



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

**Μελέτη μεταπτώσεων φάσης και μοριακής δυναμικής σε
ενυδατωμένα υβριδικά δίκτυα ζελατίνης και υαλουρονικού
οξέος**

Διπλωματική εργασία

ΤΟΥ

Κωνσταντίνου Ζαφείρη

Επιβλέπων: Απόστολος Κυρίτσης

Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2017

*Στον Νίκο
και
την Αιμιλία*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2016-2017 στην ομάδα Διηλεκτρικής Φασματοσκοπίας του Τομέα Φυσικής του ΕΜΠ, σε συνεργασία με το Κέντρο Βιοϋλικών και Ιστοτεχνολογίας (Centre for Biomaterials and Tissue Engineering) του Πανεπιστημίου της Βαλένθια (UPV Universitat Politècnica de València). Ο επιβλέπων της διπλωματικής μου εργασίας είναι ο αναπληρωτής καθηγητής, κ Απόστολος Κυρίτσης, στον οποίο οφείλω τις ευχαριστίες μου για τη συνεχή επίβλεψη και συμπαράσταση καθόλη της διάρκειας της ερευνητικής μου πορείας.

Επίσης, ευχαριστώ την κ. Σωτηρία Κρυπωτού για την συνεχή καθοδήγηση και επίβλεψη των πειραμάτων, καθόλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας. Οι συμβουλές και υποδείξεις της, ήταν καταλυτικές στην κατανόηση του αντικειμένου που μελετήθηκε. Προφανώς, δε θα μπορούσα να παραλείψω τον κ. Παναγιώτη Κλώνο, χωρίς τη συμβολή του οποίου, θα μου ήταν αδύνατο να εξοικειωθώ με τις πειραματικές τεχνικές χαρακτηρισμού και τις αρχές λειτουργίας τους.

Οφείλω επίσης τις ευχαριστίες μου στην εργαστηριακή συνεργάτιδα Maria Culebras Martinez για τις γνώσεις που μου εμφύσησε σχετικά με τη σύνθεση και την κατανόηση των υλικών που μελετήσαμε. Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη της ομάδας Διηλεκτρικής Φασματοσκοπίας για τη συνεχή ροή γνώσεων και το ευχάριστο κλίμα συνύπαρξης και συνεργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για την ακατάβλητη υπομονή τους και την διαρκή τους στήριξη καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και τους φίλους μου που ήταν πάντοτε εκεί όταν τους χρειαζόμουν.

Περίληψη

Η επιστημονική πρόοδος του τομέα της Ιστοτεχνολογίας, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ικρωμάτων πολυμερικής φύσεως, με κατάλληλα χαρακτηριστικά και ιδιότητες, ικανά να μιμηθούν τον φυσικό ιστό και να εκπληρώνουν τις διαφορετικές λειτουργίες που εκτελεί το εξωκυττάριο πλέγμα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αναγέννησης του ιστού. Στον φυσικό ιστό, το εξωκυττάριο πλέγμα ως δομικό υποστήριγμα, επιτρέπει την κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και πολλαπλασιασμό, καθώς και τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών και μεταβολικών καταλοίπων. Ειδικότερα, στο εξωκυττάριο πλέγμα των μαλακών ιστών, συστατικά όπως το κολλαγόνο και το υαλουρονικό οξύ, λειτουργούν σε ένα υψηλά υδατωμένο περιβάλλον.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε σύνθεση και χαρακτηρισμός ενέσιμων υδρογελών, αποτελούμενων από ζελατίνη, υαλουρονικό οξύ ενοφθαλμισμένα αμφοτέρα με τυραμίνη και μίγματά τους. Στόχος των συγκεκριμένων ουσιών είναι η συνεισφορά στη διαδικασία αναγέννησης των μαλακών ιστών. Οι δύο ουσίες είναι βιοσυμβατές και βιοαποικοδομήσιμες αποφεύγοντας έτσι οποιαδήποτε αντίδραση απόρριψης από πλευράς οργανισμού μετά την εμφύτευση. Ο συνδυασμός των δύο ουσιών, αποσκοπεί στη βελτίωση των ιδιοτήτων που διαθέτουν η κάθε μία ξεχωριστά. Η ζελατίνη διαθέτει ακολουθίες κυτταρικής πρόσδεσης, ενώ το υαλουρονικό οξύ καλύτερες μηχανικές και απορροφητικές ιδιότητες. Ο σχηματισμός των υδρογελών μέσω σταυροειδών δεσμών, πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό του ενζύμου περοξειδάση και του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μη κυτταροτοξικές ποσότητες. Καθώς οι υδρογέλες είναι ενέσιμες, μπορούν να χορηγηθούν στον ασθενή ώντας σε υγρή κατάσταση, με τη διαδικασία πηγμάτωσης να διεξάγεται εντός του οργανισμού. Με τον τρόπο αυτό, καταλαμβάνεται ομοιογενώς η στοχευόμενη περιοχή του ιστού και αποφεύγονται επεμβατικές χειρουργικές επεμβάσεις.

Συντέθηκαν υδρογέλες με διαφορετικές περιεκτικότητες ζελατίνης και υαλουρονικού οξέος, και μελετήθηκαν με επιλεγμένες τεχνικές χαρακτηρισμού. Το ενδιαφέρον εστιάστηκε στη δυνατότητα απορρόφησης νερού, την αναμιξιμότητα τους και στις αλληλεπιδράσεις των πολυμερικών δικτύων με το νερό. Για το λόγο αυτό, υποβλήθηκαν σε διάφορα περιβάλλοντα σχετικής υγρασίας τα οποία και θα προσομοίωναν τα ενυδατωμένα περιβάλλοντα των εκάστοτε ιστών. Η μελέτη των υδρογελών διεξήχθη με τη χρήση διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης, διηλεκτρικής φασματοσκοπίας εναλλασσόμενου πεδίου και ισόθερμων μετρήσεων ρόφησης-εκρόφησης νερού. Τα συμπεράσματα που εξήχθησαν, προσφέρουν σαφή εικόνα για την παρουσία και συμπεριφορά του νερού στα διάφορα συστήματα που μελετήθηκαν.

Abstract

Recent advances in the field of tissue engineering, have led to the development of polymer scaffolds with suitable characteristics and properties, capable of mimicking natural tissue and fulfilling the different functions that the extracellular matrix (ECM) performs during the stages of tissue regeneration. In the natural tissue, ECM serves as a structural support, allows cell adhesion, migration and proliferation, as well as transport of nutrients and metabolic wastes. Specifically, in the extracellular matrix of soft tissues, components such as collagen and hyaluronic acid perform these functions in a highly hydrated environment.

In the present thesis, the synthesis and characterization of injectable gelatin hyaluronic acid hydrogels mixtures took place. Both components were grafted with tyramine. The aim of these combined components is to contribute in tissue regeneration. Both of them possess good biocompatibility and biodegradability. The combination of the two substances in one hydrogel is intended to improve the properties of the pure ones since, while gelatin provides cellular adhesion sequences (RGD), hyaluronic acid has better mechanical properties and greater hydration capability. The cross-linking of the hydrogels was carried out enzymatically by the combined action of the enzyme peroxidase and hydrogen peroxide at non-cytotoxic amounts. As the hydrogels are injectable, they can be administered to the patient in liquid state, and gelification takes place inside the body. In this way, the total homogenous occupation of the defect is assured regardless of its shape. Besides, no invasive surgery is required for the implantation of hydrogels in the patient.

Firstly, the synthesis of hydrogels containing different percentages of gelatin and hyaluronic acid was carried out, and then they were studied through selected material characterization techniques. The main interest of the study was focused on the water retention capacity, the miscibility of the different mixtures, as well as the interactions between the polymeric networks and the absorbed water. For this reason, the hydrogels were placed in various relative humidity environments, in order to simulate the different moist environments of soft tissues. The hydrogels were studied with the use of differential scanning calorimetry (DSC), dielectric relaxation spectroscopy (DRS) and equilibrium sorption isotherms (ESI). The conclusions derived from these measurements, offer a clear view of the presence and behavior of water in the examined hydrogel systems.

Περιεχόμενα

1	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	1
1.1	Μία εισαγωγή στην Ιστοτεχνολογία.	1
1.2	Πολυμερή.....	3
1.3	Υδρογέλες (Hydrogels).....	6
1.4	Καταστάσεις νερού στα πολυμερικά δίκτυα των υδρογελών.....	17
1.5	Διάγραμμα Φάσεων Πολυμερικών Υδρογελών	18
1.6	Σύνθεση Υδρογελών Ζελατίνης – Υαλουρονικού Οξέος	22
2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ.....	27
2.1	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)	27
2.2	Διηλεκτρική Φασματοσκοπία Εναλλασσόμενου Πεδίου (DRS).....	33
2.3	Ισόθερμες Μετρήσεις Ρόφησης – Διάχυσης Νερού (ESI).....	42
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΑΝΑΛΥΣΗ.....	47
3.1	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)	47
3.2	Διηλεκτρική Φασματοσκοπία Εναλλασσόμενου Πεδίου (DRS).....	69
3.3	Περιβάλλοντα Σχετικής Υγρασίας.....	101
3.4	Ισόθερμες Μετρήσεις Ρόφησης – Διάχυσης Νερού (ESI).....	104
4	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	113
4.1	Συμπεράσματα μέσω Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)	113
4.2	Συμπεράσματα μέσω Διηλεκτρικής Φασματοσκοπίας Εναλλασσόμενου Πεδίου (DRS)	113
4.3	Συμπεράσματα μέσω Υδατώσεων και ESI.....	114
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

1.1 Μία εισαγωγή στην Ιστοτεχνολογία.

Η απώλεια ιστού ή η αναντίστροφη οργανική ανεπάρκεια αποτελούν δύο από τα σημαντικότερα προβλήματα στον τομέα της Ιατρικής. Όλες οι επεμβάσεις με στόχο την αποκατάσταση του κατεστραμμένου ιστού περιλαμβάνουν τη χρήση κάποιας δομής για να αντικαταστήσει την αντίστοιχη περιοχή. Μέχρι προσφάτως, οι δομές που χρησιμοποιούνταν στην εν λόγω διαδικασία ήταν πλήρως τεχνητές, όπως προσθετικά αρθρώσεων, ή επεξεργασμένοι αδρανείς ιστοί όπως στις περιπτώσεις των κατασκευασμένων καρδιακών βαλβίδων και των εμφυτευμάτων οργάνων από άλλο ασθενή. **[1] [2]**

Εντούτοις, οι συγκεκριμένες τεχνικές παρουσιάζουν περιορισμούς λόγω διαφόρων παραγόντων. Οι τεχνητές προσθήκες παρουσιάζουν ατέλειες με κίνδυνο να αλλοιωθούν δομικά με την πάροδο του χρόνου ή κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των οστών, στα οποία έχουν παρατηρηθεί συμπτώματα οστεόλυσης και προοδευτική απώλεια οστικού ιστού. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στη διαφορά των μηχανικών ιδιοτήτων μεταξύ του προσθετικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε και του οστού. Επιπλέον, έχουν καταγραφεί περιστατικών φλεγμονωδών αντιδράσεων γνωστές ως «αντίδραση ξένου σώματος» (foreign body reaction), που προκαλούν αναρροφήσεις ιστών, οδηγώντας στην αφαίρεση των προσθέτων. **[3] [4] [5]**

Όσον αφορά στις μεταμοσχεύσεις ιστών και οργάνων, παρουσιάζονται εμπόδια λόγω του μειωμένου αριθμού δοτών σε σχέση με τον αντίστοιχο των ασθενών. Ένας ακόμη περιορισμός είναι ότι οι αποδέκτες μοσχευμάτων, υποχρεώνονται να ακολουθήσουν ανοσοκατασταλτική φαρμακευτική αγωγή εφ' όρου ζωής, για να αποφευχθεί ο κίνδυνος μολύνσεων, ανάπτυξης όγκων και παρενεργειών. **[1]**

Όλα τα παραπάνω μειονεκτήματα, έχουν δημιουργήσει την ανάγκη αναζήτησης καινούριων λύσεων για την αποκατάσταση της λειτουργικότητας των ιστών και των οργάνων, στοχεύοντας κυρίως στο πεδίο των βιοϋλικών.

Η ιστοτεχνολογία μπορεί να περιγραφεί ως το διεπιστημονικό πεδίο που εφαρμόζει τις αρχές της μηχανικής και των βιοεπιστημών στην ανάπτυξη βιολογικών υποκατάστατων για την αποκατάσταση, τη διατήρηση και τη βελτίωση της λειτουργικότητας των ιστών. Ειδικότερα, η ιστοτεχνολογία, αντικαθιστά τον κατεστραμμένο ιστό του ασθενή με τον αντίστοιχο εν ζωή ιστό, ο οποίος έχει σχεδιαστεί για να καλύπτει τις εξατομικευμένες ανάγκες του. **[6] [7]**

Η ιστοτεχνολογία βασίζεται σε τρεις θεμελιώδεις πυλώνες: i) τα κύτταρα ii) τα ικρίωματα και iii) τους βιοδραστικούς παράγοντες ανάπτυξης. **[8]**

i. Κύτταρα

Τα κύτταρα αποτελούν ακρογωνιαίο λίθο του συγκεκριμένου τομέα, καθώς από αυτά προέρχεται ο καινούριος ιστός. Για κλινικές εφαρμογές, κύτταρα λαμβάνονται από τον ίδιο τον ασθενή, στενούς συγγενείς ή τρίτα πρόσωπα.

ii. Ικρίωματα (Scaffolds)

Τα ικρίωματα είναι πορώδη πολυμερικά υλικά που μιμούνται την εξωκυττάρια μήτρα (Extracellular Matrix, ECM) κατά τα στάδια την αναγέννησης του ιστού. Χρησιμεύουν ως ένα τρισδιάστατο υπόστρωμα, στο οποίο τα κύτταρα προσκολλώνται, ενώ επιτρέπει τη μεταφορά, αποθήκευση και απελευθέρωση δραστικών μορίων. Εξάλλου, διεγείρει συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις και συμβάλλει στη δομική και μηχανική ακεραιότητα της υπό θεραπεία περιοχής. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των ικρίωμάτων καθώς και οι ιδιότητες των τελευταίων, εξαρτώνται από το είδος του εκάστοτε ιστού και τη διαδικασία που πρέπει να ακολουθηθεί. **[9]**
[10]

iii. Βιοδραστικοί Παράγοντες Ανάπτυξης (Bioactive Growth Factors)

Πρόκειται για πολυπεπίδια που συνεισφέρουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Η κυτταρική ανάπτυξη εκκινείται με την πρόσδεση ενός αυξητικού παράγοντα σε συγκεκριμένο υποδοχέα των κυττάρων που έχουν εισαχθεί στο πολυμερικό ικρίωμα, ο οποίος επιταχύνει την ανάπτυξή τους.

Κατά τη διαδικασία αυτή, ο επιβλαβής ιστός αφαιρείται, και τα απαιτούμενα κύτταρα για την επιδιόρθωση τοποθετούνται στο ικρίωμα το οποίο βελτιστοποιεί την ικανότητα επιβίωσής τους, σε ένα περιβάλλον που θα επιτρέψει στο σώμα να αποθεραπευτεί. **[8]**

Καταληκτικά, η ιστοτεχνολογία, προσφέρει ένα μεγάλο αριθμό από πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλα είδη τεχνικών που στοχεύουν στην επιδιόρθωση των ιστών: **[8]**
[11]

- Είναι ανεξάρτητη δοτών.
- Αναπαράγει τις λειτουργίες ιστών και οργάνων μέσω σχεδίασης και ανάπτυξης ενός οργανωμένου τρισδιάστατου ιστού.
- Προσωρινή παρουσία του εμφυτεύματος, λόγω της βιοαποικοδομησιμότητάς του, που σημαίνει:
 - Δε χρειάζεται δεύτερη επέμβαση για την αφαίρεση του εμφυτεύματος.

- Δεν εμφανίζονται φλεγμονώδεις αντιδράσεις.
- Ελεγχόμενη μεταφορά ουσιών προς τον επιδιορθωμένο ιστό.

Η ιστοτεχνολογία, στοχεύει στην καταπολέμηση βλαβών στους μαλακούς ιστούς (soft tissues). Γενικά, η εξωκυττάρια μήτρα των ιστών αυτών, χαρακτηρίζεται από ένα ιδιαίτερα ενυδατωμένο τρισδιάστατο δίκτυο, αποτελούμενο κυρίως από γλυκοζαμινογλυκάνες (glycosaminoglycans, GAGs), όπως το υαλουρονικό οξύ και πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο και η φιβρονεκτίνη (fibronectin). Η εξωκυττάρια μήτρα εξυπηρετεί ως δομική υποστήριξη για την κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και πολλαπλασιασμό, ενώ επιτρέπει τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και μεταβολικών καταλοίπων. **[12] [13] [14]** Οι υδρογέλες αποτελούν τα ικρίωματα που χρησιμοποιούνται για την επιδιόρθωση και αναγέννηση των μαλακών ιστών, αφού μπορούν να μιμηθούν ικανοποιητικά των ενυδατωμένο τρισδιάστατο περιβάλλον που χρειάζονται τα κύτταρα στους εν λόγω ιστούς, για σωστή διαφοροποίηση και διατήρηση του φαινοτύπου.

1.2 Πολυμερή

Πολυμερή ονομάζονται οι οργανικές ενώσεις, των οποίων τα μόρια αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα μικρότερα τμήματα, τα μονομερή, που ενώνονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας τις λεγόμενες «πολυμερικές αλυσίδες». Στην περίπτωση που η πολυμερική αλυσίδα απαρτίζεται από περισσότερα των δέκα μονομερών χρησιμοποιείται ο όρος «μακρομόριο» (macromolecule). **[15] [16] [17]**

Οι δεσμοί που συγκρατούν τα μονομερή μεταξύ τους είναι ομοιοπολικοί και καθορίζουν τη θερμική και χημική σταθερότητα του υλικού. Οι πολυμερικές αλυσίδες, με τη σειρά τους, συνδέονται μεταξύ τους με ασθενείς διαμοριακές δυνάμεις τύπου Van der Waals ή δεσμούς υδρογόνου. Οι ασθενείς αυτές αλληλεπιδράσεις είναι υπεύθυνες για τις φυσικές ιδιότητες του πολυμερούς (π.χ. ιξώδες, ελαστικότητα, διαλυτότητα κ.ά.). Οι βασικές μέθοδοι πολυμερισμού είναι δύο:

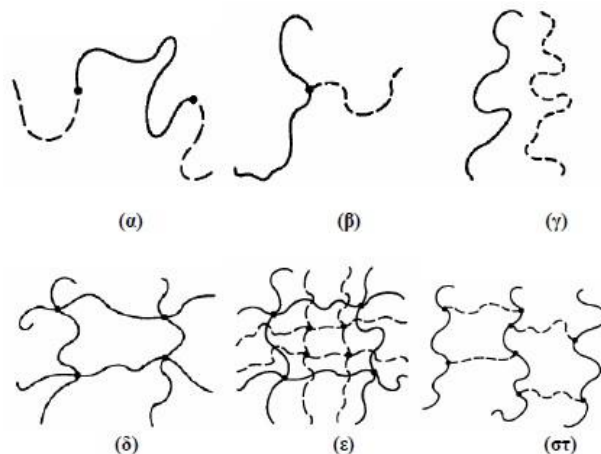
- Ο σταδιακός πολυμερισμός (γραμμικός και μη γραμμικός)
- Ο αλυσωτός πολυμερισμός (ή πολυμερισμός ελευθέρων ριζών)

Γενικά υπάρχουν διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των πολυμερών. Αν ληφθεί υπόψη η ικανότητά τους να διαχέονται εύκολα ή δύσκολα σε διάλυμα, διακρίνονται σε κρυσταλλοειδή ή κολλοειδή αντίστοιχα. Ανάλογα με το αν αποτελούνται από ένα, δύο ή τρία είδη δομικών μονάδων, χωρίζονται αντίστοιχα σε ομοπολυμερή, συμπολυμερή ή τριπολυμερή. Μπορούν επίσης να υπάρχουν και πολυμερικά μίγματα.

Τα συμπολυμερή (copolymers) διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες:

- «Τυχαία» ή «στατιστικά» (random or statistical copolymers), στα οποία οι δομικές μονάδες κατανέμονται τυχαία κατά μήκος του μακρομορίου.
- «Εναλλασσόμενα συμπολυμερή» (alternating copolymers), στα οποία οι δύο δομικές μονάδες εναλλάσσονται με απόλυτη κανονικότητα, στο μακρομόριο.
- «Συσταδικά» ή «αδρομερή» (block copolymers), στα οποία τα γραμμικά μακρομόρια αποτελούνται από εναλλασσόμενες συστάδες, ή blocks συμπολυμερών.
- «Ενοφθαλισμένα» ή «εμβολιασμένα» συμπολυμερή (graft copolymers), όταν κατά μήκος ενός ομοπολυμερούς, «ενοφθαλμίζονται», ως διακλαδώσεις συστάδες ενός άλλου ομοπολυμερούς.
- «Πολυμερικά μίγματα» (polymer blends), που αποτελούνται από διαφορετικές πολυμερικές αλυσίδες, χωρίς αυτές να συνδέονται μεταξύ τους με χημικό τρόπο.

Άλλη μία ιδιότητα των μακρομορίων είναι να σχηματίζουν εκτός από γραμμικές αλυσίδες και αλυσίδες με διακλαδωμένα μόρια, που μπορούν να είναι τόσο πολύπλοκα, ώστε να αλλάζουν αρκετά τις φυσικές τους ιδιότητες. Μπορούν να σχηματίζουν πολυμερικά δίκτυα, απλά ή πιο σύνθετα (πχ. IPNs). Το σημείο-δεσμός διακλάδωσης των πολυμερικών αλυσίδων ονομάζεται σταυροδεσμός (crosslink).



Εικόνα 1.1: Οι βασικοί τύποι συμπολυμερών. (α) Συσταδικό συμπολυμερές, (β) Ενοφθαλισμένο συμπολυμερές, (γ) Μίγμα πολυμερών, (δ) Πολυμερικό δίκτυο, (ε) Ενδιαπλεκόμενο πολυμερικό δίκτυο (IPN), (στ) AB-Σταυροδεσμοποιημένο συμπολυμερές.

Από την άποψη της θερμομηχανικής συμπεριφοράς τα πολυμερή κατατάσσονται

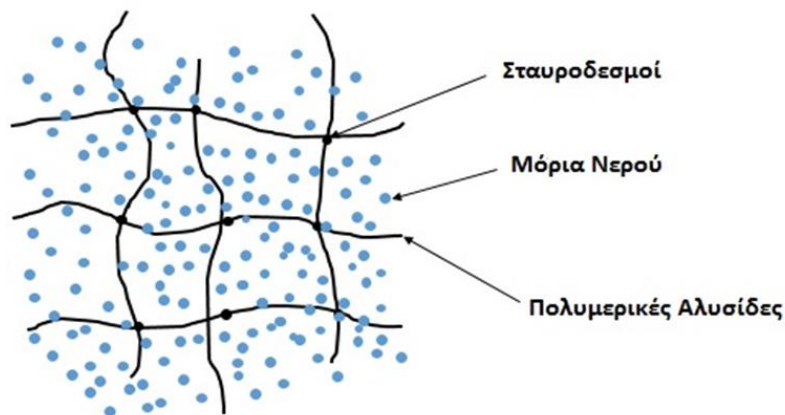
σε:

- «Θερμοπλαστικά»: Είναι γραμμικά ή διακλαδωμένα πολυμερικά υλικά, τα μόρια των οποίων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με ασθενείς δεσμούς και έτσι με την αύξηση της θερμοκρασίας είναι δυνατό να μορφοποιηθούν. Τέτοια είναι το πολυστυρένιο, το PVC, το πολυαιθυλένιο κ.ά.
- «Θερμοσκληρυνόμενα»: Είναι πολυμερή που έχουν παρασκευασθεί με αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ στη θερμοκρασία δωματίου βρίσκονται στην υαλώδη φάση. Οι πολυμερικές τους αλυσίδες σχηματίζουν τρισδιάστατο πλέγμα (network) και με την αύξηση της θερμοκρασίας δε ρέουν. Επίσης εμφανίζουν μεγάλη αντοχή στους διαλύτες. Τέτοια υλικά είναι ο βακελίτης, το βουλκανισμένο καουτσούκ, οι εποξικές ρητίνες κ.ά.
- «Ελαστικά»: Όπως στα θερμοσκληρυνόμενα έτσι και στα ελαστικά σχηματίζονται πολυμερικά δίκτυα. Έχουν χαμηλή θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης με αποτέλεσμα να βρίσκονται, στη θερμοκρασία δωματίου, στην ελαστική φάση.

Είναι επίσης δυνατό να διαχωριστούν τα πολυμερή υλικά, σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το αν έχουν τη δυνατότητα να κρυσταλλωθούν ή όχι. Τα πολυμερή που έχουν αυτήν τη δυνατότητα ονομάζονται «κρυσταλλικά», ενώ αυτά που δεν εμφανίζουν κρυσταλλικότητα ονομάζονται «άμορφα». Στην περίπτωση που σε ένα πολυμερές μπορούν να συνυπάρξουν και άμορφες και κρυσταλλικές περιοχές, τότε το υλικό ονομάζεται «ημικρυσταλλικό» (semicrystalline).

1.3 Υδρογέλες (Hydrogels)

Οι υδρογέλες είναι υλικά που σχηματίζονται από υδρόφιλα πολυμερικά δίκτυα, τα οποία είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με σταυροδεσμίματα (cross-linking). Λόγω της υδροφιλικότητας των αλυσίδων τους, οι υδρογέλες είναι ικανές να απορροφήσουν μεγάλες ποσότητες νερού, ενώ οι σταυροειδείς δεσμοί, εμποδίζουν τη διάλυση των πρώτων και προσδίδουν στο υλικό τρισδιάστατη δομή. [18] [19]



Εικόνα 1.2: Μικροδομή υδρογελών.

Οι υδρογέλες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες με βάση τη φύση των σταυροδεσμών που σχηματίζουν τα δίκτυα των πολυμερικών αλυσίδων. Τα χημικώς σταυροδεμένα δίκτυα έχουν μόνιμους δεσμούς (ομοιοπολικούς), ενώ τα φυσικώς σταυροδεμένα χαρακτηρίζονται από βραχύβιες συνδέσεις που οφείλονται είτε σε περιπλοκή των πολυμερικών αλυσίδων, είτε σε φυσικές αλληλεπιδράσεις. Αυτές μπορεί να είναι ιοντικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου ή υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Οι υδρογέλες που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία, είναι ικανές να απορροφήσουν νερό όταν βρεθούν σε μία κατάσταση ισορροπίας, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα όταν βρεθούν σε ασταθή περιβάλλοντα. Αντίθετα, οι φυσικώς σταυροδεμένες υδρογέλες, είναι ασθενέστερες, γεγονός που τις καθιστά αναστρέψιμες και ανταποκρίνονται σε φυσικές αλλαγές όπως η θερμοκρασία ή το pH. [19] [20]

Ένας από τους λόγους που οι υδρογέλες χαρακτηρίζονται σαν «έξυπνα υλικά» είναι ότι, πέραν των μοναδικών ιδιοτήτων τους, μπορούν να μιμηθούν το εξωκυττάριο πλέγμα των μαλακών ιστών και καθίστανται έτσι πολύτιμο εργαλείο στον τομέα της Μηχανικής των Ιστών (Tissue Engineering). Λόγω την δυνατότητάς τους να απορροφούν μεγάλες ποσότητες νερού αναλογικά με το αρχικό τους βάρος, οι υδρογέλες παρέχουν ένα διογκωμένο τρισδιάστατο περιβάλλον, παρόμοιο με το φυσικό περιβάλλον του ιστού, υποστηρίζοντας με αυτό τον τρόπο την κυτταρική διαφοροποίηση καθώς και τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών και μεταβολικών

αποβλήτων. Επιπλέον, τα εν λόγω υλικά είναι βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα, ενώ μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν με τη χρήση συνδέσμων κυτταρικής προσκόλλησης, και να εγχυθούν σε ζωντανό οργανισμό (in vivo) σε υγρή κατάσταση, εντός του οποίου αποκτούν τη μορφή γέλης εξαιτίας της θερμοκρασίας του. **[14][18]**

Πέραν της καλής υδάτωσης και της δυνατότητας να προσκολληθεί στα κύτταρα, η υδρογέλη πρέπει να διαθέτει επαρκείς μηχανικές ιδιότητες, δεδομένου ότι πρέπει να είναι σε θέση να αντέχει τα φορτία και τις τάσεις του φυσικού ιστού, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια, προτού τα κύτταρα αρχίσουν να παράγουν το δικό τους λειτουργικό εξωκυττάριο πλέγμα. **[21]**

Οι συνθετικές υδρογέλες έχουν μεγαλύτερη ευκολία στον έλεγχο και τη ρύθμιση των χαρακτηριστικών τους και διαθέτουν καλύτερες μηχανικές ιδιότητες. Ωστόσο, η χρήση τους στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής, περιορίζεται από την έλλειψη της ικανότητάς τους να προσκολλούνται στα κύτταρα και την πιθανότητα έκλυσης κυτταροτοξικών προϊόντων αποικοδόμησης. **[22]**

Αντιθέτως, οι φυσικές υδρογέλες διαθέτουν χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την επιτυχή χρήση τους στον πολλαπλασιασμό κυττάρων και την αναγέννηση ιστών. Οι υδρογέλες που αποτελούνται από φυσικά πολυμερή, μοιάζουν με τις δομές του εξωκυττάριου πλέγματος, είναι μη τοξικές και δεν προκαλούν φλεγμονές ή ανοσολογικές αντιδράσεις. Επιπλέον, ευνοούν την κυτταρική προσκόλληση και ανάπτυξη και λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η έκκριση. Τα συγκεκριμένα υλικά μπορούν να αποικοδομηθούν ολοκληρωτικά και να απορροφηθούν από τον μεταβολισμό. Εντούτοις, σε αρκετές περιπτώσεις, οι εν λόγω υδρογέλες, περιορίζονται από την ανεπάρκεια των μηχανικών τους ιδιοτήτων. Εξαιτίας αυτού, τροποποιούνται με κατασκευαστικές ενισχύσεις, με σκοπό την προσαρμογή των ιδιοτήτων αυτών στον επιθυμητό βαθμό. **[23]**

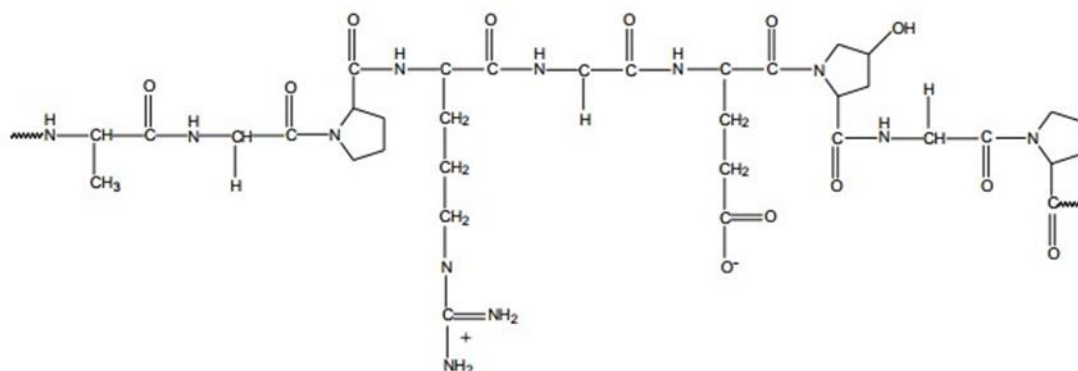
Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε σύνθεση υδρογελών αποτελούμενες από ζελατίνη (gelatin) και υαλουρονικό οξύ (hyaluronic acid). Με αυτό τον τρόπο, δημιουργήθηκαν υδρογέλες ικανές να μιμηθούν το εξωκυττάριο πλέγμα. Τα δύο συστατικά είναι φυσικά πολυμερή που συναντώνται στο εξωκυττάριο πλέγμα των ιστών, εξασφαλίζοντας καλή βιοσυμβατότητα και αποτρέποντας έτσι οποιαδήποτε αντίδραση απόρριψης από τον οργανισμό, μετά την εμφύτευσή τους σε αυτόν.

1.3.1 Ζελατίνη (Gelatin)

Η ζελατίνη (gelatin), είναι μια πρωτεΐνη που λαμβάνεται από μετουσίωση και μερική υδρόλυση του κολλαγόνου, μίας ουσίας που αποτελεί ένα μεγάλο μέρος των συνδετικών ιστών των ζωντανών οργανισμών. [24]

Σχηματίζεται από την ένωση αμινοξέων μέσω πεπτιδικών δεσμών. Τα κυριότερα εξ αυτών είναι η προλίνη (proline), η υδροξοπρόλίνη (hydroxoproline), η γλυκίνη (glycine) και το γλουταμινικό οξύ (glutamic acid). Εξαιτίας των πεπτιδικών δεσμών, οι πολυμερικές αλυσίδες της ζελατίνης έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 15.000 και 400.000 g/mol. [25][26]

Η ζελατίνη περιέχει μεταξύ άλλων, ελεύθερες αμινομάδες και φαινολομάδες, γεγονός που της επιτρέπει να αντιδρά με άλλες ενώσεις προς τροποποίηση των ιδιοτήτων της. [27]



Εικόνα 1.3 Τυπική δομή ζελατίνης. [28]

Μία μοναδική ιδιότητα της ζελατίνης είναι ότι παρουσιάζει θερμικώς επαγόμενη μετάβαση από μορφή διαλύματος σε μορφή γέλης (sol-gel transition). Όταν βρίσκεται κάτω από τη θερμοκρασία τήξης της, δηλαδή ~ 23 °C, η ζελατίνη αποκτά ελικοειδή δομή, συγκρατούμενη από ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, παρόμοια με αυτή του κολλαγόνου. Συγκεκριμένα, οι τριπλές έλικες της ζελατίνης, σχηματίζουν φυσικούς σταυροδεσμούς, προσδίδοντας έτσι στο υλικό τη μορφή γέλης, αδιάλυτης στο νερό. Η ακαμψία της γέλης εξαρτάται από τη δομή και το μοριακό βάρος της ζελατίνης, καθώς και από το pH, τη θερμοκρασία και την παρουσία οποιουδήποτε πρόσθετου. Αντιθέτως, πάνω από τη θερμοκρασία τήξης, οι ενδομοριακοί δεσμοί αποδυναμώνονται και η τρισδιάστατη δομή καθίσταται ασταθής, οδηγώντας έτσι σε διάλυση της γέλης σε υδατινό περιβάλλον. [29]

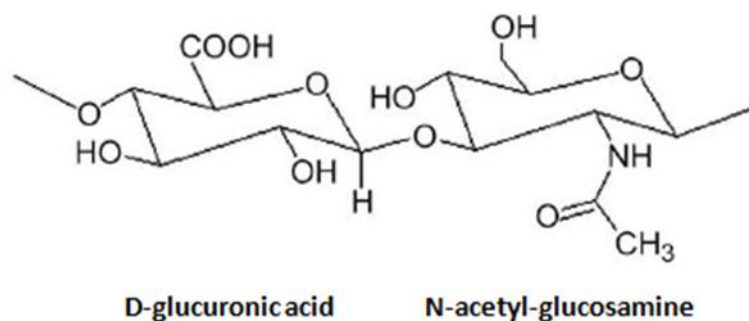
Η ζελατίνη, διατηρεί ορισμένες δομικές ακολουθίες αμινοξέων του κολλαγόνου, γεγονός που την καθιστά εξίσου βιοσυμβατή και βιοαποικοδομήσιμη με αυτό.

Συγκεκριμένα, μετά την παρασκευή της, παραμένουν στις αλυσίδες της ορισμένες ακολουθίες υπεύθυνες για την κυτταρική προσκόλληση, όπως το αργινο-γλυκίνο-ασπαρτικό οξύ (argin-glycine-aspartic acid, RGD). [23] [30] Τα κύτταρα αναγνωρίζουν τις εν λόγω ακολουθίες μέσω των ιντεγκρινών (integrins) που βρίσκονται στο εξωκυττάριο πλέγμα, οι οποίες συνδέονται μέσω της διαμεμβράνης και μορφοποιούν τον κυτταροσκελετό στο εσωτερικό των κυττάρων. Εξάλλου, οι παραπάνω ακολουθίες ενισχύουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. [31][32]

Όλες οι παραπάνω ιδιότητες, καθιστούν τη ζελατίνη προτιμητέα για χρήση σε βιοιατρικές εφαρμογές, όπως η δημιουργία επιδέσμων για τραύματα και η παρασκευή ικριωμάτων (scaffolds) για επιδιόρθωση ιστών στα πλαίσια της Ιστοτεχνολογίας (Tissue Engineering). [33][34] Εντούτοις, η καθαρή ζελατίνη σπανίως χρησιμοποιείται στην παρασκευή ικριωμάτων για τις ανάγκες της Ιστοτεχνολογίας, λόγω των πενιχρών μηχανικών ιδιοτήτων της. [23] Εξ ου και το ενδιαφέρον για τη χρήση μιγμάτων τα οποία θα συνδυάζουν και θα βελτιώνουν τις συγκεκριμένες ιδιότητες. [35]

1.3.2 Υαλουρονικό Οξύ (Hyaluronic Acid)

Το υαλουρονικό οξύ (hyaluronic acid) είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από περίπου 250 - 25.000 επαναλαμβανόμενες δισακχαρικές μονάδες από N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (N-acetyl-D-glucosamine) και D-γλυκουρονικό οξύ (D-glucuronic acid) συνδεδεμένες με γλυκοζιτικό δεσμό. Ο συγκεκριμένος πολυσακχαρίτης είναι αρνητικά φορτισμένος, έχει μοριακό βάρος μεταξύ 105 και 108 g/mol και οι ομάδες καρβοξυλίου και αλκοόλης που περιλαμβάνει, του επιτρέπουν να τροποποιηθεί χημικά, προς δημιουργία παραγώγων ικανών να συμμετάσχουν σε σταυροδεμένα δίκτυα όπως αυτά των υδρογελών.



Εικόνα 1.4: Τυπική δομή υαλουρονικού οξέος.

Πρόκειται για ένα από τα σημαντικότερα συστατικά του εξωκυττάριου πλέγματος. Στο ανθρώπινο σώμα, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υαλουρονικού οξέος

συναντώνται στους μαλακούς συνδετικούς ιστούς όπως ο ομφάλιος λώρος, το αρθρικό υγρό, το δέρμα και το υαλώδες σώμα (ή υαλώδες υγρό) των οφθαλμών. Παρατηρείται επίσης και σε περιοχές όπως οι πνεύμονες, τα νεφρά, ο εγκέφαλος, οι χόνδροι και οι μύες.

Εξαιτίας της αφθονίας των υδρόφιλων ομάδων στις αλυσίδες του, το υαλουρονικό οξύ έχει μία υψηλή ικανότητα κατακράτησης νερού, γεγονός που του προσφέρει και μεγάλο βαθμό ιξωδοελαστικότητας. Το υαλουρονικό οξύ είναι υπεύθυνο για την ομοιοστάση των ιστών, συνδράμοντας καταλυτικά στην επούλωση και αναδημιουργία τους, στη μορφογένεση και αγγειογένεση, καθώς ευνοεί τη διείσδυση των μεταναστευτικών κυττάρων στον τραυματισμένο ιστό και προάγει την κυτταρική κινητικότητα και πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, διατελεί σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία (cell signaling), αλληλεπιδρώντας με τα κύτταρα μέσω υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας όπως οι CD44 και RHAMM. Οι εν λόγω αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούν σε φυσιολογικές διεργασίες, όπως η μεταγωγή σήματος και ο σχηματισμός περικυτταρικού στρώματος.

Οι παραπάνω ιδιότητες, συνδυασμένες με την καλή βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητά του, καθιστούν το υαλουρονικό οξύ χρήσιμο σε βιοιατρικές εφαρμογές, εκ των οποίων ξεχωρίζει η αναγέννηση ιστών που περιλαμβάνει επιδιόρθωση χόνδρων και δέρματος. Ωστόσο, τα βιοϋλικά που έχουν ως βάση το υαλουρονικό οξύ, χρησιμοποιούνται ευρέως για να εμποδίσουν την απορρόφηση πρωτεϊνών και την κυτταρική προσάρτηση όπως και να αποτρέψουν μετεγχειρητικές προσκολλήσεις.

Παρά ταύτα, η ανάπτυξη υλικών προερχόμενων από το υαλουρονικό οξύ έχει παρεμποδιστεί από το γεγονός ότι οι υδρόφιλες και πολυανιονικές τους επιφάνειες δεν ευνοούν θερμοδυναμικώς την πρόσδεση των κυττάρων σε ιοντικές επιφάνειες. Γενικά, τα κύτταρα προσκολλούνται αποτελεσματικότερα σε ουδέτερες, υδρόφοβες και πολυκατιοντικές επιφάνειες. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό, σε συνδυασμό με τον γρήγορο εκφυλισμό και τις ανεπαρκείς μηχανικές ιδιότητες που παρουσιάζει το υαλουρονικό οξύ σε συγκεκριμένες εφαρμογές, οδηγεί στον συγκερασμό του με άλλα υλικά στοχεύοντας στην αντιστάθμιση και βελτίωση των προαναφερθέντων γνωρισμάτων.

Ο συνδυασμός υαλουρονικού οξέος και ζελατίνης προορίζεται να παράσχει πλήρως βιοσυμβατές υδρογέλες πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη, αφού και οι δύο ουσίες είναι φυσικά πολυμερή και αποτελούν συστατικό του εξωκυττάρου πλέγματος των ιστών. Εξάλλου, υπάρχει πρόθεση άμβλυνσης των περιορισμών και των δύο καθαρών ενώσεων. Αφενός, το υαλουρονικό οξύ προσφέρει καλή ενυδάτωση και διάχυση θρεπτικών ουσιών και κυτταρικών μεταβολικών καταλοίπων. Επίσης, λόγω της ακαμψίας των πολυμερικών του αλυσίδων ευρισκόμενο σε ενυδατωμένη κατάσταση, παρέχει καλύτερες μηχανικές ιδιότητες στην υδρογέλη. Αφετέρου, οι ακολουθίες

προσκόλλησης που διαθέτει η ζελατίνη, μπορούν να αναγνωριστούν από τις ιντεγκρίνες των κυττάρων, προσδίδοντας τη δυνατότητα καλύτερης πρόσφυσης και επιτρέποντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

1.3.3 Ενέσιμες Υδρογέλες και Μηχανισμοί Σταυροδεσίματος

Οι υδρογέλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμφυτεύματα, γεγονός που προϋποθέτει είτε το σχηματισμό τους πριν την εισαγωγή τους στον οργανισμό του ασθενή, είτε τη χορήγησή τους σε μορφή ενέσιμου διαλύματος που θα περιέχει τους προπομούς των γελών με τους κατάλληλους βιοδραστικούς παράγοντες. Τα διαλύματα αυτά θα μπορούν να χορηγούνται στον ασθενή με τη χρήση σύριγγας. Όταν βρεθούν στο εσωτερικό του οργανισμού, οι προπομοί σχηματίζουν σταυροδεσμούς είτε με φυσικό τρόπο, εξαιτίας της μεταβολής της θερμοκρασίας ή του pH, είτε με χημικό τρόπο λόγω αντίδρασης τύπου Michael (Michael reaction ή Michael addition) ή σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών. **[36] [37]**

Οι ενέσιμες (in situ) υδρογέλες παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις προσχηματισμένες, γεγονός που τις καθιστά προτιμητέες σε βιοιατρικές εφαρμογές όπως η χορήγηση φαρμάκων και η επιδιόρθωση ιστών. Αναλυτικότερα:

- Ολοκληρωτική κατάληψη του χώρου της ατέλειας ανεξαρτήτως του σχήματός της.
- Η ενσωμάτωση των μορίων ή/και των θεραπευτικών κυττάρων γίνεται ομοιογενώς.
- Απαιτείται ελάχιστης έως μηδενικής έκτασης χειρουργική επέμβαση για την εμφύτευση, άρα ο βαθμός επικινδυνότητας μειώνεται αισθητά. **[38] [39]**

Οι in situ υδρογέλες μπορούν να σχηματιστούν μέσω φυσικών ή χημικών μηχανισμών αντίδρασης σταυροδεσίματος. Οι συνήθεις φυσικοί μηχανισμοί είναι μέσω ιοντικών δυνάμεων, κρυσταλλοποίησης και δεσμών υδρογόνου. Η ειδοποιός διαφορά των φυσικά σταυροδεμένων υδρογελών από τις αντίστοιχες χημικές, είναι η απουσία των παραγόντων σχηματισμού σταυροειδών δεσμών κατά την παρασκευή τους, κάτι που τις καθιστά αναστρέψιμες και επαρκώς βιοσυμβατές. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ακεραιότητα των ουσιών που περιέχονται στην υδρογέλη, όπως κύτταρα και πρωτεΐνες, ενώ αποτελούν κυτταροτοξικές ενώσεις οι οποίες θα πρέπει να αφαιρεθούν από αυτήν για να καταστεί λειτουργική. Εντούτοις, οι φυσικοί μηχανισμοί σχηματισμού σταυροδεσμών, προσδίδουν στο υλικό ασθενείς μηχανικές ιδιότητες, καθιστώντας παράλληλα τη σταθερότητά του in vivo (εντός του οργανισμού) ευάλωτη σε παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH και οι ιοντικές δυνάμεις. Οι μεταβολές των παραγόντων αυτών, μπορεί να οδηγήσει σε κατάρρευση του σταυροδεμένου δικτύου. **[38] [39]**

Αντιθέτως, οι υδρογέλες που προέρχονται από χημικούς μηχανισμούς σταυροδεσίματος είναι μη αντιστρέψιμες, διαθέτουν καλύτερη χημική σταθερότητα και μηχανικές ιδιότητες. Οι σταυροειδείς δεσμοί ομοιοπολικής φύσεως επιτρέπουν ακριβέστερο έλεγχο της πυκνότητας σταυροδεσίματος της υδρογέλης, άρα και καλύτερο χειρισμό των ιδιοτήτων της όπως η μηχανική αντοχή, ο χρόνος αποικοδόμησης και η απορροφητική ικανότητα. **[39] [40] [41]**

Οι τρόποι με τους οποίους επιτυγχάνεται το χημικό σταυροδέσιμο, συνήθως είναι ο πολυμερισμός μέσω ελευθέρων ριζών (free radical polymerization), όπου χρησιμοποιούνται εκκινητές οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων ή φωτοεκκινητές, η προσθετική αντίδραση τύπου Michael, όπου αναμιγνύονται υδατικά διαλύματα πολυμερών που διαθέτουν πυρηνόφιλες (nucleophilic) ομάδες (αμινοομάδες ή θειολομάδες) με αντίστοιχα που έχουν ηλεκτρονιόφιλες (electrophilic) ομάδες (βινυλομάδες ή ακρυλομάδες) καθώς επίσης και μέσω δισουλφιδικών δεσμών ή αλδεΐδων. Εντούτοις, έχει αποδειχθεί ότι οι εν λόγω μέθοδοι προκαλούν κυτταροτοξικές αντιδράσεις, καθιστώντας τη χρήση τους για σχηματισμό in vivo υδρογελών, αφερέγγυα. **[13] [41] [42] [43]**

Μία τεχνική, ικανή να ξεπεράσει τα προβλήματα που εγείρονται από τις προαναφερθείσες μεθόδους, είναι το σταυροδέσιμο με τη βοήθεια ενζύμων (enzymatic crosslinking). Τα ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτή την τεχνική, είναι ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις που προκύπτουν φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό, και αναπτύσσονται σε υδατικό μέσο, σε μέτριες θερμοκρασίες και ουδέτερο pH. Επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για in situ δημιουργία σταυροειδών δεσμών στις υδρογέλες, προσφέροντας τα εξής πλεονεκτήματα: **[44] [45] [46]**

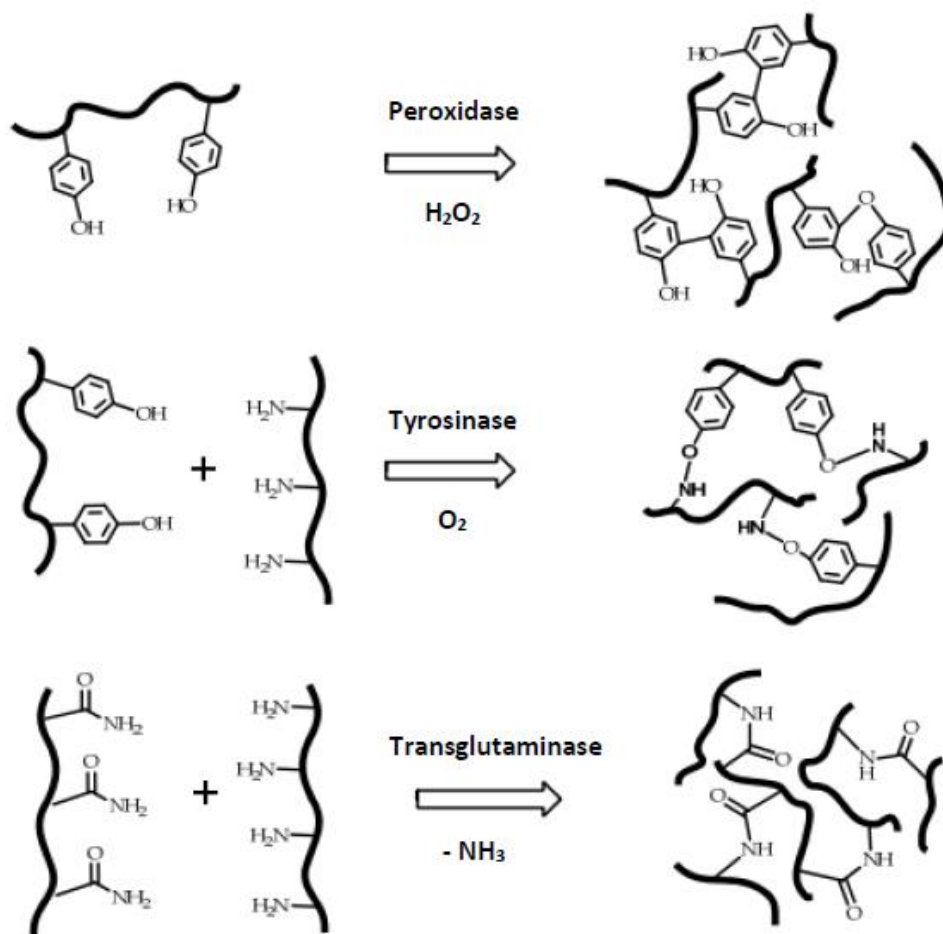
- Αποφυγή κυτταροτοξικών αντιδράσεων.
- Ηπιότερης έντασης αντιδράσεις: Οι ενζυματικές αντιδράσεις είναι ήπιας έντασης υπό φυσιολογικές συνθήκες, γεγονός που επιτρέπει το σταυροδέσιμο πολυμερών, που δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν στις ακραίες συνθήκες των χημικών αντιδράσεων.
- Μηχανικές ιδιότητες και απορροφητική ικανότητα παρόμοιες με αυτές του εγγενή ιστού.
- Η αντίδραση πολυμερισμού μπορεί να ελεγχθεί μέσω της ρύθμισης της ενεργότητας του ενζύμου.
- Ο ρυθμός σχηματισμού της γέλης (gelation rate) μπορεί να ρυθμιστεί, χαρακτηριστικό ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς επιτυγχάνεται καλύτερη κυτταρική κατανομή και ενσωμάτωση της υδρογέλης στον περιβάλλοντα ιστό.

Τα συνηθέστερα ένζυμα που επιστρατεύονται για το συγκριμένο είδος σταυροδεσίματος είναι η horseradish peroxidase (HRP), η τυροσινάση (tyrosinase) και η τρανσγλουταμινάση (transglutaminase).

Το ένζυμο horseradish peroxidase (HRP), πρόκειται για μία μονής αλυσίδας, β-τύπου αιμοπρωτεΐνη, η οποία καταλύει τη σύζευξη φαινολών ή παραγώγων ανιλίνης, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (hydrogen peroxide, H_2O_2). Η αντίδραση σταυροδεσίματος γίνεται μέσω δεσμού άνθρακα-άνθρακα στις θέσεις «όρθο» ή/και μέσω δεσμού άνθρακα-οξυγόνου μεταξύ του ατόμου άνθρακα της θέσης «όρθο» και του φαινοξυγόνου στα τμήματα των φαινολών. Έχει παρατηρηθεί ότι το συγκεκριμένο ένζυμο μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό σχηματισμού της γέλης ανάλογα με την συγκέντρωσή του. Επιπλέον, προσφέρει χημική σταθερότητα και καλές μηχανικές ιδιότητες. Το μειονέκτημα εντούτοις, της χρήσης της HRP, βρίσκεται στην παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου, H_2O_2 . Συγκεκριμένα, υψηλές συγκεντρώσεις τις ουσίας, μπορεί να προκαλέσουν κυτταρική απόπτωση, μία διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Συνίσταται έτσι η χρήση του σε συγκεντρώσεις ευνοϊκές για τα κύτταρα. **[41] [47] [48]**

Η τυροσινάση (tyrosinase), είναι ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη διαδικασία σχηματισμού διαφόρων τύπων μελανίνης ευρισκόμενο σε ζώα και φυτά. Ο μηχανισμός αντίδρασης της τυροσινάσης βασίζεται στη μετατροπή φαινόλης σε κατεχόλη, προσθέτοντας μία επιπλέον υδροξυλομάδα στον αρωματικό δακτύλιο, παρουσία οξυγόνου. Η οξειδωση της κατεχόλης, παράγει μία κινόνη ικανή να σχηματίσει ομοιοπολικό δεσμό με άλλες κινόνες. **[49]** Οι υδρογέλες που σχηματίζονται με τη συνδρομή αυτού του ενζύμου, δεν απαιτούν τη χρήση επιπλέον συμπαραγόντων και διαθέτουν υψηλή ικανότητα προσκόλλησης. Ωστόσο, είναι μηχανικά και χημικά ασταθείς. **[50]**

Όσον αφορά στην τρανσγλουταμινάση (transglutaminase), είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στο σταυροδέσιμο πρωτεϊνών. Ειδικότερα, καταλύει την αντίδραση δημιουργίας σταυροειδών δεσμών μεταξύ αμινομάδων και των Υ-καρβοξυαμιδομάδων γλουταμίνης που βρίσκονται στα πεπτίδια. Η χρήση της τρανσγλουταμινάσης δεν απαιτεί τη χρήση συμπαραγόντων, δεν επηρεάζει αρνητικά τα κύτταρα και διευκολύνει αισθητά τη μεταφορά ουσιών. Εντούτοις, μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδη απόκριση, γεγονός που την καθιστά απορριπτέα για χρήση στη σύνθεση υδρογελών. **[46]**

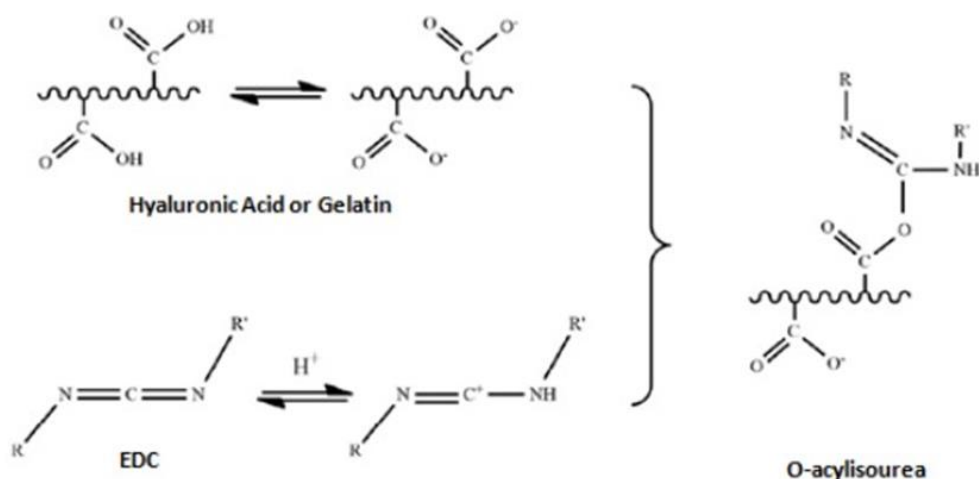


Εικόνα 1.5: Ενζυματικές αντιδράσεις HRP, tyrosinase, transglutaminase για τη σύνθεση υδρογελών.[41]

Από τις προαναφερθείσες ιδιότητες των εκάστοτε ενζύμων, συμπεραίνει κανείς, πως η horseradish peroxidase (HRP) συγκεντρώνει τις περισσότερες πιθανότητες για σύνθεση υδρογελών ιδανικών για χρήση στον τομέα της επιδιόρθωσης ιστών. Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία.

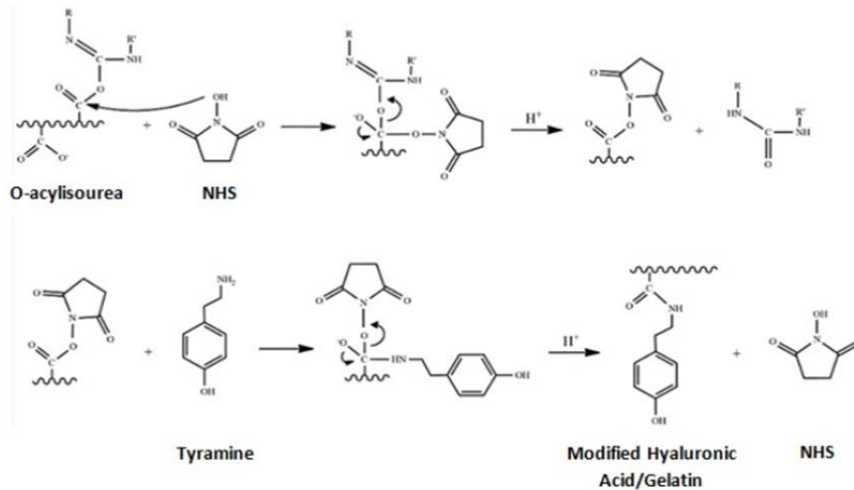
1.3.4 Ενοφθαλισμός Ζελατίνης και Υαλουρονικού Οξέος με Τυραμίνη προς σχηματισμό υδρογελών

Για τη σύνθεση των υδρογελών ζελατίνης και υαλουρονικού οξέος, ήταν αρχικά απαραίτητο να προστεθεί τυραμίνη (tyramine) στις πολυμερικές αλυσίδες των δύο συστατικών, ούτως ώστε να προκύψουν φαινολομάδες ικανές να αντιδράσουν για τον επακόλουθο σχηματισμό της υδρογέλης. Ο ενοφθαλισμός τυραμίνης επετεύχθη χρησιμοποιώντας τις ουσίες NHS (N-Hydroxysuccinimide) και EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) ως σταθεροποιητή και καταλύτη της αντίδρασης αντίστοιχα. Αρχικά πραγματοποιείται η αντίδραση της EDC με τις αλυσίδες της ζελατίνης και του υαλουρονικού οξέος παράγοντας O-acylisourea.



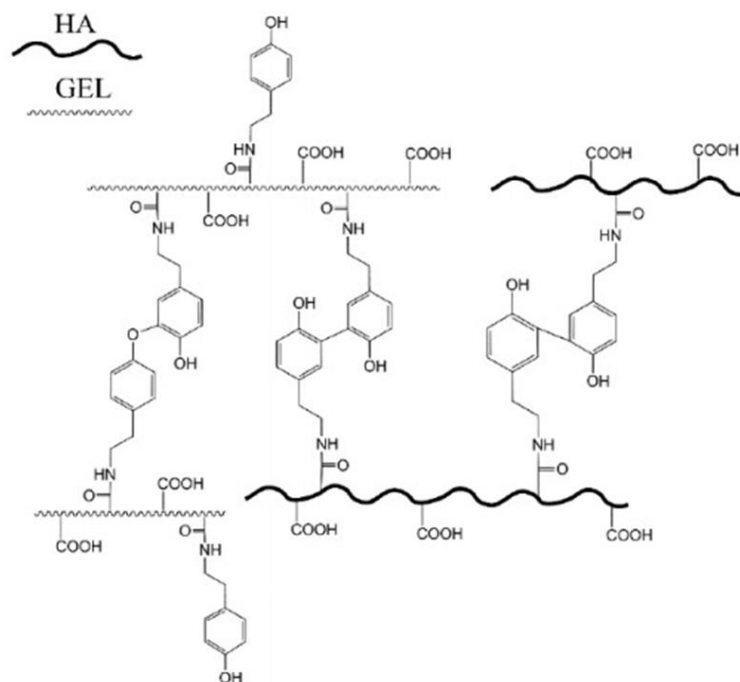
Εικόνα 1.6: Αντίδραση υαλουρονικού οξέος/ ζελατίνης με EDC, οδηγώντας στο σχηματισμό της O-acylisourea. [51]

Στη συνέχεια, η O-acylisourea αντιδρά με την τυραμίνη και το NHS προς σχηματισμό αμιδικών δεσμών, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την τροποποίηση της ζελατίνης και του υαλουρονικού οξέος με φαινολομάδες για να καταστεί δυνατή η διαδικασία δημιουργίας των σταυροειδών δεσμών.



Εικόνα 1.7: Αντίδραση της O-acylisourea με NHS και ακολούθως με τυραμίνη, οδηγώντας στην πρόσδεση της τελευταίας στις αλυσίδες υαλουρονικού οξέος και ζελατίνης. [51]

Το χημικό σταυροδέσιμο των δύο συστατικών των υδρογελών πραγματοποιείται μέσω οξειδωτικής αντίδρασης σύζευξης με τη βοήθεια του ενζύμου HRP και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), η οποία διεξάγεται σε δύο μέρη. Καταρχάς, η HRP οξειδώνεται παρουσία του H₂O₂ ώστε να δημιουργηθεί ένα ενδιάμεσο χημικό μέσο το οποίο με τη σειρά του θα οξειδώσει τις φαινολομάδες της τυραμίνης που βρίσκεται προσδεμένη στη ζελατίνη και το υαλουρονικό οξύ, οδηγώντας στο σταυροδέσιμο και συνεπώς στο σχηματισμό της υδρογέλης.



Εικόνα 1.8: Χημική δομή υδρογέλης ζελατίνης/υαλουρονικού οξέος κατόπιν ενζυματικού σταυροδεσίματος, παρουσία HRP και H₂O₂. [52]

1.4 Καταστάσεις νερού στα πολυμερικά δίκτυα των υδρογελών

Οι υδρογέλες είναι υδρόφιλα πολυμερικά δίκτυα, ικανά να απορροφήσουν από 10-20% έως και χιλιάδες φορές της αρχικής (ξηρής) τους μάζα σε νερό. Η ποσότητα του απορροφούμενου νερού, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτού και της υδρογέλης, μπορούν να προσδιορίσουν ορισμένες από τις ιδιότητές της, όπως, η δυνατότητα μεταφοράς θρεπτικών ουσιών και μεταβολικών καταλοίπων και η βιοσυμβατότητα. [23][53]

Οι συμπεριφορές και τα χαρακτηριστικά που μπορεί να επιδείξει το νερό στο εσωτερικό της υδρογέλης, ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες, γνωστές ως «καταστάσεις του νερού»:

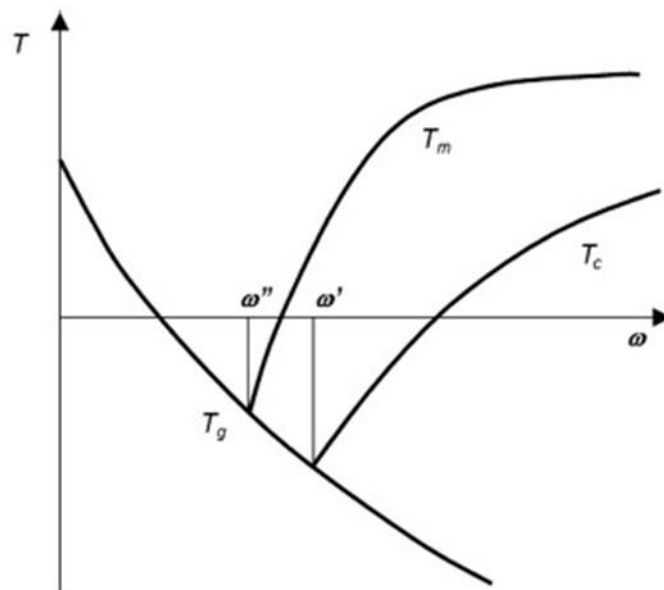
- **Πρωτεύον Δεσμευμένο Νερό (Primary Bound Water):** Όταν μία άνυδρη υδρογέλη απορροφά νερό, τα πρώτα μόρια νερού που εισέρχονται σε αυτήν, αλληλεπιδρούν με τις πολικότερες, υδρόφιλες ομάδες, σχηματίζοντας την πρώτη στιβάδα νερού (first water layer) ή αλλιώς «πρωτεύον δεσμευμένο νερό». Τα μόρια νερού της εν λόγω στιβάδας αλληλεπιδρούν έντονα με τις πολυμερικές αλυσίδες της υδρογέλης.
- **Δευτερεύον Δεσμευμένο Νερό (Secondary Bound Water):** Όσο η απορρόφηση νερού συνεχίζεται, το δίκτυο διογκώνεται και εφόσον όλες οι υδρόφιλες ομάδες ενυδατωθούν, τα νεοεισελθόντα μόρια νερού αλληλεπιδρούν με τις μη-πολικές ομάδες και την ήδη διαμορφωμένη πρώτη στιβάδα νερού. Σχηματίζεται με αυτό τον τρόπο η δεύτερη στιβάδα νερού (second water layer) ή αλλιώς «δευτερεύον δεσμευμένο νερό» η οποία χαρακτηρίζεται από ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις σε σύγκριση με την πρώτη στιβάδα. Ο συνδυασμός πρώτης και δεύτερης στιβάδας νερού που αλληλεπιδρά απευθείας με τις πολυμερικές αλυσίδες της υδρογέλης, καλείται «συνολικό δεσμευμένο νερό» (total bound water).
- **Συστάδες Νερού (Cluster Domains of Water):** Μόλις σχηματιστούν οι στιβάδες του δεσμευμένου νερού, τα μόρια νερού που θα εισέρχονται στην υδρογέλη, θα αλληλεπιδρούν με αυτά, σχηματίζοντας συστάδες νερού. Δεδομένου ότι οι συστάδες δεν συσχετίζονται άμεσα με τις πολυμερικές αλυσίδες, οι αλληλεπιδράσεις τους θα είναι πολύ πιο αδύναμες σε σχέση με τις αντίστοιχες του δεσμευμένου νερού.
- **Ελεύθερο Νερό (Pure Bulk Water):** Ύστερα από το σχηματισμό των συστάδων, η υδρογέλη απορροφά περισσότερο νερό εξαιτίας της ωσμωτικής πίεσης του πολυμερικού δικτύου, μέχρις ότου φτάσει μία τιμή ισορροπίας (equilibrium water content). Το νερό αυτό ονομάζεται «ελεύθερο νερό», και έχει τις ίδιες ιδιότητες με το καθαρό νερό. Το συγκεκριμένο είδος νερού, παρατηρείται στο εσωτερικό των υδρογελών όταν η υδατική δραστηριότητα (water activity) ισούται με τη μονάδα, (ή εναλλακτικά, όταν η σχετική

υγρασία, RH, είναι 100%) και υπάρχουν κοιλότητες μεταξύ των δικτύων ικανές να το «φιλοξενήσουν».

Η ποσότητα του νερού που απορροφάται από την υδρογέλη εξαρτάται από τις θερμοδυναμικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ αυτής και του νερού και από την υδροφιλικότητα της. Αναλυτικότερα, οι θερμοδυναμικές δυνάμεις εξαρτώνται από τη δύναμη ανάκλισης του τρισδιάστατου πολυμερικού δικτύου η οποία αποδίδεται στον αριθμό των σταυροειδών δεσμών που το συγκροτεί, ενώ η υδροφιλικότητα χαρακτηρίζεται από την παράμετρο αλληλεπίδρασης, χ , μεταξύ πολυμερούς και διαλύτη (στη συγκεκριμένη περίπτωση το νερό).

1.5 Διάγραμμα Φάσεων Πολυμερικών Υδρογελών

Μία υδρογέλη μπορεί να οριστεί σαν ένα ομογενές μίγμα δύο συστατικών, του πολυμερούς από το οποίο έχει σχηματιστεί και ενός διαλύτη. Το διάγραμμα φάσεων παρουσιάζει τις διαφορετικές θερμικές διεργασίες που μπορεί να προκύψουν σε ένα πολυμερές, όταν μεταβάλλεται η θερμοκρασία συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύτη που βρίσκεται σε αυτό. Το διάγραμμα αποτελείται από τρεις καμπύλες, όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί. [54] [55]

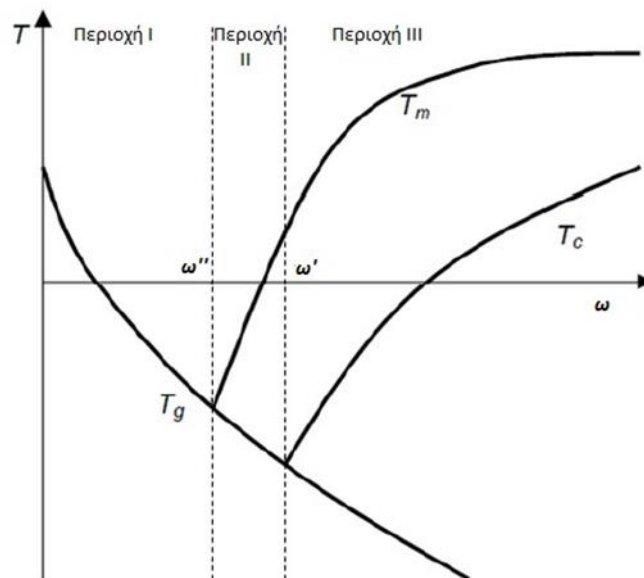


Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση διαγράμματος φάσης πολυμερικής υδρογέλης. Το ω είναι το ποσοστό νερού στην υδρογέλη, και οι θερμοκρασίες κρυστάλλωσης και πήξης του νερού και η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης της διογκωμένης υδρογέλης.

Η πρώτη καμπύλη αντιστοιχεί στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, T_g , η οποία περιγράφει μία συγκεκριμένη περιοχή θερμοκρασιών στην οποία παρατηρείται δομική αλλαγή του άμορφου τμήματος του πολυμερούς. Σε θερμοκρασίες άνω της T_g , τα μόρια διαθέτουν επαρκή ενέργεια για να ξεπεράσουν τις ελκτικές δυνάμεις και να

κινηθούν. Αντίθετα, σε θερμοκρασίες κάτω της T_g , το υλικό βρίσκεται σε υαλώδη κατάσταση και η ενέργεια των μορίων δεν είναι αρκετή, καθιστώντας τα αμελητέα σε σχέση με την κίνηση των αλυσίδων. Η δεύτερη καμπύλη αντιπροσωπεύει τη θερμοκρασία κρυστάλλωσης, T_c . Η κρυστάλλωση είναι μία διαδικασία που παρατηρείται με την πτώση της θερμοκρασία του πολυμερούς στην θερμοκρασία όπου τα μόρια μπορούν να διαταχθούν σε κρυσταλλική μορφή. Η συγκεκριμένη διεργασία είναι εξώθερμη, καθώς σχηματίζονται δευτεροβάθμιοι δεσμοί (δεσμοί υδρογόνου, Van der Waals) και εκλύεται ενέργεια.

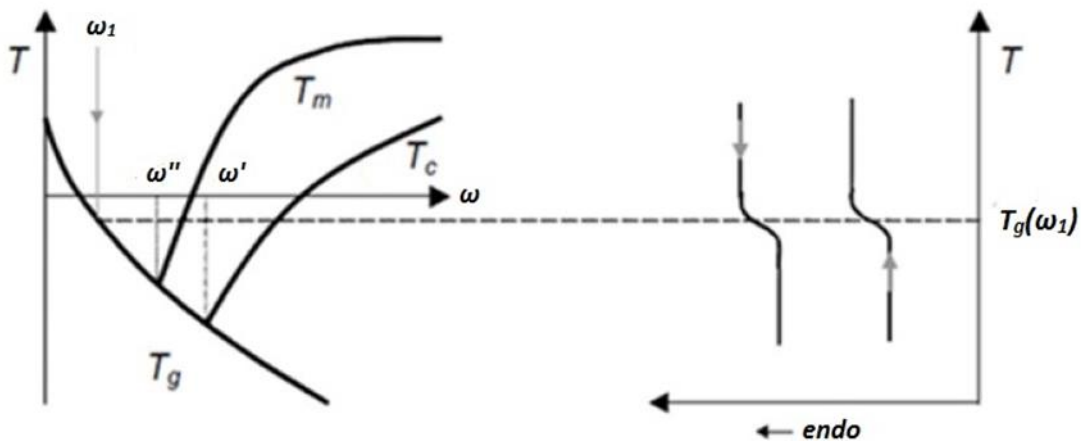
Τέλος, υπάρχει και η καμπύλη που αντιστοιχεί στην θερμοκρασία τήξης, T_m . Η τήξη παρατηρείται όταν η θερμοκρασία του πολυμερούς αυξηθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε οι δευτεροβάθμιοι δεσμοί που είχαν δημιουργηθεί κατά την κρυστάλλωση να καταρρεύσουν. Η τήξη αποτελεί ενδόθερμη διαδικασία, καθώς απαιτείται ενέργεια για να καταλυθούν οι προαναφερθέντες δεσμοί. [56] [57] Παρατηρώντας το διάγραμμα φάσεων, εξάγεται το συμπέρασμα ότι, καθώς αυξάνεται το ποσοστό του νερού στο εσωτερικό του πολυμερούς, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης μειώνεται, ενώ οι θερμοκρασίες τήξης και κρυστάλλωσης αυξάνονται. Όταν λαμβάνει χώρα κάποια θερμική αλλαγή στην υδρογέλη, μπορούν να παρατηρηθούν διαφορετικές διεργασίες στην υδρογέλη, ανάλογα την περιοχή του διαγράμματος. Το τελευταίο μπορεί να χωριστεί σε τρεις περιοχές οι οποίες ορίζονται από τα σημεία τομής των θερμοκρασιακών καμπυλών.



Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών που ορίζονται από τις τομές των καμπυλών θερμοκρασίας ως προς το ποσοστό νερού.

- **Περιοχή I: Ποσοστά διαλύτη κάτω από ω'' ($\omega < \omega''$)**

Όταν η θερμοκρασία μειώνεται στην περιοχή αυτή, η καμπύλη της υαλώδους μετάπτωσης προηγείται αυτών της κρυστάλλωσης και τήξης. Κάτω από την T_g , οι πολυμερικές αλυσίδες στερούνται κινητικότητας καθώς το υλικό βρίσκεται σε υαλώδη κατάσταση, γεγονός που εμποδίζει τη μετακίνηση του διαλύτη άρα και την κρυστάλλωση. Επομένως, το συγκεκριμένο ποσοστό νερού στο εσωτερικό της υδρογέλης, δεν μπορεί να κρυσταλλωθεί (non-freezable).

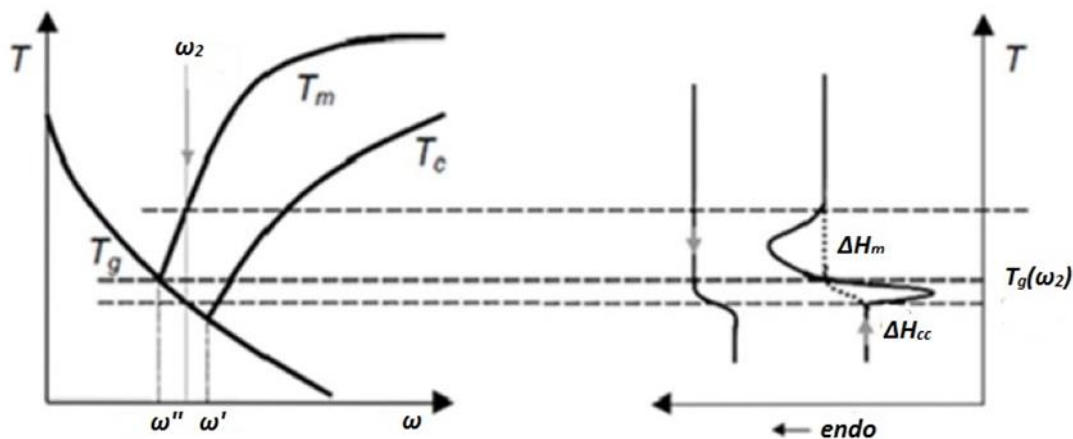


Εικόνα 1.11: Διάγραμμα φάσεων (αριστερά) και θερμογράφημα (δεξιά) πολυμερούς που περιέχει διαλύτη σε ποσοστό κάτω από ω'' . [58]

- **Περιοχή II: Ποσοστά διαλύτη μεταξύ ω'' και ω' ($\omega'' < \omega < \omega'$)**

Όπως και στην Περιοχή I, έτσι και σε αυτήν, όταν η υδρογέλη ψύχεται, η διαδικασία της υαλώδους μετάπτωσης παρατηρείται πριν την κρυστάλλωση, συνεπώς ο διαλύτης δεν κρυσταλλοποιείται. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο σχηματισμός των κρυστάλλων συντελείται μέσω δύο διαδικασιών: α) το σχηματισμό πυρήνων σεβαστού μεγέθους και β) την επακόλουθη ανάπτυξή τους. Η διαδικασία ψύξης επηρεάζει αρνητικά το σχηματισμό κρυστάλλων, καθώς ο ρυθμός σχηματισμού πυρήνων αυξάνεται όπως και το ιξώδες του συστήματος, εμποδίζοντας τη μετακίνηση του διαλύτη προς σχηματισμό πυρήνων σεβαστού μεγέθους.

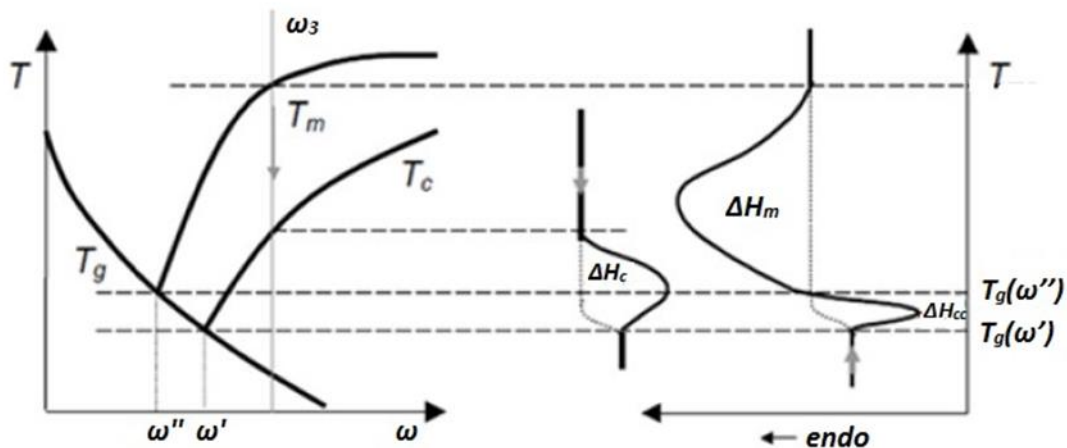
Εντούτοις, κατά τη θέρμανση, όταν το σύστημα φτάσει στην T_g , το ιξώδες του μειώνεται, επιτρέποντας τη μετακίνηση του διαλύτη σε περιοχές που έχουν διαμορφωθεί κατά την ψύξη, δημιουργώντας κρυστάλλους στο εσωτερικό της υδρογέλης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ψυχρή κρυστάλλωση (cold crystallization). Αν η θερμοκρασία αυξηθεί περαιτέρω, οι κρύσταλλοι που είχαν σχηματιστεί, θα λιώσουν.



Εικόνα 1.12: Διάγραμμα φάσεων (αριστερά) και θερμογράφημα (δεξιά) πολυμερούς που περιέχει διαλύτη σε ποσοστό μεταξύ ω' και ω'' . [58]

- **Περιοχή III: Ποσοστά διαλύτη άνω του ω' ($\omega > \omega'$)**

Σε αυτή την περίπτωση, όταν διεξάγεται η διαδικασία ψύξης, η καμπύλη κρυστάλλωσης συναντάται πριν την αντίστοιχη της υαλώδους μετάπτωσης στο διάγραμμα φάσεων. Σχηματίζονται κρύσταλλοι γεγονός που μεταφράζεται σαν μία εξώθερμη κορυφή στο θερμογράφημα του DSC. Ο σχηματισμός κρυστάλλων οδηγεί σε μείωση του διαλύτη στην υδρογέλη έως ότου $\omega = \omega'$. Στο σημείο αυτό, έχει επιτευχθεί η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, προκαλώντας μείωση της κινητικότητας αλυσίδων και επομένως, δεν είναι δυνατή η δημιουργία κρυστάλλων. Κατά τη θέρμανση, όταν η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης ξεπεραστεί, παρατηρείται η ψυχρή κρυστάλλωση όπως αναλύθηκε προηγουμένως. Αν η θερμοκρασία συνεχίσει να αυξάνεται, τότε προκαλείται τήξη των κρυστάλλων που είχα σχηματιστεί κατά τις διαδικασίες θέρμανσης και τήξης, με αποτέλεσμα το ποσοστό του διαλύτη να επανέλθει στο αρχικό.



Εικόνα 1.13: Διάγραμμα φάσεων (αριστερά) και θερμογράφημα (δεξιά) πολυμερούς που περιέχει διαλύτη σε ποσοστό άνω του ω' . [58]

1.6 Σύνθεση Υδρογελών Ζελατίνης – Υαλουρονικού Οξέος

1.6.1 Στάδιο 1: Παρασκευή Υδρογελών από Διαλύματα

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, πραγματοποιήθηκε σύνθεση υδρογελών ζελατίνης (gelatin) και υαλουρονικού οξέος (hyaluronic acid) μέσω χημικού σταυροδεσίματος, που βασίστηκε στη χρήση του ενζύμου περοξειδάση (horseradish peroxidase) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (hydrogen peroxide, H_2O_2). Τα δύο συστατικά, ήταν ενοφθαλισμένα με τυραμίνη (tyramine), σε μοριακές αναλογίες Gel 1:2 Tyr και HA 1:1 Tyr αντίστοιχα.

Πριν την τελική διαδικασία σχηματισμού των υδρογελών, απαραίτητη ήταν η σύνθεση ξεχωριστών διαλυμάτων των τεσσάρων ουσιών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Calcium Free Krebs Ringer Buffer (CF-KRB) και τα διαλύματα είχαν τις εξής περιεκτικότητες:

- **Gel-Tyr (2% w/v):** Το διάλυμα παρασκευάστηκε στην επιθυμητή συγκέντρωση και τοποθετήθηκε για 30 λεπτά στο φούρνο, σε θερμοκρασία 37 °C για να εξασφαλιστεί η διάλυση της ζελατίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα.
- **HA-Tyr (2% w/v):** Το διάλυμα παρασκευάστηκε στην επιθυμητή συγκέντρωση και παρέμεινε για 24 ώρες σε ψυγείο σε θερμοκρασία 4 °C για να εξασφαλιστεί η διάλυση του υαλουρονικού οξέος στο ρυθμιστικό διάλυμα.

- **HRP (12.5 U/mL):** Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάστηκε στην απαιτούμενη συγκέντρωση, λίγο πριν χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό των υδρογελών, ούτως ώστε να αποφευχθεί η απενεργοποίηση του ενζύμου.
- **H₂O₂ (20mM):** Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάστηκε στην απαιτούμενη συγκέντρωση αμέσως πριν τη σύνθεση των υδρογελών, ούτως ώστε να είναι όσο πιο πρόσφατο γίνεται. Για τη δημιουργία του διαλύματος, παρασκευάστηκε αρχικά διάλυμα H₂O₂ συγκέντρωσης 100mM εκ του οποίου χρησιμοποιήθηκε ο απαιτούμενος όγκος για την παρασκευή του υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκέντρωσης 20mM.

Η σύσταση των υδρογελών που ετοιμάστηκαν ήταν η ακόλουθη:

- 80 % v/v των ήδη παρασκευασμένων διαλυμάτων HA-Tyr (2% w/v) ή και Gel-Tyr (2% w/v).
- 10% v/v του διαλύματος HRP (12.5 U/mL).
- 10% v/v του διαλύματος H₂O₂ (20mM).

Η σύνθεση των υδρογελών πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία πολλαπλών κοιλοτήτων (well plates) δύο διαφορετικών μεγεθών, ανάλογα με το απαιτούμενο τελικό μέγεθος του δείγματος. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 48 τρυβλία πολλαπλών κοιλοτήτων για την παρασκευή δειγμάτων όγκου 300μL και αντίστοιχα 24 για την παρασκευή δειγμάτων όγκου 750μL.

Μόλις τα διαλύματα παρασκευάστηκαν, χρησιμοποιώντας μία μικροπιπέτα, τοποθετήθηκε αρχικά στις υποδοχές των τρυβλίων η απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος HA-Tyr (2% w/v) και ακολούθησε η αντίστοιχη ποσότητα του Gel-Tyr (2% w/v). Κατόπιν, προστέθηκε το διάλυμα της HRP και το μίγμα ομογενοποιήθηκε με τη βοήθεια της μικροπιπέτας. Εν τέλει, προστέθηκε το διάλυμα H₂O₂ εκκινώντας έτσι την αντίδραση σταυροδεσίματος, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στο σχηματισμό των υδρογελών εντός ολίγων λεπτών.

Ύστερα από τον σχηματισμό τους, οι υδρογέλες απομακρύνθηκαν από τα τρυβλία με τη βοήθεια μίας σπάτουλας. Αποκολλήθηκαν αρχικά από τα τοιχώματα και εν συνεχεία από τη βάση των υποδοχών των τρυβλίων και τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά γυάλινα φιαλίδια που περιείχαν απιονισμένο νερό. Κατόπιν, τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε ψυγείο, με σκοπό να αποφευχθεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών και βακτηρίων στις γέλες που βρίσκονταν εντός τους.

Λαμβάνοντας υπόψη τον βασικό στόχο της εργασίας, ο οποίος ήταν να μελετηθεί η συμπεριφορά των υδρογελών σε διαφορετικές σχετικές υγρασίες, κρίθηκε

απαραίτητο να αφαιρεθεί από αυτές το νερό που περιείχαν, για να μπορέσουν να τοποθετηθούν στα επιθυμητά περιβάλλοντα υγρασίας, χωρίς να περιέχουν εξ' αρχής νερό στο εσωτερικό τους. Παρακάτω, αναφέρονται οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν, μέχρι τα δείγματα να απολέσουν πλήρως το νερό που βρισκόταν σε αυτά για να μπορέσουν έτσι να τοποθετηθούν στα κατάλληλα περιβάλλοντα υγρασίας.

1.6.2 Στάδιο 2: Μέθοδος εκχύλισης μέσω ψύξης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι υδρογέλες μετά την παρασκευή τους τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με απιονισμένο νερό και εν συνεχεία στο ψυγείο για την αποφυγή ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και βακτηρίων. Παρέμειναν στο ψυγείο για μερικές ώρες και αμέσως μετά υποβλήθηκαν σε διαδικασία εκχύλισης νερού μέσω ψύξης, με στόχο την απομάκρυνση του νερού από το εσωτερικό τους και την μετατροπή τους σε πορώδη υλικά.

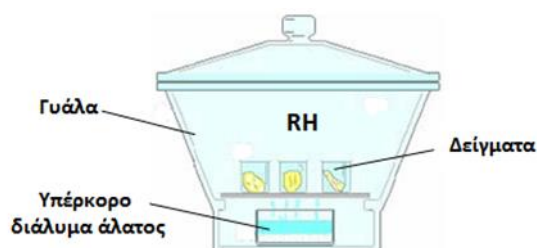
Η εκχύλιση μέσω ψύξης, είναι μία μέθοδος διαχωρισμού φάσης, η οποία στοχεύει στην απόκτηση ενός υλικού με πορώδη δομή, κάτω από συνθήκες ψύξης. Η βασική αρχή της μεθόδου, είναι η εκχύλιση ενός διαλύτη μέσω ενός μη-διαλύτη. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ο διαλύτης είναι το νερό το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό της υδρογέλης και ο μη-διαλύτης είναι η αιθανόλη.[79] Μέσω της διαδικασίας αυτής, το παγωμένο νερό θα διαλυθεί παρουσία της αιθανόλης σε χαμηλή θερμοκρασία και οι χώροι που καταλαμβάνονταν από νερό εντός της υδρογέλης θα καταλειφθούν από αιθανόλη.

Για την πραγματοποίηση της μεθόδου, αρχικά αφαιρέθηκε το απιονισμένο νερό στο οποία βρίσκονταν εμβαπτισμένες οι υδρογέλες και κατόπιν παρέμειναν σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 2 ώρες. Έπειτα, οι υδρογέλες εμβαπτίστηκαν εκ νέου, αυτή τη φορά σε αιθανόλη θερμοκρασίας $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, και παρέμειναν στη συγκεκριμένη θερμοκρασία για 45 λεπτά. Μετά από το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, η αιθανόλη αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε με καινούρια. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν κάθε 45 λεπτά για διάστημα 3 ωρών. Μετά το πέρας της, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φούρνο κενού (απουσία αέρα) σε θερμοκρασία δωματίου ($20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) για διάστημα 48 ωρών, ούτως ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη από το εσωτερικό και την επιφάνειά τους.

1.6.3 Στάδιο 3: Αποθήκευση και Υδάτωση

Μετά τη διαδικασία ξήρανσης στο φούρνο κενού, τα δείγματα ζυγίστηκαν σε ψηφιακό ζυγό ακριβείας (Mettler Toledo) και αποθηκεύτηκαν σε ερμητικά κλειστή γυάλα που περιείχε πεντοξειδίο του φωσφόρου, P₂O₅. Η συγκεκριμένη ουσία είναι αφυδατική, δεν επιτρέπει δηλαδή να αναπτυχτεί υγρασία εντός της γυάλας. Με τον τρόπο αυτό, τα δείγματα παρέμειναν ξηρά, μέχρις ότου μετρηθούν πειραματικά (είτε μέσω Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης, είτε μέσω Διηλεκτρικής Φασματοσκοπίας Εναλλασσόμενου Πεδίου), ή μεταφερθούν σε διαφορετική γυάλα εντός της οποίας θα αναπτυσσόταν περιβάλλον σχετικής υγρασίας, RH.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε γυάλες με περιβάλλοντα σχετικής υγρασίας 65%, 85% και 98%. Για να επιτευχθούν τα συγκεκριμένα ποσοστά, στο εσωτερικό κάθε γυάλας τοποθετήθηκε ένα υπέρκορο διάλυμα άλατος σε απιονισμένο νερό, ανάλογα με τα επιθυμητά επίπεδα σχετικής υγρασίας. Τα συγκεκριμένα άλατα, έχουν την ιδιότητα να απορροφούν συγκεκριμένα ποσοστά υγρασίας το καθένα, επιτρέποντας έτσι να δημιουργηθεί το κατάλληλο ποσοστό σχετικής υγρασίας. Στη συνέχεια, οι γυάλες σφραγίστηκαν ερμητικά και παρέμειναν έτσι για διάστημα 7 ημερών, με στόχο να ισορροπήσει το περιβάλλον που θα αναπτυσσόταν στο εσωτερικό τους. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η μεταβολή της θερμοκρασίας επηρεάζει την επίτευξη του τελευταίου, οι γυάλες βρισκόνταν πάντα στον ίδιο χώρο.



Εικόνα 1.14: Σκίτσο γυάλας με περιβάλλον εντός της οποίας αναπτύσσεται περιβάλλον σχετικής υγρασίας.

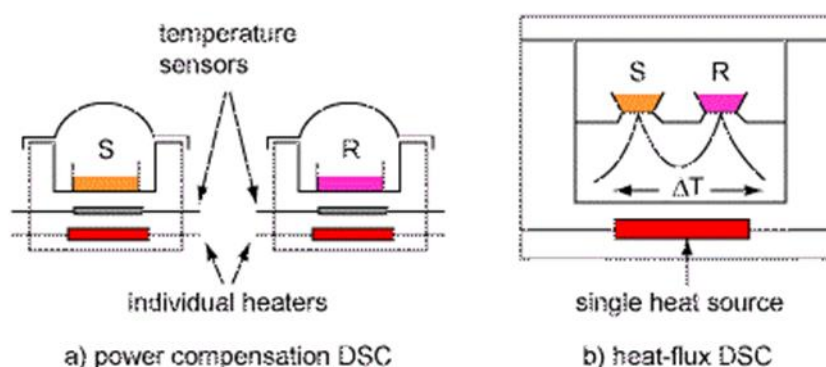
2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

2.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης αποτελεί ευρέως διαδεδομένη μέθοδο θερμικής ανάλυσης, η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη θερμικών μεταβάσεων υλικών[59]. Μέσω της εν λόγω μεθόδου, προσδιορίζεται η ποσότητα της θερμότητας που απορροφάται ή εκλύεται συγκριτικά με ένα δείγμα αναφοράς, κατά τη διάρκεια μιας θερμικής μετάβασης. [60]Οι πειραματικές διατάξεις DSC διακρίνονται σε δύο τύπους: α) τις διατάξεις αντιστάθμισης ισχύος (power compensation) και β) τις διατάξεις ροής θερμότητας (heat flux).

Στην πρώτη περίπτωση, η θερμοκρασία του εξεταζόμενου δείγματος, T_s , και του δείγματος αναφοράς, T_r , ελέγχονται ανεξάρτητα από δύο διαφορετικούς φούρνους. Η παροχή ενέργειας στον κάθε φούρνο ελέγχεται ανεξάρτητα, ούτως ώστε $T_s = T_r$, και καθορίζει τη ροή θερμότητας στο σύστημα. Η διαφορά στην παρεχόμενη ισχύ, συναρτήσει της θερμοκρασίας του δοκιμίου, αντιστοιχεί στην ποσότητα της θερμοκρασίας που απορροφάται ή εκλύεται κατά τη διεργασία που μελετάται.

Στη δεύτερη περίπτωση, το υπό μελέτη δοκίμιο και το δοκίμιο αναφοράς βρίσκονται σε θερμική επαφή μέσω ενός κοινού μεταλλικού δίσκου και περικλείονται από έναν κοινό φούρνο. Οι μεταβολές της ενθαλπίας και της θερμοχωρητικότητας που παρατηρούνται στο εξεταζόμενο δοκίμιο οδηγούν σε μεταβολή της T_s συναρτήσει της T_r . Η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των δύο δοκιμίων, ΔT , μετράται και για δεδομένη θερμική αντίσταση συνδέεται με τη ροή θερμότητας στο σύστημα.

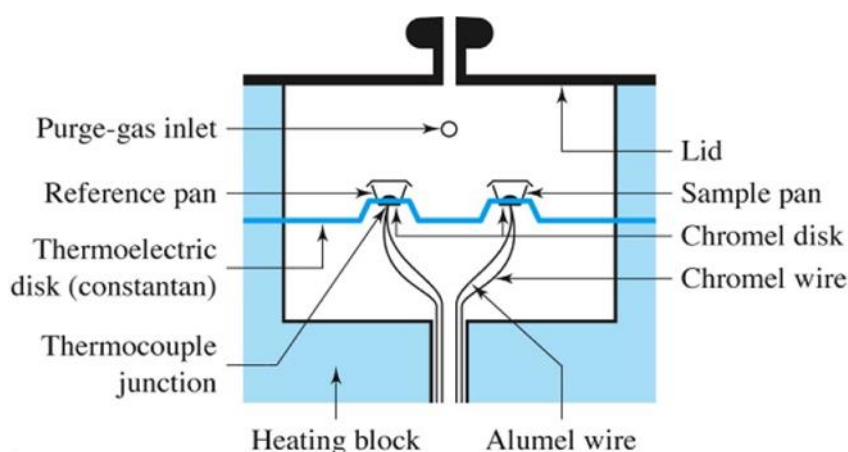


Εικόνα 2.1: Κυψελίδες μέτρησης τύπου αντιστάθμισης ισχύος (αριστερά) και κυψελίδα μέτρησης τύπου ροής θερμότητας (δεξιά).

Το διαφορικό θερμιδόμετρο μετρά τις τιμές της ενθαλπίας, μέσω της διαφορετικής ροής θερμότητας που απαιτείται για να διατηρήσει ένα υλικό τη θερμοκρασία του σταθερή. Κατά τις αλλαγές φάσεις ή κατά τη διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης, για

να διατηρηθεί η θερμοκρασία του υλικού σταθερή, υπάρχουν διαφοροποιήσεις στη ροή θερμότητας, οι οποίες καταγράφονται από τη διάταξη. Αυτό επιτυγχάνεται τοποθετώντας μία μικρή ποσότητα του υλικού προς μελέτη σε ένα καψίδιο αλουμινίου (pan) και χρησιμοποιώντας ένα όμοιο αλλά άδειο καψίδιο ως δοκίμιο αναφοράς. Τα καψίδια αυτά τοποθετούνται σε δύο θερμαινόμενους υποδοχείς και εξασφαλίζουν την καλή επαφή με την πηγή παροχής ισχύος και τους αισθητήρες ελέγχου του συστήματος.

Η διάταξη του εργαστηρίου είναι τύπου ροής θερμότητας (heat flux DSC) γεγονός που σημαίνει ότι το σύστημα καψιδίων - υποδοχέων βρίσκεται στο εσωτερικό θερμοηλεκτρικού δοχείου περιβαλλόμενο από έναν κοινό φούρνο. Στο εσωτερικό του φούρνου η ατμόσφαιρα αδρανοποιείται με ροή αζώτου. Ο θερμικός ελεγκτής θερμαίνει τον φούρνο μέσω των δύο θερμικών υποδοχέων με προκαθορισμένο γραμμικό ρυθμό που έχει επιλεγεί από τον ερευνητή. Η εξίσωση της θερμοκρασίας στα δύο καψίδια επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των θερμοζευγών.



Εικόνα 2.2: Βασικά χαρακτηριστικά κυψελίδας ροής θερμότητας.

Μερικά δεδομένα που μπορούν να ληφθούν από αυτή τη μέθοδο χαρακτηρισμού είναι τα ποσοστά και ο βαθμός κρυσταλλικότητας, τα φαινόμενα υαλώδους μετάπτωσης, η θερμοχωρητικότητα και η ενθαλπία των μεταβάσεων, η θερμική αγωγιμότητα του δείγματος, η ταυτοποίησή του και γενικότερα η μελέτη και ο χαρακτηρισμός συμπολυμερών, διαλυμάτων ή μειγμάτων πολυμερικών υλικών. **[61]**

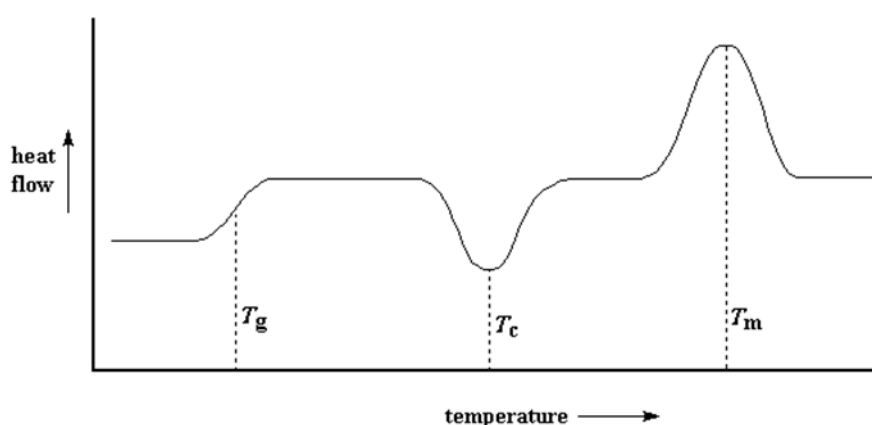
Συνήθως πραγματοποιούνται τυποποιημένες δοκιμές θερμιδομετρίας με σταθερές τιμές σάρωσης, προκειμένου να εξαχθούν δεδομένα όπως η θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης T_g , θερμοκρασία κρυστάλλωσης T_c , θερμοκρασία ψυχρής κρυστάλλωσης T_{cc} , θερμοκρασία τήξης T_m , και οι αντίστοιχες ενθαλπίες κρυστάλλωσης ΔH_c , ψυχρής κρυστάλλωσης ΔH_{cc} , και τήξης ΔH_m . Τέλος μπορεί να προσδιοριστεί και ο βαθμός

κρυσταλλικότητας άμορφων και ημικρυσταλλικών πολυμερών.[60]Για την ορθή κατανόηση των μεταβάσεων φάσης που ανιχνεύονται μέσω της μεθόδου DSC, είναι χρήσιμο να γίνουν κατανοητές οι διαφορές μεταξύ μεταβάσεων πρώτης και δεύτερης τάξης.

Στις μεταβάσεις πρώτης τάξης, η ελεύθερη ενέργεια ως συνάρτηση δεδομένης κατάστασης μεταβλητού όγκου V , πίεσης P και θερμοκρασίας T , είναι συνεχής, ενώ η πρώτη παράγωγος είναι είτε ασυνεχής, είτε βαθμωτή. Οι πρώτης τάξης θερμοδυναμικές ποσότητες εκφράζονται ως η πρώτη παράγωγος της ελεύθερης ενέργειας Gibbs. Συνεπώς, η ενθαλπία H , ο όγκος V και η εντροπία S αποτελούν πρώτης τάξης θερμοδυναμικές ποσότητες. Αν οι παραπάνω θερμοδυναμικές ποσότητες μελετώνται συναρτήσει της θερμοκρασίας εμφανίζουν ασυνέχεια και παρατηρούνται μεταβάσεις όπως η τήξη και η κρυστάλλωση. [61]

Όσον αφορά στις μεταβάσεις δεύτερης τάξης, οι ποσότητες εκφράζονται από τη δεύτερη παράγωγο της ελεύθερης ενέργειας όπως η θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση C_p . Πραγματοποιώντας τη μέτρηση υπό σταθερή πίεση, εξάγεται η διαφορική θερμότητα dQ που απαιτείται για την αύξηση της θερμοκρασίας του εξεταζόμενου δείγματος κατά μία διαφορική θερμοκρασία dT . Με τον τρόπο αυτό εκφράζεται η προαναφερθείσα θερμοχωρητικότητα.

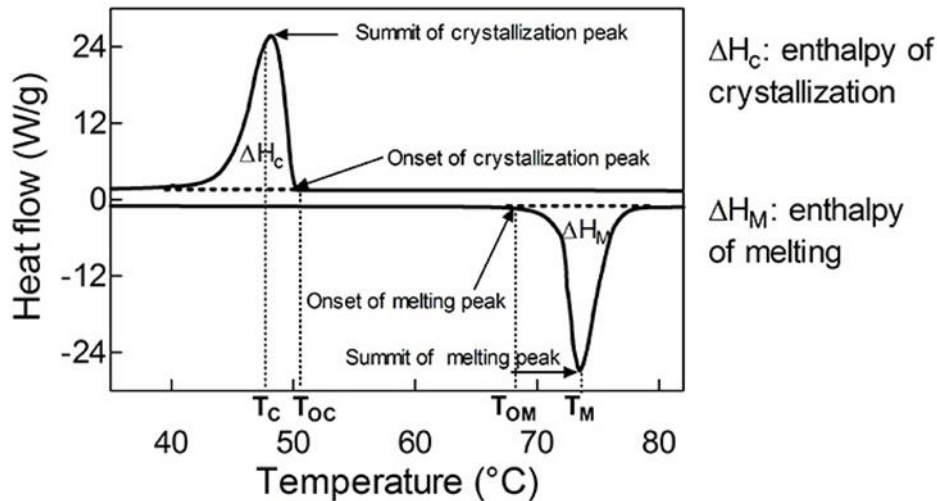
Κατά τη διάρκεια μια μετάβασης πρώτης τάξης, και ενώ εκτελείται θερμοκρασιακή σάρωση, στο δείγμα εμφανίζεται κορυφή και η περιοχή (εμβαδόν) που βρίσκεται άνωθεν ή κάτωθεν αυτής, είναι η ενθαλπία που σχετίζεται με τη συγκεκριμένη μετάβαση. Οι δεύτερης τάξης μεταβάσεις εμφανίζονται ως αλλαγή στην κλίση του διαγράμματος ή ως βήμα.



Εικόνα 2.3: Τυπικό θερμογράφημα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι θερμικές μεταπτώσεις πραγματοποιούνται σε μια περιοχή θερμοκρασιών και όχι σε συγκεκριμένη τιμή. Κατά την εμφάνιση μεταβάσεων επιλέγεται συνήθως είτε η μέγιστη ή ελάχιστη τιμή της κορυφής όταν

πρόκειται για πρώτης τάξης μεταβάσεις, όπως η θερμοκρασία τήξης και κρυστάλλωσης, είτε το μέσο της μετάβασης όταν πρόκειται για τιμές υαλώδους μετάπτωσης.

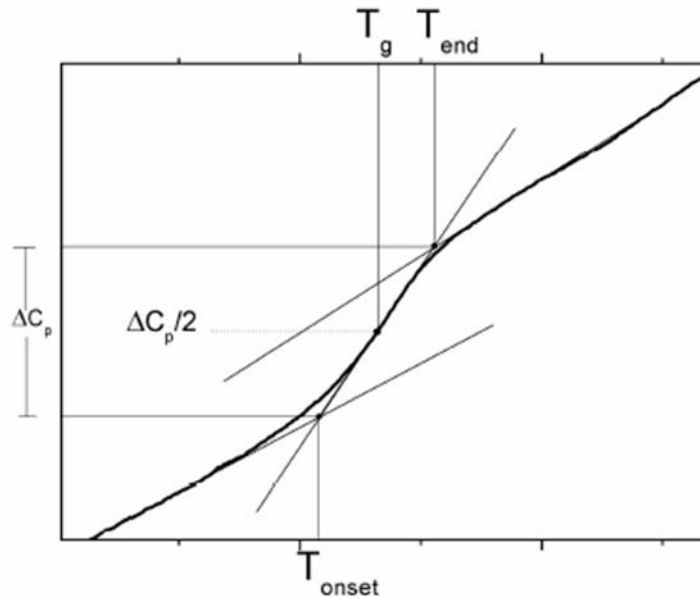


Εικόνα 2.4: Θερμογράφημα DSC σε υλικό στο οποίο παρατηρείται κρυστάλλωση και τήξη. [62]

Υπολογισμός Θερμοκρασίας Υαλώδους Μετάβασης

Η υαλώδης μετάβαση (ή μετάπτωση) καταγράφεται ως μία μεταβολή στη θερμοχωρητικότητα του υλικού, επομένως ο υπολογισμός της θερμοκρασίας στην οποία παρατηρείται είναι έμμεσος. Συγκεκριμένα, βασίστηκε στη μέθοδο υπολογισμού που παρείχε το λογισμικό του υπολογιστή το οποίο και ήταν υπεύθυνο για την κατάρτιση του πρωτοκόλλου της θερμιδομετρικής μέτρησης.

Η εν λόγω μέθοδος ορίζει τη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης, ως τη θερμοκρασία στην οποία η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας, ΔC_p , ισούται με το ήμισυ της συνολικής μεταβολής. Η συνολική ΔC_p ορίζεται ως η παρέκταση των σημείων διέλευσης των εφαπτόμενων της πειραματικής καμπύλης σε θερμοκρασίες χαμηλότερες και υψηλότερες από την T_g , όπου οι γραμμικές περιοχές κυριαρχούν με την εφαπτόμενη στο σημείο καμπής προς στον άξονα y. Εξάλλου, η παρέκταση των σημείων διέλευσης προς τον άξονα x, υποδηλώνουν τις θερμοκρασίες έναρξης (T_{onset}) και λήξης (T_{end}) της μετάβασης. [63]



Εικόνα 2.5: Υπολογισμός θερμοκρασίας υαλώδους μετάβασης, T_g , σε θερμογράφημα DSC.

Ανάλυση κορυφών τήξης και κρυστάλλωσης

Τα φαινόμενα τήξης και κρυστάλλωσης, γίνονται αντιληπτά μέσω κορυφών που αποτυπώνονται στο θερμογράφημα του DSC. Οι χαρακτηριστικές θερμοκρασίες τήξης, T_m και κρυστάλλωσης, T_c είναι δυνατό να υπολογιστούν. Επιπλέον οι αντίστοιχες ενθαλπίες ΔH_m και ΔH_c , μπορούν να υπολογιστούν μέσω του εμβαδού που περικλείουν οι κορυφές των φαινομένων.

Ο βαθμός κρυσταλλικότητας, χ_c , ενός πολυμερούς μπορεί να υπολογιστεί μέσω της σχέσης:

$$\chi_c = \frac{\Delta H}{\Delta H_{100\%}}$$

όπου είναι η μετρούμενη ενθαλπία τήξης και η ενθαλπία τήξης του καθαρού κρυσταλλικού πολυμερούς.

2.1.1 Διάταξη DSC

Το Ερευνητικό Εργαστήριο Θερμικής Ανάλυσης του Τομέα Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, ΕΜΠ διαθέτει δύο πειραματικές διατάξεις DSC: α) την Pyris και β) την Q200. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, για τις μετρήσεις των υδρογελών καθαρού υαλουρονικού οξέος, καθαρής

ζελατίνης και των μιγμάτων τους, χρησιμοποιήθηκε η διάταξη Q200 της εταιρίας Thermal Analysis που χρησιμοποιεί την τεχνολογία Tzero.

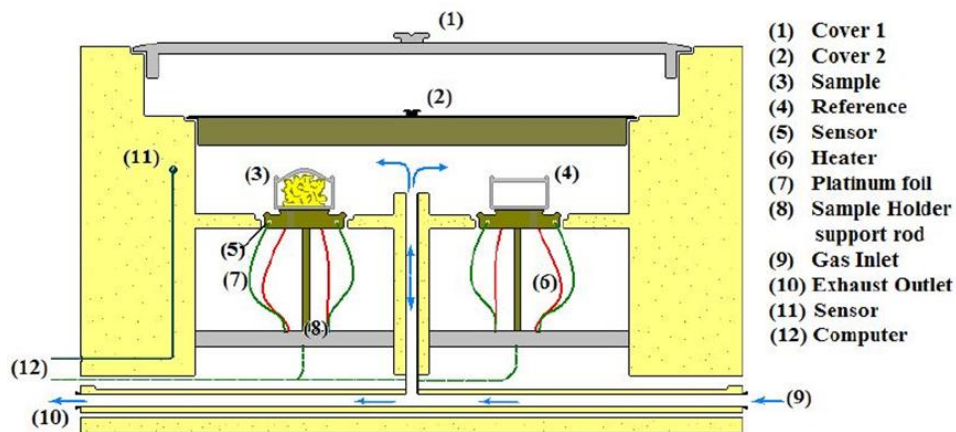


Εικόνα 2.6: Η διάταξη Q200 DSC του ερευνητικού εργαστηρίου θερμικής ανάλυσης. [64]

Η πειραματική διάταξη αποτελείται από:

- τη συσκευή Q200 DSC που περιέχει αισθητήρες ακριβείας 0.1%. Το θερμοκρασιακό εύρος της κυμαίνεται μεταξύ $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $725\text{ }^{\circ}\text{C}$, ανάλογα με το σύστημα ψύξης που χρησιμοποιείται.
- τον ηλεκτρονικό υπολογιστή με το λογισμικό Universal Analysis 2000, που εκτελεί τον έλεγχο του συστήματος, τη λήψη και την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων.
- το σύστημα ψύξης υγρού αζώτου (Liquid Nitrogen Cooling System, LNCS) της TA Instruments με χαμηλότερη θερμοκρασία τους $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$, υψηλότερη τους $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ και μέγιστη ψυκτική ικανότητα 140 K/min .
- παροχή αερίου αζώτου ή ηλίου ανάλογα με το εκάστοτε πρωτόκολλο μέτρησης.

Το σύστημα Tzero είναι πιο ακριβές για τη μέτρηση ροής θερμότητας, γιατί ενσωματώνει τη θερμική αντίσταση των καψιδίων και τα χαρακτηριστικά της θερμοχωρητικότητας τους που παλιότερα θεωρούνταν αμελητέα. Η ένταξη αυτών βελτιώνει την εκτίμηση του υποβάθρου, ώστε να μη χρειάζεται η ξεχωριστή μέτρηση του και η αφαίρεση του από τις τελικές μετρήσεις.



Εικόνα 2.7: Σχηματική απεικόνιση εσωτερικού κυψελίδας του Q200 DSC. [65]

2.2 Διηλεκτρική Φασματοσκοπία Εναλλασσόμενου Πεδίου (DRS)

Μηχανισμοί Πόλωσης

Ένα υλικό μπορεί να αναπτύξει αρκετούς διηλεκτρικούς μηχανισμούς, που συμβάλλουν στη διαμόρφωση της μιγαδικής του επιτρεπτότητας. Όλοι οι μηχανισμοί πόλωσης των υλικών αποτελούν τη φυσική αιτία των διηλεκτρικών ιδιοτήτων και της εξάρτησής τους από τη συχνότητα του εφαρμοζόμενου πεδίου. Υπάρχουν διαφόρων ειδών μηχανισμοί πόλωσης, οι κυριότεροι εκ των οποίων είναι ο ηλεκτρονιακός, ο ιοντικός, ο διπολικός και ο διεπιφανειακός. Επειδή η πόλωση περιλαμβάνει κίνηση φορτίων, απαιτεί ένα πεπερασμένο χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθεί. Επομένως, για κάθε διηλεκτρικό μηχανισμό, υπάρχει ένα όριο συχνότητας, πάνω από το οποίο η πόλωση δεν είναι δυνατό να «παρακολουθήσει» τις μεταβολές του πεδίου.

- **Ηλεκτρονιακή Πόλωση**

Όλα τα υλικά αποτελούνται από πυρήνες ατόμων, περιβαλλόμενους από ηλεκτρονιακά νέφη. Τα ηλεκτρόνια είναι πολύ ευκίνητα και χαρακτηρίζονται από μικρή ενεργό μάζα, με αποτέλεσμα να αντιδρούν γρήγορα στις αλλαγές του πεδίου. Συγκεκριμένα, μπορούν να ακολουθήσουν τις πεδιακές αλλαγές ακόμα και σε οπτικές συχνότητες της τάξης των $10^{15} - 10^{16}$ Hz. Είναι ουσιαστικά η συνεισφορά στη διπολική ροπή λόγω της παραμόρφωσης των ηλεκτρονιακών φλοιών, εξαιτίας του πεδίου και είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας.

- **Ιοντική Πόλωση**

Το συγκεκριμένο είδος πόλωσης παρατηρείται σε κρυσταλλικά υλικά που αποτελούνται από θετικά και αρνητικά ιόντα. Τα ιόντα αυτά δε διαχωρίζονται από ασθενή πεδία ή χαμηλές θερμοκρασίες, μπορούν εντούτοις να υποστούν μικρές

ελαστικές μετατοπίσεις γύρω από τη θέση ισορροπίας τους και να σχηματίσουν δίπολα. Λόγω της μεγαλύτερης μάζας των ιόντων έναντι των ηλεκτρονίων, η πόλωση μπορεί να «ακολουθήσει» το πεδίο μέχρι τις υπέρυθρες συχνότητες ($10^{12} - 10^{13}$ Hz) που είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με τις συχνότητες ταλάντωσης του κρυσταλλικού πλέγματος.

- **Πόλωση Προσανατολισμού ή Διπολική Πόλωση**

Αναφέρεται σε υλικά που περιέχουν μόρια με μόνιμες διπολικές ροπές, με προσανατολισμούς στατιστικά ομοιόμορφα κατανεμημένους, λόγω δράσης της θερμικής ενέργειας. Δηλαδή, χωρίς την εφαρμογή εξωτερικού πεδίου, η συνολική πόλωση είναι μηδέν. Ωστόσο, υπό την επιρροή του Η.Π., τα δίπολα προσανατολίζονται μερικώς, οπότε υπάρχει γραμμική εξάρτηση του με το του Η.Π. Είναι αρκετά γρήγορος μηχανισμός και μπορεί να «ακολουθήσει» σε συχνότητες τάξης $10^{11} - 10^{12}$ Hz. Επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, καθώς όσο αυτή αυξάνεται, ο μηχανισμός εξασθενεί.

- **Διεπιφανειακή Πόλωση ή Πόλωση Φορτίων Χώρου**

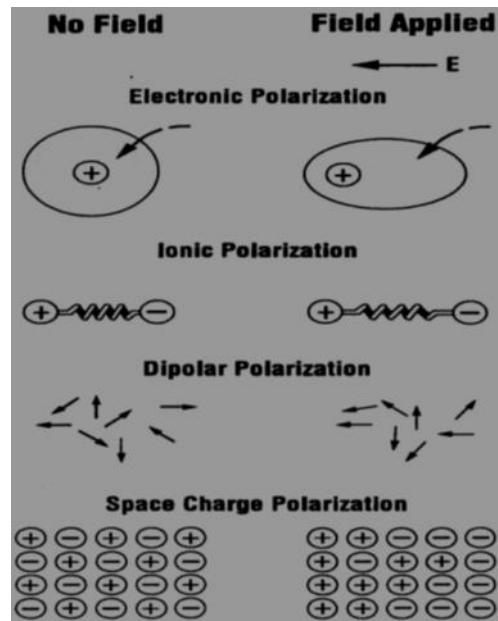
Η ηλεκτρονιακή, η ιοντική και η πόλωση προσανατολισμού παρατηρούνται όταν φορτία είναι δεσμευμένα τοπικά σε άτομα, μόρια ή δομές στερεών ή υγρών. Υπάρχουν ωστόσο επιπλέον φορείς φορτίου εντός του υλικού, ικανοί να μετακινηθούν σε μεγάλη απόσταση, υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Η διεπιφανειακή πόλωση (ή πόλωση φορτίων χώρου) συμβαίνει, όταν η κίνηση των εν λόγω κινούμενων φορτίων εμποδίζεται λόγω παγίδευσής τους στις ενδοεπιφάνειες του υλικού που παρουσιάζει διαφορετικές φάσεις. Η διαταραχή του πεδίου που προκαλείται από τη συσσώρευση των φορτίων αυτών, αυξάνει την ολική χωρητικότητα του υλικού και κατά συνέπεια το πραγματικό μέρος της διηλεκτρικής σταθεράς.

Σε ετερογενή υλικά με ηλεκτρικά αγώγιμες περιοχές, που δεν βρίσκονται σε επαφή μεταξύ τους, (χωρισμένες από μη αγώγιμες περιοχές), εμφανίζεται το φαινόμενο Maxwell – Wagner – Sillars. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, τα φορτία έχουν χρόνο να συσσωρευτούν στα όρια των αγώγιμων περιοχών, προκαλώντας αύξηση της διηλεκτρικής σταθεράς, . Σε υψηλότερες ωστόσο συχνότητες, τα φορτία προλαβαίνουν να συσσωρευτούν και δεν εμφανίζεται πόλωση (οι μετατοπίσεις φορτίων είναι μικρές συγκρινόμενες με τις διαστάσεις των αγώγιμων περιοχών). Αυτό το φαινόμενο είναι συχνά πολύ αργό, έντονα εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία και γενικά αντιληπτό σε συχνότητες μέχρι 1 kHz.

- **Πόλωση λόγω «αλμάτων» φορέων φορτίου (hopping)**

Μεταξύ των διπόλων και των ελεύθερων φορτίων, υπάρχει ένα άλλο είδος φορέων φορτίου που χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι βρίσκονται σε εντοπισμένες

πλεγματικές ή ενδοπλεγματικές θέσεις, όπου υφίστανται μικρές θερμικές ταλαντώσεις. Περιστασιακά, υπερβαίνοντας το φράγμα δυναμικού, μπορούν να μεταβούν με «άλματα» σε γειτονικές θέσεις που βρίσκονται σε απόσταση μίας ή περισσοτέρων πλεγματικών σταθερών. Πρόκειται είτε για μία θερμικώς διεγερόμενη διαδικασία, είτε για μία μετάβαση μέσω του φαινομένου σήραγγας (tunneling transition) που υποβοηθείται από την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου το οποίο μειώνει το φράγμα δυναμικού.



Εικόνα 2.8: Μηχανισμοί Πόλωσης Διηλεκτρικών.

Μία σημαντική παράμετρος σε μικροσκοπικό επίπεδο, είναι ο συντελεστής πόλωσης ή πολωσιμότητα, α , ο οποίος για τα γραμμικά διηλεκτρικά, ορίζεται ως εξής:

$$\vec{P} = a \cdot \vec{E}$$

όπου \vec{P} η συνολική διπολική ροπή που αποκτά ένα άτομο ή μόριο υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου \vec{E} . Η πολωσιμότητα α , εκφράζει την ικανότητα πόλωσης των ατόμων ή μορίων του διηλεκτρικού υλικού. Στα πολυατομικά υλικά η παραπάνω σχέση γράφεται ως εξής:

$$a = \sum \left(\frac{P_i}{E_i} \right)$$

όπου ο δείκτης i αναφέρεται στα διαφορετικά είδη ατόμων.

Ανάλογα με τη δομή των μορίων, τα οποία αποτελούν ένα υλικό, υπάρχουν διάφορα είδη πολωσιμότητας που οδηγούν στις αντίστοιχες διαδικασίες πόλωσης του υλικού που αναφέρθηκαν παραπάνω. [66]

Διηλεκτρικά εντός εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η απόκριση ενός υλικού όταν σε αυτό εφαρμοστεί ένα χρονοεξαρτώμενο ηλεκτρικό πεδίο που μεταβάλλεται αρμονικά με το χρόνο:

$$E(t) = E_o \cos(\omega t)$$

όπου E_o το πλάτος του πεδίου και $\omega = 2\pi f$ η γωνιακή του συχνότητα.

Τα περισσότερα υλικά παρουσιάζουν πάνω από μία ορισμένη συχνότητα (συνήθως μεταξύ 1 MHz και 1 GHz), μια διαφορά φάσης $\delta(\omega)$, μεταξύ του ηλεκτρικού πεδίου και της ηλεκτρικής μετατόπισης. Ισχύει δηλαδή:

$$D(t) = D_o \cos(\omega t - \delta(\omega))$$

Η εξίσωση μπορεί να γραφτεί ως:

$$D(t) = D_o \cos(\delta(\omega)) \cos(\omega t) + D_o \sin(\delta(\omega)) \sin(\omega t)$$

Εισάγοντας:

$$D_o \cos(\delta(\omega)) = \varepsilon'(\omega) \varepsilon_o E_o$$

$$D_o \sin(\delta(\omega)) = \varepsilon''(\omega) \varepsilon_o E_o$$

η ηλεκτρική μετατόπιση μπορεί να εκφραστεί ως:

$$D(t) = \varepsilon'(\omega) \varepsilon_o E_o \cos(\omega t) + \varepsilon''(\omega) \varepsilon_o E_o \sin(\omega t)$$

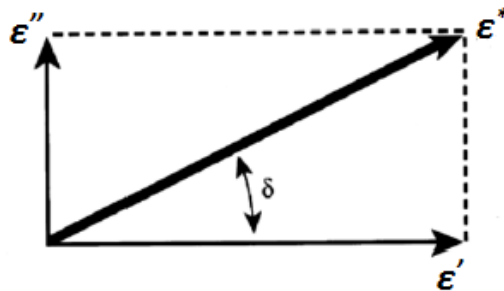
με διαφορά φάσης που θα δίνεται από τη σχέση:

$$\tan(\delta(\omega)) = \frac{\varepsilon''(\omega)}{\varepsilon'(\omega)}$$

Έτσι, η σχέση μεταξύ $D(t)$ και $E(t)$ δεν χαρακτηρίζεται από το πλάτος D_o και τη διαφορά φάσης $\delta(\omega)$, αλλά από το πραγματικό και φανταστικό μέρος της μιγαδικής διηλεκτρικής συνάρτησης:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega)$$

Η σχετική μιγαδική διηλεκτρική σταθερά, είναι ένα αδιάστατο μέγεθος, που συγκρίνει τη μιγαδική διαπερατότητα ϵ ενός υλικού με τη διαπερατότητα του κενού, $\epsilon_0 = 8.85 \cdot 10^{-12} \text{ F/m}$. Περιγράφει την αλληλεπίδραση ενός υλικού με το ηλεκτρικό πεδίο και αποτελείται από το πραγματικό μέρος, ϵ' , που αντιπροσωπεύει την αποθήκευση φορτίου και το φανταστικό μέρος, ϵ'' , που εκφράζει τις απώλειες. Το πραγματικό μέρος είναι ένα μέτρο για την ποσότητα της ηλεκτρικής ενέργειας που αποθηκεύεται από το εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο στο υλικό και συχνά αναφέρεται ως «διηλεκτρική σταθερά». Το φανταστικό μέρος είναι ένα μέτρο για το πόσες απώλειες εμφανίζει το υλικό υπό την επίδραση του πεδίου. Σύμφωνα με τη θεωρία $\epsilon' > 1$ και $\epsilon'' > 0$ αλλά $\epsilon'' < \epsilon'$. Σχεδιάζοντας τη μιγαδική σχετική διηλεκτρική σταθερά σε ένα ανυσματικό διάγραμμα, το πραγματικό μέρος έχει διαφορά φάσης 90° από το φανταστικό. **[67]** Το ανυσματικό τους άθροισμα σχηματίζει γωνία δ με τον πραγματικό άξονα ϵ' .



Εικόνα 2.9: Ανυσματική απεικόνιση πραγματικού και φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής συνάρτησης.

Ο λόγος $\tan \delta$ ονομάζεται συντελεστής απωλειών (ή εφαπτομένη απωλειών) και είναι ανάλογη του λόγου της ενέργειας που χάνεται προς την αντίστοιχη που αποθηκεύεται σε κάθε κύκλο εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου.

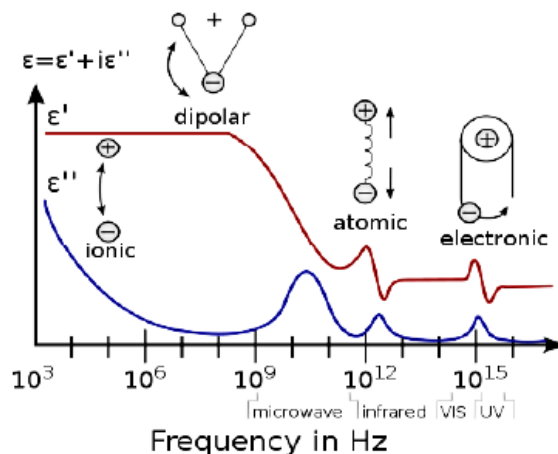
Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η εξέταση της πολωσιμότητας, την οποία επάγει ένα εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Καθένας από τους τύπους πολωσιμότητας είναι συνάρτηση της συχνότητας του εφαρμοζόμενου πεδίου. Όταν η συχνότητα του πεδίου είναι μικρή, όλοι οι τύποι πόλωσης προλαβαίνουν να αποκτήσουν την τιμή που θα είναι αν το πεδίο ήταν συνεχές, με τιμή ίση με τη στιγμιαία τιμή του εναλλασσόμενου πεδίου. Τότε η ολική πολωσιμότητα είναι:

$$\alpha = \alpha_e + \alpha_a + \alpha_\delta + \alpha_{\pi\rho}$$

όπου α_e η ηλεκτρονιακή πολωσιμότητα, α_a η ιοντική, α_δ η διεπιφανειακή πολωσιμότητα και $\alpha_{\pi\rho}$ η πολωσιμότητα προσανατολισμού.

Καθώς όμως η συχνότητα αυξάνει, η πόλωση δεν προλαβαίνει να αποκτήσει τη σταθερή της τιμή. Για παράδειγμα, στην περιοχή συχνοτήτων $10^{10} - 10^{12} \text{ Hz}$, η

πόλωση προσανατολισμού δεν έχει απαιτούμενο χρόνο να αποκτήσει την τιμή ισορροπίας και συνεισφέρει όλο και λιγότερο στην πόλωση. Η συγκεκριμένη πτώση της πολωσιμότητας με την αντίστοιχη πτώση της διηλεκτρικής διαπερατότητας, συνιστά τη διηλεκτρική χαλάρωση. Όταν η συχνότητα του πεδίου αποκτήσει συχνότητες συγκρινόμενες με αυτές της ταλάντωσης των ατόμων στα μόρια, τότε η σ αποκτά την τιμή ισορροπίας της και συνεπώς θα δημιουργηθεί μια καινούρια περιοχή χαλάρωσης. Επομένως, καθένας από τους διηλεκτρικούς μηχανισμούς συνδέεται με μια χαρακτηριστική συχνότητα συντονισμού (απότομη αύξηση της διηλεκτρικής σταθεράς γύρω από τη συχνότητα) ή συχνότητα χαλάρωσης (σταδιακή μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς με την αύξηση της συχνότητας). Καθώς η συχνότητα αυξάνεται, οι πιο αργοί διηλεκτρικοί μηχανισμοί πόλωσης εξαλείφονται, αφήνοντας μόνο τους ταχύτερους να συμβάλλουν στα φαινόμενα αποθήκευσης ενέργειας. Αντίστοιχα, ο συντελεστής απωλειών, $\tan \delta$, αυξάνεται σε κάθε κρίσιμη συχνότητα. Τα φαινόμενα συντονισμού συνήθως συνδέονται με την ηλεκτρονική πόλωση και παρατηρούνται σε υψηλές συχνότητες. Τα φαινόμενα χαλάρωσης αναπτύσσονται κατά την πόλωση των υπόλοιπων τύπων και συνδέονται με τη μετατόπιση ιόντων, διπόλων ή και χωρικών φορτίων στον όγκο του υλικού.



Εικόνα 2.10: Πραγματικό και φανταστικό μέρος της σχετικής διηλεκτρικής σταθεράς.

Μετά την απομάκρυνση του ηλεκτρικού πεδίου, τα δίπολα (μόνιμα και επαγόμενα) τείνουν να επιστρέψουν στην αρχική τους κατάσταση (αρχή διατήρησης ελάχιστης ενέργειας). Ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη διαδικασία καλείται «χρόνος αποκατάστασης» τ και είναι διαφορετικός για κάθε είδος διπόλου. Πρόκειται για μία εκθετική πτώση στην πόλωση του υλικού που ακολουθεί την απομάκρυνση του πεδίου. Επιπλέον, πέραν από τα είδη των διπόλων, τον χρόνο αποκατάστασης επηρεάζει και η θερμοκρασία. Ειδικότερα, αυξανόμενης της θερμοκρασίας του υλικού, αυξάνεται παράλληλα και η κινητική ενέργεια των

διπόλων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα δίπολα να γίνουν πιο ευκίνητα και να ευνοείται ο προσανατολισμός τους με το ηλεκτρικό πεδίο.

Η θερμοκρασιακή εξάρτηση περιγράφεται συνήθως από δύο εξισώσεις:

- Η εξίσωση Arrhenius:

$$\tau = \tau_o \exp\left(-\frac{E_{act}}{kT}\right)$$

όπου τ_o ο προεκθετικός παράγοντας, E_{act} η ενέργεια ενεργοποίησης του μηχανισμού, k η σταθερά του Boltzmann και T η θερμοκρασία. Η εξίσωση Arrhenius υποδηλώνει ότι τα δίπολα θα πρέπει να ξεπεράσουν το ενεργειακό φράγμα E_{act} για να κινηθούν και η κίνησή τους είναι μη-συνεργασιακή, δηλαδή αλληλεπιδρούν αποκλειστικά με το πεδίο και όχι μεταξύ τους.

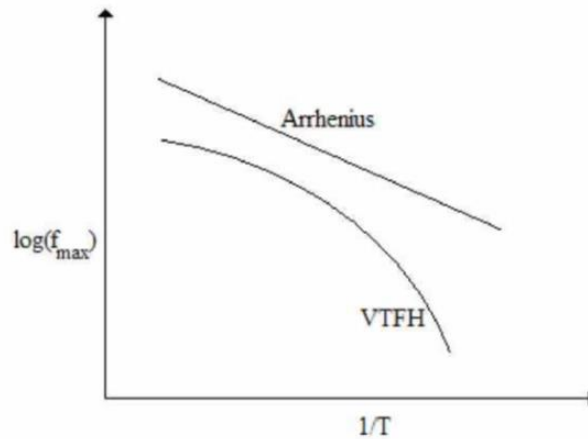
- Η εξίσωση Vogel-Tammann-Fullcher-Hesse (VTFH):

$$\tau = \tau_o \exp\left(-\frac{A}{T - T_o}\right)$$

όπου τ_o ο προεκθετικός παράγοντας, A μία φαινομενολογική παράμετρος και T_o η θερμοκρασία Vogel, στην οποία, ο χρόνος αποκατάστασης γίνεται άπειρος.

Η παρουσίαση των πειραματικών αποτελεσμάτων, με στόχο την ανάδειξη της εξάρτησης του χρόνου αποκατάστασης από τη θερμοκρασία, γίνεται μέσω του διαγράμματος Arrhenius. Στο εν λόγω διάγραμμα, ο οριζόντιος άξονας χαρακτηρίζεται από κλίμακα αντίστροφη της θερμοκρασίας (στη συγκεκριμένη περίπτωση, $1000/T$) και ο κάθετος άξονας περιέχει τον λογάριθμο της συχνότητας μεγιστοποίησης του μηχανισμού χαλάρωσης, $\log(f_{max})$. Η συχνότητα f_{max} είναι η αντίστροφη του χρόνου χαλάρωσης τ . Η σχέση που συνδέει τα δύο μεγέθη είναι:

$$f_{max} = \frac{1}{2\pi\tau}$$



Εικόνα 2.11: Διάγραμμα Arrhenius και VTFH.

Το παραπάνω διάγραμμα προσφέρει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της κίνησης των διπόλων ως συνεργασιακή ή μη-συνεργασιακή, ανάλογα με τη μορφή της καμπύλης. Ο συνεργασιακός μηχανισμός (VTFH), αναγνωρίζεται από μία καμπύλη γραμμή, ενώ ο μη-συνεργασιακός (Arrhenius), από μία ευθεία γραμμή.

2.2.1 Διάταξη DRS

Το Εργαστήριο Διηλεκτρικής Φασματοσκοπίας του Τομέα Φυσικής της σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, ΕΜΠ, διαθέτει μια πειραματική διάταξη DRS που περιλαμβάνει την κυψελίδα μετρήσεων εντός της οποίας τοποθετείται το προς μελέτη υλικό, έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα WinDETA και τα συστήματα Quatro και Alpha Analyzer της Novocontrol.

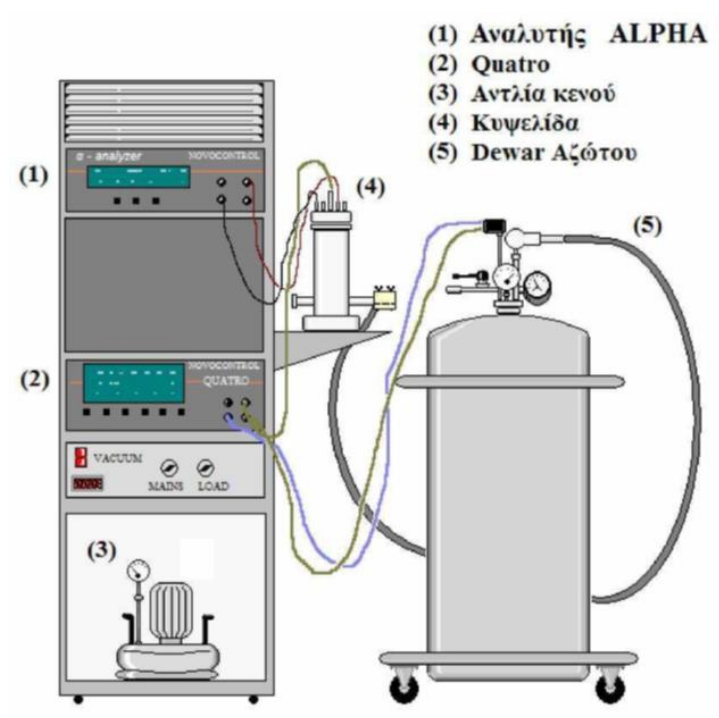
Αναλυτικότερα, η διάταξη αποτελείται από:

- Τον κρυοστάτη για τη διατήρηση των χαμηλών θερμοκρασιών
- Τη μονάδα ψύξης-θέρμανσης αερίου
- Τη μονάδα δημιουργίας διαφοράς πίεσης μεταξύ υγρού αζώτου και κυψελίδας, ώστε οι ψυχροί ατμοί αζώτου να διαχυθούν στο σύστημα μέσω μιας καλά μονωμένης γραμμής μεταφοράς
- Μία αντλία κενού συνδεδεμένη στη μονάδα θέρμανσης αερίου και τον κρυοστάτη
- Dewar υγρού αζώτου
- Γεννήτρια

- Το Quatro system controller που παρακολουθεί τη θερμοκρασία και την πίεση στο dewar και τις θερμοκρασίες δείγματος και αερίου.

Όλα τα παραπάνω συνθέτουν τέσσερα υψηλής ακρίβειας κυκλώματα ελέγχου: θερμοκρασίας δείγματος, θερμοκρασίας αερίου αζώτου, θερμοκρασίας υγρού αζώτου στο dewar και πίεσης εντός του dewar. Δύναται να εκτελέσει μετρήσεις με ράμπας θερμοκρασίας από 0.01 ως 30oC/min, με σταθερότητα θερμοκρασίας 0.01oC, έχει χαμηλή κατανάλωση αζώτου (τυπικά 1l/hr σε $T > -100oC$) και επιτυγχάνει χρόνο σταθεροποίησης μικρότερο από 8min για σταθερότητα 0.1oC.

Τέλος, το πρόγραμμα WinDETA της ίδιας εταιρίας μας επιτρέπει τη δυνατότητα ρύθμισης των παραμέτρων και επιλογής συνθηκών του πειράματος, ενώ παράλληλα εμφανίζει απευθείας διαγράμματα των αποτελεσμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της μέτρησης.



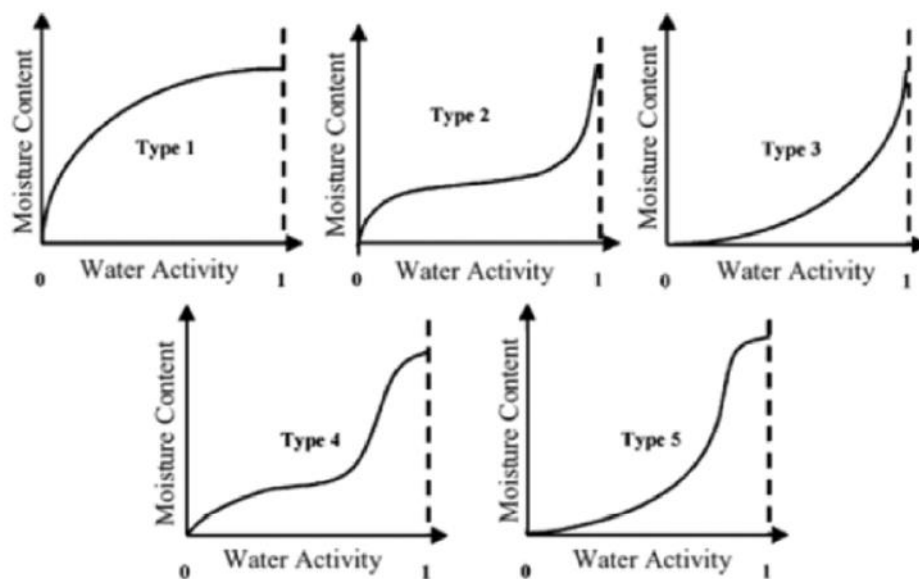
Εικόνα 2.12: Πειραματική διάταξη DRS. [68]

Η μελέτη των διηλεκτρικών ιδιοτήτων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη τεχνολογικών υλικών με προκαθορισμένες επιθυμητές ιδιότητες. Η μέθοδος αυτή παρέχει έμμεσα πληροφορίες για τους μηχανισμούς μοριακής κινητικότητας του υλικού, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στη μελέτη πολύπλοκων δομών και ποικίλων μορφολογιών σε σχέση με τις ιδιότητές του. Είναι επίσης μια μέθοδος ιδιαίτερου οφέλους στο χαρακτηρισμό, την κατασκευή και τον ποιοτικό έλεγχο υλικών που προορίζονται για τεχνολογικές εφαρμογές μικροηλεκτρονικής, ηλεκτρικών μονώσεων, διεπαφών, αισθητήρων, ενεργών

διηλεκτρικών (πιεζοηλεκτρικά και πυροηλεκτρικά υλικά), φαρμακευτικών ουσιών και βιολογικών συστημάτων.

2.3 Ισόθερμες Μετρήσεις Ρόφησης – Διάχυσης Νερού (ESI)

Με τη μέθοδο ισόθερμης υδάτωσης (Equilibrium Sorption Isotherms, ESI) μελετάται η υδροφιλικότητα ενός υλικού σε διάφορα περιβάλλοντα σχετικής υγρασίας. Η μέθοδος στηρίζεται στην καταγραφή ενός μεγέθους (όπως η κατά βάρος συγκέντρωση ή ο αριθμός γραμμομορίων) που εκφράζει την ποσότητα του αναρροφούμενου νερού σε κάποιο υλικό ως συνάρτηση της σχετικής πίεσης των ατμών του νερού που περιβάλλουν το υλικό, δηλαδή της σχετικής υγρασίας (Relative Humidity – RH) ή ενεργότητας του νερού. Η παραπάνω συσχέτιση γίνεται αντιληπτή μέσω των ανάλογων διαγραμμάτων. Τα διαγράμματα αυτά, έχουν ταξινομηθεί με βάση το σχήμα τους και τα είδη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ νερού και στερεού δοκιμίου. [69] Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται οι πέντε τύποι διαγραμμάτων ισόθερμης υδάτωσης.



Εικόνα 2.13: Κατηγοριοποίηση διαγραμμάτων ισόθερμης υδάτωσης. [70]

Το διάγραμμα ισόθερμης υδάτωσης Τύπου 1, παρουσιάζει μια χαρακτηριστική αύξηση του απορροφούμενου νερού πλησιάζοντας μια μέγιστη τιμή και περιγράφει τη διαδικασία προσρόφησης σε μικροπορώδη υλικά, με βάση τη θεωρία Langmuir. Σύμφωνα με την εν λόγω θεωρία, όλα τα διαθέσιμα σημεία προσρόφησης, είναι ταυτόσημα και το φαινόμενο λαμβάνει χώρα αποκλειστικά σε μονοστρωματικές επιφάνειες μορίων. Τα διαγράμματα Τύπου 2 και 3 λαμβάνουν υπόψη την ύπαρξη πολλαπλών στρωμάτων προσρόφησης και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των

απορροφημένων μορίων και των συστατικών του υλικού. Τέλος, τα διαγράμματα Τύπου 4 και 5 περιγράφουν αντίστοιχα μονοστρωματική και πολυστρωματική προσρόφηση, συνοδευόμενη από διεργασίες τριχοειδής συμπύκνωσης.

Η κατά βάρος υδάτωση ενός υλικού μπορεί να υπολογιστεί μέσω της σχέσης:

$$h_d = \frac{m_{H_2O}}{m_{dry}}$$

όπου m_{H_2O} είναι η μάζα του απορροφημένου νερού και m_{dry} η μάζα του ξηρού δοκιμίου. Η μάζα του νερού που έχει απορροφήσει το δείγμα υπολογίζεται αφαιρώντας τη μάζα του ξηρού από τη μάζα του ενυδατωμένου δείγματος.

Τα μοντέλα ισόθερμης υδάτωσης που έχουν προταθεί προβλέπουν την ποσότητα του νερού που απορροφάται από τα υλικά για συγκεκριμένη σχετική πίεση ατμών λαμβάνοντας υπόψη συχνά και μοντέλα δομής υλικού. Δεν υπάρχει κάποιο μοντέλο που να συμφωνεί με τα πειραματικά δεδομένα για όλες τις τιμές σχετικής υγρασίας, ούτε και για όλα τα υλικά.

Ένα ευρέως αποδεκτό μαθηματικό μοντέλο για την περιγραφή σιγμοειδούς μορφής διαγραμμάτων ισόθερμης προσρόφησης νερού είναι η εξίσωση Brunauer-Emmett-Teller (BET). **[71]** Το πρότυπο της BET δέχεται ότι η επιφάνεια του στερεού αποτελείται από ισοενεργειακές θέσεις προσρόφησης σε κάθε μία από τις οποίες προσροφάται από ένα μόριο αερίου. Η θεωρία της BET περιλαμβάνει τις εξής παραδοχές:

- Τα προσροφημένα μόρια της πρώτης στοιβάδας, αποτελούν καινούριες θέσεις προσρόφησης για το σχηματισμό της επόμενης στοιβάδας κ.ο.κ.
- Οι συνθήκες εξάτμισης-συμπύκνωσης είναι ίδιες καθώς και η μοριακή θερμότητα προσρόφησης είναι ίση με τη θερμότητα συμπύκνωσης του αερίου σε όλες τις στοιβάδες εκτός από την πρώτη.
- Όταν η πίεση του αερίου P γίνει ίση με την τάση ατμών P_0 , το αέριο υγροποιείται στην επιφάνεια του στερεού, δηλαδή ο αριθμός των στρωμάτων γίνεται άπειρος. Η εξίσωση BET συμφωνεί ικανοποιητικά με τις πειραματικές ισόθερμες σε σχετικές πιέσεις από 0,05 έως 0,35.

Η εξίσωση BET εκφράζεται ως:

$$\frac{a_w}{(1-a_w)m} = \frac{1}{w_m C} + \left(\frac{C-1}{w_m C} \right) a_w$$

Η εξίσωση GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) είναι εξίσωση τριών παραμέτρων που ικανοποιεί δεδομένα προσρόφησης σε μεγαλύτερο εύρος σχετικών πιέσεων από την εξίσωση BET και συγκεκριμένα μέχρι $\frac{P}{P_o} \approx 0.9$. Στην περίπτωση της ρόφησης υδρατμών η GAB εκφράζεται ως:

$$w = \frac{CKa_w - w_m}{(1 - Ka_w)(1 - Ka_w + CKa_w)}$$

Στις δύο παραπάνω εξισώσεις, οι όροι αποσαφηνίζονται ως w η περιεκτικότητα σε νερό, a_w η ενεργότητα του νερού, w_m , K και C τρεις ελεύθερες παράμετροι που χαρακτηρίζουν τις ιδιότητες ρόφησης του εκάστοτε υλικού (παράμετροι ρόφησης). [72]Ειδικότερα, η w_m εκφράζει την περιεκτικότητα σε νερό της μονομοριακής στοιβάδας και η παράμετρος K την αναλογία των χημικών δυναμικών των μορίων νερού στο δεύτερο επίπεδο και τα διαδοχικά επίπεδα υδάτωσης (ημιδέσμιο νερό) προς αυτό των υπολοίπων μορίων νερού (συσσωματώματα). Οι παράμετροι K και C παρουσιάζουν θερμοκρασιακή εξάρτηση που περιγράφεται από μια σχέση Arrhenius. Τέλος, η ενεργότητα του νερού, ορίζεται ως:

$$a_w = \frac{P_o}{P} = \frac{RH}{100} \%$$

όπου η σχετική υγρασία.

2.3.1 Διάταξη ESI

Η πειραματική διάταξη του εργαστήριου είναι η VTI-SA+ Vapor Sorption Analyzer της εταιρίας TA Instruments (water and organic vapor sorption isotherms, 15 °C to 100 °C)



Εικόνα 2.14: Πειραματική Διάταξη VTG.



Εικόνα 2.15: Θάλαμος δοκιμίου.

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΑΝΑΛΥΣΗ

3.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Βασικός σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας, είναι η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυμερικών δικτύων των υδρογελών και του νερού που είναι ικανές να απορροφήσουν καθώς και η αναμιξιμότητα της ζελατίνης(Gel) με το υαλουρονικό οξύ(HA). Στη μελέτη αυτή, συνετέλεσαν καταρχάς οι πειραματικές μετρήσεις με τη μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης(DSC), όπου μελετήθηκε η κατηγορία δειγμάτων HA/Gel με μοριακή αναλογία HA 1:1 Tyr.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάφορα περιβάλλοντα σχετικής υγρασίας, ούτως ώστε να μελετηθεί η συμπεριφορά τους ανάλογα με τα ποσοστά απορροφημένου νερού. Πρόκειται ουσιαστικά για μία προσομοίωση των διαφορετικών ιστών που οι υδρογέλες ενδέχεται να «συναντήσουν» όταν εμφυτευθούν στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι ιστοί αποτελούνται κυρίως από ένα μίγμα νερού και αλάτων με ποσοότητες που κυμαίνονται ανάλογα με το είδος του εκάστοτε ιστού. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε τέσσερις καταστάσεις σχετικής υγρασίας: 0%, 65%, 85% και 98%.

Για τα δείγματα που βρέθηκαν σε περιβάλλον 0% σχετικής υγρασίας (Dry), εφαρμόστηκε το εξής πρωτόκολλο μέτρησης:

- Ψύξη από τους 20 °C μέχρι τους -150 °C με ρυθμό 10 K/min και παραμονή για 1 λεπτό.
- Θέρμανση από τους -150 °C μέχρι τους +130 °C με ρυθμό 10 K/min και παραμονή για 1 λεπτό.

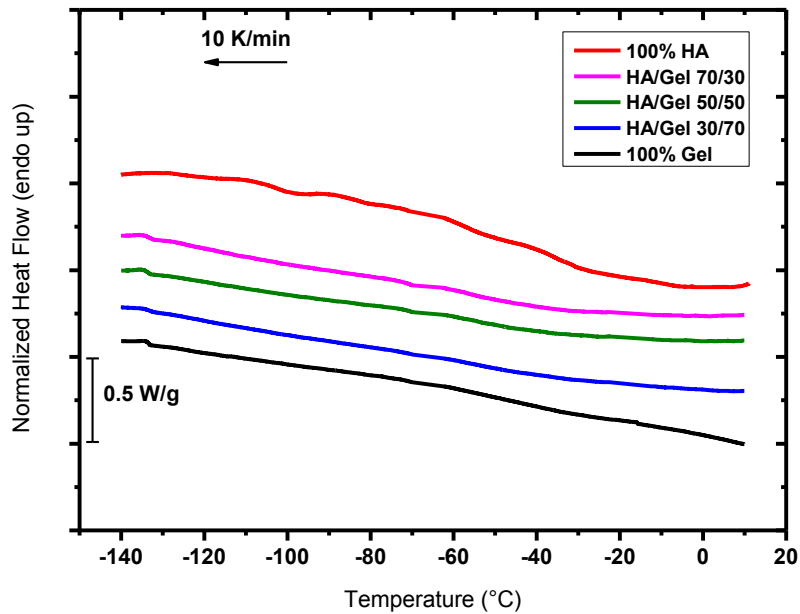
Για τα δείγματα που βρέθηκαν σε περιβάλλον 65%, 85% και 98% σχετικής υγρασίας (65% RH, 85% RH, 98% RH), εφαρμόστηκε το εξής πρωτόκολλο μέτρησης:

- Ψύξη από τους 20 °C μέχρι τους -150 °C με ρυθμό 10 K/min και παραμονή για 1 λεπτό (1^η ψύξη).
- Θέρμανση από τους -150 °C μέχρι τους +130 °C με ρυθμό 10 K/min και παραμονή για 1 λεπτό (1^η θέρμανση).
- Ψύξη από τους +130 °C μέχρι τους -150 °C με ρυθμό 10 K/min και παραμονή για 1 λεπτό (2^η ψύξη).
- Θέρμανση από τους -150 °C μέχρι τους +130 °C με ρυθμό 10 K/min και παραμονή για 1 λεπτό (2^η θέρμανση).

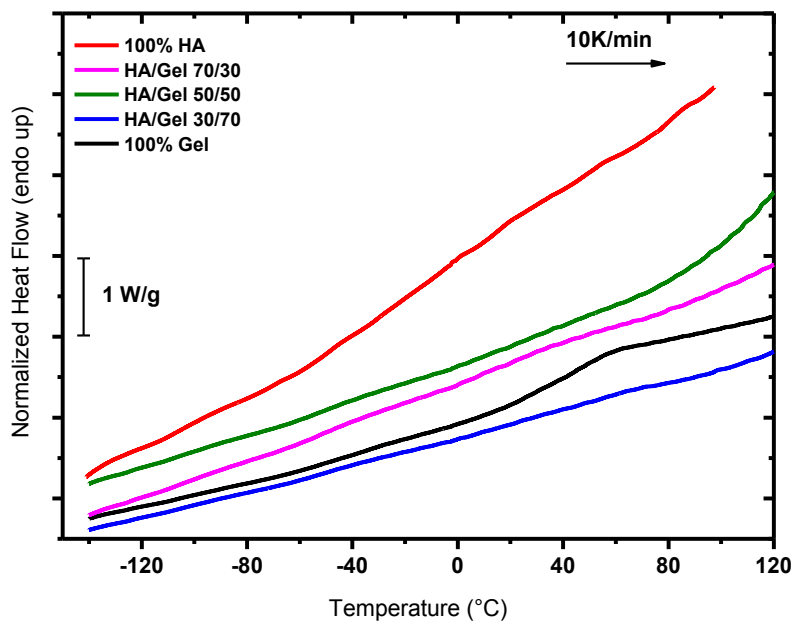
Η ανάλυση των θερμογραφημάτων που ακολουθούν έγινε με τη χρήση του λογισμικού TA Universal Analysis. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την

κανονικοποιημένη ροή θερμότητας (ροή θερμότητας διαιρεμένη με τη μάζα του εκάστοτε δείγματος) συναρτήσει της θερμοκρασίας.

- ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ DRY (0% RH) ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ.



Σχήμα 3.1: Διάγραμμα ψύξης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον μηδενικής υγρασίας.



Σχήμα 3.2: Διάγραμμα θέρμανσης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον μηδενικής υγρασίας.

Εξαιτίας της ακαμψίας των πολυμερικών του αλυσίδων, το υαλουρονικό οξύ δεν παρουσιάζει υαλώδη μετάπτωση όταν βρίσκεται σε ξηρή κατάσταση. [73] Ωστόσο, παρατηρώντας το διάγραμμα ψύξης, διαπιστώνουμε πως η υδρογέλη που αποτελείται εξολοκλήρου από υαλουρονικό οξύ παρουσιάζει την εν λόγω αλλαγή φάσης. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί από το γεγονός ότι το περιβάλλον ξήρανσης που δημιουργήθηκε με τη χρήση του πεντοξειδίου του φωσφόρου (P_2O_5) δεν ήταν πλήρως αποτελεσματικό, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα στην υδρογέλη του 100% HA να απορροφήσει ελάχιστη, αν και επαρκή ποσότητα νερού, ικανή να πλαστικοποιήσει τις αλυσίδες του HA, οδηγώντας στην εμφάνιση υαλώδους μετάπτωσης σε θερμοκρασία -48.5 °C. Εξάλλου, η υψηλή υδροφιλικότητα του HA, δεν μπορεί να αποκλείσει το ενδεχόμενο το εν λόγω δείγμα να απορρόφησε νερό κατά τη διαδικασία τοποθέτησής του στο καψίδιο μέτρησης. Η ζελατίνη, 100% Gel, παρουσιάζει υαλώδη μετάπτωση σε θερμοκρασία 43 °C.

Στη συγκεκριμένη σχετική υγρασία, παρατηρήθηκαν υαλώδης μεταπτώσεις μόνο στις υδρογέλες που αποτελούνταν από τα καθαρά συστατικά και όχι τα μίγματα. Παρακάτω, παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες υαλώδης μετάβασης, T_g , και οι αντίστοιχες μεταβολές της θερμοχωρητικότητας, ΔC_p , των δύο καθαρών ουσιών.

Δείγματα	T_g (°C)	ΔC_p (J/gK)
HA/Gel		
100/0	-48.5	0.36
0/100	43	0.33

Πίνακας 3.1: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, T_g , και μεταβολή θερμοχωρητικότητας, ΔC_p , των δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον μηδενικής σχετικής υγρασίας.

Όταν ένα ομογενές μίγμα διαφορετικών πολυμερών συντεθεί, παρατηρείται μία ξεκάθαρη υαλώδη μετάπτωση σε θερμοκρασία ενδιάμεση των αντίστοιχων θερμοκρασιών των καθαρών ουσιών. Όταν πρόκειται για μίγματα με ξεκάθαρο διαχωρισμό φάσης, με περιοχές μεγαλύτερες από το ελάχιστο μέγεθος που χρειάζεται για συνεργατική κίνηση, παρατηρούνται δύο μεταπτώσεις σε παρόμοιες θερμοκρασίες με τις καθарές ουσίες. Όταν τα μίγματα παρουσιάζουν μερικό διαχωρισμό φάσεων, τότε οι δύο μεταπτώσεις, προκύπτουν σε θερμοκρασίες ανάμεσα σε αυτές των αντίστοιχων καθαρών ουσιών. [54] [74] [75]

Στην παρούσα περίπτωση, οι υαλώδεις μεταπτώσεις στα μίγματα απουσιάζουν, γεγονός που ωθεί στο συμπέρασμα ότι οι δύο ουσίες επιδεικνύουν αξιοσημείωτη αναμιξιμότητα. Ο συλλογισμός αυτός, μπορεί να βασιστεί στην ακαμψία των αλυσίδων του HA σε επίπεδα μηδενικής υγρασίας, οι οποίες περιορίζουν την κινητικότητα των αναμεμιγμένων περιοχών των δύο ουσιών.

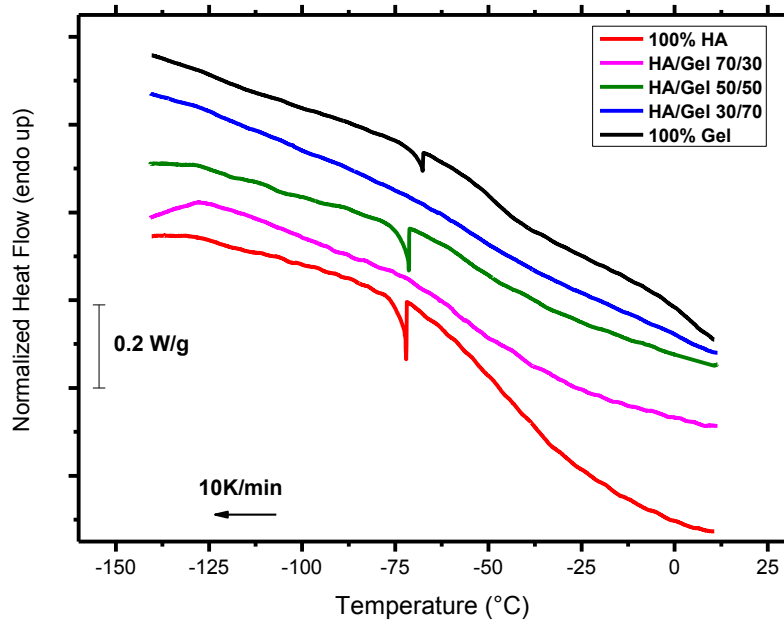
Επιπλέον, δεν παρατηρείται κρυστάλλωση ή τήξη σε κανένα από τα δείγματα, το οποίο αιτιολογείται από την ξηρή κατάστασή τους, η οποία επέτρεπε μόνο την ανεπαίσθητη παρουσία νερού, ανίκανου να κρυσταλλωθεί.

- **ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ 65% ΣΧΕΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ (65% RH)**

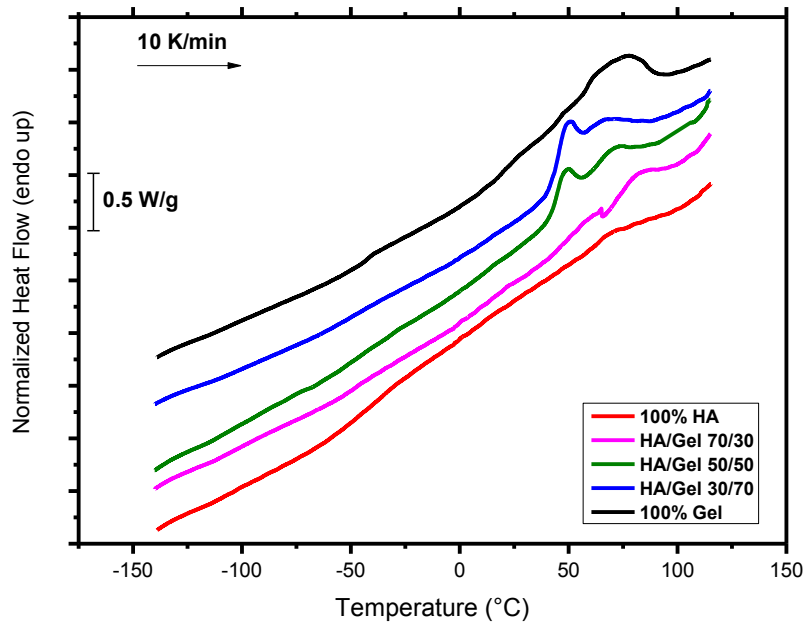
Σειρά δειγμάτων HA/Gel τοποθετήθηκε για 7 ημέρες σε περιβάλλον με 65% σχετική υγρασία. Στη συνέχεια μετρήθηκαν οι επαυξημένες μάζες τους και υπολογίστηκε το ποσοστό νερού σε ισορροπία (EWC ή h_d) και το ποσοστό νερού (h_w).

Δείγματα HA/Gel	EWC (%)	h_w (%)
100/0	14.2 ±2.3	12.4 ±1.8
70/30	9.8 ±1.7	8.9 ±1.4
50/50	10.4 ±1.3	9.4 ±1.0
30/70	6.2 ±1.9	5.8 ±1.7
0/100	5.4 ±0.6	5.1 ±0.6

Πίνακας 3.2: Ποσοστό νερού σε ισορροπία (EWC) και ποσοστό νερού (h_w) των δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 65%.

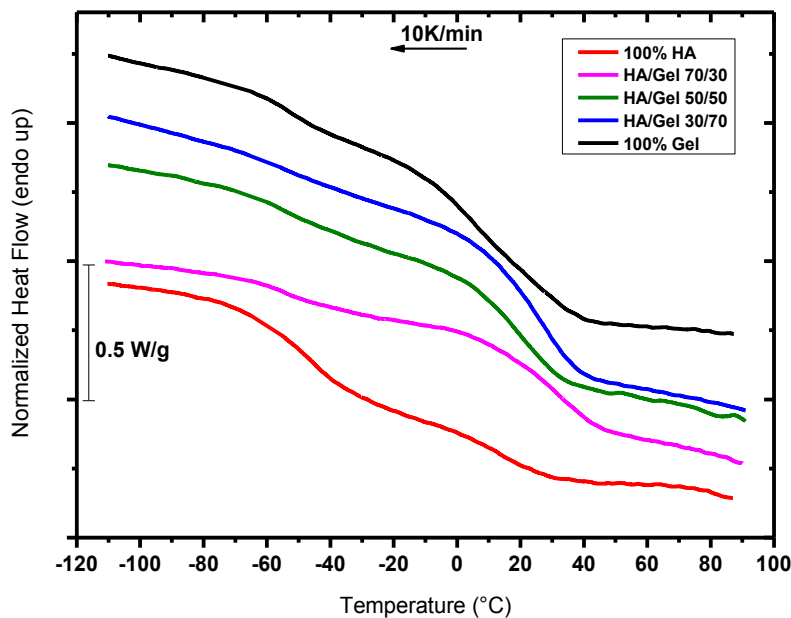


Σχήμα 3.3: Διάγραμμα 1^{ης} ψύξης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 65%.

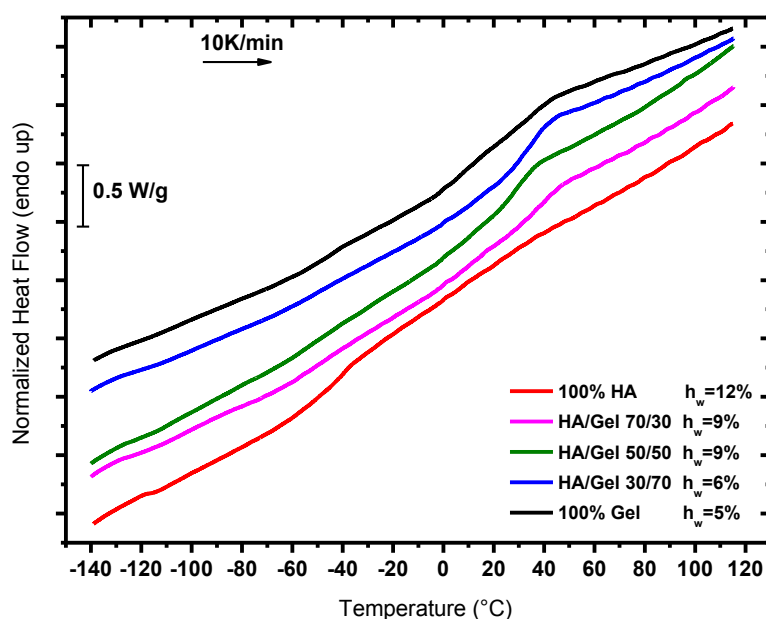


Σχήμα 3.4: Διάγραμμα 1^{ης} θέρμανσης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 65%.

Κατά τον 1^ο κύκλο ψύξης-θέρμανσης και αρχής γενομένης από την ψύξη των δειγμάτων (Σχήμα 3.3), δεν παρατηρείται κάτι το ιδιαίτερο πέραν ορισμένων εξώθερμων κορυφών σε θερμοκρασία -75 °C, οι οποίες ερμηνεύονται ως θόρυβος και αγνοούνται. Κατά τη θέρμανση, όλα τα δείγματα πλην του καθαρού υαλουρονικού οξέος, HA, παρουσιάζουν ενδόθερμη κορυφή σε θερμοκρασία περίπου 60 °C. Η πιθανότερη ερμηνεία της συμπεριφοράς αυτής είναι η εξατμίσση μέρους της ποσότητας νερού που είχαν απορροφήσει τα εν λόγω δείγματα. Επιπλέον, το καθαρό υαλουρονικό οξύ φαίνεται να παρουσιάζει υαλώδη μετάπτωση σε θερμοκρασία -52 °C και μεταβολή θερμοχωρητικότητας $\Delta C_p = 0.13 \text{ J/gK}$. Μοναδική επιφύλαξη για τον ισχυρισμό αυτό, είναι η αμφιβόλου ποιότητας σήματος της γραμμής αναφοράς (baseline).



Σχήμα 3.5: Διάγραμμα 2^{ης} ψύξης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 65%.



Σχήμα 3.6: Διάγραμμα 2^{ης} θέρμανσης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 65%.

Στον 2^ο κύκλο ψύξης-θέρμανσης, παρατηρεί κανείς με ευκρίνεια υαλώδη μετάπτωση σε όλα τα δείγματα (Σχήμα 3.6). Τα μίγματα, παρουσίασαν επίσης και μία επιπλέον, ωστόσο αδύναμη μετάβαση κοντά στην αντίστοιχη του υαλουρονικού οξέος, η οποία ώντας δυσδιάκριτη, δεν υπολογίστηκε από το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε. Παρακάτω, παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες υαλώδους μετάβασης, T_g , και οι αντίστοιχες μεταβολές της θερμοχωρητικότητας, ΔC_p , των υδατωμένων δειγμάτων.

Δείγματα HA/Gel	T_g (°C)	ΔC_p (J/gK)
100/0	-38	0.25
70/30	26	0.28
50/50	29	0.22
30/70	35	0.30
0/100	36	0.38

Πίνακας 3.3: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, T_g , και μεταβολή θερμοχωρητικότητας, ΔC_p , των δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 65%.

Όταν τα δείγματα βρεθούν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας (εδώ 65%), τα μόρια νερού που απορροφώνται προσκολλούνται στις πολυμερικές αλυσίδες και προκαλούν την κίνηση τους. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως «πλαστικοποίηση». Οι αλυσίδες της ζελατίνης συνάπτονται όπως και οι αντίστοιχες του υαλουρονικού οξέος, λόγω της χημικής τους συγγένειας. Προκαλείται έτσι ένας ξεκάθαρος διαχωρισμός φάσης στα μίγματα, οδηγώντας στην ανάδειξη υαλωδών μεταπτώσεων σε περιοχές όπου η ζελατίνη αφθονεί. Αντίθετα, οι περιοχές του υαλουρονικού οξέος εμφανίζουν δυσδιάκριτη πειραματικά μετάπτωση.

Όσον αφορά στα μίγματα, όπως και στα ξηρά δείγματα, έτσι και εδώ, η υαλώδης μετάπτωση από πλευράς υαλουρονικού οξέος είναι δυσδιάκριτη για να υπολογιστεί, καθώς οι άκαμπτες περιοχές της ζελατίνης, περιορίζουν τις αλυσίδες του, εμποδίζοντας την κίνησή τους. Εντούτοις, η μετάπτωση της ζελατίνης είναι ορατή, αφού πλέον οι άκαμπτες αλυσίδες της έχουν χαλαρώσει και αποκτήσει κινητικότητα.

Παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα, διαπιστώνει κανείς, ότι η τιμή της T_g μειώνεται καθώς η ποσότητα του HA στο δείγμα αυξάνεται. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το υαλουρονικό οξύ, ώντας πιο υδρόφιλο από τη ζελατίνη, απορροφά μεγαλύτερη ποσότητα νερού στην ίδια σχετική υγρασία. Η συγκριμένη σχέση μεταξύ T_g και h_w επιβεβαιώνεται ανατρέχοντας στο διάγραμμα φάσεων των πολυμερών (Ενότητα 1.5).

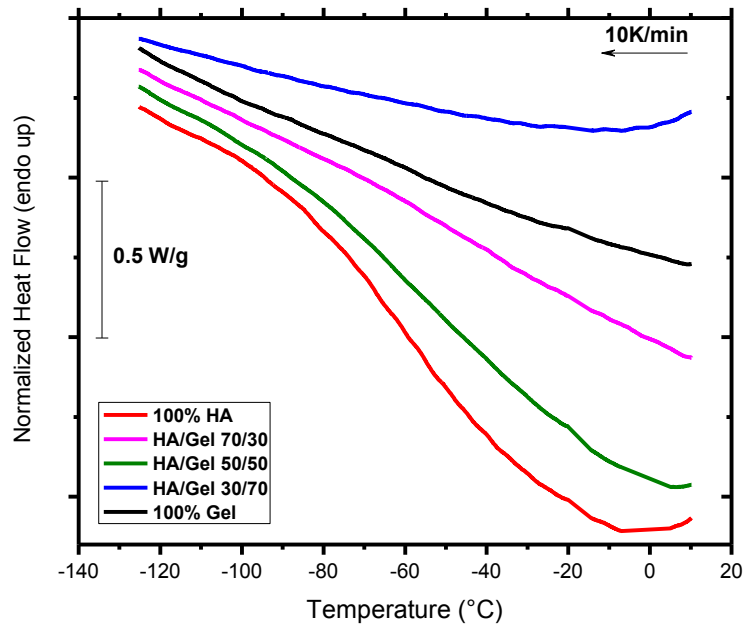
Τέλος, δεν παρατηρήθηκε κρυστάλλωση κατά την ψύξη, ούτε τήξη κατά τη θέρμανση σε κανένα από τα δείγματα. Αυτό οφείλεται σε δύο φαινόμενα. Πρώτον, το νερό που βρίσκεται στην περιοχή της ζελατίνης δεν μπορεί να κρυσταλλωθεί, αφού η T_g είναι μεγαλύτερη από τις αναμενόμενες θερμοκρασίες κρυστάλλωσης του νερού. Δεύτερον, το νερό που βρίσκεται στην περιοχή του υαλουρονικού οξέος δεν είναι ικανό να διαχυθεί από το πολυμερικό δίκτυο της υδρογέλης. Αυτό αποδίδεται πιθανότατα στο υψηλό ιξώδες που προκάλεσαν οι χαμηλές θερμοκρασίες, κοντά στην T_g της φάσης του υαλουρονικού οξέος.

- **ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ 85% ΣΧΕΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ (85% RH)**

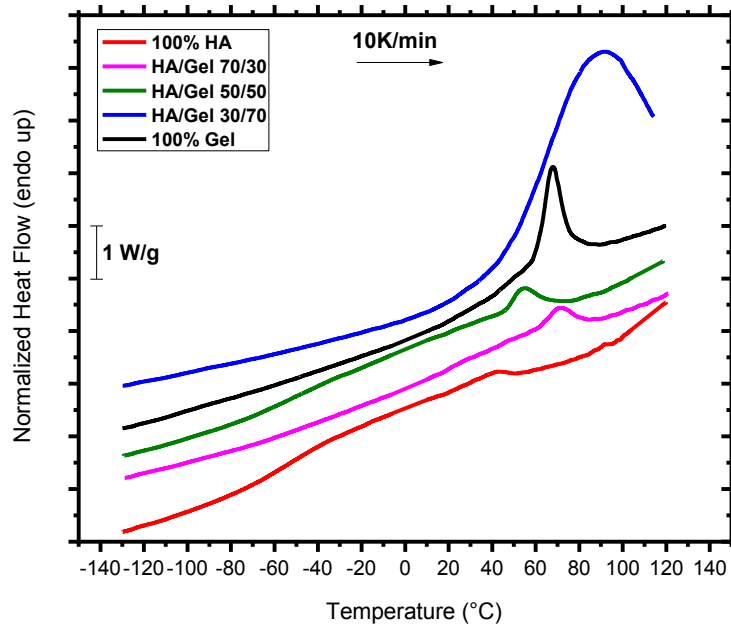
Σειρά δειγμάτων HA/Gel τοποθετήθηκε για 7 ημέρες σε περιβάλλον με 85% σχετική υγρασία. Στη συνέχεια μετρήθηκαν οι επαυξημένες μάζες τους και υπολογίστηκε το ποσοστό νερού σε ισορροπία (EWC ή h_d) και το ποσοστό νερού (h_w).

Δείγματα HA/Gel	EWC (%)	h_w (%)
100/0	29.1 ±5.0	22.4 ±3.0
70/30	19.8 ±7.1	16.3 ±5.12
50/50	20.7 ±1.1	17.1 ±0.78
30/70	15.0 ±5.9	12.9 ±4.6
0/100	8.33 ±5.4	7.5 ±4.7

Πίνακας 3.4: Ποσοστό νερού σε ισορροπία (EWC) και ποσοστό νερού (h_w) των δειγμάτων HA/Gel που βρέθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 85%.

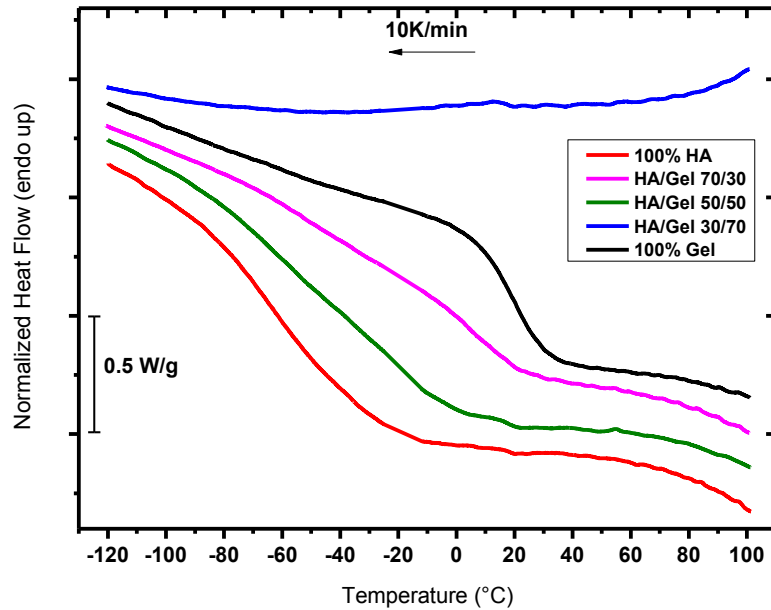


Σχήμα 3.7: Διάγραμμα 1^{ης} ψύξης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 85%.

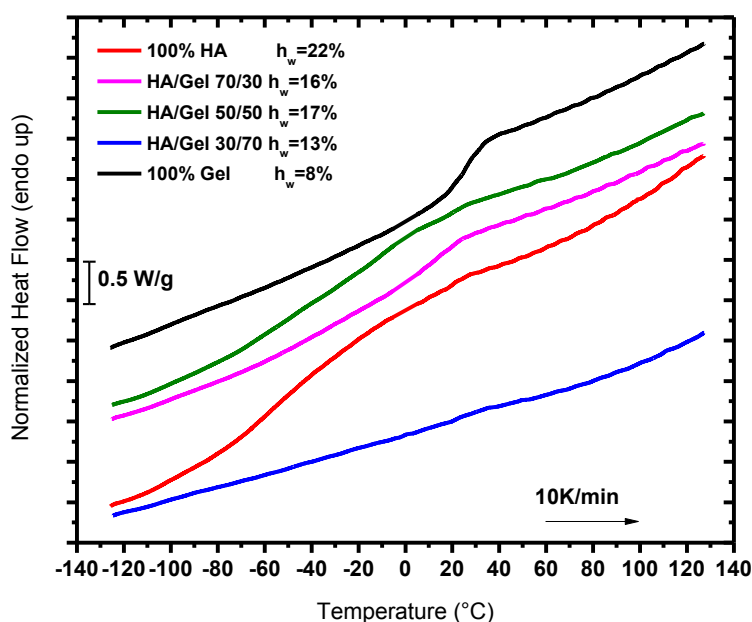


Σχήμα 3.8: Διάγραμμα 1^{ης} θέρμανσης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 85%.

Κατά την 1^η ψύξη (Σχήμα 3.7) δεν παρατηρείται κάτι το αξιοσημείωτο, ενώ δεν εμφανίζονται φαινόμενα κρυστάλλωσης του νερού. Συνεχίζοντας στη θέρμανση (Σχήμα 3.8), όλα τα δείγματα εκτός του ΗΑ, εμφανίζουν ενδόθερμες κορυφές εξάτμισης του νερού, οι οποίες αρχίζουν να εκδηλώνονται σε θερμοκρασία 50 °C. Το ΗΑ, φαίνεται να εμφανίζει υαλώδη μετάπτωση σε θερμοκρασία $T_g = -58$ °C και $\Delta C_p = 0.35$ J/gK.



Σχήμα 3.9: Διάγραμμα 2^{ης} ψύξης DSC της σειράς δειγμάτων ΗΑ/Γελ που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 85%.



Σχήμα 3.10: Διάγραμμα T_g θέρμανσης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 85%.

Στο συγκεκριμένο ποσοστό σχετικής υγρασίας, μπορεί κανείς να παρατηρήσει υαλώδη μετάπτωση σε όλα τα δείγματα HA/Gel με επιφύλαξη στην περίπτωση του δείγματος HA/Gel 30/70. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.10, οι γραμμές αναφοράς στις περιπτώσεις των HA/Gel 50/50 και 100% HA δεν επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων όσον αφορά τις υαλώδεις μεταπτώσεις και τις θερμοκρασίες στις οποίες παρατηρούνται. Επιπλέον, υπάρχει η υποψία ανεπαίσθητου βήματος μετάπτωσης στην περίπτωση του HA/Gel 30/70, σε θερμοκρασία $T_g=22$ °C.

Δείγματα	T_g (°C)	ΔC_p (J/gK)
HA/Gel		
100/0	-58	0.45
70/30	13	0.11
50/50	20	0.09
30/70	22	0.18
0/100	27	0.45

Πίνακας 3.5: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, T_g , και μεταβολή θερμοχωρητικότητας, ΔC_p , των δειγμάτων HA/Gel που βρέθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 85%.

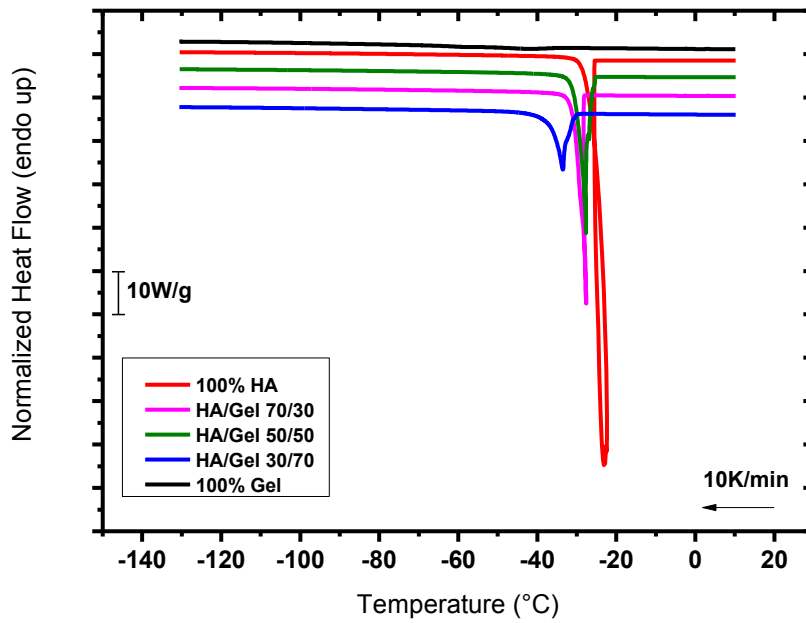
Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις σχετικής υγρασίας, έτσι και εδώ, παρατηρείται υαλώδης μετάπτωση (Σχήμα 3.10) στις υδρογέλες που αποτελούνται από τα καθαρά συστατικά και συγκεκριμένα στις θερμοκρασίες 27 °C για τη ζελατίνη και -58 °C για το υαλουρονικό οξύ. Όσον αφορά στα μίγματα, η χαλάρωση των περιοχών ζελατίνης λόγω της πλαστικοποίησης του νερού, προκάλεσε εμφάνιση της μετάπτωσης σε θερμοκρασίες παραπλήσιες της καθαρής ζελατίνης. Οι εν λόγω τιμές απομακρύνονται από αυτήν της καθαρής ζελατίνης, όσο μειώνεται η ποσότητά της στην υδρογέλη, φαινόμενο που εντοπίστηκε και στην περίπτωση της 65% σχετικής υγρασίας. Η εξήγηση αυτής της συμπεριφοράς, είναι ότι καθώς μειώνεται η ποσότητα ζελατίνης (άρα αυξάνεται αυτή του υαλουρονικού οξέος), η απορροφούμενη ποσότητα νερού αυξάνεται, λόγω αύξησης της υδροφιλικότητας. Η αύξηση του ποσοστού νερού προκαλεί μείωση της T_g , όπως εξηγεί και το διάγραμμα φάσεων των πολυμερών (Ενότητα 1.5). Τέλος, δεν παρατηρήθηκε κρυστάλλωση κατά την ψύξη, ούτε τήξη κατά τη θέρμανση, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το νερό που απορροφήθηκε από τα δείγματα αδυνατεί να κρυσταλλωθεί καθώς δεν μπορεί να μετακινηθεί για να λιώσει ή να κρυσταλλωθεί.

- **ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ 98% ΣΧΕΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ (98% RH)**

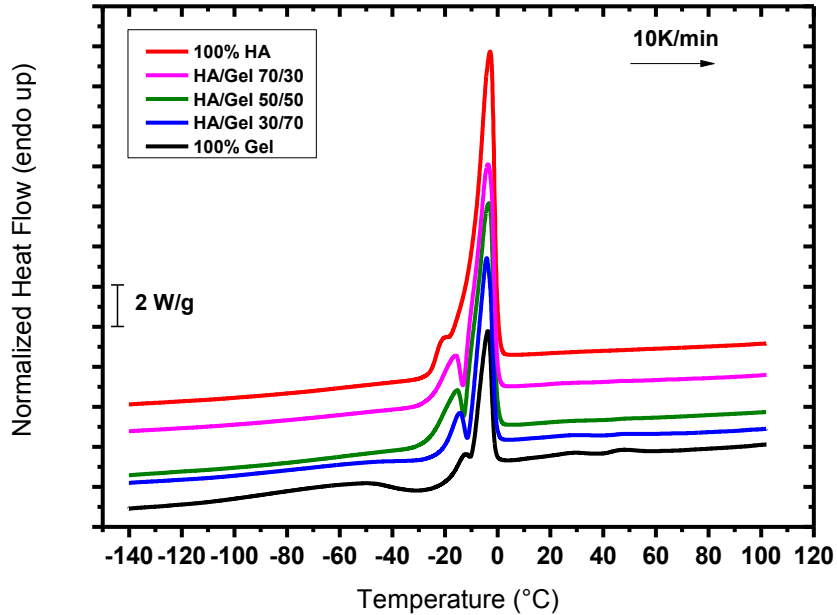
Σειρά δειγμάτων HA/Gel τοποθετήθηκε για 7 ημέρες σε περιβάλλον με 98% σχετική υγρασία. Στη συνέχεια μετρήθηκαν οι επαυξημένες μάζες τους και υπολογίστηκε το ποσοστό νερού σε ισορροπία (EWC ή h_d) και το ποσοστό νερού (h_w).

Δείγματα HA/Gel	EWC (%)	h_w (%)
100/0	193.6 ±7.4	65.6 ±0.8
70/30	140.6 ±9.7	58.4 ±1.7
50/50	121.5 ±11.9	54.8 ±2.5
30/70	98.6 ±7.6	49.6 ±1.9
0/100	59.7 ±7.0	37.3 ±2.8

Πίνακας 3.6: Ποσοστό νερού σε ισορροπία (EWC) και ποσοστό νερού (h_w) των δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.

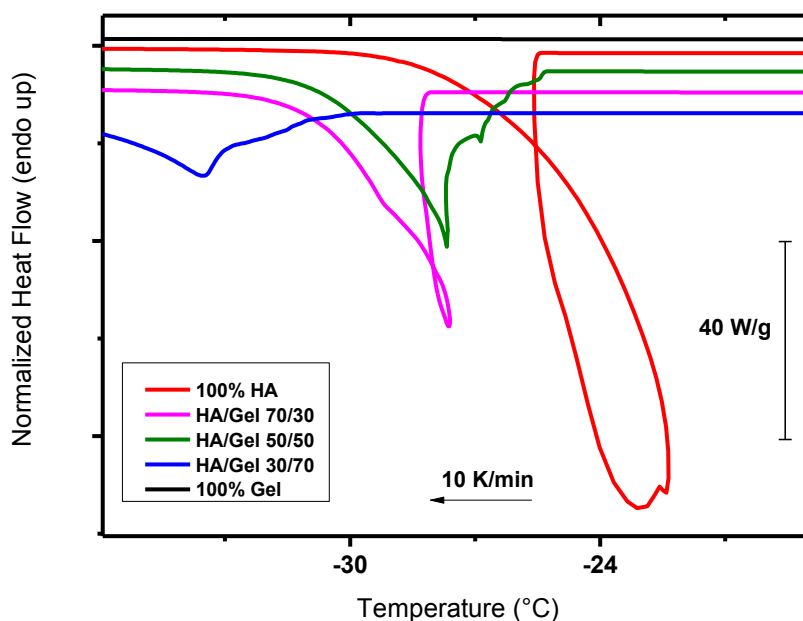


Σχήμα 3.11: Διάγραμμα 1^{ης} ψύξης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.



Σχήμα 3.12: Διάγραμμα 1^{ης} θέρμανσης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.

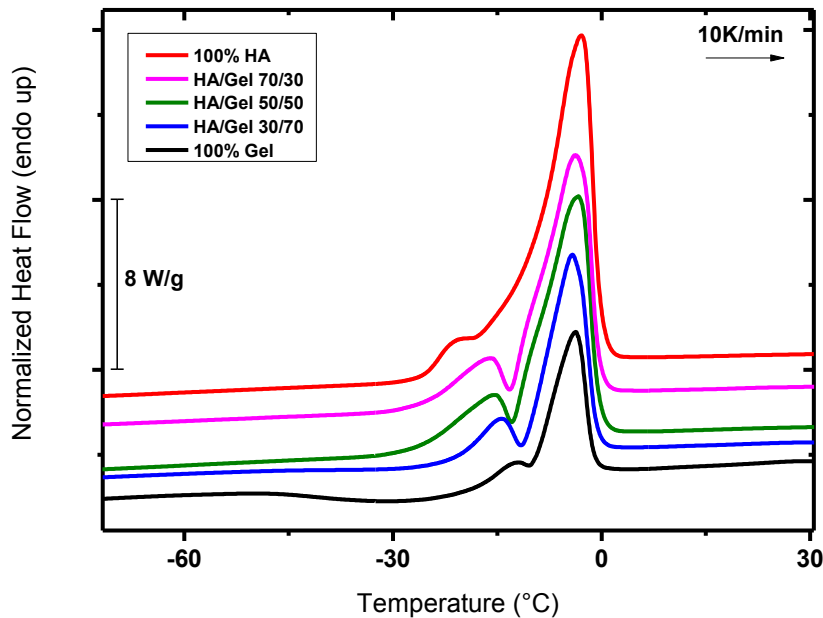
Κατά τον 1^ο κύκλο ψύξης-θέρμανσης των δειγμάτων που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον με σχετική υγρασία 98%, παρουσιάστηκαν φαινόμενα κρυστάλλωσης και τήξης στα δείγματα. Ειδικότερα, κατά την ψύξη (Σχήμα 3.7), σε όλα τα δείγματα πλην της καθαρής ζελατίνης, 100% Gel, παρατηρήθηκε κρυστάλλωση νερού. Επίσης η ένταση του φαινομένου (δηλ. η ποσότητα του νερού που κρυσταλλώθηκε) αυξάνεται, όσο αυξάνεται η ποσότητα του υαλουρονικού οξέος, HA, στη σύσταση των δειγμάτων. Αυτό σημαίνει ότι στα δείγματα που περιέχουν HA, τα μόρια νερού έχουν τη ευχέρεια να μετακινηθούν και να σχηματίσουν κρυστάλλους, δυνατότητα που στερούνται όταν βρίσκονται στην υδρογέλη καθαρής ζελατίνης, λόγω μειωμένης υδροφιλικότητας. Επιπλέον, μελετώντας κανείς προσεκτικότερα τις ψύξεις των δειγμάτων HA/Gel 70/30 και 100% HA, εντοπίζει μία ιδιομορφία στις αντίστοιχες καμπύλες, που οφείλεται στο γεγονός ότι η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι εντόνως εξώθερμη, με αποτέλεσμα, κατά τη διάρκειά της να αυξάνεται η θερμοκρασία.



Σχήμα 3.13: Μεγεθυμένο διάγραμμα 1^{ης} ψύξης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.

Όσον αφορά στη θέρμανση (Σχήμα 3.8), σε όλα τα δείγματα παρατηρούνται διπλές κορυφές τήξης, με την κορυφή που εμφανίζεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία να είναι σημαντικά μικρότερη σε ένταση σε σχέση με αυτήν που ακολουθεί σε υψηλότερη θερμοκρασία. Οι διπλές αυτές κορυφές αποδίδονται στο σχηματισμό δύο διαφορετικών ειδών κρυστάλλων στις υδρογέλες, ανάλογα με το είδος του νερού. Το «δεσμευμένο» νερό (bound water) είναι πιο περιορισμένο και δημιουργεί πάγο κυβικού σχήματος που τήκεται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από τον αντίστοιχο του «ελεύθερου» νερού (bulk water), φαινόμενο στο οποίο αποδίδεται η πρώτη

κορυφή. Αντίθετα, ο εξαγωγικός πάγος που σχηματίζει το «ελεύθερο» νερό, τήκεται περίπου στους 0 °C, γεγονός που αιτιολογεί την ύπαρξη της δεύτερης κορυφής σε ανάλογη θερμοκρασία. [76] [77]



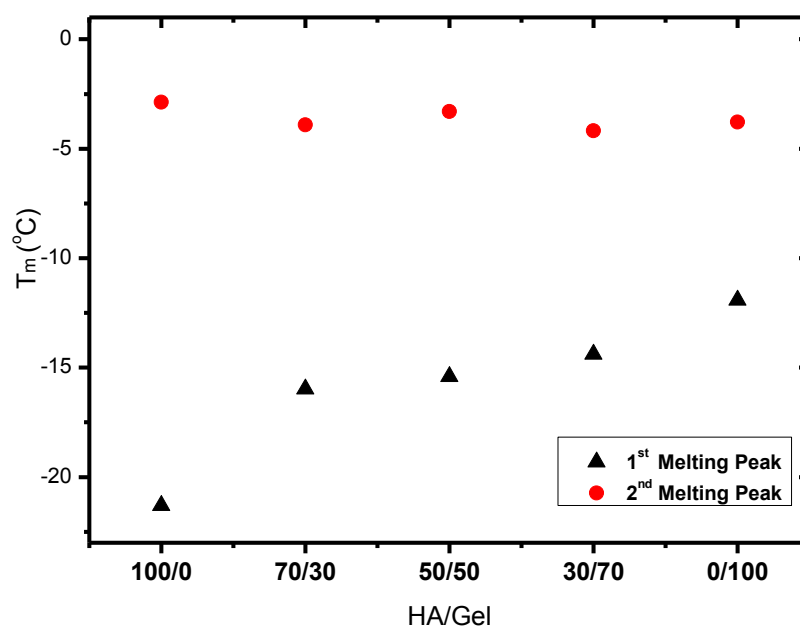
Σχήμα 3.14: Μεγεθυμένο διάγραμμα 1^{ης} θέρμανσης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.

Επιπλέον, στην περίπτωση του δείγματος 100% Gel (κυρίως) και του HA/Gel 30/70 (ανεπαίσθητα), πριν την τήξη εμφανίζεται το φαινόμενο της ψυχρής κρυστάλλωσης (Σχήμα 3.10). Η διαδικασία αυτή, ξεκινά και για τα δύο δείγματα στην θερμοκρασία των -52 °C, η οποία αντιστοιχεί σε αυτήν της υαλώδους μετάπτωσης της καθαρής ζελατίνης.

Δείγματα HA/Gel	1 ^η Τήξη		2 ^η Τήξη		Σύνολο
	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)	ΔH _m (J/g)
100/0	-21	13	-3	134	147
70/30	-16	11	-4	81	92
50/50	-15	10	-3	77	87
30/70	-14	7	-4	53	60
0/100	-12	2	-4	30	32

Πίνακας 3.7: Θερμοκρασίες και ενθαλπίες τήξης της 1^{ης} θέρμανσης DSC των δειγμάτων HA/Gel που βρέθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.

Για να αναλυθεί η συσχέτιση των θερμοκρασιών πρώτης και δεύτερης τήξης με τις συστάσεις των δειγμάτων, δημιουργήθηκε το ανάλογο διάγραμμα. Οι τιμές των θερμοκρασιών δεύτερων κορυφών, υποδηλώνουν μία σχετικά σταθερή συμπεριφορά ανεξαρτήτως της σύστασης δειγμάτων. Αντίθετα, οι τιμές των θερμοκρασιών των πρώτων κορυφών, εμφανίζουν αυξητική συμπεριφορά συναρτήσει της αύξησης της περιεκτικότητας της ζελατίνης στα δείγματα. Η δεύτερη κορυφή αντιστοιχεί στην τήξη του ελεύθερου νερού που έχει σχηματίσει κρυστάλλους, ή του νερού που έχει σχηματίσει μέρος των συστάδων (clusters) στο εσωτερικό των υδρογελών. Οι συγκεκριμένοι κρύσταλλοι δημιουργούνται εύκολα όταν μειώνεται η θερμοκρασία εντός της κυψελίδας μέτρησης του DSC (και όταν αυξάνεται η θερμοκρασία άνω της T_g) και δεν περιορίζονται ιδιαίτερα από το πολυμερικό δίκτυο. Μπορούν επίσης να έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τους αντίστοιχους που τήκονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Τήκονται σε σταθερή θερμοκρασία, ανεξαρτήτως της σύστασης και του σταυροδεσίματος των δικτύων, η οποία και είναι η συνήθης θερμοκρασία τήξης του «ελεύθερου» νερού. Εντούτοις, στην περίπτωση της πρώτης κορυφής, οι κρύσταλλοι, ώντας περισσότερο δεσμευμένοι χωρικά, λιώνουν σε μεγαλύτερη θερμοκρασία όσο η ποσότητα της ζελατίνης στην υδρογέλη αυξάνεται. Αυτό οφείλεται στα δίκτυα που σχηματίζει η ζελατίνη, των οποίων το σταυροδέσιμο είναι ισχυρότερο από το αντίστοιχο αυτών του υαλουρονικού οξέος.



Σχήμα 3.15: Αναπαράσταση των θερμοκρασιών τήξης, T_m , που παρατηρήθηκαν κατά την 1^η θέρμανση DSC συναρτήσει των συστάσεων των δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι η ενθαλπία τήξης και των δύο κορυφών αυξάνεται, καθώς αυξάνεται και η ποσότητα του υαλουρονικού οξέος στο δείγμα. Αυτό οφείλεται στην μεγαλύτερη απορροφητική ικανότητα που διαθέτει το υαλουρονικό οξύ, ώντας σημαντικά πιο υδρόφιλο σε σχέση με τη ζελατίνη. Επομένως, μεγαλύτερη ποσότητα νερού θα κρυσταλλωθεί κατά την ψύξη, άρα και θα λιώσει κατά τη θέρμανση.

Μέσω των καταγεγραμμένων ενθαλπιών τήξης, υπολογίστηκαν τα ποσοστά των διαφορετικών ειδών νερού που βρίσκονταν εντός των υδρογελών. [76] [78] Παρόλο που διευκρινίστηκε προηγουμένως ότι η πρώτη ενδόθερμη κορυφή αντιστοιχεί στην τήξη του δεσμευμένου νερού και η δεύτερη σε αυτή του ελεύθερου νερού, θα πρέπει κανείς να λάβει υπόψη, ότι τα διαφορετικά είδη νερού που είναι παρόντα στο εσωτερικό των υδρογελών, δεν έχουν εντελώς ανεξάρτητη συμπεριφορά. Συνήθως παρατηρείται ένας συνδυασμός των συμπεριφορών αυτών. Οι ποσότητες του νερού, χωρίστηκαν με βάση αυτό σε δύο είδη, το νερό που μπορεί να παγώσει (freezable total water) W_f και το νερό που δεν μπορεί να παγώσει (non-freezable water) W_{nf} . Η διαδικασία υπολογισμού που ακολουθήθηκε, είναι η εξής:

Καταρχάς, είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η συνολική ενθαλπία τήξης, $\Delta H_{m,total}$, αθροίζοντας τις ενθαλπίες τήξης που αντιστοιχούν στις δύο ενδόθερμες κορυφές που παρατηρήθηκαν κατά τη θέρμανση:

$$\Delta H_{m,total} = \Delta H_{m,1} + \Delta H_{m,2}$$

Διαιρώντας τη συνολική ενθαλπία με την ενθαλπία τήξης του νερού υπό κανονικές συνθήκες, $\Delta H_{m,H_2O}^\circ = 333.5 \text{ kJ / kg}$, υπολογίζεται το κλάσμα του νερού που βρίσκεται στο εσωτερικό της υδρογέλης και είναι ικανό να παγώσει, W_f :

$$W_f = \frac{\Delta H_{m,total}}{\Delta H_{m,H_2O}^\circ}$$

Τέλος, χρησιμοποιώντας το W_f , και γνωρίζοντας το κλάσμα νερού του πολυμερούς, h_w , μπορεί κανείς να υπολογίσει το κλάσμα νερού που δεν μπορεί να παγώσει στο εσωτερικό της υδρογέλης, W_{nf} :

$$W_{nf} = h_w - W_f$$

Τα κλάσματα νερού ικανού και μη να παγώσει, βρίσκονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Δείγματα	W_f (%)	W_{nf} (%)
HA/Gel		
100/0	44	22
70/30	28	30
50/50	26	29
30/70	18	31
0/100	10	28

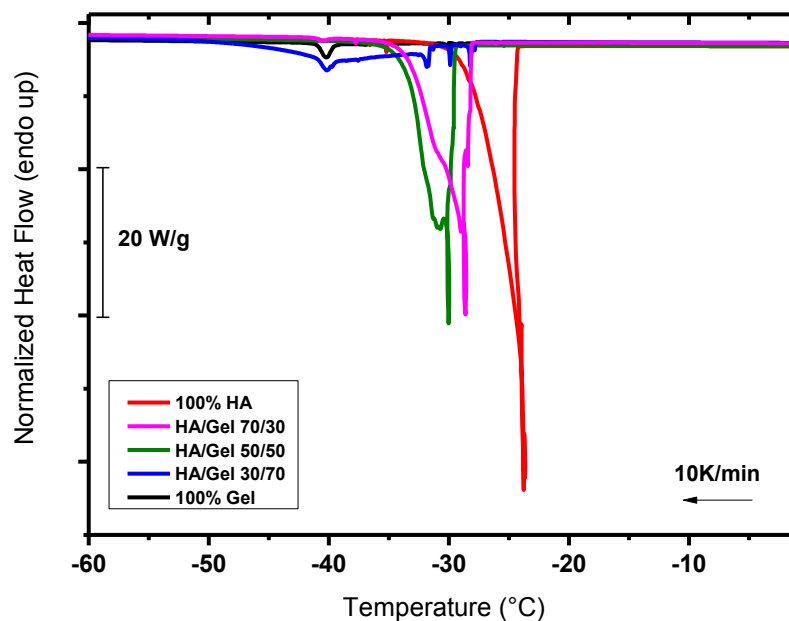
Πίνακας 3.8: Ποσοστά νερού κατά την 1^η θέρμανση, στο εσωτερικό των δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.

Στην περίπτωση του νερού που είναι ικανό να παγώσει (freezing water), παρατηρείται ξεκάθαρα ότι η ποσότητά του αυξάνεται, με την αύξηση της ποσότητας του υαλουρονικού οξέος στην υδρογέλη. Όπως και προηγουμένως, έτσι και εδώ, η

εξήγηση βασίζεται στην υψηλή απορροφητική ικανότητα του υαλουρονικού οξέος, εξαιτίας του εξαιρετικά υδρόφιλου χαρακτήρα του.

Παρατηρώντας εν συνεχεία τα ποσοστά του δεύτερου είδους νερού (non-freezable water), διαπιστώνει κανείς ότι αυτά είναι μεγαλύτερα στην περίπτωση της καθαρής ζελατίνης σε σύγκριση με το καθαρό υαλουρονικό οξύ. Το συγκεκριμένο είδος νερού, αλληλεπιδρά εντόνως με τις πολυμερικές αλυσίδες, αδυνατώντας έτσι να σχηματίσει κρυστάλλους και ως εκ τούτου δεν παγώνει. Παρά το γεγονός πως το υαλουρονικό οξύ είναι πιο υδρόφιλο από τη ζελατίνη, άρα αλληλεπιδρά εντονότερα με τα μόρια νερού, ο υψηλός βαθμός σταυροδεσίματος της ζελατίνης είναι ο παράγοντας που καθορίζει τα προαναφερθέντα ποσοστά. Συγκεκριμένα, τα πολυμερικά δίκτυα ζελατίνης περιορίζουν τα μόρια του νερού σε βαθμό που δεν μπορούν να μετακινηθούν προς σχηματισμό κρυστάλλων.

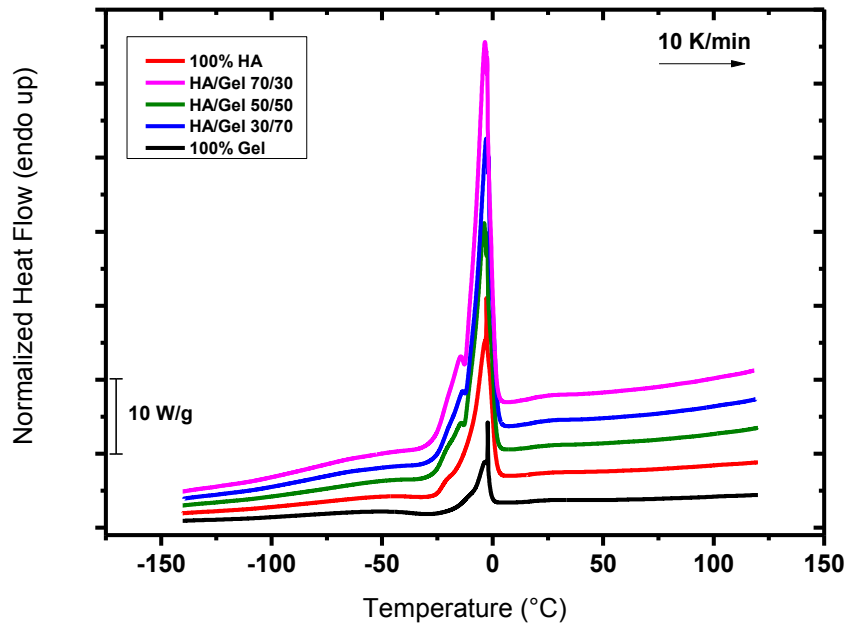
Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν τα δείγματα και κατά τον 2^ο κύκλο της μέτρησης (2^η ψύξη – 2^η θέρμανση), όπως φαίνεται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



Σχήμα 3.16: *Διάγραμμα 2^{ης} ψύξης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%*

Κατά την ψύξη, παρατηρείται κρυστάλλωση σε όλα τα δείγματα με το φαινόμενο να εντείνεται, όσο αυξάνεται η ποσότητα του υαλουρονικού οξέος σε αυτά. Οι θερμοκρασίες στις οποίες παρατηρείται, είναι ανάλογες με τις αντίστοιχες της 1^{ης} ψύξης. Λόγω αυτού, η ερμηνεία της κλιμακούμενης έντασης είναι η ίδια με αυτήν

που δόθηκε για την 1^η ψύξη. Η εμφάνιση ανεπαίσθητης, ωστόσο παρατηρήσιμης κρυστάλλωσης στο δείγμα καθαρής ζελατίνης, 100% Gel, υποδηλώνει κινητικότητα του νερού στα δίκτυά της, χαρακτηριστικό που απουσίαζε προηγουμένως.



Σχήμα 3.17: Διάγραμμα 2^{ης} θέρμανσης DSC της σειράς δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.

Όσον αφορά στη θέρμανση, στα δείγματα HA/Gel 70/30 και HA/Gel 50/50 παρατηρούνται διπλές κορυφές τήξης, με την κορυφή που εμφανίζεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία να είναι σημαντικά μικρότερη σε ένταση σε σχέση με αυτήν που ακολουθεί σε υψηλότερη θερμοκρασία. Σύμφωνα και με την ερμηνεία που δόθηκε στο αντίστοιχο φαινόμενο της 1^{ης} θέρμανσης, συμπεραίνει κανείς ότι στα δείγματα που απουσιάζει η πρώτη κορυφή, τα μόρια νερού δε σχηματίζουν πάγο κυβικού σχήματος, παρά μόνο εξαγωνικού, ο οποίος και τήκεται σε θερμοκρασίες κοντά στους 0 °C. Επιπλέον το η καθαρής ζελατίνης εμφανίζει ψυχρή κρυστάλλωση, η οποία ξεκινά σε παρόμοια θερμοκρασία με την αντίστοιχη της πρώτης θέρμανσης.

Δείγματα HA/Gel	1 ^η Τήξη		2 ^η Τήξη		Σύνολο
	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)	ΔH _m (J/g)
100/0	--	--	-2	147	147
70/30	-15	13	-3	76	88
50/50	-16	10	-4	75	86
30/70	--	--	-2	71	71
0/100	--	--	-2	45	45

Πίνακας 3.9: Θερμοκρασίες και ενθαλπίες τήξης της 2^{ης} θέρμανσης DSC των δειγμάτων HA/Gel που βρέθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.

Θεωρώντας ότι τα ποσοστά νερού, h_w , στο εσωτερικό των υδρογελών παρέμειναν σταθερά κατά τους δύο κύκλους, μπορεί κανείς να υπολογίσει εκ νέου τα διαφορετικά είδη νερού, όπως και στον πρώτη θέρμανση.

Δείγματα HA/Gel	W _f (%)	W _{nf} (%)
100/0	44	22
70/30	26	32
50/50	26	29
30/70	21	28
0/100	13	24

Πίνακας 3.10: Ποσοστά νερού κατά την 2^η θέρμανση, στο εσωτερικό των δειγμάτων HA/Gel που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%.

Συγκρίνοντας τα ποσοστά με τα αντίστοιχα της πρώτης θέρμανσης, είναι εμφανής η αύξηση του ποσοστού του νερού που είναι ικανό να παγώσει (freezable water) στο δείγμα της καθαρής ζελατίνης. Φαίνεται πως τα μόρια του νερού στο συγκεκριμένο δείγμα, απέκτησαν παραπάνω ευχέρεια κίνησης εντός του πολυμερικού δικτύου. Κάτι τέτοιο καταδεικνύει και η ύπαρξη κρυστάλλωσης στο ίδιο δείγμα κατά τη ψύξη.

3.2 Διηλεκτρική Φασματοσκοπία Εναλλασσόμενου Πεδίου (DRS)

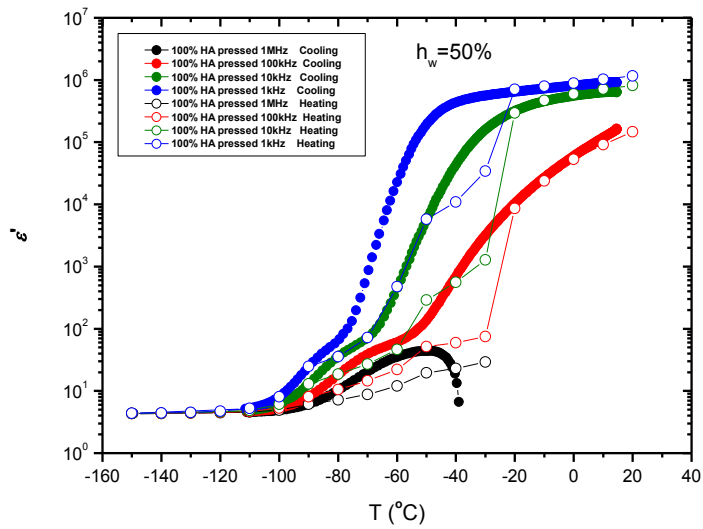
Οι μετρήσεις διηλεκτρικής φασματοσκοπίας εναλλασσόμενου πεδίου πραγματοποιήθηκαν για όλα τα δοκίμια υδρογελών HA/Gel με διαφορετικά ποσοστά νερού, στο θερμοκρασιακό εύρος $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και σε συχνότητες 10^{-1} έως 10^6 Hz. Συγκεκριμένα, αφού τα δείγματα ψύχθηκαν μέχρι τους $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ με ρυθμό $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Στη συνέχεια θερμάνθηκαν με το ίδιο βήμα θερμοκρασίας. Καταγράφηκαν οι τιμές του πραγματικού και φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής σταθεράς, και αντίστοιχα και το μέτρο της ac αγωγιμότητας του διηλεκτρικού, σ_{ac} . Τα δείγματα που μετρήθηκαν καθώς και οι περιεκτικότητές τους σε νερό παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί. Όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν στα εργαστήρια που του Κέντρου Βιοϋλικών και Ιστοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου της Βαλένθια, πλην του HA/Gel 30/70 που παρασκευάστηκαν στα εργαστήρια του Τομέα Φυσικής της Σχολής ΕΜΦΕ του ΕΜΠ. Για το δείγμα HA/Gel 70/30 και για δύο επιπλέον δείγματα καθαρού υαλουρονικού οξέος (100% HA) και καθαρής ζελατίνης (100% Gel), αποφασίστηκε η κατεργασία τους μέσω θερμικής πλάκας (hot plate). Συγκεκριμένα, τα δείγματα πιέστηκαν πάνω στη θερμαινόμενη πλάκα, σε θερμοκρασία $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Με τον τρόπο αυτό, οι υδρογέλες μετατράπηκαν σε λεπτά φύλλα (thin films), μειώνοντας έτσι στο ελάχιστο τους πόρους που βρίσκονταν στο εσωτερικό τους. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.11) τα εν λόγω δείγματα παρουσιάζονται με τη σήμανση «pressed», όπως και στα διαγράμματα που θα ακολουθήσουν.

Δείγματα HA/Gel	Dry	$h_w\%$ from 65% RH	$h_w\%$ from 85% RH	$h_w\%$ from 98% RH
100/0	X	21	61	-
100/0 (Pressed)	X	-	50	80
70/30 (Pressed)	X	-	32	52
50/50	X	9	21	54
30/70 (ATHENS)	X	-	13	47
0/100	X	10	21	-
0/100 (Pressed)	X	-	30	57

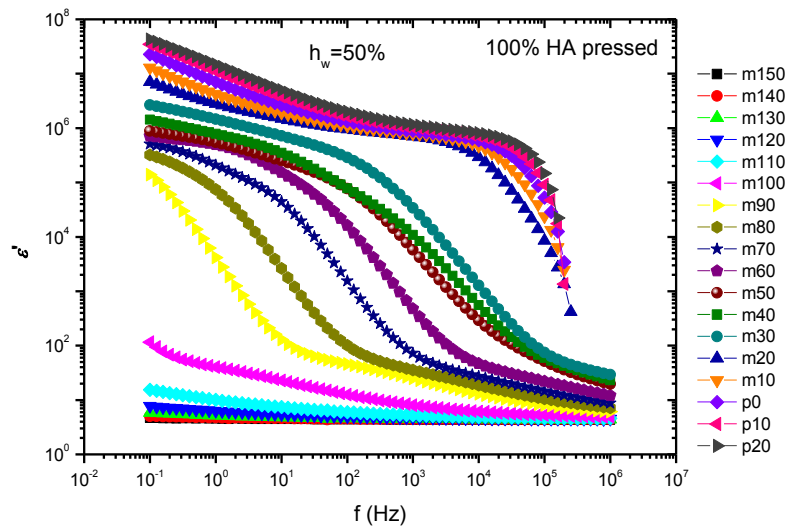
Πίνακας 3.11: Δείγματα υδρογελών HA/Gel και καταστάσεις υδάτωσης στις οποίες μετρήθηκαν.

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, βασικός στόχος της παρούσας εργασίας και των πειραματικών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν, είναι η μελέτη της συμπεριφοράς του νερού και της αλληλεπίδρασής του με το πολυμερικό δίκτυο των υδρογελών. Μελετήθηκαν δοκίμια με διαφορετικά ποσοστά νερού, στα οποία το νερό δεν κρυσταλλώνεται ή κρυσταλλώνεται. Προκειμένου να ελεγχθεί η κατάσταση του νερού (κρυσταλλωμένο ή μη), καταγράφηκε το σήμα κατά την ψύξη. Η εν λόγω διαδικασία καλείται «ράμπα» και κατά τη διάρκειά της, καταγράφηκε η συμπεριφορά του δείγματος στις συχνότητες 1 MHz, 100 kHz, 10 kHz και 1 kHz του εναλλασσόμενου πεδίου στο οποίο και υποβλήθηκε. Με το πέρας της «ράμπας», το δείγμα θερμάνθηκε, από τη θερμοκρασία στην οποία βρισκόταν (-150 °C), μέχρι (στις περισσότερες των περιπτώσεων) τους 20 °C. Η αύξηση της θερμοκρασίας, πραγματοποιήθηκε με ρυθμό 10 °C/min. Οι βασικές ποσότητες που μελετήθηκαν είναι το πραγματικό και φανταστικό μέρος της διηλεκτρικής σταθεράς, ϵ' και ϵ'' αντίστοιχα, καθώς και η αγωγιμότητα σ_{ac} .

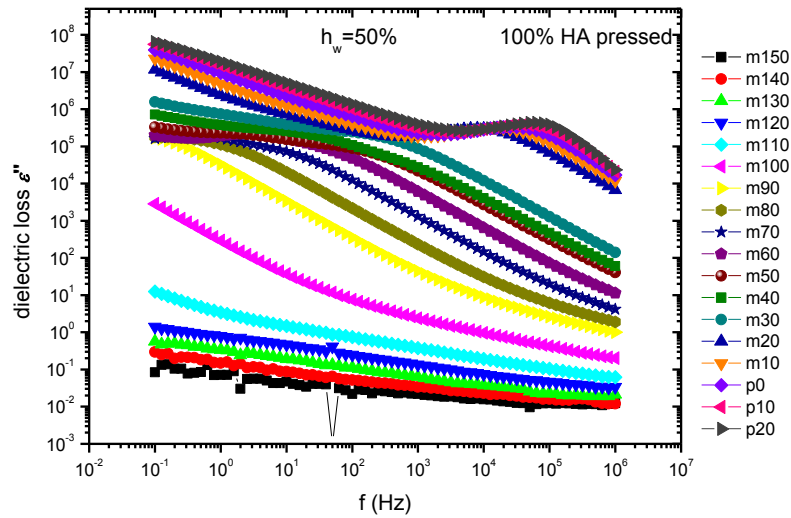
Αρχικά, παρουσιάζονται τα διαγράμματα για τις δύο καθαρές συνιστώσες που έχουν ισορροπήσει σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 85% ως ενδεικτικά για τον τρόπο καταγραφής των μετρήσεων με την τεχνική της διηλεκτρικής φασματοσκοπίας. Στο Σχήμα 3.14 φαίνεται το διάγραμμα του ϵ' συναρτήσει της θερμοκρασίας για το καθαρό HA με ποσοστό νερού 50%. Στο σχήμα παρουσιάζονται τα δεδομένα κατά την ψύξη του δοκιμίου με ρυθμό 10 °C/min (γεμάτα σύμβολα) καθώς και κατά τη θέρμανσή του (άδεια σύμβολα) σε 4 συχνότητες (1MHz, 100kHz, 10kHz και 1kHz). Τα σημεία κατά τη θέρμανση προέρχονται από επανασχεδιασμό των ισόθερμων μετρήσεων στις αντίστοιχες συχνότητες. Οι ισόθερμες μετρήσεις παρουσιάζονται στη συνέχεια. Στις καμπύλες της ψύξης, παρατηρούνται μεταβολές στο ϵ' υπό τη μορφή βήματος, οι οποίες μετατοπίζονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες με μείωση της συχνότητας και υποδεικνύουν την ύπαρξη μηχανισμών διηλεκτρικής αποκατάστασης. Δεν παρατηρείται μεταβολή σε κάποια θερμοκρασία ανεξάρτητα της συχνότητας, η οποία υποδεικνύει αλλαγή φάσης στο υλικό. Επομένως, στο συγκεκριμένο δοκίμιο, το νερό δεν κρυσταλλώνεται κατά την ψύξη του δοκιμίου με ρυθμό 10 °C/min. Κατά τη θέρμανση, παρατηρούνται μεταβολές ανεξάρτητες της συχνότητας στους -90 °C, -50 °C και -30 °C, οι οποίες υποδεικνύουν αλλαγές φάσης στο υλικό. Οι αλλαγές αποδίδονται στο νερό. Συγκεκριμένα, στη μετάβαση του νερού στην κρυσταλλική φάση, σε κρυσταλλική φάση άλλου είδους και στη μετάβασή του στην υγρή κατάσταση αντίστοιχα.



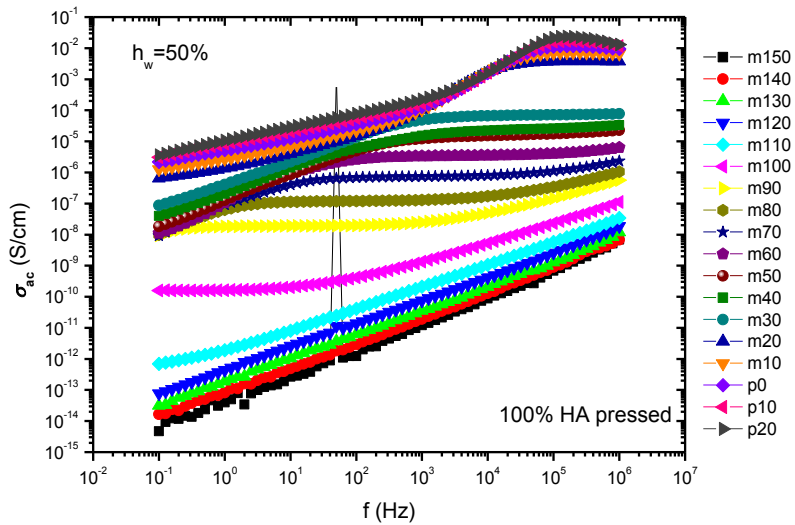
Σχήμα 3.18: Συγκριτικό διάγραμμα ψύξης – θέρμανσης για την θερμικά πιεσμένη υδρογέλη καθαρού HA, με ποσοστό υδάτωσης $h_w=50\%$.



Σχήμα 3.19: Διάγραμμα του πραγματικού μέρους της διηλεκτρικής σταθεράς, ϵ' , συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου σε όλες τις θερμοκρασίες από -150°C έως 20°C για την περίπτωση της θερμικά πιεσμένης υδρογέλης καθαρού HA, με ποσοστό υδάτωσης $h_w=50\%$.



Σχήμα 3.20: Διάγραμμα του φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής σταθεράς, ϵ'' , συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου σε όλες τις θερμοκρασίες από -150°C έως 20°C για την περίπτωση της θερμικά πιεσμένης υδρογέλης καθαρού HA, με ποσοστό υδάτωσης $h_w=50\%$.



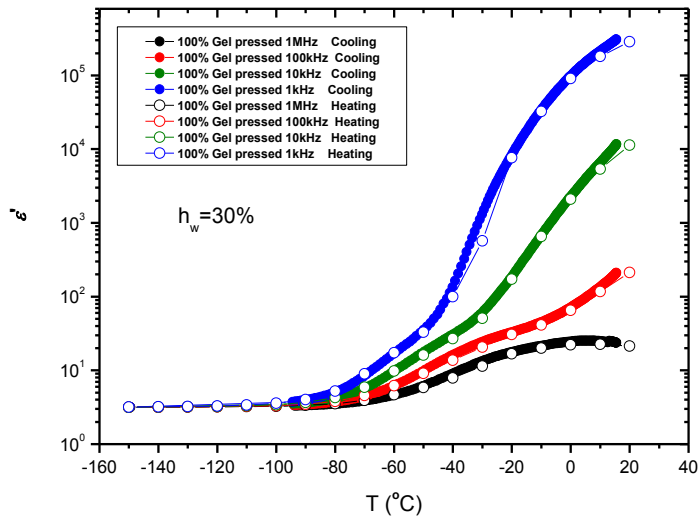
Σχήμα 3.21: Διάγραμμα ηλεκτρικής αγωγιμότητας σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου σε όλες τις θερμοκρασίες από -150°C έως 20°C για την περίπτωση της θερμικά πιεσμένης υδρογέλης καθαρού HA, με ποσοστό υδάτωσης $h_w=50\%$.

Στα σχήματα 3.19 – 3.21 παρουσιάζονται τα διαγράμματα του πραγματικού και φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής σταθεράς ϵ' και ϵ'' και η διηλεκτρική αγωγιμότητα σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας του διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για εύρος θερμοκρασιών -150°C έως 20°C για το καθαρό HA, με ποσοστό νερού 50%. Ξεκινώντας από το ϵ' (Σχήμα 3.19), παρατηρεί κανείς ότι για κάποια συχνότητα

(διαφορετική σε κάθε θερμοκρασία), το ϵ' παρουσιάζει απότομη μείωση (σκαλοπάτι) προς τα κάτω. Αυτό συμβαίνει διότι, σε αρκετά χαμηλές συχνότητες σε σχέση με την f_{\max} τα δίπολα προλαβαίνουν να ακολουθήσουν τις μεταβολές του πεδίου, ενώ για αρκετά μεγάλη συχνότητα, αποτυγχάνουν, μη συμμετέχοντας έτσι στην πόλωση. Ειδικότερα, το σκαλοπάτι που παρατηρείται σηματοδοτεί την ύπαρξη μηχανισμού διηλεκτρικής αποκατάστασης. Ο μηχανισμός αρχίζει να εκδηλώνεται σε θερμοκρασία $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ και συνεχίζεται μέχρι και τους $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, ο μηχανισμός παρατηρείται σε μεγαλύτερες συχνότητες (μετατόπιση f_{\max}) ξεκινώντας από 1Hz μέχρι και 2kHz. Η συμπεριφορά του ϵ' αλλάζει μετά τους $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, θερμοκρασία στην οποία έχει παρατηρηθεί η τήξη του πάγου, όπως περιγράφηκε και στο Σχήμα 3.18. Από τους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι και τους $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ παρατηρείται ένα ακόμα απότομο σκαλοπάτι το οποίο είναι πιθανό να αντιστοιχεί σε κάποιο διαφορετικό μηχανισμό, ο οποίος μετατοπίζεται από τα 10kHz έως τα 100kHz με την αύξηση της θερμοκρασίας.

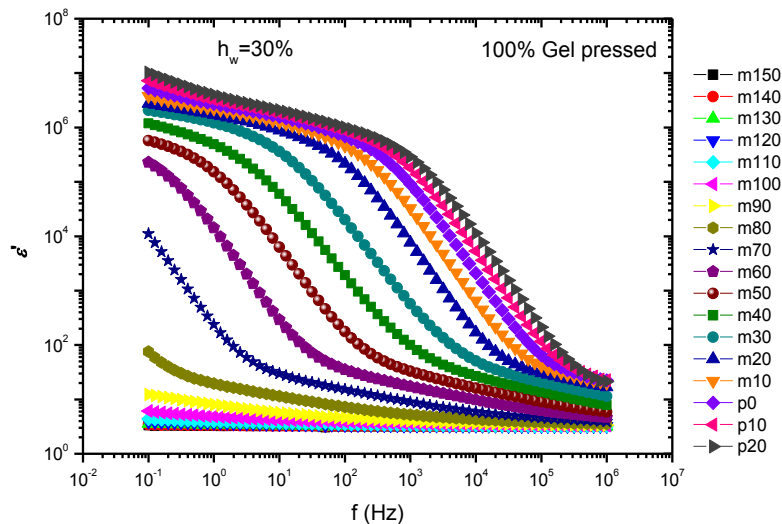
Στο Σχήμα 3.20 το ϵ'' παρουσιάζει στις αντίστοιχες θερμοκρασίες με το ϵ' κορυφές στις ίδιες συχνότητες, καθώς εκεί παρατηρούνται οι μέγιστες απώλειες ενέργειας. Οι κορυφές μετατοπίζονται προς υψηλότερες τιμές με την αύξηση της θερμοκρασίας. Ομοίως και εδώ, μετά τους $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ η εικόνα του ϵ'' αλλάζει και εμφανίζονται καινούριες κορυφές απωλειών στις αντίστοιχες συχνότητες με του ϵ' .

Στο Σχήμα 3.21 η αγωγιμότητα σ_{ac} , παρουσιάζει γραμμικότητα μέχρι και τους $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Με την αύξηση της θερμοκρασίας στη συνέχεια, εμφανίζεται πλατώ (plateau) dc αγωγιμότητας έκτασης περίπου τεσσάρων τάξεων μεγέθους συχνότητας, το οποίο και μετατοπίζεται σε μεγαλύτερες συχνότητες με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στην εμφάνιση φορέων ηλεκτρικής αγωγιμότητας (ιόντα) λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, για το θερμοκρασιακό εύρος $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, το μέγεθος του πλατώ μειώνεται αισθητά, φαινόμενο στο οποίο ενδεχομένως να συμβάλει η τήξη του πάγου που προηγήθηκε (Σχήμα 3.18).



Σχήμα 3.22: Συγκριτικό διάγραμμα ψύξης – θέρμανσης για την θερμικά πιεσμένη υδρογέλη καθαρής Gel, με ποσοστό υδάτωσης $h_w=30\%$.

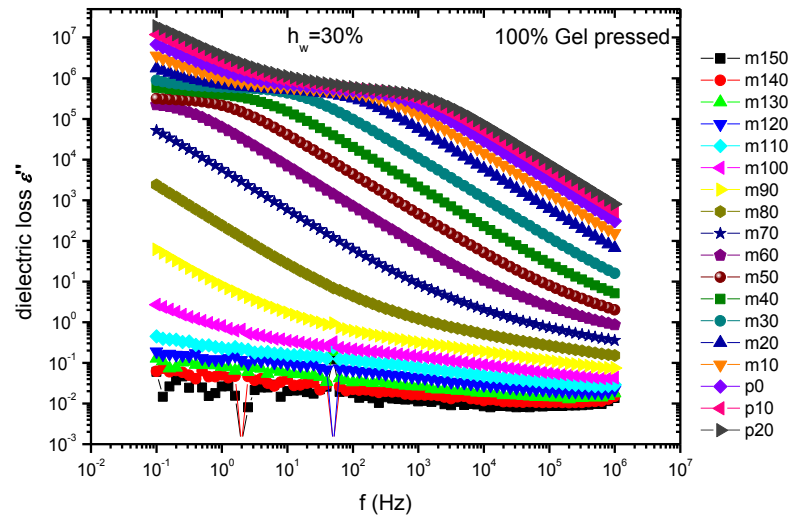
Στο Σχήμα 3.22 δεν παρατηρείται τίποτα το ιδιαίτερο ούτε κατά την ψύξη, ούτε κατά τη θέρμανση. Το νερό που βρίσκεται εντός της υδρογέλης, είναι δέσμιο στις πολυμερικές αλυσίδες του δικτύου, αδυνατώντας έτσι να κρυσταλλωθεί.



Σχήμα 3.23: Διάγραμμα του πραγματικού μέρους της διηλεκτρικής σταθεράς, ϵ' , συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου σε όλες τις θερμοκρασίες από -150°C έως 20°C για την περίπτωση της θερμικά πιεσμένης υδρογέλης καθαρής Gel, με ποσοστό υδάτωσης $h_w=30\%$.

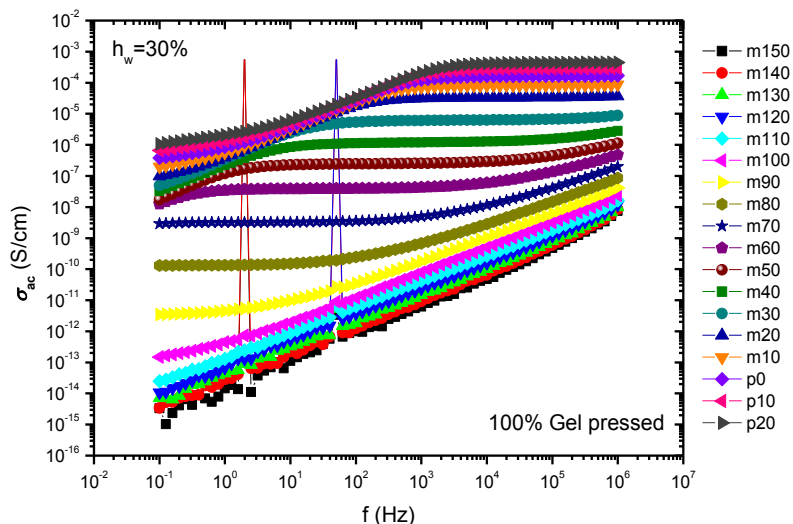
Όσον αφορά στην υδρογέλη καθαρής ζελατίνης, Gel, παρατηρώντας κανείς το διάγραμμα του ϵ' (Σχήμα 3.23), διαπιστώνει την ύπαρξη μηχανισμού που αρχίζει να εκδηλώνεται στη θερμοκρασία των -80°C , ενώ το σκαλοπάτι του γίνεται ορατό από τη θερμοκρασία των -50°C και ύστερα. Το σκαλοπάτι του μηχανισμού παρατηρείται

σε συχνότητα 1Hz σε θερμοκρασία $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, και μετατοπίζεται σε μεγαλύτερες συχνότητες όσο αυτή αυξάνεται. Τελευταία συχνότητα στην οποία συναντάται, είναι η 10kHz.



Σχήμα 3.24: Διάγραμμα του φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής σταθεράς, ϵ'' , συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου σε όλες τις θερμοκρασίες από $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για την περίπτωση της θερμικά πιεσμένης υδρογέλης καθαρής Gel, με ποσοστό υδάτωσης $h_w=30\%$.

Στο διάγραμμα του φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής σταθεράς, ϵ'' , (Σχήμα 3.24), παρατηρεί κανείς τον ίδιο μηχανισμό να εμφανίζεται στις αντίστοιχες συχνότητες, αλλά αυτή τη φορά με τη μορφή κορυφών αντί βημάτων.



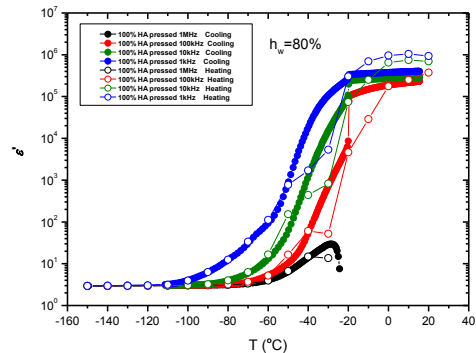
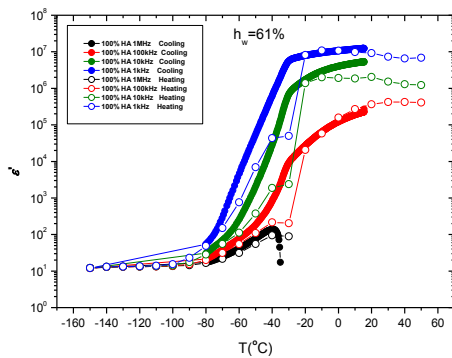
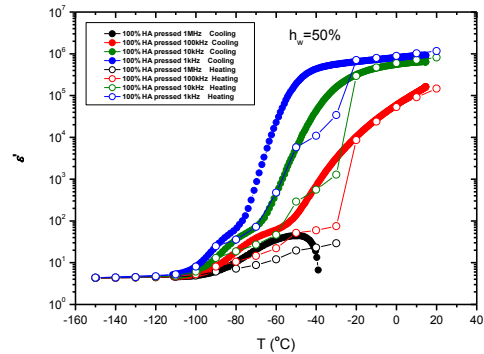
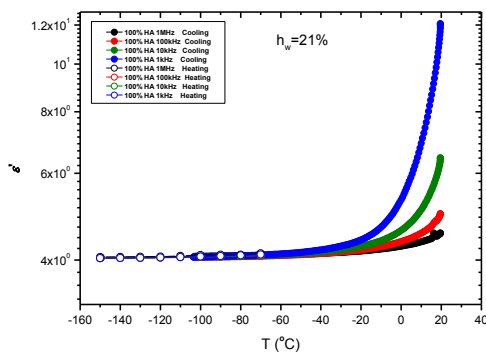
Σχήμα 3.25: Διάγραμμα ηλεκτρικής αγωγιμότητας συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου σε όλες τις θερμοκρασίες από $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για την περίπτωση της θερμικά πιεσμένης υδρογέλης καθαρής Gel, με ποσοστό υδάτωσης $h_w=30\%$.

Όσον αφορά στο Σχήμα 3.25, παρατηρείται απουσία dc αγωγιμότητας μέχρι τη θερμοκρασία των $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στη συνέχεια, η αύξηση της θερμοκρασίας, προκαλεί την εμφάνιση ιόντων με συνέπεια τον εντοπισμό πλατώ dc αγωγιμότητας. Συγκεκριμένα, το πλατώ εμφανίζεται στη θερμοκρασία των $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ και εκτείνεται από 0.1Hz έως 1Hz . Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, η έκτασή αυξάνεται μέχρι και τη θερμοκρασία των $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου έχει μήκος 4 τάξεις μεγέθους (από 10^2Hz έως 10^6Hz). Τέλος, από τη θερμοκρασία των $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι και $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ το πλατώ μειώνεται αλλά παραμένει ορατό.

Επιλεκτικά διαγράμματα από όλες τις υδρογέλες

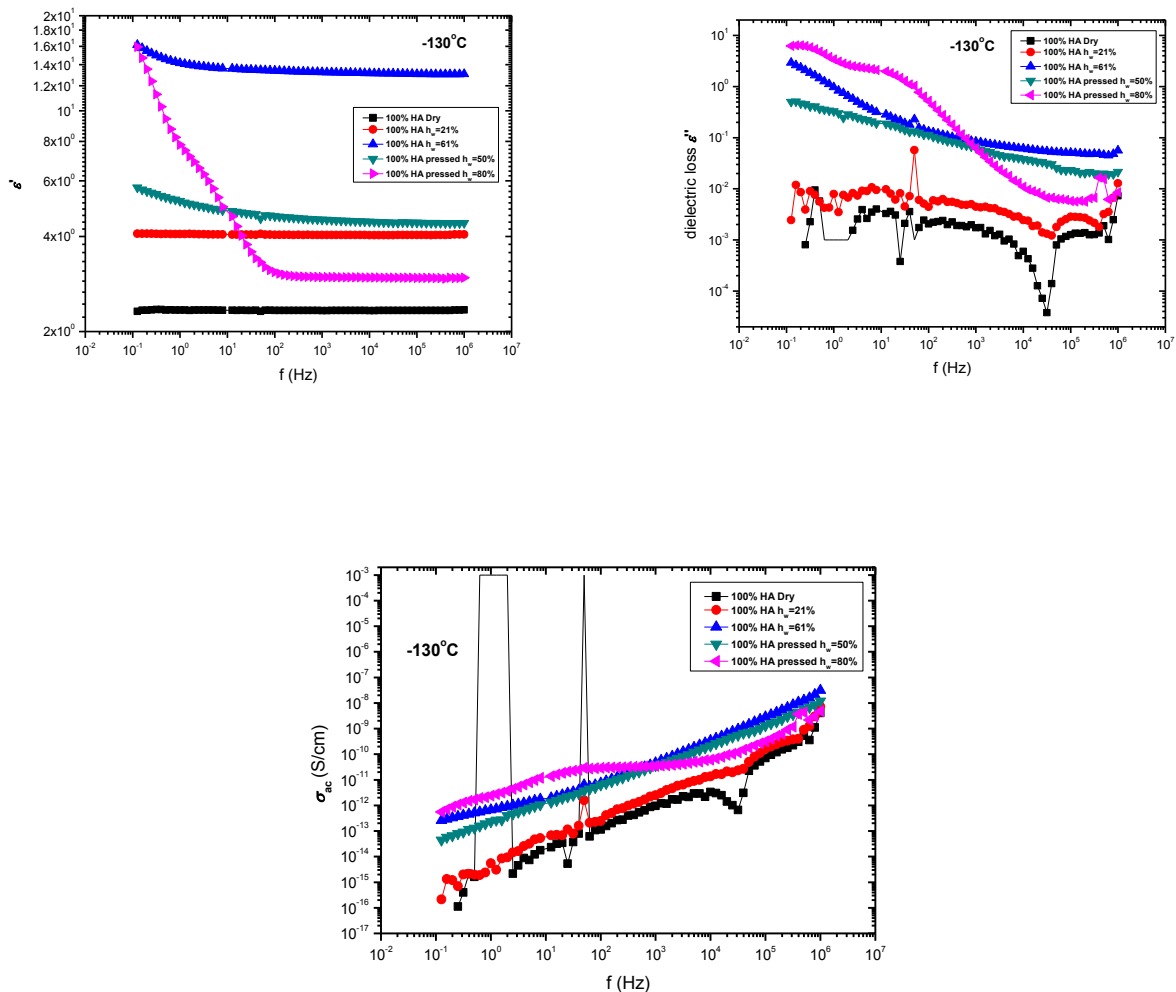
Στη συνέχεια, παρατίθενται για κάθε υλικό τα διαγράμματα του ϵ' συναρτήσει της θερμοκρασίας κατά την ψύξη και κατά τη θέρμανση, προκειμένου να γίνει γνωστή η κατάσταση του νερού κατά τις ισόθερμες μετρήσεις. Επιπλέον, παρουσιάζονται διαγράμματα ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας σε επιλεγμένες θερμοκρασίες για όλα τα ποσοστά νερού που επιτεύχθηκαν για κάθε υλικό.

Υδρογέλες 100% HA



Σχήμα 3.26: Διάγραμμα ϵ' συναρτήσεως της θερμοκρασίας σε 4 διαφορετικές συχνότητες για το ΗΑ κατά την ψύξη (γεμάτα σύμβολα) και κατά τη θέρμανση (ανοιχτά σύμβολα) για διαφορετικά ποσοστά νερού, τα οποία αναγράφονται στα διαγράμματα.

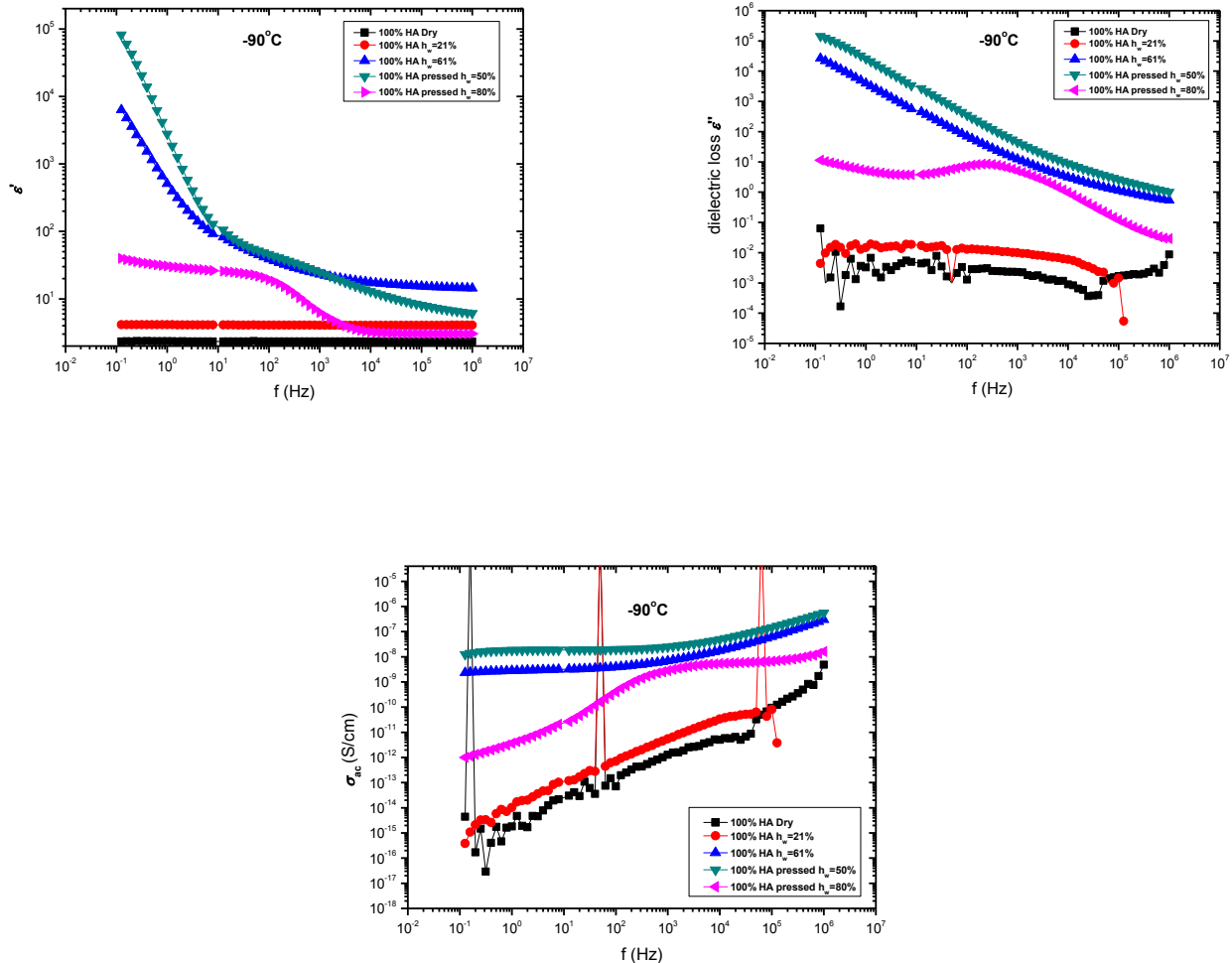
Παρατηρώντας το 1^ο διάγραμμα ψύξης-θέρμανσης της υδρογέλης καθαρού υαλουρονικού οξέος με ποσοστό νερού 21% (Σχήμα 3.26), διαπιστώνει ότι κατά την ψύξη δεν έχει λάβει χώρα φαινόμενο κρυστάλλωσης, ούτε εμφανίζεται κάποιος μηχανισμός διηλεκτρικής αποκατάστασης. Εξάλλου κατά τη θέρμανση, όπως γίνεται αντιληπτό, η μέτρηση δεν διεκπεραιώθηκε μέχρι τέλους, οπότε δεν προσφέρεται για συμπεράσματα. Για ποσοστό νερού 50%, στις καμπύλες παρατηρούνται μεταβολές στο ϵ' υπό τη μορφή βήματος, οι οποίες μετατοπίζονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες με τη μείωση της συχνότητας, φαινόμενο που καταδεικνύει την ύπαρξη μηχανισμών διηλεκτρικής αποκατάστασης. Όπως αναλύθηκε και προηγουμένως (Σχήμα 3.18) δεν διαπιστώνεται μεταβολή του ϵ' σε κάποια θερμοκρασία ανεξάρτητη της συχνότητας, γεγονός που θα σηματοδοτούσε αλλαγή φάσης στο υλικό. Αντίθετα, κατά τη θέρμανση, παρατηρούνται μεταβολές ανεξάρτητες της συχνότητας στη θερμοκρασία των -90°C , -50°C και -30°C , οι οποίες υποδεικνύουν αλλαγές φάσης στο υλικό. Οι αλλαγές φάσης αποδίδονται στο νερό. Συγκεκριμένα, στη μετάβαση του νερού στην κρυσταλλική φάση, σε κρυσταλλική φάση άλλου είδους και στην μετάβασή του στην υγρή κατάσταση, αντίστοιχα. Με την αύξηση του ποσοστού υδάτωσης σε 61%, το ϵ' παρουσιάζει βήμα (σκαλοπάτι) στη θερμοκρασία των -30°C ανεξαρτήτως της συχνότητας. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί την κρυστάλλωση του δεσμευμένου νερού (bound water) εντός του πολυμερικού δικτύου. Κατά τη θέρμανση, παρατηρούνται μεταβολές ανεξάρτητες της συχνότητας στη θερμοκρασία των -30°C που σηματοδοτούν την τήξη του κυβικού πάγου (cubic ice) που είχε σχηματιστεί. Τέλος, όταν η υδρογέλη καθαρού ΗΑ διαθέτει $h_w=80\%$ (4^ο διάγραμμα), παρατηρείται κατά την ψύξη, μεταβολή του ϵ' στη θερμοκρασία των -20°C , ανεξαρτήτως συχνότητας. Κατά τη θέρμανση διαπιστώνει κανείς μεταβολές στις θερμοκρασίες των -50°C και -30°C , οι οποίες υποδηλώνουν μεταπτώσεις φάσης στο ΗΑ οφειλόμενες στο νερό. Ειδικότερα, πρόκειται για μετάβαση του νερού σε κρυσταλλική φάση και στη συνέχεια στην υγρή κατάσταση.



Σχήμα 3.27: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -130^\circ\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης καθαρού HA.

Ξεκινώντας από τη θερμοκρασία των -130°C (Σχήμα 3.27), για τα διάφορα ποσοστά υδατώσεων του HA, καθίσταται καταρχάς σαφές ότι το σήμα αυξάνεται όσο αυξάνεται η ποσότητα του νερού στο δείγμα. Όσον αφορά στο ϵ' , δεν παρατηρείται κάποιος μηχανισμός διηλεκτρικής αποκατάστασης σε κάποιο δείγμα. Η συμπεριφορά του πραγματικού μέρους της διηλεκτρικής συνάρτησης φαίνεται σταθερή σε όλα τα δείγματα, με εξαίρεση το δείγμα με ποσοστό νερού 80%, στο οποίο εμφανίζει φθίνουσα συμπεριφορά με την αύξηση της συχνότητας του εναλλασσόμενου πεδίου. Εν τέλει σταθεροποιείται σε συχνότητα 100Hz. Στο διάγραμμα του ϵ'' ωστόσο, το ίδιο δείγμα παρουσιάζει κορυφή διηλεκτρικών απωλειών σε συχνότητα 10Hz, ένδειξη ότι τελικά υπάρχει κάποιος μηχανισμός διηλεκτρικής αποκατάστασης. Για τα υπόλοιπα ποσοστά υδατώσεων, το ϵ'' δεν εμφανίζει κάτι αξιο σχολιασμού. Σχετικά με την αγωγιμότητα, σ_{ac} , η συμπεριφορά της υποδηλώνει την απουσία dc

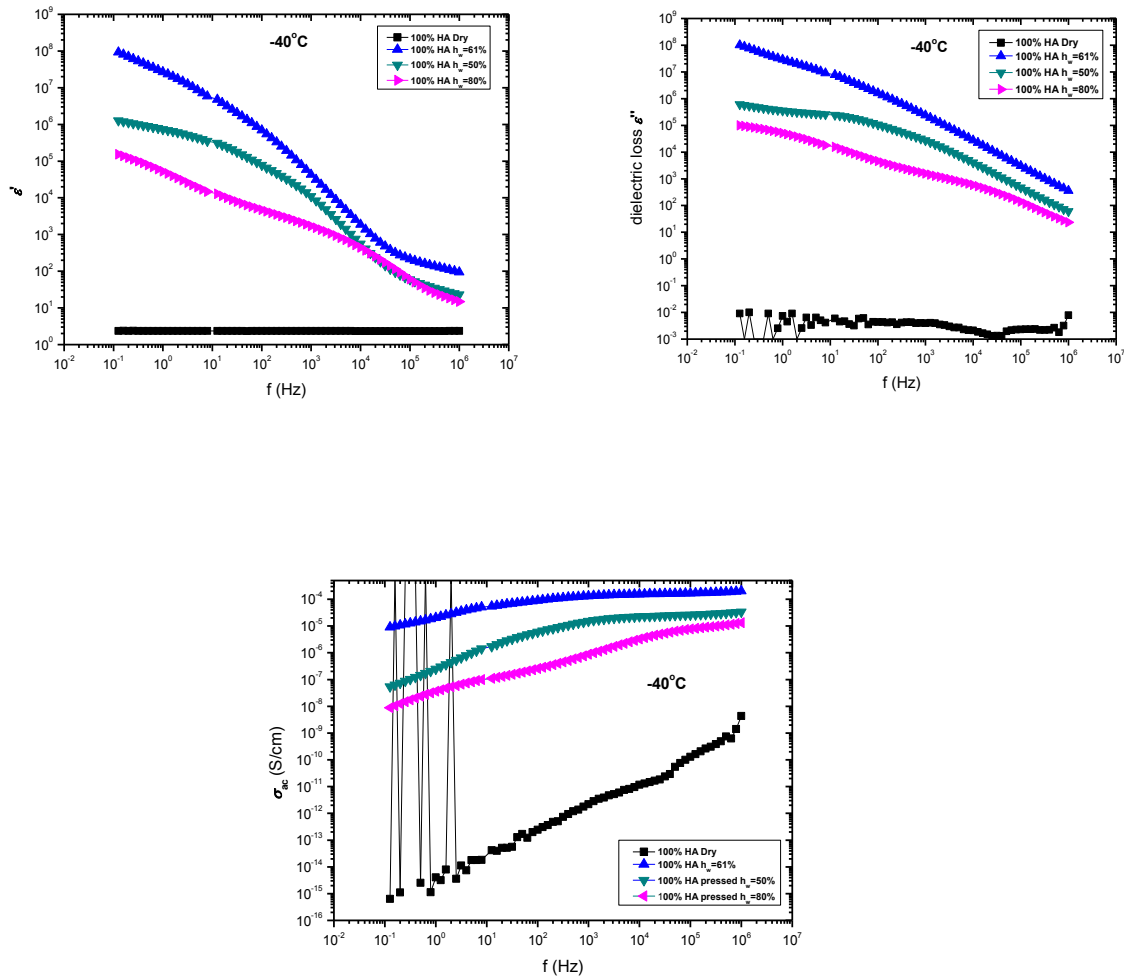
αγωγιμότητας. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί και πάλι το HA με ποσοστό νερού 80%, το οποίο εμφανίζει πλατώ dc αγωγιμότητας αρχής γενομένης από συχνότητα 10^2 Hz μέχρι και 10^4 Hz.



Σχήμα 3.28: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -90^\circ\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης καθαρού HA.

Με την αύξηση της θερμοκρασίας στους -90°C (Σχήμα 3.28), στο διάγραμμα του ϵ' και συγκεκριμένα στο δείγμα με $h_w=80\%$, γίνεται πλέον αντιληπτός ο μηχανισμός που είχε εμφανιστεί και προηγουμένως στο ϵ'' (Σχήμα 3.27). Το βήμα του μηχανισμού παρουσιάζεται σε συχνότητα 10^2 Hz. Ο ίδιος μηχανισμός αντιστοιχεί στην κορυφή που εμφανίζεται στο διάγραμμα του ϵ'' για ίδιο δείγμα, σε συχνότητα λίγο μεγαλύτερη από 10^2 Hz. Τα δείγματα HA, για χαμηλότερες υδατώσεις, δεν παρουσιάζουν κάποιο μηχανισμό που να γίνεται αντιληπτός στα διαγράμματα ϵ' και ϵ'' . Τέλος, από πλευράς αγωγιμότητας, το άνυδρο HA και αυτό με ποσοστό νερού 21% εξακολουθούν να μην εμφανίζουν dc αγωγιμότητα. Αντίθετα, τα δείγματα με

$h_w=50\%$ και $h_w=61\%$, εμφανίζουν το χαρακτηριστικό πλατώ της εν λόγω αγωγιμότητας, από συχνότητα 10^{-1}Hz έως 10^3Hz . Η αύξηση της θερμοκρασίας, φαίνεται πως έθεσε σε κίνηση φορείς ηλεκτρικής αγωγιμότητας (ιόντα), προκαλώντας την εμφάνιση του πλατώ. Τέλος, το HA με $h_w=80\%$, διατηρεί το πλατώ αγωγιμότητας που είχε και στη θερμοκρασία των -130°C , μετατοπισμένο μεταξύ 10^3 και 10^5Hz .



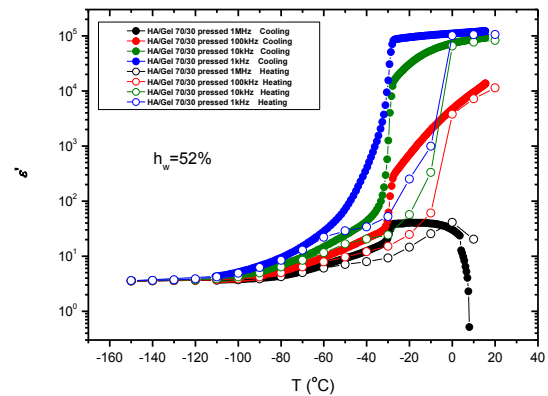
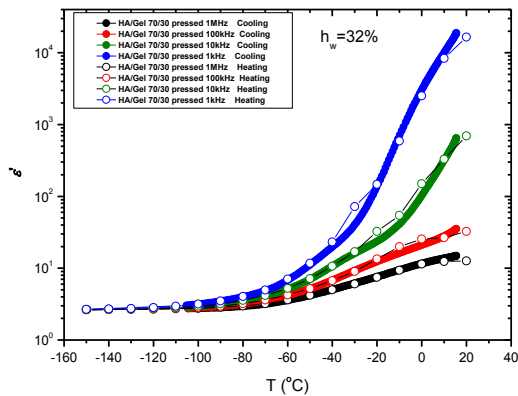
Σχήμα 3.29: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -40^\circ\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσεων της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης καθαρού HA.

Με την περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας στους -40°C (Σχήμα 3.29), παρατηρεί κανείς ότι το άνυδρο δείγμα HA, δεν παρουσιάζει κάτι το αξιοσημείωτο. Εδώ απουσιάζει το HA με $h_w=21\%$, καθώς η μέτρηση είχε διακοπεί νωρίτερα. Γενικότερα, όλα τα Dry δείγματα υδρογελών καθώς και εκείνα που υποβλήθηκαν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 65%, λόγω του μηδαμινού ή μικρού ποσοστού νερού, κρίνονται μη αξιοποιήσιμα από πλευράς σήματος, όπως θα διαπιστωθεί και σε άλλα δείγματα παρακάτω. Συνεχίζοντας σε υψηλότερες υδατώσεις ($h_w=50\%$) και στο διάγραμμα ϵ' ,

παρατηρείται скаλοπάτι σε συχνότητα 10Hz το οποίο επιβεβαιώνεται από την κορυφή των διηλεκτρικών απωλειών στο αντίστοιχο διάγραμμα. Πρόκειται για μηχανισμό διηλεκτρικής αποκατάστασης που δεν είχε εμφανιστεί στις δύο προηγούμενες θερμοκρασίες. Ανάλογη συμπεριφορά εμφανίζει το HA σε ποσοστό υδάτωσης $h_w=61\%$ στην ίδια συχνότητα. Στην περίπτωση της μέγιστης υδάτωσης που επετεύχθη ($h_w=80\%$), ο ήδη εκδηλωμένος μηχανισμός, έχει πλέον μετατοπιστεί σε συχνότητα 10^4Hz (εμφανής ως βήμα στο ε' και ως κορυφή στο ε'').

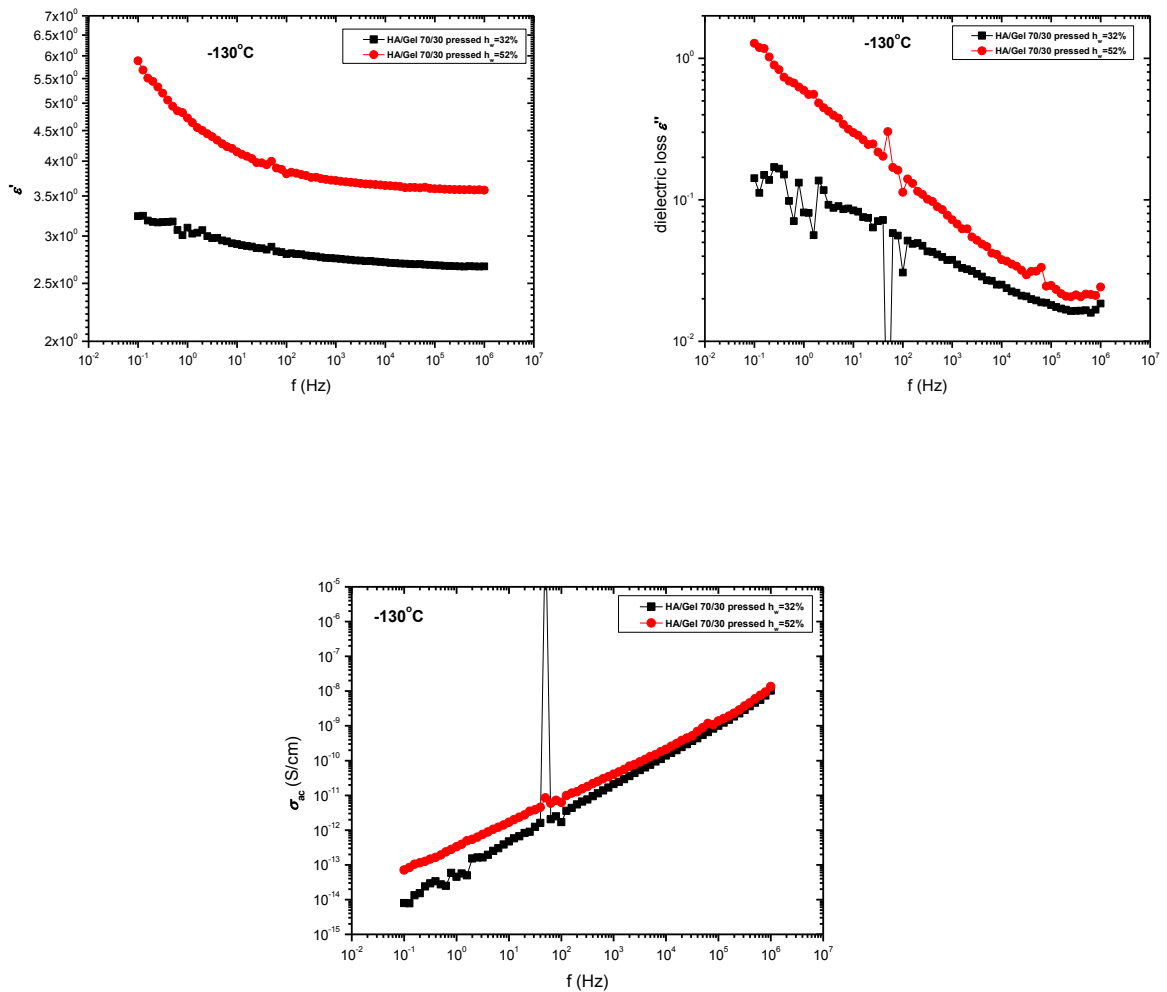
Τέλος, αναφορικά με την αγωγιμότητα, σ_{ac} , η dc αγωγιμότητα στα δείγματα με ποσοστά νερού 50% και 61% διατηρούνται, έχοντας μετατοπιστεί σε μεγαλύτερες συχνότητες (10^3 έως 10^6Hz), ενώ το πλατώ του HA με $h_w=80\%$ τείνει να εξαλειφτεί.

Υδρογέλες HA/Gel 70/30



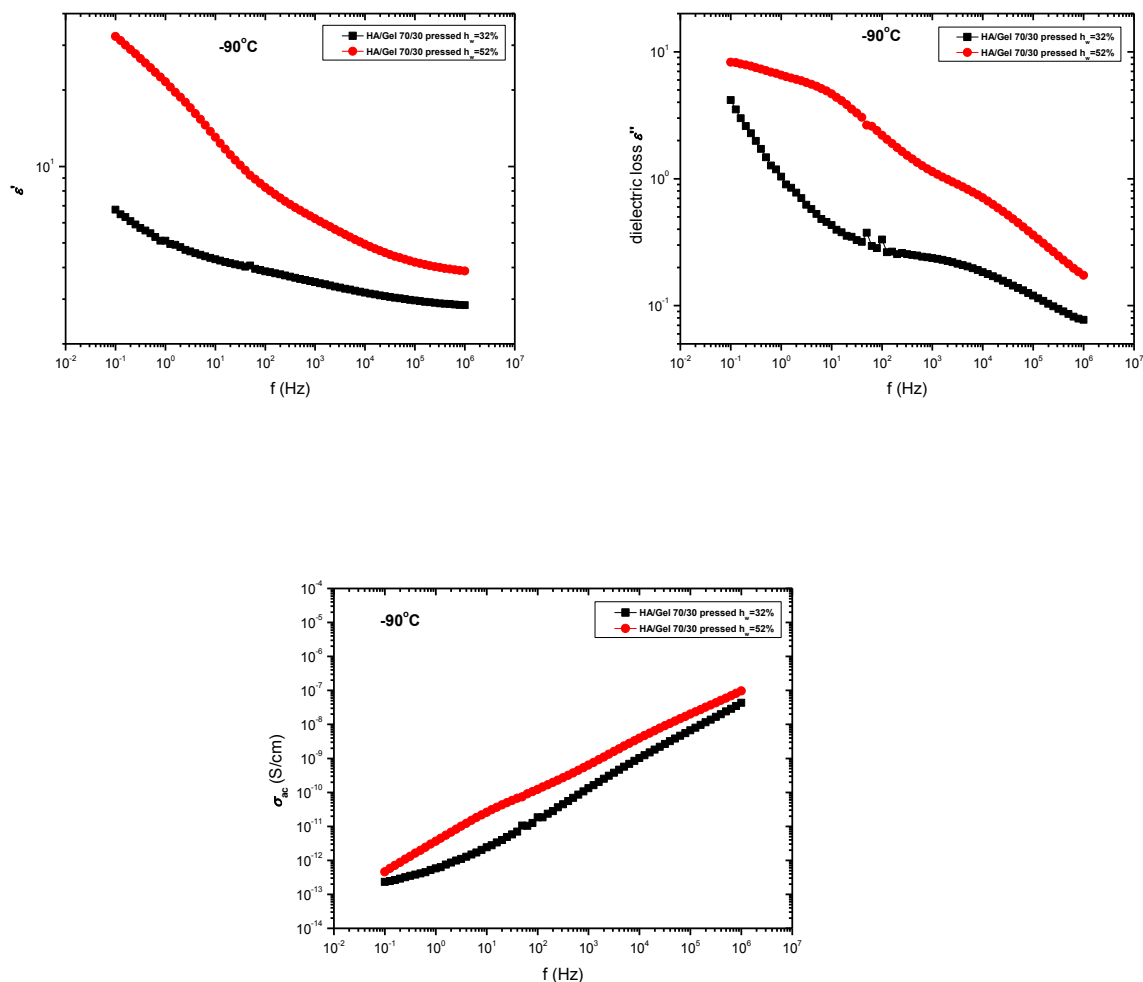
Σχήμα 3.30: Διάγραμμα ε' συνάρτησης της θερμοκρασίας σε 4 διαφορετικές συχνότητες για το HA/Gel 70/30 κατά την ψύξη (γεμάτα σύμβολα) και κατά τη θέρμανση (ανοιχτά σύμβολα) για διαφορετικά ποσοστά νερού, τα οποία αναγράφονται στα διαγράμματα.

Στην περίπτωση της υδρογέλης HA/Gel 70/30 (Σχήμα 3.30) για ποσοστό νερού 32%, δεν παρατηρούνται φαινόμενα κρυστάλλωσης κατά την ψύξη, ή τήξης κατά τη θέρμανση. Αντίθετα, όταν το ποσοστό νερού αυξήθηκε σε 52%, διαπιστώθηκαν μεταβολές του ε' καταρχάς κατά την ψύξη. Συγκεκριμένα, στη θερμοκρασία των $-27\text{ }^\circ\text{C}$, παρουσιάζεται αλλαγή στις καμπύλες του ε' ανεξαρτήτως συχνότητας, γεγονός που αντικατοπτρίζει κρυστάλλωση νερού. Όσον αφορά στη θέρμανση, παρουσιάζονται μεταβολές ανεξαρτήτως συχνότητας, στις θερμοκρασίες των $-60\text{ }^\circ\text{C}$ και $-30\text{ }^\circ\text{C}$, αντιπροσωπευτικές των μεταπτώσεων φάσης που υφίσταται το νερό. Η πρώτη μετάπτωση είναι σε κρυσταλλική φάση, ενώ η δεύτερη σε υγρή κατάσταση.



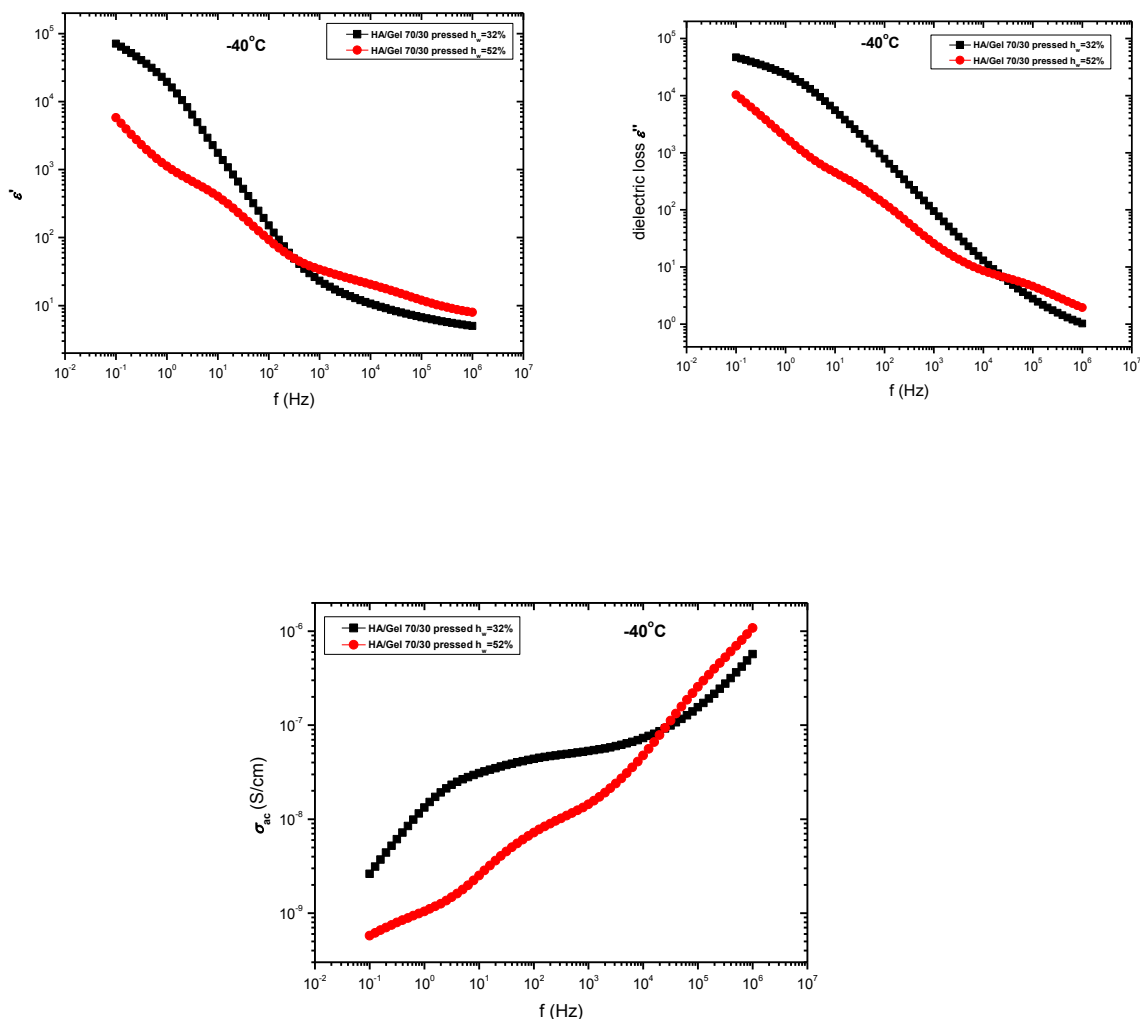
Σχήμα 3.31: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -130\text{ }^{\circ}\text{C}$ των, ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης HA/Gel 70/30.

Συνεχίζοντας στα ισόθερμα διαγράμματα, και συγκεκριμένα σε θερμοκρασία $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Σχήμα 3.31), δεν παρατηρούνται μηχανισμοί σε καμία από τις δύο υδατώσεις του δείγματος HA/Gel 70/30, ενώ απουσιάζει και η dc αγωγιμότητα. Όπως ήταν φυσικό, το δείγμα με μεγαλύτερο ποσοστό νερού ($h_w=52\%$), έχει υψηλότερο σήμα στο ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} .



Σχήμα 3.32: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -90^{\circ}\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσεων της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης HA/Gel 70/30.

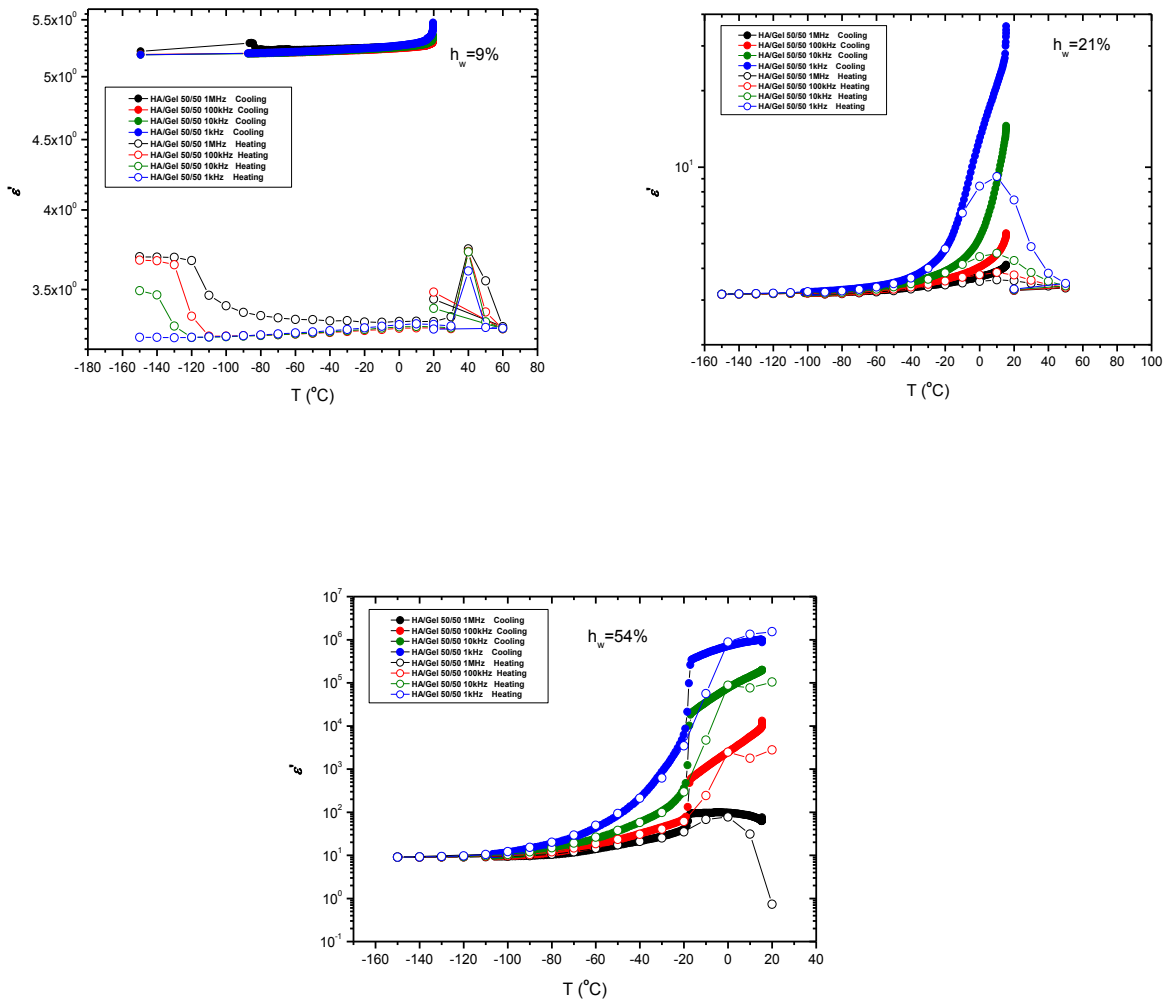
Όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε (Σχήμα 3.32), το δείγμα με ποσοστό νερού 52%, παρουσίασε δυσδιάκριτο σκαλοπάτι μηχανισμού στο ϵ' , ο οποίος εντούτοις φαίνεται πως επιβεβαιώνεται στο διάγραμμα του ϵ'' με κορυφή διηλεκτρικών απωλειών σε συχνότητα 10Hz. Επιπλέον στο ίδιο διάγραμμα, είναι ορατή μία ακόμη κορυφή σε συχνότητα 10^4 Hz, που ενδεχομένως να υποδηλώνει την ύπαρξη ενός ακόμη μηχανισμού. Το αντίστοιχο δείγμα με $h_w=32\%$ δεν εμφάνισε μηχανισμό, ενώ η αγωγιμότητα και για τα δύο δείγματα δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη μεταβολή.



Σχήμα 3.33: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -40^\circ\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης HA/Gel 70/30.

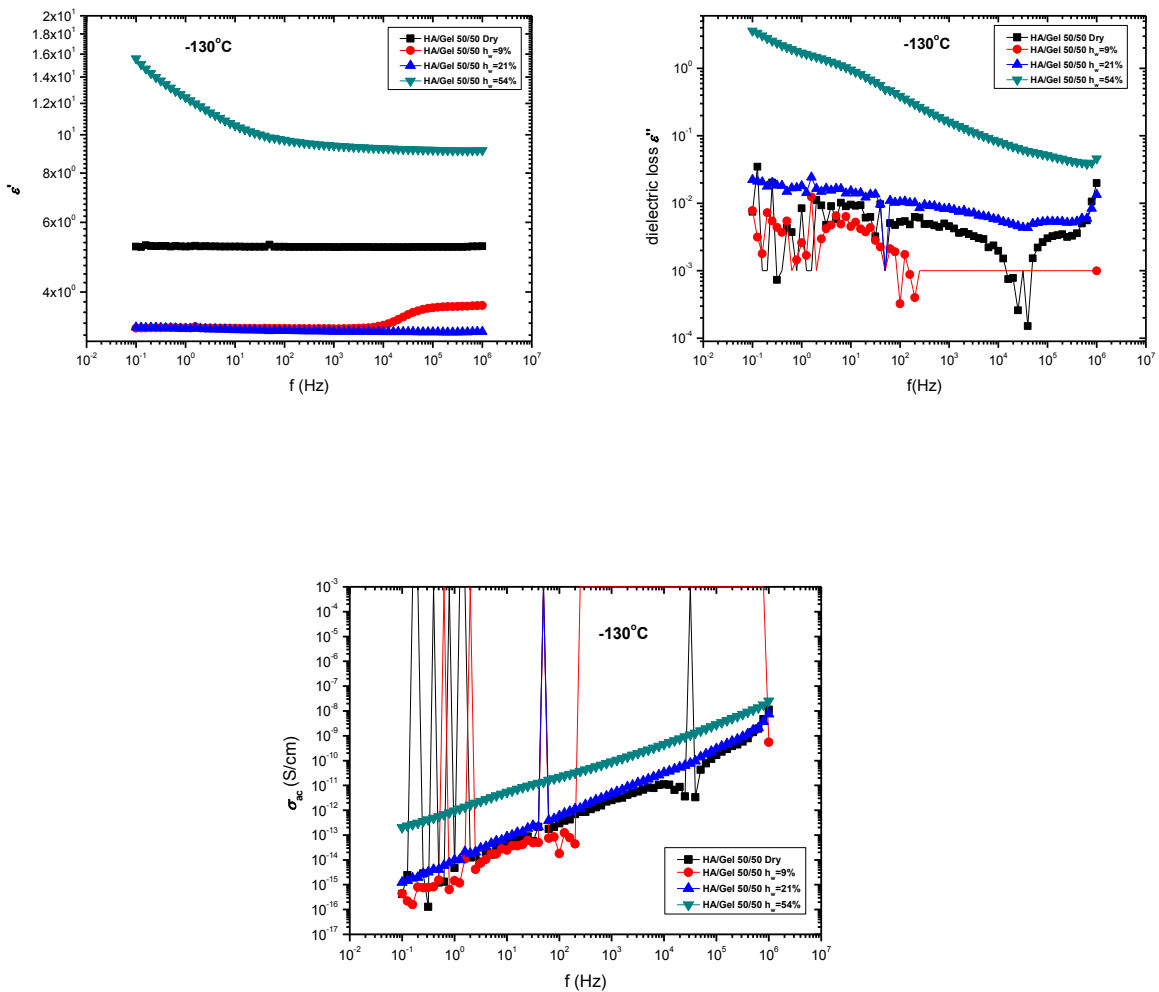
Σε θερμοκρασία -40°C (Σχήμα 3.33), στο διάγραμμα του ϵ' το δείγμα με ποσοστό νερού 32% τείνει να εμφανίσει σκαλοπάτι μηχανισμού, κάτι που δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί στο διάγραμμα των διηλεκτρικών απωλειών από κάποια κορυφή. Εντούτοις, στο αντίστοιχο δείγμα με ποσοστό 52%, ο ήδη υπάρχον μηχανισμός, φαίνεται πως έχει μετατοπιστεί σε υψηλότερη συχνότητα (10^2Hz), ενώ ο δεύτερος πιθανός μηχανισμός που παρατηρήθηκε (σε θερμοκρασία -90°C) φαίνεται να έχει εξασθενήσει. Τέλος, στο διάγραμμα αγωγιμότητας για ποσοστό νερού 32%, τείνει να εμφανιστεί πλατώ dc αγωγιμότητας σε εύρος συχνοτήτων $10-10^3\text{Hz}$. Το δείγμα με ποσοστό 52%, εμφανίζει παρόμοια αλλά σημαντικά πιο αργή συμπεριφορά.

Υδρογέλες HA/Gel 50/50



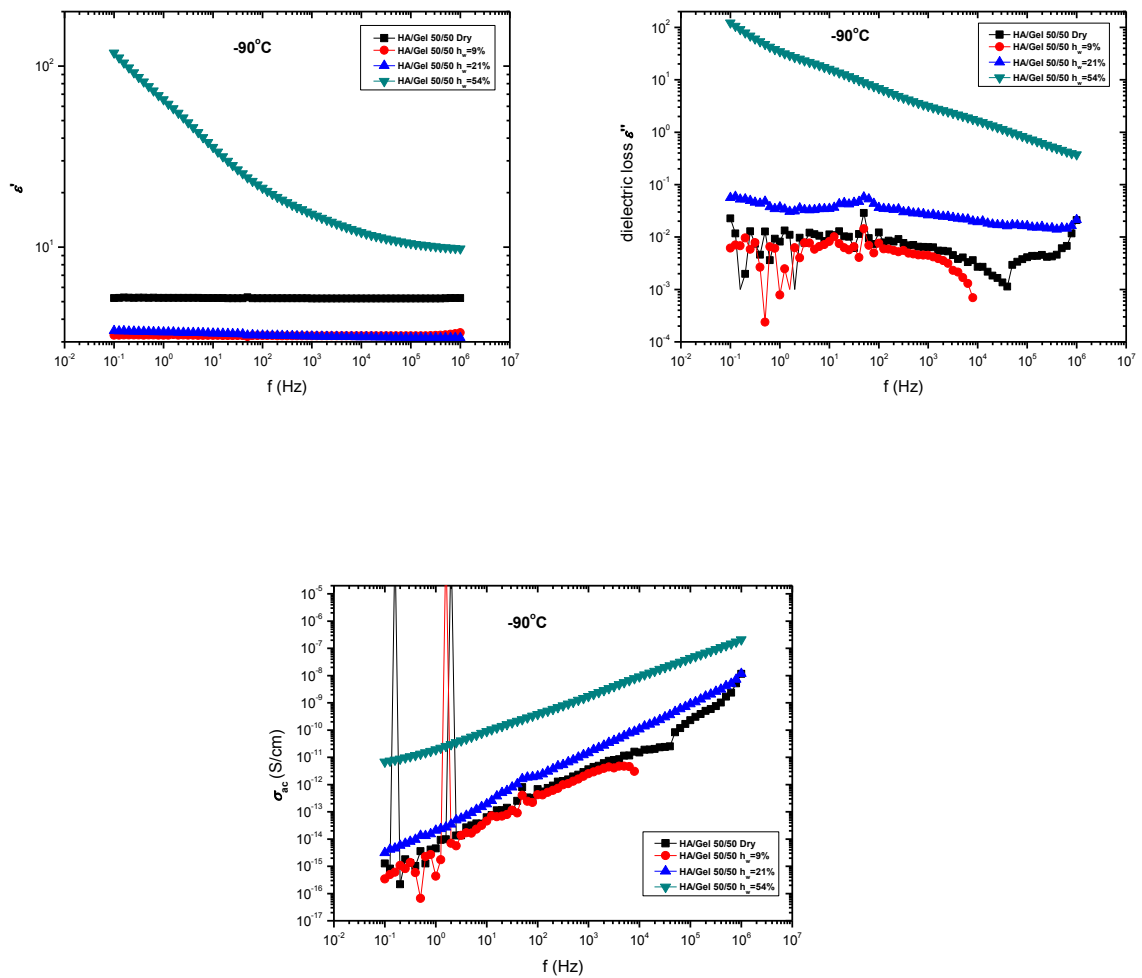
Σχήμα 3.34: Διάγραμμα G' συναρτήσεως της θερμοκρασίας σε 4 διαφορετικές συχνότητες για το HA/Gel 50/50 κατά την ψύξη (γεμάτα σύμβολα) και κατά τη θέρμανση (ανοιχτά σύμβολα) για διαφορετικά ποσοστά νερού, τα οποία αναγράφονται στα διαγράμματα.

Στην υδρογέλη HA/Gel 50/50, και υδάτωσης $h_w=54\%$ (Σχήμα 3.34), παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά των καμπυλών ψύξης με την αντίστοιχη της 70/30 υδάτωσης $h_w=52\%$ (Σχήμα 3.30), γεγονός κατανοητό εξαιτίας της ίδιας ποσότητας απορροφημένου νερού. Στην υδρογέλη HA/Gel 50/50, κρυστάλλωση εμφανίζεται στους -17 °C, ενώ η τήξη αργεί να εκδηλωθεί και εν τέλει παρατηρείται σε θερμοκρασίες κοντά στους 0 °C. Η τήξη στην εν λόγω θερμοκρασία αντιστοιχεί στην περίπτωση του ελεύθερου νερού, γεγονός που σημαίνει ότι εντός του δικτύου είχε σχηματιστεί πάγος εξαιτίας ελεύθερου (bulk) νερού.



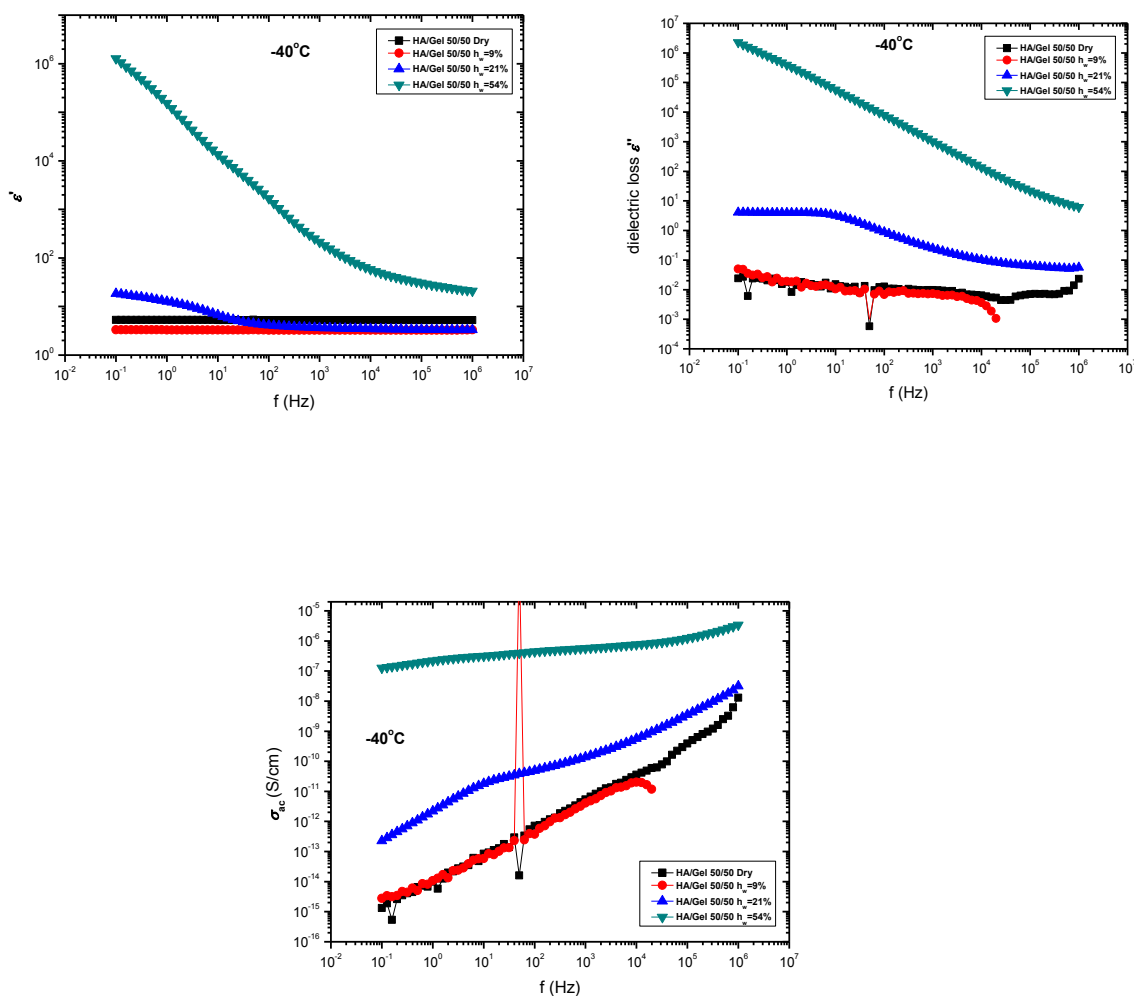
Σχήμα 3.35: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -130^{\circ}\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης HA/Gel 50/50.

Στην περίπτωση των διαγραμμάτων σε θερμοκρασία -130°C (Σχήμα 3.35), τα δείγματα με ποσοστό νερού 9% και 21%, παρουσιάζουν χαμηλότερο σήμα στο ϵ' σε σχέση με το άνυδρο. Μία πιθανή εξήγηση, είναι τα εν λόγω δείγματα απώλεσαν άμεσα την ποσότητα νερού που είχαν απορροφήσει. Το δείγμα HA/Gel 50/50 με $h_w=54\%$, φαίνεται να εμφανίζει κορυφή διηλεκτρικών απωλειών σε συχνότητα 10Hz στο αντίστοιχο διάγραμμα. Από άποψη αγωγιμότητας, το προαναφερθέν δείγμα εμφανίζει μεγαλύτερες τιμές από τα υπόλοιπα, ωστόσο κανένα δεν χαρακτηρίζεται από πλατώ dc αγωγιμότητας, ένδειξη απουσίας των φορέων της.



Σχήμα 3.36: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -90^\circ\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης HA/Gel 50/50.

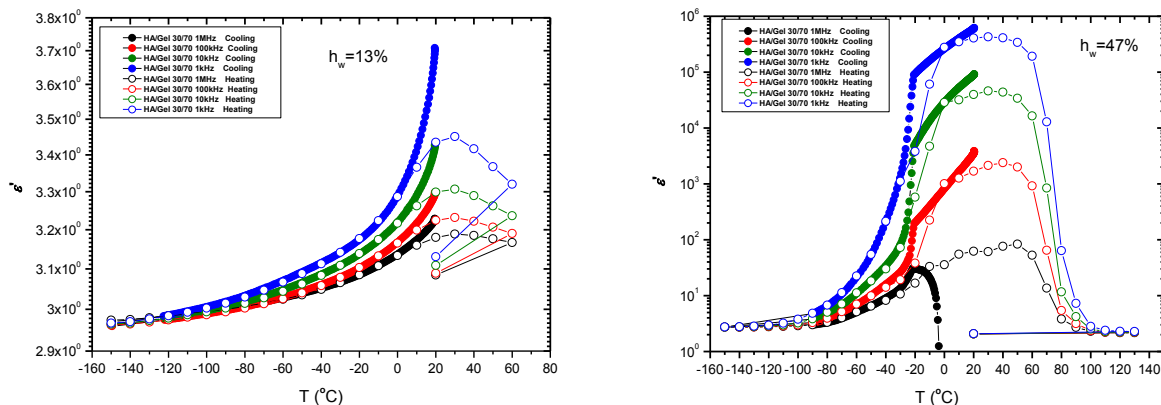
Όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε στους -90°C (Σχήμα 3.36), η συμπεριφορά των δειγμάτων παρέμεινε αμετάβλητη σε όλα τα διαγράμματα ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} . Ειδικότερα, το άνυδρο δείγμα διατήρησε το υψηλότερο σήμα στο ϵ' σε σχέση με τα υδατωμένα με 9% και 21% ποσοστό νερού, ενώ ο μηχανισμός του δείγματος με $h_w=54\%$, παρέμεινε στις ίδιες τιμές συχνοτήτων. Τέλος, το δείγμα με $h_w=21\%$ εμφανίζει κορυφή στο διάγραμμα διηλεκτρικών απωλειών, η οποία δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί με βάση την εικόνα του ίδιου δείγματος στο διάγραμμα ϵ' .



Σχήμα 3.37: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -40^\circ\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσεων της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης HA/Gel 50/50.

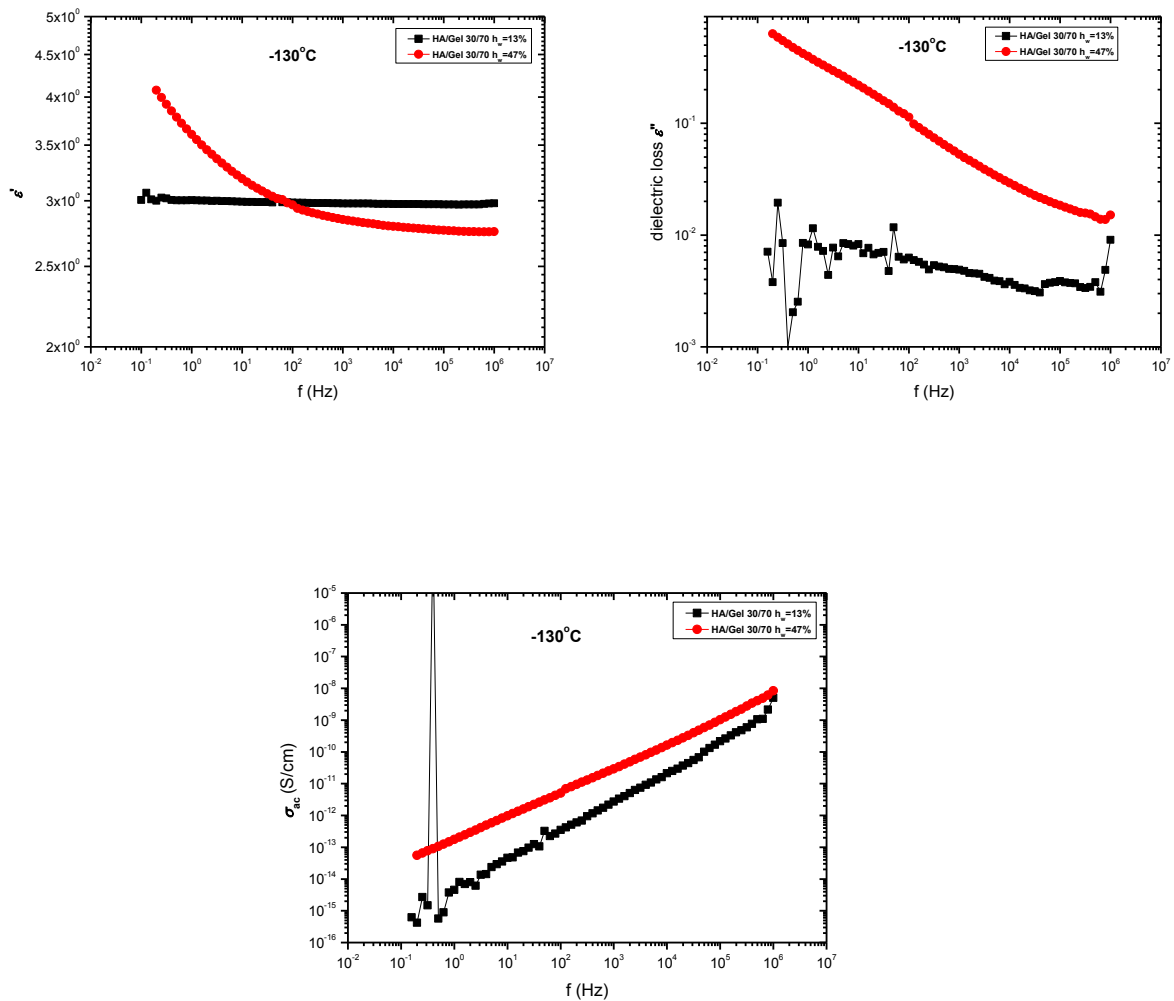
Καταλήγοντας στη θερμοκρασία των -40°C (Σχήμα 3.37), διαπιστώνει κανείς ότι απουσιάζει πλέον ο μηχανισμός που είχε εμφανιστεί στο δείγμα με ποσοστό νερού 54%. Αντίθετα, στο αντίστοιχο με ποσοστό 21%, φαίνεται πως εκδηλώνεται μηχανισμός σε συχνότητα 10Hz, συμπέρασμα που εξάγεται κρίνοντας από τη συμπεριφορά των ανάλογων διαγραμμάτων ϵ' και ϵ'' . Τέλος, από πλευράς αγωγιμότητας, το προαναφερθέν τείνει να εμφανίσει πλατώ dc αγωγιμότητας (στο εύρος συχνοτήτων $10-10^2\text{Hz}$), ενώ η υδρογέλη με το μεγαλύτερο ποσοστό υδάτωσης ($hw=54\%$) το έχει ήδη εμφανίσει μεταξύ $1-10^4\text{Hz}$.

Υδρογέλες HA/Gel 30/70



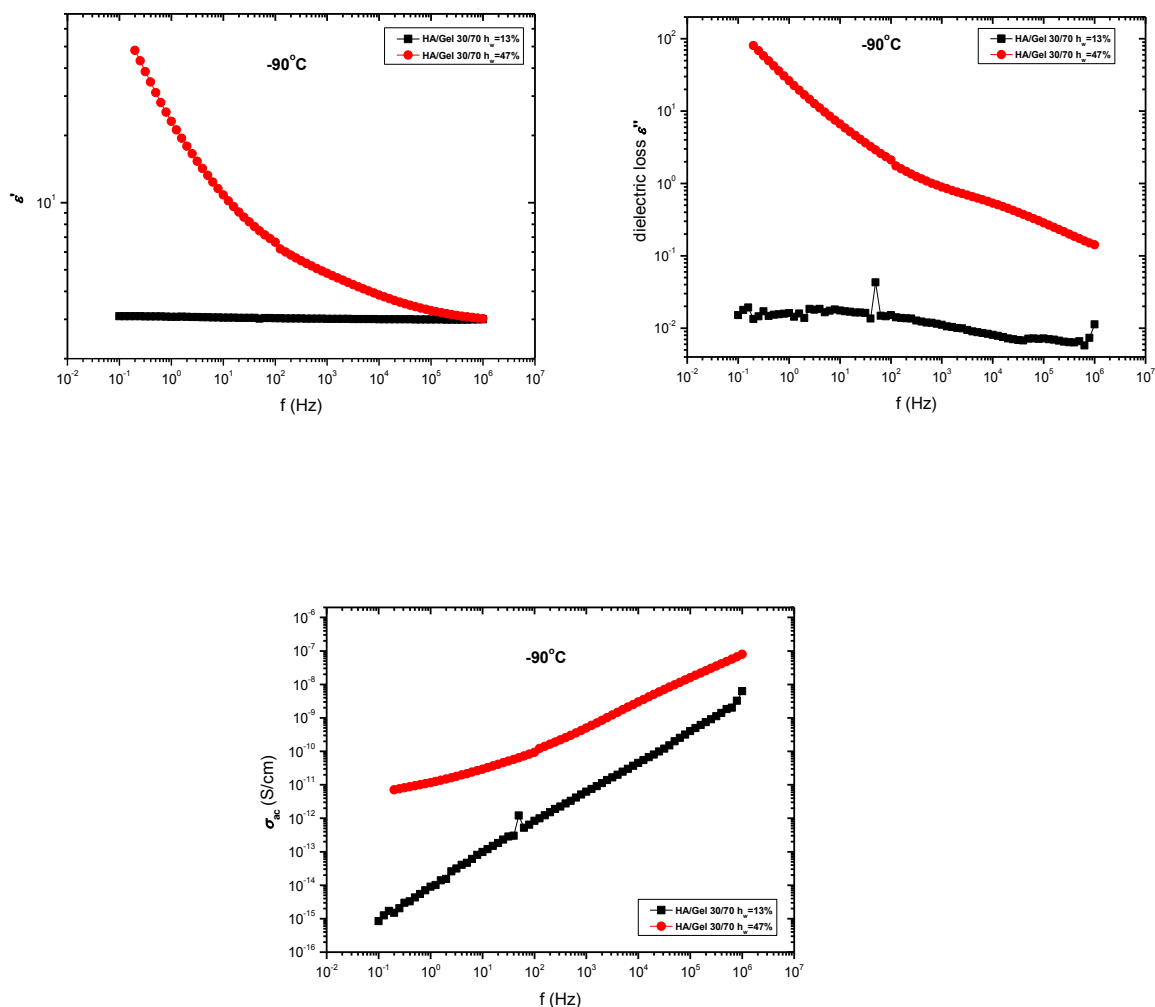
Σχήμα 3.38: Διάγραμμα ϵ' συναρτήσει της θερμοκρασίας σε 4 διαφορετικές συχνότητες για το HA/Gel 30/70 κατά την ψύξη (γεμάτα σύμβολα) και κατά τη θέρμανση (ανοιχτά σύμβολα) για διαφορετικά ποσοστά νερού, τα οποία αναγράφονται στα διαγράμματα.

Προχωρώντας στην υδρογέλη HA/Gel 30/70, στην περίπτωση όπου $h_w = 13\%$ (Σχήμα 3.38), δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή του ϵ' κατά την ψύξη που να σηματοδοτεί την ύπαρξη μηχανισμού διηλεκτρικής αποκατάστασης, ή μετάβαση φάσης. Κατά τη θέρμανση, παρατηρείται μεταβολή ανεξάρτητη της συχνότητας σε θερμοκρασία 20°C. Όταν το ποσοστό νερού στο υλικό αυξήθηκε σε 47%, παρατηρήθηκε φαινόμενο κρυστάλλωσης κατά την ψύξη, σε θερμοκρασία -20°C. Κατά τη θέρμανση, μεταβολή στο ϵ' παρουσιάστηκε στη θερμοκρασία των 0°C, που υποδηλώνει την τήξη του σχηματισμένου κατά την ψύξη πάγου. Συμπεραίνει κανείς ότι το νερό που τήχθηκε, είχε σχηματίσει πάγο εξαγωνική δομής, όντας ελεύθερο στο πολυμερικό δίκτυο.



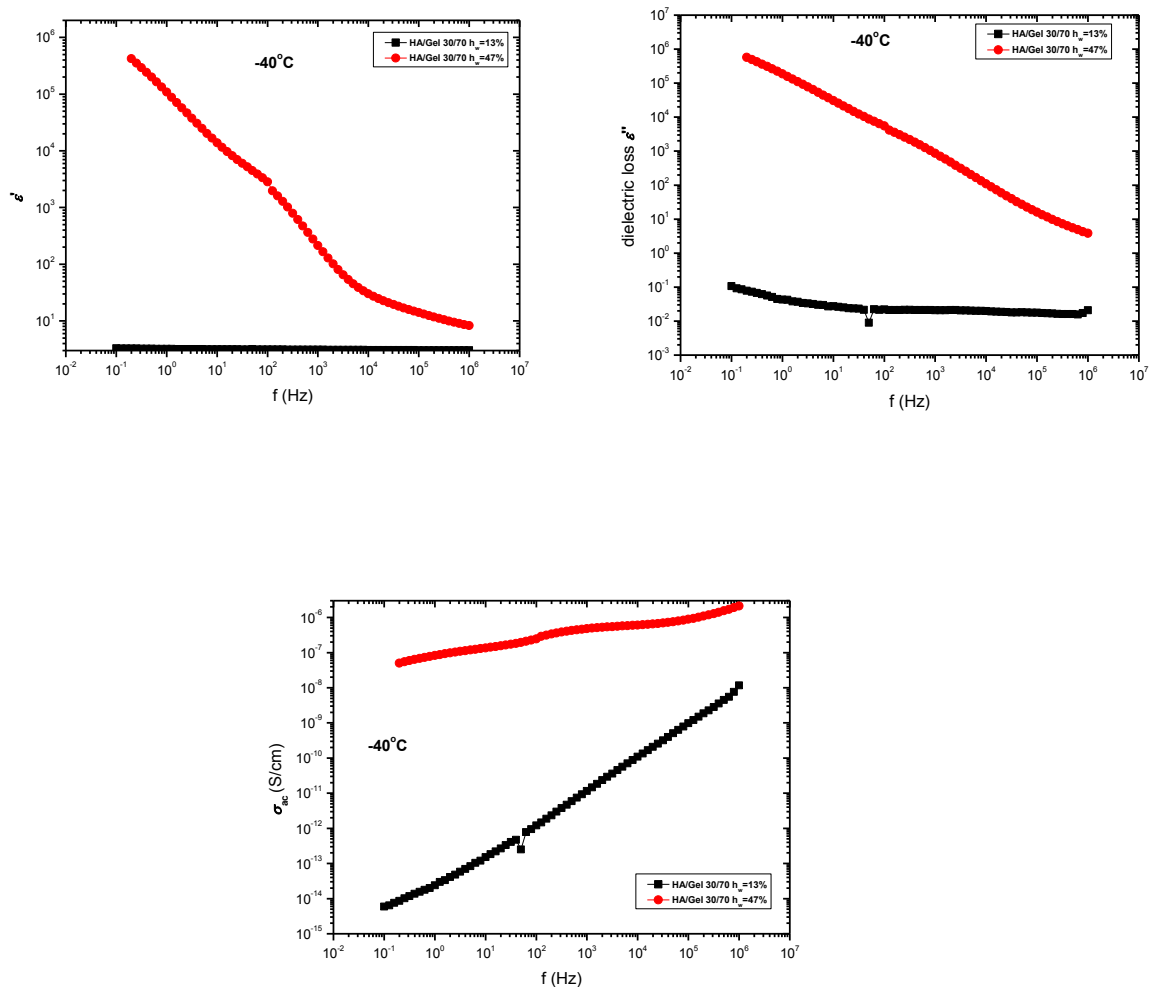
Σχήμα 3.39: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -130\text{ }^{\circ}\text{C}$ των, ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης HA/Gel 30/70.

Ξεκινώντας από τη θερμοκρασία των $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Σχήμα 3.39), δεν παρατηρείται κάποιος μηχανισμός στα διαγράμματα ϵ' και ϵ'' , σε καμία από τις δύο περιπτώσεις υδάτωσης. Η υποψία κορυφής διηλεκτρικών απωλειών σε συχνότητα 10^2 Hz για το ποσοστό 47%, σίγουρα δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί από τη συμπεριφορά του υλικού στο ϵ' . Όσον αφορά στην αγωγιμότητα, το προαναφερθέν δείγμα παρουσιάζει ελαφρώς μεγαλύτερες τιμές από το αντίστοιχο με ποσοστό νερού 13%, ωστόσο αμφότερα δεν εκδηλώνουν πλατώ dc αγωγιμότητας.



Σχήμα 3.40: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -90^\circ\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης HA/Gel 30/70.

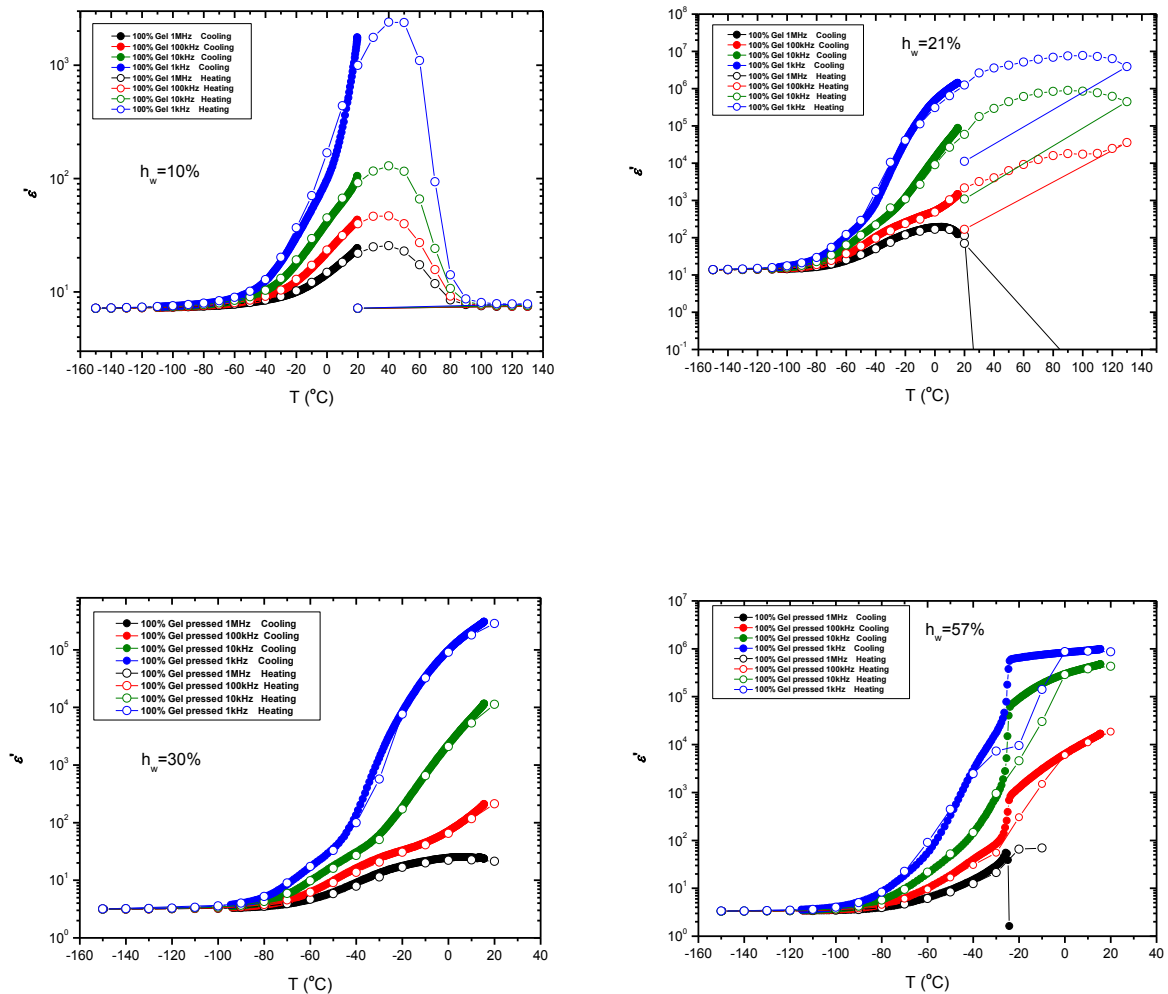
Παρόμοια συμπεριφορά από πλευράς ϵ' και ϵ'' παρατηρείται και για θερμοκρασία -90°C (Σχήμα 3.40). Το δείγμα μεγαλύτερου ποσοστού υδάτωσης, έχει υψηλότερο σήμα, γεγονός λογικό. Στην περίπτωση της αγωγιμότητας, το συγκεκριμένο δείγμα, τείνει να εμφανίσει το πλατώ, αρχής γενομένης από συχνότητα 0.1 Hz .



Σχήμα 3.41: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -40^\circ\text{C}$ των, ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσεων της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης HA/Gel 30/70.

Με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας (-40°C , Σχήμα 3.41), στο διάγραμμα του ϵ' , η υδρογέλη με $h_w = 47\%$ εμφανίζει σκαλοπάτι σε συχνότητα 10^2Hz , γεγονός που δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί στο διάγραμμα του ϵ'' μέσω κορυφής. Μία πιθανή εξήγηση ίσως να είναι η ύπαρξη περισσότερων της μίας κορυφής διηλεκτρικών απωλειών που επικαλύπτονται. Όσον αφορά στην αγωγιμότητα, το εν λόγω δείγμα εμφανίζει dc αγωγιμότητα στο εύρος συχνοτήτων $10^2 - 10^5\text{Hz}$. Η αντίστοιχη υδρογέλη μικρότερου ποσοστού νερού, δεν παρουσιάζει κάτι το αξιοσημείωτο για καμία από τις τρεις ποσότητες.

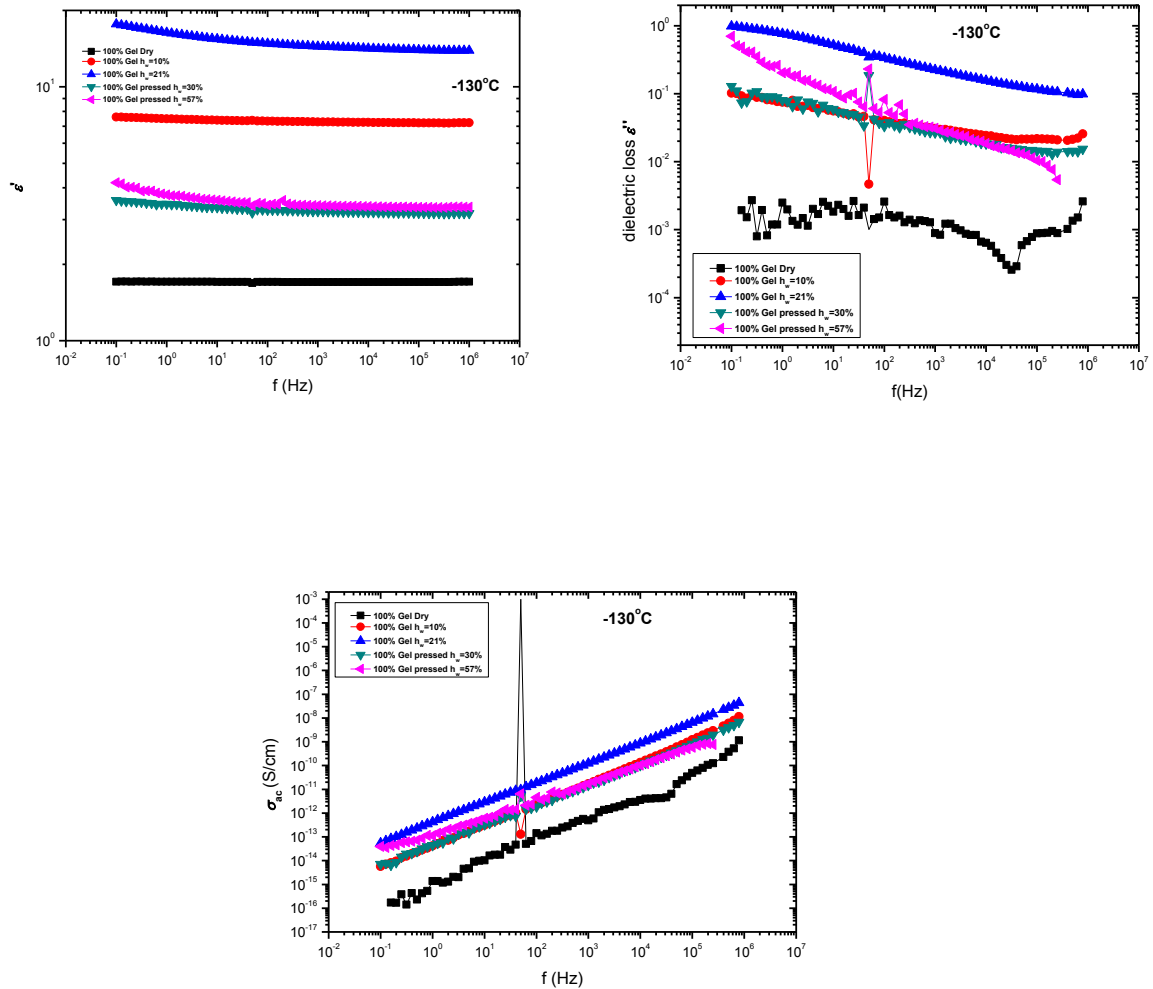
Υδρογέλες 100% Gel



Σχήμα 3.42: Διάγραμμα ϵ'' συναρτήσεως της θερμοκρασίας σε 4 διαφορετικές συχνότητες για την Gel κατά την ψύξη (γεμάτα σύμβολα) και κατά τη θέρμανση (ανοιχτά σύμβολα) για διαφορετικά ποσοστά νερού, τα οποία αναγράφονται στα διαγράμματα.

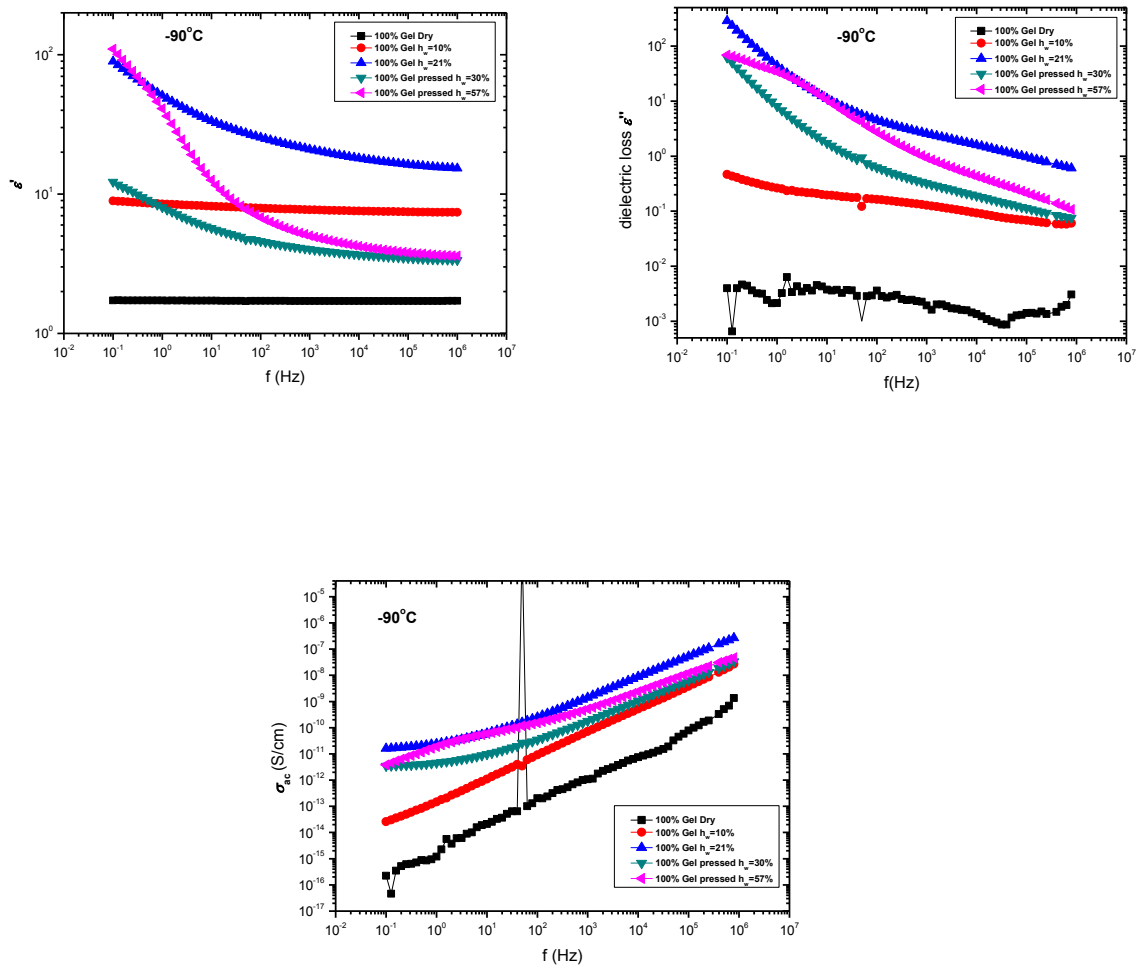
Στην υδρογέλη που αποτελείται εξολοκλήρου από ζελατίνη, Gel, (Σχήμα 3.42), δεν παρατηρείται κάποιος μηχανισμός διηλεκτρικής αποκατάστασης ή μετάβαση φάσης κατά την ψύξη ή τη θέρμανση για τα ποσοστά νερού 10%, 21% και 30%. Αντίθετα, σε ποσοστό νερού $h_w=57\%$, ξεκινώντας από την ψύξη, διακρίνει κανείς φαινόμενο κρυστάλλωσης του νερού στη θερμοκρασία των -23°C . Το φαινόμενο γίνεται αντιληπτό, μέσω της μεταβολής το ϵ'' σε εκείνη τη θερμοκρασία, ανεξάρτητα από τη συχνότητα. Κατά τη θέρμανση, μεταβολή παρατηρείται στη θερμοκρασία των 0°C , όπου συμβαίνει η τήξη του πάγου που είχε σχηματιστεί κατά την ψύξη. Με βάση τη

θερμοκρασία στην οποία σημειώνεται, πρόκειται για τήξη εξαγωγικού πάγου που οφείλεται σε ελεύθερο (bulk) νερό που βρισκόταν στο εσωτερικό του δικτύου.



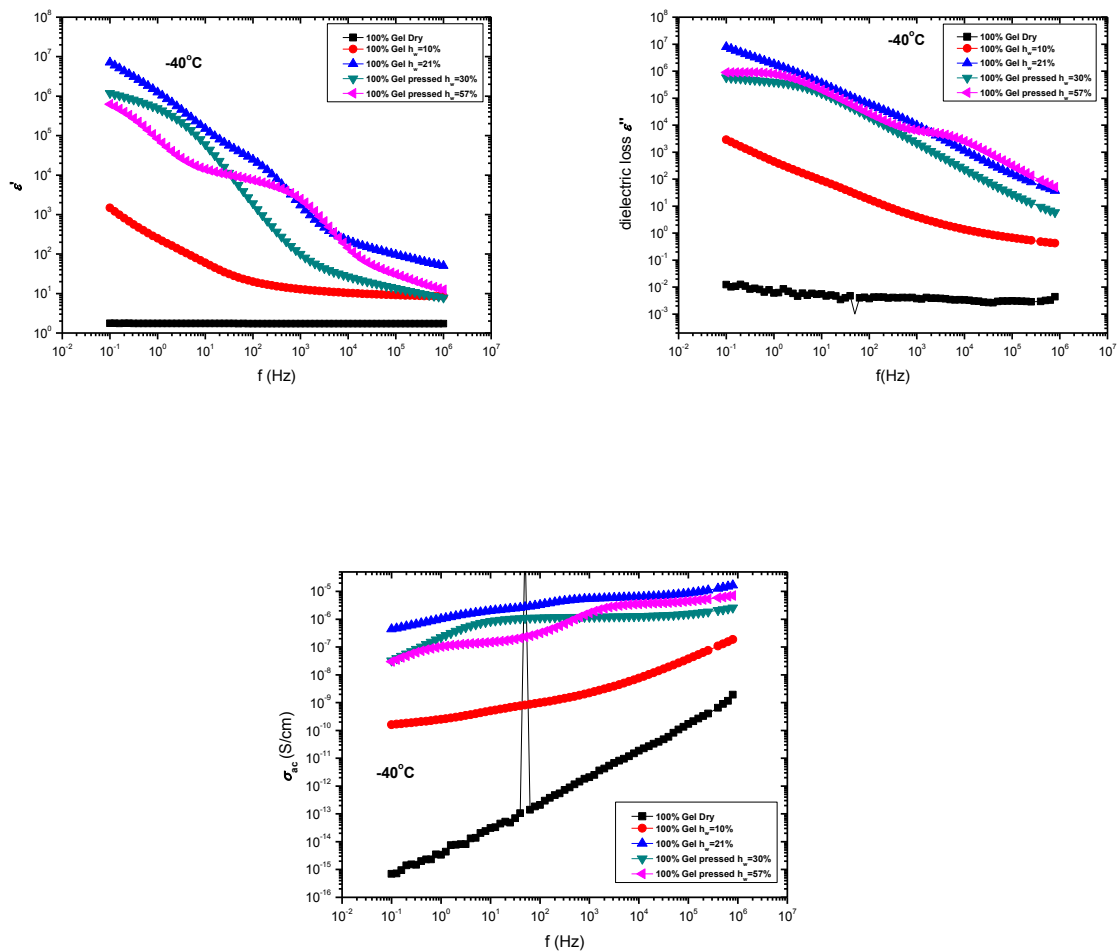
Σχήμα 3.43: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -130^{\circ}\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσει της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης καθαρής Gel.

Στη θερμοκρασία των -130°C δεν παρουσιάζονται ενδείξεις ύπαρξης μηχανισμού στο δείγμα καθαρής Gel, σε καμία από τις υδατώσεις που επιτεύχθηκαν (διαγράμματα ϵ' και ϵ''), ούτε και dc αγωγιμότητας στο αντίστοιχο διάγραμμα.



Σχήμα 3.44: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -90^\circ\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσεων της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης καθαρής Gel.

Στη θερμοκρασία των -90°C (Σχήμα 3.44) το μόνο δείγμα που παρουσιάζει μηχανισμό διηλεκτρικής αποκατάστασης είναι αυτό με το μεγαλύτερο ποσοστό υδάτωσης ($h_w=57\%$). Ο μηχανισμός γίνεται αντιληπτός μέσω της κορυφής διηλεκτρικών απωλειών σε συχνότητα 1Hz στο διάγραμμα ϵ'' . Τα δείγματα με υδατώσεις $h_w=21\%$ και $h_w=30\%$, παρουσιάζουν πλατώ dc αγωγιμότητας, αμφότερα στο εύρος συχνοτήτων 0.1-1Hz.

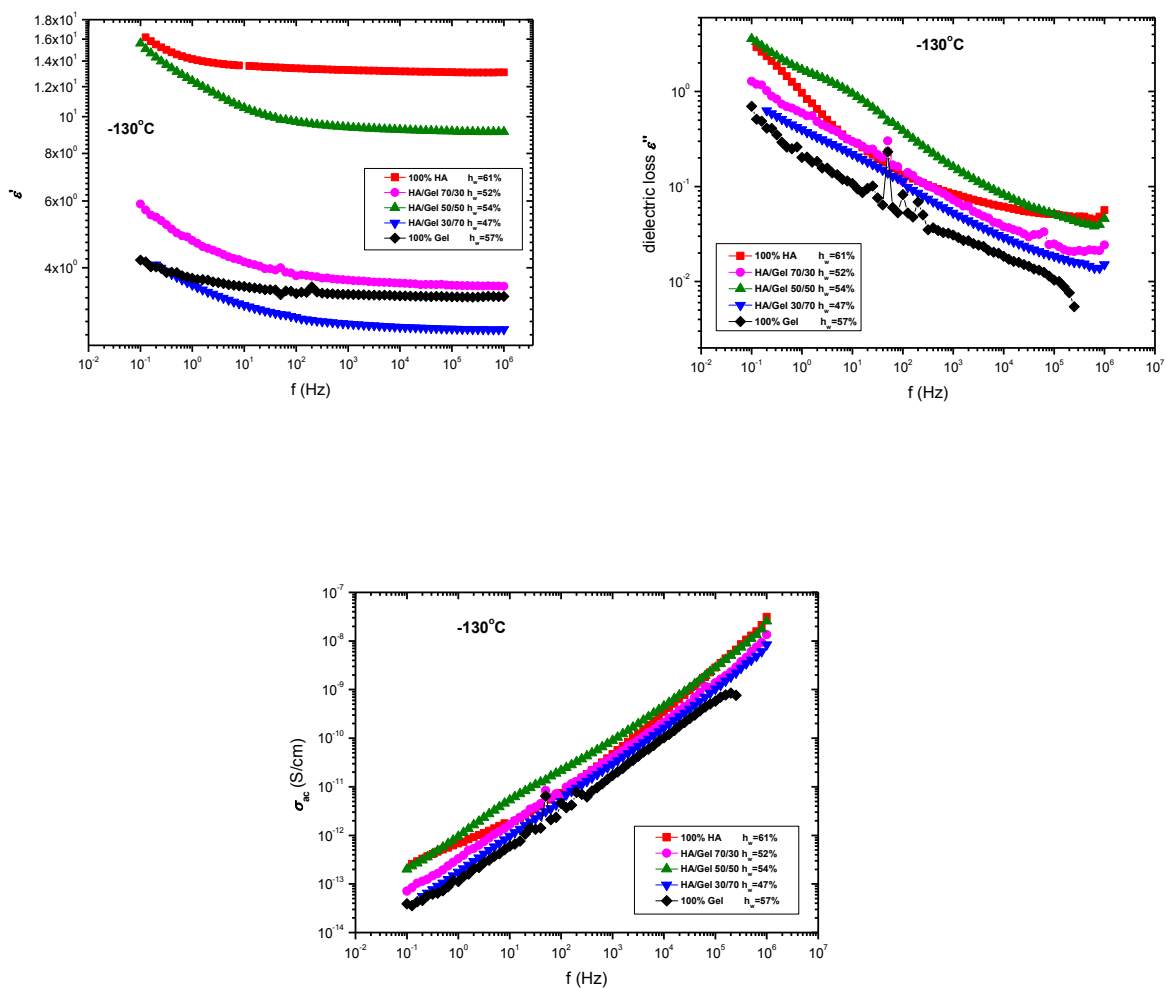


Σχήμα 3.45: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -40^{\circ}\text{C}$ των, ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσεων της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση της υδρογέλης καθαρής Gel.

Τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα συναντώνται σε θερμοκρασία -40°C (Σχήμα 3.45). Στο διάγραμμα ϵ' , όλα τα δείγματα πέραν του άνυδρου και του $h_w=10\%$ παρουσιάζουν βήμα, ενδεικτικό της ύπαρξης μηχανισμού. Ξεκινώντας από τον ήδη γνωστό από προηγούμενως μηχανισμό της υδρογέλης με ποσοστό νερού 57%, παρατηρεί κανείς ότι έχει μετατοπιστεί σε υψηλότερες συχνότητες (10^3Hz). Σε ποσοστά υδάτωσης 21% και 30%, παρατηρείται βήμα σε συχνότητες 1 και 10^2Hz αντίστοιχα. Οι εν λόγω συμπεριφορές μπορούν να επιβεβαιωθούν και στο διάγραμμα του ϵ'' , πλην της περίπτωσης του 21%. Τέλος, από άποψη αγωγιμότητας, όλα τα δείγματα φαίνεται πως διαθέτουν φορείς αγωγιμότητας εκτός από το άνυδρο. Ειδικότερα, για ποσοστό νερού 10%, υπάρχει εμφανή τάση σχηματισμού πλατώ στο εύρος $0.1-10^3\text{Hz}$, ενώ για μεγαλύτερα ποσοστά νερού το πλατώ εμφανίζεται σε υψηλότερες συχνότητες.

Συγκριτικά διαγράμματα

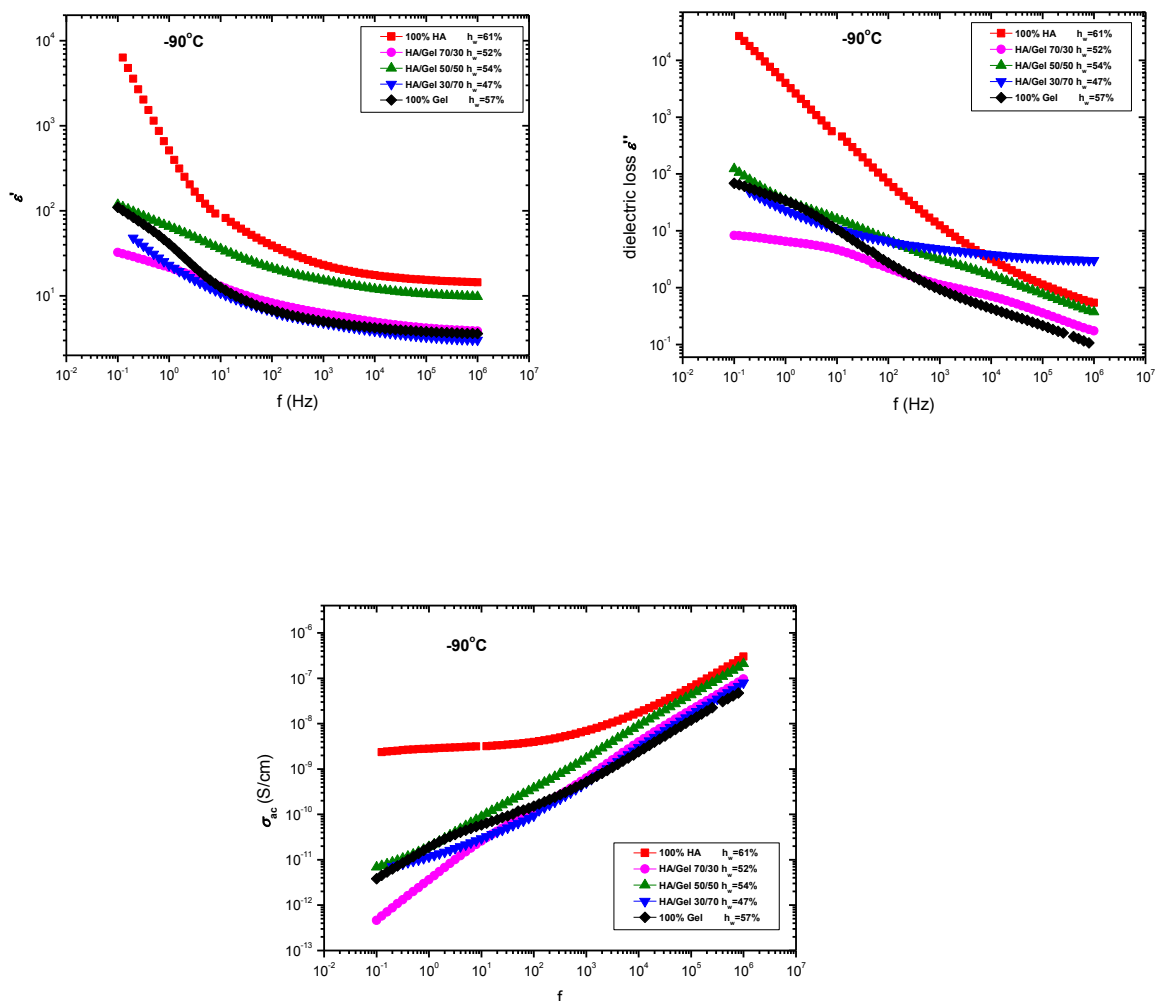
Κατόπιν ανάλυσης των συγκριτικών διαγραμμάτων ψύξης – θέρμανσης των δειγμάτων, καταλήγει κανείς σε μία σειρά δειγμάτων υδρογελών HA/Gel, με παραπλήσια κλάσματα νερού, στις οποίες παρατηρείται κρυστάλλωση. Πρόκειται για τις 100% HA με $h_w=61\%$ ($T_c=-30\text{ }^\circ\text{C}$), HA/Gel 70/30 με $h_w=52\%$ ($T_c=-27\text{ }^\circ\text{C}$), HA/Gel 50/50 με $h_w=54\%$ ($T_c=-17\text{ }^\circ\text{C}$), HA/Gel 30/70 με $h_w=47\%$ ($T_c=-20\text{ }^\circ\text{C}$) και 100% Gel με $h_w=57\%$ ($T_c=-23\text{ }^\circ\text{C}$). Απαραίτητη κρίνεται η σύγκριση των ποσοτήτων ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} για τις συγκεκριμένες υδρογέλες, ως προς τη σύστασή τους, στις θερμοκρασίες $-130\text{ }^\circ\text{C}$, $-90\text{ }^\circ\text{C}$ και $-40\text{ }^\circ\text{C}$.



Σχήμα 3.46: Ισόθερμα διαγράμματα για $T= -130\text{ }^\circ\text{C}$ των, ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσεως της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση των δειγμάτων HA/Gel που κρυσταλλώθηκαν.

Ξεκινώντας από τη θερμοκρασία των $-130\text{ }^\circ\text{C}$ (Σχήμα 3.46), παρατηρεί κανείς παρόμοια απόκριση στο εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο από τα δείγματα HA/Gel

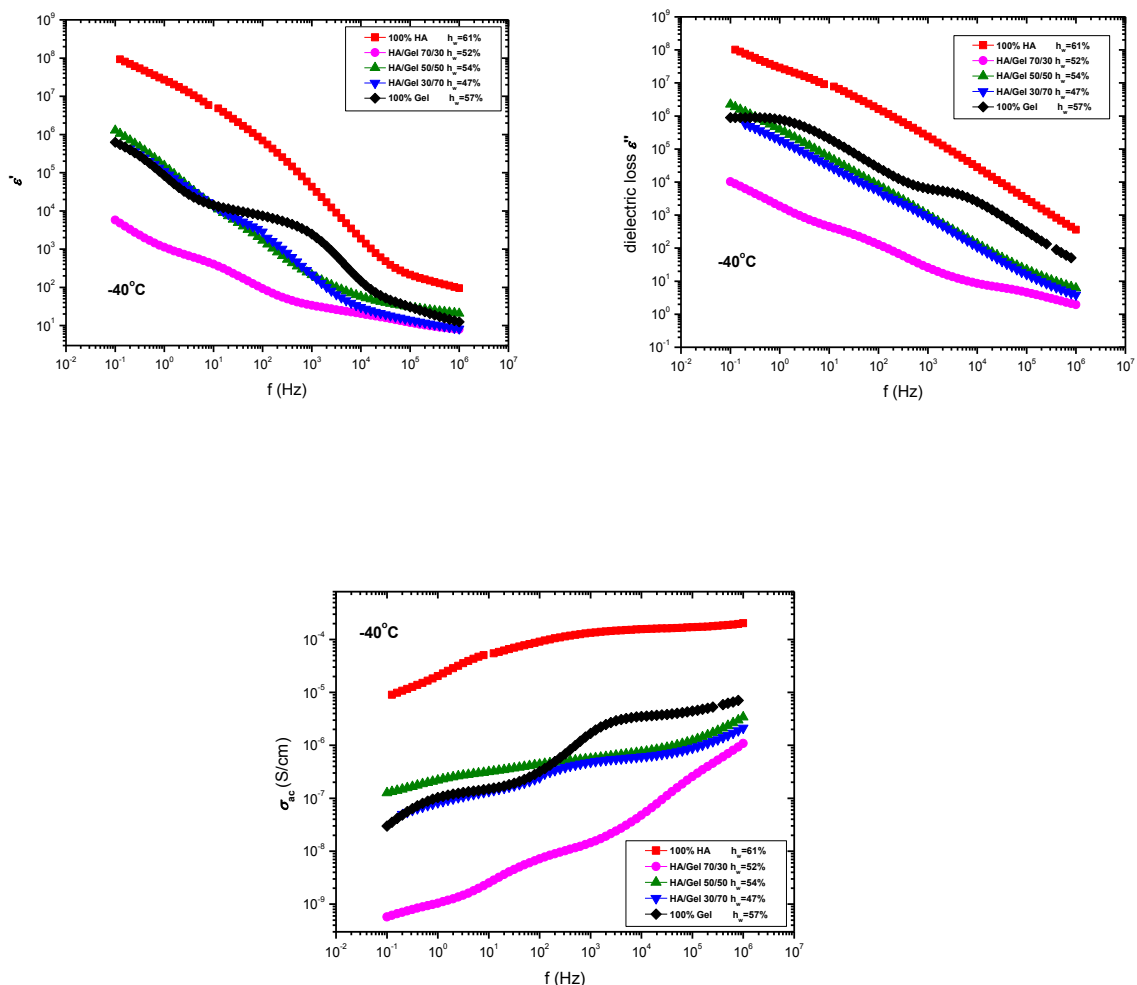
70/30, 30/70 και την καθαρή Gel, ενώ η συμπεριφορά του καθαρού HA και του HA/Gel 50/50 φαίνεται να διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα (διάγραμμα ε'). Συνεχίζοντας στο διάγραμμα ε'', φαίνεται πως το καθαρό HA, έχει τελείως διαφορετική συμπεριφορά από τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ το 50/50 εμφανίζει κορυφή διηλεκτρικών απωλειών σε συχνότητα 10Hz. Όσον αφορά στην αγωγιμότητα, όλα τα δείγματα παρουσιάζουν ac αγωγιμότητα, ενώ το καθαρό HA, ξεχωρίζει και πάλι, έχοντας την τάση να εμφανίζει πλατώ dc αγωγιμότητας σε χαμηλές συχνότητες. Ο μηχανισμός που εντοπίστηκε στο δείγμα 50/50, είναι εμφανής και εδώ, μέσω της συνεισφοράς του σε συχνότητα 10Hz.



Σχήμα 3.47: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -90^\circ\text{C}$ των, ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσεων της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση των δειγμάτων HA/Gel που κρυσταλλώθηκαν.

Με την αύξηση της θερμοκρασία στους -90°C (Σχήμα 3.47), όλα τα δείγματα πλην του καθαρού HA εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά καταρχάς στα διαγράμματα ϵ'

και ϵ'' . Από πλευράς μηχανισμών, το 50/50 εξακολουθεί να εμφανίζει μηχανισμό σε συχνότητα 10Hz. Εξάλλου, κορυφές διηλεκτρικών απωλειών παρατηρούνται πλέον και στην καθαρή Gel σε συχνότητα 1Hz, στο αντίστοιχο διάγραμμα. Επιπλέον, το δείγμα 70/30, φαίνεται πως έχει εκδηλώσει δύο κορυφές μηχανισμών σε συχνότητες 10 και 10^4 Hz. Στο διάγραμμα αγωγιμότητας, παρατηρείται η συνεισφορά των μηχανισμών στις συχνότητες όπου παρατηρήθηκαν. Το καθαρό HA, εξακολουθεί να παρουσιάζει διαφορετική απόκριση στο πεδίο σε σχέση με τα υπόλοιπα, ενώ η καθαρή Gel και το 30/70 δείχνουν την τάση να εμφανίσουν πλατώ dc αγωγιμότητας σε χαμηλές συχνότητες.



Σχήμα 3.48: Ισόθερμα διαγράμματα για $T = -40^\circ\text{C}$ των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} συναρτήσεων της συχνότητας διεγείροντος ηλεκτρικού πεδίου για την περίπτωση των δειγμάτων HA/Gel που κρυσταλώθηκαν.

Τέλος, σε θερμοκρασία -40°C (Σχήμα 3.48) πέραν του καθαρού HA, διαχωρίζεται πλέον και το 70/30 από τα υπόλοιπα δείγματα, κρίνοντας από τη συμπεριφορά του και στα τρία διαγράμματα των ϵ' , ϵ'' και σ_{ac} . Σε αυτό ενδεχομένως συντελεί η αλλαγή

φάσης που υφίσταται το εν λόγω δείγμα κατά τη θέρμανση, όπως αυτή είχε παρατηρηθεί προηγουμένως (Σχήμα 3.30). Μηχανισμοί φαίνεται να εμφανίζονται σε όλα τα δείγματα, πέραν του 50/50. Συγκεκριμένα, στρέφοντας την προσοχή στο διάγραμμα ε'', μπορεί κανείς να παρατηρήσει κορυφή στα 10Hz για το HA, στα 10²Hz και στα 10⁵Hz για το 70/30, στα 10²Hz για το 30/70 ενώ δύο μηχανισμούς διαθέτει και η καθαρή Gel, σε συχνότητες, 1 και 10⁴ Hz. Στο διάγραμμα αγωγιμότητας, η καθαρή Gel και τα μίγματα HA/Gel 30/70 και 50/50 φαίνεται να έχουν παρόμοια συμπεριφορά και να εκδηλώνουν πλατώ dc αγωγιμότητας. Η συνεισφορά των μηχανισμών στα εκάστοτε δείγματα είναι και εδώ ορατή. Αγωγιμότητα dc παρουσιάζει και το καθαρό HA στο εύρος συχνοτήτων, 10³ – 10⁶Hz.

Φαίνεται ότι, όταν οι υδρογέλες περιέχουν παραπλήσια ποσοστά νερού, τα μίγματα HA/Gel και κυρίως τα 30/70 και 50/50, τείνουν να υιοθετήσουν τη συμπεριφορά της καθαρής Gel, έναντι του καθαρού HA.

3.3 Περιβάλλοντα Σχετικής Υγρασίας

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, μελετήθηκε η ικανότητα απορρόφησης νερού των υδρογελών που αποτελούνταν αμιγώς από ζελατίνη και υαλουρονικό οξύ αντίστοιχα, καθώς και τα μίγματά τους. Για τη μελέτη της εν λόγω ιδιότητας, τα δείγματα έπρεπε να τοποθετηθούν σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας, RH, ούτως ώστε να απορροφήσουν μόρια νερού. Υπάρχουν δύο τρόποι έκφρασης του ποσοστού του απορροφούμενου νερού:

- Υπολογισμός ποσοστού υδάτωσης ως προς την αρχική, άνυδρη μάζα του δείγματος (h_d %):

$$h_d \% = \frac{\Delta m}{m_d} \cdot 100\%$$

όπου Δm η μεταβολή της μάζας του δείγματος, που ουσιαστικά αντιστοιχεί στη μάζα του προσροφημένου νερού και m_d η αρχική, άνυδρη μάζα του δείγματος. Το συγκεκριμένο ποσοστό υδάτωσης είναι επίσης γνωστό και ως «Equilibrium Water Content» (EWC).

- Υπολογισμός ποσοστού υδάτωσης ως προς την τελική, υδατωμένη μάζα του δείγματος (h_w %):

$$h_w \% = \frac{\Delta m}{m_w} \cdot 100\%$$

όπου Δm η μεταβολή της μάζας του δείγματος, που ουσιαστικά αντιστοιχεί στη μάζα του προσροφημένου νερού και m_w η τελική υδατωμένη μάζα του δείγματος.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές με σκοπό τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των υδρογελών με περιβάλλον σχετικής υγρασίας:

- **Τοποθέτηση δειγμάτων σε περιβάλλον μεμονωμένης σχετικής υγρασίας.**

Στη συγκεκριμένη τεχνική, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε τρία διαφορετικά περιβάλλοντα σχετικής υγρασίας, 65%, 85% και 98% και θερμοκρασίας 25 °C. Τα δείγματα παρέμειναν εκεί για διάστημα 7 ημερών, με σκοπό να ισορροπήσουν. Στη συνέχεια μετρήθηκαν οι μάζες τους και υπολογίστηκαν τα ποσοστά απορρόφησης

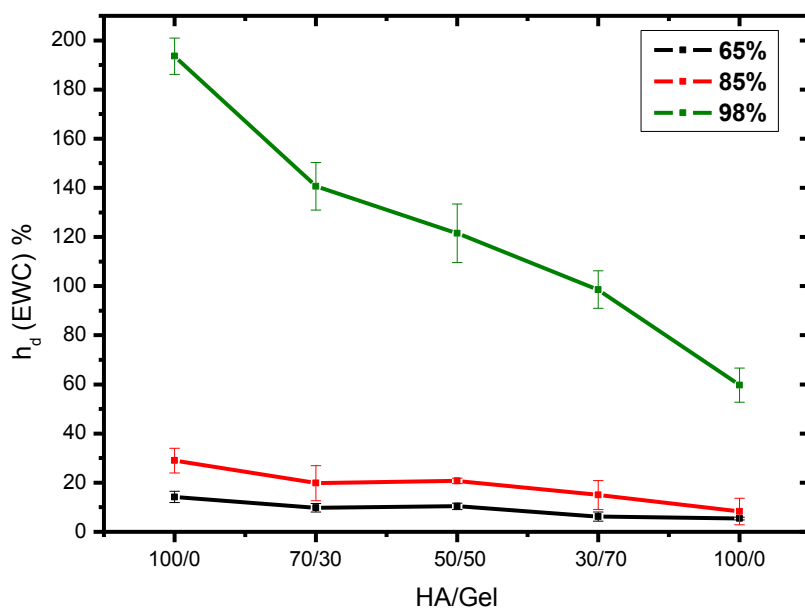
νερού σε σχέση με την αρχική τους, ξηρή, μάζα καθώς και σε σχέση με την υδατωμένη.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των συγκεκριμένων υδατώσεων, συντέθηκαν στα εργαστήρια του Τομέα Φυσικής της Σχολής ΕΜΦΕ του ΕΜΠ, με την υποσημείωση ότι οι βασικές ουσίες, ζελατίνη και υαλουρονικό οξύ, είχαν ήδη ενοφθαλμιστεί με τυραμίνη στα εργαστήρια του Κέντρου Βιοϋλικών και Ιστοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου της Βαλένθια.

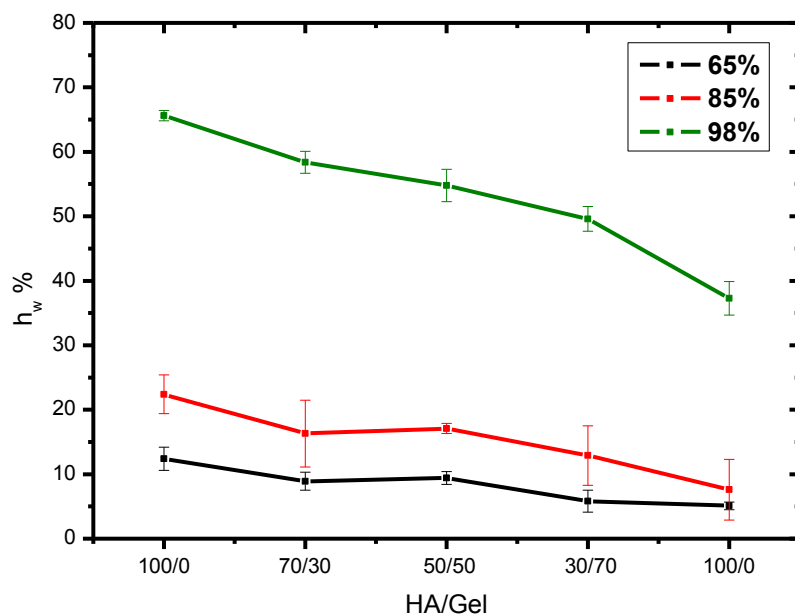
Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των ποσοστών νερού για τα εν Αθήναις παρασκευασμένα δείγματα υδρογελών που τοποθετήθηκαν σε περιβάλλοντα σχετικής υγρασίας 65%, 85% και 98%.

Δείγματα HA/Gel	65% RH		85% RH		98% RH	
	$h_d\%$	$h_w\%$	$h_d\%$	$h_w\%$	$h_d\%$	$h_w\%$
100/0	14.2 ±2.3	12.4 ±1.8	29.1 ±5.0	22.4 ±3.0	193.6 ±7.4	65.6 ±0.8
70/30	9.8 ±1.7	8.9 ±1.4	19.8 ±7.1	16.3 ±5.12	140.6 ±9.7	58.4 ±1.7
50/50	10.4 ±1.3	9.4 ±1.0	20.7 ±1.1	17.1 ±0.78	121.5 ±11.9	54.8 ±2.5
30/70	6.2 ±1.9	5.8 ±1.7	15.0 ±5.9	12.9 ±4.6	98.6 ±7.6	49.6 ±1.9
0/100	5.4 ±0.6	5.1 ±0.6	8.33 ±5.4	7.5 ±4.7	59.7 ±7.0	37.3 ±2.8

Πίνακας 3.12: Μέσες τιμές και σφάλματα μέσω των τιμών των ποσοστών υδατώσεων των σειρών δειγμάτων HA/Gel, που παρασκευάστηκαν στα εργαστήρια της ΕΜΦΕ, ΕΜΠ, για περιβάλλοντα σχετικών υδατώσεων 65%, 85% και 98%.



Σχήμα 3.49: Διάγραμμα διακύμανσης ποσοστού απορροφούμενου νερού, h_d (EWC), συγκριτικά με τη σύσταση των δειγμάτων υδρογελών HA/Gel.



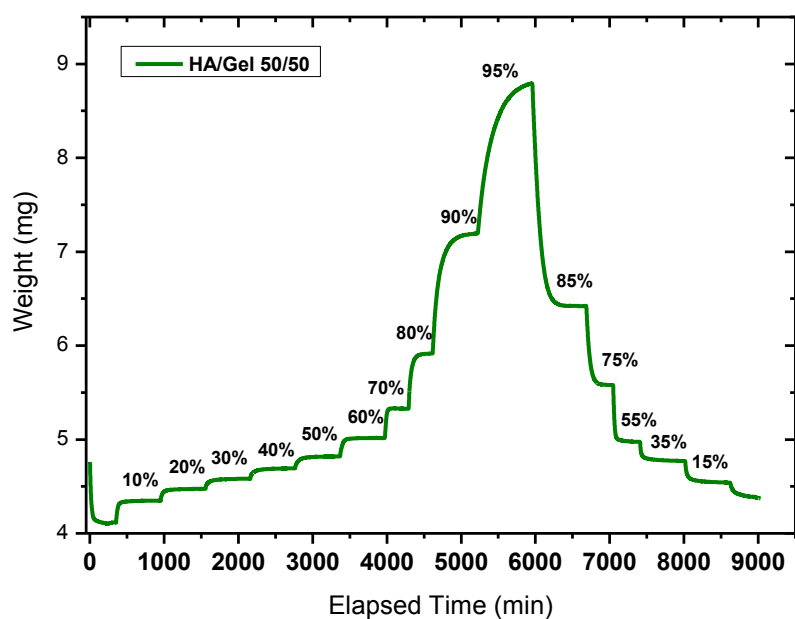
Σχήμα 3.50: Διάγραμμα διακύμανσης ποσοστού απορροφούμενου νερού, h_w , συγκριτικά με τη σύσταση των δειγμάτων υδρογελών HA/Gel.

Παρατηρώντας τα συγκριτικά διαγράμματα, μεταξύ h_d % , h_w % και σύστασης HA/Gel των δειγμάτων, μπορεί κανείς να εξάγει δύο συμπεράσματα. Καταρχάς, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι σε κάθε περιβάλλον σχετικής υγρασίας, RH, το ποσοστό απορροφούμενου νερού αυξάνεται, όσο αυξάνεται το ποσοστό του υαλουρονικού οξέος, HA, στην υδρογέλη. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά των μιγμάτων HA/Gel διακυμαίνονται ανάμεσα στα αντίστοιχα των καθαρών ουσιών, ανεξάρτητα του ποσοστού σχετικής υγρασίας. Η αιτία της συμπεριφοράς αυτής, είναι η ισχυρά υδρόφιλη φύση του υαλουρονικού οξέος έναντι της ζελατίνης, Gel, που οδηγεί στην απορρόφηση μεγαλύτερων ποσοτήτων νερού. Επιπλέον ο βαθμός ενοφθαλμισμού της τυραμίνης στο υαλουρονικό οξύ (1:1) είναι χαμηλότερος από τον αντίστοιχο στη ζελατίνη (1:2), με αποτέλεσμα ο βαθμός σταυροδεσίματος να είναι ασθενέστερος στην περίπτωση του πρώτου. Συνεπώς, τα πολυμερικά δίκτυα που περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό HA έναντι Gel, διαθέτουν μεγαλύτερη απορροφητική ικανότητα. Επιπλέον, παρατηρείται ότι τα ποσοστά νερού για κάθε δείγμα HA/Gel διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, με μοναδικές εξαιρέσεις τα HA/Gel 50/50 και 70/30 όπου τα ποσοστά κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα, ανεξαρτήτως του περιβάλλοντος σχετικής υγρασίας. Τέλος, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού νερού σε όλα τα δείγματα, με την αύξηση της σχετικής υγρασίας του περιβάλλοντος στο οποίο έχουν τοποθετηθεί.

3.4 Ισόθερμες Μετρήσεις Ρόφησης – Διάχυσης Νερού (ESI)

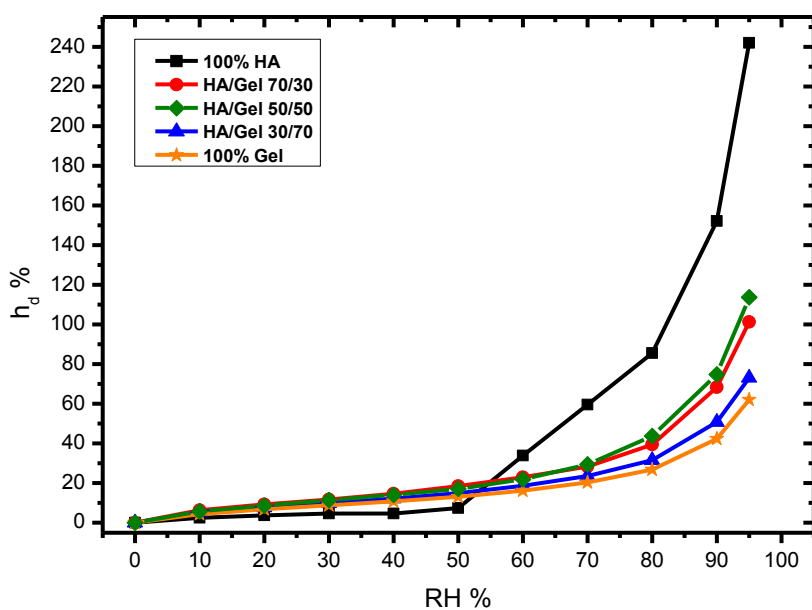
Για τις μετρήσεις ισόθερμης ρόφησης (sorption) – εκρόφησης (desorption) νερού, χρησιμοποιήθηκε σειρά δειγμάτων υδρογελών HA/Gel η οποία είχε συντεθεί εξολοκλήρου στα εργαστήρια του Κέντρου Βιοϋλικών και Ιστοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου της Βαλένθια. Τα δείγματα καταρχάς πιέστηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα (hot plate) θερμοκρασίας 60 °C ούτως ώστε να αποκτήσουν το απαιτούμενο σχήμα και μέγεθος για να τοποθετηθούν στη διάταξη, αλλά και να εξαλειφτούν όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωτικά οι πόροι στο εσωτερικό τους. Στη συνέχεια, μετρήθηκαν στην πειραματική διάταξη του εργαστηρίου του Τομέα Φυσικής της Σχολής ΕΜΦΕ του ΕΜΠ. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 25 °C. Η δραστηκότητα του νερού a_w (σχετική υγρασία, RH%) κυμάνθηκε από 0 έως 0.95 (αντίστοιχα από 0 έως 100%).

Αρχικά, έγινε ξήρανση στους 60 °C για 3 ώρες. Κατά τη ρόφηση, το βήμα αύξησης του ποσοστού της σχετικής υγρασίας, RH% ήταν 10% με χρόνο ισορροπίας 10 ώρες. Κατά τη διάχυση, το βήμα κυμάνθηκε μεταξύ 10% (μεταξύ υψηλών ποσοστών RH) και 20% (μεταξύ χαμηλών ποσοστών RH). Ουσιαστικά, κατά την εκρόφηση, επιλέχθηκαν να καταγραφούν ποσοστά υδάτωσης σε τιμές σχετικών υγρασιών μεταξύ των αντίστοιχων της ρόφησης.



Σχήμα 3.51: Χαρακτηριστικό διάγραμμα βάρους δοκιμίου συναρτήσει του χρόνου, σε διάφορα ποσοστά σχετικής υγρασίας, κατά τις διαδικασίες ρόφησης και εκρόφησης.

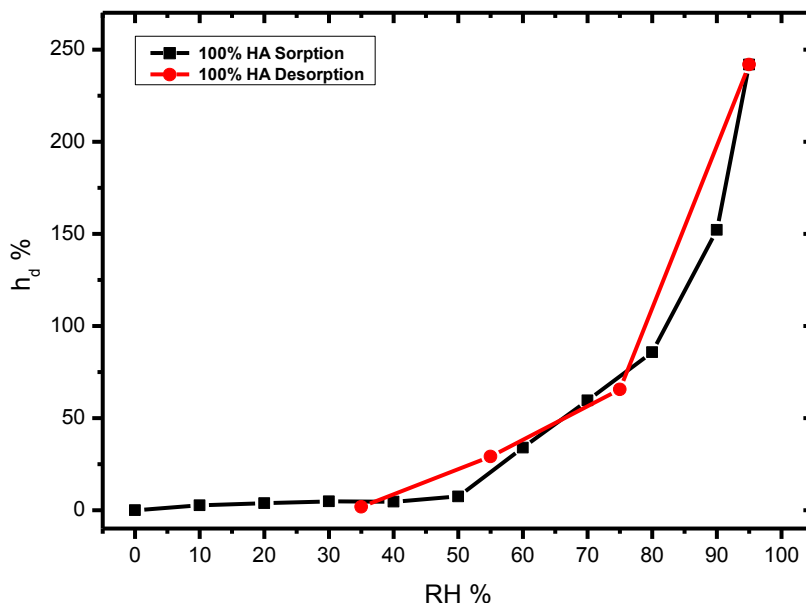
Προτού γίνει σύγκριση των διαδικασιών ρόφησης και εκρόφησης, ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκριτική παρουσίαση των διαγραμμάτων ισόθερμης υδάτωσης για όλα τα δείγματα υδρογελών HA/Gel.



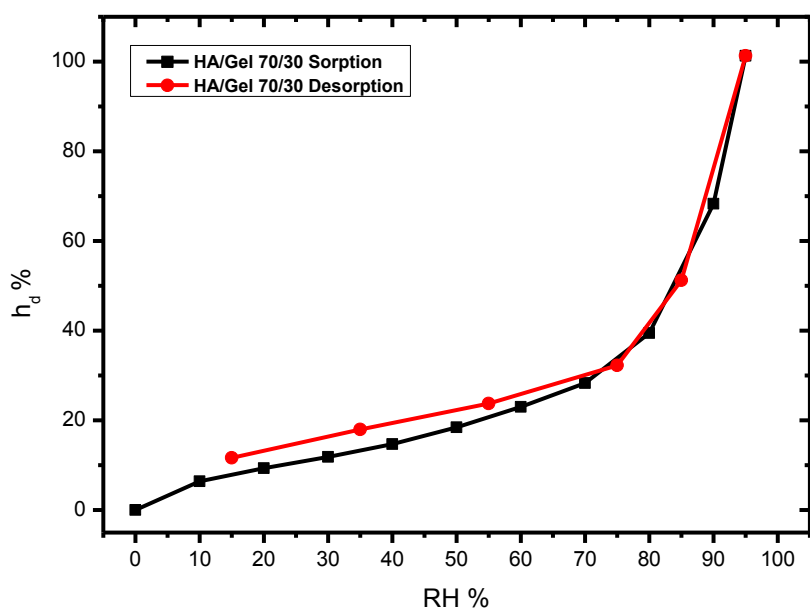
Σχήμα 3.52: Συγκριτικό διάγραμμα ρόφησης νερού της σειράς δειγμάτων HA/Gel.

Στο παραπάνω διάγραμμα, παρατηρεί κανείς ότι όλα τα δείγματα παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά στα χαμηλά ποσοστά σχετικής υγρασίας (περίπου 50% RH). Στη συνέχεια, η καμπύλη ρόφησης του καθαρού υαλουρονικού οξέος διαχωρίζεται αισθητά από τις υπόλοιπες, ενώ αυτές παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα υδάτωσης. Όπως ήταν επίσης αναμενόμενο, η υδρογέλη καθαρής ζελατίνης απορροφά τα μικρότερα ποσοστά νερού σε κάθε υδάτωση σε σχέση με τις υπόλοιπες. Όσον αφορά στα μίγματα, τα δίκτυα HA/Gel 70/30 και 50/50 παρουσιάζουν τα ίδια επίπεδα υδάτωσης, με εξαίρεση τις υψηλές σχετικές υγρασίες 80% και πάνω όπου φαίνεται ότι το δεύτερο προσροφά ελάχιστα περισσότερο νερό. Η διαπίστωση αυτή, έρχεται σε αντίθεση με τη θεωρία που υποστηρίζει ότι τα ποσοστά υδάτωσης των δικτύων αυξάνονται, όσο αυξάνεται η ποσότητα του υαλουρονικού οξέος σε αυτά. Εντούτοις, δε θα πρέπει να παραληφθεί το στοιχείο ότι τα συγκεκριμένα δείγματα παρασκευάστηκαν σε διαφορετικό εργαστήριο από τα υπόλοιπα που χρησιμοποιήθηκαν στις τεχνικές χαρακτηρισμού. Τέλος, η καμπύλη ρόφησης του δείγματος HA/Gel 30/70 συμφωνεί με την προαναφερθείσα θεωρία καθώς αντιστοιχεί στα χαμηλότερα ποσοστά υδάτωσης, πριν ακολουθήσουν αυτά της καθαρής ζελατίνης.

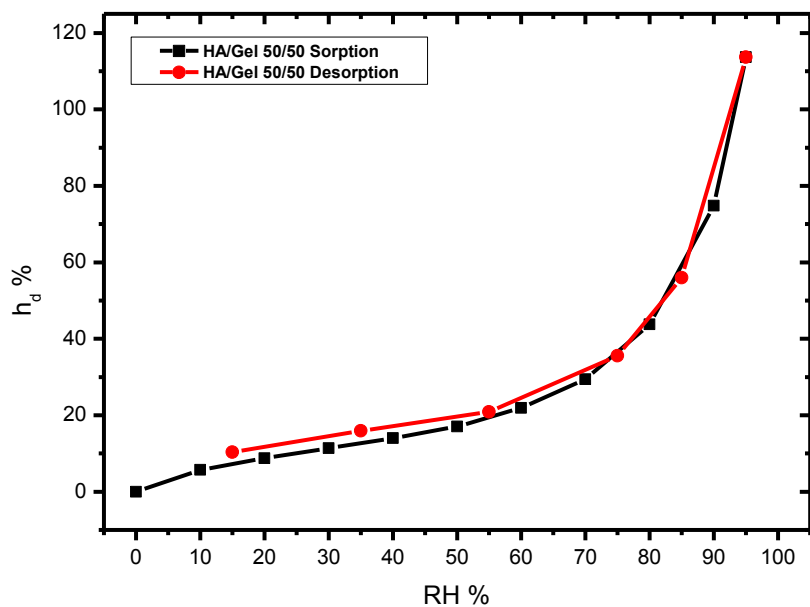
Ακολουθούν τα διαγράμματα ισόθερμης υδάτωσης κατά τη διαδικασία της ρόφησης (sorption) και εκρόφησης (desorption) νερού για κάθε ένα από τα δείγματα υδρογελών HA/Gel.



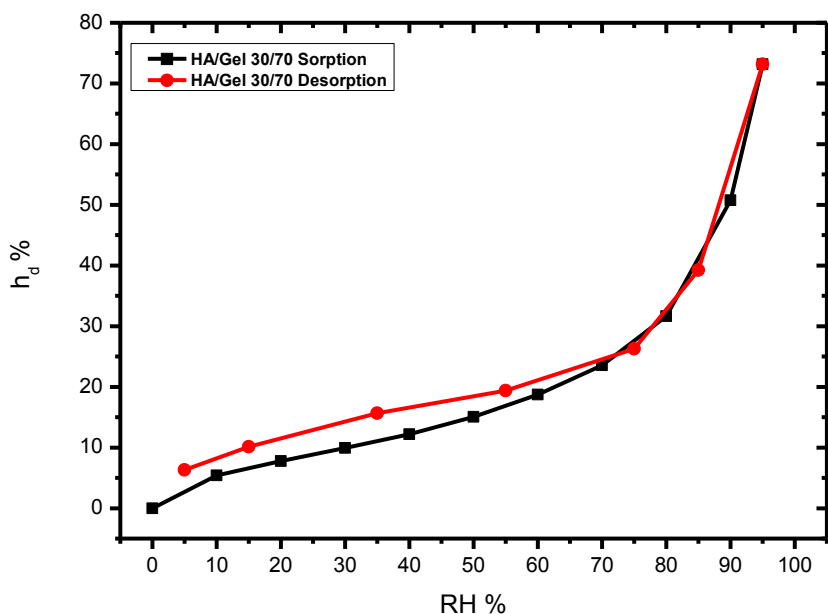
Σχήμα 3.53: Διάγραμμα ισόθερμης υδάτωσης κατά τη ρόφηση και εκρόφηση νερού για το δείγμα υδρογέλης καθαρού υαλουρονικού οξέος, 100% HA.



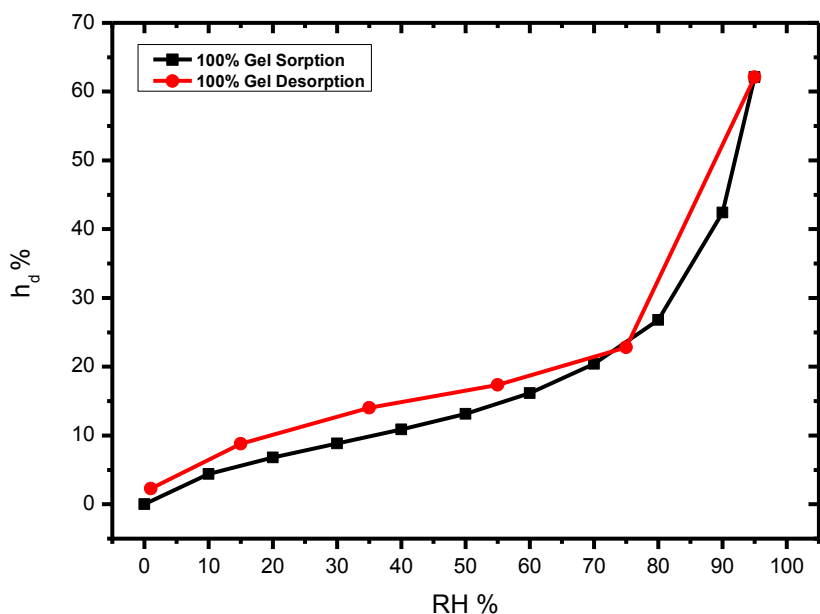
Σχήμα 3.54: Διάγραμμα ισόθερμης υδάτωσης κατά τη ρόφηση και εκρόφηση νερού για το δείγμα υδρογέλης HA/Gel 70/30.



Σχήμα 3.55: Διάγραμμα ισόθερμης υδάτωσης κατά τη ρόφηση και εκρόφηση νερού για το δείγμα υδρογέλης σύστασης HA/Gel 50/50.



Σχήμα 3.56: Διάγραμμα ισόθερμης υδάτωσης κατά τη ρόφηση και εκρόφηση νερού για το δείγμα υδρογέλης σύστασης HA/Gel 30/70.



Σχήμα 3.57: Διάγραμμα ισόθερμης υδάτωσης κατά τη ρόφηση και εκρόφηση νερού για το δείγμα υδρογέλης καθαρής ζελατίνης, 100% Gel.

Στα συγκριτικά διαγράμματα ρόφησης – εκρόφησης, παρατηρούνται φαινόμενα υστέρησης σε όλα τα δείγματα υδρογελών. Ουσιαστικά, το φαινόμενο υστέρησης, υποδηλώνει, ότι το δείγμα αποβάλλει μικρότερη ποσότητα νερού σε σχέση με αυτή που έχει απορροφήσει στο ίδιο ποσοστό σχετικής υγρασίας. Ξεκινώντας από την

περίπτωση των καθαρών ουσιών και συγκεκριμένα του καθαρού υαλουρονικού οξέος, 100% HA, διαπιστώνει κανείς ότι εμφανίζεται βρόχος υστέρησης μεγάλης έντασης από την αρχή της διαδικασίας εκρόφησης, μέχρι περίπου 70 %RH. Στη συνέχεια, το φαινόμενο παραμένει, αλλά με μειωμένη ένταση. Παρόμοια συμπεριφορά υπάρχει και στην υδρογέλη καθαρής ζελατίνης, 100% Gel. Μία ερμηνεία των παραπάνω παρατηρήσεων, είναι ότι τα εν λόγω πολυμερικά δείγματα υδρογέλης, είναι ικανά να συγκρατήσουν σημαντικές ποσότητες νερού, ειδικά σε υψηλά ποσοστά υδάτωσης, γεγονός που γίνεται κατανοητό λόγω της υδρόφιλης φύσης, του υαλουρονικού οξέος (πρωτίστως) και της ζελατίνης.

Προχωρώντας στις υδρογέλες που περιέχουν μίγματα και των δύο ουσιών, HA/Gel 70/30 και 30/70, φαινόμενα υστέρησης ξεκινούν να εκδηλώνονται από ποσοστά σχετικής υγρασίας 70% RH και μετά, και σε πολύ μικρότερη ένταση από τα αντίστοιχα των καθαρών ουσιών. Αντίθετα, από την αρχή της διαδικασίας εκρόφησης, μέχρι εκείνο το σημείο, η διάχυση «ακολουθεί» την ρόφηση του νερού. Κάτι τέτοιο υποδηλώνει ότι σε περιβάλλοντα υψηλών ποσοστών σχετικής υγρασίας, τα πολυμερικά δίκτυα δεν είναι ικανά να συγκρατήσουν το νερό που έχουν απορροφήσει, σε αντίθεση με τα χαμηλότερα ποσοστά. Τέλος, στην υδρογέλη σύστασης HA/Gel 50/50, φαίνεται ότι η διάχυση «ακολουθεί» πλήρως τη ρόφηση, καθώς ο βρόχος υστέρησης, αν και εκδηλώνεται σε χαμηλά ποσοστά υγρασίας, είναι ιδιαίτερα ισχνός. Φαίνεται ότι στο συγκεκριμένο πολυμερικό δίκτυο, τα μόρια νερού που έχουν προσροφηθεί, δεν έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσουν με τα υδρόφιλα μόρια των ουσιών, και κυρίως του υαλουρονικού οξέος.

Σημαντική επισήμανση, ως κατακλείδα της αιτιολόγησης της απουσίας υστέρησης, είναι το γεγονός ότι τα δείγματα μετατράπηκαν σε πολύ λεπτά φύλλα μέσω της πίεσης σε θερμική πλάκα. Με τον τρόπο αυτό, μειώθηκαν στο ελάχιστο οι πόροι, άρα και ο ελεύθερος χώρος στο εσωτερικό των υδρογελών. Αυτό, πιθανώς να είχε ως αποτέλεσμα, σε υψηλά ποσοστά υγρασίας, τα μόρια νερού που αδυνατούσαν να αλληλεπιδράσουν με το εσωτερικό της υδρογέλης (πολυμερικά δίκτυα) να παρέμειναν στην επιφάνειά της, ώντας έτσι ευκολότερο να απομακρυνθούν από αυτήν, όταν τα ποσοστά υγρασίας μειώνονταν.

Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζει και η σύγκριση των πειραματικών τιμών της διαδικασίας ρόφησης, με τις αντίστοιχες θεωρητικές που μπορούν να υπολογιστούν μέσω του «προσθετικού κανόνα». Σύμφωνα με τον προσθετικό κανόνα, στην περίπτωση των υδατώσεων, το ποσοστό απορροφούμενου νερού ενός μίγματος από δύο ουσίες, εξαρτάται από την ποσοστιαία σύστασή του, σε συνάρτηση με την ικανότητα υδάτωσης των δύο καθαρών ουσιών. Συγκεκριμένα, για δεδομένο RH, το ποσοστό απορροφούμενου νερού ενός μίγματος, υπολογίζεται από τη σχέση:

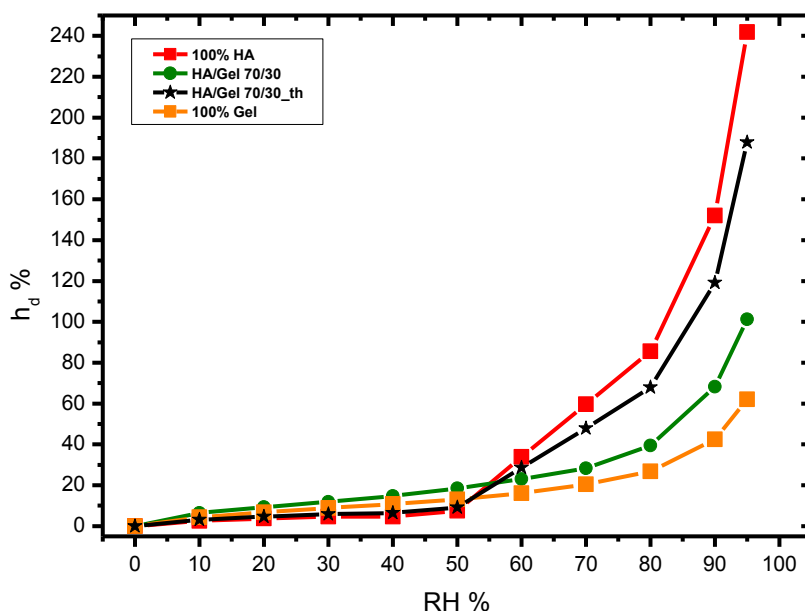
$$h_{d_{HA/Gel}} = a \cdot h_{d_{HA}} + b \cdot h_{d_{GEL}}$$

όπου a και b οι περιεκτικότητες του μίγματος σε HA και Gel αντίστοιχα ενώ, $h_{d_{HA}}$ και $h_{d_{Gel}}$ τα ποσοστά απορροφούμενου νερού των HA και Gel αντίστοιχα.

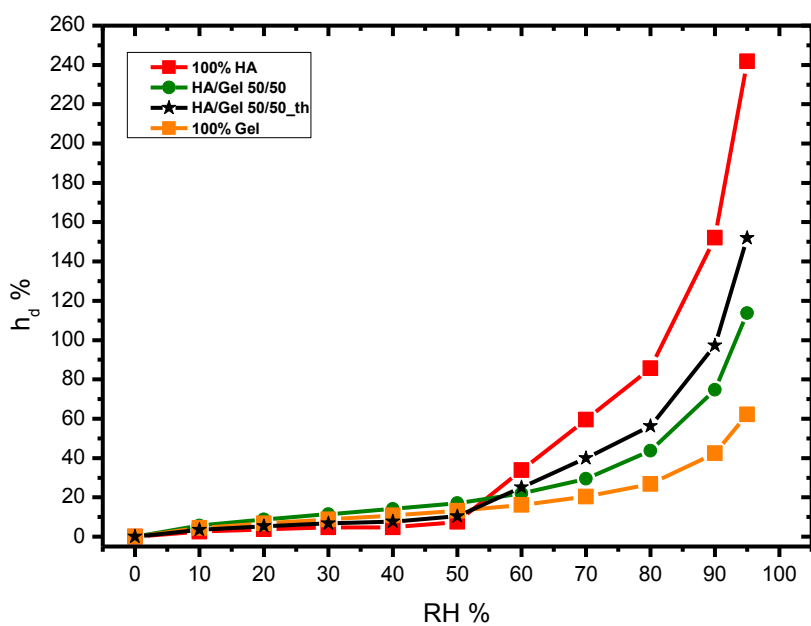
RH %	100% HA		HA/Gel 70/30		HA/Gel 50/50		HA/Gel 30/70		100% Gel
	h_d %	h_d % _π	h_d % _θ	h_d % _π	h_d % _θ	h_d % _π	h_d % _θ	h_d %	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	2.50	6.41	3.07	5.69	3.44	5.38	3.82	4.39	
20	3.80	9.32	4.71	8.72	5.31	7.79	5.91	6.82	
30	4.67	11.84	5.92	11.38	6.75	9.93	7.58	8.82	
40	4.64	14.73	6.51	14.03	7.75	12.21	8.00	10.87	
50	7.46	18.49	9.17	17.09	10.30	15.05	11.44	13.14	
60	33.83	22.99	28.53	21.89	25.00	18.73	21.47	16.17	
70	59.59	28.30	47.84	29.41	40.00	23.54	32.17	20.42	
80	85.63	39.47	67.98	43.75	56.21	31.66	44.44	26.79	
90	152.11	68.29	119.20	74.79	97.26	50.76	75.32	42.41	
95	241.86	101.27	187.93	113.64	151.98	73.15	116.04	62.11	

Πίνακας 3.13: Πειραματικές και θεωρητικές τιμές ποσοστών υδάτωσης μιγμάτων HA/Gel.

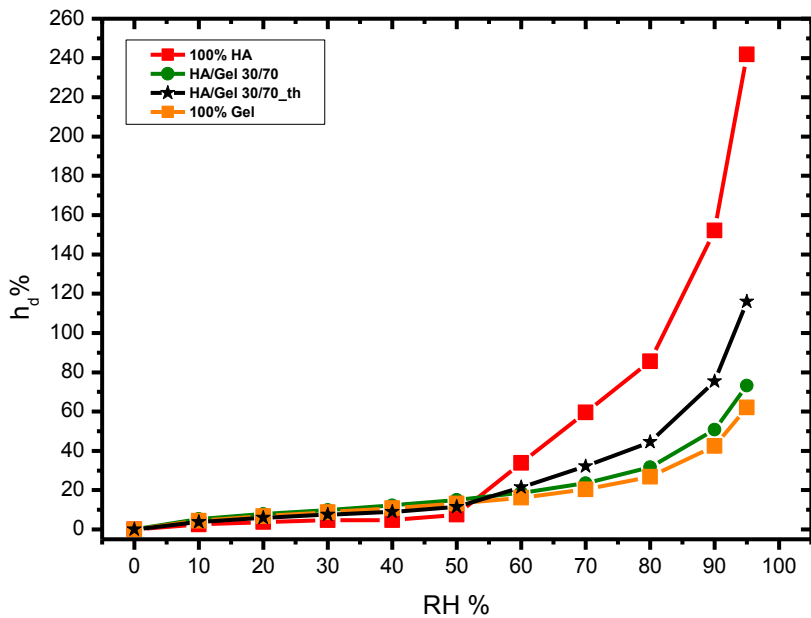
Τα συγκριτικά δεδομένα του παραπάνω πίνακα, μπορούν να οπτικοποιηθούν με τη βοήθεια των ακόλουθων διαγραμμάτων.



Σχήμα 3.58: Συγκριτικό διάγραμμα πειραματικής και θεωρητικής τιμής κατά βάρους υδάτωσης του δείγματος HA/Gel 70/30, σε συνάρτηση με τις πειραματικές τιμές των καθαρών ουσιών, HA και Gel.



Σχήμα 3.59: Συγκριτικό διάγραμμα πειραματικής και θεωρητικής τιμής κατά βάρους υδάτωσης του δείγματος HA/Gel 50/50, σε συνάρτηση με τις πειραματικές τιμές των καθαρών ουσιών, HA και Gel.



Σχήμα 3.60: Συγκριτικό διάγραμμα πειραματικής και θεωρητικής τιμής κατά βάρους υδάτωσης του δείγματος HA/Gel 30/70, σε συνάρτηση με τις πειραματικές τιμές των καθαρών ουσιών, HA και Gel.

Σε όλα τα διαγράμματα παρατηρείται ασυμφωνία μεταξύ της πειραματικής και της θεωρητικής καμπύλης ρόφησης, αρχής γενομένης από ποσοστά σχετικών υγρασιών 60% και μετά. Τα μίγματα, όπως γίνεται αντιληπτό, σε υψηλά ποσοστά σχετικής υγρασίας, δεν ακολουθούν τον «προσθετικό κανόνα». Συγκεκριμένα, και στα τρία μίγματα HA/Gel, οι πειραματικές τιμές των κατά βάρος υδατώσεων, $h_d\%$, είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες θεωρητικές, με χαρακτηριστικότερα τα HA/Gel 70/30 και 30/70. Εν ολίγοις, παρά την υψηλά υδρόφιλη φύση του υαλουρονικού οξέος, τα μίγματά του, δεν είναι ικανά να απορροφήσουν αντίστοιχη ποσότητα νερού, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στα δύο προαναφερθέντα δείγματα. Τα συγκεκριμένα, φαίνεται εκ του πειράματος, ότι υιοθετούν τη συμπεριφορά της ζελατίνης, Gel, ανεξαρτήτως σύστασης. Καταλήγοντας, οδηγείται κανείς στο συμπέρασμα, ότι δεν μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια η υδάτωση των μιγμάτων, τουλάχιστον με βάση το συγκεκριμένο μαθηματικό μοντέλο. Η ανάμιξη των δύο πολυμερών συνδυάζεται πιθανώς και με διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες και αναιρούν το νόμο της προσθετικότητας, ιδιαίτερα σε μεγάλες σχετικές υγρασίες.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Συμπεράσματα μέσω Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)

Οι μετρήσεις DSC, απέδειξαν την ύπαρξη καλής αναμιξιμότητας των δύο συστατικών στην ξηρή κατάσταση. Εντούτοις, παρατηρήθηκε διαχωρισμός φάσης ανάμεσα σε ζελατίνη και υαλουρονικό οξύ σε υψηλά επίπεδα σχετική υγρασίας, καθώς η παρουσία νερού εντός των πολυμερικών δικτύων, προκάλεσε την πλαστικοποίηση τους. Υπολογίστηκαν οι ποσότητες των διάφορων ειδών νερού που βρίσκονταν εντός των δικτύων, καταδεικνύοντας ότι η ζελατίνη και τα μίγματά της, εμφανίζουν μεγάλα ποσοστά νερού που είναι δέσμιο στις πολυμερικές αλυσίδες. Χάρη σε αυτό, μπορούν να παρέχουν το επιθυμητό ενυδατωμένο περιβάλλον που χρειάζονται οι αλληλουχίες RGD, για να υποστηρίξουν την κυτταρική προσκόλληση. Τα μίγματα παρουσιάζουν βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με τις καθарές ουσίες, γεγονός που τα καθιστά ικανά να μιμηθούν το εξωκυττάριο πλέγμα των μαλακών ιστών. Μπορούν δηλαδή να εκπληρωθούν οι απαιτήσεις της κυτταρικής προσκόλλησης, του πολλαπλασιασμού, καθώς και της ομαλής μεταφοράς θρεπτικών ουσιών και μεταβολικών καταλοίπων.

Όσον αφορά στη συμπεριφορά του νερού εντός των πολυμερικών δικτύων, τα σημαντικότερα πορίσματα εξάγονται από την περίπτωση όπου τα δείγματα είχαν υδατωθεί σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας 98%. Κατά την 1^η θέρμανση, παρατηρήθηκαν διπλές κορυφές τήξης σε κάθε δείγμα με την πρώτη χρονικά να έχει πολύ μικρότερη ένταση από τη δεύτερη. Η πρώτη κορυφή σηματοδοτεί τήξη πάγου κυβικής δομής που είχε σχηματιστεί από την κρυστάλλωση του δεσμευμένου νερού (bound water), ενώ η δεύτερη, τήξη πάγου εξαγωνικής μορφής που προερχόταν από κρυστάλλωση ελεύθερου νερού (bulk water) που βρισκόταν ελεύθερο εντός των πολυμερικών δικτύων.

4.2 Συμπεράσματα μέσω Διηλεκτρικής Φασματοσκοπίας Εναλλασσόμενου Πεδίου (DRS)

Κατά τη διαδικασία της ράμπας, παρατηρήθηκε κρυστάλλωση του νερού στα δείγματα καθαρού HA με ποσοστά υδάτωσης, $h_w=61\%$ και 80% σε θερμοκρασίες $T_c=-30\text{ }^\circ\text{C}$ και $T_c=-20\text{ }^\circ\text{C}$ αντίστοιχα. Στο δείγμα καθαρής Gel με $h_w=57\%$, το νερό κρυστάλλωθηκε σε $T_c=-23\text{ }^\circ\text{C}$. Τα μίγματα HA/Gel 70/30, 50/50 και 30/70 με ποσοστά νερού 52%, 54% και 47%, εμφάνισαν κρυστάλλωση νερού σε $T_c=-27\text{ }^\circ\text{C}$, $T_c=-17\text{ }^\circ\text{C}$ και $T_c=-20\text{ }^\circ\text{C}$ αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τη συμπεριφορά των μιγμάτων HA/Gel που εμφάνισαν φαινόμενα κρυστάλλωσης, σε σχέση με τα αντίστοιχα καθαρά συστατικά, παρατηρείται ότι τα πρώτα υιοθετούν τη συμπεριφορά της Gel έναντι του HA. Πρόκειται για ένα ακόμη στοιχείο που επιβεβαιώνει την επιτυχή, με βάση τις απαιτήσεις της μελέτης, ανάμιξη

των δύο ουσιών. Τα ξηρά δείγματα, καθώς και αυτά με τα χαμηλότερα ποσοστά υδατώσεων (περιβάλλον σχετική υγρασίας 65%) δεν προσέφεραν κάποια σημαντική πληροφορία, εξαιτίας και του κακού σήματος που είχε ο πυκνωτής.

Παρατηρήθηκαν μηχανισμοί σε θερμοκρασίες $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ για όλα τα δείγματα υψηλών υδατώσεων (περιβάλλοντα σχετικής υγρασίας 85% και 98%) των οποίων η ανάλυση, κρίνεται απαραίτητη για τη συνέχιση της μελέτης των συγκεκριμένων πολυμερικών δικτύων, καθώς και της συμπεριφοράς του νερού εντός αυτών.

4.3 Συμπεράσματα μέσω Υδατώσεων και ESI

Όσον αφορά στις μετρήσεις των υδατώσεων που πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλοντα σχετικής υγρασίας, αποδείχθηκε ξεκάθαρα η κατά κράτος επικράτηση της υδρόφιλης φύσης του υαλουρονικού οξέος, έναντι της ζελατίνης. Τα δείγματα παρουσίασαν αύξηση του ποσοστού απορροφούμενου νερού με την αύξηση της ποσότητας του υαλουρονικού οξέος στο εσωτερικό τους. Το φαινόμενο ήταν ιδιαίτερα έντονο για ποσοστό σχετικής υγρασίας 98%.

Όσον αφορά στις ισόθερμες μετρήσεις ρόφησης – διάχυσης, παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις συστάσεις, τα πολυμερικά δίκτυα είναι ικανά να συγκρατήσουν ποσότητες νερού σε περιβάλλοντα σχετικών υγρασιών κάτω του 70%. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί στο υαλουρονικό οξύ, του οποίου η συμπεριφορά είναι δύσκολο να εξηγηθεί, καθώς παρουσιάζει ανεξέλεγκτη συμπεριφορά στα υψηλά ποσοστά σχετικής υγρασίας. Η υδρογέλη καθαρού HA, καθίσταται απορριπτέα για βιοιατρικές εφαρμογές, σε αντίθεση με τα μίγματα τα οποία αν και διατηρούν μεγάλο μέρος της υδρόφιλης φύσης του πρώτου, παρουσιάζονται σταθερότερα λόγω της ζελατίνης.

Το μαθηματικό μοντέλο που εφαρμόστηκε με σκοπό την πρόβλεψη των υδατώσεων των μιγμάτων με βάση τις αντίστοιχες των καθαρών ουσιών, έδειξε ότι στα μίγματα επικρατεί η «ταυτότητα» της ζελατίνης έναντι του υαλουρονικού οξέος. Συγκεκριμένα, ακόμα και τα δείγματα σύστασης HA/Gel 70/30 και 50/50, παρουσίασαν υδατώσεις παραπλήσιες αυτών της καθαρής ζελατίνης, σε σχέση με το υαλουρονικό οξύ. Τα μίγματα δηλαδή, παραμένουν πιο υδρόφιλα από τη ζελατίνη, αλλά σε καμία περίπτωση δεν πλησιάζουν τη φύση του καθαρού υαλουρονικού οξέος. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις με εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vacanti, J. P., Langer, R., "Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation," *The lancet*, vol. 354, p. S32-S34, 1999.
2. Palsson, B. O., Bhatia, S. N., "Tissue Engineering," Pearson Prentice Hall, 2004.
3. Teitelbaum, S. L., Ross, F. P., "Genetic regulation of osteoclast development and function," *Nature Reviews. Genetics*, vol. 4, p. 638 -649, 2003.
4. Boyle, W. J., Simonet, W. S., Lacey, D. L., "Osteoclast differentiation and activation," *Nature*, vol. 423, no. 6937, p. 337-342, 2003.
5. A. Mikos, "NWO | Huygens Lecture 2003: Tissue Engineering," Netherlands Organization for Scientific Research, The Hague, 2003.
6. Jiankang, H., Dichen, L., Yaxiong, L., Bo, Y., Hanxiang, Z., Qin, L., Yi, L., "Preparation of chitosan–gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering," *Acta biomaterialia*, vol. 5, no. 1, p. 453-461, 2009.
7. Cheng, Y., Lu, J., Liu, S., Zhao, P., Lu, G., Chen, J., "The preparation, characterization and evaluation of regenerated cellulose/collagen composite hydrogel films," *Carbohydrate polymers*, vol. 107, p. 57-64, 2014.
8. Langer, R., Vacanti, J. P., "Principles of tissue engineering," Academic press. Fourth Edition. Elsevier, 2011.
9. Drury, J. L., Mooney, D. J., "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications," *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, p. 4337-4351., 2003.
10. Zhu, C., Fan, D., Duan, Z., Xue, W., Shang, L., Chen, F., Luo, Y., "Initial investigation of novel human-like collagen/chitosan scaffold for vascular tissue engineering," *Journal of biomedical materials research Part A*, vol. 89, no. 3, pp. 829–840, 2009.
11. Vavken, P., Joshi, S., Murray, M. M., "TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 27, no. 12, p. 1612, 2009.
12. Du, M., Liang, H., Mou, C., Li, X., Sun, J., Zhuang, Y., Dai, J., "Regulation of human mesenchymal stem cells differentiation into chondrocytes in extracellular matrix-based hydrogel scaffolds," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 114, p. 316–323, 2014.
13. Shu, X. Z., Liu, Y., Palumbo, F., Prestwich, G. D., "Disulfide-crosslinked hyaluronan gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth," *Biomaterials*, vol. 24, no. 21, p. 3825–3834, 2003.
14. Huang, X., Zhang, Y., Zhang, X., Xu, L., Chen, X., Wei, S., "Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous

- wound healing," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 33, no. 8, p. 4816–4824, 2013.
15. Παναγιώτου Κ., *Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών*, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη 2000
 16. Sperling L. H., *Introduction to physical polymer science*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2006
 17. Σιμιτζής Χρ. Ιωάννης, *Πολυμερή*, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα 2004
 18. A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, p. 18–23, 2012.
 19. Kopeček, J., Yang, J., "Hydrogels as smart biomaterials," *Polymer International*, vol. 56, no. 9, p. 1078–1098, 2007
 20. Furth, M. E., Atala, A., Van Dyke, M. E., "Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine," *Biomaterials*, vol. 28, no. 34, p. 5068-5073, 2007.
 21. S. J. A. K. S. Bryant, "Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photo encapsulated in poly (ethylene glycol) hydrogels," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 59(1), p. 63-72, 2002
 22. S. Van Vlierberghe, D. Dubruel, E. Schacht., "Biopolymer-Based Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review," *Polymer Chemistry & Biomaterials Research Group*, 2011.
 23. Zhao, W., Jin, X., Cong, Y., Liu, Y., Fu, J., "Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 88, no. 3, p. 327-339, 2013.
 24. Lee, Y., Bae, J. W., Oh, D. H., Park, K. M., Chun, Y. W., Sung, H. J., Park, K. D., "In situ forming gelatin-based tissue adhesives and their phenolic content-driven properties," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 1, no. 18, p. 2407-2414, 2013.
 25. G. H. GMIA, "Gelatin Handbook," *Gelatin Manufacturers Institute of America*, 2012.
 26. Zhou, Z., Chen, J., Peng, C., Huang, T., Zhou, H., Ou, B., Huang, H., "Fabrication and physical properties of gelatin/sodium alginate/hyaluronic acid composite wound dressing hydrogel," *Journal of Macromolecular Science, Part A*, vol. 51, no. 4, p. 318-325, 2014.
 27. Li, Y., Jia, H., Cheng, Q., Pan, F., Jiang, Z., "Sodium alginate–gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permselectivity," *Journal of membrane science*, vol. 375, no. 1, p. 304-312, 2011.
 28. Josias H. Hamman. (2010,). Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Marine Drugs*. 8 (8), 1305-1322.
 29. Susheel Kalia. (2015). Protein-Based Hydrogels. In: *Susheel Kalia Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*. Switzerland: Springer. 78-79.

30. Sarker, B., Singh, R., Silva, R., Roether, J. A., Kaschta, J., Detsch, R., Boccaccini, A. R., "Evaluation of fibroblasts adhesion and proliferation on alginate-gelatin crosslinked hydrogel," *PloS one*, vol. 9, no. 9, e107952, 2014.
31. R. O. Hynes, "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines," *Cell*, vol. 110, no.6, p. 673-687, 2002.
32. Taubenberger, A. V., Woodruff, M. A., Bai, H., Muller, D. J., Hutmacher, D. W., "The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation," *Biomaterials*, vol. 31, no. 10, p. 2827-2835, 2010.
33. Zhou, Z., Yang, Z., Kong, L., Liu, L., Liu, Q., Zhao, Y., Cao, D., "Preparation and characterization of hyaluronic acid hydrogel blends with gelatin," *Journal of Macromolecular Science, Part B*, vol. 51, no. 12, p. 2392-2400, 2012.
34. Kuijpers, A. J., Van Wachem, P. B., Van Luyn, M. J. A., Engbers, G. H. M., Krijgsveld, J., Zaat, S. A. J., Feijen, J., "In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves," *Journal of controlled release*, vol. 67, no. 2, p. 323-336, 2000.
35. da Silva, M. A., Bode, F., Grillo, I., Dreiss, C. A., "Exploring the kinetics of gelation and final architecture of enzymatically cross-linked chitosan/gelatin gels," *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 4, p. 1401-1409, 2015.
36. Sakai, S., Hirose, K., Taguchi, K., Ogushi, Y., Kawakami, K., "An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 30, no. 20, p. 3371-3377, 2009.
37. Sun, Y., Deng, Z., Tian, Y., Lin, C., "Horseradish peroxidase-mediated in situ forming hydrogels from degradable tyramine-based poly (amido amine)s," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 127, no. 1, p. 40-48, 2013.
38. Hennink, W. E., Van Nostrum, C., "Novel crosslinking methods to design hydrogels," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, p. 223-236, 2012.
39. R. Jin, "In-situ forming biomimetic hydrogels for tissue regeneration," INTECH Open Access Publisher, 2012.
40. Wang, L. S., Du, C., Chung, J. E., Kurisawa, M., "Enzymatically cross-linked gelatin-phenol hydrogels with a broader stiffness range for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells," *Acta biomaterialia*, vol. 8, no. 5, p. 1826-1837, 2012.
41. Weng, L., Pan, H., Chen, W., "Self-crosslinkable hydrogels composed of partially oxidized hyaluronan and gelatin: In vitro and in vivo responses," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 85, no. 2, p. 352-365, 2008.
42. Chen, Y. C., Su, W. Y., Yang, S. H., Gefen, A., Lin, F. H., "In situ forming hydrogels composed of oxidized high molecular weight hyaluronic acid and

- gelatin for nucleus pulposus regeneration," *Acta biomaterialia*, vol. 9, no. 2, p. 5181-5193, 2013.
43. Darr, A., Calabro, A., "Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 20, no. 1, p. 33-44, 2009.
 44. Davis, N. E., Ding, S., Forster, R. E., Pinkas, D. M., Barron, A. E., "Modular enzymatically crosslinked protein polymer hydrogels for in situ gelation," *Biomaterials*, vol. 3, no. 28, p. 7288-7297, 2010.
 45. Jin, R., Teixeira, L. S. M., Dijkstra, P. J., van Blitterswijk, C. A., Karperien, M., Feijen, J., "Chondrogenesis in injectable enzymatically crosslinked heparin/dextran hydrogels," *Journal of controlled release*, vol. 152, no. 1, p. 186-195, 2011.
 46. Teixeira, L. S. M., Feijen, J., van Blitterswijk, C. A., Dijkstra, P. J., Karperien, M., "Enzyme catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 33, no. 5, p. 1281-1290, 2012.
 47. N. C. Veitch, "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme," *Phytochemistry*, vol. 65, no. 3, p. 249-259, 2004.
 48. Ryan, B. J., Carolan, N., ÓFágáin, C., "Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches?," *Trends in biotechnology*, vol. 24, no. 8, p. 355-363, 2006.
 49. Roberts, J. J., Naudiyal, P., Lim, K. S., Poole-Warren, L. A., Martens, P. J., "A comparative study of enzyme initiators for crosslinking phenol-functionalized hydrogels for cell encapsulation," *Biomaterials Research*, vol. 20, no. 1, p. 30, 2016.
 50. Chen, T., Embree, H. D., Brown, E. M., Taylor, M. M., Payne, G. F., "Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications," *Biomaterials*, vol. 24, no. 17, p. 2831-2841, 2003.
 51. Hoare, D. T., Koshland, D. E., "A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 242, no. 10, p. 2447-2453, 1976.
 52. Poveda-Reyes, S., Moulisova, V., Sanmartín-Masiá, E., Quintanilla-Sierra, L., Salmerón-Sánchez, M., Ferrer, G. G., "Gelatin—Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterbalance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation," *Macromolecular bioscience*, vol. 16, no. 9, p. 1311-1324, 2016.
 53. Vallés-Lluch, A., Poveda-Reyes, S., Amorós, P., Beltran, D., Monleón Pradas, M., "Hyaluronic Acid–Silica Nanohybrid Gels," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 12, p. 4217-4225, 2013.
 54. Pissis, P., Kyritsis, A., "Hydration studies in polymer hydrogels," *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 51, no. 3, p. 159-175, 2013.
 55. Enrione, J., Díaz-Calderón, P., Weinstein-Oppenheimer, C. R., Sánchez, E., Fuentes, M. A., Brown, D. I., Acevedo, C. A., "Designing a

- gelatin/chitosan/hyaluronic acid biopolymer using a thermophysical approach for use in tissue engineering," *Bioprocess and biosystems engineering*, vol. 36, no. 12, p. 1947-1956, 2013.
56. Balart, R., López, J., García, D., Parres, F., "Técnicas experimentales de análisis térmico de polímeros," 2003.
 57. Hatakeyama, T., Quinn, F. X., "Thermal analysis: fundamentals and applications to polymer science," [sl], 1999.
 58. M. S. Sánchez, On the nature of thermal transitions in acrylic polymer gels. (Doctoral dissertation), Universidad Politécnica de Valencia, 2002.
 59. T. Hatakeyama, F.X. Quinn. *Thermal Analysis: Fundamentals and applications to polymer Science*. John Wiley and Sons, 1994.
 60. A. J. Muller, R. M. Michell. *Polymer Morphology: Principles, Characterization, and Processing, Differential Scanning Calorimetry of Polymers*, John Wiley & Sons, 2016.
 61. Chartoff RP, Sircar AK. *Thermal analysis of polymers*, Encyclopedia of Polymer Science and Technology. New York: John Wiley & Sons, 2005.
 62. AOCs Lipid Library - American Oil Chemist's Society
 63. Noel, T. R., Parker, R., Ring, S. G., "Effect of molecular structure and water content on the dielectric relaxation behavior of amorphous low molecular weight carbohydrates above and below their glass transition," *Carbohydrate Research*, vol. 329, no. 4, p. 83, 2000.
 64. <http://dielectricsgroup.physics.ntua.gr/q200>
 65. G. Limousin et al., Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement, *Applied Geochemistry* 22 (2007) 249–275.
 66. Η. Χρηστάκης, ' ' Διηλεκτρική μελέτη υλικών βραδείας καύσεως ' ', Μεταπτυχιακή εργασία, Αθήνα, 2001.
 67. Γ. Κοντός, ' ' Φαινόμενα ηλεκτρικής χαλάρωσης σε σύνθετα υλικά εποξειδικής ρητίνης κεραμικού TiO₂ ' ', Μεταπτυχιακή εργασία, Πάτρα, 2008.
 68. Κλώνος, Π., Μοριακή δυναμική και αλλαγές φάσης σε πολυμερή προσροφημένα σε νανοσωματίδια οξειδίων. 2009, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο: Αθήνα.
 69. S. Brunauer, L. S. Deming, W. E. Deming, E. Teller, On a theory of the van der Waals adsorption of gases, *J. of The American Chemical Society*, 62(7) (1940) 1723-1732.
 70. M. Mathlouthi, B. Roge, Water vapor sorption isotherms and the caking of food powders, *Food Chem.* 82(1) (2003) 61-71.
 71. S. Brunauer, P. H. Emmet, E. Teller, Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Am. Chem. Soc.*, 60 (2) (1938) 309-319.
 72. J. Blahovec, S. Yanniotis, GAB Generalized equation for sorption phenomena, *Food Bioprocess Tech.*, (2007).

73. Panagopoulou, A., Molina, J. V., Kyritsis, A., Pradas, M. M., Lluch, A. V., Ferrer, G. G., Pissis, P., "Glass transition and water dynamics in hyaluronic acid hydrogels," *Food biophysics*, vol. 8, no. 3, p. 192, 2013.
74. Noel, T. R., Parker, R., Ring, S. G., "Effect of molecular structure and water content on the dielectric relaxation behaviour of amorphous low molecular weight carbohydrates above and below their glass transition," *Carbohydrate Research*, vol. 329, no. 4, p. 83, 2000.
75. Orford, P. D., Parker, R., Ring, S. G., "Aspects of the glass transition behaviour of mixtures of carbohydrates of low molecular weight," *Carbohydrate Research*, vol. 196, p. 11-18, 1990.
76. "Thermal analysis to determine various forms of water present in hydrogels," TA Instruments. TA384.
77. Seidl, M., Elsaesser, M. S., Winkel, K., Zifferer, G., Mayer, E., Loerting, T., "Volumetric study consistent with a glass-to-liquid transition in amorphous ices under pressure," *Physical Review B*, vol. 83, no. 10, p. 100201, 2011.
78. Aktas, N., Tülek, Y., Gökalp, H. Y., "Determination of freezable water content of beef semimembranous muscle DSC study," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 48, no. 2, p. 259-266, 1997.
79. Xu, K., Narayanan, K., Lee, F., Bae, K. H., Gao, S., Kurisawa, M., "Enzyme-mediated hyaluronic acid-tyramine hydrogels for the propagation of human embryonic stem cell in 3D," *Acta biomaterialia*, vol. 24, no. 159-171, 2015.