



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

Σχηματισμός βιοσυμβατών φιλμ φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών – χιτοζάνης με ενσωματωμένο εκχύλισμα άγριου τριαντάφυλλου



Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δέτση Αναστασία

Μπουργιώτη Μαριάννα
Αθήνα, Σεπτέμβριος 2020

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019 – 2020 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια Αναστασία Δέτση για τη δυνατότητα εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας στο πλαίσιο του εργαστηρίου, φέρνοντας με σε επαφή με καινοτόμες τεχνολογίες και σύγχρονα εργαλεία επιστημονικής έρευνας. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Νεφέλη Ποντίλλο για την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και την καθημερινή υποστήριξη της, καθώς και την διδάκτορα Ανδρομάχη Τζάνη και τις υποψήφιες διδάκτορες Αννίτα Κατωπόδη και Μαρία Μπαϊρακτάρη. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Άννα Παπαϊωάννου, καθώς κομβικά σημεία της παρούσας εργασίας στηρίχθηκαν στα αποτελέσματα της δικής της διπλωματικής εργασίας, και την εταιρεία Korres Natural Products για την προσφορά της πρώτης ύλης. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα εργαστήρια Οργανικής Χημείας, Βιοτεχνολογίας, Πολυμερών, Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας για την παροχή οργάνων και τη διεξαγωγή απαιτούμενων αναλύσεων.

Περίληψη

Το άγριο τριαντάφυλλο (*Rosa canina* L.) είναι ένα φυτό πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά με υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Έχει χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα ως θεραπευτικό βότανο για τόνωση του οργανισμού και καταπολέμηση του κοινού κρυολογήματος, ενώ στη σύγχρονη εποχή αξιοποιείται σε διάφορες βιομηχανίες με κυρίαρχη αυτή της κοσμητολογίας. Πολλές εταιρείες καλλυντικών χρησιμοποιούν το εκχύλισμα του άγριου τριαντάφυλλου και το αιθέριο έλαιό του ως βασικό συστατικό για τις αντιγηραντικές του ιδιότητες και την περιποίηση της επιδερμίδας.

Ως Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES) ορίζονται τα μείγματα δύο ή περισσότερων φυσικών συστατικών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, μεταβαίνοντας από στερεή σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Χαρακτηρίζονται ως πράσινοι διαλύτες που μπορούν να αντικαταστήσουν τους συμβατικούς και, πιθανώς, τοξικούς διαλύτες. Η ευκολία παρασκευής, η βιοαποικοδομησιμότητα και η χαμηλή τοξικότητα που παρουσιάζουν, τους καθιστούν ιδιαιτέρως δημοφιλείς για χρήση σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Η χρήση τους ως εκχυλιστικά μέσα έχει κερδίσει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς παρουσιάζουν ποικιλία ως προς την πολικότητά τους, ανάλογα με τα συστατικά τους, διαλυτοποιώντας, έτσι, εύρος επιθυμητών ουσιών. Το σημαντικότερο είναι ότι μετά το πέρας της εκχύλισης, όχι μόνο δεν απαιτείται ανάκτηση των ουσιών, εφόσον τα NaDES δεν αποτελούν τοξικό περιβάλλον και μπορούν να λειτουργήσουν ως μήτρα αποθήκευσης και προστασίας ευαίσθητων ενώσεων, αλλά η παρουσία τους μπορεί να προσδίδει και επιπλέον ιδιότητες στο σύστημα, καταλήγοντας σε ένα τελικό προϊόν προστιθέμενης αξίας.

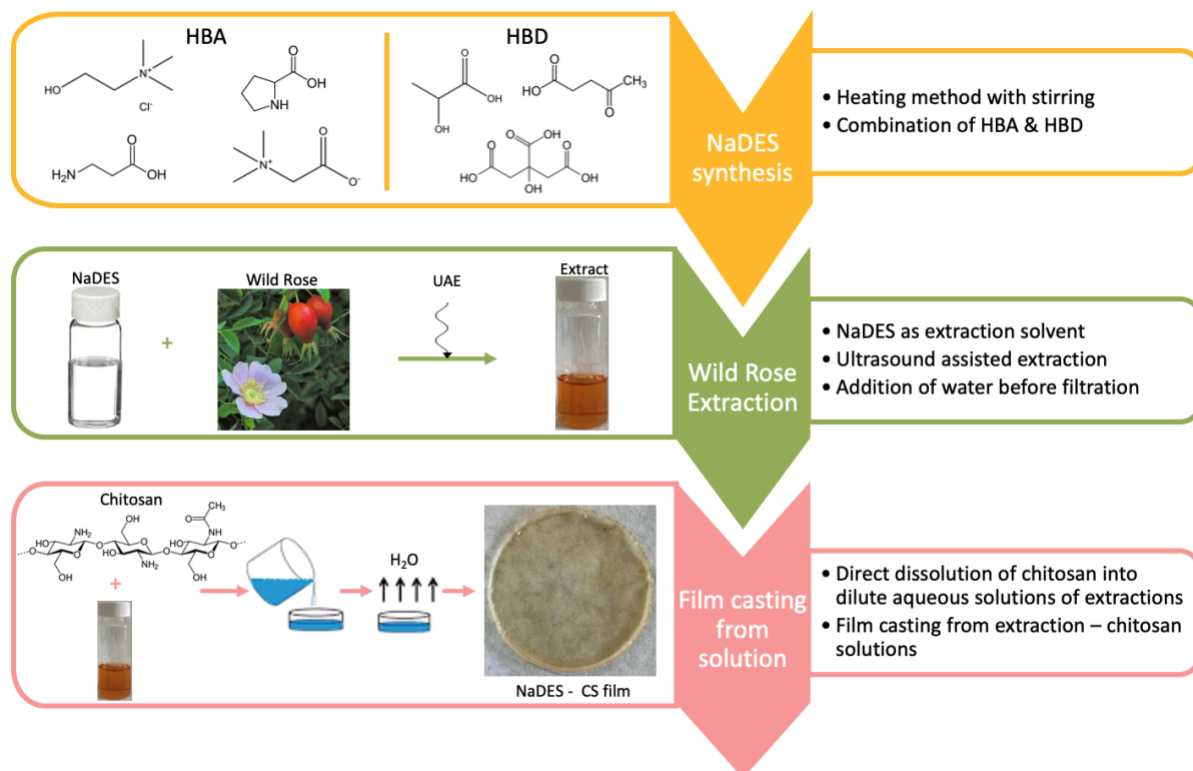
Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής, αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση 8 NaDES με τη μέθοδο της θέρμανσης και ο χαρακτηρισμός τους. Ως δότες ηλεκτρονίων (HBD) χρησιμοποιήθηκαν τα οργανικά οξέα γαλακτικό, κιτρικό και λεβουλνικό οξύ ενώ ως δέκτες (HBA) η βεταΐνη, η χλωριούχος χολίνη, η προλίνη και η αλανίνη. Τα NaDES που παρασκευάστηκαν αξιοποιήθηκαν ως διαλύτες στην εκχύλιση του άγριου τριαντάφυλλου υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE). Οι παράμετροι της εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν διασφαλίζουν τη μεγιστοποίηση της απόδοσης εκχύλισης των φλαβονοειδών. Η επίδραση του διαλύτη στην εκχύλιση των ολικών φαινολικών (TPC), ολικών φλαβονοειδών (TFC) καθώς και στην αντιοξειδωτική ικανότητα του τελικού εκχυλίσματος μελετήθηκαν διεξοδικά.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε μετατροπή των εκχυλισμάτων σε φιλμ με χρήση χιτοζάνης ως μέσο σταθεροποίησης. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν αραιά υδατικά διαλύματα των NaDES και μελετήθηκε η ικανότητα απευθείας διάλυσης της χιτοζάνης. Όπου αυτό κατέστη εφικτό, και το πολυμερές διαλύθηκε σε συγκέντρωση τουλάχιστον 0.2%, έγινε εξάτμιση του νερού για το σχηματισμό φιλμ με τη μέθοδο της χύτευσης. Ακολούθησε η ταυτοποίηση των ιδιοτήτων των φιλμ: μάζα, πάχος, χρώμα, σκληρότητα, διαπερατότητα υδρατμών (WVP), αντιοξειδωτική δράση και εναπομείνουσα υγρασία. Προσδιορίστηκαν οι παράμετροι που καθορίζουν τις ιδιότητες αυτές και αποδείχθηκε ότι η επιλογή διαλύτη αποτελεί καθοριστικό παράγοντα.

Παρουσιάζεται, λοιπόν, μια ολοκληρωμένη διεργασία από την επεξεργασία και την εκχύλιση της πρώτης ύλης, μέχρι την παρασκευή βιοσυμβατών καινοτόμων φιλμ προστιθέμενης αξίας και τον χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων τους. Η απευθείας διαλυτοποίηση της χιτοζάνης σε ένα φυτικό εκχύλισμα, που δεν έχει αναφερθεί ξανά βιβλιογραφικά, επιτρέπει την ελαχιστοποίηση ή εξάλειψη της χρήσης συμβατικά χρησιμοποιούμενων διαλυτών όπως το οξικό οξύ ή το υδροχλωρικό οξύ. Επιπλέον, οι ιδιότητες των φιλμ παρουσιάζουν διαφορές ανάλογα με το διαλύτη που έχει χρησιμοποιηθεί, υποδηλώνοντας ότι υπάρχει μεγάλη ευελιξία και προσαρμοστικότητα στο τελικό αποτέλεσμα.

Λέξεις Κλειδιά: Άγριο Τριαντάφυλλο, Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες, Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Μικροκύματα, Αντιοξειδωτική Δράση, Φλαβονοειδή, Χιτοζάνη, Βιοσυμβατά Φιλμ Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών – Χιτοζάνης, Επούλωση πληγών

Graphical Abstract



Abstract

Wild rose (*Rosa canina* L.) is a plant rich in bioactive compounds with high antioxidant activity. It has been used since ancient times as a medicinal herb for boosting the immune system and fighting off the common cold, while nowadays it is utilized in various industries, mainly in cosmetics. Many cosmetics companies incorporate in their products the extract of wild rose and the essential oil of wild rose as the main ingredients for antiaging and skincare.

Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) are mixtures of two or more natural compounds which interact with hydrogen bonds resulting in a liquid solvent at room temperature. They are characterized as green solvents that can substitute conventional and possibly toxic solvents. They can be used in a wide range of applications due to their easy preparation, biodegradability and low levels of toxicity. They appear to be very interesting as extraction solvents as their polarity varies, depending on their components, enabling them to solvate a great variety of substances. Most importantly, following the extraction, not only the separation of the extract is not necessary as NaDES are not toxic and can be used as a matrix for storing and protecting sensitive bioactive compounds, but also their presence can enhance the system's properties leading to a final value-added product.

In this diploma thesis, 8 NaDES were synthesized with the heating method and characterized. The organic acids lactic, citric and levulinic acid were used as hydrogen bond donors (HBD)

while betaine, choline chloride, proline and alanine were used as hydrogen bond acceptors (HBA). These NaDES were then utilized as solvents for the ultrasound assisted extraction (UAE) of wild rose. The selected parameters of extraction ensure the maximization of the extraction yield of flavonoid compounds. Moreover, the impact of the solvent on extract's total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activity were studied.

Finally, the extracts were converted into films with the incorporation of chitosan as a stabilizer. Specifically, dilute aqueous solutions of extractions were prepared and chitosan's direct dissolution was studied. In the samples that chitosan dissolved with a concentration of at least 0.2 %, the water was evaporated in order for the films to be formed with the method of casting. Subsequently, the identification of films' properties took place: mass, thickness, color, burst strength, distance at burst, water vapor permeability (WVP), antioxidant activity and remaining moisture. Also, the parameters that affect those properties were defined and it was demonstrated that solvent's selection is a determining factor.

In conclusion, a completed process is presented starting from the processing and extraction of the raw material to the formation of novel value-added biocompatible films and their characterization. The direct dissolution of chitosan in a plant extract, not previously mentioned in the literature, leads to the minimization or elimination of the use of conventional solvents such as acetic acid or hydrochloric acid. Furthermore, films' properties differ depending on the solvent used, suggesting there is great flexibility and adaptability regarding the final product.

Keywords: Wild Rose, Natural Deep Eutectic Solvent, Ultrasound Assisted Extraction, Antioxidant Activity, Total Flavonoid Content, Chitosan, Biocompatible films of NaDES with Chitosan

Περιεχόμενα

Πρόλογος	1
Περίληψη	2
Graphical Abstract	4
Abstract.....	4
Περιεχόμενα	6
Κατάλογος Γραφημάτων.....	9
Κατάλογος Πινάκων	10
Κατάλογος Σχημάτων.....	11
Κατάλογος Εικόνων.....	12
1. Εισαγωγή.....	13
1.1. Πράσινη Χημεία	13
1.1.1.Εισαγωγή στην Πράσινη Χημεία.....	13
1.1.2. Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES)	15
1.1.2.1. Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES)	16
1.1.2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες DES και NaDES.....	17
1.1.2.3. Εφαρμογές των DES και NaDES	18
1.1.2.4. Μέθοδοι παρασκευής DES	20
1.1.2.5. Επιμέρους συστατικά NaDES.....	21
1.2. Μέθοδοι εκχύλισης.....	22
1.2.1. Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (Ultrasound Assisted Extraction, UAE)	22
1.3. Βιοενεργές Ενώσεις	23
1.3.1. Φαινολικές Ενώσεις	24
1.3.1.1. Φλαβονοειδή	26
1.3.1.2. Φαινολικά Οξέα	27
1.3.2. Ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση	28
1.4. Άγριο Τριαντάφυλλο (Wild Rose, WR).....	30
1.4.1. Σύσταση Άγριου Τριαντάφυλλου	32
1.5. Χιτοζάνη (Chitosan, CS).....	35
1.5.1. Φιλμ χιτοζάνης.....	37
1.5.1.1. Ιδιότητες φιλμ χιτοζάνης	37
1.5.1.2. Εφαρμογές φιλμ χιτοζάνης.....	38
1.5.1.3. Βιοσυμβατά φιλμ βαθέως ευτηκτικών διαλυτών χιτοζάνης	39
2. Πειραματικό Μέρος.....	40
2.1. Σκοπός.....	40
2.2. Όργανα, συσκευές και αντιδραστήρια.....	40

2.3. Παρασκευή NaDES.....	42
2.4. Χαρακτηρισμός NaDES.....	44
2.4.1. Φασματοσκοπία FT-IR	44
2.4.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH	44
2.5. Εκχύλιση άγριου τριαντάφυλλου υποβοηθούμενη με υπερήχους (UAE).....	45
2.6. Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων	47
2.6.1. Φασματοσκοπία FT-IR	47
2.6.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH	47
2.6.3. Μέτρηση ολικών φαινολικών (Total Phenolic Content, TPC)	48
2.6.4. Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών (Total Flavonoid Content, TFC)	48
2.7. Προσδιορισμός διαλυτότητας χιτοζάνης σε υδατικά διαλύματα εκχυλισμάτων και pH διαλυμάτων	49
2.8. Σχηματισμός βιοσυμβατών φιλμ φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών χιτοζάνης	49
2.9. Χαρακτηρισμός φιλμ.....	51
2.9.1. Φασματοσκοπία ATR – FT-IR	51
2.9.2. Μέτρηση μάζας.....	51
2.9.3. Μέτρηση πάχους	51
2.9.4. Μέτρηση χρώματος	51
2.9.5. Μέτρηση σκληρότητας	52
2.9.6. Μέτρηση διαπερατότητας υδρατμών (Water Vapor Permeability, WVP)	53
2.9.7. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης των φιλμ	54
2.9.8. Προσδιορισμός υγρασίας με λυοφιλίωση	55
3. Αποτελέσματα – Συζήτηση	56
3.1. Χαρακτηρισμός NaDES.....	56
3.1.1. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH	56
3.2. Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων	58
3.2.1. Φασματοσκοπία FT-IR	58
3.2.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH	61
3.2.3. Μέτρηση ολικών φαινολικών (Total Phenolic Content, TPC)	62
3.2.4. Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών (Total Flavonoid Content, TFC)	63
3.3. Προσδιορισμός διαλυτότητας χιτοζάνης σε υδατικά διαλύματα εκχυλισμάτων και pH διαλυμάτων	64
3.4. Σχηματισμός φιλμ χιτοζάνης	66
3.5. Χαρακτηρισμός φιλμ.....	68
3.5.1. Φασματοσκοπία ATR – FT-IR	68
3.5.2. Μέτρηση μάζας και πάχους.....	71
3.5.3. Μέτρηση χρώματος	72
3.5.4. Μέτρηση σκληρότητας	73
3.5.5. Μέτρηση διαπερατότητας υδρατμών (Water Vapor Permeability, WVP)	74
3.5.6. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH	76
3.5.7. Προσδιορισμός υγρασίας με λυοφιλίωση	76
4. Συμπεράσματα.....	77

5. Προτάσεις μελλοντικής έρευνας	80
6. Βιβλιογραφία	82
7. Παράρτημα	86

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 3-1: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/ChCl:LA	59
Γράφημα 3-2: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Bet:LA	59
Γράφημα 3-3: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Pro:LA	60
Γράφημα 3-4: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/ChCl:LA/0.2	68
Γράφημα 3-5: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/ChCl:LA/0.3	68
Γράφημα 3-6: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/Bet:LA/0.2	69
Γράφημα 3-7: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/Pro:LA/0.2	70
Γράφημα 7-1: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης DPPH.....	86
Γράφημα 7-2: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης γαλλικού οξέος.....	86
Γράφημα 7-3: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης κατεχίνης.....	87
Γράφημα 7-4: Φάσμα FT-IR του NaDES ChCl:LA.....	87
Γράφημα 7-5: Φάσμα FT-IR του NaDES Bet:LA	88
Γράφημα 7-6: Φάσμα FT-IR του NaDES Pro:LA	88
Γράφημα 7-7: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Ala:LA.....	89
Γράφημα 7-8: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Bet:CA:W	89
Γράφημα 7-9: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Pro:CA:W	90
Γράφημα 7-10: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Bet:LevA	90
Γράφημα 7-11: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/ChCl:CA	91
Γράφημα 7-12: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/Bet:LA/0.3	91
Γράφημα 7-13: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/Ala:LA/0.2	92
Γράφημα 7-14: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/Bet:LevA/0.2	92

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1-1: Βασικές πληροφορίες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή NaDES.....	21
Πίνακας 1-2: Ιστορικά καταγεγραμμένες θεραπευτικές χρήσεις του WR.....	31
Πίνακας 1-3: Ενδεικτικές συγκεντρώσεις βιοενεργών ενώσεων του WR με αντιοξειδωτική δράση.....	33
Πίνακας 1-4: Τριτερπενικά οξέα, λιπαρά οξέα και γαλακτολιπίδια που εντοπίζονται βιβλιογραφικά στο WR.....	34
Πίνακας 1-5: Διαφοροποίηση σύστασης βιοενεργών ενώσεων μεταξύ σπόρων και περιβλήματος του WR.....	34
Πίνακας 1-6: Τομείς αξιοποίησης της χιτοζάνης βάσει των επιμέρους ιδιοτήτων και εφαρμογών της.....	36
Πίνακας 2-1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν.....	40
Πίνακας 2-2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.....	41
Πίνακας 2-3: Συστατικά και συνθήκες παρασκευής NaDES με τη μέθοδο της θέρμανσης...	43
Πίνακας 2-4: Χημικές δομές NaDES.....	44
Πίνακας 2-5: Συμβολισμός παραγόμενων εκχυλισμάτων.....	45
Πίνακας 2-6: Συμβολισμός παραγόμενων φιλμ και αντίστοιχη περιεκτικότητά τους σε CS..	50
Πίνακας 3-1: Αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων αναφοράς και των επιμέρους συστατικών των NaDES [IC ₅₀ (g/L)].....	56
Πίνακας 3-2: Αντιοξειδωτική δράση των NaDES [IC ₅₀ (mL/L)].....	57
Πίνακας 3-3: Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων [IC ₅₀ (mL/L)].....	61
Πίνακας 3-4: Ολικό φαινολικό. περιεχόμενο, TPC, των εκχυλισμάτων.....	62
Πίνακας 3-5: Ολικά φλαβονοειδή, TFC, των εκχυλισμάτων.....	63
Πίνακας 3-6: Τιμές pH και διαλυτότητας χιτοζάνης σε υδατικά διαλύματα περιεκτικότητας 1 % v/v σε εκχύλισμα.....	64
Πίνακας 3-7: Τιμές pH υδατικών διαλυμάτων περιεκτικότητας 1 % v/v σε εκχύλισμα και 0.2 ή 0.3 % w/v σε χιτοζάνη.....	65
Πίνακας 3-8: Τιμές μάζας και πάχους φιλμ.....	71
Πίνακας 3-9: Τιμές παραμέτρων L, a, b των φιλμ.....	72
Πίνακας 3-10: Τιμές Δi, όπου i: L, a, b, και ΔE των φιλμ.....	73
Πίνακας 3-11: Τιμές δύναμης θραύσης και επιμήκυνσης κατά τη θραύση των φιλμ.....	73
Πίνακας 3-12: Τιμές διαπερατότητας υδρατμών, ρυθμού μεταφοράς υδρατμών και ποσοστού μάζας υδρατμών που διαπερνούν κάθε φιλμ εντός 24 h.....	75
Πίνακας 3-13: Αντιοξειδωτική δράση των φιλμ F/ChCl:LA/0.2 και F/Pro:LA/0.2 [IC ₅₀ (g/L)].....	76

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1-1: Διάκριση πολυφαινολικών ενώσεων φυτών σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή	25
Σχήμα 1-2: Βασική δομή και υποκατηγορίες φλαβονοειδών.	27
Σχήμα 1-3: Διάκριση φαινολικών οξέων βάσει της προέλευσης τους από βενζοϊκό ή κινναμωνικό οξύ.	28
Σχήμα 1-4: Αντίδραση φαινολικού αντιοξειδωτικού με την ελεύθερη ρίζα DPPH	29
Σχήμα 1-5: Δομή χιτίνης και χιτοζάνης.	35

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1-1: Οι Δώδεκα Αρχές της Πράσινης Χημείας σε κάθε ένα από τα κλαδιά και οι διαθέσιμοι μηχανισμοί, υλικά και διεργασίες στα φύλλα για την υλοποίηση της κάθε αρχής.	14
Εικόνα 1-2: Απεικόνιση της διαφοροποίησης μεταξύ (α) ευτηκτικού διαλύτη και (β) βαθέως ευτηκτικού διαλύτη σε διάγραμμα δύο φάσεων, όπου Mp: σημείο τήξης, ΔTf: πτώση σημείου τήξης, Ec: ευτηκτική σύσταση και Ep: ευτηκτικό σημείο	15
Εικόνα 1-3: Απεικόνιση του σχηματισμού ευτηκτικού μείγματος μεταξύ δότη και δέκτη δεσμού υδρογόνου.....	16
Εικόνα 1-4: Με πρώτες ύλες τις (1): σουκρόζη (Suc), (2): φρουκτόζη (Fru), (3): γλυκόζη (Glc) και (4): μηλικό οξύ (MA) παρασκευάζονται τα NaDES (5): Suc:Fru:Glc 1:1:1 και (6): Suc:MA 1:1.	16
Εικόνα 1-5: Βηματική απεικόνιση εκχύλισης με χρήση NaDES.....	19
Εικόνα 1-6: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους σε λουτρό.....	23
Εικόνα 1-7:(i) Άνθος και καρπός του άγριου τριαντάφυλλου, αριστερά (ii) εγκάρσια τομή του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου, δεξιά.	30
Εικόνα 1-8: Μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης φιλμ χιτοζάνης ενισχυμένα με εκχύλιμα πρόπολης.	38
Εικόνα 2-1: Πειραματική διάταξη παρασκευής NaDES με ελεγχόμενη θέρμανση και μαγνητική ανάδευση.	43
Εικόνα 2-2: Διήθηση του εκχυλίσματος E/ChCl:CA, προς απομάκρυνση της στερεής πρώτης ύλης και παραλαβής του τελικού εκχυλίσματος.....	46
Εικόνα 2-3: (i) Εκχύλιμα E/ChCl:CA πριν τη διήθηση, αριστερά (ii) Εκχύλιμα E/ChCl:CA μετά τη διήθηση, δεξιά.	47
Εικόνα 2-4: Κρυσταλλωτήρια με υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος και χιτοζάνης εντός υδατόλουτρου προς σχηματισμό φιλμ	51
Εικόνα 2-5: Φιλμ τεντωμένο πάνω στην οπή του ενός εκ των δύο πλακιδίων.	52
Εικόνα 2-6: (i) Ο αισθητήρας κατευθύνεται κατακόρυφα προς τα κάτω, αριστερά (ii) Ο αισθητήρας προκαλεί θραύση του φιλμ, δεξιά	53
Εικόνα 2-7: Το σύστημα κρυσταλλωτήριο – νερό – φιλμ παραμένει εντός ξηραντήρα ανάμεσα στη λήψη των διαδοχικών του ζυγίσεων.	54
Εικόνα 3-1: Παραγόμενα εκχυλίσματα κατά σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: E/Pro:LA, E/ChCl:CA, E/Ala:LA, E/Pro:CA:W, E/ChCl:LA και E/Bet:CA:W.....	58
Εικόνα 3-2: (i) Φιλμ F/ChCl:LA/0.2, αριστερά (ii) Φιλμ F/Bet:LA/0.2, δεξιά.	66
Εικόνα 3-3: (i) Φιλμ F/ChCl:LA/0.3, αριστερά (ii) Φιλμ F/Bet:LA/0.3, δεξιά.	66
Εικόνα 3-4: (i) Φιλμ F/Pro:LA/0.2, αριστερά (ii) Φιλμ F/Ala:LA/0.2, δεξιά.	67
Εικόνα 3-5: (i) Φιλμ F/Bet:LevA/0.2, αριστερά (ii) Φιλμ F/ChCl:CA /0.2, δεξιά.	67

1. Εισαγωγή

1.1. Πράσινη Χημεία

1.1.1.Εισαγωγή στην Πράσινη Χημεία

Η Πράσινη Χημεία αποτελεί το θεωρητικό υπόβαθρο για το σχεδιασμό χημικών προϊόντων και διεργασιών με σκοπό την μείωση ή την εξάλειψη της χρήσης και της παραγωγής επικίνδυνων ουσιών.¹ Η εφαρμογή της αποσκοπεί, δηλαδή, στην ελάττωση των κινδύνων που αφορούν το περιβάλλον, την ανθρώπινη υγεία και ασφάλεια μέσω επανασχεδιασμού τοξικών μορίων και τροποποίησης συνθετικών μηχανισμών και βιομηχανικών διεργασιών.²

Βασική έννοια της Πράσινης Χημείας θεωρείται ο σχεδιασμός, ο οποίος υπάγεται σε συγκεκριμένους κανόνες, τις λεγόμενες «Δώδεκα Αρχές της Πράσινης Χημείας» που στοχεύουν υιοθέτηση της φιλοσοφίας της βιωσιμότητας και της αειφορίας.¹ Συνοπτικά, οι αρχές αυτές υποδεικνύουν την πρόληψη παραγωγής αποβλήτων, την ελαχιστοποίηση κατανάλωσης ενέργειας, την αξιοποίηση ανανεώσιμων πρώτων υλών, τον σχεδιασμό βιοδιασπώμενων προϊόντων και την επιλογή χημικών με γνώμονα την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας ατυχήματος. Στο ακόλουθο δέντρο (Εικόνα 1-1) παρουσιάζονται, επιγραμματικά σε κάθε κλαδί μία από τις αρχές και στα αντίστοιχα φύλλα διαθέσιμοι μηχανισμοί, υλικά, διαδικασίες και έννοιες που μπορούν να την εξυπηρετήσουν. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους αλλά δρουν συνεργιστικά για το σχεδιασμό ενός πιο βιώσιμου τελικού προϊόντος.²

Ο κλάδος της Πράσινης Χημείας είναι διεπιστημονικός και μπορεί να χαρακτηριστεί ως κράμα της χημείας, της χημικής μηχανικής, της τοξικολογίας και της οικολογίας. Η έρευνα επικεντρώνεται, κυρίως, στην ανάπτυξη νέων καταλυτών, στην διερεύνηση νέων διαλυτών (ιοντικά υγρά, βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες) και στην δοκιμή εναλλακτικών μηχανισμών διεργασιών.² Καθώς επιδιώκεται η βιωσιμότητα, βρίσκει εφαρμογή σε διάφορες βιομηχανίες, όπως αυτή της ενέργειας, των φαρμάκων, των καλλυντικών, των αυτοκινήτων, της αεροναυπηγικής, της γεωργίας και των ηλεκτρονικών συστημάτων.¹

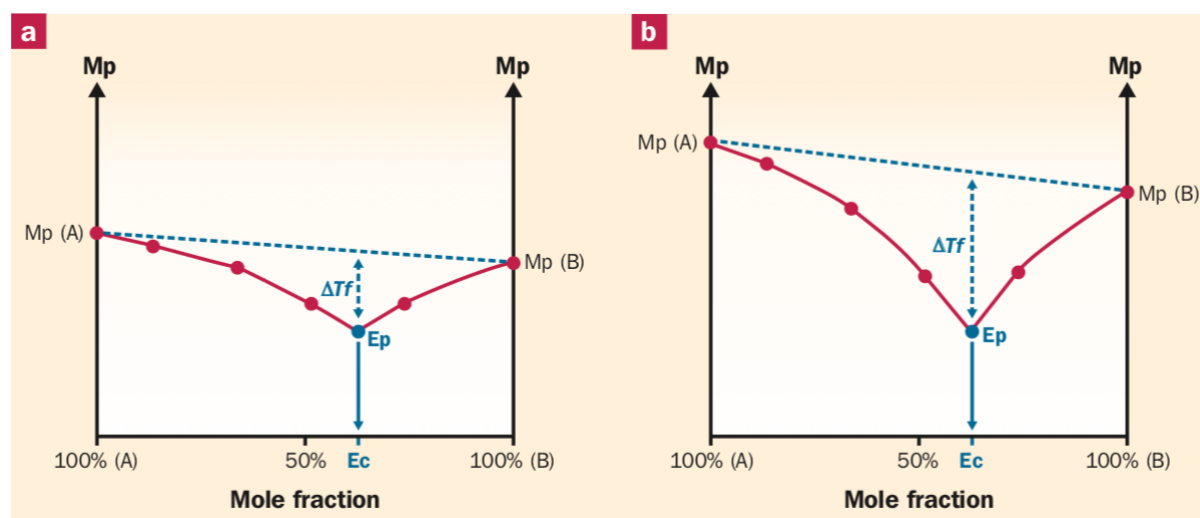
Βέβαια για να ποσοτικοποιηθούν τα οφέλη αυτού του, σχετικά, καινοτόμου τομέα, ο «πράσινος» σχεδιασμός, πέρα από την εργαστηριακή κλίμακα, θα πρέπει να εδραιωθεί περισσότερο και σε βιομηχανικό επίπεδο μεγάλης κλίμακας. Παράλληλα, σημαντική συνεισφορά στην ευρύτερη υιοθέτηση της Πράσινης Χημείας μπορεί να έχει η δημόσια ευαισθητοποίηση, κυρίως γύρω από την καταναλωτική δραστηριότητα, και οι κυβερνητικές αποφάσεις που ορίζουν κατευθυντήριες γραμμές για τις βιομηχανίες.²



Εικόνα 1-1: Οι Δώδεκα Αρχές της Πράσινης Χημείας σε κάθε ένα από τα κλαδιά και οι διαθέσιμοι μηχανισμοί, υλικά και διεργασίες στα φύλλα για την υλοποίηση της κάθε αρχής.²

1.1.2. Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES)

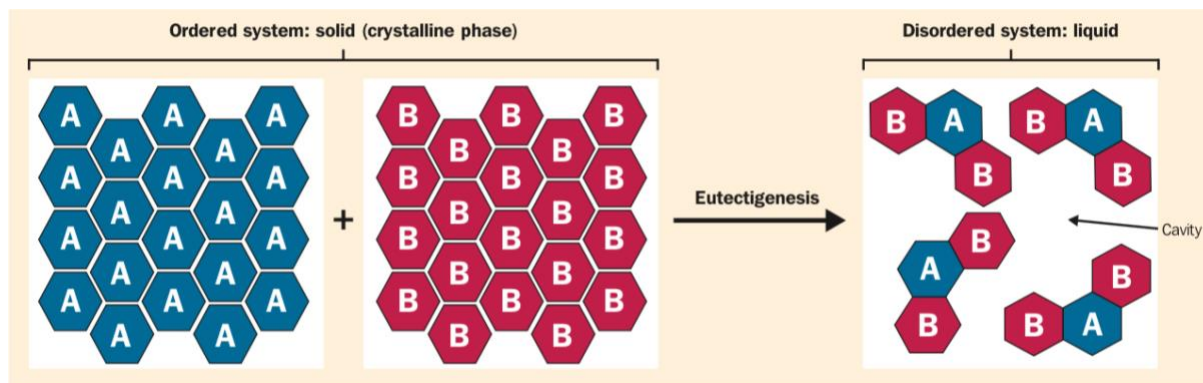
Στα πλαίσια της Πράσινης Χημείας, το ενδιαφέρον έχει στραφεί σημαντικά στη χρήση νέων διαλυτών, λιγότερο τοξικών έναντι των συμβατικών, για την εκχύλιση ή το διαχωρισμό επιθυμητών ουσιών. Παραδείγματα πράσινων διαλυτών αποτελούν τα Ιοντικά Υγρά και οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES). Τα DESs προκύπτουν από την ανάμιξη δύο ή τριών ουσιών σε συγκεκριμένη αναλογία και θερμοκρασία και χαρακτηρίζονται από σημείο τήξης πολύ χαμηλότερο από αυτό των επιμέρους συστατικών, λόγω ανάπτυξης διαμοριακών δεσμών υδρογόνου.^{3,4} Ο προσδιορισμός «βαθέως» έχει προστεθεί, καθώς, συγκριτικά με άλλα ευτηκτικά μείγματα, η απόκλιση του σημείου τήξης ενός DES από τα συστατικά του μπορεί να είναι 100-200°C (Εικόνα 1-2).⁵



Εικόνα 1-2: Απεικόνιση της διαφοροποίησης μεταξύ (a) ευτηκτικού διαλύτη και (b) βαθέως ευτηκτικού διαλύτη σε διάγραμμα δύο φάσεων, όπου Mp: σημείο τήξης, ΔT_f : πτώση σημείου τήξης, Ec: ευτηκτική σύσταση και Ep: ευτηκτικό σημείο.⁵

Έτσι, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος απαντώνται σε υγρή φάση.^{3,4} Τα συγκεκριμένα ευτηκτικά μείγματα προέρχονται από συνδυασμό δεκτών δεσμού υδρογόνου (hydrogen bond acceptors, HBAs), όπως άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου ή φωσφονίου, και δοτών δεσμού υδρογόνου (hydrogen bond donors, HBDs), όπως οργανικά οξέα. Βέβαια, έχει παρατηρηθεί και ο σχηματισμός DES μεταξύ αλάτων μετάλλων και απλών οργανικών αλκοολών ή αμιδίων.³ Από τον παραπάνω συνδυασμό προκύπτουν διαυγή, ιξώδη ρευστά, η σταθερότητα και το ιξώδες των οποίων εξαρτάται από την αναλογία των επιμέρους συστατικών.⁵

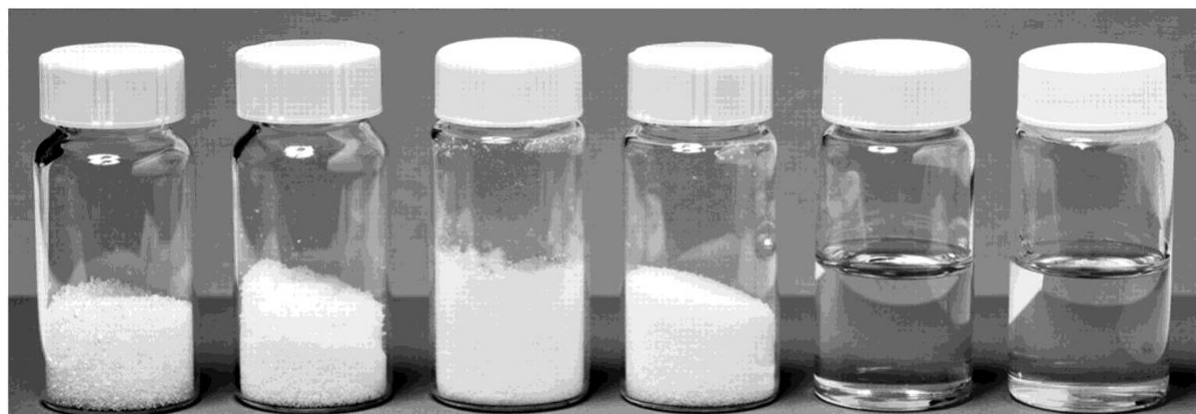
Η μοριακή διάταξη των DESs χαρακτηρίζεται από αυξημένο κενό όγκο μέσω αναδιάταξης των μοριακών δικτύων των επιμέρους συστατικών του. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1-3, το ένα συστατικό ενός DES, έστω στερεό A, παρουσιάζει πολύ συμπαγή δομή, με ελάχιστο κενό χώρο μεταξύ των μορίων. Αν, όμως, αλληλοεπιδράσει με δεσμούς υδρογόνου με άλλο συστατικό, έστω B, δημιουργώντας ένα ευτηκτικό μείγμα, το κρυσταλλικό του πλέγμα διαταράσσεται. Έτσι, οι κοιλότητες μεταξύ των μορίων είναι περισσότερες, επιτρέποντας την διάχυση τους εντός του συστήματος, και το τελικό μείγμα σε υγρή φάση.



Εικόνα 1-3: Απεικόνιση του σχηματισμού ευτηκτικού μείγματος μεταξύ δότη και δέκτη δεσμού υδρογόνου.⁵

1.1.2.1. Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES)

Υποκατηγορία των DESs αποτελούν οι Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES) των οποίων τα επιμέρους συστατικά είναι πρωτογενείς μεταβολίτες κυττάρων και, συνεπώς, ασφαλή, φιλικά προς το περιβάλλον και χαμηλά σε κόστος. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως συντίθενται από ουσίες όπως σάκχαρα, πολυαλκοόλες, μικρά οργανικά οξέα και βάσεις, αμίνες, πολυόλες και αμινοξέα. Συγκριτικά με τα ιοντικά και τα DESs, υπερτερούν ως διαλύτες εκχύλισης καθώς χαρακτηρίζονται από ρυθμιζόμενο ιώδες, είναι βιώσιμα και πολλά παραμένουν στην υγρή φάση ακόμα και σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 0°C.^{4,6}



1 **2** **3** **4** **5** **6**
Εικόνα 1-4: Με πρώτες ύλες τις (1): σουκρόζη (Suc), (2): φρουκτόζη (Fru), (3): γλυκόζη (Glc) και (4): μηλικό οξύ (MA) παρασκευάζονται τα NaDES (5): Suc:Fru:Glc 1:1:1 και (6): Suc:MA 1:1.⁷

Η μελέτη αυτής της υποκατηγορίας ξεκίνησε το 2011 (Verpoorte *et al.*) στην προσπάθεια ερμηνείας του λόγου ύπαρξης υψηλών, σχετικά, συγκεντρώσεων κάποιων συστατικών, όπως σακχάρων, αλάτων τεταρτοταγούς αμμωνίου, αμινοξέων, πολυόλων και οργανικών οξέων, σε φυτικά κύτταρα και συσχέτισής τους με κάποια λειτουργία ζωτικής σημασίας. Καθώς οι επιμέρους αυτές ουσίες τείνουν να συσσωρεύονται στα φυτά στην προσπάθεια αντοχής τους έναντι της ξηρασίας και, ταυτόχρονα, μπορούν να σχηματίσουν DESs, προέκυψε το

συμπέρασμα ότι σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες τα κύτταρα σχηματίζουν φυσικά DESs, στα οποία οι μεμβράνες, τα ένζυμα και οι μεταβολίτες παραμένουν σταθεροί, διατηρώντας την ακεραιότητά τους. Ακόμα, καθώς παρατηρήθηκε η βιοσύνθεση, αποθήκευση και μεταφορά μακρομορίων στα κύτταρα που είναι σχεδόν αδιάλυτα στις δύο μη αναμειξιμες υγρές φάσεις του, στην υδατική και την λιπαρή, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη NaDESs που επιτελούν τον ρόλο μιας τρίτης υγρής φάσης για την πραγματοποίηση των παραπάνω.^{5,8}

Τα NaDEs, με βάση τα συστατικά τους, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 5 βασικές ομάδες⁶:

1. NaDESs, ιοντικά υγρά, που προκύπτουν από ένα οξύ και μια βάση
2. NaDESs, ουδέτερα, που προκύπτουν από σάκχαρα ή σάκχαρα και πολυαλκοόλες
3. NaDESs, ουδέτερα με οξέα, που προκύπτουν από σάκχαρα/πολυαλκοόλες και οργανικά οξέα
4. NaDESs, ουδέτερα με βάσεις, που προκύπτουν από σάκχαρα/πολυαλκοόλες και οργανικές βάσεις
5. NaDESs που προκύπτουν από αμινοξέα και σάκχαρα/οργανικά οξέα

1.1.2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες DES και NaDES

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs επηρεάζονται άμεσα από τη σύνθεσή τους. Συνεπώς, ιδιότητες όπως το σημείο τήξης, η αγωγιμότητα, η πυκνότητα και το ιξώδες μπορούν να καθοριστούν με ανάλογο σχεδιασμό της δομής τους.

Τα DESs παρουσιάζουν σημείο τήξης χαμηλότερο από αυτό των συστατικών τους, γεγονός που οφείλεται, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.1.2., στην παρουσία αυξημένου κενού όγκου και στην ασύμμετρη κατανομή φορτίου των ιόντων στο σύστημα.³ Η αναλογία του συστατικού με ρόλο HBD φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το σημείο τήξης καθώς αυξημένες αλληλεπιδράσεις ανιόντων με δεσμούς υδρογόνου επιφέρουν μείωση αντίστοιχων αλληλεπιδράσεων με κατιόντα. Έτσι, η πτώση του σημείου τήξεως είναι αποτέλεσμα την εξασθένησης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ιόντων θετικού και αρνητικού φορτίου.⁹

Το είδος του HBD, του HBA, καθώς, και η μοριακή αναλογία τους επηρεάζουν σημαντικά την πυκνότητα, το ιξώδες, την αγωγιμότητα, την πολικότητα και την επιφανειακή τάση του τελικού ευτηκτικού μείγματος. Όσον αφορά την πυκνότητα των DESs, είναι υψηλότερη του νερού και του καθαρού HDB.^{3,9}

Τα DESs, γενικά, έχουν υψηλότερο ιξώδες και επιφανειακή τάση και χαμηλότερη αγωγιμότητα συγκριτικά με άλλους συμβατικούς διαλύτες. Συγκεκριμένα, το ιξώδες των περισσότερων σημειώνεται μεγαλύτερο των 100 cP. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στην παρουσία ισχυρού δικτύου δεσμών υδρογόνου που περιορίζει την κινητικότητα και υποβοηθάται από την ταυτόχρονη παρουσία δυνάμεων van der Waals και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Όπου αυτό αποτελεί εμπόδιο στην αξιοποίηση τους σε εφαρμογές, μπορεί να γίνει ελεγχόμενη προσθήκη νερού. Με αύξηση της θερμοκρασίας το ιξώδες, η

πολικότητα και η επιφανειακή τους τάση μειώνεται ενώ η αγωγιμότητα τους αυξάνεται (μικρότερη από $2 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος).⁹

Επίσης, τα DESs επιδεικνύουν πολύ καλή διαλυτότητα για διάφορες ουσίες, όπως φάρμακα, οξείδια μετάλλων και CO_2 και, μάλιστα, μελέτες (Morrison et al.) έχουν αποδείξει ότι πέντε συγκεκριμένα φάρμακα είναι 5-22000 φορές πιο διαλυτά σε DESs από ότι στο νερό.³ Η φύση του HBA του DESs είναι καθοριστική για την ενίσχυση της διαλυτοποίησης φαρμακευτικών συστατικών, όπως φαινυλαιθανικό, ακετυλοσαλικυλικό και βενζοϊκό οξύ. Ακόμα, το DNA φαίνεται να διαλυτοποιείται καλύτερα στους DESs με αποδόμηση χαμηλότερη από ότι στα ιοντικά υγρά.⁹

Τέλος, σχετικά με τις πιο «πράσινες» ιδιότητές τους, έχει παρατηρηθεί ότι τα DESs με βάση τη χλωριούχο χολίνη παρουσιάζουν χαμηλή προς μέτρια κυτταροτοξικότητα, σημαντική αντιβακτηριακή δράση και χαρακτηρίζονται ως άμεσα βιοαποικοδομήσιμα.^{10,11} Συνολικά, όμως, έχει παρατηρηθεί ένας βαθμός τοξικότητας ως προς έμβιους οργανισμούς, ιδίως όταν προκύπτουν από οξέα ή όταν αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη, καθώς έτσι μπορούν να εισχωρήσουν στο κύτταρο, να συσσωρευθούν στην επιφάνεια του, καταστρέφοντας την κυτταρική μεμβράνη και τις εσωτερικές πρωτεΐνες και ένζυμα, προκαλώντας, τελικά, κυτταρικό θάνατο. Για τον περιορισμό της τοξικότητας, λοιπόν, τα επιμέρους συστατικά των DESs επιλέγονται ώστε να αποτελούν ουσίες που συναντώνται συχνά στα μεταβολικά μονοπάτια των κυττάρων.¹²

1.1.2.3. Εφαρμογές των DES και NaDES

Τα DESs, επιδεικνύοντας χαμηλό κόστος παραγωγής, χημική αδράνεια με το νερό, βιοαποικοδομησιμότητα, φαρμακευτικά αποδεκτή τοξικότητα και ασφάλεια στη χρήση, προτιμώνται έναντι των σχετικά επικίνδυνων και ακριβών ιοντικών υγρών. Τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν ως αποτέλεσμα το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον αξιοποίησής τους σε διάφορα επιστημονικά και τεχνολογικά πεδία, όπως είναι η οργανική σύνθεση, η εκχύλιση, η κατάλυση, η ηλεκτροχημεία, η επιστήμη των υλικών και ο καθαρισμός καυσίμων.^{4,13}

1.1.2.3.1. Οργανικές αντιδράσεις

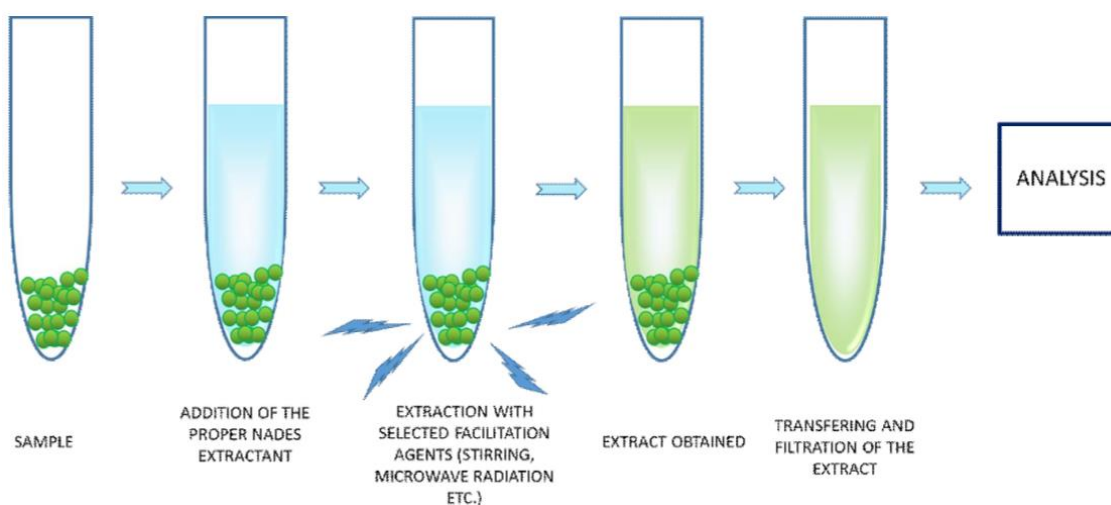
Η χρήση των NaDESs έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε οργανικές συνθέσεις. Στις περισσότερες από αυτές, πέρα από ρόλο πράσινου διαλύτη, επιτελούν και ρόλο καταλύτη ενώ η διεργασία πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες. Συγκριτικά με άλλους συμβατικούς διαλύτες έχουν επιδείξει μικρότερους χρόνους αντίδρασης, μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στο τελικό προϊόν και απόδοση.¹⁴ Σημαντική είναι και η ευκολία ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης των διαλυτών αυτών καθιστώντας τη σύνθεση πιο αποδοτική και επιβεβαιώνοντας τον πράσινο χαρακτήρα τους.¹⁵

Ταυτόχρονα, τα NaDESs μπορούν να αξιοποιηθούν σε διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις υδρολασών ή λιπασών. Συγκεκριμένα, έχουν χρησιμοποιηθεί ως διαλύτες σε ενζυμικές

υδρολύσεις λιγνινοκυτταρινούχου μάζας, όπου συντελούν στην ικανοποιητική αφαίρεση λιγνίνης και ανάκτηση κυτταρίνης.¹⁶ Επίσης, ενδιαφέρουσα είναι και η χρήση NaDESs σε ενζυμική εστεροποίηση με ρόλο διαλύτη και υποστρώματος. Τα επιμέρους συστατικά του NaDESs συνιστούν και τα αντιδρώντα της εστεροποίησης, η οποία υποβοηθάται με την προσθήκη της κατάλληλης λιπάσης.¹⁷

1.1.2.3.2. Εκχύλιση

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των NaDESs σε συνδυασμό με την ευκολία προετοιμασίας τους και την χαμηλή τοξικότητά τους, τους καθιστούν διαλύτες κατάλληλους για την εκχύλιση ενός εύρους πολικών και μη πολικών ενώσεων. Στις πολικές ενώσεις η διαλυτοποίηση ελέγχεται με την προσθήκη ορισμένης ποσότητας νερού, που δρά ως συνδυαλύτης, ενώ στις μη πολικές προτιμάται η χρήση καθαρών NaDESs. Συνοπτικά, αφού παρασκευαστεί το NaDES, ακολουθεί ανάμειξη του με την πρώτη ύλη και το μείγμα οδηγείται προς εκχύλιση υποβοηθούμενη από την εκάστοτε επιλεγμένη μέθοδο (μηχανική ανάδευση, χρήση υπερήχων κ.α.). Το εκχύλισμα διαχωρίζεται από το υπόλειμμα και αναλύεται περαιτέρω πριν τη χρήση (Εικόνα 1-5). Με βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης (περιεκτικότητα νερού, θερμοκρασία, χρόνος, επιλογή NaDES) αυξάνεται η απόδοση της διεργασίας και η σταθερότητα του εκχυλίσματος.¹⁸



Εικόνα 1-5: Βηματική απεικόνιση εκχύλισης με χρήση NaDES.¹⁸

Τα NaDESs έχουν αξιοποιηθεί ως εκχυλιστικά μέσα ουσιών διαφόρων φυσικών πρώτων υλών, όπως, φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών, ανθοκυανινών, κατεχινών, ενώ φαίνονται πολλά υποσχόμενοι και για την εκχύλιση βιοενώσεων (αλκαλοειδών, ορμονών και πεπτιδίων).^{18,19}

Το βασικό ενδιαφέρον της εκχύλισης με χρήση NaDESs έγκειται στις δυνάμεις που αναπτύσσει ο διαλύτης με το εκχύλισμα. Το πλέγμα των δυνάμεων είναι τέτοιο που προστατεύει τις ουσίες από την υποβάθμισή τους, και συνεπώς, δεν κρίνεται απαραίτητος ο διαχωρισμός τους από το διαλύτη, καθώς αυτός αποτελεί και αποθηκευτικό τους μέσο.¹⁹

Μπορεί να υιοθετηθεί η χρήση τους και σε εκχυλίσματα όπου ο διαχωρισμός είναι επιθυμητός. Παράδειγμα αποτελεί η διαδικασία καθαρισμού βιοντίζελ από γλυκερίνη με χρήση DES χλωριούχου χολίνης – γλυκερίνης. Μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού, το DES επιτελεί και μέσο απομάκρυνσης του καταλύτη από το καύσιμο.³

1.1.2.3.3. Ηλεκτροχημεία

Τα NaDES βρίσκουν εφαρμογή και στην ηλεκτροχημική ανάλυση κυρίως λόγω της υψηλής ιοντικής αγωγιμότητά τους. Κυρίως αξιοποιούνται στην ηλεκτροαπόθεση μετάλλων της τέταρτης, πέμπτης και έκτης περιόδου του περιοδικού πίνακα, η οποία ευνοείται από την υψηλή διαλυτότητα αλάτων μετάλλων σε μη υδατικά διαλύματα καθώς και από την υψηλή αγωγιμότητα αυτών των διαλυτών. Πειραματικά έχουν χρησιμοποιηθεί NaDES με βάση τη χλωριούχο χολίνη για ηλεκτροαπόθεση πλήθους μετάλλων (Co, Zn, Ni, Cr, Mn, Cu, Ag κ.α.) και κραμάτων (Zn/Cr, Zn/Sn κ.α.).^{14,20}

1.1.2.3.4. Λοιπές εφαρμογές

Τα NaDESs, κυρίως με συστατικό τη χλωριούχο χολίνη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά τη σύνθεση νανοϋλικών και πολυμερών, τόσο για τη διαλυτοποίηση του μονομερούς, όσο και ως μέσο πολυμερισμού, επιδεικνύοντας καλύτερες αποδόσεις από άλλους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες.¹⁴

Ακόμα, η κατεργασία μέταλλο-οργανικών υλικών με χρήση NaDESs μπορεί να επιφέρει αύξηση του πορώδους τους και των ελεύθερων μεταλλικών κέντρων τους, δηλαδή αύξηση της δυνατότητας προσρόφησης αερίων, τεχνολογία που μπορεί να βρει εφαρμογή στις προσπάθειες διαχείρισης και αποθήκευσης των βασικών αερίων του θερμοκηπίου, των CO₂ και CH₄.³

1.1.2.4. Μέθοδοι παρασκευής DES

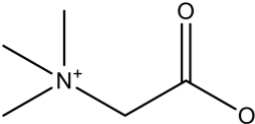
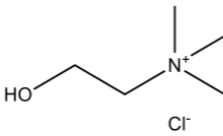
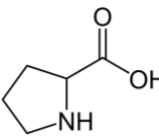
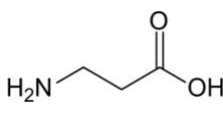
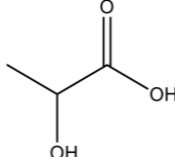
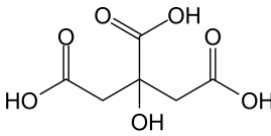
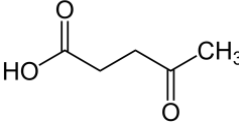
Έχουν καταγραφεί διάφορες μέθοδοι προετοιμασίας των DESs με συνηθέστερες τη μέθοδο της θέρμανσης και της λυοφιλίωσης (freeze drying). Κατά την παρασκευή με θέρμανση συγκεκριμένες ποσότητες των επιμέρους συστατικών, βάσει της απαιτούμενης γραμμομοριακής αναλογίας, προστίθενται σε σφαιρική φιάλη, η οποία εισάγεται σε διάταξη ανάδευσης και θέρμανσης σε θερμοκρασίες εύρους 50-80 °C και για χρόνο 2-4 h έως ότου προκύψει διαυγές ρευστό. Σε περιπτώσεις πολύ ιξώδους DES προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα νερού.⁸ Στη μέθοδο της λυοφιλίωσης οι ποσότητες των συστατικών διαλυτοποιούνται σε νερό, τα διαλύματα αυτά αναμειγνύονται και το τελικό δείγμα φυγοκεντρείται. Κατόπιν, καταψύχεται σε θερμοκρασίες έως -80 °C και ξηραίνεται μέσω εξαχνωσης του πάγου.¹³ Ακόμα, υπάρχει και η μέθοδος εξάτμισης υπό κενό κατά την οποία οι απαιτούμενες ποσότητες των συστατικών, αφού διαλυθούν σε νερό, οδηγούνται προς εξάτμιση στους 50 °C σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Μετά το πέρας της διαδικασίας το προϊόν αφήνεται σε ξηραντήρα με silica gel μέχρι σταθερού βάρους. Συνολικά, προτιμάται η

μέθοδος της θέρμανσης ως οικονομικότερη και ασφαλέστερη, κυρίως σε περιπτώσεις που το DES αποτελείται από θερμικά ασταθείς πρώτες ύλες, όπως σάκχαρα ή αμινοξέα.⁸

1.1.2.5. Επιμέρους συστατικά NaDES

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με όλα τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των NaDES.

Πίνακας 1-1: Βασικές πληροφορίες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή NaDES

Ένωση	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος	Μοριακό Βάρος (g/mol)	Σημείο Τήξης (°C)	Πυκνότητα (g/cm ³)
Βεταΐνη	C ₅ H ₁₁ NO ₂		117.15	-	-
Χλωριούχος χολίνη	C ₅ H ₁₄ ClNO		139.62	-	-
L-Προλίνη	C ₅ H ₉ NO ₂		115.13	-	-
β-Αλανίνη	C ₃ H ₇ NO ₂		89.05	-	-
Γαλακτικό Οξύ	C ₃ H ₆ O ₃		90.078	-	1.209
Κιτρικό Οξύ	C ₆ H ₈ O ₇		192.43	-	-
Λεβουλικό Οξύ	C ₅ H ₈ O ₃		116.12	-	1.134

1.2. Μέθοδοι εκχύλισης

Η εκχύλιση είναι μια τεχνική απομόνωσης ενώσεων στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Συγκεκριμένα, η εκχύλιση στερεού – υγρού αφορά την ανάμειξη στερεής πρώτης ύλης, που περιέχει την επιθυμητή ένωση, με επιλεγμένο υγρό διαλύτη, στον οποίο τείνει να μεταβεί η ένωση λόγω καλής διαλυτότητας. Τέτοιες ενώσεις μπορεί να είναι φυσικές βιοδραστικές ενώσεις, προερχόμενες από μύκητες, φυτά, φύκη κ.α., και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως αλκανοειδή, φλαβονοειδή, ισοπρενοειδή κ.α.⁹ Συνήθως, πριν την εκχύλιση τα φυτικά δείγματα υπόκεινται σε κατεργασία άλεσης και ομογενοποίησης με ταυτόχρονη ξήρανση με αέρα ή υπό ψύξη. Γενικά, η λυοφιλίωση διατηρεί υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο στο δείγμα σε σχέση με την ξήρανση με αέρα.²¹

Οι εκχυλιστικές μέθοδοι διακρίνονται σε δύο βασικές υποκατηγορίες, στις συμβατικές και στις μη συμβατικές (μοντέρνες). Στις συμβατικές μεθόδους ανήκουν:

- η διαβροχή
- η διήθηση
- η εκχύλιση Soxhlet
- η εκχύλιση με χρήση διαλύτη

Συνήθως, όμως, αποτελούν εκχυλίσαις χρονοβόρες, περίπλοκες, κοστοβόρες λόγω της υψηλής απαίτησης ποσότητας διαλυτών, χαμηλής απόδοσης λόγω θερμικής αποικοδόμησης, χαμηλής ασφάλειας λόγω επικίνδυνων και εύφλεκτων διαλυτών και με αδυναμία διάθεσης και επαναχρησιμοποίησης των διαλυτών.

Οι μη συμβατικές μέθοδοι περιλαμβάνουν:

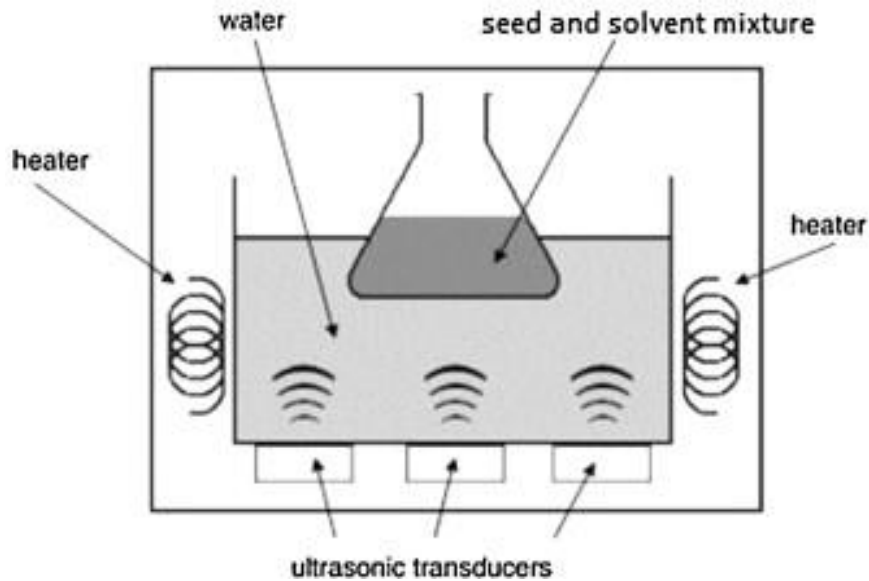
- την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση
- την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους
- την εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα
- την εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά
- την εκχύλιση με υποκρίσιμα υγρά
- την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υψηλή πίεση

Αυτές οι μέθοδοι χαρακτηρίζονται συνήθως από υψηλότερη αποτελεσματικότητα, μικρότερο χρόνο και κόστος εκχύλισης και υψηλότερη καθαρότητα επιθυμητής ένωσης στο παραλαμβανόμενο εκχύλισμα. Συνδυαστικά με χρήση πράσινων διαλυτών, όπως τα DES, μπορούν να αντικαταστήσουν τους παραδοσιακούς αλλά επικίνδυνους διαλύτες της τωρινής βιομηχανίας.⁹

1.2.1. Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (Ultrasound Assisted Extraction, UAE)

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας ως πράσινη μέθοδος εκχύλισης επιλέχθηκε η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (UAE). Με τη μέθοδο UAE αξιοποιείται η ενέργεια των υπερήχων, με συνήθη συχνότητα 40 kHz, η οποία διευκολύνει την αλληλεπίδραση μεταξύ δείγματος και εκχυλιστικού διαλύτη. Η ακτινοβολία υπερήχων μπορεί να εφαρμοστεί είτε με χρήση διάταξης λουτρού νερού (Εικόνα 1-6) είτε με χρήση υπερηχητικού διαταράκτη

(ultrasonic probes) κατά την οποία επιτυγχάνεται μεγαλύτερη διοχέτευση ενέργειας ανά όγκο και καλύτερος έλεγχος των παραμέτρων της διεργασίας.²²



Εικόνα 1-6: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους σε λουτρό.²³

Η ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης με UAE οφείλεται στο φαινόμενο σπηλαίωσης, με ταυτόχρονη παραγωγή φυσαλίδων, και στη διάτρηση αυτών μέσω της διάδοσης των κυμάτων των υπερήχων στο διαλύτη. Η διάνοιξη των φυσαλίδων σπηλαίωσης επιφέρει ισχυρότερη αλληλεπίδραση εντός του συστήματος μέσω έντονης διάρρηξης των κυτταρικών μεμβρανών που εμπεριέχουν την επιθυμητή ένωση και ενισχυμένης μεταφοράς μάζας. Σε μηχανικό επίπεδο, οι υπερήχοι επιτρέπουν μεγαλύτερη διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα του δείγματος, αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής μεταξύ υγρής και στερεής φάσης και εντείνουν τις μοριακές δονήσεις. Έτσι, συνολικά, αυξάνεται η απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού προϊόντος στο μέσο εκχύλισης σε μικρότερο χρόνο. Η εφαρμογή υψηλότερων θερμοκρασιών μπορεί να καταστήσει την εκχύλιση πιο αποτελεσματική, εξαιτίας της αύξησης των σχηματιζόμενων φυσαλίδων.^{23,24,21}

Λόγω υψηλής απόδοσης ανάκτησης, απλότητας και ταχύτητας πλεονεκτεί έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, ενώ, λόγω χαμηλού κόστους, χαμηλών απαιτήσεων σε εξοπλισμό και μικρότερης αποικοδόμησης φαινολικών, προτιμάται έναντι των άλλων μη συμβατικών μεθόδων. Η ελεγχόμενη θέρμανση κατά την UAE με χρήση λουτρού διευκολύνει και την ανάκτηση θερμοευαίσθητων συστατικών (π.χ. αιθέρια έλαια). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε σε μικρή είτε σε μεγάλη κλίμακα στη βιομηχανία. Τέλος, κατά τη χρήση DES ως διαλύτη στη μέθοδο UAE απαιτείται μικρότερη ποσότητα διαλύτη και μικρότερος χρόνος εκχύλισης.^{21,22,23}

1.3. Βιοενεργές Ενώσεις

Κάθε ζωντανός οργανισμός παράγει και επεξεργάζεται πληθώρα χημικών ενώσεων για τη συντήρηση και την επιβίωσή του, οι οποίες μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες υποκατηγορίες. Η μία περιλαμβάνει τους πρωτογενείς μεταβολίτες, ουσίες που στοχεύουν

στην ανάπτυξη του οργανισμού, όπως υδατάνθρακες, αμινοξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια. Την δεύτερη υποκατηγορία συνιστούν οι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι ενισχύουν την ικανότητα του οργανισμού για επιβίωση και καθορίζουν τον τρόπο που αλληλεπιδρά με το περιβάλλον του. Πιο συγκεκριμένα, δεν συμβάλλουν στο στάδιο της ανάπτυξης, αλλά παράγονται σε φάση διαδοχική αυτής από συγκεκριμένες ταξινομικές ομάδες μικροοργανισμών ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες, παρουσιάζουν ασυνήθιστες χημικές δομές και, συχνά, σχηματίζονται ως μείγμα συγγενικών ενώσεων της ίδιας χημικής οικογένειας. Παράδειγμα τέτοιων μεταβολιτών αποτελεί το άρωμα που εκλύουν φυτά με άνθη ώστε να προσελκύσουν τα έντομα για τη γονιμοποίησή τους ή το τοξικό χημικό που συνθέτουν παθογόνα και φυτοφάγα είδη για τον περιορισμό της ανάπτυξης γειτονικών φυτών.

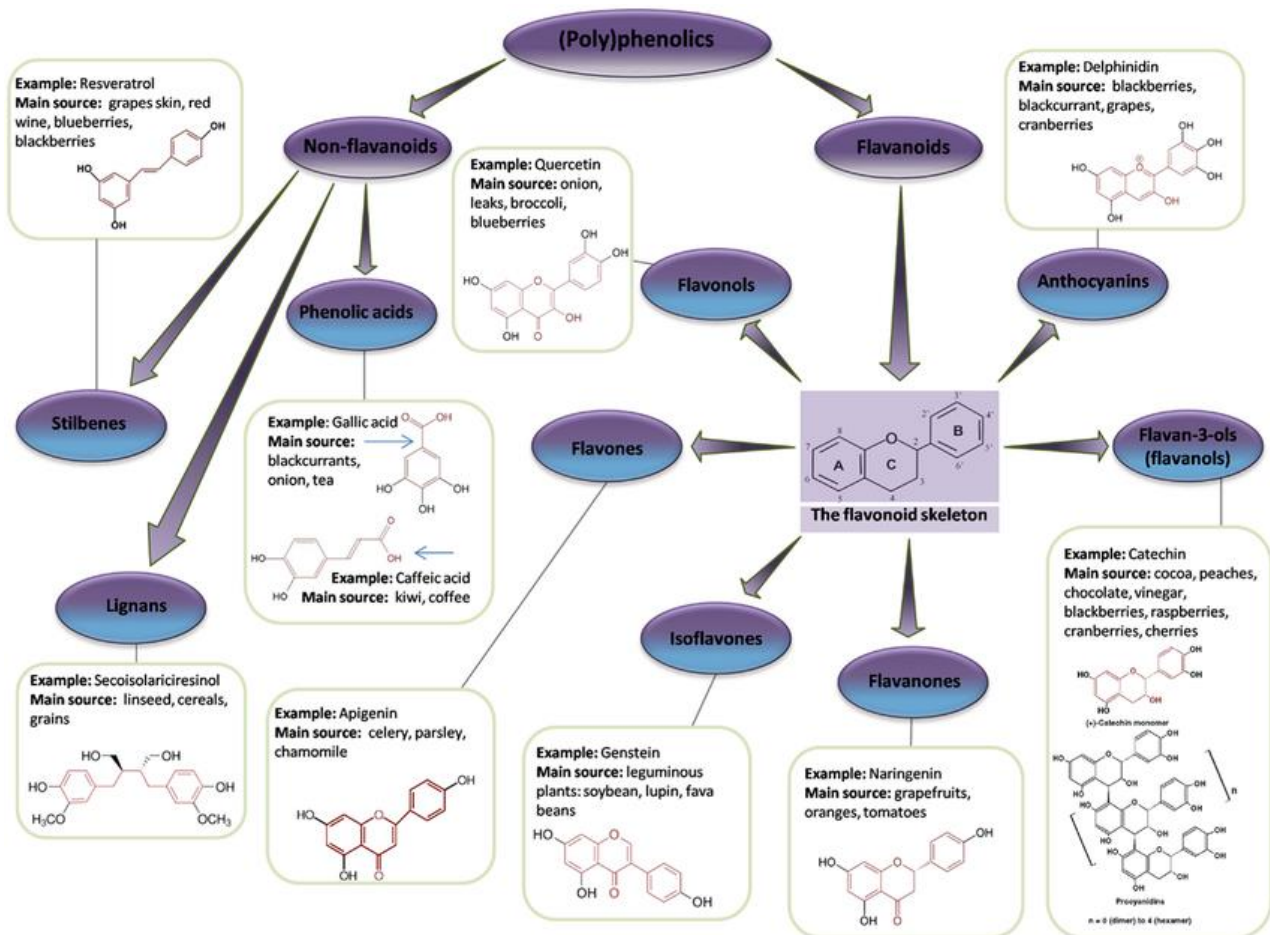
Όσοι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών επηρεάζουν βιολογικά συστήματα, δηλαδή όσοι παρουσιάζουν φαρμακολογική ή τοξικολογική επιρροή σε ανθρώπους και ζώα καλούνται βιοενεργές ενώσεις. Αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες βάσει της δομής τους που οφείλεται στον τρόπο βιοσύνθεσής τους:

- i. τερπένια και τερπενοειδή (περίπου 25000 είδη)
- ii. αλκαλοειδή (περίπου 12000 είδη)
- iii. φαινολικές ενώσεις (περίπου 8000 είδη)

Υπάρχουν τέσσερις βασικοί μηχανισμοί σύνθεσης βιοενεργών ενώσεων, η οδός σικιμικού οξέος, η οδός μηλονικού οξέος, η οδός μελαβονικού οξέος και η μη μελαβονική οδός. Τα αλκανοειδή που παράγονται από αρωματικά αμινοξέα προέρχονται από την οδό του σικιμικού οξέος, ενώ αυτά που παράγονται από αλειφατικά αμινοξέα από τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος. Τα τερπένια συντίθενται μέσω της οδού του μελαβινικού οξέος και της μη μελαβονικής οδού, ενώ οι φαινολικές ενώσεις μέσω των οδών του σικιμικού και του μηλονικού οξέος.²⁵

1.3.1. Φαινολικές Ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις, συνηθέστεροι δευτερογενείς μεταβολίτες, αποτελούνται συνδυασμό ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων και ενός ή περισσότερων δακτυλίων. Προς το παρόν είναι γνωστές πάνω από 8000 δομές και παραδείγματα των υποκατηγοριών τους αποτελούν οι απλές φαινόλες, τα φαινολικά οξέα, οι ακετοφαινόλες, οι κουμαρίνες, τα στιλβένια, τα φλαβονοειδή, οι λιγνάνες και οι υψηλά πολυμερισμένες ταννίνες (Σχήμα 1-1)^{9,21}



Σχήμα 1-1: Διάκριση πολυφαινολικών ενώσεων φυτών σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή

Οι φαινολικές ενώσεις φημίζονται για τις αντιοξειδωτικές και, πιθανώς, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές ιδιότητές τους, εμπλέκονται σε μηχανισμούς άμυνας κατά της υπερϊώδους ακτινοβολίας και προστατεύουν τα φυτά από παθογόνους μικροοργανισμούς και παράσιτα. Ούσες παρούσες σε όλα τα φυτικά όργανα, αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής. Πιο αναλυτικά, υπάρχουν σε αφθονία σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης (φρούτα, λαχανικά, όσπρια, δημητριακά κ.α.) και σε αναψυκτικά (τσάι, καφές, μπύρα, κρασί κ.α.) και είναι, εν μέρει, υπεύθυνες για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Για παράδειγμα, η προκυανιδίνη, αλληλεπιδρώντας με τη γλυκοπρωτεΐνη του σάλιου, καθορίζει πόσο πικρή και στυφή γεύση έχει ένα φρούτο. Οι ανθοκυανίνες δίνουν το πορτοκαλί, κόκκινο, μπλε ή μωβ χρώμα σε διάφορα φρούτα και λαχανικά. Ακόμα, η αντίδραση των φαινολικών ενώσεων με το οξυγόνο είναι καθοριστική για τη διατήρηση, την ωρίμανση και την παλαίωση των κρασιών.²¹

Η διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων καθορίζεται από το χημικό προφίλ της πρώτης ύλης, καθώς, και από την πολικότητα του χρησιμοποιούμενου διαλύτη. Παράλληλα, οι ίδιες οι ενώσεις μπορεί να σχηματίζουν σύμπλοκα με άλλα συστατικά του φυτού, όπως υδατάνθρακες ή πρωτεΐνες). Έτσι, συνυπολογίζοντας και την ποικιλομορφία τους, δεν είναι δυνατό να υπάρξει μια καθολική μέθοδος εκχύλισης τους. Σε κάθε περίπτωση, όμως, η εκχύλισή τους επηρεάζεται από το χρόνο και τη θερμοκρασία εκχύλισης. Αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση στη διαλυτότητα της ουσίας, λόγω εντονότερης μεταφοράς μάζας, και σε μείωση της επιφανειακής τάσης και του ιξώδους,

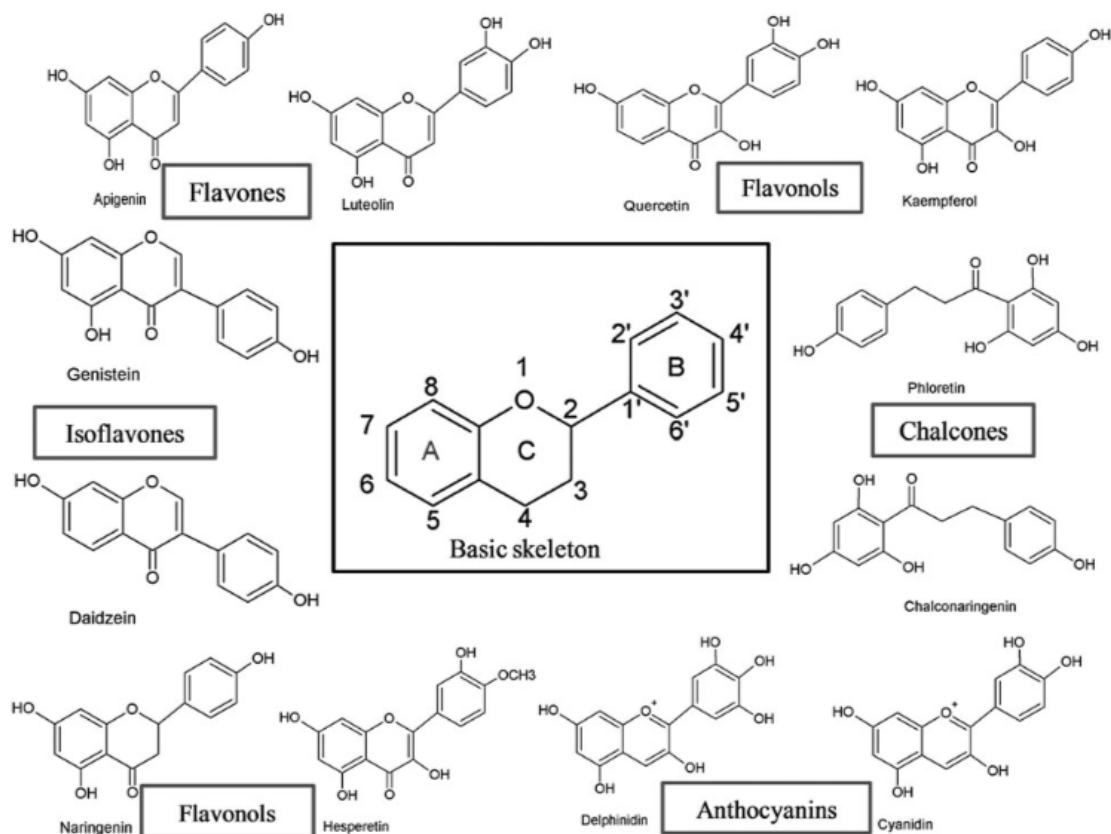
διευκολύνοντας τη διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα του δείγματος και αυξάνοντας το ρυθμό της εκχύλισης. Βέβαια, αύξηση του χρόνου και της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσουν και σε μειωμένη απόδοση αν οι επιθυμητές φαινολικές ενώσεις είναι ευαίσθητες σε οξείδωση και υδρόλυση. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση είναι το μέγεθος των σωματιδίων του στερεού δείγματος και η αναλογία διαλύτη και στερεού. Αύξηση της αναλογίας αυτή και μείωση του μεγέθους των σωματιδίων φαίνεται να επιδρούν θετικά στην απόδοση ανάκτησης των φαινολικών ενώσεων.²¹

Μια βασική μέθοδος προσδιορισμού των ολικών φαινολικών (Total Phenolics Content, TPC) είναι η μέθοδος Folin-Ciocalteu του Waterman. Βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων, εντός αλκαλικού περιβάλλοντος, από φαινολικές ενώσεις σε σύμπλοκα φωσφομολυβδαινικού/φωσφοβωλφραμικού οξέος προς σχηματισμό μπλε συμπλόκων, οι οποίες προσδιορίζονται φασματοσκοπικά με μέτρηση μέγιστης απορρόφησης στα 755 nm. Ως πρότυπο σύγκρισης χρησιμοποιείται το γαλλικό οξύ, δηλαδή τα αποτελέσματα αναγράφονται σε μονάδες ισοδύναμων mg gallic acid/kg δείγματος.²¹

1.3.1.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τις συνηθέστερες πολυφαινόλες της διατροφής μας. Η βασική τους δομή καλείται φλαβανικός πυρήνας (flavan nucleus) και περιλαμβάνει 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε 3 δακτυλίους, C6-C3-C6, που συμβολίζονται A, C και B, αντίστοιχα (Σχήμα 1-2). Ειδικότερα, οι δύο δακτύλιοι (A,B) είναι αρωματικοί και συνδέονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων (C). Όπως έχει αναφερθεί, για να προκύψει αυτή η σκελετική δομή ακολουθούνται δύο βιοσυνθετικές οδές: με αφετηρία τη φαιτυλαλανίνη και μέσω της οδού του σικιμικού οξέος συντίθεται η γέφυρα και ο ένας αρωματικός δακτύλιος, ενώ ο τρίτος δακτύλιος είναι προϊόν συμπύκνωσης τριών οξικών μονάδων παραγόμενων κατά την οδό του μηλονικού οξέος. Βέβαια, μπορούν να διαθέτουν υποκαταστάτες, όπως σάκχαρα, καθώς συνήθως συναντώνται ως γλυκοσίδες.

Ομαδοποιούνται σε υποκατηγορίες ανάλογα με σε ποιον άνθρακα του δακτυλίου C είναι συνδεδεμένος ο δακτύλιος B και με το βαθμό ακορεστότητας και οξείδωσης του C. Φλαβονοειδή των οποίων ο B συνδέεται με τον άνθρακα 3 του C καλούνται ισοφλαβόνες, ενώ όταν η σύνδεση γίνεται στη θέση 4 καλούνται νεοφλαβονοειδή. Στην περίπτωση που ο «συνδετικός κρίκος» είναι ο άνθρακας 2, ανάλογα με τη δομή του C, προκύπτει η περαιτέρω διάκριση των φλαβονοειδών σε φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, ανθοκυανίνες και χαλκόνες (Σχήμα 1-2). Η δομική ποικιλία κάθε υποκατηγορίας είναι αποτέλεσμα του βαθμού και του είδους υδροξυλίωσης, μεθοξυλίωσης, πρενυλίωσης και γλυκοζυλίωσης. Η πιο διαδεδομένη ομάδα χρωμοφόρων φλαβονοειδών είναι αυτή των ανθοκυανινών, που χαρακτηρίζονται ως β-γλυκοσίδες με σάκχαρα στη θέση 3, ενώ άλλα συνήθη φλαβονοειδή είναι η κερκετίνη, φλαβονόλη στα κρεμμύδια, στο μπρόκολο και στο μήλο, η κατεχίνη, φλαβανόλη στο τσάι και σε διάφορα φρούτα και η ναρινχερίνη, φλαβονόνη στο γκρέιπφρουτ.^{21,26,27}



Σχήμα 1-2: Βασική δομή και υποκατηγορίες φλαβονοειδών.²⁷

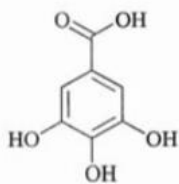
Αναφορικά με τη δράση τους, οι ανθοκυανίνες προσελκύουν επικονιαστές σε άνθη και καρπούς μέσω οπτικών σημάτων, ενώ απομακρύνουν μικρόβια και επιβλαβή έντομα. Τα φλαβονοειδή, επίσης, συσσωρεύονται στα επιδερμικά στρώματα περιορίζοντας την διόδο της υπεριώδους Β ακτινοβολίας (UV-B) και επιτρέποντάς την σε ορατά μήκη κύματος. Βάσει αυτού, σε πολλές χώρε αξιοποιούνται για την προστασία έναντι σε εγκαύματα από τον ήλιο. Στους φυτικούς οργανισμούς προσδίδουν αντοχή στην ξηρασία ή στον παγετό και βοηθούν στην προσαρμοστικότητα τους στις θερμοκρασιακές αλλαγές. Κατανάλωση τροφών πλούσιων σε φλαβονοειδή σχετίζεται με αυξημένη πρόσληψη αντιοξειδωτικών και μειωμένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου, φλεγμονών, καρδιακών ασθενειών, ισχαιμικού εγκεφαλικού, αρτηριοσκλήρυνσης και άλλων χρόνιων παθήσεων. Για παράδειγμα, η κερκετίνη θεωρείται ότι τροποποιεί τη βιοσύνθεση του εικοσανοειδούς, προστετεύει την λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας από οξείδωση, έχει αντιθρομβωτική δράση και χαλαρώνει τους καρδιαγγειακούς μύες.^{26,27}

Συνήθως, για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών (Total Flavonoids Content, TFC) χρησιμοποιείται η χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου, $AlCl_3$.²⁸

1.3.1.2. Φαινολικά Οξέα

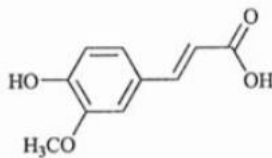
Τα φαινολικά οξέα μπορούν να διακριθούν σε αυτά που προέρχονται από το βενζοϊκό οξύ, όπως το γαλλικό οξύ, και σε αυτά που προέρχονται από το κινναμωμικό οξύ, όπως το κουμαρικό, το καφεϊκό και το φερούλικό οξύ (Σχήμα 1-3).

Hydroxybenzoic acid

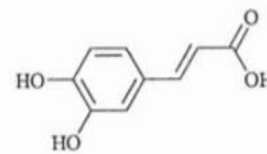


Gallic acid

Hydroxycinnamic Acid



Ferulic acid



Caffeic acid

Σχήμα 1-3: Διάκριση φαινολικών οξέων βάσει της προέλευσης τους από βενζοϊκό ή κινναμωνικό οξύ.²¹

Σε μεγαλύτερη αφθονία στα φρούτα και στα λαχανικά συναντάται το καφεϊκό οξύ, συνήθως ως χλωρογενικό οξύ ύστερα από εστεροποίηση με κινικό οξύ.²¹

1.3.2. Ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν ενώσεις, οι οποίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις δύναται να καθυστερήσουν, να παρεμποδίσουν ή να αποτρέψουν την οξείδωση οξειδώσιμων υποστρωμάτων συγκεντρώνοντας δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες και ελαττώνοντας το οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες περιγράφει μια κατάσταση έλλειψης ισορροπίας, όπου πλεονάζουσες ποσότητες αντιδραστικών ενώσεων οξυγόνου ή/και αζώτου (ROS/RNS π.χ. ανιόν σουπεροξειδίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου, ρίζα υδροξυλίου, υπεροξυνιτρώδη), προερχόμενες από τον κυτταρικό μεταβολισμό ως αποτέλεσμα ατμοσφαιρικής ρύπανσης, καπνίσματος κ.α., υπερβαίνουν την ενδογενή αντιοξειδωτική δυναμικότητα, οδηγώντας στην οξείδωση διαφόρων ενζύμων, πρωτεϊνών, DNA και λιπιδίων. Αυτή η ανισορροπία, μακροπρόθεσμα, συσχετίζεται με την ανάπτυξη χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών, όπως στεφανιαία αρτηριακή νόσος, καρκίνος και γήρανση.^{21,29}

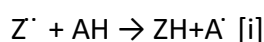
Υπάρχουν τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά που δρουν ως δότες ατόμων υδρογόνου στις πολύ δραστικές ρίζες ROO[•] και RO[•], τερματίζοντας την αλυσιδωτή αντίδραση τους και μετατρέποντάς τις σε σταθερά προϊόντα, διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης και παρεμποδίζουν ή καθυστερούν την οξείδωση. Παράλληλα, υπάρχουν και τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά που επιβραδύνουν την έναρξη της αλυσιδωτής αντίδρασης με πληθώρα μηχανισμών, όπως η δέσμευση ιόντων μετάλλων, η σάρωση ROS, η απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας, η μετατροπή υπεροξειδίων σε σταθερές ενώσεις ή η αδρανοποίηση του μονοατομικού οξυγόνου.^{29,30}

Παραδείγματα αντιοξειδωτικών αποτελούν τα καροτενοειδή, η βιταμίνη E, το ασκορβικό οξύ και οι φαινολικές ενώσεις, με τις τελευταίες να ξεχωρίζουν. Συγκεκριμένα, η συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών και χαμηλού κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, καρκίνου και οστεοπόρωσης αποδίδεται κυρίως στην περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ουσίες. Χαρακτηρίζονται ως πρωτογενή αντιοξειδωτικά που περιορίζουν, εξ αρχής, τη δράση ενζύμων και ιχνοστοιχείων που σχετίζονται με το

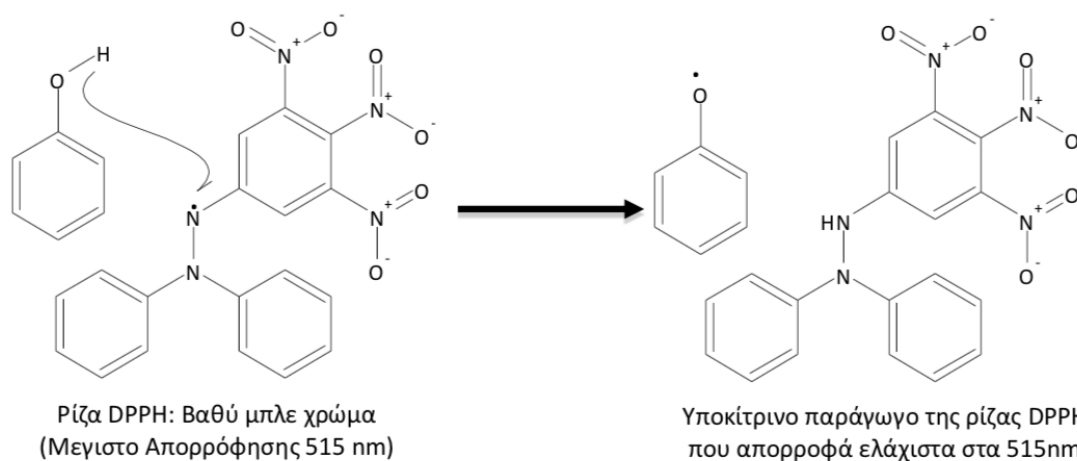
σηματισμό ελευθέρων ριζών ROS/RON, δεσμεύουν τις υπάρχουσες και διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση τους.²¹

Ο χαρακτηρισμός της αντιοξειδωτικής δράσης φυσικών εκχυλισμάτων γίνεται, συνήθως, με χρήση της χρωματομετρικής μεθόδου προσδιορισμού του ποσοστού αναγωγής της ρίζας DPPH. Η ουσία DPPH ή 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζίνη αποτελεί μια σταθερή ελεύθερη ρίζα (Σχήμα 1-4, αριστερά) εξαιτίας της μετεγκατάστασης ενός εφεδρικού ηλεκτρονίου στο μόριο συνολικά και της αποτροπή του διμερισμού του, φαινόμενο που συναντάται συνήθως στις υπόλοιπες ρίζες. Στο επιπλέον αυτό ηλεκτρόνιο οφείλει το βαθύ μωβ χρώμα του και μέγιστη απορρόφηση στα 515 nm σε αιθανολικό διάλυμα.^{30,31}

Κατά την ανάμειξη διαλύματος DPPH με ουσία – δότη ατόμου υδρογόνου, το υδρογόνο δεσμεύεται από τη ρίζα, η οποία μετατρέπεται σε ένα σταθερό παράγωγο της (Σχήμα 1-4, δεξιά). Τελικά, το διάλυμα αποχρωματίζεται από μωβ σε κίτρινο, λόγω των υπολειπόμενων πικρυλικών ομάδων. Συμβολίζοντας Z[·] την ρίζα DPPH και AH το μόριο – δότη, η μεταξύ τους αντίδραση είναι η



όπου ZH είναι η ανηγμένη μορφή του DPPH και A[·] η παραγόμενη ελεύθερη ρίζα. Αυτή θα υποβληθεί σε περαιτέρω αντιδράσεις που, τελικά, θα ορίσουν την συνολική στοιχειομετρία, δηλαδή τον αριθμό ανηγμένων μορίων DPPH που αντιστοιχούν σε ένα μόριο αναγωγικού AH, και την αντιοξειδωτική του δράση. Με την αντίδραση [i] αναπαρίστανται, λοιπόν, συστήματα οξείδωσης στους οργανισμούς, όπως η αυτοοξείδωση ενός λιπιδίου, όπου ρόλο οξειδωτικού μέσου παίζει το DPPH. Στο Σχήμα 1-4 παρουσιάζεται ο μηχανισμός της αντίδρασης [i], μεταξύ ενός φαινολικού αντιοξειδωτικού και της ελεύθερης ρίζας DPPH.^{30,31}



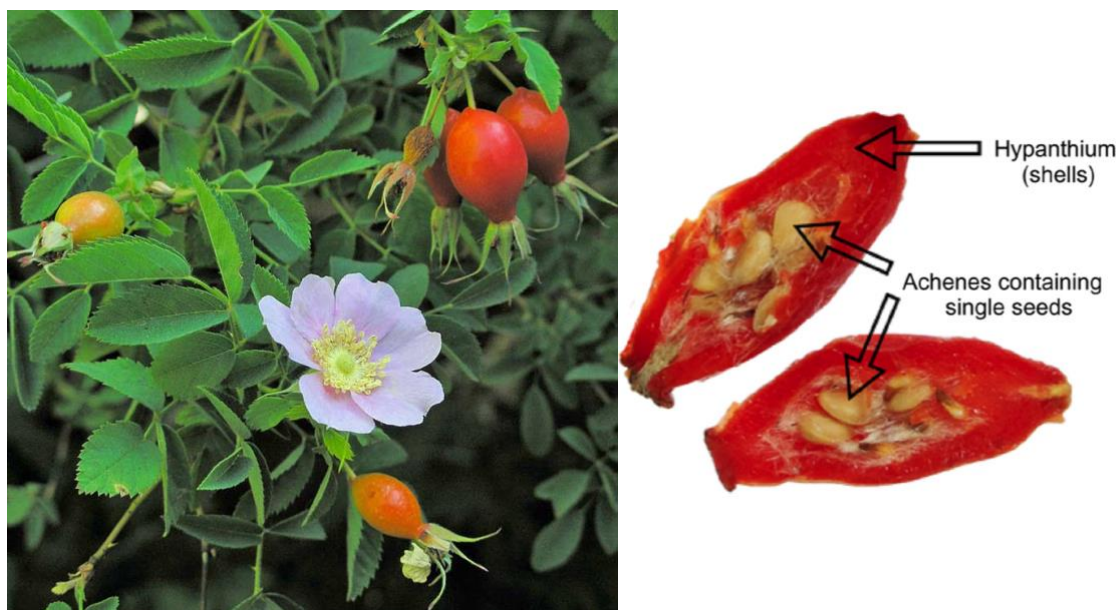
Σχήμα 1-4: Αντίδραση φαινολικού αντιοξειδωτικού με την ελεύθερη ρίζα DPPH.³⁰

Στα πλαίσια ερμηνείας των αποτελεσμάτων της μεθόδου DPPH ορίζεται η παράμετρος IC₅₀ (half maximum inhibitory concentration), η τιμή της οποίας υποδηλώνει πόση ποσότητα αντιοξειδωτικού υποστρώματος επιφέρει μείωση της ποσότητας DPPH στη μισή της αρχικής. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του δείκτη IC₅₀ τόσο μικρότερη ποσότητα της εκάστοτε ουσίας απαιτείται για την δέσμευση της μισής εκ της αρχικής ποσότητας DPPH, δηλαδή, τόσο καλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει η ουσία.^{30,31}

1.4. Άγριο Τριαντάφυλλο (Wild Rose, WR)

Στο γένος *Rosa* υπάγονται περίπου 200 είδη, πολλά από τα οποία θεωρείται ότι έχουν προκύψει μέσω υβριδισμού, συνδυασμένου με πολυπλοειδισμό. Τα είδη αυτά ευδοκούν σε εύκρατα έως και υποτροπικά κλίματα και συναντώνται σε περιοχές της Ευρώπης, της Ασίας, της Μέσης Ανατολής και της Βορείου Αμερικής. Οι καρποί τους παρουσιάζουν ποικιλία σε χρώμα και μέγεθος, από κιτρινοπορτοκαλί έως σκούρο κόκκινο ή μαύρο, ανάλογα με τη σύσταση τους σε χρωστικές όπως καροτενοειδή, φλαβονοειδή ή ανθοκυανίνες.^{32,33}

Είδος του γένους *Rosa* αποτελεί και το άγριο τριαντάφυλλο (wild rose, WR) ή κυνόροδο (dog rose) ή, όπως καλείται επιστημονικά, *Rosa canina* L., που χαρακτηρίζεται ως θάμνος ερμαφρόδιτος, ευθυτενής ύψους έως και 3.5 μέτρα, συχνά αναρριχόμενος με κλαδιά τοξωτά ή κυρτά. Τα πέταλά του έχουν χρώμα άσπρο ή απαλό ροζ (σπάνια σκούρο ροζ) και οι καρποί του ωριμάζουν αργά (Εικόνα 1-7(i)). Πιο συγκεκριμένα, οι καρποί του, ψευδοφρούτα ή κυνόροδα (rosehips), είναι συγκάρπια (aggregate fruits), αποτελούμενα από πολλά αχαιμία, εντός των οποίων περιλαμβάνονται και οι σπόροι, τα οποία εγκλείονται μαζί με ένα στρώμα τριχιδίων σε ένα μεγαλύτερο κόκκινο σαρκώδες περίβλημα, το υπάντιο (hypanthium) (Εικόνα 1-7).^{26,28,34}



Εικόνα 1-7:(i) Άνθος και καρπός του άγριου τριαντάφυλλου³⁵, αριστερά (ii) εγκάρσια τομή του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου²⁶, δεξιά.

Το WR πιστεύεται ότι αποτελεί εξέλιξη ενός διαφορετικού γένους, του *Rosa* spp., και ενός εξαφανισμένου προγόνου του, του *Protocaninae*, κατά την τελευταία ευρωπαϊκή μεταπαγετώδη περίοδο. Διαθέτει ένα μοναδικό μειωτικό και αναπαραγωγικό σύστημα αποτελούμενο από ετερογαμική μείωση με τετραπλοειδής γαμέτες και απλοειδή γύρη, σχηματίζοντας, έτσι, έναν πενταπλοειδή οργανισμό. Μέσω της ιδιαίτερης μειωτικής συμπεριφοράς προκύπτει γόνος με 80% μητρικό και 20% πατρικό γονιδίωμα, δηλαδή παρομοιάζει περισσότερο μητρικά χαρακτηριστικά. Ακόμα, παρότι είναι αυτό-συμβατό,

διαθέτει μεγάλα άνθη σχεδιασμένα για επικονίαση από έντομα ενώ είναι συνήθης και η ετεροδιασταύρωση.^{26,34}

Το φυτό *Rosa canina* χρησιμοποιείται ως φαρμακευτικό βότανο για πάνω από 2000 χρόνια και, μάλιστα, φαίνεται ότι πρώτος το χαρακτήρισε έτσι ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος (23–79 π.Χ.) όταν το χρησιμοποίησε στις γαλλικές φυλές για τη θεραπεία από το δάγκωμα σκύλων, εξού και το όνομα κυνόροδο. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε βιταμίνη C καταναλωνόταν από ναύτες με σκοπό την πρόληψη ενάντια στο σκορβούτο και αποτέλεσμα τη διηπειρωτική διάδοσή του, ενώ κατά το Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο καταγράφηκε ως βασική πηγή βιταμίνης C στη Βρετανία, όπου η κυβέρνηση επιμελήθηκε τη μαζική παραγωγή του.²⁶

Πλέον, τα άνθη και οι καρποί του WR χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων, στο σχεδιασμό τοπίου και στον έλεγχο διάβρωσης. Καθώς διατηρεί τους καρπούς του και το χειμώνα, παίζει σημαντικό ρόλο στην άγρια ζωή και τη βιοποικιλότητα.³⁴ Ορισμένες από τις ιατρικές εφαρμογές του φυτού παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 1-2:

Πίνακας 1-2: Ιστορικά καταγεγραμμένες θεραπευτικές χρήσης του WR²⁶

Μέρος του φυτού	Είδος χρήσης	Συμπτώματα ή ασθένειες προς θεραπεία
Ρίζες	Εσωτερική	Πρωκτικές αιμορροΐδες Δυσουρία Βήχας Ρευματισμοί
Φύλλα	Εσωτερική	Κρύωμα Γρίπη Κνησμός Βήχας Έκζεμα
Κλαδιά	Εσωτερική	Πέτρες στα νεφρά
	Εξωτερική	Έκζεμα
Περίβλημα καρπού	Εσωτερική	Κρύωμα Γρίπη Βήχας Βρογχίτιδα Άσθμα Μολύνσεις – Λοιμώξεις Ανοσολογική νεφρίτιδα Ασθένειες της χοληδόχου ύστης Εγκαύματα Ανεπάρκεια Βιταμίνης C Κολικός

	Διουρητικό μέσο Αρθρίτιδα Ρευματικές Διαταραχές Διάρροια Διαβήτης
Σπόροι καρπού	Εσωτερική
	Διουρητικό μέσο Οστεοαρθρίτιδα Ρευματισμοί Καθαρτικό μέσο Ουρική αρθρίτιδα Ισχιαλγία Σηπτικό μέσο αιμοκάθαρσης Ανεπάρκεια Βιταμίνης C
	Εξωτερική
	Ρευματισμοί Αιμορροΐδες Διάρροια Καρδιαγγειακά νοσήματα Υπογλυκαιμία Μολύνσεις – Λοιμώξεις

1.4.1. Σύσταση Άγριου Τριαντάφυλλου

Οι ωφέλιμες για την υγεία ιδιότητες του WR οφείλονται στην ιδιαίτερη σύστασή του, ιδίως των καρπών του. Έχει καταγραφεί ότι περιλαμβάνει πληθώρα βιοενεργών ενώσεων, όπως, φλαβονοειδή, καροτενοειδή, βιταμίνες (κυρίως C αλλά και B1, B2, K, B3, E), λιπαρά οξέα, οργανικά οξέα, ταννίνες, πηκτίνες, σάκχαρα, αμινοξέα, αιθέρια έλαια και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες.^{26,28}

Τα κυνόροδα αποτελούν σημαντική πηγή διατροφικών αντιοξειδωτικών. Η αντιοξειδωτική τους δράση έγκειται κυρίως στο ασκορβικό οξύ, του οποίου η περιεκτικότητα κυμαίνεται μεταξύ 3 – 40 g/kg και είναι αρκετά υψηλότερη συγκριτικά με αυτήν σε άλλα φρούτα και λαχανικά, ακόμα και σε εσπεριδοειδή. Έχει παρατηρηθεί ότι η τιμή αυτή αυξάνεται όσο αυξάνεται το υψόμετρο στο οποίο αναπτύσσεται το φυτό.^{28,33}

Η αντιοξειδωτική του δράση σχετίζεται, επίσης, με την παρουσία πολυφαινόλων, κυρίως φλαβονοειδών και προανθοκυανιδίνης, βιταμινών E και B και καροτενοειδών και τη συνεργιστική τους δράση (Πίνακας 1-3). Συγκεκριμένα, από την κατηγορία των καροτενοειδών φέρει λυκοπένιο, β-καροτένιο και ίχνη λουτεΐνης και ζεαξανθίνης. Ακόμα, εντοπίζονται α- και γ-τοκοφερόλες. Τα φλαβονοειδή του WR περιλαμβάνουν γλυκοσιδικά παράγωγα της κερκετίνης, συμπεριλαμβανομένου της κερκιτρίνης (quercetin-3-O-rhamnoside), της ισοκερκιτρίνης (quercetin-3-O-glucoside) και της υπεροσίδης (quercetin-3-O-galactoside), και κάποιες αγλυκόνες, όπως κατεχίνη, κερκετίνη, ταξιφολίνη και εριοδικτυόλη.³³

Βιβλιογραφικά, το ολικό φαινολικό φορτίο έχει υπολογιστεί ότι είναι της τάξης των 72.09 mg gallic acid equivalent/g dry WR και το ολικό φορτίο φλαβονοειδών της τάξης των 26.47 mg quercetin equivalent/g dry WR.³⁶

Πίνακας 1-3: Ενδεικτικές συγκεντρώσεις βιοενεργών ενώσεων του WR με αντιοξειδωτική δράση²⁹

Κατηγορία ένωσης	Αντιοξειδωτική ένωση	Συγκέντρωση
Βιταμίνες (mg/kg dry fruit)	Ασκορβικό οξύ	101±1
	Μυρικετίνη	5.4±0.2
Ουδέτερες Πολυφαινόλες (mg/kg dry fruit)	Ρουτίνη	22±1
	Κατεχίνη	11.9±0.5
	Κερκετίνη	1.5±0.2
	Σύνολο	40.8
Όξινες Πολυφαινόλες (μg/kg dry fruit)	Βανιλικό οξύ	260±30
	Καφεϊκό οξύ	2±1
	Συριγγικό οξύ	110±10
	Γαλλικό οξύ	298±2
	Ελλαγικό οξύ	80±4
	Πρωτεοδεχοϊκό οξύ	210±20
	Σύνολο	960

Τα παραπάνω συστατικά προσδίδουν, επίσης, αντιφλεγμονώδη, αντιμεταλλαξιγόνο, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση στο φυτό, ενώ, εξαιτίας της συγκέντρωσης κερκετίνης, η κατανάλωσή του εξασφαλίζει χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου II.^{28,37}

Ακόμα, η παρουσία των τριτερπενικών οξέων σχετίζεται με ανοσορρυθιστικές ιδιότητες, του ουρσολικού και ολεανολικού οξέος με ηπατοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αντιυπερλιπιδαιμική δράση και του βετουλινικού οξέος με αναστολή του ιού HIV και αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, ανθελονοσιακή, ανθελμινική και αντιοξειδωτική επίδραση σε in vitro και in vivo πειράματα. Σημαντική είναι και η ύπαρξη γαλακτολιπιδίων, λόγω των αντιφλεγμονώδων, αντιοξειδωτικών, αντιικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων τους. Στο λάδι που περιλαμβάνουν οι σπόροι των καρπών

εντοπίζονται κυρίως τα λιπαρά οξέα: ολεϊκό, παλμιτικό, στεαρικό και αραχιδονικό οξύ, και σε μεγάλη ποσότητα τα πολυακόρεστα λιπαρά: λινολεϊκό (ω -6) και λινολενικό (ω -3) οξύ, που κατέχουν ανασταλτικές ιδιότητες ως προς την 1- και 2-κυκλοξυγενάση (Πίνακας 1-4).^{28,33}

Πίνακας 1-4: Τριτερπενικά οξέα, λιπαρά οξέα και γαλακτολιπίδια που εντοπίζονται βιβλιογραφικά στο WR²⁶

Κατηγορία ένωσης	Ονομασία ένωση
Τριτερπενικά οξέα	Ουρσολικό οξύ Ολεανολικό οξύ Βετουλινικό οξύ
Λιπαρά Οξέα	Λαυρικό οξύ Μυριστικό οξύ Παλμιτικό οξύ Παλμιτολετικό οξύ Στεαρικό οξύ Ολεϊκό οξύ Λινολεϊκό οξύ α -Λινολενικό οξύ Αραχιδικό οξύ Βεχενικό οξύ Δοκοσαδιενοϊκό οξύ
Γαλακτολιπίδια	GOPO

Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά της σύστασης των βιοενεργών ενώσεων μεταξύ περιβλήματος και σπόρων του καρπού (Πίνακας 1-5). Προϊόντα του WR που προέρχονται από τους σπόρους περιλαμβάνουν τέσσερις φορές υψηλότερη περιεκτικότητα, γενικά, σε λιπαρά οξέα και πάνω από επτά φορές υψηλότερη, ειδικά, σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα συγκριτικά με τα προϊόντα του περιβλήματος. Τα επίπεδα βιταμίνης C και β -καροτενίου είναι σχεδόν ίδια, ενώ η ποσότητα τριτερπενοειδών, γαλακτολιπιδίων, λυκοπενίου και βιταμίνης E είναι μεγαλύτερη στο περίβλημα. Τέλος, τα φλαβονοειδή είναι παρόντα σε παρόμοια ποσοστά και στα δύο μέρη του καρπού αλλά με διαφορετική κατανομή.²⁶

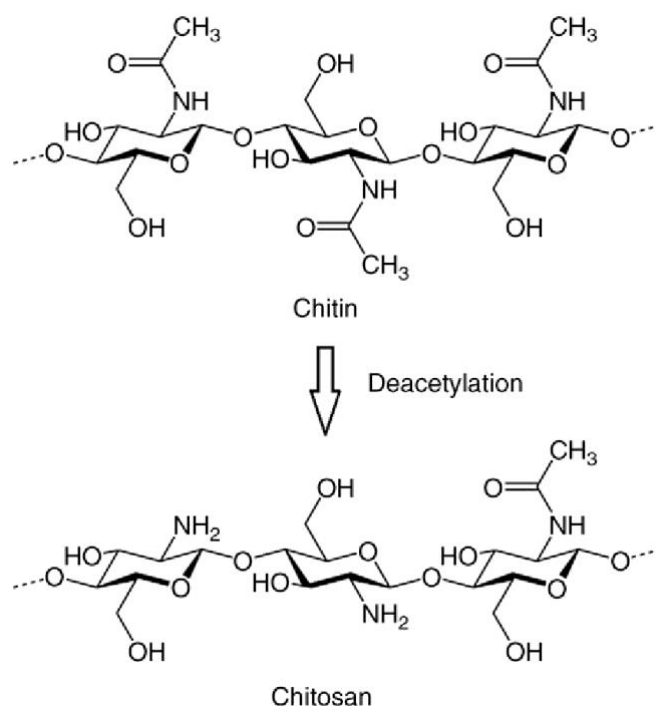
Πίνακας 1-5: Διαφοροποίηση σύστασης βιοενεργών ενώσεων μεταξύ σπόρων και περιβλήματος του WR²⁶

Ονομασία φλαβονοειδούς	Συγκέντρωση στον καρπό (mg/g dry weight)	Συγκέντρωση στο περίβλημα (mg/g dry weight)
Υπεροσίδη	0.15 \pm 0.07	0.08 \pm 0.02
Ταϊλιροσίδη	0.07 \pm 0.03	0.00
Ρουτίνη	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00

Κερκετίνη	0.04±0.02	0.04±0.01
Κατεχίνη	0.19±0.06	0.39±0.19
Αστραγαλίνη	0.04±0.02	0.05±0.04
Σύνολο	0.52±0.10	0.56±0.21

1.5. Χιτοζάνη (Chitosan, CS)

Η χιτοζάνη είναι ένα γραμμικό αποακετυλιωμένο πολυμερές της χιτίνης αποτελούμενο από μόρια D-γλυκοζαμίνης (αποακετυλιωμένη μονάδα) συνδεδεμένα με μόρια N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης (ακετυλιωμένη μονάδα) με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό (Σχήμα 1-5). Ουσιαστικά, όταν ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτίνης υπερβαίνει το 50 %, αυτή διαλυτοποιείται σε όξινα υδατικά διαλύματα και καλείται χιτοζάνη.^{38,39}



Σχήμα 1-5: Δομή χιτίνης και χιτοζάνης.³⁸

Η διαλυτοποίηση πραγματοποιείται λόγω της πρωτονίωσης της ομάδας $-NH_2$ στον άνθρακα C-2 του επαναλαμβανόμενου μονομερούς D-γλυκοζαμίνης. Δηλαδή, ο πολυσακχαρίτης μετατρέπεται σε πολυηλεκτρολύτη σε όξινα μέσα.³⁹

Η χιτοζάνη, σε στερεή κατάσταση, είναι ημικρυσταλλικό πολυμερές. Είναι αδιάλυτη στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες ενώ διαλυτοποιείται σε αραιά υδατικά διαλύματα οξέων (π.χ. σε διάλυμα υδροχλωρικού, φορμικού, οξικού, οξαλικού και γαλακτικού οξέος). Η διαλυτότητά της σε αυτά τα μέσα εξαρτάται από το βαθμό αποακετυλίωσης, τη συγκέντρωση ιόντων, το pH, τη φύση του οξέος που προκαλεί την πρωτονίωση, την

κατανομή των ομάδων ακετυλίου κατά μήκος της αλυσίδας και τις συνθήκες απομόνωσης και ξήρανσης του πολυσακχαρίτη. Σημειώνεται πως, λόγω φαινομένου εξαλάτωσης (salting-out effect), παρατηρείται πτώση της διαλυτότητας σε αυξημένες συγκεντρώσεις διαλύματος οξέος.^{39,40}

Προερχόμενη από τη χιτίνη, το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη γη μετά την κυτταρίνη, η χιτοζάνη θεωρείται υλικό βιολογικής προέλευσης, φιλικό προς το περιβάλλον, μη τοξικό, βιοδιασπώμενο με αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες.^{41,42}

Όντας το μοναδικό ψευτοφυσικό κατιοντικό πολυμερές μπορεί να αξιοποιηθεί σε πληθώρα εφαρμογών, π.χ. ως κροκιδωτικό για την ανάκτηση πρωτεϊνών ή ως πρώτη ύλη σε διαδικασίες απορρύπανσης, ενώ, λόγω της διαλυτότητάς του μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μορφή διαλύματος, πηκτής, φιλμ ή ινών. Αναλυτικότερα, στον Πίνακα 1-6 συνοψίζονται οι τομείς αξιοποίησης της χιτοζάνης βάσει των επιμέρους ιδιοτήτων και εφαρμογών της.³⁹

Πίνακας 1-6: Τομείς αξιοποίησης της χιτοζάνης βάσει των επιμέρους ιδιοτήτων και εφαρμογών της³⁹

Τομέας	Ιδιότητα / Εφαρμογή	Τομέας	Ιδιότητα / Εφαρμογή
Γεωργία	Μηχανισμός άμυνας στα φυτά Διέγερση της ανάπτυξης των φυτών Προστασία από τον παγετό Ρύθμιση χρόνου απελευθέρωσης λιπασμάτων και θρεπτικών στο χώμα	Καλλυντικά	Διατήρηση της υγρασίας του δέρματος Αντιμετώπιση ακμής Βελτίωση της ελαστικότητας των μαλλιών Τόνωση του δέρματος Στοματική υγιεινή
Επεξεργασία νερού και αποβλήτων	Κροκιδωτικό για τον καθαρισμό νερού Αφαίρεση ιόντων μετάλλων Οικολογικό πολυμερές (περιορισμός συνθετικών πολυμερών Ελάττωση οσμών	Τρόφιμα και αναψυκτικά	Μη εύπεπτη από τον άνθρωπο (φυτική ίνα) Ένωση λιπιδίων (μείωση χοληστερόλης) Συντηρητικό Πηκτικό μέσο και σταθεροποιητής για σάλτσες Προστατευτικό, αντιμυκητιακό και αντιβακτηριακό κάλλυμα - φιλμ για φρούτα
Βιοφαρμακευτικά προϊόντα	Ανοσολογικά Αντικαρκινικά Αιμοστατικά Αντιπηκτικά Βακτηριοστατικά Επουλωτικά		

1.5.1. Φιλμ χιτοζάνης

1.5.1.1. Ιδιότητες φιλμ χιτοζάνης

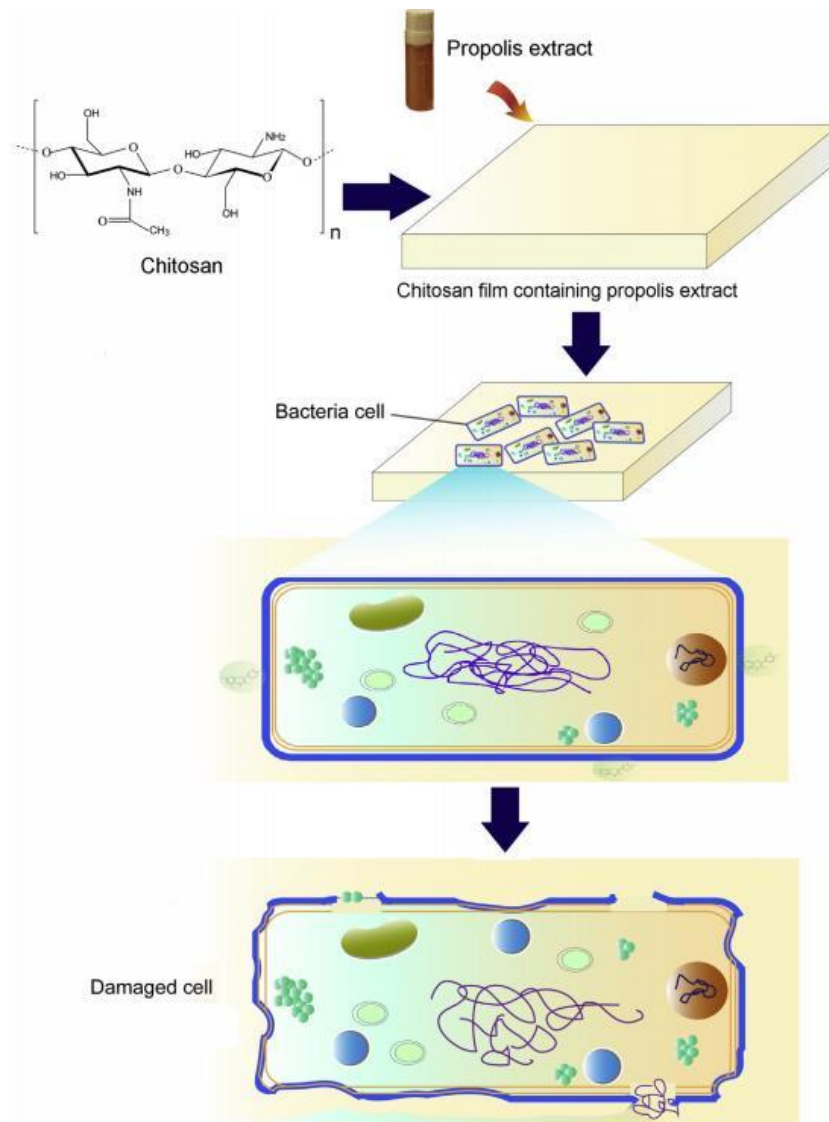
Οι φυσικές και λειτουργικές ιδιότητες των φιλμ χιτοζάνης καθορίζονται από το μοριακό βάρος του χρησιμοποιούμενου πολυμερούς, το βαθμό αποακετυλίωσης, το είδος και τη συγκέντρωση των όξινων διαλυμάτων και των πλαστικοποιητών και τη θερμοκρασία και το pH κατά την παρασκευή του φιλμ.

Τα φιλμ χιτοζάνης παρουσιάζουν καλές μηχανικές ιδιότητες (π.χ. αντοχή σε εφελκυσμό, επιμήκυνση θραύσεως). Έχει παρατηρηθεί ότι φιλμ που προέρχονται από χιτοζάνη υψηλότερου βαθμού αποακετυλίωσης παρουσιάζουν υψηλότερη αντοχή σε εφελκυσμό λόγω του πυκνότερου «πακεταρίσματος» των πολυμερικών αλυσίδων, οι οποίες διαθέτουν μικρά αμινοξέα ως υποκαταστάτες και, έτσι, αλληλεπιδρούν ισχυρότερα μεταξύ τους. Παράλληλα, η επιμήκυνση στη θραύση και η απορροφητικότητα τους σε υγρασία είναι χαμηλότερες. Ακόμα, αύξηση του μοριακού βάρους της χιτοζάνης περιπλέκει και πυκνώνει το δίκτυο των αλυσίδων με αποτέλεσμα την αύξηση της τάσης και της επιμήκυνσης κατά τον εφελκυσμό, καθώς, και της απορροφούμενης υγρασίας.³⁸

Διαθέτουν επιλεκτική διαπερατότητα σε αέρια, κυρίως σε O₂ και CO₂. Έτσι, κατά τη χρήση τους ως συσκευασία, διατηρώντας την διαπερατότητα σε O₂ χαμηλή, επιτρέπουν ελεγχόμενη ωρίμανση των φρούτων, μείωση της οξείδωσης ευαίσθητων τροφίμων και του ταγγισμού πολυακόρεστων λιπών. Αυτή τους η ιδιότητα, σε συνδυασμό με την ικανότητα δέσμευσης ριζών υδροξυλίου, χηλίωσης σε σιδηρούχα ιόντα και ενώσεις μεταλλικών ιόντων καθυστερώντας την οξείδωση λιπιδίων, τους προσδίδει και αντιοξειδωτικό χαρακτήρα. Φιλμ χιτοζάνης με υψηλότερο βαθμό ακετυλίωσης διαθέτουν περισσότερα αμινοξέα, προσδίνοντάς τους υψηλότελη αντιοξειδωτική δράση. Μέσω της πρωτονίωσης της ομάδας -NH₂ σε -NH₃⁺ της πολυμερικής αλυσίδας, τα φιλμ μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ανιόντα σε όξινο περιβάλλον, ιδιότητα που αξιοποιείται στα βρώσιμα φιλμ.^{38,41}

Η χιτοζάνη διαθέτει αντιμικροβιακή δράση κατά των βακτηρίων, των νηματοειδών μυκήτων και των ζυμών. Μέσω των θετικά φορτισμένων αμινομάδων της αλληλεπιδρά με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη μικροβιακών κυττάρων, προκαλώντας τη διαρροή πρωτεϊνούχων και άλλων ενδοκυτταρικών συστατικών των μικροοργανισμών (Εικόνα 1-8). Τόσο στα Gram-θετικά όσο και στα Gram-αρνητικά βακτήρια, η αντιβακτηριακή δράση γίνεται εντονότερη με μείωση του βαθμού ακετυλίωσης. Όσον αφορά την αντιμυκητιακή δράση, τα φιλμ χιτοζάνης περιορίζουν μολύνσεις από μύκητες μέσω αναστολής της ανάπτυξης μυκηλίων και της παραγωγής, απελευθέρωσης και βλάστησης спорίων.³⁸

Στα φιλμ χιτοζάνης μπορούν να προστεθούν άλλα φυσικά αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά, όπως εκχύλισμα αγριού τριανταφύλλου ή πρόπολης (Εικόνα 1-8) που περιλαμβάνουν πληθώρα πολυφαινόλων, προς ενίσχυση και βελτίωση των ιδιοτήτων τους.³⁸



Εικόνα 1-8: Μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης φιλμ χιτοζάνης ενισχυμένα με εκχύλισμα πρόπολης.⁴³

1.5.1.2. Εφαρμογές φιλμ χιτοζάνης

Τα φιλμ χιτοζάνης έχουν αξιοποιηθεί κυρίως ως συσκευασίες τροφίμων, εδώδιμα φιλμ, επίδεσμοι για τη επούλωση πληγών και ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών. Λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής τους δράσης έχουν μεγάλη πιθανότητα να κατοχυρωθούν ως εναλλακτικές, βιοδιασπώμενες, βιοσυμβατές και ενεργές συσκευασίες τροφίμων. Μέσω των μηχανικών ιδιοτήτων τους και της ελεγχόμενης διαπερατότητάς τους μπορούν να προστατεύσουν τα τρόφιμα, να διατηρήσουν τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά και την ασφάλεια κατανάλωσής τους και να παρατείνουν την ημερομηνία λήξης τους. Η δυνατότητα ενσωμάτωσης φυσικών αντιοξειδωτικών στα φιλμ χιτοζάνης επιλύει το ζήτημα χρήσης συνθετικών αντιοξειδωτικών με πιθανές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.^{38,43,44}

Σταδιακά, πλέον, η χρήση συνθετικών ή φυσικών επιδέσμων, βαμβακιού, μαλλιού ή γαζών αντικαθίσταται από πιο σύγχρονα υλικά, όπως φιλμ, σπόνγιοι, υδροκολλοειδή, πηκτές και

πάστες, που παρέχουν ένα βέλτιστο περιβάλλον γύρω από την πληγή, μεταφέρουν ενεργά συστατικά και αλληλοεπιδρούν τοπικά με τα κύτταρα για τη διευκόλυνση της επούλωσης. Ένας ιδανικός επίδεσμος πρέπει να αποτρέπει μολύνσεις, να αφαιρεί το αίμα και άλλα εκκρίματα, να παρέχει την απαιτούμενη υγρασία και να τη διατηρεί, να επιτρέπει την διαπερατότητα σε ατμό και O₂, να επιφέρει θερμική μόνωση, να είναι άνετος και να αφαιρείται εύκολα χωρίς πρόκληση πληγής, να είναι μη τοξικός και να μην προκαλεί αλλεργία και να είναι οικονομικά αποδοτικός. Η επούλωση πληγών είναι μια περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς, όπως πήξη του αίματος, φλεγμονή, σύνθεση και εναπόθεση μήτρας, αγγειογένεση, ινοπλασία, επιθηλιοποίηση, συστολή και αναδιαμόρφωση. Τα φιλμ χιτοζάνης, λοιπόν, όντας μη τοξικά, βιοδιασπώμενα, βιοσυμβατά και αντιμικροβιακά, φαίνονται υποσχόμενα για την επούλωση πληγών. Ακόμα, φαίνεται πως η χιτοζάνη, προκαλώντας ταχεία αναγέννηση του δέρματος και ενισχύοντας την επανεπιθηλιοποίησή του, επιταχύνει την ανάπλαση και την επούλωση ανοιχτών πληγών.

Τέλος, η ικανότητα της χιτοζάνης να σχηματίζει φιλμ βρίσκει πολλές εφαρμογές στην μηχανική των ιστών και στους φορείς φαρμακευτικών ουσιών, εξαιτίας της υψηλής αντοχής των φιλμ και της αργής βιοαποικοδόμησής τους. Ήδη κάποια φιλμ με ενσωματωμένες δραστικές φαρμακευτικές ουσίες θεωρούνται καινοτόμα συστήματα χορήγησης φαρμάκων, ενώ ορισμένα έχουν την προοπτική χρήσης για παρατεταμένη τοπική παράδοση αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων.⁴⁵

1.5.1.3. Βιοσυμβατά φιλμ βαθέως ευτηκτικών διαλυτών χιτοζάνης

Τελευταία, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στη μελέτη της σύνθεσης φιλμ βαθέως ευτηκτικών διαλυτών χιτοζάνης. Μέσω ανάλυσης FT-IR επιβεβαιώνεται η αλληλεπίδραση του DES με τη χιτοζάνη με δεσμούς υδρογόνου και μέσω ανάλυσης SEM διαφαίνεται η άτακτη κατανομή των δύο συστατικών στην πολυμερική μήτρα. Πειράματα έχουν δείξει πως όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του φιλμ σε DES τόσο αυξάνεται η ελαστικότητά του και μειώνεται το μέτρο του Young. Η σκληρότητα της επιφάνειάς του, αρχικά, αυξάνεται ελαφρώς, ενώ, σε περιεκτικότητες DES πάνω από 60 % w/w, μειώνεται. Επιπλέον, ο ρυθμός διαπερατότητας του φιλμ σε νερό είναι αρκετά υψηλός λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα του DES, που διευκολύνει την διάχυση του ατμού, και οριακά ανεξάρτητος από το βαθμό αποακετυλίωσης. Υπάρχουν εφαρμογές που επιθυμούν υψηλή διαπερατότητα σε νερό, π.χ. η χρήση φιλμ για την επούλωση πληγών, και άλλες, όπως η συσκευασία τροφίμων, στις οποίες είναι ανεπιθύμητη και περιορίζεται με ενσωμάτωση υδρόφοβων υλικών.⁴⁶

2. Πειραματικό Μέρος

2.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης διεργασίας που περιλαμβάνει:

- σύνθεση διαφόρων φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES),
- αξιοποίηση των NaDES στην εκχύλιση του αγρίου τριαντάφυλλου (WR) υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE),
- ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων σε βιοσυμβατά φιλμ βαθέως ευτηκτικών διαλυτών – χιτοζάνης και
- χαρακτηρισμό των φυσικοχημικών και μηχανικών ιδιοτήτων των φιλμ.

Η επιλογή της εκχύλισης του αγρίου τριαντάφυλλου έγινε βάσει προηγούμενης μελέτης του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας⁴⁷, κατά την οποία έγινε βελτιστοποίηση της διεργασίας με στόχο τη μεγιστοποίηση της εκχύλισης των βιοενεργών ενώσεων.

2.2. Όργανα, συσκευές και αντιδραστήρια

Τα όργανα – συσκευές (Πίνακας 2-1) και τα αντιδραστήρια (Πίνακας 2-2) που χρησιμοποιήθηκαν συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 2-1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν

Όργανο – Συσκευή	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210 g)	KERN	ADB 200-4
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2 g)	Sartorius	M2P
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	Witeg	MSH-20A
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp	ZX4
Λουτρό υπερήχων	Branson	2210 Ultrasonic Bath
Αντλία κενού	Edwards	-
Πεχάμετρο	Metrohm	744

Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Φασματόμετρο FT-IR	Jasco	4200
Φασματοφωτόμετρο δειγματοφορέα πηγαδιών (microplate reader)	Molecular Devices	SpectraMax 250
Παχύμετρο (digital micrometer, 0 – 25 mm)	Hogetex	-
Χρωματόμετρο	Konica Minolta	CR-200
Αναλυτής υφής	Stable Micro Systems	TA-XT2i
Συσκευή λυοφιλίωσης	Frozen In Time	Lablyo Mini
Υδατόλουτρο	J. P Selecta	Precistern

Πίνακας 2-2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιδραστήριο	Μοριακός τύπος	Προμηθευτής
Νερό (απιονισμένο)	H ₂ O	-
Βεταΐνη (άνυδρη)	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Alfa Aesar
Χλωριούχος χολίνη	C ₅ H ₁₄ ClNO	Alfa Aesar
L-Προλίνη	C ₅ H ₉ NO ₂	Fluka – Garantie
β-Αλανίνη	C ₃ H ₇ NO ₂	MERCK
Γαλακτικό Οξύ (υδατικό διάλυμα 80 – 85 %)	C ₃ H ₆ O ₃	Alfa Aesar
Κιτρικό Οξύ	C ₆ H ₈ O ₇	Fluka
Λεβουλινικό Οξύ	C ₅ H ₈ O ₃	Alfa Aesar
Άγριο Τριαντάφυλλο	-	Korres Natural Products
Αιθανόλη	EtOH	Sigma – Aldrich
DPPH	C ₁₈ H ₁₃ N ₅ O ₆	Aldrich
Νιτρώδες Νάτριο	NaNO ₂	Fluka AG. Buchs SG

Χλωριούχο Αργύλιο	AlCl ₃	Sigma – Aldrich
Καυστικό Νάτριο	NaOH	Panreac
Αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu	-	Merck Millipore
Ανθρακικό Νάτριο	Na ₂ CO ₃	Penta
Βρωμιούχο Κάλιο	KBr	Penta
Ασκορβικό Οξύ	C ₆ H ₈ O ₆	Duchefa
Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Sigma – Aldrich
Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	Merck Millipore
Trolox	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	ACROS ORGANICS
Χιτοζάνη (χαμηλού Mr, 5 – 20 mPa·s)	(C ₆ H ₁₁ NO ₄) _n	TCI

2.3. Παρασκευή NaDES

Για την παρασκευή των NaDES, ύστερα από δοκιμές μεταξύ θέρμανσης και λυοφιλίωσης, επιλέχθηκε η μέθοδος της θέρμανσης. Συγκεκριμένα, υπολογίζονται οι απαιτούμενες ποσότητες των συστατικών κάθε NaDES βάσει της εκάστοτε γραμμομοριακής αναλογίας (βρίσκεται βιβλιογραφικά^{3,8} ή με πειραματικές δοκιμές) και ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας. Να σημειωθεί ότι για τα συστατικά που είναι υγροσκοπικά, όπως η χλωριούχος χολίνη, απομακρύνεται πρώτα η υγρασία σε αντλία κενού Edwards μέχρι σταθερού βάρους. Κατόπιν, οι ζυγισμένες ποσότητες εισάγονται σε σφαιρική φιάλη, ενσωματωμένη σε διάταξη με ψυκτήρα, υπό ήπια ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα και σταθερή θέρμανση, έως ότου μετατραπούν σε διαυγές ρευστό (Εικόνα 2-1).



Εικόνα 2-1: Πειραματική διάταξη παρασκευής NaDES με ελεγχόμενη θέρμανση και μαγνητική ανάδευση.

Η θερμοκρασία και ο χρόνος ανάδευσης μεταβάλλονται ελαφρώς ανάλογα με το επιθυμητό παραγόμενο NaDES (Πίνακας 2-3). Μετά την ολοκλήρωση της παρασκευής το NaDES αποθηκεύεται σε ξηραντήρα.

Πίνακας 2-3: Συστατικά και συνθήκες παρασκευής NaDES με τη μέθοδο της θέρμανσης

Συμβολισμός NaDES	Συστατικό 1 (HBA)	Συστατικό 2 (HBD)	Συστατικό 3	Μοριακή Αναλογία	T (°C)	t (h)
Bet:LA	Βεταΐνη	Γαλακτικό Οξύ	-	1:2	50	3
ChCl:LA	Χλωριούχος Χολίνη	Γαλακτικό Οξύ	-	1:1.5	50	3
Pro:LA	Προλίνη	Γαλακτικό Οξύ	-	1:2	60	3
Ala:LA	Αλανίνη	Γαλακτικό Οξύ	-	1:2	60	3
Bet:CA:W	Βεταΐνη	Κιτρικό Οξύ	Νερό	1:1:3	80	5
ChCl:CA	Χλωριούχος Χολίνη	Κιτρικό Οξύ	-	2:1	80	3
Pro:CA:W	Προλίνη	Κιτρικό Οξύ	Νερό	2:1:4	80	5
Bet:LevA	Βεταΐνη	Λεβουλικό Οξύ	-	1:2	70	3

Πίνακας 2-4: Χημικές δομές NaDES

NaDES	Χημική δομή	NaDES	Χημική δομή
Bet:LA		Bet:CA:W	
ChCl:LA		ChCl:CA	
Pro:LA		Pro:CA:W	
Ala:LA		Bet:LevA	

2.4. Χαρακτηρισμός NaDES

2.4.1. Φασματοσκοπία FT-IR

Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των NaDES με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier με σκοπό τη σύγκριση των φασμάτων τους με εκείνα των παραγώγων τους (εκχυλίσματα, φιλμ). Μικρή ποσότητα δείγματος, περίπου μια σταγόνα, λιωτριβείται με ξηρό KBr προς σχηματισμό ταμπλετών, με χρήση πρέσας 10 tn, και πραγματοποιείται μελέτη της αλληλεπίδρασής του με την υπέρυθη ακτινοβολία στο εύρος 4000 – 400 cm^{-1} .

2.4.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των NaDES βασίστηκε σε βιβλιογραφικές μεθόδους.^{31,48} Αρχικά, ζυγίζονται 10 mg DPPH και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστίθεται ποσότητα αιθανόλης μέχρι τη χαραγή και η φιάλη αναδεύεται μέχρι

πλήρους διάλυσης του αντιδραστηρίου (έστω συγκέντρωση C_0). Καθώς το διάλυμα είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητο, παρασκευάζεται τη μέρα που πρόκειται να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις και φυλάσσεται στο σκοτάδι περιβαλλόμενο από αλουμινόχαρτο. Πριν την ανάλυση των δειγμάτων, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς του αντιδραστηρίου DPPH ($C_{DPPH} = f(A_{DPPH})$). Για το σκοπό αυτό παρασκευάζονται αραιώσεις του αντιδραστηρίου με αιθανόλη ($C_0, 0.8C_0, 0.6C_0, 0.5C_0, 0.4C_0, 0.2C_0$) τελικού όγκου 200 μL και φωτομετρούνται σε μήκος κύματος $\lambda = 515 \text{ nm}$. Με προσαρμογή των δεδομένων που λαμβάνονται (Γράφημα 7-1) προκύπτει η εξίσωση [1]:

$$C_{DPPH} = 0.0733 \cdot A_{DPPH} - 0.0002 \text{ με } R^2 = 0.9994 [1]$$

Κατόπιν γίνεται η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης ισχυρών αντιοξειδωτικών (ασκορβικό οξύ, γαλλικό οξύ, trolox), των επιμέρους συστατικών των NaDES και των NaDES. Από κάθε δείγμα λαμβάνονται κατάλληλες αραιώσεις με αιθανόλη τελικού όγκου 100 μL και εισάγονται σε δειγματοφορέα πηγαδιών (microplate). Στη συνέχεια, απουσία φωτός, προστίθενται 100 μL DPPH αρχικής συγκέντρωσης C_0 και ο δειγματοφορέας αφήνεται για επώαση για 30 min στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα, μετράται η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στο μήκος κύματος, $\lambda = 515 \text{ nm}$.

Μέσω της εξίσωσης [1] και για $A_{DPPH} = A_{DPPH, \text{blank}}$ υπολογίζεται η αρχική συγκέντρωση του DPPH στο blank δείγμα, $C_{DPPH, \text{αρχ}}$. Υπολογίζεται, επίσης, μέσω της [1], η συγκέντρωση της ελεύθερης ρίζας DPPH σε κάθε δείγμα μετά το πέρας των 30 min, $C_{DPPH, \text{τελ}}$. Έτσι, κατασκευάζεται το γράφημα $C_{\text{δείγματος}} = f(\Delta C_{DPPH})$, όπου $\Delta C_{DPPH} = C_{DPPH, \text{αρχ}} - C_{DPPH, \text{τελ}}$. [2], και η κλίση της ευθείας που προκύπτει εκφράζει το πλήθος των αναγόμενων ριζών ανά μόριο αντιοξειδωτικού, ενώ η συγκέντρωση δείγματος που ανάγει το 50 % του αρχικού DPPH αποτελεί το δείκτη IC_{50} .

2.5. Εκχύλιση άγριου τριαντάφυλλου υποβοηθούμενη με υπερήχους (UAE)

Για την εκχύλιση του άγριου τριαντάφυλλου με NaDES υποβοηθούμενη από υπερήχους η πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε σε μορφή πούδρας, ύστερα από κονιοποίηση του καρπού σε μύλο καφέ, με σκοπό την αύξηση της επιφάνειας επαφής της με τον διαλύτη, δηλαδή, τη βελτίωση της μεταφοράς μάζας των βιοενεργών ενώσεων από το στερεό στο υγρό. Συγκεκριμένα, ζυγίζονται 100 mg WR σε ζυγό ακριβείας και μεταφέρονται σε vial μαζί με 6 mL NaDES. Το σύστημα αναδεύεται με χρήση vortex και αφήνεται να εκχυλιστεί για 30 min σε θερμοκρασία 37 °C εντός λουτρού υπερήχων. Στον Πίνακα 2-5 συνοψίζονται τα εκχυλίσματα που παρήχθησαν.

Πίνακας 2-5: Συμβολισμός παραγόμενων εκχυλισμάτων

Συμβολισμός εκχυλίσματος	NaDES
E/ChCl:LA	ChCl:LA

E/Bet:LA	Bet:LA
E/Pro:LA	Pro:LA
E/Ala:LA	Ala:LA
E/Bet:CA:W	Bet:CA:W
E/Pro:CA:W	Pro:CA:W
E/Bet:LevA	Bet:LevA
E/ChCl:CA	ChCl:CA

Μετά το πέρας της εκχύλισης προστίθενται 4 mL νερού στο δείγμα και ακολουθεί διήθηση υπό κενό όπως φαίνεται διάταξη της Εικόνα 2-2. Το τελικό εκχύλισμα μεταφέρεται σε καθαρό vial (Εικόνα 2-3(ii)) και αποθηκεύεται σε ξηραντήρα. Πραγματοποιήθηκε δοκιμή παράλειψης της προσθήκης νερού κατά τη διήθηση. Όμως, ειδικά στα δείγματα με NaDES υψηλού ιξώδους, παρατηρήθηκε δυσκολία στην διήθηση και παραλαβή του εκχυλίσματος και, γι' αυτό απορρίπτεται ως εναλλακτική αυτή η δοκιμή.



Εικόνα 2-2: Διήθηση του εκχυλίσματος E/ChCl:CA, προς απομάκρυνση της στερεής πρώτης ύλης και παραλαβής του τελικού εκχυλίσματος.



Εικόνα 2-3: (i) Εκχύλισμα E/ChCl:CA πριν τη διήθηση, αριστερά (ii) Εκχύλισμα E/ChCl:CA μετά τη διήθηση, δεξιά.

2.6. Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

2.6.1. Φασματοσκοπία FT-IR

Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier με σκοπό την ταυτοποίηση των εκχυλισμάτων. Μικρή ποσότητα δείγματος, περίπου μια σταγόνα, λιωτριβείται με κατάλληλη ποσότητα ξηρού KBr προς σχηματισμό ταμπλετών, με χρήση πρέσας 10 tn. Κάθε ταμπλέτα εισάγεται για μέτρηση στο φασματόμετρο προς μελέτη της αλληλεπίδρασής του δείγματος με την υπέρυθρη ακτινοβολία στο εύρος $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Η επεξεργασία και ανάλυση των φασμάτων γίνεται με ρήση του προγράμματος SpectraManager.

2.6.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων ακολουθείται η μέθοδος που περιγράφεται στην ενότητα 2.4.2. με σκοπό την σύγκριση των αποτελεσμάτων, τόσο μεταξύ τους, όσο και με τα αποτελέσματα των NaDES, των επιμέρους συστατικών των NaDES και των ισχυρών αντιοξειδωτικών.

2.6.3. Μέτρηση ολικών φαινολικών (Total Phenolic Content, TPC)

Για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών (TPC) χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu βάσει της μεθόδου του Waterman⁴⁹ και ως ένωση αναφοράς επιλέχθηκε το γαλλικό οξύ. Αρχικά δημιουργείται καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης γαλλικού οξέος συναρτήσει της απορρόφησης του σε μήκος κύματος $\lambda = 755$ nm. Με προσαρμογή των δεδομένων που λαμβάνονται (Γράφημα 7-2) προκύπτει η εξίσωση [3]:

$$C_{\text{gallic acid}} = 0.9632 \cdot A_{\text{gallic acid}} - 0.0113 \mu\text{ε} \quad R^2 = 0.9948 \quad [3]$$

Για τη μελέτη των εκχυλισμάτων, σε 100 μL δείγματος προστίθενται 6 mL H_2O και 0.5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Αφού το μείγμα επωαστεί για 1 – 8 min, προστίθενται 1.5 mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 , που αποτελεί το ρυθμιστή του pH, και 1.9 mL H_2O . Τα δείγματα που προκύπτουν επωάζονται για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στο σκοτάδι, λόγω φωτοευαισθησίας του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Ποιοτικά η παρουσία φαινολικών επιβεβαιώνεται με την εμφάνιση μπλε απόχρωσης. Τα δείγματα μετρούνται σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος $\lambda = 755$ nm.

Τελικά, μέσω της εξίσωσης [3], οι λαμβανόμενες απορροφήσεις μετατρέπονται σε ισοδύναμη συγκέντρωση γαλλικού οξέος και, κατόπιν, τα αποτελέσματα ανάγονται σε mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος ανά mg πρώτης ύλης μέσω της εξίσωσης [4]

$$\text{TPC} \left(\frac{\text{mg gallic acid eq}}{\text{g WR}} \right) = \frac{C_{\text{gallic acid eq}} \left(\frac{\text{mg gallic acid eq}}{\text{L}} \right) \cdot V_{\text{extr}} (\text{L})}{m_{\text{WR}} (\text{g WR})} \quad [4]$$

όπου,

$C_{\text{gallic acid eq}}$: η συγκέντρωση σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος που υπολογίζεται από την εξίσωση [3],

V_{extr} : ο όγκος που προκύπτει μετά το τέλος της διήθησης του εκχυλίσματος και

m_{WR} : η μάζα του άγριου τριαντάφυλλου που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση.

2.6.4. Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών (Total Flavonoid Content, TFC)

Για τον προσδιορισμό του περιεχομένου σε ολικά φλαβονοειδή χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου²⁰ και ως ένωση αναφοράς επιλέχθηκε η κατεχίνη. Αρχικά, διαλύματα διάφορων συγκεντρώσεων κατεχίνης δημιουργούνται και φωτομετρούνται σε μήκος κύματος $\lambda = 495$ nm. Με προσαρμογή των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται (Γράφημα 7-3) προκύπτει η εξίσωση [5]:

$$C_{\text{catechin}} = 609.8221 \cdot A_{\text{catechin}} + 6.1225 \mu\text{ε} \quad R^2 = 0.9970 \quad [5]$$

Για τη μελέτη των εκχυλισμάτων, σε 125 μL δείγματος προστίθενται 75 μL υδατικού διαλύματος NaNO_2 5 % w/v και το σύστημα αφήνεται σε ηρεμία για 6 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 150 μL AlCl_3 10 % w/v και αφήνεται σε ηρεμία για 5 min. Στο προκύπτον διάλυμα προστίθενται 750 μL NaOH 1 M και 1.4 mL H_2O και ακολουθεί ανάδευση με χρήση

vortex. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και απουσία φωτός για 15 min τα δείγματα που περιέχουν φλαβονοειδή παρουσιάζουν ένα κιτρινωπό χρώμα. Τα δείγματα μετρούνται σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος $\lambda = 495 \text{ nm}$.

Τελικά, μέσω της εξίσωσης [5], οι λαμβανόμενες απορροφήσεις μετατρέπονται σε ισοδύναμη συγκέντρωση κατεχίνης και, κατόπιν, τα αποτελέσματα ανάγονται σε mg ισοδύναμης κατεχίνης ανά mg πρώτης ύλης μέσω της εξίσωσης [6]

$$\text{TFC} \left(\frac{\text{mg catechin eq}}{\text{g WR}} \right) = \frac{C_{\text{catechin eq}} \left(\frac{\text{mg catechin eq}}{\text{L}} \right) \cdot V_{\text{extr}} (\text{L})}{m_{\text{WR}} (\text{g WR})} \quad [6]$$

όπου,

$C_{\text{catechin eq}}$: η συγκέντρωση σε ισοδύναμα κατεχίνης που υπολογίζεται από την εξίσωση [5],
 V_{extr} : ο όγκος που προκύπτει μετά το τέλος της διήθησης του εκχυλίσματος και
 m_{WR} : η μάζα του άγριου τριαντάφυλλου που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση.

2.7. Προσδιορισμός διαλυτότητας χιτοζάνης σε υδατικά διαλύματα εκχυλισμάτων και pH διαλυμάτων

Αρχικά, για τη μέτρηση του pH των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό πεχάμετρο Metrohm 744, το οποίο βαθμονομείται με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH 4 και 7. Από κάθε εκχύλισμα παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα με περιεκτικότητα 1 % v/v σε εκχύλισμα, αναδεύεται με vortex για την πλήρη διαλυτοποίησή του και μετράται.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η διαλυτότητα CS σε υδατικά διαλύματα εκχυλισμάτων 1 % v/v. Σε σφαιρική φιάλη με αρχικό όγκο διαλύματος εκχυλίσματος 25 mL προστίθενται 50 mg CS (αρχική περιεκτικότητα CS 0.2 % w/v). Το δείγμα αφήνεται σε ανάδευση προς πλήρη διάλυση της CS, η οποία μπορεί να υποβοηθηθεί σε λουτρό υπερήχων, και μετράται το pH του διαλύματος. Στην περίπτωση που παρατηρηθεί αδιάλυτη CS, προστίθενται γνωστή ποσότητα διαλύματος εκχυλίσματος 1 % v/v, έως ότου διαλυθεί, ενώ αν διαλυθεί γίνεται δοκιμή διάλυσης υψηλότερης ποσότητας CS. Σε κάθε περίπτωση σημειώνεται ως διαλυτότητα η οριακή περιεκτικότητα πλήρους διάλυσης της CS.

2.8. Σχηματισμός βιοσυμβατών φιλμ φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών χιτοζάνης

Για το σχηματισμό φιλμ NaDES – CS, αρχικά, διαλύεται κατάλληλη ποσότητα χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους σε 100 mL υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος 1 % v/v. Το διάλυμα αφήνεται σε σύστημα μαγνητικής ανάδευσης προς πλήρη διάλυση της χιτοζάνης, η οποία μπορεί να υποβοηθηθεί και με χρήση υπερήχων. Σε δύο κρυσταλλωτήρια, με επιφάνεια διατομής 25 cm², προστίθενται 45 mL του διαλύματος. Τα κρυσταλλωτήρια μεταφέρονται σε υδατόλουτρο και αφήνονται σε θερμοκρασία 40 °C για 1.5 d προς

σχηματισμό των φιλμ, μέσω εξάτμισης του περιεχόμενου νερού (Εικόνα 2-4). Μετά την πλήρη εξάτμιση του νερού, τα φιλμ που έχουν δημιουργηθεί αποκολλώνται από το σκεύος με χρήση σπαθίδας ή τσιμπιδας και αποθηκεύονται σε ξηραντήρα. Ακολουθεί ο Πίνακας 2-6 στον οποίο αναγράφονται οι ονομασίες όλων των παραγόμενων φιλμ σε συνδυασμό με το περιεχόμενο εκχύλισμα και την περιεκτικότητα χιτοζάνης.

Πίνακας 2-6: Συμβολισμός παραγόμενων φιλμ και αντίστοιχη περιεκτικότητά τους σε CS

Συμβολισμός φιλμ	Εκχύλισμα	Περιεκτικότητα CS % w/v
F/ChCl:LA/0.2	E/ChCl:LA	0.2
F/Bet:LA/0.2	E/Bet:LA	0.2
F/ChCl:LA/0.3	E/ChCl:LA	0.3
F/Bet:LA/0.3	E/Bet:LA	0.3
F/Pro:LA/0.2	E/Pro:LA	0.2
F/Ala:LA/0.2	E/Ala:LA	0.2
F/Bet:CA:W/0.2	E/Bet:CA:W	0.2
F/Pro:CA:W/0.2	E/Pro:CA:W	0.2
F/Bet:LevA/0.2	E/Bet:LevA	0.2
F/ChCl:CA/0.2	E/ChCl:CA	0.2



Εικόνα 2-4: Κρυσταλλωτήρια με υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος και χιτοζάνης εντός υδατόλουτρου προς σχηματισμό φιλμ

2.9. Χαρακτηρισμός φιλμ

2.9.1. Φασματοσκοπία ATR – FT-IR

Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των φιλμ με φασματοσκοπία υπερύθρου με την τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης με σκοπό τη σύγκριση των φασμάτων τους με εκείνα των NaDES και των εκχυλισμάτων από τα οποία προέρχονται. Μικρό κομμάτι φιλμ, επιφάνειας περίπου 1 cm², φέρεται σε επαφή με τον υποδοχέα κρύσταλλο, με χρήση ειδικού μοχλού, με σκοπό τη μελέτη της αλληλεπίδρασής του με την υπέρυθη ακτινοβολία στο εύρος 4000 – 400 cm⁻¹.

2.9.2. Μέτρηση μάζας

Σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ζυγίζεται κάθε κρυσταλλωτήριο, εντός του οποίου περιέχεται το σχηματισμένο φιλμ ($m_{\text{κρυστ+φιλμ}}$). Κατόπιν, ζυγίζεται το κρυσταλλωτήριο ύστερα από αφαίρεση του φιλμ ($m_{\text{κρυστ}}$). Η μάζα του φιλμ, $m_{\text{φιλμ}}$, υπολογίζεται από τη σχέση [7]

$$m_{\text{φιλμ}} = m_{\text{κρυστ+φιλμ}} - m_{\text{κρυστ}} \quad [7]$$

2.9.3. Μέτρηση πάχους

Για τη μέτρηση του πάχους των φιλμ χρησιμοποιείται παχύμετρο (Hogotex 0 – 25 mm). Για την λήψη ακριβέστερης μέτρησης και την αποφυγή καταστροφής του φιλμ, χρησιμοποιείται προστατευτική μεμβράνη εξωτερικά του φιλμ. Λαμβάνονται πολλαπλές μετρήσεις (τουλάχιστον 6) του πάχους της προστατευτικής μεμβράνης και του φιλμ. Το πάχος του φιλμ, $d_{\text{φιλμ}}$, υπολογίζεται από τη σχέση [8]

$$d_{\text{φιλμ}} = d_{\text{μεμβ+φιλμ}} - d_{\text{μεμβ}} \quad [8]$$

2.9.4. Μέτρηση χρώματος

Η μέτρηση του χρώματος πραγματοποιείται με χρήση του χρωματόμετρου Konica Minolta CR-200 με σκοπό την μέτρηση των οπτικών παραμέτρων L (βαθμός φωτεινότητας, όπου 0 για μαύρο και 100 για άσπρο), a (βαθμός κόκκινης (+)/πράσινης απόχρωσης (-)) και b (βαθμός κίτρινης (+)/μπλε απόχρωσης (-)) των φιλμ και των αντίστοιχων L*, a* και b* μιας λευκής πλάκας (blank). Αρχικά, το όργανο βαθμονομείται με χρήση της λευκής πλάκας και,

κατόπιν, μετρούνται οι τιμές L^* , a^* και b^* της πλάκας. Στη συνέχεια, κάθε φιλμ τοποθετείται πάνω στην πλάκα και μετρούνται οι οπτικοί του δείκτες. Τόσο το blank όσο και κάθε φιλμ μετράται τρεις φορές και υπολογίζεται ο μέσος όρος των παραμέτρων. Τέλος, υπολογίζονται τα μεγέθη

$$\Delta i = i - i^* [9]$$

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2} = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} [10]$$

όπου,

i : a , b , L ,

Δi : η διαφορά κάθε παραμέτρου του φιλμ από την αντίστοιχη του blank και

ΔE : Ολική διαφορά χρώματος (Total color difference).⁴²

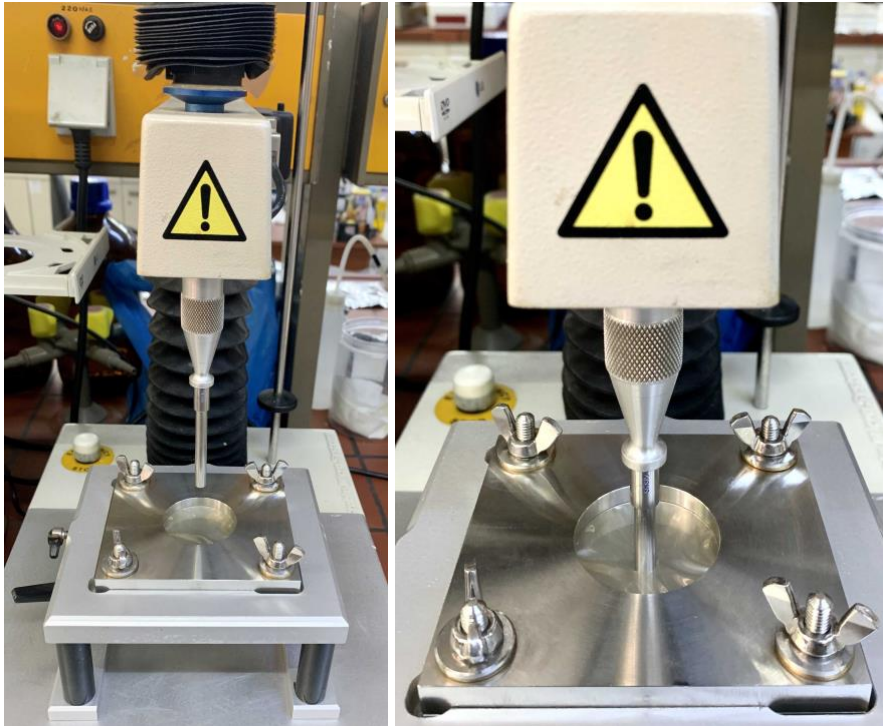
2.9.5. Μέτρηση σκληρότητας

Η σκληρότητα και η ελαστικότητα των φιλμ προσδιορίζονται με αναλυτή υφής TA.XT2i Texture Analyzer (Stable Micro System) με χρήση των κατάλληλων εξαρτημάτων (ειδικό probe και πλάκα υποδοχής φιλμ) μέσω μέτρησης της δύναμης θραύσης (Film Burst Strength, g) και της επιμήκυνσης κατά τη θραύση (Distance at Burst, mm) αντίστοιχα. Αφού βαθμονομηθεί το όργανο, το φιλμ τοποθετείται τεντωμένο στην οπή του κάτω μεταλλικού πλακιδίου της πλάκας (Εικόνα 2-5), καλύπτεται από το άλλο πλακίδιο και βεβαιώνεται η καλή επαφή των πλακιδίων μέσω σύσφιξης τεσσάρων σφικτήρων.



Εικόνα 2-5: Φιλμ τεντωμένο πάνω στην οπή του ενός εκ των δύο πλακιδίων.

Η πλάκα υποδοχής του φιλμ ενσωματώνεται στον αναλυτή υφής (Εικόνα 2-6(i)) και ο αισθητήρας εκτελεί κατακόρυφη κίνηση προς τα κάτω μέχρι τη θραύση του φιλμ (Εικόνα 2-6(ii)). Τα αποτελέσματα λαμβάνονται σε Η/Υ συνδεδεμένο με τον αναλυτή, μέσω του λογισμικού Texture Exponent 32.



Εικόνα 2-6: (i) Ο αισθητήρας κατευθύνεται κατακόρυφα προς τα κάτω, αριστερά (ii) Ο αισθητήρας προκαλεί θραύση του φιλμ, δεξιά

Μέσω της παραπάνω ανάλυσης λαμβάνονται τιμές για τη $m_{\theta\rho\alpha\upsilon\sigma\eta\varsigma}$ (g), η οποία μετατρέπεται σε δύναμη θραύσης, $F_{\theta\rho\alpha\upsilon\sigma\eta\varsigma}$ (N), μέσω της σχέσης [11]:

$$F_{\theta\rho\alpha\upsilon\sigma\eta\varsigma} = m_{\theta\rho\alpha\upsilon\sigma\eta\varsigma} \cdot g \cdot 10^{-3} \text{ [11]}$$

όπου $g = 9.81 \text{ m/s}^2$.

2.9.6. Μέτρηση διαπερατότητας υδρατμών (Water Vapor Permeability, WVP)

Η διαπερατότητα υδρατμών των φιλμ μετράται με πρότυπη μέθοδο, τη ASTM 2016 (βάσει του Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials). Σε κρυσταλλωτήριο με επιφάνεια διατομής 17.5 cm^2 προστίθενται 10 mL νερού. Στο στόμιο του σκεύους τοποθετείται κόλλα και προσκολλάται το φιλμ. Το σύστημα ζυγίζεται την χρονική στιγμή $t = 0$ και τοποθετείται σε ξηραντήρα ο οποίος έχει έρθει ήδη σε ισορροπία και η υγρασία είναι $RH=0\%$ (Εικόνα 2-7). Για διάστημα 24 h, το σύστημα ζυγίζεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, $m_{\kappa\rho\upsilon\sigma\tau+\nu\epsilon\rho\acute{o}+\phi\iota\lambda\mu}$. Τα δεδομένα προσαρμόζονται γραφικά ($m_{\kappa\rho\upsilon\sigma\tau+\nu\epsilon\rho\acute{o}+\phi\iota\lambda\mu} = f(t)$) σε βέλτιστη ευθεία, της οποίας η κλίση συμβολίζεται α. Ο ρυθμός μεταφοράς υδρατμών (Water Vapor Transmission Rate, WVTR) υπολογίζεται από τη σχέση

$$WVTR = \frac{\alpha}{A} \left(\frac{\text{g}}{\text{m}^2 \cdot \text{min}} \right) \text{ [12]}$$

όπου,

α: κλίση, κατ' απόλυτη τιμή, της βέλτιστης ευθείας δεδομένων (g/min) και

A: εμβαδό φιλμ (m^2).⁴⁴

Η διαπερατότητα υδρατμών κάθε film υπολογίζεται από τη σχέση

$$WVP = WVTR \cdot \frac{d_{\text{φιλμ}}}{\Delta P} = \frac{\alpha \cdot d_{\text{φιλμ}}}{A \cdot \Delta P} \left(\frac{\text{g}}{\text{m} \cdot \text{min} \cdot \text{Pa}} \right) \quad [13]$$

όπου,

$d_{\text{φιλμ}}$: πάχος φιλμ (m) και

ΔP : διαφορά πίεσης μεταξύ των δύο επιφανειών του φιλμ που σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, ισούται με 2339 Pa.⁴³



Εικόνα 2-7: Το σύστημα κρυσταλλωτήριο – νερό – φιλμ παραμένει εντός ξηραντήρα ανάμεσα στη λήψη των διαδοχικών του ζυγίσεων.

Επίσης, προσδιορίζεται το ποσοστό μάζας νερού που διαπερνά το φιλμ εντός 24 h

$$\pi_{\text{νερού}} \% = \frac{m_{\text{κρυστ+νερό+φιλμ}, t=0} - m_{\text{κρυστ+νερό+φιλμ}, t=24 \text{ h}}}{m_{\text{κρυστ+νερό+φιλμ}, t=0}} \cdot 100\% \quad [14]$$

όπου,

$m_{\text{κρυστ+νερό+φιλμ}, t=0}$: η μάζα του συστήματος την $t = 0$ και

$m_{\text{κρυστ+νερό+φιλμ}, t=24 \text{ h}}$: η μάζα του συστήματος την $t = 24 \text{ h}$.

2.9.7. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης των φιλμ

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των φιλμ γίνεται ενδεικτικά σε δύο φιλμ, στα F/ChCl:LA/0.2 και F/Pro:LA/0.2, που περιέχουν εκχυλίσματα με επιβεβαιωμένα καλή δράση. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στη μέθοδο που περιγράφεται στην ενότητα 2.4.2. Το δείγμα κάθε φιλμ προκύπτει από διάλυση γνωστής μάζας φιλμ σε απιονισμένο νερό.

2.9.8. Προσδιορισμός υγρασίας με λυοφιλίωση

Ο προσδιορισμός της υγρασίας γίνεται δειγματοληπτικά σε ένα φιλμ με σκοπό, ουσιαστικά, την εύρεση της τάξης μεγέθους της εναπομένουσας υγρασίας στα φιλμ. Προζυγίζεται κρυσταλλωτήριο, $m_{\text{κρυστ}} = 30.3351 \text{ g}$, και ζυγίζεται μικρή ποσότητα φιλμ F/ChCl:LA/0.2, $m_{\text{φιλμ,αρχ}} = 0.1247 \text{ g}$. Μετά το πέρας της λυοφιλίωσης (freeze drying), μέσω ζύγισης του συστήματος, λαμβάνεται το μέγεθος ($m_{\text{κρυστ}} + m_{\text{φιλμ,τελ}}$). Άρα η μάζα της περιεχόμενης υγρασίας στο φιλμ υπολογίζεται από τη σχέση [15]:

$$m_{\text{υγρασίας}} = m_{\text{κρυστ}} + m_{\text{φιλμ,αρχ}} - (m_{\text{κρυστ}} + m_{\text{φιλμ,τελ}}) \quad [15]$$

ενώ το ποσοστό της εναπομένουσας υγρασίας ισούται με

$$\pi_{\text{υγρασίας}} \% = \frac{m_{\text{υγρασίας}}}{m_{\text{φιλμ,αρχ}}} \cdot 100 \% \quad [16]$$

3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

3.1. Χαρακτηρισμός NaDES

Το ιξώδες των παραγόμενων NaDES, όπως μελετήθηκε με οπτική παρατήρηση, ποικίλει. Όλα τα NaDES με κιτρικό οξύ ως HBD είναι πολύ ιξώδη, ιδίως το ChCl:CA. Το μόριο του κιτρικού οξέος διαθέτει περισσότερες ομάδες υδροξυλίων συγκριτικά με το γαλακτικό και το λεβουλινικό οξύ, δηλαδή, έχει περισσότερα διαθέσιμα σημεία για την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου με τα μόρια-δέκτες. Αυτό, πιθανώς, οδηγεί στην ανάπτυξη πιο πυκνών πλεγμάτων και στη μείωση της απόστασης μεταξύ μορίων-δοτών και δεκτών δεσμού υδρογόνου, με αποτέλεσμα τα παραγόμενα NaDES που περιέχουν κιτρικό οξύ να είναι πιο ιξώδη.

Μεταξύ των NaDES με γαλακτικό οξύ, παρόμοιο ιξώδες εμφανίζουν τα Bet:LA, Pro:LA και E/Ala:LA, ενώ το ChCl:LA είναι πιο ιξώδες από τα υπόλοιπα. Μεταξύ Bet:LA και Bet:LevA, το δεύτερο παρουσιάζει ελαφρώς υψηλότερο ιξώδες.

3.1.1. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH

Η αντιοξειδωτική δράση των NaDES αξιολογήθηκε μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύσουν τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH. Στους Πίνακας 3-1 – 3-2 παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε τιμές IC₅₀ (g/L ή mL/L) στα 30 min.

Πίνακας 3-1: Αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων αναφοράς και των επιμέρους συστατικών των NaDES [IC₅₀ (g/L)]

Ένωση	Ικανότητα δέσμευσης DPPH IC ₅₀ (g/L)
Γαλλικό οξύ	2·10 ⁻³
Trolox	7·10 ⁻³
Ασκορβικό οξύ	8·10 ⁻³
Βεταΐνη	1.1
Χλωριούχος Χολίνη	2.6
Προλίνη	1.6
Αλανίνη	3.8
Κιτρικό οξύ	3.4

Γαλακτικό οξύ	24
Λεβουλιλικό οξύ	660

Πίνακας 3-2: Αντιοξειδωτική δράση των NaDES [IC_{50} (mL/L)]

NaDES	Ικανότητα δέσμευσης DPPH IC_{50} (mL/L)
Bet:LA	594
ChCl:LA	81
Pro:LA	18
Ala:LA	254
Bet:CA:W	438
ChCl:CA	40
Pro:CA:W	102
Bet:LevA	186

Συγκρίνοντας την τιμή του δείκτη IC_{50} των επιμέρους συστατικών των NaDES με αυτήν των ισχυρών αντιοξειδωτικών φαίνεται πως κανένα δεν παρουσιάζει έντονη αντιοξειδωτική δράση. Το γαλακτικό και το λεβουλιλικό οξύ δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση.

Παρότι η βεταΐνη παρουσιάζει την καλύτερη δράση συγκριτικά με τα υπόλοιπα επιμέρους συστατικά των NaDES, τα NaDES Bet:LA και Bet:CA:W παρουσιάζουν τη χαμηλότερη ικανότητα δέσμευσης DPPH συγκριτικά με τα NaDES που περιέχουν γαλακτικό και κιτρικό οξύ. Αυτό αποδίδεται στη μικρότερη συγκέντρωσή του σε σύγκριση με τα άλλα NaDES καθώς στην πρώτη περίπτωση το γαλακτικό οξύ είναι περισσότερο από ότι στο NaDES ChCl:LA ενώ στη δεύτερη έχει προστεθεί νερό. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντιοξειδωτική δράση του NaDES Bet:LevA, η οποία βρέθηκε μεγαλύτερη από εκείνη το Bet:LA, ενώ τα επιμέρους συστατικά παρουσίασαν σημαντική διαφορά. Το μόριο της βεταΐνης ίσως αλληλεπιδρά με το μόριο-δότη δεσμού υδρογόνου εντός του πλέγματος των NaDES με τρόπο που επιφέρει μείωση στην ικανότητα της να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες DPPH.

Η παρουσία νερού στα DES αναμένεται να μειώνουν την μετρούμενη αντιοξειδωτική δράση, καθώς αραιώνουν τα δείγματα. Παρόλα αυτά, το Pro:CA:W εμφανίζει μία από τις καλύτερες αντιοξειδωτικές δράσεις, αφού και τα επιμέρους συστατικά παρουσιάζουν καλύτερη δράση από τα υπόλοιπα.

Ξεχωρίζουν για την υψηλότερη αντιοξειδωτική τους δράση το Pro:LA, με 18 mL/L, και το ChCl:CA, με 40 mL/L.

3.2. Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

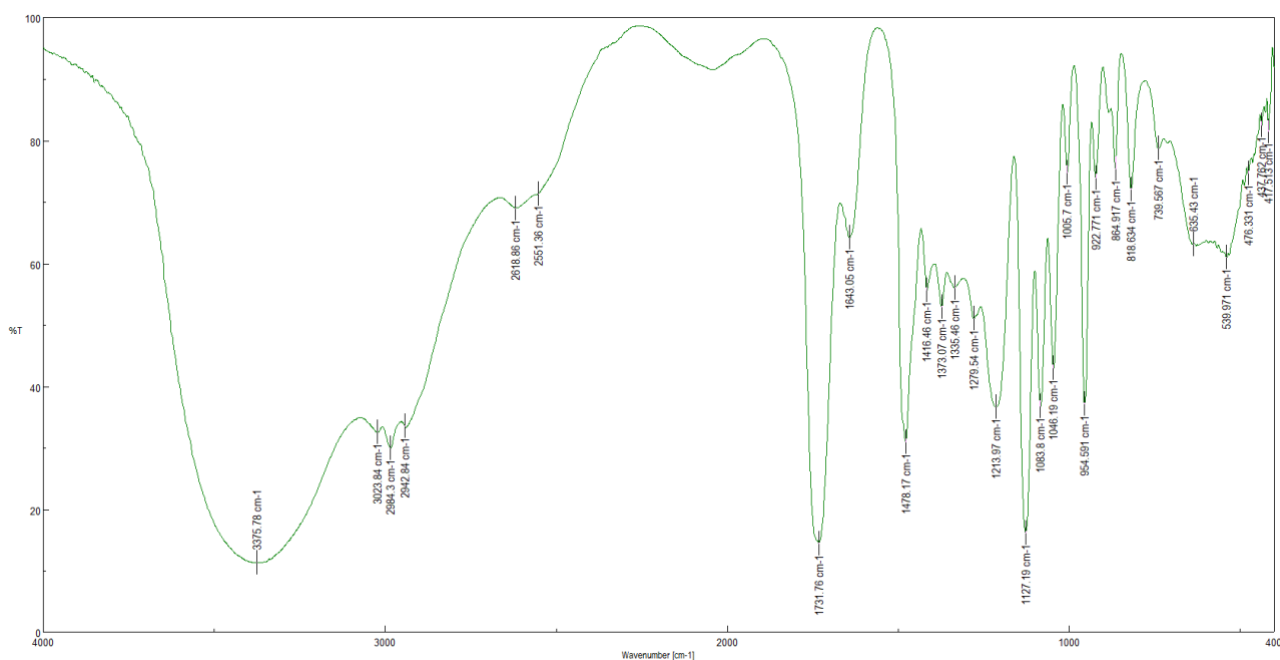
Στην Εικόνα 3-1 παρουσιάζονται ορισμένα από τα παραγόμενα εκχυλίσματα. Η εμφάνιση υποκίτρινων και πορτοκαλί αποχρώσεων στα εκχυλίσματα αποτελεί ένδειξη πραγματοποίησης της εκχύλισης βιοενεργών ενώσεων από το άγριο τριαντάφυλλο. Αυτές οι αποχρώσεις, πιθανώς, συνδέονται με την εκχύλιση ανθοκυανινών που φέρουν τέτοια χρώματα.



Εικόνα 3-1: Παραγόμενα εκχυλίσματα κατά σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: E/Pro:LA, E/ChCl:CA, E/Ala:LA, E/Pro:CA:W, E/ChCl:LA και E/Bet:CA:W

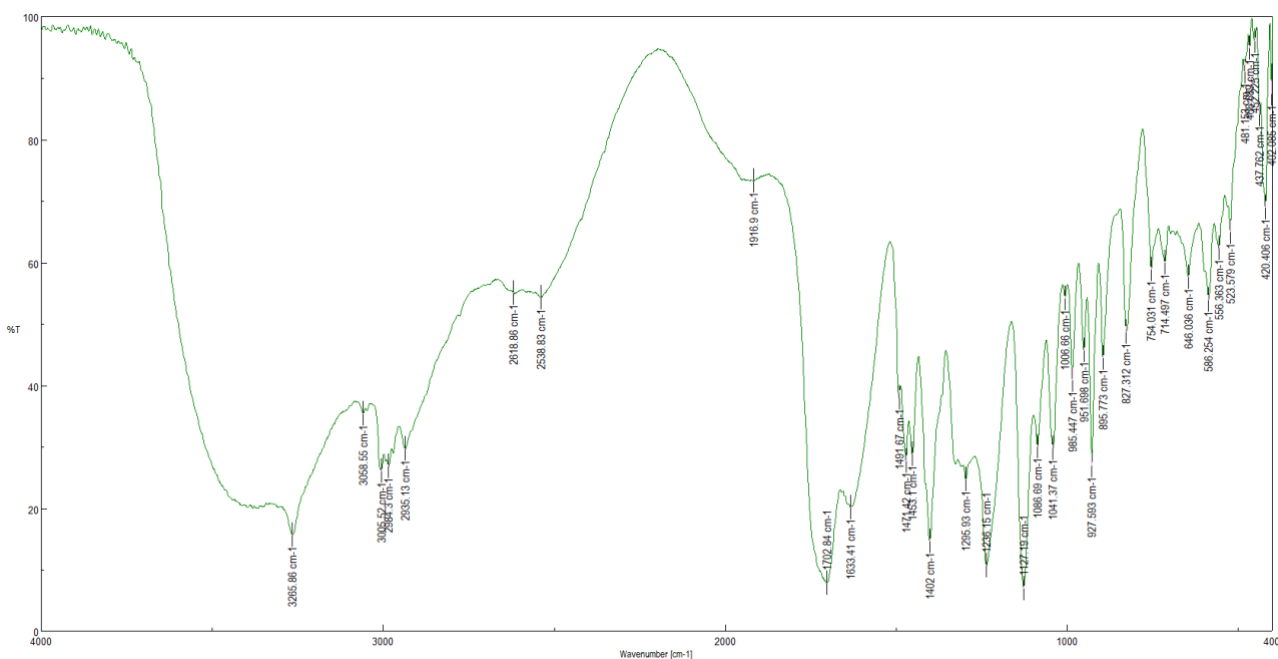
3.2.1. Φασματοσκοπία FT-IR

Μέσω λήψης φασμάτων απορρόφησης στο μέσο υπέρυθρο φάσμα ακτινοβολίας τριών NaDES (βλ. Παράρτημα, Γράφημα 7-4 — Γράφημα 7-6) και των αντίστοιχων εκχυλισμάτων είναι επιθυμητή η μεταξύ τους σύγκριση με σκοπό την επιβεβαίωση ενσωμάτωσης του εκχυλίσματος αγρίου τριαντάφυλλου στο σύστημα των NaDES και την αναγνώριση των κορυφών απορρόφησης που οφείλονται σε αυτό.



Γράφημα 3-1: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/ChCl:LA

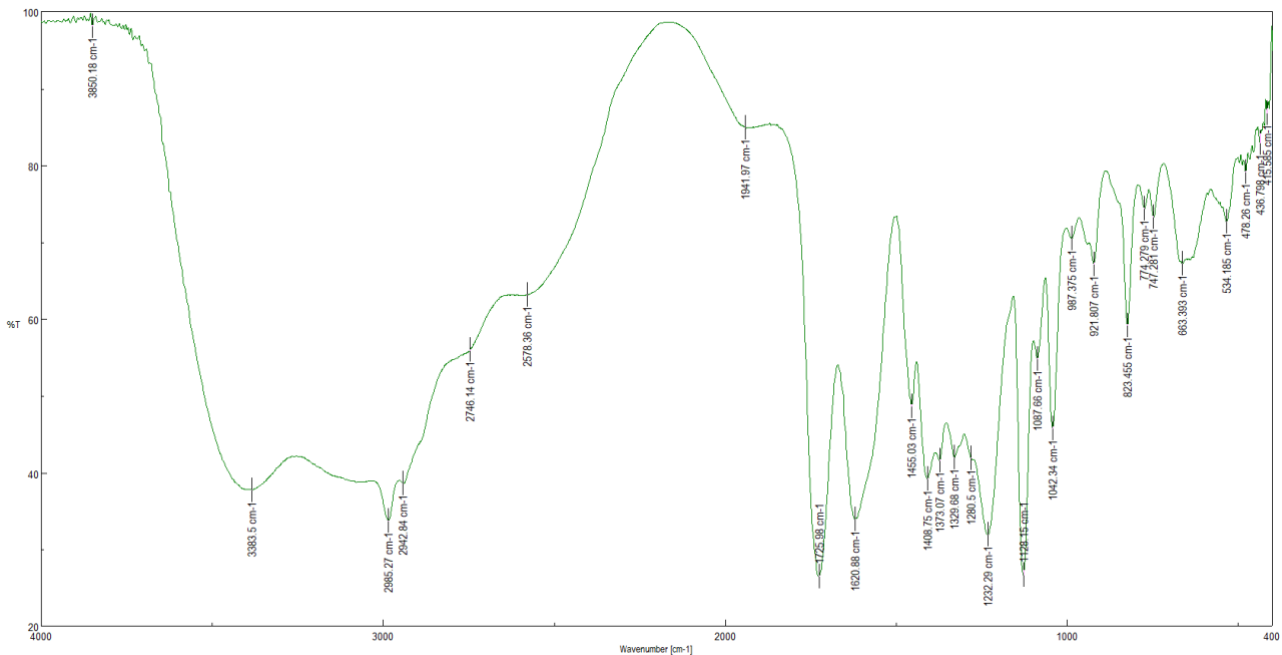
Αρχικά, παρατηρώντας το φάσμα FT – IR του NaDES ChCl:LA (Γράφημα 7-4) διακρίνεται μια ευρεία κορυφή στα 3406 cm^{-1} η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού N-H της χλωριούχου χολίνης και του O-H. Στο εύρος $3000 - 2500\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης των δεσμών C-H, O-H, στο εύρος $1870 - 1540\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης του δεσμού C=O του καρβοξυλίου του γαλακτικού οξέος και κάμψης του N-H της χλωριούχου χολίνης, στο εύρος $1600 - 1100\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης του δεσμού C-O και του C-N και σε δονήσεις κάμψης των δεσμών C-H, O-H, ενώ στο εύρος $850 - 800\text{ cm}^{-1}$ παρατηρείται κορυφή που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-Cl της χλωριούχου χολίνης. Συγκρίνοντας το φάσμα αυτό με το φάσμα (Γράφημα 3-1) του αντίστοιχου εκχυλίσματος αγρίου τριαντάφυλλου, E/ChCl:LA, είναι εμφανής η ομοιότητα με τις προαναφερθείσες κορυφές στο εύρος $4000 - 800\text{ cm}^{-1}$. Παρ' όλ' αυτά παρατηρούνται σχετικά μικρές μετατοπίσεις, οι οποίες αποτελούν ένδειξη αλληλεπίδρασης των μορίων του NaDES με το εκχύλισμα. Ξεχωρίζουν οι μετατοπίσεις των κορυφών από τα 3406 στα 3376 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού N-H και του O-H, από τα 2510 στα 2555 cm^{-1} , που εκφράζει το δεσμό O-H των καρβοξυλίων, από τα 1743 στα 1732 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=O, και από τα 1274 στα 1280 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε ισχυρές δονήσεις τάσης του δεσμού C-N.⁵⁰



Γράφημα 3-2: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Bet:LA

Στο φάσμα FT – IR του NaDES Bet:LA (Γράφημα 7-5) διακρίνεται μια ευρεία κορυφή στα 3491 cm^{-1} η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού N-H της βεταΐνης και του O-H. Στο εύρος $3000 - 2500\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης των δεσμών C-H, O-H, στο εύρος $1870 - 1540\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης του δεσμού C=O του καρβοξυλίου του γαλακτικού οξέος και κάμψης του N-H της βεταΐνης, στο εύρος $1600 - 1100\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης του δεσμού C-O και του C-N και σε δονήσεις κάμψης των δεσμών C-H, O-H, ενώ στο εύρος $900 - 800\text{ cm}^{-1}$ παρατηρείται κορυφή που αντιστοιχεί στις δονήσεις κάμψης

του δεσμού C-H. Συγκρίνοντας το φάσμα αυτό με εκείνο (Γράφημα 3-2) του αντίστοιχου εκχυλίσματος αγρίου τριαντάφυλλου, E/Bet:LA, στο εύρος 4000 - 800 cm^{-1} , παρατηρούνται μετατοπισμένες κορυφές, όπως η μετατόπιση της κορυφής από τα 3491 στα 3388 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού N-H και του O-H, από τα 2529 στα 2539 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσεις του δεσμού O-H καρβοξυλίων, από τα 1727 στα 1703 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=O, και από τα 1333 στα 1296 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε ισχυρές δονήσεις τάσης του δεσμού C-N, φαινόμενο που αποδίδεται στην αλληλεπίδραση των μορίων του NaDES με το εκχύλισμα.⁵⁰



Γράφημα 3-3: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Pro:LA

Στο φάσμα FT – IR του NaDES Pro:LA (Γράφημα 7-6) εμφανίζονται στο εύρος 3000 – 2500 cm^{-1} κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης των δεσμών C-H, O-H, στο εύρος 1870 – 1540 cm^{-1} κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης του δεσμού C=O του καρβοξυλίου του γαλακτικού οξέος και της προλίνης και κάμψης του N-H της προλίνης, στο εύρος 1600 – 1100 cm^{-1} κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης του δεσμού C-O και του C-N και σε δονήσεις κάμψης των δεσμών C-H, O-H, ενώ στο εύρος 900 – 800 cm^{-1} παρατηρείται κορυφή που αντιστοιχεί στις δονήσεις κάμψης του δεσμού C-H. Συγκρίνοντας το φάσμα αυτό με εκείνο (Γράφημα 3-3) του αντίστοιχου εκχυλίσματος αγρίου τριαντάφυλλου, E/Pro:LA, παρατηρούνται μετατοπισμένες κορυφές οι οποίες αποδίδονται στην αλληλεπίδραση των μορίων του NaDES με το εκχύλισμα. Ενδεικτικά, σημειώνονται οι μετατοπίσεις από τα 2540 στα 2578 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσεις του δεσμού O-H καρβοξυλίων, από τα 1984 στα 1942 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε ασθενείς δονήσεις κάμψης του δεσμού C-H, από τα 1732 στα 1726 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=O, από τα 1603 στα 1621 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις δονήσεις κάμψης του δεσμού N-H της προλίνης, και από τα 1402 στα 1409 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις δονήσεις κάμψης του δεσμού O-H.⁵⁰

Συνολικά, παρατηρείται ότι τα φάσματα των NaDES εμφανίζουν κορυφές μέχρι τα 800 cm^{-1} , ενώ στα φάσματα των εκχυλισμάτων διακρίνονται νέες κοινές κορυφές στο εύρος 800 – 400

cm⁻¹ που επιβεβαιώνουν την εκχύλιση συστατικών από το άγριο τριαντάφυλλο. Συγκεκριμένα, εντοπίζονται οι κορυφές κατά μέσο όρο στα 777, 658 και 541 cm⁻¹ που υποδηλώνουν δονήσεις κάμψης δεσμών C=C, για παράδειγμα αρωματικών δακτυλίων που αντιστοιχούν σε φαινολικές ενώσεις, και C-H. Η ύπαρξη πολυφαινολών αποδεικνύεται και μέσω της αυξημένης έντασης κορυφών κοινών με των φασμάτων των NaDES, δηλαδή, γύρω από τα 1730 cm⁻¹ και τα 3400 cm⁻¹, γεγονός που υποδηλώνει επιπλέον ύπαρξη δονήσεων κάμψης δεσμών C=O λόγω αλδευδών, κετονών ή εστέρων και τάσης των O-H, αντίστοιχα. Τέλος, ένδειξη φαινολών αποτελούν οι κορυφές στο εύρος 1390 – 1310 cm⁻¹, που συσχετίζονται με δονήσεις κάμψης δεσμών O-H, καθώς η παρουσία νέων κορυφών ή μεγαλύτερης έντασης στο εύρος 1150 – 1085 cm⁻¹, που αντιπροσωπεύουν δονήσεις τάσης δεσμών C-O αλειφατικών αιθέρων.⁵⁰ Τα φάσματα των υπόλοιπων εκχυλισμάτων παρατίθενται στο Παράρτημα.

3.2.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH

Παρατίθενται οι τιμές του δείκτη IC₅₀, που προκύπτουν μέσω της επεξεργασίας που περιγράφεται στην ενότητα 2.6.2, για τα εκχυλίσματα (Πίνακας 3-3) στα 30 min.

Πίνακας 3-3: Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων [IC₅₀ (mL/L)]

Εκχύλισμα	Ικανότητα δέσμευσης DPPH IC ₅₀ (mL/L)
E/ChCl:LA	23
E/Bet:LA	82
E/Pro:LA	12
E/Ala:LA	7
E/Bet:CA:W	69
E/Pro:CA:W	28
E/Bet:LevA	28
E/ChCl:CA	5

Παρατηρείται, αρχικά, ότι όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, καθώς η τιμή του IC₅₀ είναι σχετικά μικρή. Συγκριτικά με τα αντίστοιχα NaDES, όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν σημαντικά βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση, και, μάλιστα, οι τιμές του IC₅₀ είναι 1-2 τάξεις μεγέθους μικρότερες από τις τιμές των NaDES, παρότι τα εκχυλίσματα αποτελούνται κατά 40 % από νερό. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρείται ακόμα και στα εκχυλίσματα που προέρχονται από NaDES με πολύ χαμηλή δράση, π.χ. IC_{50,E/Pro:CA:W} = 28 mL/L ενώ IC_{50,Pro:CA:W} = 102 mL/L. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την εκχύλιση ισχυρών αντιοξειδωτικών ενώσεων στη μήτρα των NaDES.

Καλή δράση παρουσιάζουν τα E/ChCl:LA, E/Pro:CA:W και E/Bet:LevA. Ξεχωρίζουν ως καλύτερα αντιοξειδωτικά το E/ChCl:CA, με IC₅₀ = 5 mL/L, το E/Ala:LA, με IC₅₀ = 7 mL/L, και το E/Pro:LA, με IC₅₀ = 12 mL/L. Η αντιοξειδωτική δράση των E/ChCl:CA και E/Pro:LA είναι αναμενόμενη καθώς και τα αντίστοιχα NaDES Pro:LA, με IC₅₀ = 18 mL/L, και ChCl:CA, με IC₅₀ = 40 mL/L έχουν καλή δράση συγκριτικά με τα υπόλοιπα NaDES. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το E/Ala:LA που παρουσιάζει τη δεύτερη καλύτερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των εκχυλισμάτων, ενώ προέρχεται από το NaDES Ala:LA, με IC₅₀ = 254 mL/L, που ουσιαστικά δεν επιδεικνύει δράση. Φαίνεται, λοιπόν, ότι με χρήση του Ala:LA επιτυγχάνεται η εκχύλιση της υψηλότερης συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών ουσιών, σε σχέση με τα υπόλοιπα NaDES. Αυτή η συμπεριφορά μπορεί πιθανόν αποδίδεται, συγκριτικά με τα υπόλοιπα NaDES που περιέχουν γαλακτικό οξύ, στη δομή του μορίου της αλανίνης. Συγκεκριμένα, η αλανίνη αποτελεί το μικρότερο HBA μόριο με μόνο 3 άτομα άνθρακα, ενώ η βεταΐνη, η χλωριούχος χολίνη και η προλίνη διαθέτουν 5 άτομα άνθρακα, και είναι γραμμική σε αντίθεση με την προλίνη που έχει δευτεροταγή αμινομάδα σε πενταμελή δακτύλιο. Αυτή η διαφορά στη δομή πιθανόν έχει επίδραση στο πλέγμα του NaDES που δημιουργείται με το γαλακτικό οξύ: η αλανίνη επιφέρει χαμηλότερη στερεοχημική παρεμπόδιση, συγκριτικά με τα άλλα μόρια, αφήνοντας κενό όγκο για την διείσδυση περισσότερων βιοενεργών ενώσεων του εκχυλίσματος.

3.2.3. Μέτρηση ολικών φαινολικών (Total Phenolic Content, TPC)

Τα αποτελέσματα της μέτρησης των ολικών φαινολικών των εκχυλισμάτων συνοψίζονται στον Πίνακα 3-4.

Η μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου στα δείγματα που περιέχουν χλωριούχο χολίνη, E/ChCl:LA και E/ChCl:CA, δεν ήταν εφικτή με τη συγκεκριμένη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε, λόγω της παρουσίας μετάλλων στο αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu, τα οποία αντιδρούν με το χλώριο προς σχηματισμό συμπλόκου που, τελικά, καταβυθίζεται με τη μορφή κίτρινου ιζήματος και καθιστά τη μέτρηση μη εφικτή.

Πίνακας 3-4: Ολικό φαινολικό. περιεχόμενο, TPC, των εκχυλισμάτων

Εκχύλισμα	TPC $\left(\cdot 10^{-3} \frac{\text{mg gallic acid eq}}{\text{g WR}} \right)$
E/Bet:LA	9
E/Pro:LA	29
E/Ala:LA	31
E/Bet:CA:W	7
E/Pro:CA:W	23
E/Bet:LevA	25

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα περισσότερα εκχυλίσματα, E/Ala:LA E/Pro:LA, E/Pro:CA:W και E/Bet:LevA, έχουν παρόμοια τιμή ολικών φαινολικών. Τη χαμηλότερη απόδοση εκχύλισης φαινολικών εμφανίζουν το E/Bet:CA:W και E/Bet:LA.

Υψηλότερο ολικό φαινολικό φορτίο, TPC, υποδηλώνει ότι κατά την εκχύλιση περισσότερες φαινολικές ενώσεις κατάφεραν να αποσπαστούν από τους δεσμούς εντός της βιομάζας της μήτρας του άγριου τριαντάφυλλου και να συνδεθούν με τα μόρια των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Η αλληλεπίδραση μεταξύ φαινολών και NaDES καθορίζεται από την πολικότητα τόσο των NaDES όσο και των φαινολικών ενώσεων και από την πυκνότητα και το ιξώδες των NaDES.⁵¹

3.2.4. Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών (Total Flavonoid Content, TFC)

Τα αποτελέσματα της μέτρησης των ολικών φλαβονοειδών των υπολοίπων εκχυλισμάτων συνοψίζονται στον Πίνακα 3-5.

Πίνακας 3-5: Ολικά φλαβονοειδή, TFC, των εκχυλισμάτων

Εκχύλισμα	TFC $\left(\frac{\text{mg catechin eq}}{\text{g WR}}\right)$
E/ChCl:LA	3
E/Bet:LA	6
E/Pro:LA	5
E/Ala:LA	15
E/Bet:CA:W	11
E/Pro:CA:W	12
E/ChCl:CA	13

Συγκρίνοντας τις τιμές των TFC υψηλότερη απόδοση εκχύλισης σε φλαβονοειδή φαίνεται ότι επιτεύχθηκε στα δείγμα E/Ala:LA, E/ChCl:CA, E/Pro:CA:W και E/Bet:CA:W. Χαμηλό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή παρουσιάζουν τα E/Pro:LA και E/Bet:LA, ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση συναντάται στο E/ChCl:LA.

Παρατηρείται ότι μεταξύ εκχυλισμάτων με ίδιο HBA και HBD κιτρικό ή γαλακτικό οξύ, το περιεχόμενο των φλαβονοειδών είναι τουλάχιστον διπλάσιο στα εκχυλίσματα με κιτρικό οξύ. Το μόριο του κιτρικού οξέος είναι μεγαλύτερο από αυτό του γαλακτικού και διαθέτει περισσότερες ομάδες υδροξυλίων. Έτσι, βασιζόμενοι στο μόριο της κατεχίνης ως ισοδύναμο των φλαβονοειδών, το οποίο είναι πολικό, βρίσκει περισσότερα διαθέσιμα σημεία στο κιτρικό οξύ για την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου συγκριτικά με το γαλακτικό οξύ. Δηλαδή,

περισσότερα μόρια κατεχίνης καταφέρνουν να αποσπαστούν από τη μήτρα της πρώτης ύλης και να μεταφερθούν στο σύστημα του NaDES.

3.3. Προσδιορισμός διαλυτότητας χιτοζάνης σε υδατικά διαλύματα εκχυλισμάτων και pH διαλυμάτων

Στον Πίνακα 3-6 συνοψίζονται οι τιμές pH και διαλυτότητας της χιτοζάνης σε υδατικά διαλύματα περιεκτικότητας 1 % v/v σε εκχύλισμα.

Πίνακας 3-6: Τιμές pH και διαλυτότητας χιτοζάνης σε υδατικά διαλύματα περιεκτικότητας 1 % v/v σε εκχύλισμα

Υδατικό διάλυμα	pH	s _{cs} (% w/v)
Eaq/ChCl:LA	2.5	0.3
Eaq/Bet:LA	2.6	0.3
Eaq/Pro:LA	2.3	0.25
Eaq/Ala:LA	3.4	0.2
Eaq/Bet:CA:W	2.6	0.033
Eaq/Pro:CA:W	2.8	0.01
Eaq/Bet:LevA	3.3	0.2
Eaq/ChCl:CA	2.5	0.2

Δεδομένου ότι στους 20 °C οι τιμές pK_a των οξέων είναι pK_a_{CA} = 2.79, pK_a_{LA} = 3.86⁵² και pK_a_{LevA} = 4.62 είναι αναμενόμενο το μετρούμενο pH των εκχυλισμάτων να είναι αρκετά όξινο.^{53,52,54} Το pH του εκχυλισμάτος E/Bet:LevA συγκριτικά με αυτό των E/Bet:LA ή E/Bet:CA:W είναι λιγότερο όξινο καθώς το λεβουλινικό οξύ είναι πιο ασθενές οξύ. Στα εκχυλίσματα που περιέχουν κιτρικό οξύ, κατά τη σύνθεσή τους, προστέθηκε νερό λόγω υψηλού ιξώδους, το οποίο στη συνέχεια δεν αφαιρέθηκε. Συνεπώς, το pH των εκχυλισμάτων αυτών δεν εμφανίζεται χαμηλότερο από το pH των αντίστοιχων εκχυλισμάτων με γαλακτικό οξύ, παρόλο που το κιτρικό οξύ είναι ισχυρότερο από το γαλακτικό.

Παρατηρείται ότι σε όλα τα εκχυλίσματα των οποίων το NaDES περιέχει γαλακτικό οξύ η χιτοζάνη έχει διαλυτότητα τουλάχιστον 0.2 % w/v, και, συγκεκριμένα στα E/ChCl:LA και E/Bet:LA φτάνει μέχρι 0.3 % w/v.

Συγκρίνοντας τα διαλύματα στα οποία το NaDES έχει ως HBA τη βεταΐνη και ως HBD το γαλακτικό ή το κιτρικό οξύ (E/Bet:LA και E/Bet:CA:W, αντίστοιχα) φαίνεται πως σε αυτά που περιέχουν κιτρικό οξύ η διαλυτότητα της χιτοζάνης είναι σημαντικά μικρότερη (10 φορές),

παρόλο που τα διαλύματα έχουν το ίδιο pH (2.6). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στην περίπτωση των διαλυμάτων των E/Pro:LA και E/Pro:CA:W, τα οποία έχουν επίσης παρόμοια pH (2.6 και 2.8, αντίστοιχα). Η διαλυτότητα της χιτοζάνης στο διάλυμα E/Pro:CA:W είναι 25 φορές μικρότερη από ό,τι στο διάλυμα E/Pro:LA. Στην περίπτωση των διαλυμάτων E/ChCl:LA και E/ChCl:CA (pH 2.5) η διαλυτότητα της χιτοζάνης είναι και 1.5 φορά μικρότερη στο διάλυμα με το κιτρικό οξύ από ό,τι στο διάλυμα με γαλακτικό οξύ.

Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διαλυτότητα της χιτοζάνης δεν εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από το pH του διαλύματος (το οποίο πρέπει να είναι χαμηλό ώστε να πρωτονιώνονται οι αμινομάδες της χιτοζάνης και να σχηματίζονται τα αντίστοιχα άλατα που είναι υδατοδιαλυτά) αλλά και από τα δομικά χαρακτηριστικά των συστατικών του και τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με την πολυμερική αλυσίδα της χιτοζάνης.⁵⁵

Στα διαλύματα που μελετήθηκαν φαίνεται ότι πιο σημαντικό ρόλο στη διαλυτοποίηση της χιτοζάνης παίζει η δομή του οξέος-δότη δεσμών υδρογόνου από ό,τι η δομή του δέκτη δεσμών υδρογόνου.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε το pH κάθε υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 1 % v/v σε εκχύλισμα και 0.2 ή 0.3 % w/v σε χιτοζάνη (Πίνακας 3-7).

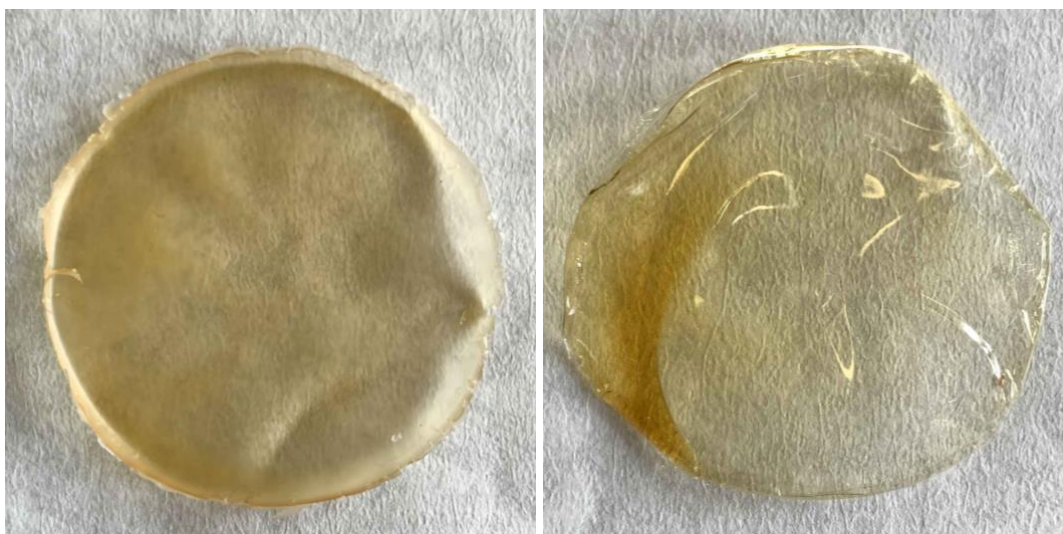
Πίνακας 3-7: Τιμές pH υδατικών διαλυμάτων περιεκτικότητας 1 % v/v σε εκχύλισμα και 0.2 ή 0.3 % w/v σε χιτοζάνη

Υδατικό διάλυμα	pH
Eaq/ChCl:LA/0.2	2.9
Eaq/Bet:LA/0.2	2.8
Eaq/ChCl:LA/0.3	3.2
Eaq/Bet:LA/0.3	3.0
Eaq/Pro:LA/0.2	3.2
Eaq/Ala:LA/0.2	3.6
Eaq/Bet:CA:W/0.2	2.9
Eaq/Pro:CA:W/0.2	3.1
Eaq/Bet:LevA/0.2	3.7
Eaq/ChCl:CA/0.2	3.0

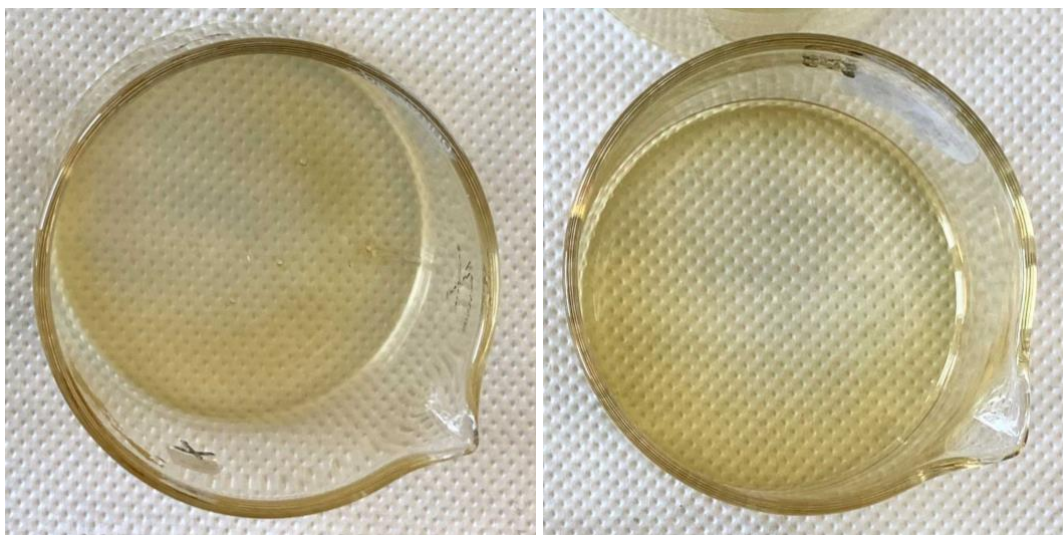
Η αύξηση της περιεκτικότητας χιτοζάνης, από 0.2 σε 0.3 % w/v, προκαλεί αύξηση του pH. Η αύξηση αυτή είναι αναμενόμενη καθώς υπάρχουν περισσότερες αμινομάδες που δύνανται να πρωτονιωθούν, επομένως, καταναλώνεται μεγαλύτερη ποσότητα των αντίστοιχων οξέων.

3.4. Σχηματισμός φιλμ χιτοζάνης

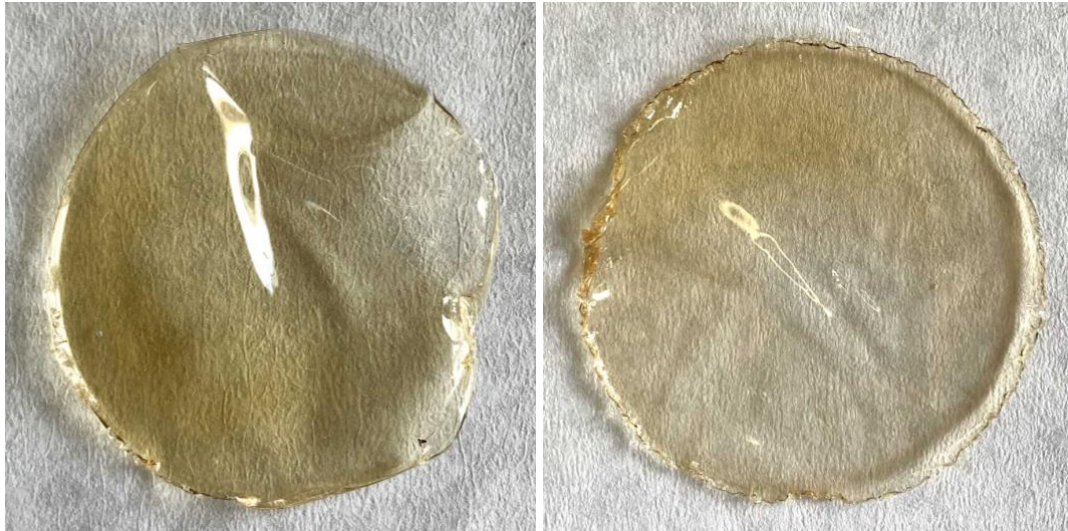
Παρατηρώντας τα αποτελέσματα διαλυτότητας χιτοζάνης σε υδατικά διαλύματα εκχυλισμάτων (Πίνακας 3-6), φαίνεται ότι δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός των φιλμ F/Bet:CA:W/0.2 και F/Pro:CA:W/0.2 καθώς η απευθείας διαλυτοποίηση της χιτοζάνης στα αντίστοιχα εκχυλίσματα σε συγκέντρωση τουλάχιστον 0.2 % w/v δεν είναι εφικτή. Παραλαμβάνονται, λοιπόν, τα φιλμ F/ChCl:LA/0.2 (Εικόνα 3-2(i)), F/Bet:LA/0.2 (Εικόνα 3-2(ii)), F/ChCl:LA/0.3 (Εικόνα 3-3(i)), F/Bet:LA/0.3 (Εικόνα 3-3(ii)), F/Pro:LA/0.2 (Εικόνα 3-4(i)), F/Ala:LA/0.2 (Εικόνα 3-4(ii)), F/Bet:LevA/0.2 (Εικόνα 3-5(i)) και F/ChCl:CA/0.2 (Εικόνα 3-5(ii)).



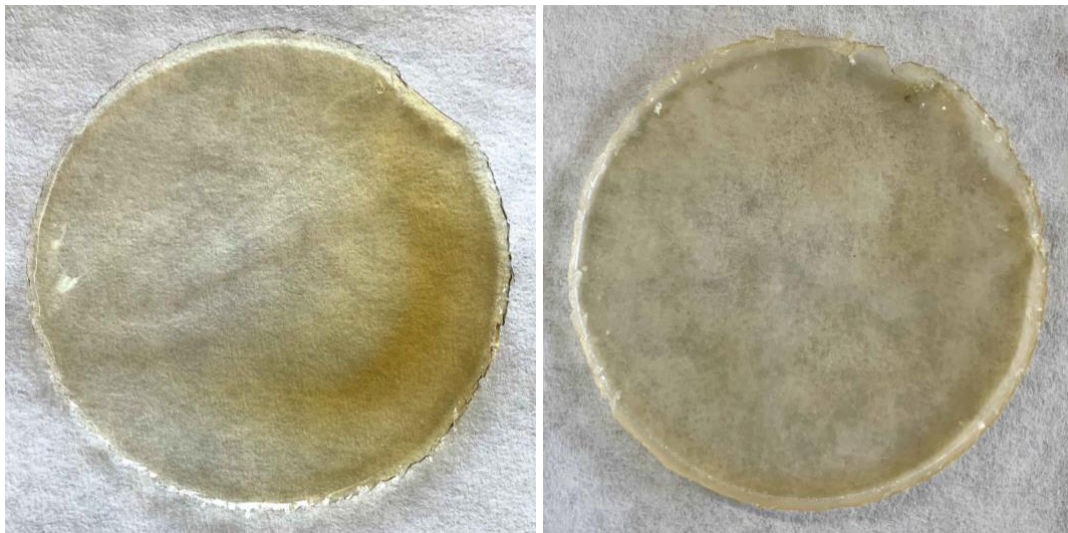
Εικόνα 3-2: (i) Φιλμ F/ChCl:LA/0.2, αριστερά (ii) Φιλμ F/Bet:LA/0.2, δεξιά.



Εικόνα 3-3: (i) Φιλμ F/ChCl:LA/0.3, αριστερά (ii) Φιλμ F/Bet:LA/0.3, δεξιά.



Εικόνα 3-4: (i) Φιλμ F/Pro:LA/0.2, αριστερά (ii) Φιλμ F/Ala:LA/0.2, δεξιά.

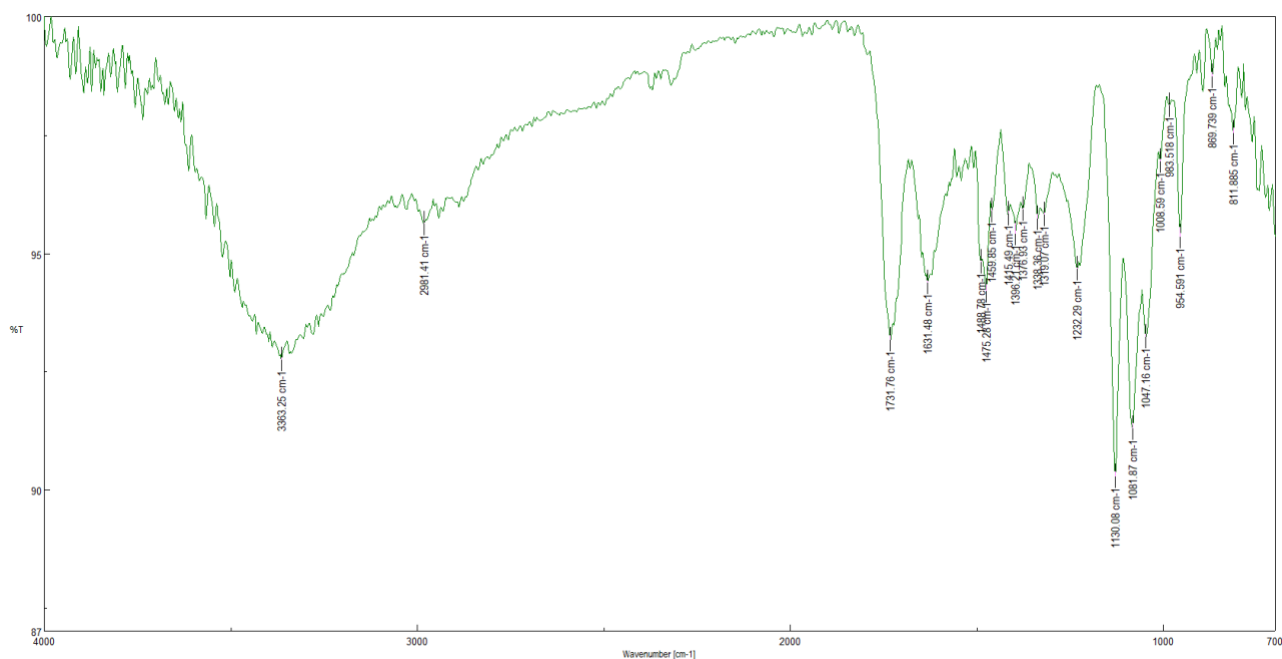


Εικόνα 3-5: (i) Φιλμ F/Bet:LevA/0.2, αριστερά (ii) Φιλμ F/ChCl:CA /0.2, δεξιά.

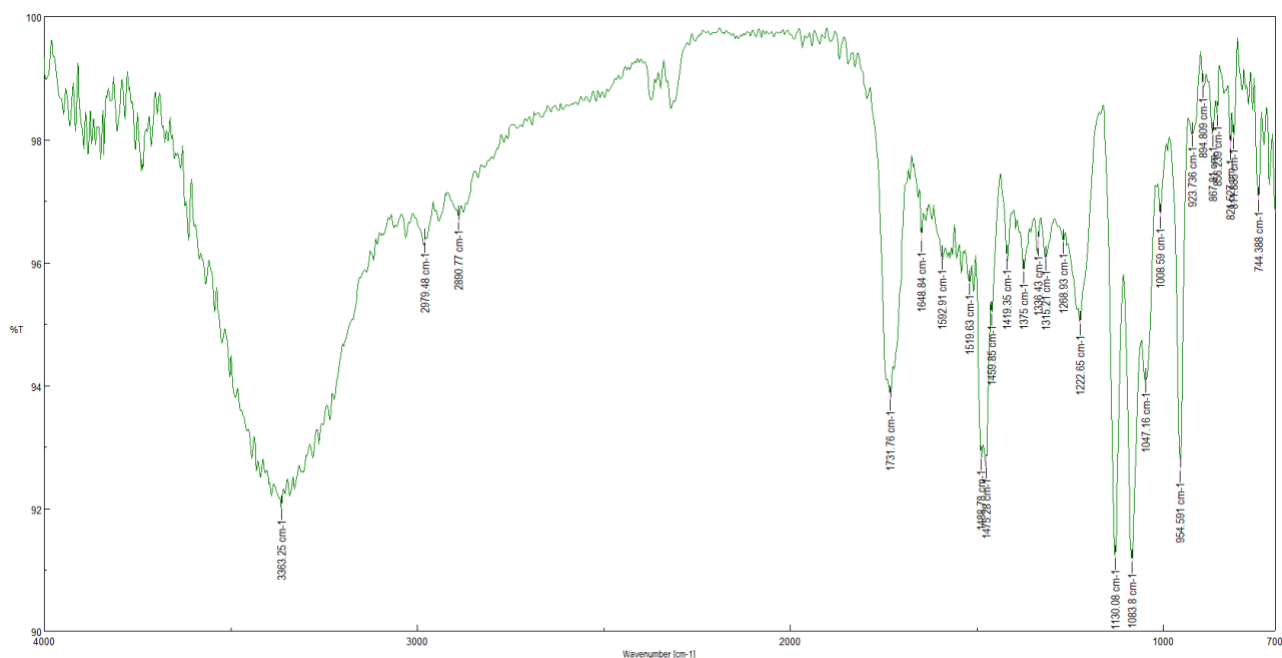
Τα φιλμ που περιέχουν χλωριούχο χολίνη έχουν πιο θαμπή όψη, ενώ τα υπόλοιπα είναι πιο διαυγή και γυαλιστερά.

3.5. Χαρακτηρισμός φιλμ

3.5.1. Φασματοσκοπία ATR – FT-IR



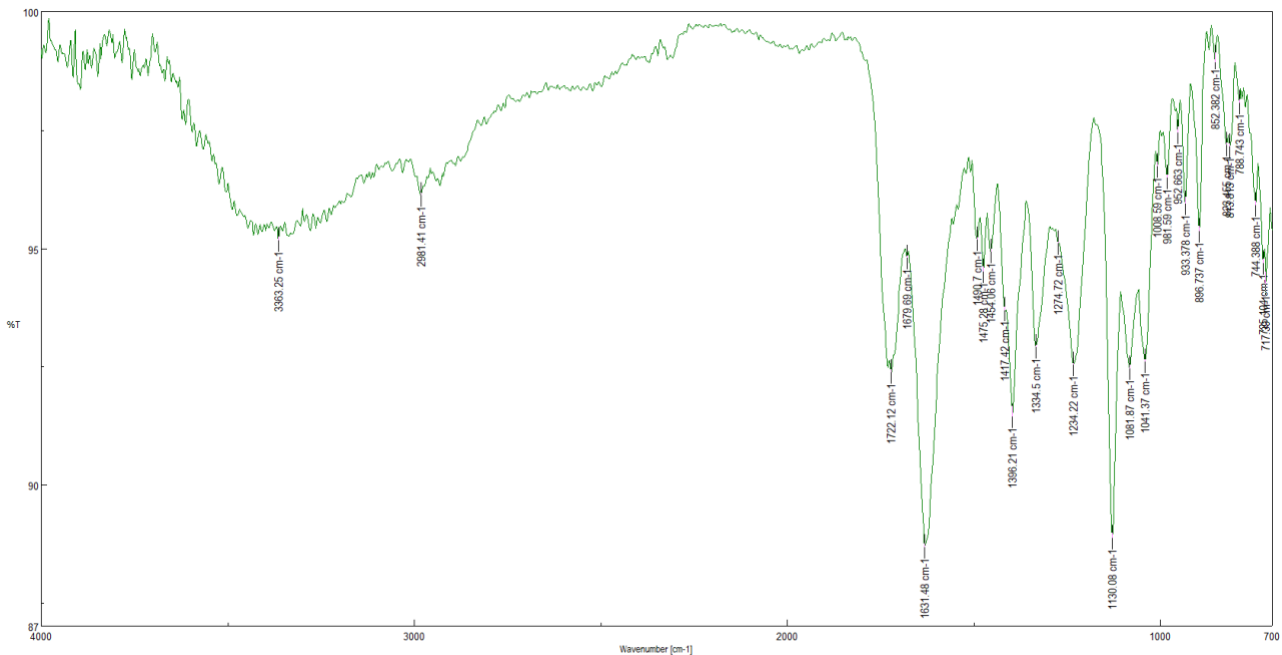
Γράφημα 3-4: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/ChCl:LA/0.2



Γράφημα 3-5: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/ChCl:LA/0.3

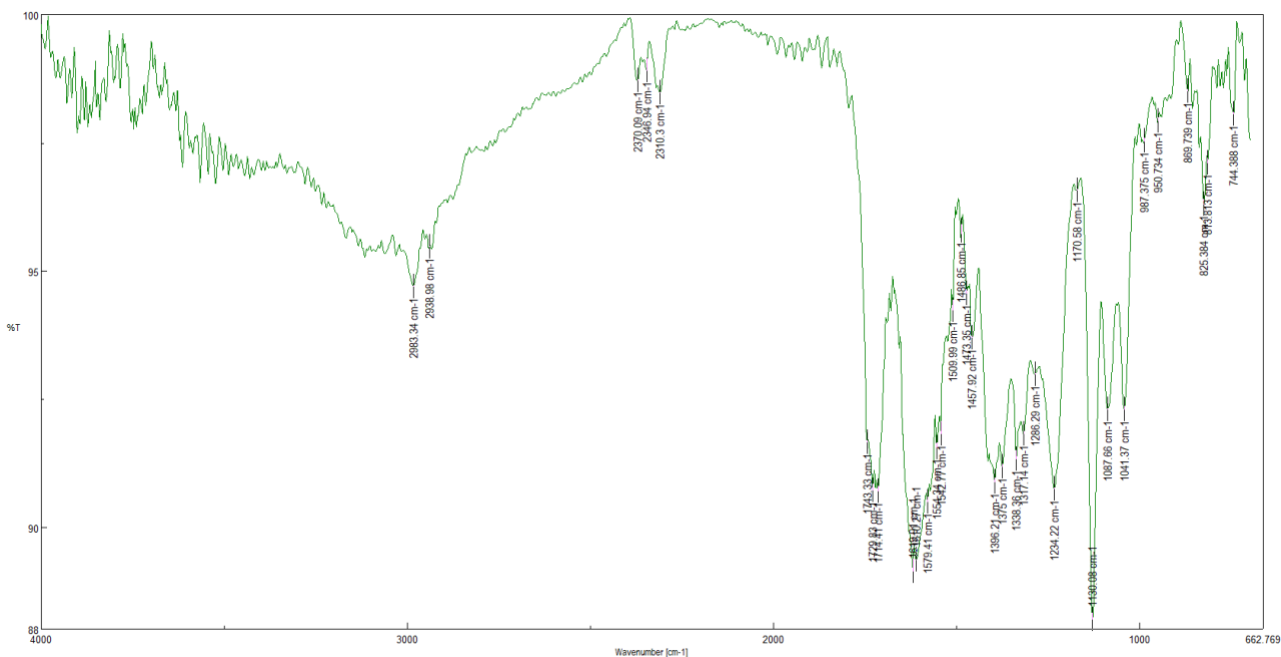
Στο φάσμα του F/ChCl:LA/0.2 και του F/ChCl:LA/0.3 διακρίνονται κοινές κορυφές, η ένταση των οποίων είναι μεγαλύτερη στο φιλμ με την υψηλότερη περιεκτικότητα πολυμερούς. Ξεχωρίζουν για την ένταση τους οι κορυφές στα 1731, 1478, 1130, 1083 και 954 cm^{-1} , οι

οποίες εμφανίζονται και στο φάσμα του αντίστοιχου εκχυλίσματος, E/ChCl:LA. Ακόμα, η κορυφή που εμφανίζεται στο φάσμα του εκχυλίσματος στα 3375 cm^{-1} παρατηρείται μετατοπισμένη στα 3363 cm^{-1} . Η ευρεία της μορφή προκύπτει από αλληλοεπικάλυψη των ταινιών απορρόφησης της χλωριούχου χολίνης και της χιτοζάνης, που προκύπτουν από δονήσεις τάσης των δεσμών O-H και N-H. Η αλληλεπίδραση μεταξύ χιτοζάνης και του E/ChCl:LA εκφράζεται και μέσω άλλων μετατοπίσεων κορυφών, όπως η μετατόπιση από τα 1643 στα 1631 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε δονήσεις κάμψης των δεσμών N-H αμινομάδων, από τα 1478 στα 1488 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε απορροφήσεις μεθυλομάδων, και από τα 1213 στα 1223 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε δονήσεις τάσης δεσμών C-O.⁵⁰



Γράφημα 3-6: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/Bet:LA/0.2

Στο φάσμα του F/Bet:LA/0.2 εμφανίζεται η ευρεία κορυφή στα 3363 cm^{-1} και σχετίζεται με την κορυφή στο φάσμα του εκχυλίσματος E/Bet:LA στα 3388 cm^{-1} . Η μετατόπιση και η μορφή της προκύπτει από αλληλοεπικάλυψη των ταινιών απορρόφησης της βεταΐνης και της χιτοζάνης, που προκύπτουν από δονήσεις τάσης των δεσμών O-H και N-H. Η αλληλεπίδραση μεταξύ χιτοζάνης και του E/Bet:LA εκφράζεται και μέσω άλλων μετατοπίσεων κορυφών, όπως η μετατόπιση από τα 1633 στα 1631 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε δονήσεις κάμψης των δεσμών N-H αμινομάδων, από τα 1471 στα 1475 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε απορροφήσεις μεθυλομάδων, και από τα 1295 στα 1274 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε δονήσεις τάσης δεσμών C-O.⁵⁰



Γράφημα 3-7: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/Pro:LA/0.2

Στο φάσμα του F/Pro:LA/0.2 εμφανίζεται μια ευρεία ταινία απορροφήσεων γύρω από την κορυφή στα 2983 cm^{-1} και σχετίζεται με την κορυφή στο φάσμα του εκχυλίσματος E/Bet:LA στα 2985 cm^{-1} . Η μετατόπιση και η μορφή της προκύπτει από αλληλοεπικάλυψη των ταινιών απορρόφησης της προλίνης και της χιτοζάνης, που προκύπτουν από δονήσεις τάσης των δεσμών O-H και N-H. Η αλληλεπίδραση μεταξύ χιτοζάνης και του E/Pro:LA εκφράζεται και μέσω άλλων μετατοπίσεων κορυφών, όπως η μετατόπιση από τα 1455 στα 1458 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε απορροφήσεις μεθυλομάδων, και από τα 1281 στα 1286 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε δονήσεις τάσης δεσμών C-O.⁵⁰

Εξετάζοντας συνδυαστικά τα φάσματα όλων των φιλμ (βλ. Παράρτημα), αρχικά, επιβεβαιώνεται η ενσωμάτωση της χιτοζάνης μέσω της εμφάνισης κοινών κορυφών που δεν εντοπίζονται στα αντίστοιχα εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα, εντοπίζονται κορυφές στα εύρη $1650 - 1580\text{ cm}^{-1}$, $1465 - 1450\text{ cm}^{-1}$ και $1440 - 1395\text{ cm}^{-1}$ που εκπροσωπούν δονήσεις κάμψης των δεσμών N-H, C-H και O-H της χιτοζάνης, αντίστοιχα. Η ενσωμάτωση των βιοενεργών ενώσεων των εκχυλισμάτων στη μήτρα των φιλμ επιβεβαιώνεται από την εμφάνιση κορυφών σε κυματαριθμούς μικρότερους των 800 cm^{-1} , που υποδηλώνουν δονήσεις κάμψης δεσμών C=C, για παράδειγμα αρωματικών δακτυλίων που αντιστοιχούν σε φαινολικές ενώσεις, και C-H. Η ύπαρξη πολυφαινολών αποδεικνύεται και μέσω της αυξημένης έντασης κορυφών κοινών με των φασμάτων των εκχυλισμάτων, δηλαδή, γύρω από τα 1730 cm^{-1} , γεγονός που υποδηλώνει ύπαρξη δονήσεων κάμψης δεσμών C=O λόγω αλδεϋδών, κετονών ή εστέρων. Τέλος, ένδειξη παρουσίας φαινολικών ενώσεων αποτελούν οι κορυφές στο εύρος $1390 - 1310\text{ cm}^{-1}$, που συσχετίζονται με δονήσεις κάμψης δεσμών O-H, καθώς οι κορυφές στο εύρος $1150 - 1085\text{ cm}^{-1}$, που αντιπροσωπεύουν δονήσεις τάσης δεσμών C-O αλειφατικών αιθέρων.⁵⁰

3.5.2. Μέτρηση μάζας και πάχους

Οι τιμές μάζας και πάχους κάθε φιλμ συνοψίζονται στον Πίνακα 3-8.

Πίνακας 3-8: Τιμές μάζας και πάχους φιλμ

Φιλμ	$m_{\text{φιλμ}}$ (mg)	$d_{\text{φιλμ}}$ (mm)
F/ChCl:LA/0.2	423	0.127 ± 0.024
F/Bet:LA/0.2	342	0.097 ± 0.028
F/ChCl:LA/0.3	464	0.118 ± 0.014
F/Bet:LA/0.3	390	0.105 ± 0.031
F/Pro:LA/0.2	386	0.132 ± 0.033
F/Ala:LA/0.2	487	0.186 ± 0.037
F/Bet:LevA/0.2	402	0.129 ± 0.051
F/ChCl:CA/0.2	465	0.124 ± 0.042

Όπως είναι αναμενόμενο, αύξηση της περιεκτικότητας χιτοζάνης, από 0.2 σε 0.3 % w/v, δηλαδή η προσθήκη επιπλέον 50 mg χιτοζάνης στο σύστημα του φιλμ, προκαλεί αύξηση της μάζας του.

Μεταξύ των φιλμ ίσης περιεκτικότητας χιτοζάνης (0.2 % w/v) μεγαλύτερη μάζα και πάχος έχει το φιλμ που περιέχει Ala:LA. Στο εκχύλισμα E/Ala:LA προσδιορίστηκε η υψηλότερη περιεκτικότητα ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών και η δεύτερη υψηλότερη συγκέντρωση ουσιών με αντιοξειδωτική δράση, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει το μεγαλύτερο βάρος του αντίστοιχου φιλμ. Επίσης, η μεγαλύτερη μάζα του F/Ala:LA/0.2 μπορεί να αιτιολογηθεί και από τον έντονο υγροσκοπικό του χαρακτήρα, καθώς, είτε απορροφά μόρια νερού, αμέσως, μόλις έρθει σε επαφή με την ατμόσφαιρα, είτε κάποια μόρια νερού δεν εξατμίζονται και παραμένουν εντός τους συστήματος του φιλμ.

Η μάζα των φιλμ, των οποίων το NaDES περιέχει ίδιο HBA και ως HBD γαλακτικό, λεβουλινικό ή κιτρικό οξύ, αυξάνεται όσο αυξάνεται το μοριακό βάρος του HBD, δεδομένου ότι $MW_{LA} < MW_{LevA} < MW_{CA}$. Μεταξύ των NaDES, και συνεπώς, των εκχυλισμάτων με γαλακτικό οξύ ως HBD, τα Bet:LA και Pro:LA έχουν ιξώδες παρόμοιο και χαμηλότερο από αυτό του ChCl:LA. Συνεπώς, καθώς κατά το σχηματισμό των φιλμ λαμβάνεται ίδιος όγκος εκχυλίσματος, το φιλμ F/ChCl:LA/0.2 παρουσιάζει υψηλότερη μάζα από τα F/Bet:LA/0.2 και F/Pro:LA/0.2.

Η παρουσία πολλών μορίων με αρωματικούς δακτυλίους στο E/Ala:LA οδηγεί στη διαμόρφωση ενός πλέγματος στο οποίο οι πολυμερικές αλυσίδες της χιτοζάνης δεν μπορούν να διαταχθούν με υψηλή πυκνότητα, με αποτέλεσμα το φιλμ F/Ala:LA/0.2 να είναι πιο παχύ

λόγω παρουσίας περισσότερου κενού όγκου. Το πάχος των υπολοίπων φιλμ ίδιας περιεκτικότητας πολυμερούς δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές.

Βάσει της τάξης μεγέθους της τυπικής απόκλισης του πάχους, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι τιμές πάχους είναι παρεμφερείς μεταξύ των φιλμ ίδιου NaDES και διαφορετικής περιεκτικότητας χιτοζάνης.

3.5.3. Μέτρηση χρώματος

Οι τιμές των παραμέτρων L, a, b τόσο των δειγμάτων όσο και της λευκής πλάκας (blank) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-9.

Πίνακας 3-9: Τιμές παραμέτρων L, a, b των φιλμ

Δείγμα	L	a	b
blank	97.24	-0.21	1.73
F/ChCl:LA/0.2	43.11	-0.65	3.46
F/Bet:LA/0.2	40.12	-0.26	4.33
F/ChCl:LA/0.3	43.42	-0.94	6.35
F/Bet:LA/0.3	37.33	-0.41	5.33
F/Pro:LA/0.2	54.61	-1.46	7.04
F/Ala:LA/0.2	37.46	0.38	12.61
F/Bet:LevA/0.2	40.40	-0.95	5.32
F/ChCl:CA/0.2	40.20	-0.35	2.01

Η φωτεινότητα (L) των φιλμ είναι παρόμοια και κυμαίνεται εντός του εύρους 37 - 43, με εξαίρεση το φιλμ F/Pro:LA/0.2 που παρουσιάζει υψηλότερη φωτεινότητα, L = 54.61. Η παράμετρος a είναι μικρή σε όλα τα φιλμ το οποίο σημαίνει ότι κανένα δεν παρουσιάζει έντονο κόκκινο ή πράσινο χρώμα. Πέρα από το F/Ala:LA/0.2 που έχει θετική τιμή a, a = 0.38, δηλαδή τείνει προς το κόκκινο, τα υπόλοιπα φιλμ έχουν αρνητικό a, δηλαδή τείνουν προς το πράσινο. Καθώς όλες οι τιμές της παραμέτρου b είναι θετικές, όλα τα φιλμ χαρακτηρίζονται κίτρινα, με ποιο έντονα κίτρινο το F/Ala:LA/0.2, όπου b = 12.61.

Η διαφορά κάθε παραμέτρου του φιλμ από την αντίστοιχη του blank, Δi , και η ολική διαφορά χρώματος, ΔE , υπολογίζονται μέσω των σχέσεων [9], [10] και συνοψίζονται στον Πίνακα 3-10.

Πίνακας 3-10: Τιμές Δi , όπου i : L, a, b, και ΔE των φιλμ

Φιλμ	ΔL	Δa	Δb	ΔE
F/ChCl:LA/0.2	-54.13	-0.44	1.73	54.16
F/Bet:LA/0.2	-57.12	-0.05	2.60	57.18
F/ChCl:LA/0.3	-53.82	-0.73	4.62	54.02
F/Bet:LA/0.3	-59.91	-0.20	3.60	60.02
F/Pro:LA/0.2	-42.63	-1.25	5.31	42.98
F/Ala:LA/0.2	-59.78	0.59	10.88	60.77
F/Bet:LevA/0.2	-56.84	-0.74	3.59	56.96
F/ChCl:CA/0.2	-57.04	-0.14	0.28	57.04

Όλες οι τιμές ΔL είναι αρνητικές, δηλαδή, τα φιλμ είναι λιγότερο φωτεινά σε σχέση με τη λευκή πλάκα. Αρνητικές τιμές του Δa υποδηλώνουν πόσο πιο κόκκινο είναι ένα δείγμα από το λευκό, θετικές τιμές του Δa πόσο πιο πράσινο και θετικές τιμές του Δb πόσο πιο κίτρινο. Η ολική διαφορά χρώματος είναι παρόμοια στα φιλμ, μεταξύ [54, 61], με εξαίρεση το F/Pro:LA/0.2 για το οποίο ισχύει $\Delta E = 42.98$. Η ύπαρξη χρώματος στα φιλμ, πέρα από την παρουσία χιτοζάνης και NaDES, οφείλεται και στο χρώμα των εκχυλισμάτων αγρίου τριαντάφυλλου.

3.5.4. Μέτρηση σκληρότητας

Τα αποτελέσματα δύναμης θραύσης, $F_{\theta\rho\alpha\upsilon\sigma\eta\varsigma}$, και επιμήκυνσης κατά τη θραύση, $d_{\theta\rho\alpha\upsilon\sigma\eta\varsigma}$, φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3-11. Να σημειωθεί ότι δεν πραγματοποιήθηκε μέτρηση σκληρότητας στο φιλμ F/Ala:LA/0.2 λόγω υψηλού υγροσκοπικού του χαρακτήρα.

Πίνακας 3-11: Τιμές δύναμης θραύσης και επιμήκυνσης κατά τη θραύση των φιλμ

Φιλμ	$F_{\theta\rho\alpha\upsilon\sigma\eta\varsigma}$ (N)	$d_{\theta\rho\alpha\upsilon\sigma\eta\varsigma}$ (mm)
F/ChCl:LA/0.2	1.0	10.05
F/Bet:LA/0.2	1.2	21.44
F/ChCl:LA/0.3	4.0	18.60
F/Bet:LA/0.3	4.1	22.28
F/Pro:LA/0.2	0.6	16.15

F/Bet:LevA/0.2	1.6	15.21
F/ChCl:CA/0.2	0.8	8.69

Αρχικά, παρατηρείται ότι με αύξηση της περιεκτικότητας της χιτοζάνης κατά 0.1 % w/v η δύναμη θραύσης σχεδόν τετραπλασιάζεται, δηλαδή αυξάνεται η σκληρότητα του φιλμ. Εφόσον το πάχος δεν παρουσιάζει παρόμοια τάση αύξησης, σημαίνει ότι η επιπλέον ποσότητα πολυμερικών αλυσίδων χιτοζάνης, που προστίθεται, διατάσσεται σχεδόν στον ίδιο χώρο με πιο συμπαγή τρόπο, επιφέροντας την πύκνωση του πλέγματος του φιλμ, καθιστώντας το πιο σκληρό και αυξάνοντας την αντοχή του σε θραύση. Επιπλέον, η αύξηση της περιεκτικότητας της χιτοζάνης φαίνεται να επιδρά εντονότερα στην επιμήκυνση κατά τη θραύση των φιλμ που περιέχουν χλωριούχο χολίνη συγκριτικά με εκείνα που περιέχουν βεταΐνη. Η μεγαλύτερη αύξηση της ελαστικότητας παρουσία της χλωριούχου χολίνης, πιθανώς, αιτιολογείται λόγω του μεγαλύτερου όγκου που καταλαμβάνει ως μόριο συγκριτικά με τη βεταΐνη, γεγονός που ωθεί τις αλυσίδες χιτοζάνης να διατάσσονται πιο αραιά.

Μεταξύ των F/ChCl:LA/0.2 και F/ChCl:CA/0.2, το δεύτερο που περιέχει κιτρικό οξύ είναι ελαφρώς λιγότερο σκληρό και ελαστικό. Το κιτρικό οξύ είναι μεγαλύτερο μόριο από το γαλακτικό οξύ και περιέχει και μια διακλάδωση δημιουργώντας πιθανότατα ένα ελαφρώς πιο αραιό πλέγμα. Όμοια, δεδομένου ότι η χλωριούχος χολίνη, περιέχοντας το ανιόν χλωρίου, και η προλίνη, περιέχοντας δακτύλιο, είναι πιο μεγάλα μόρια από τη βεταΐνη, τα φιλμ F/Pro:LA/0.2 και F/ChCl:LA/0.2 είναι λιγότερο ελαστικά και ελαφρώς λιγότερο σκληρά από το F/Bet:LA/0.2. Επίσης, μεταξύ των F/Bet:LA/0.2 και F/Bet:LevA/0.2, το δεύτερο που περιέχει λεβουλνικό οξύ (μεγαλύτερο του γαλακτικού οξέος) είναι σημαντικά λιγότερο ελαστικό. Συνεπώς, η ελαστικότητα των φιλμ με κοινό HBA ή HBD τείνει να μειώνεται όσο αυξάνεται το μέγεθος του μορίου-δότη ή δέκτη δεσμών υδρογόνου του NaDES αντίστοιχα.

Συνολικά, για την ίδια συγκέντρωση πολυμερούς χιτοζάνης υψηλότερη αντοχή σε θραύση παρουσιάζει το F/Bet:LevA/0.2, χαμηλότερη αντοχή σε θραύση το F/Pro:LA/0.2, μεγαλύτερη επιμήκυνση το F/Bet:LA/0.2 και μικρότερη επιμήκυνση το F/ChCl:CA/0.2.

3.5.5. Μέτρηση διαπερατότητας υδρατμών (Water Vapor Permeability, WVP)

Η διαπερατότητα υδρατμών και το ποσοστό μάζας νερού που διαπερνά κάθε φιλμ εντός 24 h παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-12.

Δεν πραγματοποιήθηκε μέτρηση διαπερατότητας στο φιλμ F/Ala:LA/0.2 λόγω του ισχυρά υγροσκοπικού του χαρακτήρα που οδήγησε στην άμεση διάλυσή του.

Πίνακας 3-12: Τιμές διαπερατότητας υδρατμών, ρυθμού μεταφοράς υδρατμών και ποσοστού μάζας υδρατμών που διαπερνούν κάθε φιλμ εντός 24 h

Φιλμ	WVTR ($\cdot 10^{-1} \frac{\text{g}}{\text{m}^2 \cdot \text{min}}$)	WVP ($\cdot 10^{-8} \frac{\text{g}}{\text{m} \cdot \text{min} \cdot \text{Pa}}$)	π _{νερού} %
F/ChCl:LA/0.2	3.0	1.6	2.1
F/Bet:LA/0.2	2.8	1.2	1.6
F/ChCl:LA/0.3	2.6	1.3	1.8
F/Bet:LA/0.3	2.3	1.0	1.3
F/Pro:LA/0.2	4.8	2.7	3.7
F/Bet:LevA/0.2	6.2	3.4	4.0
F/ChCl:CA/0.2	4.9	2.6	3.1

Τα φιλμ NaDES – χιτοζάνης παρουσιάζουν σχετικά υψηλή διαπερατότητα υδρατμών λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα των NaDES, που διευκολύνει την κινητικότητα των υδρατμών μεταξύ των δύο επιφανειών του φιλμ.⁴⁶

Η αύξηση της περιεκτικότητας χιτοζάνης από 0.2 σε 0.3 % w/v στα φιλμ με NaDES ChCl:LA και Bet:LA, οδηγεί σε αναδιάταξη της χωροταξικής δομής των μορίων του φιλμ. Η επιπλέον ποσότητα χιτοζάνης αλληλεπιδρά με τα μόρια του NaDES, πυκνώνοντας το πλέγμα του συστήματος και μειώνοντας τις διόδους μετακίνησης του νερού.

Μεταξύ των φιλμ με γαλακτικό οξύ και ίδια περιεκτικότητα σε χιτοζάνη φαίνεται η διαπερατότητα σε υδρατμούς να αυξάνεται όσο αυξάνεται το μέγεθος του συστατικού που δρα ως δέκτης δεσμών υδρογόνου. Δηλαδή, εκτιμώντας ότι η προλίνη λόγω δακτυλίου είναι πιο ογκώδης από τη χλωριούχο χολίνη, η οποία με τη σειρά της, λόγω του ανιόντος χλωρίου, είναι μεγαλύτερη από τη βεταΐνη, αντίστοιχα, ως προς τη διαπερατότητα παρατηρείται ότι F/Pro:LA/0.2 > F/ChCl:LA/0.2 > F/Bet:LA/0.2.

Αντίστοιχα λόγω μεγαλύτερου μεγέθους του κιτρικού και του λεβουλικού οξέος έναντι του γαλακτικού παρατηρείται η εξής συμπεριφορά διαπερατότητας: F/ChCl:CA/0.2 > F/ChCl:LA/0.2 και F/Bet:LevA/0.2 > F/Bet:LA/0.2. Φαίνεται ότι, όσο πιο ογκώδης είναι η δομή ενός συστατικού του NaDES στο χώρο, τόσο το πλέγμα που προκύπτει μετά την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου χαρακτηρίζεται από αυξημένο κενό όγκο, γεγονός που ευνοεί τη διόδο περισσότερων μορίων νερού.

Επίσης, παρατηρείται πως τα φιλμ F/Pro:LA/0.2 και F/Bet:LevA/0.2 που περιέχουν τα εκχυλίσματα E/Pro:LA και E/Bet:LevA, τα οποία φέρουν το υψηλότερο περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά, 23 και $25 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mg gallic acid eq}}{\text{g WR}}$ αντίστοιχα, παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαπερατότητα σε υδρατμούς. Είναι πιθανό, το υψηλότερο φαινολικό φορτίο, λόγω μεγαλύτερου αριθμού διαθέσιμων υδροξυλομάδων, να συνδέεται με περισσότερες

αλληλεπιδράσεις με μόρια νερού, μέσω ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου, και αυξημένη διέλευση υδρατμών από τη μία επιφάνεια του φιλμ στην άλλη.

3.5.6. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH

Παρατίθενται οι τιμές του δείκτη IC_{50} , που προκύπτουν μέσω της επεξεργασίας που περιγράφεται στην ενότητα 2.9.7., για τα φιλμ F/ChCl:LA/0.2 και F/Pro:LA/0.2 (Πίνακας 3-13) στα 30 min.

Πίνακας 3-13: Αντιοξειδωτική δράση των φιλμ F/ChCl:LA/0.2 και F/Pro:LA/0.2 [IC_{50} (g/L)]

Φιλμ	Ικανότητα δέσμωσης DPPH IC_{50} (g/L)
F/ChCl:LA/0.2	5.9
F/Pro:LA/0.2	4.9

Αρχικά, συγκρίνοντας τα NaDES που περιέχουν τα παραπάνω φιλμ, φαίνεται ότι το Pro:LA, με $IC_{50} = 18$ mL/L, παρουσιάζει αρκετά καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το ChCl:LA, με $IC_{50} = 81$ mL/L. Μεταξύ των αντίστοιχων εκχυλισμάτων, το E/Pro:LA, με $IC_{50} = 12$ mL/L, παρουσιάζει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το E/ChCl:LA, με $IC_{50} = 23$ mL/L. Παρατηρείται, όμως, ότι η απόκλιση της δράσης των εκχυλισμάτων είναι μικρότερη συγκριτικά με την απόκλιση που παρατηρείται μεταξύ των NaDES. Συγκρίνοντας τα φιλμ, παρότι το F/Pro:LA/0.2 παρουσιάζει χαμηλότερο IC_{50} από το F/ChCl:LA/0.2, η διαφορά δεν είναι σημαντική, δηλαδή παρουσιάζουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση.

3.5.7. Προσδιορισμός υγρασίας με λυοφιλίωση

Ο προσδιορισμός έγινε ενδεικτικά σε ένα φιλμ, αμέσως μόλις παρασκευάστηκε προς αποφυγή απορρόφησης υγρασίας.

Μέσω της σχέσης [15], η μάζα της περιεχόμενης υγρασίας στο φιλμ F/ChCl:LA/0.2 ισούται με $m_{υγρασίας} = 0.004$ g, δηλαδή, το ποσοστό υγρασίας του φιλμ είναι

$$[16] \Rightarrow \pi_{υγρασίας} = 3.14 \%$$

Επομένως, η εναπομείνουσα υγρασία στα φιλμ είναι της τάξης του 3 %.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση και χαρακτηρισμός των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES): Χλωριούχος χολίνη : Γαλακτικό οξύ (ChCl:LA), Βεταΐνη : Γαλακτικό οξύ (Bet:LA), Προλίνη : Γαλακτικό οξύ (Pro:LA), Αλανίνη : Γαλακτικό οξύ (Ala:LA), Βεταΐνη : Κιτρικό οξύ : Νερό (Bet:CA:W), Προλίνη : Κιτρικό οξύ : Νερό (Pro:CA:W), Χλωριούχος χολίνη : Κιτρικό οξύ (ChCl:CA) και Βεταΐνη : Λεβουλικό οξύ (Bet:LevA). Στη συνέχεια, τα NaDES χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες εκχύλισης βιοενεργών ενώσεων του αγρίου τριαντάφυλλου (WR) με εφαρμογή υπερήχων (UAE). Τέλος, δημιουργήθηκαν φιλμ των εκχυλισμάτων που παραλήφθηκαν με χρήση της χιτοζάνης ως παράγοντα σταθεροποίησης. Μέσω της μελέτης αυτή εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός των NaDES

- Τα περισσότερα NaDES που παρασκευάζονται με κιτρικό οξύ ως HBD είναι αρκετά ιξώδη και, γι' αυτό, προστίθεται ως τρίτο συστατικό του συστήματος το νερό. Επίσης, συγκριτικά με τα NaDES που περιέχουν λεβουλικό ή γαλακτικό οξύ, τα Bet:CA:W, Pro:CA:W και ChCl:CA απαιτούν για το σχηματισμό τους υψηλότερη θερμοκρασία (70 – 80 °C) και χρόνο θέρμανσης (έως 5 h).
- Τα NaDES Pro:LA και ChCl:CA παρουσιάζουν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, με IC₅₀ = 18 mL/L και 40 mL/L. Συνολικά, όμως, τα NaDES δεν παρουσιάζουν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση. Παρ' όλ' αυτά, τα αποτελέσματα αποτελούν μια ένδειξη της δράσης τους αλλά και μια απόδειξη ότι οι ιδιότητες των NaDES επηρεάζονται από τα επιμέρους συστατικά και την αναλογία μεταξύ τους. Επίσης, τα συστατικά των NaDES αναπτύσσουν μεταξύ τους δεσμούς υδρογόνου και, τελικά, προκύπτει ένα δίκτυο που δύναται να αλληλεπιδράσει με τις ελεύθερες ρίζες με τρόπο διαφορετικό, απ' ότι αν τα επιμέρους συστατικά συνυπήρχαν σε φυσικό μείγμα, γεγονός που επιτρέπει την σύνθεση και χρήση NaDES «ειδικού σκοπού» (tailor-made) με κατάλληλα επιλεγμένες ιδιότητες για την εκάστοτε εφαρμογή.

2. Εκχυλιστική διεργασία και χαρακτηρισμός προϊόντος

- Η εκχύλιση βιοενεργών ενώσεων από την πρώτη ύλη επιβεβαιώνεται και μέσω του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν αρκετά χαμηλότερη τιμή IC₅₀ από τα αντίστοιχα NaDES, γεγονός που αποτελεί σημαντική ένδειξη εκχύλισης ισχυρών αντιοξειδωτικών ενώσεων. Ξεχωρίζουν ως αντιοξειδωτικά το E/ChCl:CA, με IC₅₀ = 5 mL/L, το E/Ala:LA, με IC₅₀ = 7 mL/L και το E/Pro:LA, με IC₅₀ = 12 mL/L.
- Συγκρίνοντας τα φάσματα FT-IR των NaDES με εκείνα των αντίστοιχων εκχυλισμάτων, παρατηρείται η ύπαρξη επιπλέον κορυφών, κοινών για όλα τα εκχυλίσματα, στο εύρος 777 – 541 cm⁻¹, που υποδηλώνουν την ύπαρξη δεσμών C=C που εμφανίζονται σε αρωματικούς δακτυλίους φαινολικών ενώσεων, και στο εύρος 1390 – 1310 cm⁻¹, που υποδηλώνουν δονήσεις κάμψης δεσμών O-H. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί άλλη μια ένδειξη παρουσίας εκχυλίσματος στο διάλυμα που προκύπτει.
- Οι πορτοκαλί αποχρώσεις των εκχυλισμάτων, λόγω εκχύλισης ανθοκυανών που φέρουν τέτοια χρώματα, σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας τους σε ολικά φλαβονοειδή και φαινολικά επιβεβαιώνει, επίσης, την εκχύλιση βιοενεργών ενώσεων.

- Ως προς το περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές, με εξαίρεση τα E/Bet:LA και E/Bet:CA:W, τα οποία παρουσιάζουν μικρότερη περιεκτικότητα.
- Ως προς την εκχύλιση των φαινολικών ουσιών φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο η φύση του μορίου HBA. Μεταξύ των εκχυλισμάτων με ίδιο HBA και κιτρικό ή γαλακτικό οξύ ως HBD παρατηρείται ότι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι παρόμοιο. Μεταξύ, όμως, των εκχυλισμάτων με κοινό HBD, δηλαδή των E/Pro:LA - E/Bet:LA και E/Pro:CA:W - E/Bet: CA:W, το εκχύλισμα που περιέχει προλίνη περιλαμβάνει περίπου τριπλάσια ποσότητα φαινολικών ενώσεων σε κάθε περίπτωση.
- Μεταξύ εκχυλισμάτων με ίδιο HBA και HBD κιτρικό ή γαλακτικό οξύ, το περιεχόμενο των φλαβονοειδών είναι τουλάχιστον διπλάσιο στα εκχυλίσματα με κιτρικό οξύ, γεγονός που αποδίδεται στο μεγαλύτερο μέγεθός του και την ύπαρξη περισσότερων ομάδων υδροξυλίου. Συνεπώς, έχει περισσότερα σημεία διαθέσιμα προς αλληλεπίδραση με μόρια φλαβονοειδών.
- Το υψηλότερο περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή διαθέτει το εκχύλισμα E/Ala:LA.
- Οι φαινολικές ενώσεις, που συναντώνται σε πληθώρα στο άγριο τριαντάφυλλο, τείνουν να υφίστανται ανεπιθύμητες τροποποιήσεις κατά την αποθήκευση ή προσπάθεια ανάκτησης τους με χημικά βίαιες διαδικασίες. Συνεπώς, οι συνθήκες ανάκτησης αλλά και αποθήκευσης των βιοδραστικών εκχυλισμάτων είναι σημαντικές για τη διατήρηση των επιθυμητών ιδιοτήτων τους. Τα NaDES δημιουργούν ένα ιδιαίτερο χημικό περιβάλλον και τείνουν να προστατεύουν τα συστατικά τους, μέσω δικτύου δεσμών υδρογόνου και άλλων αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται. Αυτή η συμπεριφορά οδηγεί στην αξιοποίηση των NaDES τόσο ως διαλύτες όσο και ως μέσο αποθήκευσης των εκχυλισμάτων για μακρά χρονικά διαστήματα. Εφόσον λοιπόν τα συστατικά των NaDES είναι συμβατά με φαρμακευτικά σκευάσματα, αλλά αποτελούν και τα ίδια δραστικά συστατικά, ο μη – διαχωρισμός τους και η απευθείας ένταξή τους σε καλλυντικό ή φαρμακευτικό σκεύασμα, όπως το φιλμ, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία.

3. Παρασκευή φιλμ

- Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι στα NaDES που περιέχουν γαλακτικό οξύ, η διαλυτότητα της χιτοζάνης είναι μεγαλύτερη από ότι σε αυτά που περιέχουν κιτρικό οξύ, παρότι τα υδατικά διαλύματα τους με περιεκτικότητα 1 % v/v σε εκχύλισμα εμφανίζουν παρόμοιες τιμές pH. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διαλυτότητα της χιτοζάνης δεν εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από το pH του διαλύματος (το οποίο πρέπει να είναι χαμηλό ώστε να πρωτονιώνονται οι αμινομάδες της χιτοζάνης και να σχηματίζονται τα αντίστοιχα άλατα που είναι υδατοδιαλυτά) αλλά και από τα δομικά χαρακτηριστικά των συστατικών του και τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με την πολυμερική αλυσίδα της χιτοζάνης.
- Το φιλμ F/Ala:LA έχει πολύ υγροσκοπικό χαρακτήρα, καθώς, είτε απορροφά μόρια νερού, αμέσως, μόλις έρθει σε επαφή με την ατμόσφαιρα, είτε κάποια μόρια νερού δεν εξατμίζονται και παραμένουν εντός τους συστήματος του φιλμ. Συνεπώς, δεν είναι δυνατή η ανάλυση του ως προς τη σκληρότητα και τη διαπερατότητα σε υδρατμούς, δηλαδή, δεν είναι δυνατή η περαιτέρω αξιοποίησή του.
- Όλα τα παραγόμενα φιλμ χαρακτηρίζονται από χαμηλότερη φωτεινότητα σε σχέση με τη λευκό δείγμα και από ολική διαφορά χρώματος της τάξης του 40 – 60, που

αποδίδεται τόσο στη χιτοζάνη και στα NaDES όσο και στις χρωμοφόρες ενώσεις που έχουν εκχυλιστεί από το άγριο τριαντάφυλλο.

- Η σκληρότητα των φιλμ αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση του περιεχομένου τους σε χιτοζάνη, λόγω πύκνωσης του πλέγματος του φιλμ και αύξησης της αντοχής σε θραύση. Μεταξύ των φιλμ με ίση περιεκτικότητα σε χιτοζάνη πιο σκληρό είναι το F/Bet:LevA/0.2 και λιγότερο σκληρό το F/Pro:LA/0.2. Τα φιλμ που περιλαμβάνουν βεταΐνη χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο μήκος επιμήκυνσης κατά τη θραύση, δηλαδή από υψηλότερη ελαστικότητα.
- Μεταξύ φιλμ που περιέχουν NaDES με ίδιο HBA (ή HBD) υψηλότερη ελαστικότητα παρουσιάζει εκείνο που αποτελείται από το μικρότερο μόριο HBD (ή HBA).
- Τα φιλμ NaDES – χιτοζάνης παρουσιάζουν σχετικά υψηλή διαπερατότητα υδρατμών λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα των NaDES, που διευκολύνει την κινητικότητα των υδρατμών μεταξύ των δύο επιφανειών του φιλμ.⁴⁶ Παρατηρείται ότι αύξηση της περιεκτικότητας χιτοζάνης οδηγεί σε ανάλογη μείωση της διαπερατότητας των φιλμ, καθώς, η επιπλέον ποσότητα χιτοζάνης αλληλεπιδρά με τα μόρια του NaDES, πυκνώνοντας το πλέγμα του συστήματος και μειώνοντας τις διόδους μετακίνησης του νερού, και με μόρια νερού, δεσμευοντάς τα.
- Ανάμεσα σε φιλμ με ίδιο HBD ή ίδιο HBA υψηλότερη διαπερατότητα παρουσιάζει εκείνο με το μεγαλύτερο σε όγκο μόριο HBA ή HBD, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, όσο πιο ογκώδης είναι η δομή ενός συστατικού του NaDES στο χώρο, τόσο υψηλότερη στερεοχημική παρεμπόδιση παρουσιάζει κατά την αλληλεπίδραση του με το δεύτερο (και τρίτο συστατικό) του. Ως αποτέλεσμα, το πλέγμα που προκύπτει μετά την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου χαρακτηρίζεται από αυξημένο κενό όγκο, γεγονός που ευνοεί τη δίοδο περισσότερων μορίων νερού.
- Στόχος ενός ιδανικού επίδεσμου επούλωσης πληγών είναι ο έλεγχος της απώλειας υδρατμών από μια πληγή με βέλτιστο ρυθμό, WVTR. Σε κανονικό δέρμα ο ρυθμός αυτός ισούται με $1.4 \cdot 10^{-1} \frac{\text{g}}{\text{m}^2 \cdot \text{min}}$ ενώ σε τραυματισμένο δέρμα κινείται στο εύρος $1.9 \cdot 10^{-1} \frac{\text{g}}{\text{m}^2 \cdot \text{min}}$, για έγκαιρα πρώτου βαθμού, έως $35.7 \cdot 10^{-1} \frac{\text{g}}{\text{m}^2 \cdot \text{min}}$, για υπερτροφικό κοκκώδη ιστό. Η διαπερατότητα ενός επίδεσμου σε υδρατμούς θα πρέπει να αποτρέπει τόσο την έντονη αφυδάτωση όσο και την ανάπτυξη εξιδρώματος. Θεωρείται ότι ένας ρυθμός της τάξης των $17.4 \cdot 10^{-1} \frac{\text{g}}{\text{m}^2 \cdot \text{min}}$, ενδιάμεση τιμή του παραπάνω εύρους, παρέχει επαρκή υγρασία χωρίς κίνδυνο αφυδάτωσης.⁵⁶ Συγκρίνοντας τις τιμές αυτές με τις πειραματικές τιμές WVTR που προέκυψαν, φαίνεται πως όλα τα φιλμ εντάσσονται εντός του επιθυμητού εύρους πλησίον του κατώτερου ορίου. Επίσης, η υψηλή ελαστικότητά τους θα επέτρεπε τη φυσική κίνηση του σώματος. Συνεκτιμώντας ότι η χιτοζάνη χαρακτηρίζεται από αιμοστατική και αντιμικροβιακή δράση, τα φιλμ που παρασκευάστηκαν μπορούν να αξιοποιηθούν για την επούλωση πληγών, όπως εγκαύματα πρώτου βαθμού. Μελλοντική διερεύνηση της παραμέτρου WVTR συγκριτικά με την περιεκτικότητα των φιλμ σε εκχύλισμα και χιτοζάνη πιθανώς να διευρύνει την εφαρμογή τους και σε άλλα είδη πληγών με υψηλότερες απαιτήσεις σε WVTR.
- Η ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων εντός της μήτρας των φιλμ επιβεβαιώνεται από την εμφάνιση αντιοξειδωτικής δράσης στα εξεταζόμενα φιλμ. Καθώς οι μονάδες μέτρησης του IC₅₀ διαφέρουν με τις αντίστοιχες των εκχυλισμάτων, δεν μπορεί να γίνει κάποια σύγκριση.

- Η περιεχόμενη υγρασία των φιλμ είναι της τάξης του 3 %, γεγονός που αποδεικνύει ότι κατά την απομάκρυνση των κρυσταλλωτηρίων από το υδατόλουτρο το νερό έχει εξατμιστεί. Η εναπομείνουσα ποσότητα μπορεί να σχετίζεται με μόρια νερού που έχουν ενσωματωθεί στο πλέγμα του φιλμ και δε δύνανται να εξατμιστούν.

5. Προτάσεις μελλοντικής έρευνας

Η παρούσα μελέτη προσέφερε κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά τη σύνθεση διαφόρων NaDES, την αξιοποίησή τους στην εκχύλιση βιοενεργών ενώσεων από το άγριο τριαντάφυλλο υποβοηθούμενη από υπερήχους και, τελικά, το σχηματισμό βιοσυμβατών φιλμ φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών με ενσωματωμένα τα εκχυλίσματα. Πρόκειται, ωστόσο, για μια μελέτη με μεγάλες προοπτικές συνέχισης, καθώς αποτελεί ένα σχετικά καινούργιο πεδίο έρευνας με λίγες ολοκληρωμένες έρευνες και βιβλιογραφικές αναφορές και πραγματοποιήθηκε εν μέσω παγκόσμιας πανδημίας, γεγονός που περιόρισε την πρόσβαση σε απαιτούμενο εξοπλισμό και περαιτέρω αναλύσεις. Προτείνονται λοιπόν παρακάτω κάποιες δυνατότητες συνέχισης και εξέλιξης της έρευνας στον τομέα αυτό.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η μελέτη της επίδρασης της δομής των NaDES στο λαμβανόμενο εκχύλισμα. Συγκεκριμένα, με τη διεξαγωγή θερμοσταθμικών αναλύσεων θα μπορούσε να διερευνηθεί η θερμοκρασία διάσπασής τους, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αποδόμησης και παραγωγής παραπροϊόντων κατά την εκχύλιση. Δηλαδή, μια σειρά τέτοιων αναλύσεων μπορεί να ενισχύσει την πεποίθηση πως η καινοτομία που φέρουν ως διαλύτες είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως μήτρες αποθήκευσης βιοενεργών ενώσεων χωρίς την ανάγκη διαχωρισμού τους και με επιπλέον, πιθανόν, δράση. Επίσης, η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, ^1H NMR, θα έδινε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα ως προς τον τρόπο που αλληλεπιδρούν τα επιμέρους συστατικά των NaDES μεταξύ τους, και συνεπώς, θα ήταν δυνατή η αιτιολόγηση του τρόπου αλληλεπίδρασης των NaDES τόσο με τις βιοενεργές ενώσεις του αγρίου τριαντάφυλλου όσο και με τη χιτοζάνη.

Μέρος της μελέτης ήταν και η παραλαβή εκχυλισμάτων με επιθυμητές ιδιότητες ώστε να ενσωματωθούν σε συστήματα φιλμ. Χρήσιμη θα ήταν, λοιπόν, και η πλήρης ταυτοποίηση του φυτοχημικού προφίλ των παραλαμβανόμενων εκχυλισμάτων με χρωματογραφική μέθοδο, για παράδειγμα HPLC. Μέσω της διαδικασίας αυτής θα ήταν δυνατή η επαλήθευση των αποτελεσμάτων μέτρησης ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών, καθώς, και η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το είδος των ενώσεων που τείνουν να αλληλεπιδράσουν περισσότερο με κάθε NaDES. Ακόμα, ενδιαφέρουσα θα ήταν και η διερεύνηση εναλλακτικών μεθόδων μέτρησης ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών για τα εκχυλίσματα εκείνα που οι παραπάνω μέθοδοι προσδιορισμού δεν ήταν συμβατές, λόγω σχηματισμού ιζήματος.

Εφοσόν, τα παραγόμενα βιοσυμβατά φιλμ παρουσιάζουν πολύ καλή διαπερατότητα υδρατμών και ρυθμό διάδοσης υδρατμών αποδεκτό βάσει των επιθυμητών προδιαγραφών των επιδέσμων που αξιοποιούνται στην επούλωση πληγών, αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω η συμπεριφορά των φιλμ ως προς αυτή την παράμετρο. Πιθανότητα, θα ήταν πολύ ωφέλιμη

η διεξαγωγή πειραματικού σχεδιασμού με παράμετρο ελέγχου το ρυθμό διάδοσης ατμού νερού, WVTR, και μεταβλητές παραμέτρους την περιεκτικότητα σε εκχύλισμα φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη, την περιεκτικότητα χιτοζάνης και τη θερμοκρασία σχηματισμού του φιλμ. Μέσα από την ανάλυση αυτή θα είναι δυνατή η εξαγωγή ενός μαθηματικού εργαλείου από το οποίο, ανάλογα με το είδος του τραύματος, ή την εκάστοτε εφαρμογή αξιοποίησης του φιλμ, θα λαμβάνονται οι αναγκαίες συνθήκες σχηματισμού του φιλμ. Στα πλαίσια διερεύνησης των χαρακτηριστικών των φιλμ για δερματική χρήση, μια ανάλυση αντιμικροβιακής δράσης, εξαιτίας τόσο της παρουσίας εκχυλισμάτων όσο και χιτοζάνης, θα έκανε πιο σφαιρικό το προφίλ των φιλμ.

6. Βιβλιογραφία

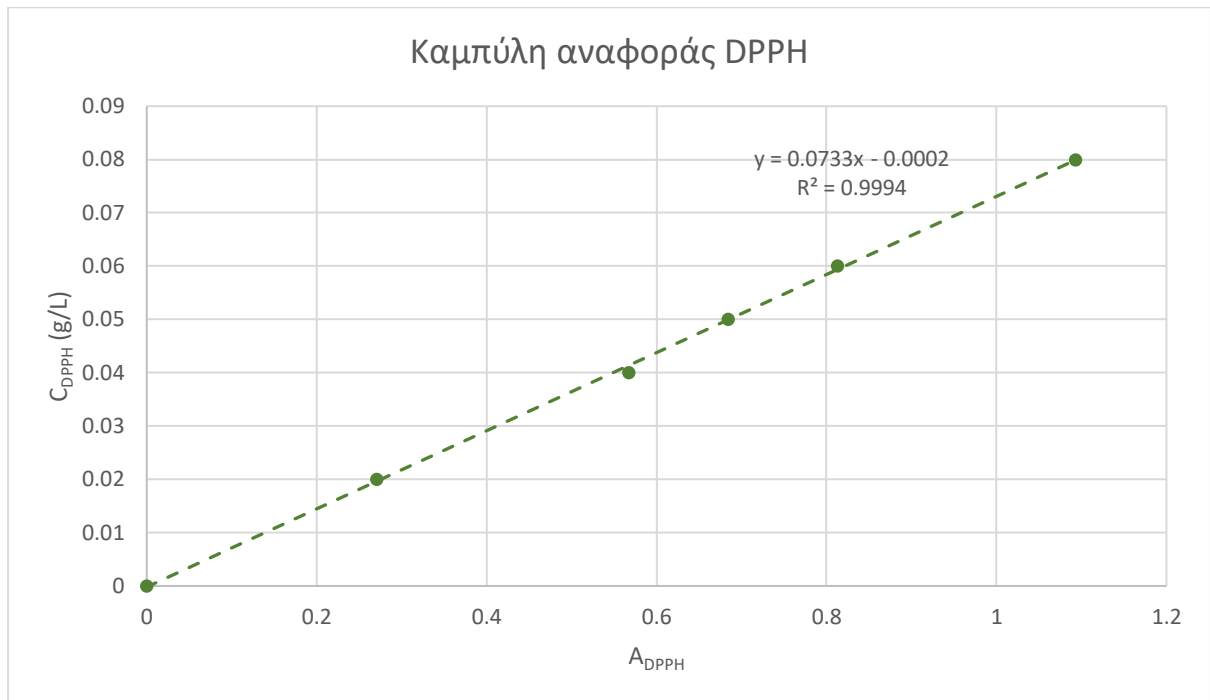
- (1) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (1), 301–312. <https://doi.org/10.1039/b918763b>.
- (2) Erythropel, H. C.; Zimmerman, J. B.; De Winter, T. M.; Petitjean, L.; Melnikov, F.; Lam, C. H.; Lounsbury, A. W.; Mellor, K. E.; Janković, N. Z.; Tu, Q.; Pincus, L. N.; Falinski, M. M.; Shi, W.; Coish, P.; Plata, D. L.; Anastas, P. T. The Green ChemisTREE: 20 Years after Taking Root with the 12 Principles. *Green Chem.* **2018**, *20* (9), 1929–1961. <https://doi.org/10.1039/c8gc00482j>.
- (3) Tang, B.; Zhang, H.; Row, K. H. Application of Deep Eutectic Solvents in the Extraction and Separation of Target Compounds from Various Samples. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38* (6), 1053–1064. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401347>.
- (4) Wei, Z.; Qi, X.; Li, T.; Luo, M.; Wang, W.; Zu, Y.; Fu, Y. Application of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction and Determination of Phenolics in *Cajanus Cajan* Leaves by Ultra Performance Liquid Chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *149*, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.05.015>.
- (5) Laguerre, M.; Lavaud, A. The Rise of Deep Eutectics from Nature to Cosmetics. *Naturex* **2016**, 45–47.
- (6) González, C. G.; Mustafa, N. R.; Wilson, E. G.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Application of Natural Deep Eutectic Solvents for the “Green” Extraction of Vanillin from Vanilla Pods. *Flavour Fragr. J.* **2018**, *33* (1), 91–96. <https://doi.org/10.1002/ffj.3425>.
- (7) Choi, Y. H.; van Spronsen, J.; Dai, Y.; Verberne, M.; Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Witkamp, G. J.; Verpoorte, R. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiol.* **2011**, *156* (4), 1701–1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>.
- (8) Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G. J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *766*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.
- (9) Zainal-Abidin, M. H.; Hayyan, M.; Hayyan, A.; Jayakumar, N. S. New Horizons in the Extraction of Bioactive Compounds Using Deep Eutectic Solvents: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *979*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.012>.
- (10) Wen, Q.; Chen, J. X.; Tang, Y. L.; Wang, J.; Yang, Z. Assessing the Toxicity and Biodegradability of Deep Eutectic Solvents. *Chemosphere* **2015**, *132*, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.061>.
- (11) Radošević, K.; Cvjetko Bubalo, M.; Gaurina Srček, V.; Grgas, D.; Landeka Dragičević, T.; Redovniković, R. I. Evaluation of Toxicity and Biodegradability of Choline Chloride Based Deep Eutectic Solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *112*, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>.
- (12) Yang, Z. Toxicity and Biodegradability of Deep Eutectic Solvents and Natural Deep Eutectic Solvents. *Deep Eutectic Solvents* **2019**, 43–60. <https://doi.org/10.1002/9783527818488.ch3>.
- (13) Nam, M. W.; Zhao, J.; Lee, M. S.; Jeong, J. H.; Lee, J. Enhanced Extraction of Bioactive Natural Products Using Tailor-Made Deep Eutectic Solvents: Application to Flavonoid Extraction from *Flos Sophorae*. *Green Chem.* **2015**, *17* (3), 1718–1727. <https://doi.org/10.1039/c4gc01556h>.
- (14) Tang, B.; Row, K. H. Recent Developments in Deep Eutectic Solvents in Chemical

- Sciences. *Monatshefte für Chemie* **2013**, *144* (10), 1427–1454. <https://doi.org/10.1007/s00706-013-1050-3>.
- (15) Pawar, P. M.; Jarag, K. J.; Shankarling, G. S. Environmentally Benign and Energy Efficient Methodology for Condensation: An Interesting Facet to the Classical Perkin Reaction. *Green Chem.* **2011**, *13* (8), 2130–2134. <https://doi.org/10.1039/c0gc00712a>.
- (16) Zhao, Z.; Chen, X.; Ali, M. F.; Abdeltawab, A. A.; Yakout, S. M.; Yu, G. Pretreatment of Wheat Straw Using Basic Ethanolamine-Based Deep Eutectic Solvents for Improving Enzymatic Hydrolysis. *Bioresour. Technol.* **2018**, *263* (May), 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.016>.
- (17) Craveiro, R.; Meneses, L.; Durazzo, L.; Rocha, Â.; Silva, J. M.; Reis, R. L.; Barreiros, S.; Duarte, A. R. C.; Paiva, A. Deep Eutectic Solvents for Enzymatic Esterification of Racemic Menthol. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7* (24), 19943–19950. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05434>.
- (18) Owczarek, K.; Szczepanska, N.; Plotka-Wasyłka, J.; Rutkowska, M.; Shyshchak, O.; Bratychak, M.; Namiesnik, J. Natural Deep Eutectic Solvents in Extraction Process. *Chem. Chem. Technol.* **2016**, *10* (4s), 601–606. <https://doi.org/10.23939/chcht10.04si.601>.
- (19) Jeong, K. M.; Ko, J.; Zhao, J.; Jin, Y.; Yoo, D. E.; Han, S. Y.; Lee, J. Multi-Functioning Deep Eutectic Solvents as Extraction and Storage Media for Bioactive Natural Products That Are Readily Applicable to Cosmetic Products. *J. Clean. Prod.* **2017**, *151*, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038>.
- (20) Koutsoukos, S.; Tsiaka, T.; Tzani, A.; Zoumpoulakis, P.; Detsi, A. Choline Chloride and Tartaric Acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the Efficient Extraction of Phenolic and Carotenoid Compounds. *J. Clean. Prod.* **2019**, *241*, 118384. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118384>.
- (21) Dai, J.; Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15* (10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
- (22) Cunha, S. C.; Fernandes, J. O. Extraction Techniques with Deep Eutectic Solvents. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2018**, *105*, 225–239. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>.
- (23) Samaram, S.; Mirhosseini, H.; Tan, C. P.; Ghazali, H. M. Ultrasound-Assisted Extraction and Solvent Extraction of Papaya Seed Oil: Crystallization and Thermal Behavior, Saturation Degree, Color and Oxidative Stability. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *52*, 702–708. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.047>.
- (24) Rostagno, M. A.; Palma, M.; Barroso, C. G. Ultrasound-Assisted Extraction of Soy Isoflavones. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1012* (2), 119–128. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01184-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01184-1).
- (25) Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A. K. M. Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. *J. Food Eng.* **2013**, *117* (4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.
- (26) Winther, K.; Campbell-Tofte, J.; Vinther Hansen, A. S. Bioactive Ingredients of Rose Hips (*Rosa Canina* L) with Special Reference to Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties: In Vitro Studies. *Bot. Targets Ther.* **2016**, *6*, 11–23. <https://doi.org/10.2147/btat.s91385>.
- (27) Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: An Overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*, 1–15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.

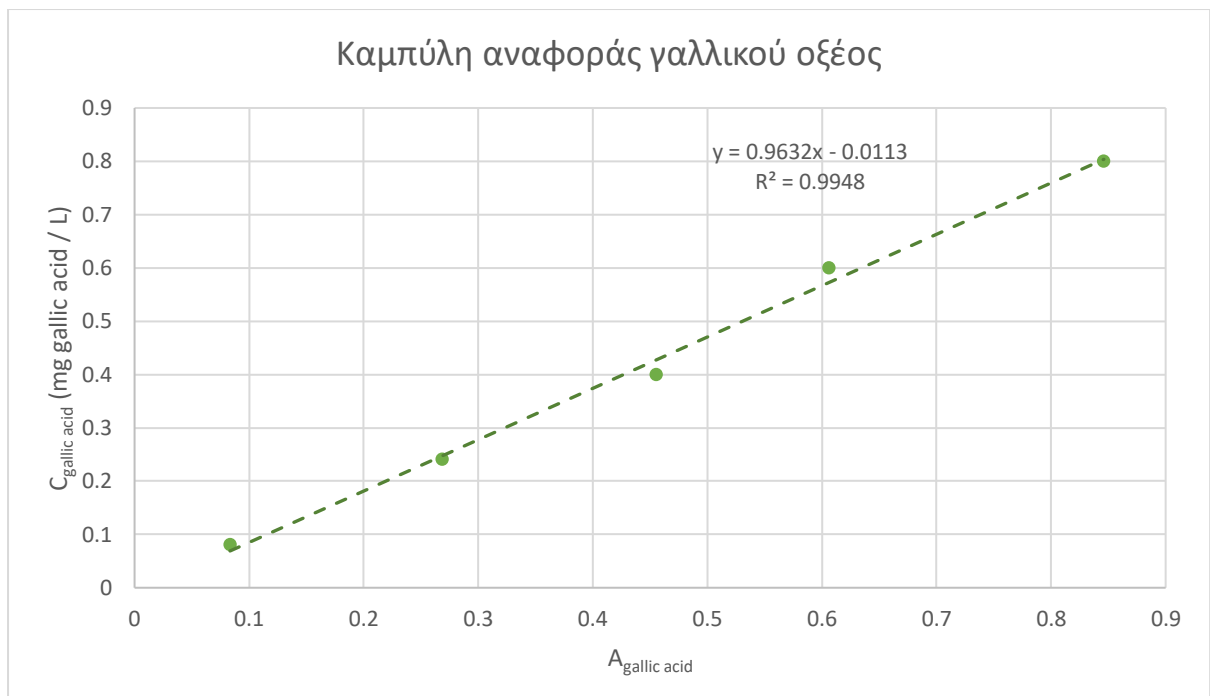
- (28) Roman, I.; Stănilă, A.; Stănilă, S. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Rosa Canina L. Biotypes from Spontaneous Flora of Transylvania. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-73>.
- (29) Jiménez, S.; Gascón, S.; Luquin, A.; Laguna, M.; Ancin-Azpilicueta, C.; Rodríguez-Yoldi, M. J. Rosa Canina Extracts Have Antiproliferative and Antioxidant Effects on Caco-2 Human Colon Cancer. *PLoS One* **2016**, *11* (7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159136>.
- (30) Ταούκης, Π.; Τζιά, Κ.; Ωραιοπούλου, Β. *Χημεία, Μικροβιολογία Και Αρχές Συντήρησης Τροφίμων*; Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο: Αθήνα, 2020.
- (31) Molyneux P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) for Estimating Anti-Oxidant Activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2004**, *26* (May), 211–219.
- (32) De Riek, J.; De Cock, K.; Smulders, M. J. M.; Nybom, H. AFLP-Based Population Structure Analysis as a Means to Validate the Complex Taxonomy of Dogroses (Rosa Section Caninae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2013**, *67* (3), 547–559. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.02.024>.
- (33) Bhave, A.; Schulzova, V.; Chmelarova, H.; Mrnka, L.; Hajslova, J. Assessment of Rosehips Based on the Content of Their Biologically Active Compounds. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25* (3), 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.019>.
- (34) Bilir, N. Fertility Variation in Wild Rose (Rosa Canina) over Habitat Classes. *Int. J. Agric. Biol.* **2011**, *13* (1), 110–114.
- (35) Curran, K. Wild rose hips, an attractive source of vitamins for Native Americans. <http://www.ethnoherbalist.com/southern-california-native-plants-medicinal/wild-rose-hips/> (accessed Aug 15, 2020).
- (36) Paunović, D.; Kalušević, A.; Petrović, T.; Urošević, T.; Djinović, D.; Nedović, V.; Popović-Djordjević, J. Assessment of Chemical and Antioxidant Properties of Fresh and Dried Rosehip (Rosa Canina L.). *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2019**, *47* (1), 108–113. <https://doi.org/10.15835/nbha47111221>.
- (37) Mármol, I.; Sánchez-De-Diego, C.; Jiménez-Moreno, N.; Ancin-Azpilicueta, C.; Rodríguez-Yoldi, M. Therapeutic Applications of Rose Hips from Different Rosa Species. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (6), 1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms18061137>.
- (38) Siripatrawan, U. Active Food Packaging from Chitosan Incorporated with Plant Polyphenols. *Nov. Approaches Nanotechnol. Food* **2016**, 465–507. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804308-0.00014-5>.
- (39) Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- (40) Kurita, K. Controlled Functionalization of the Polysaccharide Chitin. *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26* (9), 1921–1971. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00007-7).
- (41) Xu, Y. X.; Kim, K. M.; Hanna, M. A.; Nag, D. Chitosan-Starch Composite Film: Preparation and Characterization. *Ind. Crops Prod.* **2005**, *21* (2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.03.002>.
- (42) Peng, Y.; Wu, Y.; Li, Y. Development of Tea Extracts and Chitosan Composite Films for Active Packaging Materials. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *59*, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.019>.
- (43) Siripatrawan, U.; Vitchayakitti, W. Improving Functional Properties of Chitosan Films as Active Food Packaging by Incorporating with Propolis. *Food Hydrocoll.* **2016**, *61*, 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001>.

- (44) Siripatrawan, U.; Harte, B. R. Physical Properties and Antioxidant Activity of an Active Film from Chitosan Incorporated with Green Tea Extract. *Food Hydrocoll.* **2010**, *24* (8), 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.003>.
- (45) Altiok, D.; Altiok, E.; Tihminioglu, F. Physical, Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Thyme Oil for Potential Wound Healing Applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21* (7), 2227–2236. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4065-x>.
- (46) Jakubowska, E.; Gierszewska, M.; Nowaczyk, J.; Olewnik-Kruszkowska, E. Physicochemical and Storage Properties of Chitosan-Based Films Plasticized with Deep Eutectic Solvent. *Food Hydrocoll.* **2020**, *108* (May), 106007. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106007>.
- (47) Παπαϊωάννου, Ά. Ανάπτυξη Πράσινης Διεργασίας Για Την Εκχύλιση Άγριου Τριαντάφυλλου Με Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες, Διπλωματική Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2019.
- (48) Cuvelier, M. E.; Berset, C. 4A Standard Calibration Techniques. *Microflow E-b.* **1995**, *28*, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- (49) Waterman, P. G.; Mole, S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites; Blackwell, 1994.
- (50) MERCK. IR Spectrum Table & Chart <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html> (accessed Sep 10, 2020).
- (51) Krisanti, E. A.; Saputra, K.; Arif, M. M.; Mulia, K. Formulation and Characterization of Betaine-Based Deep Eutectic Solvent for Extraction Phenolic Compound from Spent Coffee Grounds. *AIP Conf. Proc.* **2019**, *2175*. <https://doi.org/10.1063/1.5134604>.
- (52) PubChem. Lactic acid <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/612> (accessed Sep 13, 2020).
- (53) PubChem. Citric acid <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/311> (accessed Sep 13, 2020).
- (54) PubChem. Levulinic acid <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levulinic-acid> (accessed Sep 13, 2020).
- (55) Chen, P., Lai, Y., Kuo, T., Liu, F. Improvement in the Properties of Chitosan Membranes Using Natural Organic Acid Solutions as Solvents for Chitosan Dissolution. *J. Med. Biol. Eng.* **2007**, *27* (1), 23–28.
- (56) Wu, Y. B.; Yu, S. H.; Mi, F. L.; Wu, C. W.; Shyu, S. S.; Peng, C. K.; Chao, A. C. Preparation and Characterization on Mechanical and Antibacterial Properties of Chitsoan/Cellulose Blends. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *57* (4), 435–440. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.05.013>.

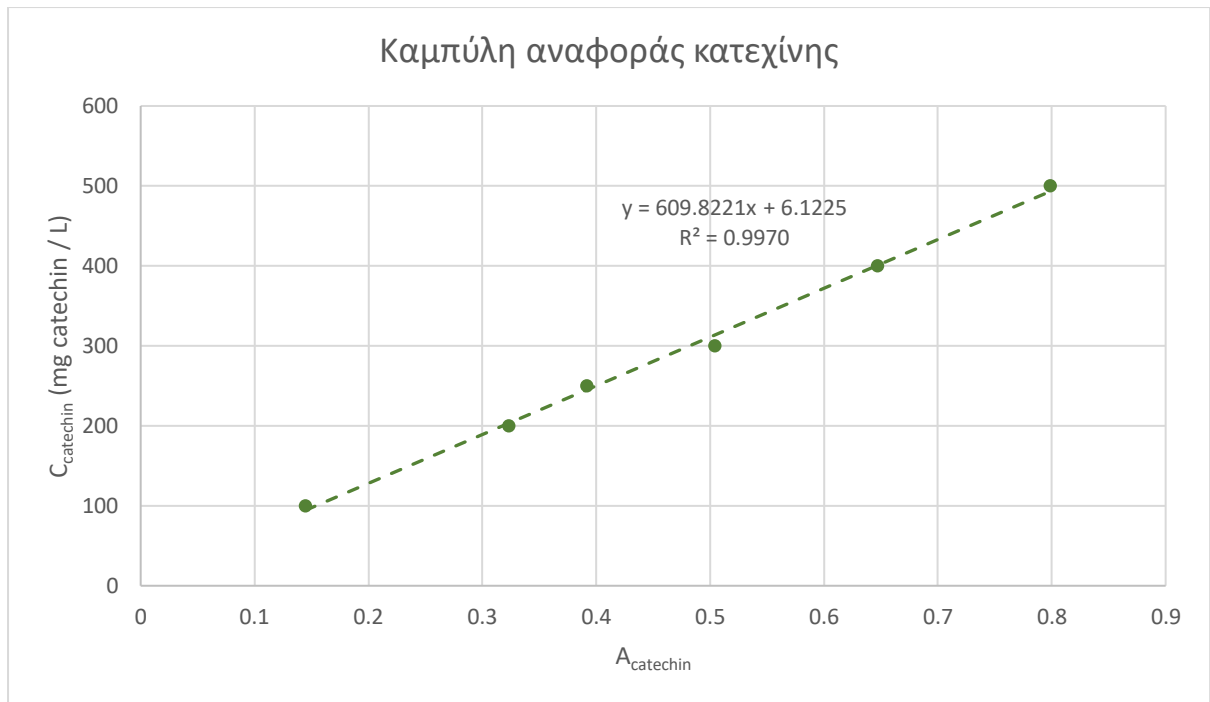
7. Παράρτημα



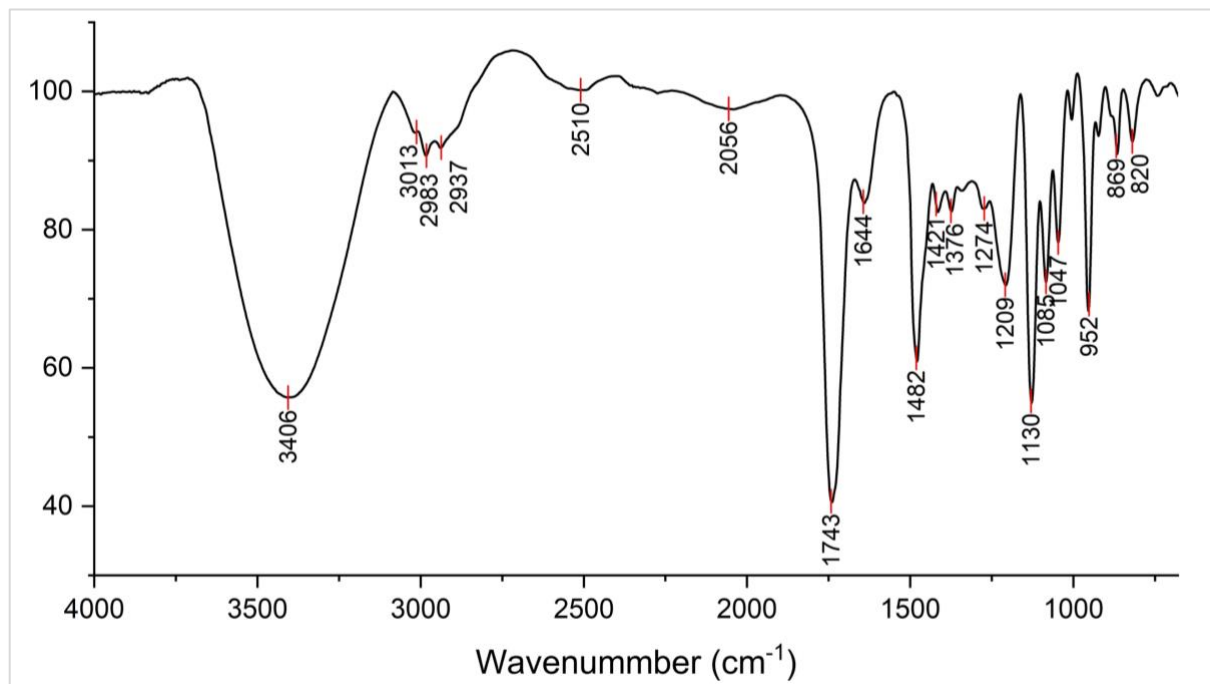
Γράφημα 7-1: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης DPPH



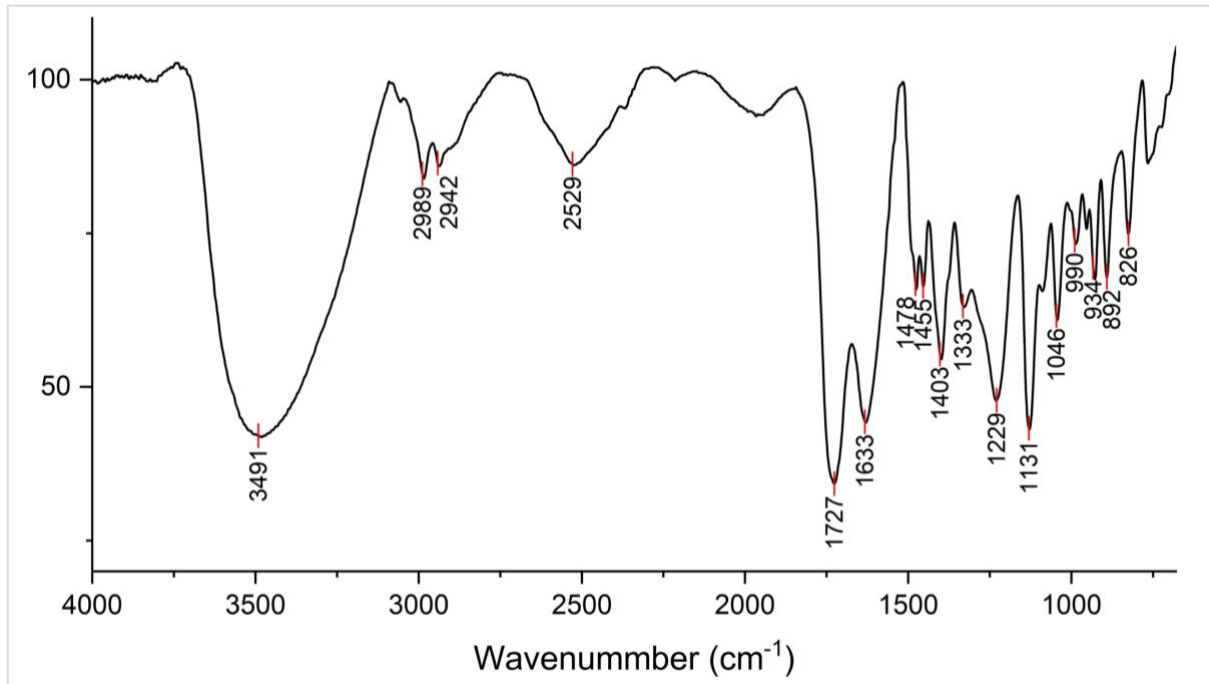
Γράφημα 7-2: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης γαλλικού οξέος



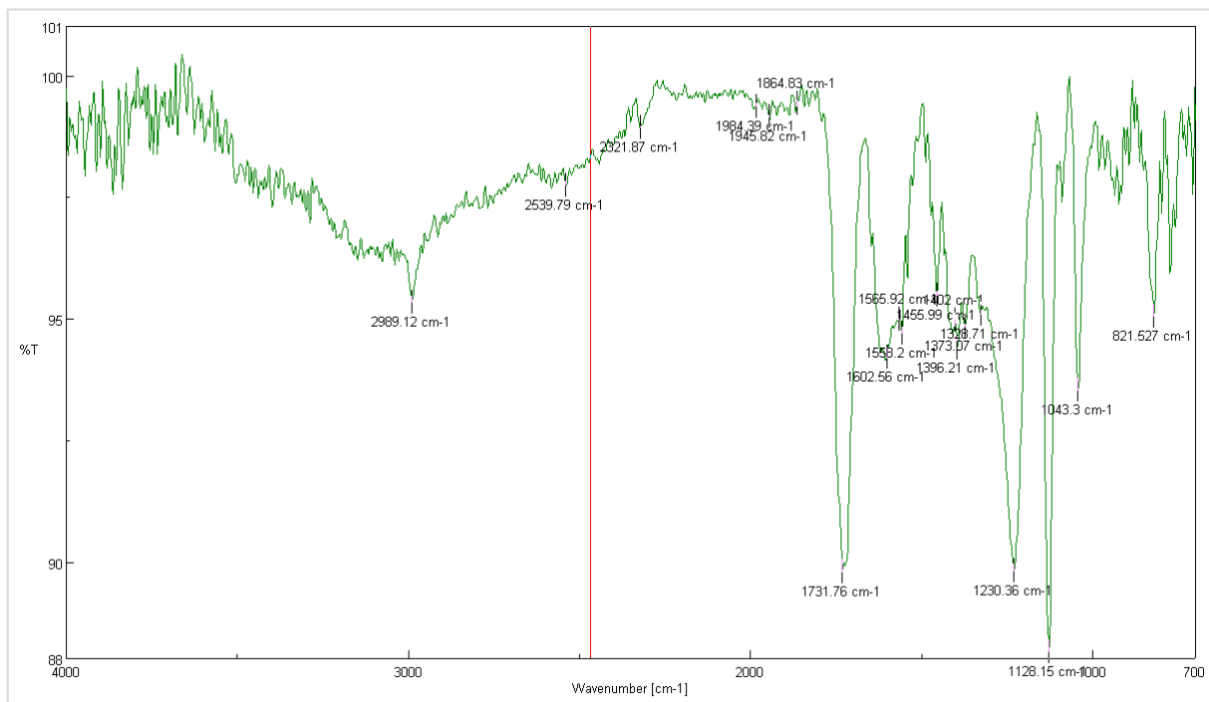
Γράφημα 7-3: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης κατεχίνης



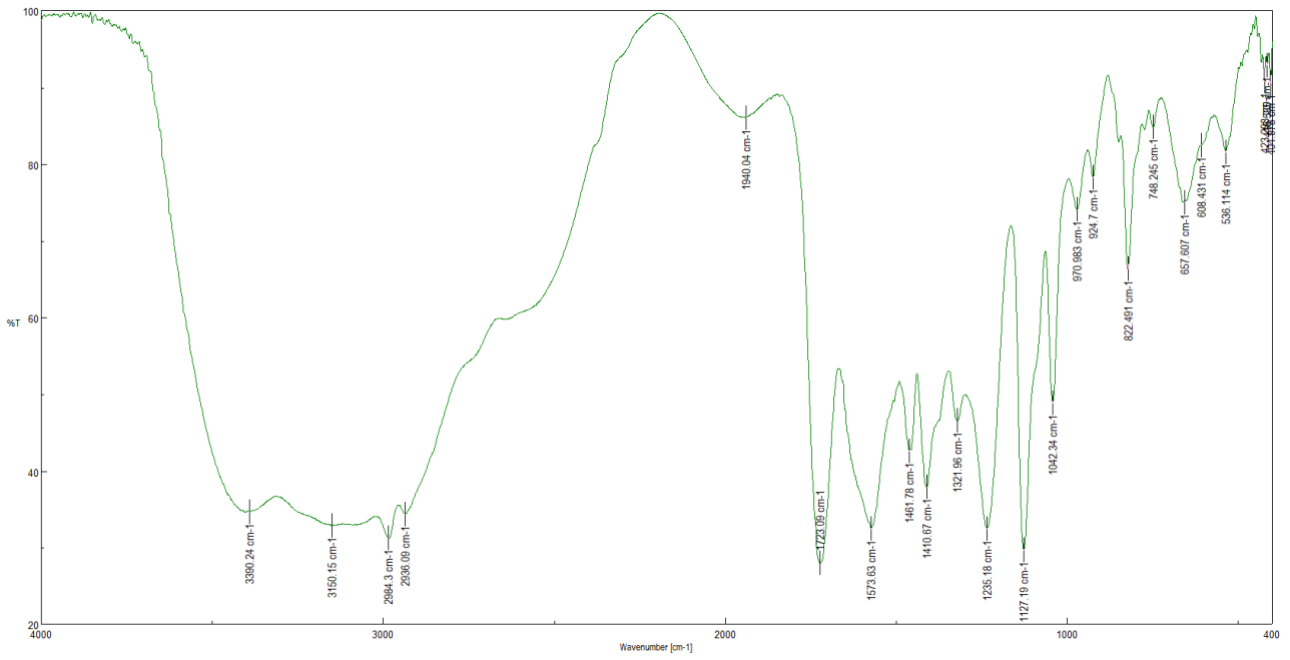
Γράφημα 7-4: Φάσμα FT-IR του NaDES ChCl:LA



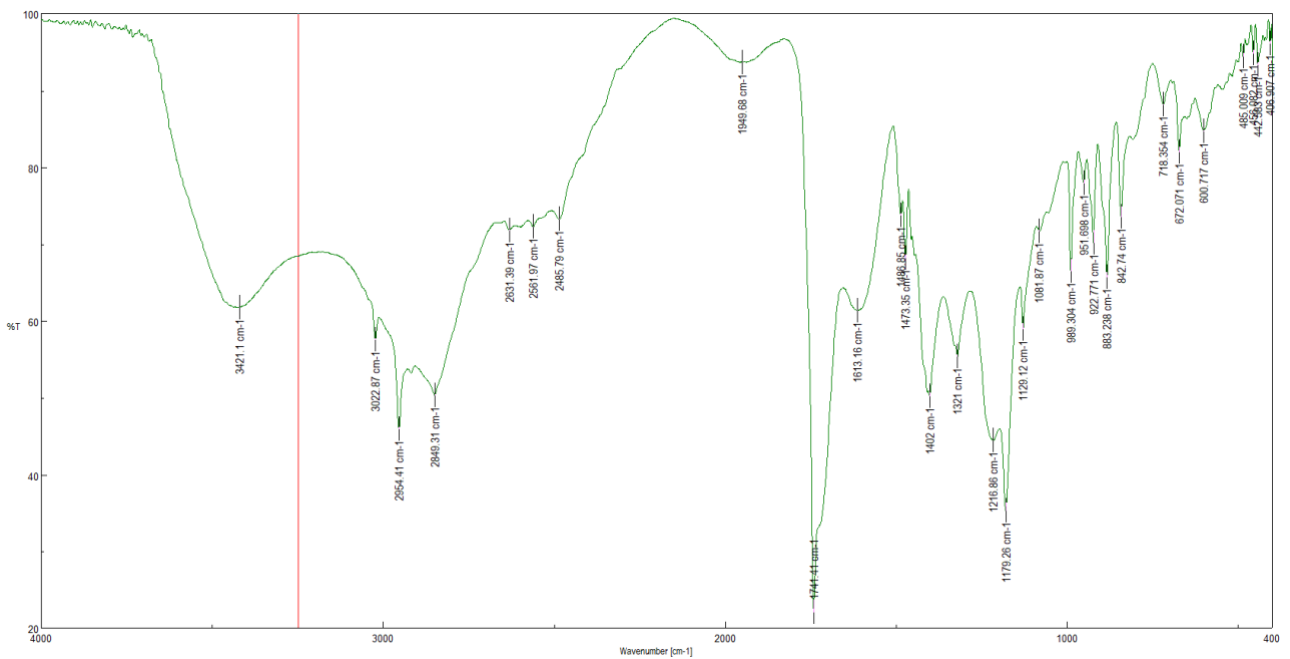
Γράφημα 7-5: Φάσμα FT-IR του NaDES Bet:LA



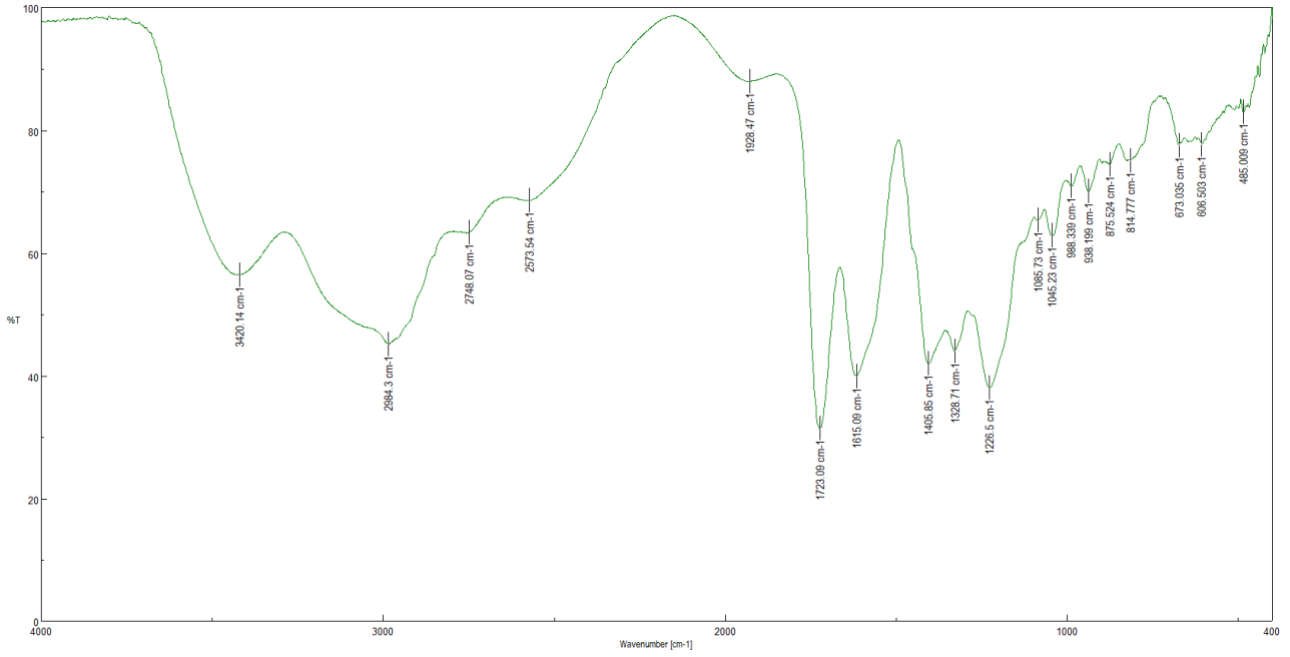
Γράφημα 7-6: Φάσμα FT-IR του NaDES Pro:LA



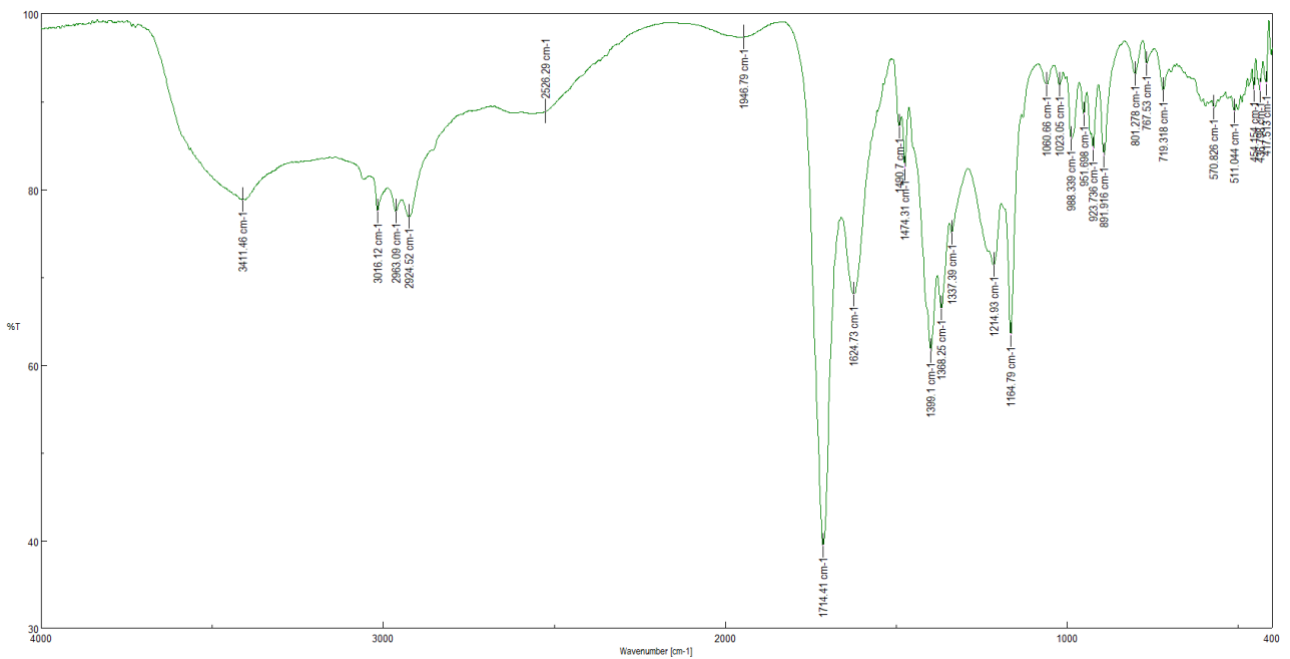
Γράφημα 7-7: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/AIa:LA



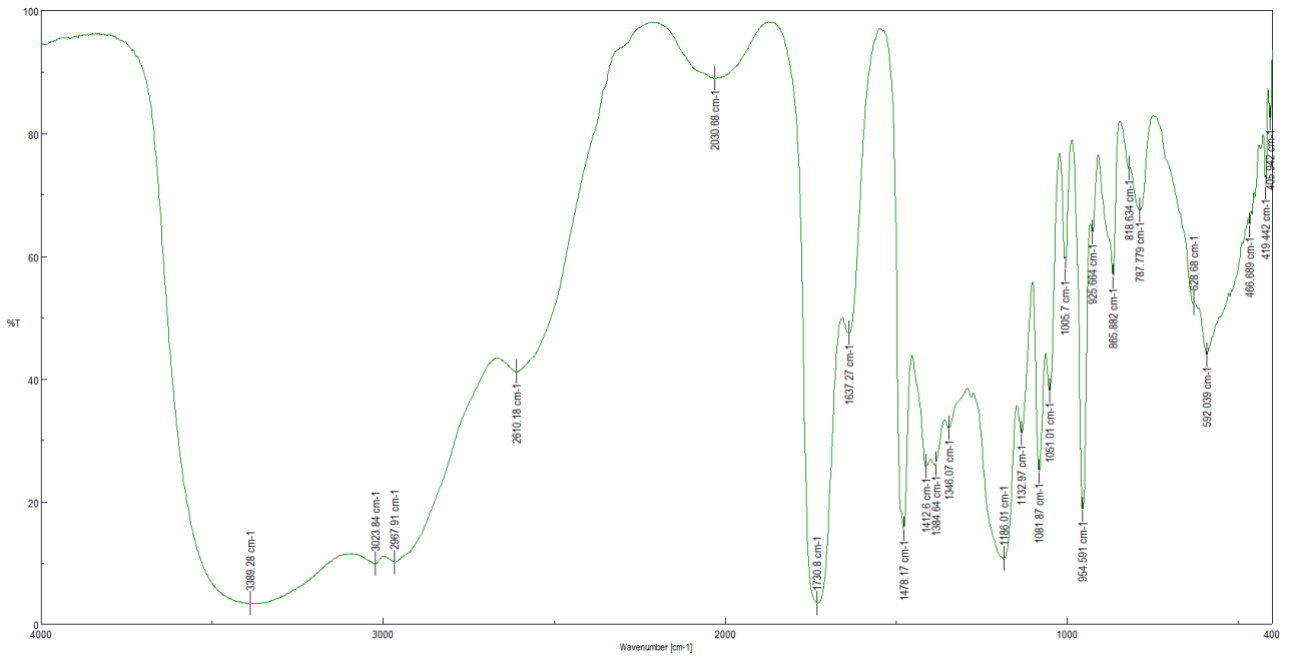
Γράφημα 7-8: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Bet:CA:W



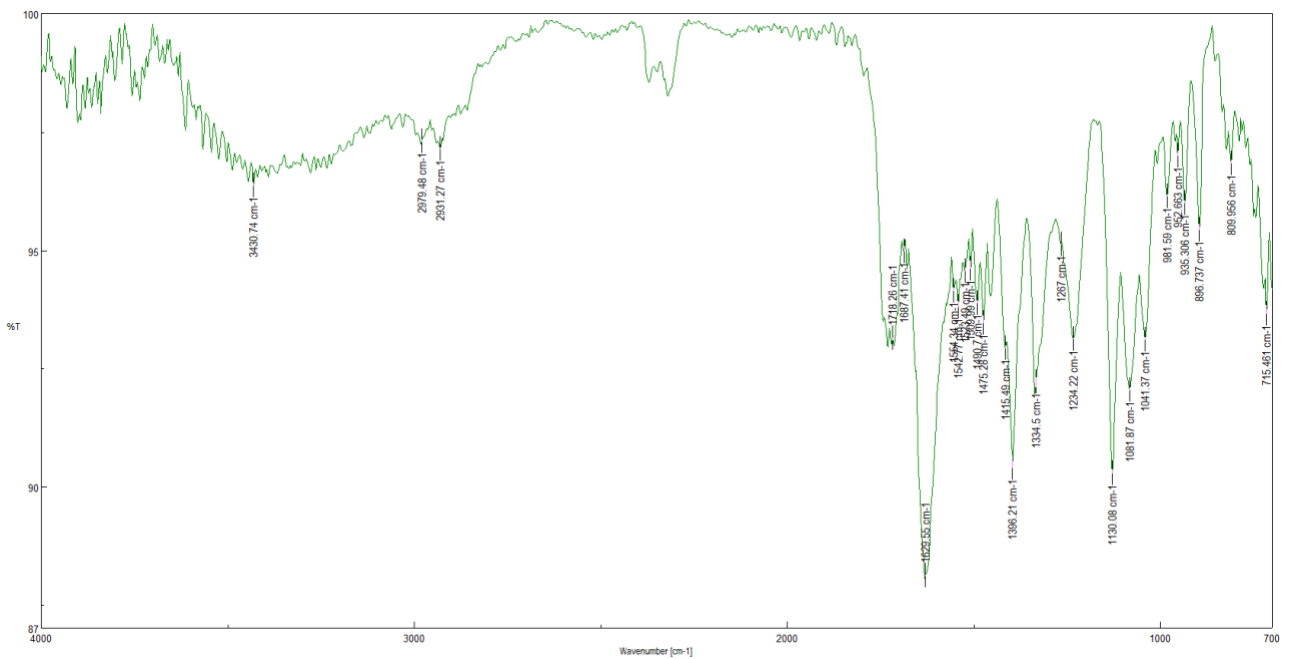
Γράφημα 7-9: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Pro:CA:W



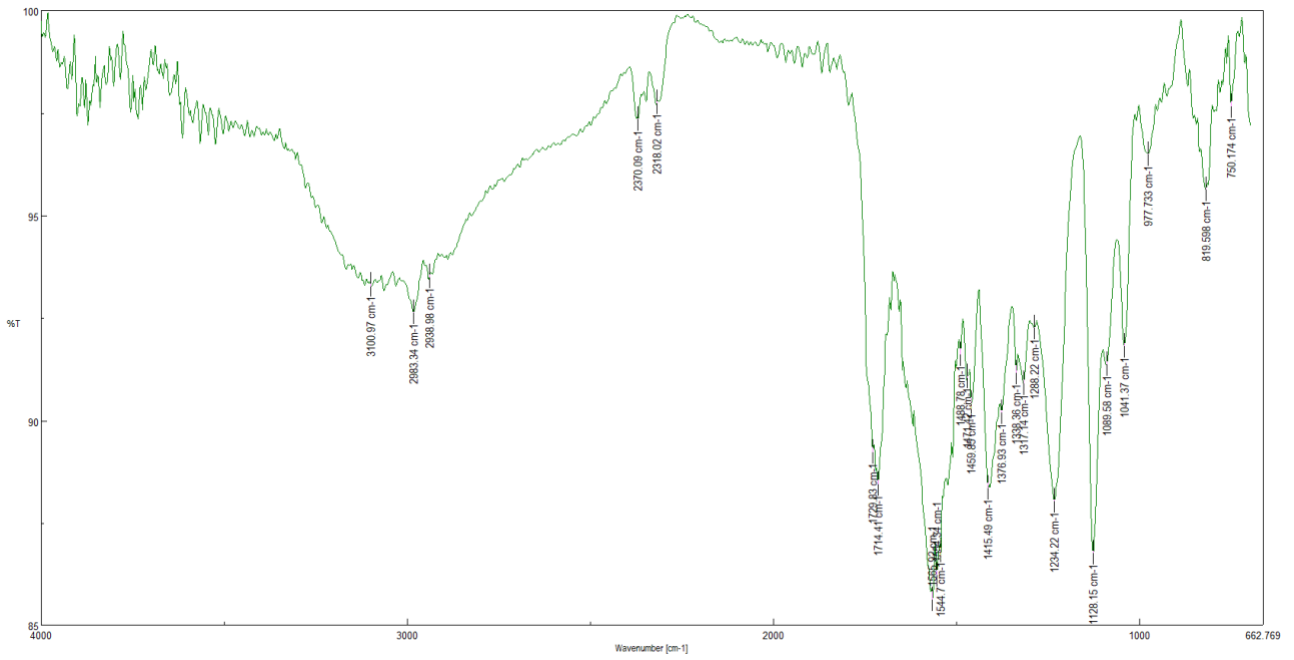
Γράφημα 7-10: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/Bet:LevA



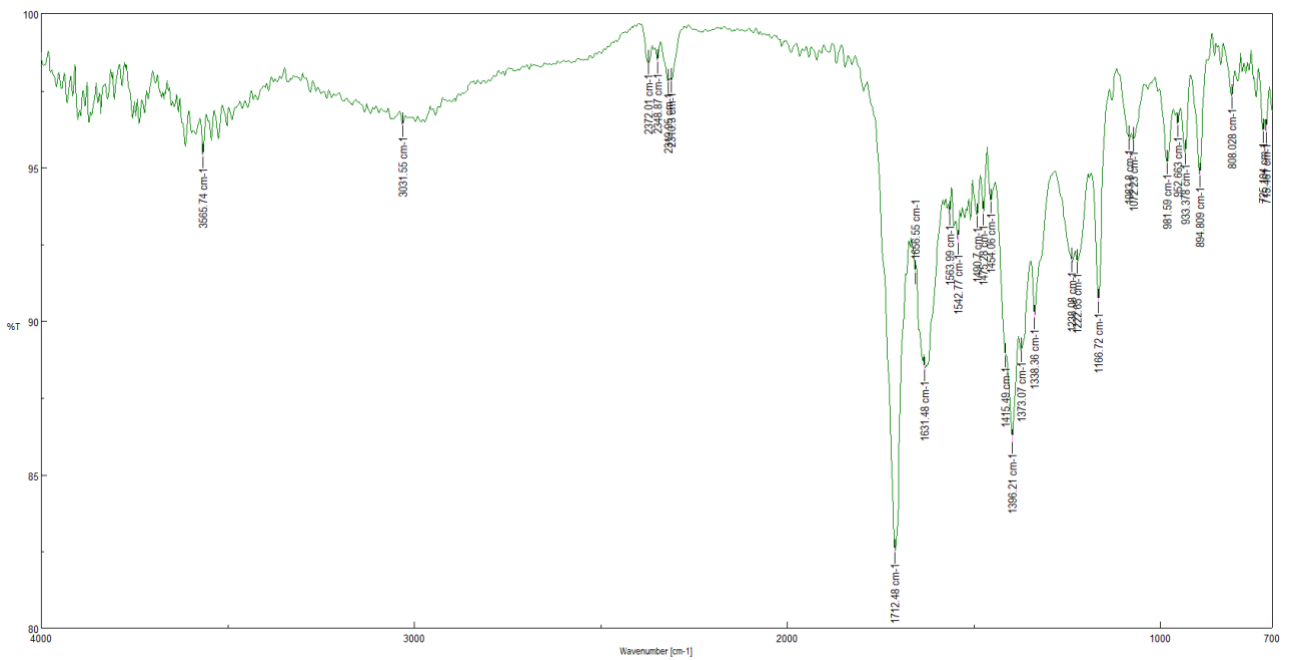
Γράφημα 7-11: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/ChCl:CA



Γράφημα 7-12: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/Bet:LA/0.3



Γράφημα 7-13: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/Ala:LA/0.2



Γράφημα 7-14: Φάσμα ATR – FT-IR του φιλμ F/Bet:LevA/0.2