bradford.pdf>

[87] Inga Marie Aasen, Ingrid S. Sandbakken, Bendik Toldnes, Michael Y. Roleda, Rasa Slizyte, “Enrichment of the protein content of the macroalgae *Saccharina latissima* and *Palmaria palmate*”, *Algal Research* 65:102727 (2022)

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102727>

[88] Marinho, G.S., Sørensen, AD.M., Safafar, H. et al., “Antioxidant content and activity of the seaweed *Saccharina latissima*: a seasonal perspective”, *J Appl Phycol* 31:1343–1354 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1650-8>

[89] Pacheco D., Cotas J., Pereira L., Bahcevandziev K. A, “Possible Synergistic Approach: Case Study of *Saccharina latissima* Extract and Nitrifying Bacteria in Lettuce”, *J. Mar. Sci. Eng.* 11: 1645 (2023) <https://doi.org/10.3390/jmse11091645>

[90] González-Pérez, B.K., Rivas-Castillo, A.M., Valdez-Calderón, A. et al., “Microalgae as biostimulants: a new approach in agriculture”, *World J Microbiol Biotechnol* 38:4 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03192-2>

[91] Irianto Irianto, Agustien Naryaningsih, Ni Wayan Trisnawati, Astuti Astuti, Kokom Komariyah, Lailatul Qomariyah, Chaidir Chaidir, Ariyanti Saputri, Rika Wulandari, Dwila Nur Rizkiyah, Nicky Rahmana Putra, “From sea to solution: A review of green extraction approaches for unlocking the potential of brown algae”, *South African Journal of Chemical Engineering*, 48:1-21 (2024) <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2024.01.001>

[92] Oliyaei, N., & Moosavi-Nasab, M., “Ultrasound-assisted extraction of fucoxanthin from *Sargassum angustifolium* and *Cystoseira indica* brown algae”, *Journal of Food Processing and Preservation* 45: 15929 (2021) <https://doi.org/10.1111/jfpp.15929>

[93] Farid Chemat, Natacha Rombaut, Anne-Gaëlle Sicaire, Alice Meullemiestre, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Maryline Abert-Vian, “Ultrasound assisted extraction of

7. Βιβλιογραφία

food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review”, *Ultrasonics Sonochemistry* 34:540-560 (2017) <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

[94] M.A. Mohamed, J. Jaafar, A.F. Ismail, M.H.D. Othman, M.A. Rahman, “Chapter 1 - Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, Editor(s): Nidal Hilal, Ahmad Fauzi Ismail, Takeshi Matsuura, Darren Oatley-Radcliffe, Membrane Characterization, Elsevier 3-29 (2017) <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2>

[95] Gaffney, J.S., Marley, N.A. and Jones, D.E., “Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy” In: Characterization of Materials, E.N. Kaufmann (Ed.). (2012) <https://doi.org/10.1002/0471266965.com107.pub2>

[96] David C. Joy, “The theory and practice of high-resolution scanning electron microscopy”, *Ultramicroscopy* 37:216-233 (1991) [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(91\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0304-3991(91)90020-7)

[97] “Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis“, Joseph I. Goldstein, Dale E. Newbury, Joseph R. Michael, Nicholas W.M. Ritchie, John Henry J. Scott, David C. Joy, Springer 2017 <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9>

[98] Sandhu R., Singh N., Dhankhar J., Kama G., & Sharma, R., «Dynamic light scattering (DLS) technique, principle, theoretical considerations and applications», *Nanotechnol. Biochem. Tech. Assess. Qual. Saf. Milk Milk Prod*, 135-137 (2018) https://www.researchgate.net/publication/331022012_Dynamic_light_scattering_DLS_technique_principle_theoretical_considerations_and_applications

[99] https://facilities.bioc.cam.ac.uk/files/media/dls_terms_defined_malvern.pdf (Αθήνα, 20024)

[100] Γ. Γκοτζαμάνης. Ανάπτυξη νέων «ευφυών» κατά συστάδες συμπολυμερών τύπου ομοπολυμερές – στατιστικό συμπολυμερές. Διδακτορική διατριβή. 2007. <https://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/26642>

[101] Steve J. Compton, Clive G. Jones, “Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay”, *Analytical Biochemistry* 151(2): 369-374 (1985) [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)

[102] Marion M. Bradford, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”, *Analytical Biochemistry* 7(72): 248-254 (1976) <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

[103] Busra Arıkan, Evren Yildiztugay, Ceyda Ozfidan-Konakci, “Responses of salicylic acid encapsulation on growth, photosynthetic attributes and ROS scavenging system in *Lactuca sativa* exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon pollution”, *Plant Physiology and Biochemistry* 203:108026 (2023) <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108026>

[104] Aydin Gunes, Ali Inal, Mehmet Alpaslan, Figen Eraslan, Esra Guneri Bagci, Nuray Cicek, “Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown

7. Βιβλιογραφία

under salinity”, *Journal of Plant Physiology* 164 (6): 728-736 (2007) <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.12.009>

[105] Figen Eraslan, Ali Inal, Aydin Gunes, Mehmet Alpaslan, “Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity”, *Scientia Horticulturae* 113(2):120-128 (2007) <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.03.012>

[106] Zabet G.L., Schaefer Rodrigues F., Polano Ody, L.; Vinícius Tres M.; Herrera E., Palacin H., Córdova-Ramos J.S., Best I.; Olivera-Montenegro L., “Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications”, *Polymers* 14:4194 (2022) <https://doi.org/10.3390/polym14194194>

[107] Gabriela Patricia Unigarro Villarreal, Anderson do Espirito Santo Pereira, Roberta Ranielle Matos de Freitas, Maria Carolina Blassioli Moraes, Anderson Ferreira Sepulveda, Daniele Ribeiro de Araujo, Leonardo Fernandes Fraceto, “Zein-based nanoformulations with encapsulated methyl salicylate incorporated in 3D printing biopolymer devices targeting potential uses in pest management”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 670:131511 (2023) <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.131511>

[108] Mohammad Amin Miri, Jibrail Movaffagh, Mohammad B. Habibi Najafi, Masoud Najaf Najafi, Behrouz Ghorani, and Arash Koocheki , “Optimization of Electrospinning Process of Zein Using Central Composite Design”, *Fibers and Polymers*, 17(5):769-777 (2016) <https://doi.org/10.1007/s12221-016-6064-0>

[109] Doan Van Hong Thien¹, Tran Thi Bich Quyen, Nguyen Minh Tri, Tran Thi Kim Thoa, Nguyen Thi Ngoc Tham, “Electrospun Chitosan/PVA Nanofibers For Drug Delivery”, *Journal of Science and Technology* 54 (4B):185-192 (2016) <http://dx.doi.org/10.15625/2525-2518/54/4B/12040>

[110] Nadirul Hasraf Mat Nayan, Mohd Syahir Anwar Hamzah, Abdussalam Al-hakimi Mohd Tahir, Amirah Anis Afina Rajali, Eva Fariska Muslih, and Ruzaini Mazlan, “Development of Polyvinyl Alcohol/Chitosan Hydrogel Loaded with Fertilizer Compound: Preparation, Properties and Effect on Seed Germination”, *Journal of Science and Technology* 10 (4): 21-27 (2018) <https://doi.org/10.15625/2525-2518/54/4B/12040>

[111] Sathiyaseelan A., Saravanakumar K., Mariadoss A.V.A., Wang M.-H., “Antimicrobial and Wound Healing Properties of FeO Fabricated Chitosan/PVA Nanocomposite Sponge”, *Antibiotics* 10:524 (2021) <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050524>

[112] Narpinder Singh, Dominique M.R. Georget, Peter S. Belton, Susan A. Barker, “Physical properties of zein films containing salicylic acid and acetyl salicylic acid”, *Journal of Cereal Science* 52(2):82-287 (2010) <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.06.008>

[113] Tiew, S. X. and Misran, M., “Encapsulation of salicylic acid in acylated low molecular weight chitosan for sustained release topical application”, *J. Appl. Polym. Sci.*, 134:45273 (2017) <https://doi.org/10.1002/app.45273>

7. Βιβλιογραφία

- [114] Ye Chen, Ran Ye, Jun Liu, “Effects of different concentrations of ethanol and isopropanol on physicochemical properties of zein-based films”, *Industrial Crops and Products*, 53:140-147 (2014) <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.034>
- [115] Fatemeh Bumedi, Mehdi Aran, Mohammad Amin Miri, Esmaeel Seyedabadi, “Preparation and characterization of zein electrospun fibers loaded with savory essential oil for fruit preservation”, *Industrial Crops and Products* 203: 117121 (2023) <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117121>
- [116] Monglong Wang, Ding Li, Jie Li, Siyu Li, Zhuo Chen, Deng-Guang Yu, Zhepeng Liu, John Zhanhu Guo, “Electrospun Janus zein–PVP nanofibers provide a two-stage controlled release of poorly water-soluble drugs”, *Materials & Design* 196: 109075 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.109075>
- [117] Margarita Panagiotopoulou, Sofia Papadaki, Magdalini Krokida, “Formation and characterization of zein electrosprayed nanoparticles containing bioactive compounds”, *South African Journal of Chemical Engineering* 40:32-47 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2022.01.004>
- [118] R. Ramya, P.N. Sudha, Dr.J.Mahalakshmi, “Preparation and Characterization of Chitosan Binary Blend” *International Journal of Scientific and Research Publications* 2(10) (2012) <https://www.ijserp.org/research-paper-1012/ijserp-p1011.pdf>
- [119] Stefanie Acosta-Ferreira, Omar S. Castillo, J. Tomás Madera-Santana, Daniel A Mendoza-García, Carlos A. Núñez-Colín, Claudia Grijalva-Verdugo, Alma G. Villalderma, Adán T. Morales-Vargas, J. Rubén Rodríguez-Núñez, “Production and physicochemical characterization of chitosan for the harvesting of wild microalgae consortia”, *Biotechnology Reports*, 28: 00554 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00554>
- [120] Parag Kolhe, Rangaramanujam M. Kannan, “Improvement in Ductility of Chitosan through Blending and Copolymerization with PEG: FTIR Investigation of Molecular Interactions” *Biomacromolecules* 4: 173-180 (2003) <https://doi.org/10.1021/bm025689+>
- [121] Flores FP, Kong F., “In Vitro Release Kinetics of Microencapsulated Materials and the Effect of the Food Matrix”, *Annu Rev Food Sci Technol.* 28(8):237-259 (2017) <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025720>
- [122] Mircioiu C., Voicu V., Anuta V., Tudose A., Celia C, Paolino D., Fresta M., Sandulovici R., Mircioiu I., “Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems”, *Pharmaceutics* 11(3):140 (2019) <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030140>
- [123] Richard W. Korsmeyer, Robert Gumy, Eric Doelker, Pierre Buri, Nikolaos A. Peppas, “Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers”, *International Journal of Pharmaceutics*, 15: 25-35 (1983) [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)

7. Βιβλιογραφία

- [124] Yun Ping Neo, Simon Swift, Sudip Ray, Marija Gizdavic-Nikolaidis, Jianyong Jin, Conrad O. Perera, “Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials”, *Food Chemistry* 141(3):3192-3200 (2013) <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.018>
- [125] Kavetsou E., Pitterou I., Dimitrioglou N.G., Kikionis S., Kritsi E., Zoumpoulakis P., Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Hatzivramidis D.T., Detsi A., “Formulation of Pharmaceutical Tablets Containing b-Cyclodextrin-4-Methyl-Umbelliferone (Hymecromone) Inclusion Complexes and Study of the Dissolution Kinetics”, *Micro* 3: 892–911(2023) <https://doi.org/10.3390/micro3040061>
- [126] Ahmet Çay, Mohsen Mirafteb, E. Perrin Akçakoca Kumbasar, “Characterization and swelling performance of physically stabilized electrospun poly(vinyl alcohol)/chitosan nanofibers”, *European Polymer Journal* 61: 253-262 (2014) <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.10.017>
- [127] Congde Qiao, Xianguang Ma, Xujie Wang, Libin Liu, “Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid”, *LWT* 135: 109984 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109984>
- [128] Jian Xu, Wei Song, Nan Wu, Jin Tong, Lili Ren, ‘Preparation and characterization of chitosan/polyvinyl porous alcohol aerogel microspheres with stable physicochemical properties”, *International Journal of Biological Macromolecules* 187: 614-623 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.127>
- [129] Mata G.C.d., Morais M.S., Oliveira W.P.d., Aguiar M.L., “Composition Effects on the Morphology of PVA/Chitosan Electrospun Nanofibers”, *Polymers* 14: 4856. (2022) <https://doi.org/10.3390/polym14224856>
- [130] Norhazirah Rosli, Wan Zaireen Nisa Yahya, Mohd Dzul Hakim Wirzal, “Crosslinked chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibers functionalized by ionic liquid for heavy metal ions removal”, *International Journal of Biological Macromolecules* 195: 132-141 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.008>
- [131] Yong-Tang Jia a,d, Jian Gong b, Xiao-Hua Gu a,e, Hark-Yong Kim c, Jiong Dong d, Xin-Yuan Shen, “Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanoWbers produced by electrospinning method”, *Carbohydrate Polymers* 67 403–409 (2007) <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.06.010>
- [132] Jae Min Choi, Kyoungtea Kim, Eunae Cho, and Seunho Jung, “Solubility Enhancement of Salicylic Acid by Complexation with Succinoglycan Monomers Isolated from *Sinorhizobium meliloti*”, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2012, Vol. 33(6):2091 <http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.6.2091>
- [133] Dhakshinamoorthy Sundaramurthi, Kirthanashri Srinivasan Vasanthan, Purushothaman Kuppan, Uma Maheswari Krishnan, Swaminathan Sethuraman, “Electrospun nanostructured chitosan–poly(vinyl alcohol) scaffolds: a biomimetic extracellular matrix as dermal substitute” *Biomed. Mater.* 7(045005):12 (2012) <https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/4/045005>

7. Βιβλιογραφία

- [134] K. Sakurai, T. Maegawa, T. Takahashi, “Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends”, *Polymer* 41:7051–7056 (2000) [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00067-7)
- [135] C.G.T. Netoa, J.A. Giacomettib, A.E. Jobb, F.C. Ferreirab, J.L.C. Fonseca, M.R. Pereira, “Thermal Analysis of Chitosan Based Networks”, *Carbohydrate Polymers* 62(2):97-103 (2005) <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.022>
- [136] Rao, V., Johns, J. Thermal behavior of chitosan/natural rubber latex blends TG and DSC analysis. *J Therm Anal Calorim* 92:801–806 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10973-007-8854-5>
- [137] Yanming Dong, Yonghong Ruan, Huiwu Wang, Yaging Zhao, Danxia Bi, “Studies on Glass Transition Temperature of Chitosan with Four Techniques”, *Journal of Applied Polymer Science* 93: 1553–1558 (2004) <https://doi.org/10.1002/app.20630>
- [138] Esam A. El-Hafian, Elham S. Elgannoudi, Azizah Mainal, Abdul Haamid Bin Yanaya, “Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies”, *Turkish Journal of Chemistry* 34 (1):47-56 (2010) <https://doi.org/10.3906/kim-0901-38>
- [139] Afonso C., Matos J., Guarda I. et al., “Bioactive and nutritional potential of *Alaria esculenta* and *Saccharina latissimi*”, *J Appl Phycol* 33: 501–513 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02298-8>
- [140] Annette Bruhn1, Ditte Bruunshøj Tørring, Marianne Thomsen, Paula Canal-Vergés, Mette Møller Nielsen, Michael Bo Rasmussen, Karin Loft Eybye, Martin Mørk Larsen, Thorsten Johannes Skovbjerg Balsby, Jens Kjerulf Petersen, “Impact of environmental conditions on biomass yield, quality, and bio-mitigation capacity of *Saccharina latissimi*”, *AQUACULTURE ENVIRONMENT INTERACTIONS* 8: 619–636 (2016) <https://doi.org/10.3354/aei00200>
- [141] Mircioiu C., Voicu V., Anuta V., Tudose A., Celia C., Paolino D., Fresta M., Sandulovici R., Mircioiu I., “Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems”, *Pharmaceutics*. 11(3):140 (2019) <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030140>
- [142] Mette Møller Nielsen, Dirk Manns, Martina D'Este, Dorte Krause-Jensen, Michael Bo Rasmussen, Martin Mørk Larsen, Merlin Alvarado-Morales, Irina Angelidaki, Annette Bruhn, “Variation in biochemical composition of *Saccharina latissima* and *Laminaria digitata* along an estuarine salinity gradient in inner Danish waters”, *Algal Research* 13: 235-245 (2016) <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.003>