



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου, Αθήνα 157 80

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***Αξιοποίηση ενζυμικά παραγόμενων πολυμερών
σε συστήματα εγκλεισμού δραστικών ουσιών***

Μαριλένα Μαθιουδάκη

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Σταματίνα Ν. Βουγιούκα

Αναπλ. Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2022

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022. Αντικείμενο της εργασίας αποτέλεσε η αναβάθμιση ιδιοτήτων ενζυμικά συντεθειμένου PBS και η εξέταση δυνατότητας εγκλεισμού δραστικής ουσίας σε νανοσφαίρες του πολυμερούς.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Ε.Μ.Π. Κα Σταματίνα Ν. Βουγιούκα, επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αλλά και για την καθοδήγηση που παρείχε όλο αυτό το διάστημα, με συχνές συναντήσεις που επέδειξαν την κατεύθυνση σε κρίσιμα σημεία.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Κα. Αναστασία Δέτση, για τη βοήθεια και τη συνεργασία που προσέφερε καθόλη τη διάρκεια της εργασίας καθώς και για τη δυνατότητα χρήσης του εξοπλισμού του εργαστηρίου της Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., όποτε αυτό ήταν αναγκαίο.

Πέραν αυτών, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις υποψήφίες διδάκτορες Χριστίνα Γκουντέλα και Ιωάννα Πιττερού, για την άψογη συνεργασία τόσο κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας όσο και κατά τη συγγραφή της, για την καθοδήγηση, τις γνώσεις, τη βοήθεια, την υπομονή και κατανόηση την οποία μου έδειξαν. Ελπίζω να συνεισέφερα ακόμα και στο ελάχιστο στην εκπόνηση της έρευνάς τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην τριμελή εξεταστική επιτροπή για τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών και Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. για την αρμονική συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε, καθιστώντας ευκολότερη τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Φυσικά, από τις ευχαριστίες δε θα μπορούσε να λείπει η οικογένεια μου και τα αγαπημένα μου πρόσωπα τα οποία με ενθάρρυναν και με στήριξαν, ώστε να ολοκληρώσω επιτυχώς τις σπουδές μου.

Περιεχόμενα

Πρόλογος / Ευχαριστίες.....	i
Περιεχόμενα.....	iii
Κατάλογος Πινάκων	vii
Κατάλογος Διαγραμμάτων	ix
Κατάλογος Εικόνων	xiii
Συντομογραφίες.....	xv
Περίληψη	xvii
Abstract	xix
Κεφάλαιο 1: Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας)-PBS.....	1
1.1. Εισαγωγικά στοιχεία	1
1.2. Χαρακτηριστικές ιδιότητες πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)	3
1.2.1. Θερμικές ιδιότητες πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)	3
1.2.2. Μηχανικές ιδιότητες πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα).....	3
1.2.3. Πράσινες ιδιότητες πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)	4
1.3. Σύνθεση πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)	5
1.3.1. Χημική σύνθεση πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)	6
1.3.2. Ενζυμική σύνθεση	6
1.4. Εφαρμογές και χρήσεις πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)	8
1.5. Βιβλιογραφία.....	10
Κεφάλαιο 2: Νανοεγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών σε βιοδιασπώμενους φορείς	15
2.1. Εισαγωγή-Νανოსωματίδια και νανοφορείς	15
2.2. Πολυμερικά νανოსωματίδια	16
2.2.1. Νανοσφαίρες και νανοκάψουλες	17
2.2.2. Τεχνικές παρασκευής.....	18

2.2.3. Εφαρμογές	21
2.3. Βιοδραστικά συστατικά-Αντιοξειδωτικές δραστικές ουσίες	22
2.3.1. Ναρινγίνη	24
2.4. Επικαλύψεις-επιφανειακές τροποποιήσεις χιτοζάνης σε νανοφορείς ...	26
2.4.1. Χιτοζάνη-Δομή, ιδιότητες και εφαρμογές.....	26
2.4.2. Χρήση χιτοζάνης για την επικάλυψη-επιφανειακή τροποποίηση νανοφορέων	27
2.5. Βιβλιογραφία.....	29
Κεφάλαιο 3: Σκοπός διπλωματικής εργασίας	35
3.1. Τεχνολογική στάθμιση	35
3.2. Σκοπός	36
3.3. Βιβλιογραφία.....	37
Κεφάλαιο 4: Πειραματικό μέρος	39
4.1. Ενζυμικός προπολυμερισμός	39
4.1.1. Υλικά.....	39
4.1.2. Όργανα και συσκευές	40
4.1.3. Πειραματική διαδικασία	40
4.2. Μεταπολυμερισμός.....	42
4.2.1. Υλικά.....	42
4.2.2. Όργανα και συσκευές	42
4.2.3. Πειραματική διαδικασία	43
4.3. Εγκλεισμός ναρινγίνης σε νανοσφαίρες PBS	44
4.3.1. Υλικά.....	44
4.3.2. Όργανα και συσκευές	45
4.3.3. Πειραματική διαδικασία	45
4.4. Χαρακτηρισμός πρώτων υλών και προϊόντων	47
4.4.1. Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	47

4.4.2.	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης DSC	50
4.4.3.	Θερμοβαρυμετρική ανάλυση TGA.....	52
4.4.4.	Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis).....	54
4.4.5.	Μέτρηση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).....	57
4.4.6.	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR).....	59
4.4.7.	Χρωματογραφία Διέλευσης μέσω Πηκτής (GPC).....	63
4.4.8.	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)	68
4.5.	Βιβλιογραφία.....	70
Κεφάλαιο 5:	Αποτελέσματα και Συζήτηση-Ενζυμικός προπολυμερισμός PBS...	73
5.1.	Εισαγωγή.....	73
5.2.	Μακροσκοπική μορφολογία προϊόντων PBS ενζυμικού προπολυμερισμού και αποδόσεις διεργασίας	74
5.3.	Ταυτοποίηση της δομής του PBS.....	75
5.3.1.	¹ H-NMR	75
5.3.2.	FTIR-ATR.....	76
5.4.	Προσδιορισμός μοριακού βάρους.....	77
5.4.1.	Προσδιορισμός μοριακού βάρους μέσω GPC	77
5.4.2.	Προσδιορισμός μοριακού βάρους μέσω ¹ H-NMR.....	79
5.4.3.	Σύγκριση αποτελεσμάτων GPC και ¹ H-NMR	80
5.5.	Θερμικές ιδιότητες προπολυμερούς PBS.....	81
5.5.1.	Αποτελέσματα DSC	81
5.5.2.	Αποτελέσματα TGA	83
5.6.	Επανάληψη πειράματος προπολυμερισμού PBS	84
5.7.	Ιδιότητες εμπορικού PBS	86
5.8.	Βιβλιογραφία.....	87
Κεφάλαιο 6:	Αποτελέσματα και Συζήτηση-Μεταπολυμερισμός PBS	90

6.1.	Πειράματα μεταπολυμερισμού στερεάς κατάστασης-SSP.....	90
6.2.	Πειράματα μεταπολυμερισμού τήγματος	97
6.3.	Σύγκριση πειραμάτων μεταπολυμερισμού.....	101
6.4.	Βιβλιογραφία.....	103
Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα και Συζήτηση-Εγκλεισμός Ναρινγίνης σε νανοσφαίρες PBS.....		
7.1.	Εισαγωγή.....	105
7.2.	Μακροσκοπική και μικροσκοπική μορφολογία προϊόντων εγκλεισμού....	106
7.3.	Αποδόσεις διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού.....	107
7.4.	FTIR-ATR.....	108
7.5.	Μέγεθος, κατανομή μεγέθους και ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων	110
7.6.	Προσδιορισμός μοριακού βάρους μέσω GPC.....	113
7.7.	Θερμικές ιδιότητες νανοσωματιδίων	114
7.7.1.	Αποτελέσματα DSC	114
7.7.2.	Αποτελέσματα TGA	123
7.8.	Μελέτη αποδέσμευσης In Vitro	129
7.9.	Βιβλιογραφία.....	130
Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα-Μελλοντική έρευνα.....		
8.1.	Συμπεράσματα που προκύπτουν από την εργασία	133
8.2.	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	134
Παράρτημα πινάκων		
		136

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικές ιδιότητες εμπορικά διαθέσιμων PBS.....	4
Πίνακας 2 Τύποι νανοφορέων[3], [11]	15
Πίνακας 3 Τεχνικές παρασκευής πολυμερικών νανοσωματιδίων [4], [7], [10] ...	18
Πίνακας 4 Επικαλυμμένα/τροποποιημένα νανοσυστήματα με χιτοζάνη με εγκλεισμένα φυσικά προϊόντα[35], [38]–[42].....	28
Πίνακας 5 Βασικές πληροφορίες αντιδραστηρίων για την ενζυμική παραγωγή PBS[1], [2]	39
Πίνακας 6 Συνθήκες διερεύνησης μεταπολυμερισμού.....	43
Πίνακας 7 Βασικές πληροφορίες αντιδραστηρίων για τον σχηματισμό νανοφορέων PBS με εγκλεισμένη ναρινγίνη	44
Πίνακας 8 Συνθήκες δειγμάτων πειραμάτων προπολυμερισμού και αποδόσεις διεργασίας	73
Πίνακας 9 Υπολογισμοί M_n και ποσοστού ακραίων ομάδων προπολυμερούς από το φάσμα H-NMR	79
Πίνακας 10 M_n με βάση τις αναλύσεις GPC και $^1\text{H-NMR}$	80
Πίνακας 11 M_n πειράματος προκρυστάλλωσης και SSP από την ανάλυση GPC	93
Πίνακας 12 M_n πειράματος συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση GPC.....	96
Πίνακας 13 Πειράματα εγκλεισμού ναρινγίνης σε PBS	105
Πίνακας 14 Απόδοση εγκλεισμού και απόδοση διεργασίας για τα πειράματα PBS-Nar	107
Πίνακας 15 Μέγεθος, κατανομή και ζ-δυναμικό νανοσφαιρών από την ανάλυση DLS.....	111
Πίνακας 16 M_n κενών νανοσωματιδίων και αρχικού υλικού τους από την ανάλυση GPC	113

Παράρτημα πινάκων

Πίνακας Π 1 Θερμικές ιδιότητες των ενζυμικά συντεθειμένων προπολυμερών PBS από την ανάλυση DSC.....	136
---	-----

Πίνακας Π 2 Θερμικές ιδιότητες των ενζυμικά συντεθειμένων προπολυμερών PBS από την ανάλυση TGA.....	136
Πίνακας Π 3 Θερμικές ιδιότητες 90_20_2 και επαναληπτικού πειράματος από την ανάλυση TGA	136
Πίνακας Π 4 Θερμικές ιδιότητες 90_20_2 και επαναληπτικού πειράματος από την ανάλυση DSC	137
Πίνακας Π 5 Θερμικές ιδιότητες εμπορικού PBS από την ανάλυση TGA	137
Πίνακας Π 6 Θερμικές ιδιότητες εμπορικού PBS από την ανάλυση DSC	137
Πίνακας Π 7 Θερμικές ιδιότητες πειράματος SSP από την ανάλυση TGA	137
Πίνακας Π 8 Θερμικές ιδιότητες πειράματος SSP από την ανάλυση DSC	138
Πίνακας Π 9 Θερμικές ιδιότητες πειράματος συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση TGA.....	138
Πίνακας Π 10 Θερμικές ιδιότητες πειράματος συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση DSC.....	139
Πίνακας Π 11 Θερμικές ιδιότητες πειράματος πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση TGA	139
Πίνακας Π 12 Θερμικές ιδιότητες M4-110 PBS και επαναληπτικού πειράματος από την ανάλυση DSC.....	140
Πίνακας Π 13 M _n πειράματος συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση GPC.....	140
Πίνακας Π 14 Θερμικές ιδιότητες NPs από την ανάλυση DSC	141
Πίνακας Π 15 Θερμικές ιδιότητες πειράματος πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση TGA	142

Διάγραμμα 1 Καμπύλη αναφοράς ναρινγίνης.	56
Διάγραμμα 2 Παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης GPC βάσει του πολυστυρενίου.	66
Διάγραμμα 3 Φάσμα FTIR προπολυμερών PBS.....	77
Διάγραμμα 4 Μοριακό βάρος και δείκτης διασποράς για τις κλιμακωμένες διεργασίες προπολυμερισμού-επίδραση ποσότητας τελικού προϊόντος.	78
Διάγραμμα 5 Μοριακό βάρος και δείκτης διασποράς για τις κλιμακωμένες διεργασίες προπολυμερισμού-επίδραση χρόνου.	78
Διάγραμμα 6 Καμπύλες DSC προπολυμερούς με διαφορετικό χρόνο δεύτερου σταδίου (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).....	81
Διάγραμμα 7 Καμπύλες TGA προπολυμερούς με διαφορετικό χρόνο δεύτερου σταδίου.....	83
Διάγραμμα 8 Φάσμα FTIR πειράματος προπολυμερισμού και επαναληπτικού. .	84
Διάγραμμα 9 Καμπύλες DSC πειράματος 90_20_2 και επαναληπτικού (1 ^η θέρμανση, ψύξη, 2 ^η θέρμανση).....	85
Διάγραμμα 10 Καμπύλες TGA πειράματος 90_20_2 και επαναληπτικού.	85
Διάγραμμα 11 Καμπύλες DSC εμπορικού PBS (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).	86
Διάγραμμα 12 Καμπύλες TGA εμπορικού PBS.....	87
Διάγραμμα 13 Καμπύλες DSC πειράματος προκρυστάλλωσης (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).	90
Διάγραμμα 14 Καμπύλες TGA πειράματος προκρυστάλλωσης.....	91
Διάγραμμα 15 Καμπύλες DSC πειράματος SSP (1 ^η θέρμανση, ψύξη, 2 ^η θέρμανση).	92
Διάγραμμα 16 Καμπύλες TGA πειράματος SSP.....	93
Διάγραμμα 17 Καμπύλες DSC πειραμάτων συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).....	95
Διάγραμμα 18 Καμπύλες TGA πειραμάτων συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος.....	96

Διάγραμμα 19 Καμπύλες DSC πειράματος M4_110 (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).....	97
Διάγραμμα 20 Καμπύλες TGA πειράματος M4_110.....	98
Διάγραμμα 21 Καμπύλες DSC πειράματος M4_110 με προθέρμανση (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).	99
Διάγραμμα 22 Καμπύλες TGA πειράματος M4_110 με προθέρμανση.	100
Διάγραμμα 23 Θερμοκρασία τήξης και κρυσταλλικότητα ανά δείγμα μεταπολυμερισμού.	101
Διάγραμμα 24 T_d και $T_{d(5\%)}$ ανά δείγμα μεταπολυμερισμού.....	102
Διάγραμμα 25 Μέσου αριθμού, μέσου βάρους μοριακό βάρος και δείκτης διασποράς ανά δείγμα μεταπολυμερισμού.	102
Διάγραμμα 26 Φάσμα FTIR Ναρινγίνης.	108
Διάγραμμα 27 Φάσμα FTIR E1_Nar και E1_Blank.	109
Διάγραμμα 28 Φάσμα FTIR M_Nar και M_Blank.....	109
Διάγραμμα 29 Ενδεικτικό γράφημα κατανομής υδροδυναμικής διαμέτρου νανοσωματιδίων.	111
Διάγραμμα 30 Ενδεικτικό γράφημα κατανομής ζ-δυναμικού νανοσωματιδίων.	112
Διάγραμμα 31 Καμπύλες DSC νανοσωματιδίων ενζυμικού προπολυμερούς PBS και PVA (1η θέρμανση).....	114
Διάγραμμα 32 Καμπύλες DSC πρώτων υλών νανοσωματιδίων (1η θέρμανση).	115
Διάγραμμα 33 Καμπύλες DSC πρώτων υλών νανοσωματιδίων (ψύξη, 2η θέρμανση).....	116
Διάγραμμα 34 Καμπύλες DSC E2_Nar και E2_Blank (1η θέρμανση).....	117
Διάγραμμα 35 Καμπύλες DSC E2_Nar και E2_Blank (ψύξη).....	118
Διάγραμμα 36 Καμπύλες DSC E2_Nar και E2_Blank (2 ^η θέρμανση).....	119
Διάγραμμα 37 Καμπύλες DSC νανοσωματιδίων προπολυμερούς και εμπορικού PBS (1η θέρμανση).....	120
Διάγραμμα 38 Καμπύλες DSC νανοσωματιδίων προπολυμερούς και εμπορικού PBS (ψύξη).	121
Διάγραμμα 39 Καμπύλες DSC νανοσωματιδίων προπολυμερούς και εμπορικού PBS (2 ^η θέρμανση).	121

Διάγραμμα 40 Καμπύλες DSC M_Nar και M_Blank (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).....	122
Διάγραμμα 41 Απώλεια βάρους TGA νανοσωματιδίων ενζυμικού προπολυμερούς PBS και PVA.	123
Διάγραμμα 42 1 ^η παράγωγος TGA νανοσωματιδίων ενζυμικού προπολυμερούς PBS και PVA.....	123
Διάγραμμα 43 Απώλεια βάρους TGA πρώτων υλών νανοσωματιδίων PBS.....	124
Διάγραμμα 44 1 ^η παράγωγος TGA πρώτων υλών νανοσωματιδίων PBS.....	125
Διάγραμμα 45 Απώλεια βάρους TGA E2_Nar και E2_Blank.	126
Διάγραμμα 46 1 ^η παράγωγος TGA E2_Nar και E2_Blank.	126
Διάγραμμα 47 Απώλεια βάρους TGA νανοσωματιδίων προπολυμερούς και εμπορικού PBS.....	127
Διάγραμμα 48 1 ^η παράγωγος TGA νανοσωματιδίων προπολυμερούς και εμπορικού PBS.....	127
Διάγραμμα 49 Καμπύλες TGA νανοσωματιδίων και πρώτων υλών μεταπολυμερισμένου ενζυμικού PBS.	128
Διάγραμμα 50 Προφίλ αποδέσμευσης ναρινγίνης από τα E1_Nar, C_Nar για τις δύο μελέτες αποδέσμευσης.....	129

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 Δομή PBS.	1
Εικόνα 2 Μερίδιο αγοράς βιοπολυμερών για το 2020 [13].	2
Εικόνα 3 Εξέλιξη της παγκόσμιας παραγωγικής ικανότητας βιοπολυμερών από το 2018 έως το 2025[13].	3
Εικόνα 4 Χημική αντίδραση πολυσυμπύκνωσης μονομερών προς παραγωγή PBS[9].	5
Εικόνα 5 Μηχανισμός κατάλυσης πολυμερισμού από ένζυμο.	7
Εικόνα 6 Μηχανισμός μεταπολυμερισμού Στερεάς Κατάστασης.	8
Εικόνα 7 Σύγχρονες εφαρμογές PBS[22].	9
Εικόνα 8 Προϊόντα από BioPBS™ [13].	10
Εικόνα 9 Δομή νανοκάψουλας και νανοσφαίρας[14].	17
Εικόνα 10 Σχηματική απεικόνιση τεχνικής απλού γαλακτώματος[10].	20
Εικόνα 11 Σχηματική απεικόνιση τεχνικής διάχυσης διαλύτη [10].	20
Εικόνα 12 Σχηματική απεικόνιση τεχνικής νανοκαθίζησης [10].	20
Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση τεχνικής διαχωρισμού με τη βοήθεια αλάτων [10].	21
Εικόνα 14 Σύγχρονες εφαρμογές πολυμερικών νανοσωματιδίων [15].	21
Εικόνα 15 Αντίδραση της α-τοκοφερόλης (οικογένειας βιταμινών E) με λιπιδική ρίζα.	23
Εικόνα 16 Χημική δομή ναρινγίνης.	24
Εικόνα 17 Χημική δομή χιτοζάνης[36].	26
Εικόνα 18 Πειραματική διάταξη περιστροφικού εξατμιστήρα με συνδεδεμένη αντλία κενού.	41
Εικόνα 19 Πειραματική διαδικασία ενζυμικού προπολυμερισμού PBS.	42
Εικόνα 20 Πειραματική διαδικασία σχηματισμού των νανοσωματιδίων με την τεχνική απλού γαλακτώματος και εξάτμισης διαλύτη.	47
Εικόνα 21 Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών δεσμών.	49
Εικόνα 22 Όργανο Platinum-ATR ALFA II Bruker.	49
Εικόνα 23 Εσωτερικό τυπικού θερμιδομέτρου διαφορικής σάρωσης (DSC).	51
Εικόνα 24 DSC 1 STAR ^e System Mettler Toledo.	52

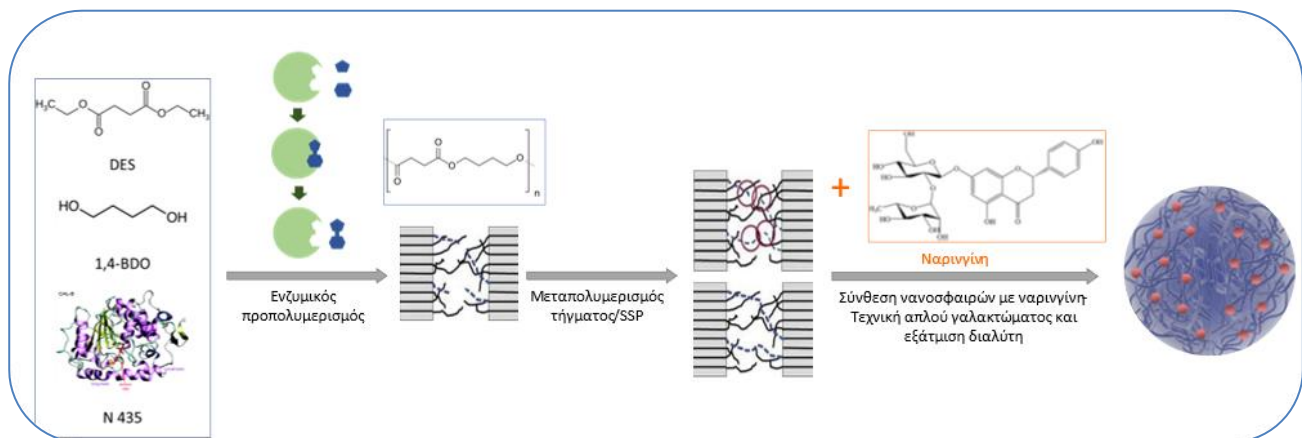
Εικόνα 25 Σχηματική αναπαράσταση θερμοζυγού[8]	53
Εικόνα 26 Σχηματική αναπαράσταση του φασματομέτρου διπλής δέσμης UV-Vis [11].....	55
Εικόνα 27 Jasco V – 770, Spectrophotometer.....	55
Εικόνα 28 Απεικόνιση της συσκευής δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) [13].	58
Εικόνα 29 Zetasizer Nano ZS.....	59
Εικόνα 30 Θέση χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα ¹ H-NMR με την ισχύ του πεδίου [19].....	61
Εικόνα 31 Κατηγοριοποίηση πρωτονίων PBS.....	62
Εικόνα 32 Ενδεικτικό φάσμα H-NMR PBS.	62
Εικόνα 33 Σχηματική αναπαράσταση έκλουσης διαφορετικών μεγεθών πολυμερών κατά την ανάλυση GPC.....	64
Εικόνα 34 Όργανο Agilent 1260 Infinity II.....	67
Εικόνα 35 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης [26].	69
Εικόνα 36 SEM TM3030Plus.....	69
Εικόνα 37 Μορφολογία προπολυμερούς PBS με διάρκεια 2ου σταδίου 2h.....	74
Εικόνα 38 Φάσμα H-NMR για το δείγμα 90_20_2.....	76
Εικόνα 39 Προϊόν εγκλεισμού ναρινγίνης σε PBS	106
Εικόνα 40 Εικόνες SEM του δείγματος C_Nar.....	106
Εικόνα 41 Εικόνες SEM για το δείγμα E1_Nar.....	106

Συντομογραφίες

1,4-BDO	1,4-Butanediol	1,4-Βουτανοδιόλη
ATR	Attenuated Total Reflection	Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση
CALB N435	Candida antarctica Lipase B Novozym 435	Candida antarctica Β-Λιπάση της Novozym 435
CAP	Cellulose Acetate Phthalate	Φθαλική Οξική Κυτταρίνη
DES	Diethyl Succinate	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας
DLS	Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
DSC	Differential Scanning Calorimetry	Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης
DTG	Derivative Thermogravimetry	Διαφορική Θερμοβαρυμετρία
EE	Encapsulation Efficiency	Απόδοση Εγκλεισμού
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
FTIR	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier
GPC	Gel Permeation Chromatography	Χρωματογραφία Διέλευσης μέσω Πηκτής
GRAS	Generally Recognised As Safe	Γενικά Αναγνωρισμένο Ως Ασφαλές
HepG2	Human liver cancer cell line	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του ήπατος
H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός Πρωτονίων
IR	InfraRed	Υπέρυθρο
Mn	Number-average Molecular Weight	Μέσου-αριθμού Μοριακό βάρος
Mw	Weight-average Molecular Weight	Μέσου-βάρους Μοριακό βάρος
Nar	Naringin	Ναρινγίνη
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NPs	NanoParticles	Νανოსωματίδια
PBS	Poly(butylene succinate)	Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας)
PCL	Polycaprolactone	Πολυκαπρολακτόνη
PDI	Polydispersity Index	Δείκτης Πολυδιασποράς
PE	Polyethylene	Πολυαιθυλένιο
PLA	Poly (Lactic acid)	Πολυ(γαλακτικό οξύ)

PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)	Πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ
PNPs	Polymeric NanoParticles	Πολυμερικά Νανοσωματίδια
PVA	Poly(vinyl alcohol)	Πολυβινυλική αλκοόλη
SEC	Size Exclusion Chromatography	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών
SEM	Scanning Electron Microscopy	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης
SSP	Solid State Polymerisation	Πολυμερισμός Στερεάς Κατάστασης
T_c	Crystallization Temperature	Θερμοκρασία κρυστάλλωσης
T_d	Decomposition Temperature	Θερμοκρασία Αποικοδόμησης
$T_{d5\%}$	Decomposition temperature at 5% weight loss	Θερμοκρασία Αποικοδόμησης στο 5% απώλειας βάρους
TEM	Transmission Electron Microscopy	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης
T_g	Glass Transition Temperature	Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης
TG	Thermogravimetry	Θερμοβαρυμετρία
TGA	Thermogravimetric Analysis	Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση
THF	Tetrahydrofuran	Τετραϋδροφουράνιο
T_m	Melting Temperature	Θερμοκρασία τήξης
T_{m1}	Melting Temperature at 1st heating	Θερμοκρασία τήξης στην πρώτη θέρμανση
T_{m2}	Melting Temperature at 2nd heating	Θερμοκρασία τήξης στη δεύτερη θέρμανση
T_r	Reaction Temperature	Θερμοκρασία Αντίδρασης
UV	Ultraviolet	Υπεριώδης
UV-Vis	Ultraviolet–visible spectroscopy	Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού
X_c	Crystallinity	Κρυσταλλικότητα
ΔH_c	Crystallization Enthalpy	Ενθαλπία κρυστάλλωσης
ΔH_{m1}	Enthalpy of melting at 1st heating	Ενθαλπία τήξης στην πρώτη θέρμανση
ΔH_{m2}	Enthalpy of melting at 2nd heating	Ενθαλπία τήξης στη δεύτερη θέρμανση

Περίληψη



Οι αυξανόμενες ενεργειακές ανάγκες, συνδυαστικά με την αυξανόμενη περιβαλλοντική ευαισθητοποίηση έχουν ενισχύσει τη ζήτηση για περισσότερο βιώσιμα υλικά. Προς αυτή την κατεύθυνση, τα βιοπολυμερή δύναται να καλύψουν το μεγαλύτερο μέρος της ετήσιας ζήτησης συνθετικών πλαστικών. Στην κατηγορία αυτή ανήκει ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (poly(butylene succinate)-PBS), ένας αλειφατικός πολυεστέρας με ικανοποιητικές θερμομηχανικές ιδιότητες, βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα και γενικότερα ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των συμβατικών πλαστικών μιας χρήσεως. Το PBS έχει πολλές δυνατότητες για χρήση σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών και παρόλο που η εμπορική αξιοποίηση του αφορά κυρίως τις βιοδιασπώμενες συσκευασίες, η χρήση του στον βιοϊατρικό τομέα έχει προσελκύσει πρόσφατα την προσοχή.

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος σύνθεσής του περιλαμβάνει τη χρήση χημικών καταλυτών και την εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών (200°C). Στις συνθήκες αυτές όμως συχνά συμβαίνουν παράπλευρες αντιδράσεις που οδηγούν σε ανεπιθύμητα φαινόμενα, ενώ πρόκειται και για μη-φιλικές προς το περιβάλλον διεργασίες. Ο ενζυμικός πολυμερισμός αποτελεί μια αποτελεσματική εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών χημικά καταλυόμενων διεργασιών. Προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως ήπιες συνθήκες, υψηλή εκλεκτικότητα των ενζύμων και έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας

και απόδοσης των τελικών προϊόντων. Ωστόσο, ένα σημαντικό μειονέκτημα του ενζυμικού πολυμερισμού αποτελεί το σχετικά χαμηλό μοριακό βάρος που επιτυγχάνεται. Επομένως, χρειάζεται να συνδυαστεί με κάποια μέθοδο αναβάθμισης των ιδιοτήτων του πολυμερούς (μοριακό βάρος, θερμικές ιδιότητες), όπως ο πολυμερισμός στερεάς κατάστασης (SSP) ή ο πολυμερισμός τήγματος.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει σε πρώτη φάση στην κλιμάκωση της ενζυμικής σύνθεσης προπολυμερούς PBS, με βάση την αριστοποίηση των συνθηκών που είχε γίνει στο εργαστήριο. Επιτυγχάνεται η κλιμάκωση της διεργασίας και παραλαμβάνονται 20 g προϊόντος με μέσου-αριθμού μοριακό βάρος 1700 g/mol, σημείο τήξης 98°C και κρυσταλλικότητα 64%. Ακολουθεί αναβάθμιση των ιδιοτήτων του προϊόντος με διερεύνηση των μεθόδων μεταπολυμερισμού στερεάς κατάστασης και τήγματος. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται από μεταπολυμερισμό τήγματος με μοριακό βάρος 3000 g/mol, σημείο τήξης 104 °C και κρυσταλλικότητα 47%.

Στο δεύτερο κομμάτι της παρούσας εργασίας, εξετάζεται ο εγκλεισμός δραστικής ένωσης σε νανοσφαίρες PBS με τη μέθοδο απλού γαλακτώματος-εξάτμισης διαλύτη. Η ουσία που επιλέγεται είναι η ναρινγίνη, ένα φλαβονοειδές με αντιοξειδωτική δράση. Σκοπός ήταν να μελετηθεί η δυνατότητα εγκλεισμού και, σε μεταγενέστερη έρευνα, το προφίλ αποδέσμευσης της εγκλεισμένης ουσίας. Όπως αποδείχθηκε, ο εγκλεισμός ήταν επιτυχής και με ικανοποιητική απόδοση διεργασίας τόσο σε εμπορικό PBS, προπολυμερές και στο τελικό προϊόν του μεταπολυμερισμού. Διαπιστώνεται λοιπόν ότι το ενζυμικά συντεθειμένο ολιγομερές PBS μπορεί να αποτελέσει μήτρα για τον εγκλεισμό ουσιών και συνεπώς προσφέρεται για χρήση σε αντίστοιχες εφαρμογές νανοτεχνολογίας.

Λέξεις κλειδιά

Βιοπολυμερή, Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας), Ενζυμικός πολυμερισμός, Μεταπολυμερισμός στερεάς κατάστασης, Εγκλεισμός, Ελεγχόμενη αποδέσμευση, Νανοσφαίρες, Ναρινγίνη

Growing energy concerns, rapid infrastructure development and increased environmental awareness have raised the demand for more sustainable materials. Towards this end, biopolymers can meet most of the annual demand for synthetic plastics. In this category there is poly(butylene succinate)-PBS, an aliphatic polyester with satisfactory thermomechanical properties, biocompatibility, biodegradability and, in general, properties similar to those of conventional single-use plastics. PBS has many potential uses in a wide range of applications and although its commercial exploitation is mainly related to biodegradable packaging, its use in the biomedical sector has recently attracted attention.

The most commonly used method of synthesis of PBS involves the use of chemical catalysts and the application of high temperatures (200°C). However, these are environmentally unfriendly processes and, under these conditions, side reactions often occur, leading to undesirable phenomena. Enzymatic polymerisation is an effective alternative to conventional chemically catalysed processes. It offers significant advantages such as mild conditions, high selectivity of enzymes and results in improved quality and yield of the final products. However, a major disadvantage of enzyme polymerisation is the relatively low molecular weight achieved. Therefore, it needs to be combined with a method to upgrade the polymer properties (molecular weight, thermal properties), such as solid-state polymerisation (SSP) or melt polymerisation.

The present diploma thesis focuses in the first phase on the scaling-up of the enzymatic synthesis of PBS prepolymer, based on the optimization of the conditions that had been used in the laboratory. Scaling-up of the process is achieved resulting in 20 g of product with a number-average molecular weight of 1700 g/mol, melting point of 98°C and crystallinity of 64%. The product properties are then improved by investigating the methods of solid-state and melt post-polymerisation. The final product was obtained by melt post-polymerisation with a molecular weight of 3000 g/mol, melting point 104 °C and mass fraction crystallinity 47%.

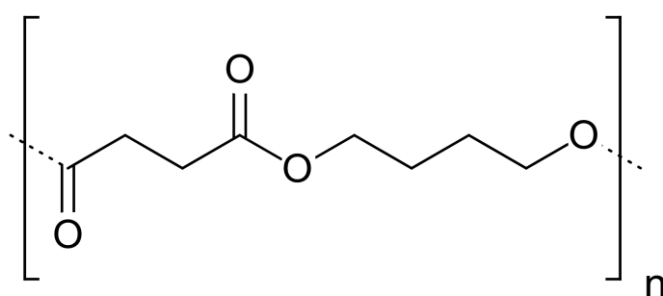
In the second part of the present diploma thesis, the encapsulation of an active compound in PBS nanospheres by the simple emulsion-solvent evaporation method is investigated. The chosen compound is naringin, a flavonoid with antioxidant activity. The aim was to study the encapsulation potential and, in a later investigation, the release profile of the encapsulated substance. As it turned out, the encapsulation was successful and with satisfactory yield (~50%) with matrix of commercial PBS, prepolymer and the final post-polymerization product. Therefore, the enzymatically synthesized oligomer PBS can be used as a matrix in encapsulation of active substances and consequently lends itself to use in corresponding nanotechnology applications.

Key words

Biopolymers, Poly(butylene succinate), Enzymatic polymerization, Solid state post-polymerisation, Encapsulation, Controlled release, Nanospheres, Naringin

1.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (poly(butylene succinate) ή PBS) είναι ένα θερμοπλαστικό ημικρυσταλλικό πολυμερές, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των αλειφατικών πολυεστέρων. Ο χημικός του τύπος είναι $C_8H_{12}O_4$ και η επαναλαμβανόμενη δομική του μονάδα παρουσιάζεται στην Εικόνα 1 [1]–[5].



Εικόνα 1 Δομή PBS.

Το PBS παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, κυρίως λόγω της βιοσυμβατότητας και της βιοαποικοδομησιμότητάς του. Σε συνδυασμό με τις ικανοποιητικές μηχανικές του ιδιότητες, όπως υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό, καλή αντοχή σε κρούση, μέτρια ακαμψία και σκληρότητα, το καθιστούν υποψήφιο αντικαταστάτη των συμβατικών πλαστικών μιας χρήσεως (π.χ. πολυπροπυλένιο, πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας) [2], [6], [7].

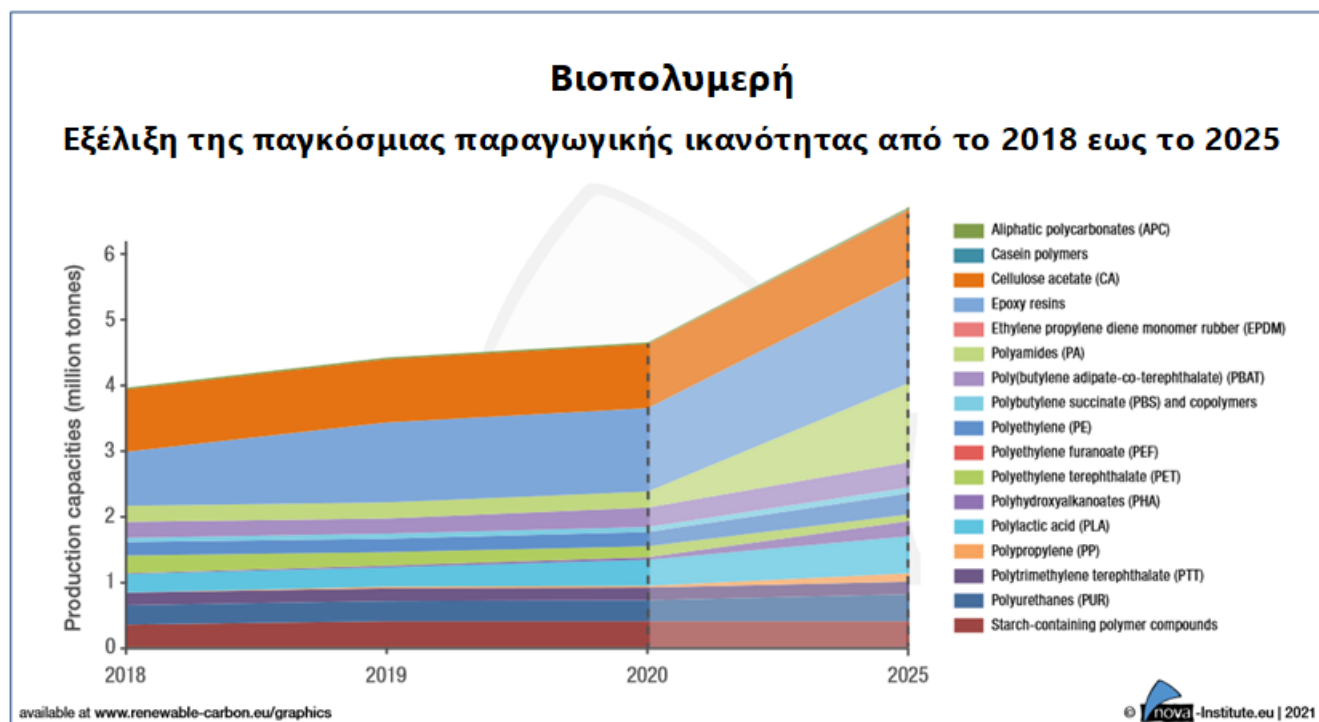
Η πρώτη προσπάθεια για τη σύνθεση PBS έγινε το 1931 από τον Carothers. Το προϊόν που προέκυψε είχε χαμηλό μοριακό βάρος (μικρότερο από 5.000 g/mol), και ήταν εύθραυστο [8]. Στην αγορά βρέθηκε διαθέσιμο για πρώτη φορά από το 1993 μέχρι το 2016 με την εμπορική ονομασία Bionolle™ από την εταιρεία Showa-Denko [9]–[11]. Ακολούθησε η Mitsubishi Chemical Corporation, το 2003, με την εμπορική ονομασία GS Pla™, ενώ και άλλες εταιρείες επιχειρούν να εισέλθουν στην αγορά αυτή [9], [12]. Μια πρόσφατη καινοτομία στην παραγωγή PBS πραγματοποιήθηκε το 2017 από τις εταιρείες PTT Global Chemical Public Company Limited (GC) και Mitsubishi Chemical Corporation. Πρόκειται για τη

σύνθεση του προϊόντος BioPBS™, ενός πολυμερούς βιολογικής προέλευσης (σε ποσοστό από 50 έως και 85%), με αυξημένη βιοδιασπασιμότητα, εγκεκριμένου για επαφή με τρόφιμα από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και επεξεργασιμότητα αντίστοιχη με αυτή των συμβατικών υλικών [13].

Σήμερα, το PBS καταλαμβάνει μεγάλο μέρος της παραγωγής των βιοπολυμερών, μετά τις εποξικές ρητίνες και την οξική κυτταρίνη. Το μερίδιο αγοράς των βιοπολυμερών για το 2020 παρουσιάζεται στην Εικόνα 2, ενώ η ανάπτυξη της παραγωγής τους από το 2018 έως και το 2025 με βάση τα σημερινά δεδομένα απεικονίζεται στην Εικόνα 3. Για πρώτη φορά ο ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης αναμένεται στο 8%, γεγονός που δείχνει πως η παγκόσμια αγορά έχει πλέον στραφεί στα πράσινα πολυμερή [14].



Εικόνα 2 Μερίδιο αγοράς βιοπολυμερών για το 2020 [14].



Εικόνα 3 Εξέλιξη της παγκόσμιας παραγωγικής ικανότητας βιοπολυμερών από το 2018 έως το 2025[14].

1.2. Χαρακτηριστικές ιδιότητες πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)

1.2.1. Θερμικές ιδιότητες πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)

Το PBS είναι ένα τυπικό θερμοπλαστικό υλικό, με θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) περίπου στους -30°C και θερμοκρασία τήξης (T_m) στους $90-120^{\circ}\text{C}$, ανάλογα με το μοριακό βάρος και τη θερμική ιστορία του υλικού [3], [5], [15]–[17]. Λόγω των ιδιοτήτων αυτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο εύρος εφαρμογών και παρουσιάζει υψηλή επεξεργασιμότητα μεταξύ 20 και 100°C [15]. Με βάση τις μελέτες θερμικής αποικοδόμησης, είναι σταθερό σε θερμοκρασίες κάτω των 220°C , με το ρυθμό απώλειας μάζας να φτάνει στο μέγιστο στους 390°C [16].

1.2.2. Μηχανικές ιδιότητες πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)

Το PBS έχει μηχανικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του πολυαιθυλενίου [1]–[4], [15], [16]. Έχει υψηλή ικανότητα κρυστάλλωσης, με κρυσταλλικότητα (x_c) στην περιοχή $65-71\%$ [15], [18]. Ως ένα σημείο, οι μηχανικές του ιδιότητες όπως η

ελαστικότητα, ο εφελκυσμός, η αντοχή σε κρούση, η διαφάνεια και η βιοαποικοδομησιμότητα εξαρτώνται από την κρυσταλλικότητα. Αυτό ευνοεί την επεξεργασία του PBS, καθώς εύκολα παράγεται προϊόν με προσαρμοσμένες μηχανικές ιδιότητες. Όσον αφορά στις ιδιότητες φράγματος, το PBS αποτελεί μέτριο φράγμα οξυγόνου και μέτριο/ασθενές φράγμα νερού [15]. Στον Πίνακα 1 εμφανίζονται οι θερμομηχανικές ιδιότητες μερικών εμπορικά διαθέσιμων PBS. Εύκολα διαπιστώνεται ότι οι τιμές των ιδιοτήτων έχουν ένα μεγάλο εύρος (ακόμα και μεταξύ προϊόντων της ίδιας εταιρείας, διαφορετικής ποιότητας). Αυτό επιβεβαιώνει πως το παραγόμενο PBS προσαρμόζεται ανάλογα με τις επιθυμητές ιδιότητες του τελικού προϊόντος για την εκάστοτε εφαρμογή [10], [12], [13].

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικές ιδιότητες εμπορικά διαθέσιμων PBS

	Bionolle™	GS Pla™	BioPBS™	BioPBS™
	1000	GZ95T	FZ71PM/PB	FZ92PM/PB
Πυκνότητα (g/cm ³)	1.26	1.51	1.26	1.24
T_g (°C)	-32	-24	-22	-40
T_m (°C)	114	110	115	84
Αντοχή εφελκυσμού (MPa)	34	33	30	24
Επιμήκυνση πριν τη θραύση (%)	560	5	170	380

1.2.3. Πράσινες ιδιότητες πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρας)

Το PBS ανήκει στην κατηγορία των «πράσινων» πολυμερών, είναι βιοαποικοδομήσιμο και βιοσυμβατό ενώ μπορεί να παραχθεί και με τη χρήση μικροοργανισμών (βιοπολυμερές) [2].

Όσον αφορά την αποικοδόμησή του, είναι ευκολότερη σε σύγκριση με τα συνθετικά πολυμερή ενώ μπορεί να αποικοδομηθεί από μύκητες και βακτήρια υπό φυσικές συνθήκες ή να υδρολυθεί [19], [20]. Η αποικοδόμηση του εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το μοριακό βάρος, τη διαπερατότητα σε νερό, την καθαρότητα, την κρυσταλλικότητα, το pH και τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος κ.α. Για παράδειγμα, υψηλότερη κρυσταλλικότητα προκαλεί

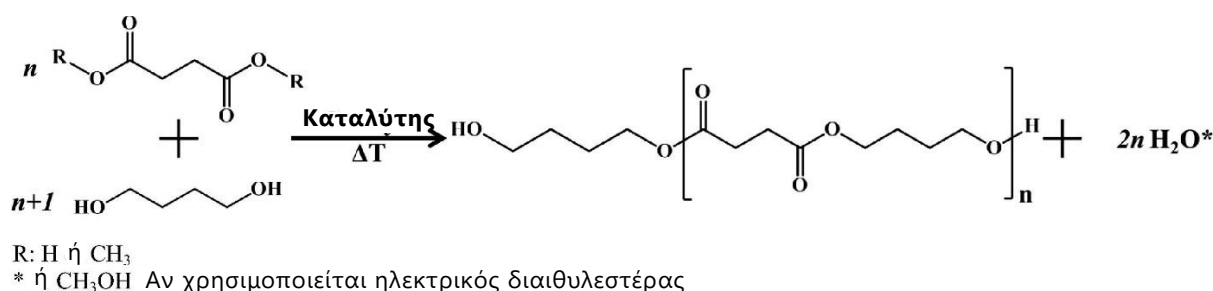
χαμηλότερους ρυθμούς υδρολυτικής και ενζυμικής αποικοδόμησης. Αντίθετα, όσο μεγαλύτερη είναι η υδροφιλία, τόσο υψηλότερος είναι ο ρυθμός υδρόλυσης [2], [9].

Εκτός αυτού, το PBS έχει καλή βιοσυμβατότητα *in vitro* και *in vivo*. Οι παράγοντες που επηρεάζουν αυτή την ιδιότητα είναι η χημεία στις επιφάνειες, η διαβρεξιμότητα και η τραχύτητα, καθώς επηρεάζει τις βιολογικές αντιδράσεις στις επιφάνειες βιοϋλικών. Ενδεικτικά, έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα προσκολλώνται καλύτερα σε επιφάνειες με χαμηλή τραχύτητα [9].

Τέλος, όπως αναφέρεται και στο επόμενο κεφάλαιο, το PBS μπορεί να συντεθεί από μονομερή με φυσική προέλευση ή/και με τη χρήση ενζύμων αντί χημικών καταλυτών. Συγκεκριμένα, όπως έχει αναφερθεί, η φυσική προέλευση του προϊόντος BioPBS™ φτάνει το 85% [13].

1.3. Σύνθεση πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)

Το PBS μπορεί να συντεθεί μέσω διαφόρων οδών. Τα αρχικά μονομερή διαφέρουν, καθώς και ο καταλύτης που χρησιμοποιείται. Η πολυσυμπύκνωση ηλεκτρικού οξέος (ή ηλεκτρικού διμεθ- ή διαιθ-υλεστέρα) και 1,4-βουτανοδιόλης είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος παραγωγής PBS (εικόνα 4). Τα μονομερή μπορεί να έχουν ορυκτή ή φυσική προέλευση [2], [9]. Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης ανάλυσης, η κατηγοριοποίηση των μεθόδων έγινε με βάση το είδος του χρησιμοποιούμενου καταλύτη: χημικός, ανόργανος (χημική σύνθεση) ή βιοκαταλύτης (ενζυμική σύνθεση).



Εικόνα 4 Χημική αντίδραση πολυσυμπύκνωσης μονομερών προς παραγωγή PBS[9].

1.3.1. Χημική σύνθεση πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)

Για τη χημική σύνθεση PBS απαιτούνται καταλύτες μετεστεροποίησης με βάση μέταλλα (οργανομεταλλικές ή ενώσεις οξειδίου μετάλλου), όπως βουτοξείδιο του τιτανίου (IV), τριοξείδιο του αντιμονίου (III), ισοπροποξειδίου του τιτανίου, τέτρα-*n*-βουτοξείδιο του αφνίου, οξείδιο του γερμανίου (IV) κ.α. Με τη μέθοδο αυτή συνήθως επιτυγχάνεται υψηλό μοριακό βάρος έως και $2 \cdot 10^5$ g/mol [21], [22].

Επίσης, πρόκειται για μια μη-φιλική προς το περιβάλλον διεργασία λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που απαιτεί. Η θερμοκρασία στο πρώτο στάδιο της σύνθεσης (αφαίρεση νερού) γίνεται μεταξύ 150 και 200 °C, ενώ στο δεύτερο στάδιο, όπου χρησιμοποιείται ο καταλύτης πραγματοποιείται από 200 έως και 230 °C [22].

Ωστόσο, υπό αυτές τις συνθήκες συχνά πραγματοποιούνται παράπλευρες αντιδράσεις όπως η αφυδάτωση της 1,4 βουτανοδιόλης προς το THF, ή/και ανεπιθύμητα φαινόμενα όπως ο χρωματισμός (κιτρίνισμα) του πολυμερούς που οφείλεται κυρίως στη χρήση καταλυτών με βάση το τιτάνιο [5].

1.3.2. Ενζυμική σύνθεση

Για την αντιμετώπιση των μειονεκτημάτων της χημικής σύνθεσης αναζητούνται περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον μέθοδοι για την παραγωγή PBS. Μια επιβεβαιωμένα αποτελεσματική μέθοδος είναι η βιοκατάλυση με τη χρήση ενζύμων. Συνήθης επιλογή είναι οι λιπάσες, οι οποίες κατατάσσονται στην κατηγορία των υδρολασών. Σε υδατικό περιβάλλον, οι λιπάσες καταλύουν την υδρόλυση των εστέρων λιπαρών οξέων. Αντίθετα, απουσία υγρασίας, μπορούν να καταλύσουν αντιδράσεις εστεροποίησης, μετεστεροποίησης και πολυσυμπύκνωσης [16], [23]. Στα πλεονεκτήματά τους κατατάσσονται η υψηλή δραστηριότητα, η καλή συμβατότητα με μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, η εξαιρετική σταθερότητα σε ποικιλία μέσων αντίδρασης [24].

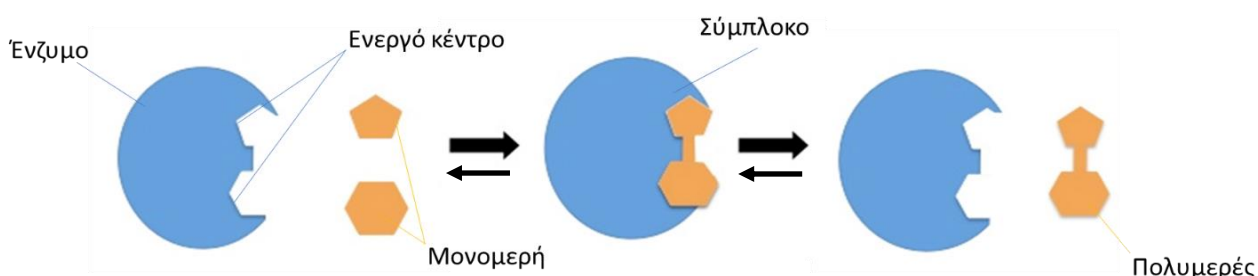
Ο τρόπος δράσης παρουσιάζεται απλουστευμένα στην Εικόνα 5.

Συγκεκριμένα, η λιπάση B από τον μικροοργανισμό *Candida antarctica* (CALB) έχει δοκιμαστεί στην ακινητοποιημένη της μορφή σε μεγάλο βαθμό και έχει βρεθεί αποτελεσματική στη σύνθεση του PBS [9], [22].

Το προϊόν που προκύπτει είναι υψηλής ποιότητας λόγω της εκλεκτικότητας του ενζύμου ενώ ταυτόχρονα δεν υπάρχουν τοξικά παραπροϊόντα, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για βιοϊατρικές εφαρμογές. Πέρα από αυτά, τα ένζυμα είναι ανακυκλώσιμα, φιλικά προς το περιβάλλον και λειτουργούν σε χαμηλές θερμοκρασίες (60-120°C) [5], [16].

Από την άλλη πλευρά, η σχετικά υψηλή τιμή των ενζύμων, η πιθανή αδρανοποίηση τους, η ενδεχόμενη ασθενής συγγένειας με το υπόστρωμα και συνεπώς η παραλαβή προϊόντων χαμηλού μοριακού βάρους είναι ορισμένοι παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν.

Αυτό ωστόσο αντιμετωπίζεται σε κάποιο βαθμό όταν ο ενζυμικός προπολυμερισμός συνδυάζεται με κάποια μετεπεξεργασία του προπολυμερούς για την αύξηση του μοριακού βάρους, με τεχνικές όπως ο μεταπολυμερισμός τήγματος ή στερεάς κατάστασης (Solid State Polymerization ή SSP). [5], [9], [22]

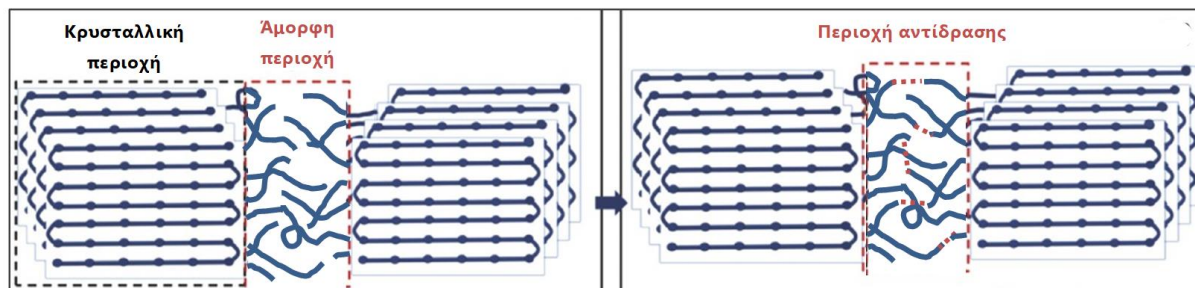


Εικόνα 5 Μηχανισμός κατάλυσης πολυμερισμού από ένζυμο.

1.3.2.1. Μεταπολυμερισμός στερεάς κατάστασης (post Solid State Polymerization-post SSP)

Το ενζυμικά παραγόμενο PBS, όπως αναφέρθηκε, έχει χαμηλό μοριακό βάρος και δεν μπορεί εύκολα να ανταγωνιστεί τα συμβατικά πολυμερή. Εφόσον πρόκειται για ημικρυσταλλικό πολυεστέρα, ένας τρόπος να παραληφθούν προϊόντα υψηλού μοριακού βάρους είναι μέσω κάποιας μετεπεξεργασίας όπως ο μεταπολυμερισμός Στερεάς Κατάστασης (post SSP). Κατά τη διεργασία αυτή, το προπολυμερές θερμαίνεται σε θερμοκρασία μεταξύ του σημείου υαλώδους

μετάπτωσης (T_g) και του σημείου τήξης (T_m). Έτσι, διατηρείται η στερεή κατάσταση του υλικού αλλά ταυτόχρονα αυξάνεται η κινητικότητα των αλυσίδων του πολυμερούς. Τότε, οι ακραίες ομάδες αντιδρούν και σχηματίζουν μεγαλύτερες αλυσίδες (εικόνα 6) ενώ τα παραπροϊόντα απομακρύνονται με τη χρήση αδρανών αερίων ή διατηρώντας μειωμένη πίεση [25]–[27].



Εικόνα 6 Μηχανισμός μεταπολυμερισμού Στερεάς Κατάστασης.

Ο SSP έχει κάποια βασικά πλεονεκτήματα που καθιστούν την εφαρμογή του ελκυστική. Αρχικά, το τελικό προϊόν έχει αυξημένο μοριακό βάρος, καλύτερη κρυσταλλικότητα και αυξημένη θερμική σταθερότητα. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως σχηματίζονται κυρίως γραμμικές αλυσίδες ενώ η περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε μονομερή και ολιγομερή είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Πέρα από αυτά, πρόκειται για μια φιλική προς το περιβάλλον διεργασία, λόγω των χαμηλών σχετικά θερμοκρασιών και την απουσία οργανικών διαλυτών. Παρόλα αυτά, σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι αλυσιδωτές αντιδράσεις των ακραίων ομάδων είναι αργές σε σύγκριση με τον πολυμερισμό τήγματος. Αντίθετα, σε υψηλότερες θερμοκρασίες έχει παρατηρηθεί συσσωμάτωση των αντιδρώντων σωματιδίων [26], [28], [29].

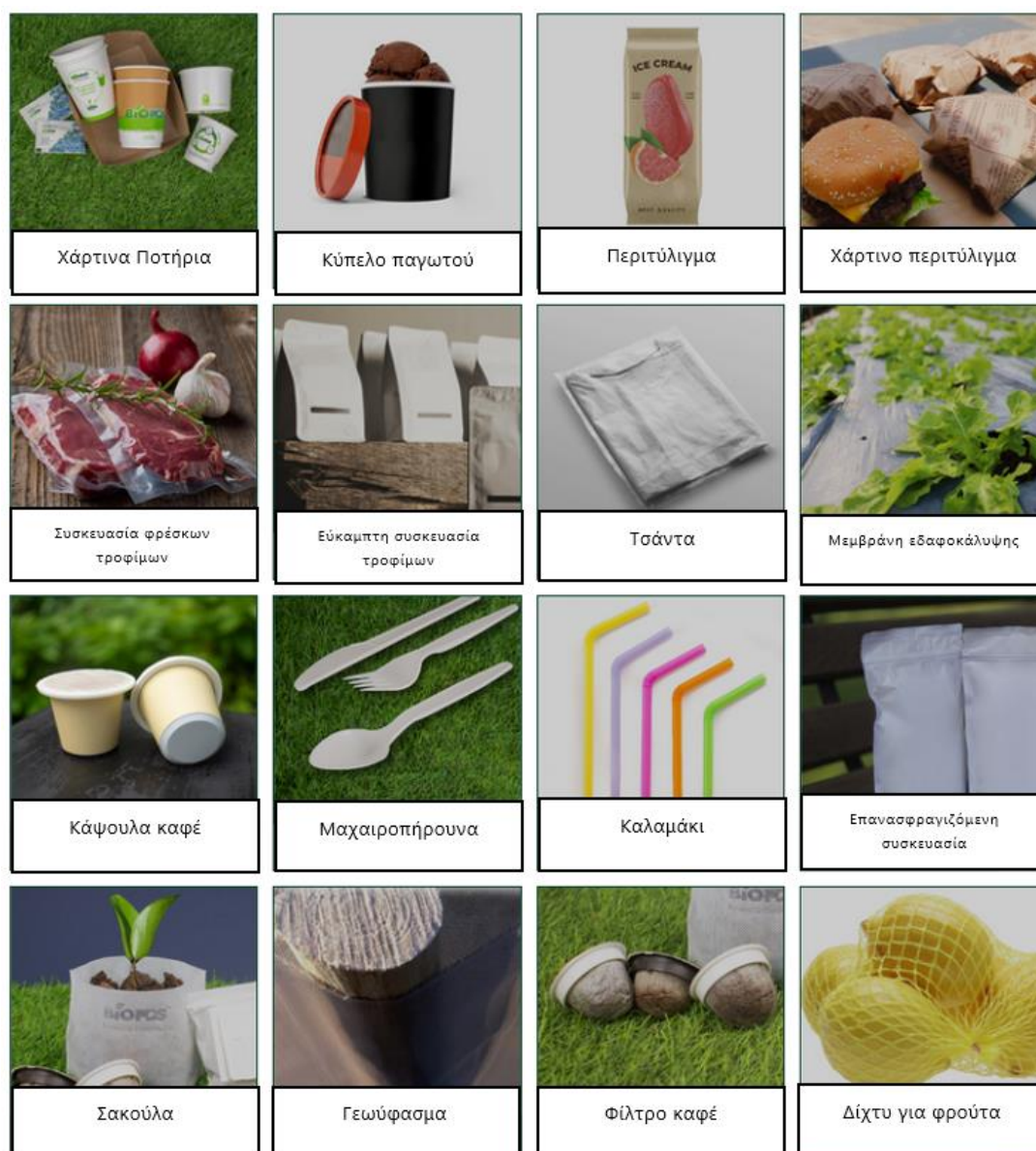
1.4. Εφαρμογές και χρήσεις πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)

Η εξαιρετική βιοδιασπασιμότητα και βιοσυμβατότητα του PBS, σε συνδυασμό με το μεγάλο θερμοκρασιακό παράθυρο επεξεργασίας, ευνοούν τη χρήση του σε μεγάλο εύρος εφαρμογών. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται μεμβράνες, κομποστοποιήσιμες σακούλες, μη υφασμένα φύλλα και υφάσματα, είδη εστίασης και αφροί. Το PBS χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανίες όπως η γεωργία, η αλιεία, η δασοκομία και τα έργα πολιτικού μηχανικού. Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια να εισέλθει στη βιομηχανία βιοϊατρικών προϊόντων καθώς

και στη συσκευασία τροφίμων. Στα πλαίσια αυτά, ερευνάται για την παραγωγή ικριωμάτων, φορέων απελευθέρωσης δραστικών ουσιών, διαδερμικών επιθεμάτων, ενεργής και απλής συσκευασίας τροφίμων κ.α. [2]–[4], [9], [13], [15], [17], [22]. Στην Εικόνα 7 φαίνεται η ποικιλία εφαρμογών PBS γενικά και στην Εικόνα 8 εφαρμογές του BioPBS™ [2], [22].



Εικόνα 7 Σύγχρονες εφαρμογές PBS[22].



Εικόνα 8 Προϊόντα από BioPBS™ [13].

1.5. Βιβλιογραφία

- [1] K. Aliko, M. B. Aldakhlalla, L. J. Leslie, T. Worthington, P. D. Topham, and E. Theodosiou, "Poly(butylene succinate) fibrous dressings containing natural antimicrobial agents," *Journal of Industrial Textiles*, vol. 0, no. 0, p. 1528083720987209, doi: 10.1177/1528083720987209.
- [2] S. A. Rafiqah *et al.*, "A Review on Properties and Application of Bio-Based Poly(Butylene Succinate)," *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 9, 2021, doi: 10.3390/polym13091436.

- [3] P. Hariraksapitak, O. Suwanton, P. Pavasant, and P. Supaphol, "Effectual drug-releasing porous scaffolds from 1,6-diisocyanatohexane-extended poly(1,4-butylene succinate) for bone tissue regeneration," *Polymer (Guildf)*, vol. 49, no. 11, pp. 2678–2685, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.04.006>
- [4] K. Mohanraj, S. Sethuraman, and U. M. Krishnan, "Development of poly(butylene succinate) microspheres for delivery of levodopa in the treatment of Parkinson's disease," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 101B, no. 5, pp. 840–847, 2013, doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32888>
- [5] C. Gkountela, M. Rigopoulou, E. M. Barampouti, and S. Vouyiouka, "Enzymatic prepolymerization combined with bulk post-polymerization towards the production of bio-based polyesters: The case of poly(butylene succinate)," *European Polymer Journal*, vol. 143, p. 110197, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110197>
- [6] E. Delamarche, A. Mattlet, S. Livi, J.-F. Gérard, R. Bayard, and V. Massardier, "Tailoring Biodegradability of Poly(Butylene Succinate)/Poly(Lactic Acid) Blends With a Deep Eutectic Solvent," *Frontiers in Materials*, vol. 7, 2020, doi: 10.3389/fmats.2020.00007.
- [7] L. Sisti, G. Totaro, and P. Marchese, "PBS makes its entrance into the family of biobased plastics," *Biodegradable and biobased polymers for environmental and biomedical applications*, vol. 7, pp. 225–285, 2016.
- [8] W. H. Carothers, "Polymerization.," *Chemical Reviews*, vol. 8, no. 3, pp. 353–426, 1931.
- [9] M. Gigli, M. Fabbri, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, and A. Munari, "Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review," *European Polymer Journal*, vol. 75, pp. 431–460, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.01.016>
- [10] T. Ichikawa Yasushi and Mizukoshi, "Bionolle (Polybutylenesuccinate)," in *Synthetic Biodegradable Polymers*, A. and C. G. W. and R. R. and D. E. and Z.

- T. A. Rieger Bernhard and Künkel, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 285–313. doi: 10.1007/12_2011_145.
- [11] Showa Denko K.K., “SDK to Terminate Production and Sale of Biodegradable Plastic,” Nov. 02, 2016. <https://www.sdk.co.jp/english/news/15030/16250.html> (accessed Apr. 22, 2022).
- [12] “GS Pla® GZ95T.” <https://www.ulprospector.com/plastics/en/datasheet/119521/gs-pla-gz95t> (accessed Apr. 22, 2022).
- [13] “BioPBS™,” 2017. https://www.m-chemical.co.jp/en/products/departments/mcc/sustainable/product/120102_5_7964.html (accessed Apr. 23, 2022).
- [14] P. Skoczinski *et al.*, “Bio-based Building Blocks and Polymers – Global Capacities, Production and Trends 2020 – 2025,” Jan. 2021.
- [15] “Development of active, intelligent and sustainable food PACKaging using PolybutyleneSUCCLnate,” 2014. Accessed: Apr. 23, 2022. [Online]. Available: <https://cordis.europa.eu/project/id/289196/reporting>
- [16] A. Douka, S. Vouyiouka, L.-M. Papaspyridi, and C. D. Papaspyrides, “A review on enzymatic polymerization to produce polycondensation polymers: The case of aliphatic polyesters, polyamides and polyesteramides,” *Progress in Polymer Science*, vol. 79, pp. 1–25, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.10.001>
- [17] B.-H. Xu Jun and Guo, “Microbial Succinic Acid, Its Polymer Poly(butylene succinate), and Applications,” in *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, G. G.-Q. Chen, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 347–388. doi: 10.1007/978-3-642-03287-5_14.
- [18] Y. Tokiwa, B. P. Calabria, C. U. Ugwu, and S. Aiba, “Biodegradability of Plastics,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 10, no. 9, pp. 3722–3742, 2009, doi: 10.3390/ijms10093722.

- [19] L. Liu, J. Yu, L. Cheng, and X. Yang, "Biodegradability of poly(butylene succinate) (PBS) composite reinforced with jute fibre," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 94, no. 1, pp. 90–94, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.10.013>
- [20] G. G.-Q. Chen, *Plastics from bacteria: natural functions and applications*, vol. 14. Springer Science & Business Media, 2009.
- [21] N. Jacquél *et al.*, "Synthesis and properties of poly(butylene succinate): Efficiency of different transesterification catalysts," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 49, no. 24, pp. 5301–5312, 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/pola.25009>
- [22] O. Platnieks, S. Gaidukovs, V. Kumar Thakur, A. Barkane, and S. Beluns, "Bio-based poly (butylene succinate): Recent progress, challenges and future opportunities," *European Polymer Journal*, vol. 161, p. 110855, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110855>
- [23] A. P. S. Brogan, K. P. Sharma, A. W. Perriman, and S. Mann, "Enzyme activity in liquid lipase melts as a step towards solvent-free biology at 150 °C," *Nature Communications*, vol. 5, no. 1, p. 5058, 2014, doi: 10.1038/ncomms6058.
- [24] B. Yeniad, H. Naik, and A. Heise, "Lipases in Polymer Chemistry," in *Biofunctionalization of Polymers and their Applications*, G. S. Nyanhongo, W. Steiner, and G. Gübitz, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 69–95. doi: 10.1007/10_2010_90.
- [25] G. Wegner, "Solid-state polymerization mechanisms," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 49, no. 4, pp. 443–454, 1977, doi: doi:10.1351/pac197749040443.
- [26] S. N. Vouyiouka, E. K. Karakatsani, and C. D. Papaspyrides, "Solid state polymerization," *Progress in Polymer Science*, vol. 30, no. 1, pp. 10–37, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.11.001>
- [27] C. Shi, J. M. DeSimone, D. J. Kiserow, and G. W. Roberts, "Reaction kinetics of the solid-state polymerization of poly (bisphenol A carbonate) facilitated by

- supercritical carbon dioxide," *Macromolecules*, vol. 34, no. 22, pp. 7744–7750, 2001.
- [28] R. Srinivasan, P. Desai, A. S. Abhiraman, and R. S. Knorr, "Solid-state polymerization vis-à-vis fiber formation of step-growth polymers. I. Results from a study of nylon 66," *J Appl Polym Sci*, vol. 53, no. 13, pp. 1731–1743, 1994.
- [29] L. Li, N. Huang, Z. Liu, Z. Tang, and W. Yung, "Simulation of solid-state polycondensation of nylon-66," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 11, no. 5, pp. 242–249, 2000.

Κεφάλαιο 2: Νανοεγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών σε βιοδιασπώμενους φορείς

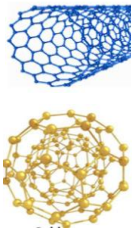
2.1. Εισαγωγή-Νανοςωματίδια και νανοφορείς

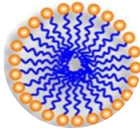

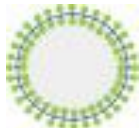
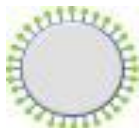
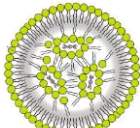
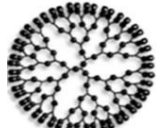
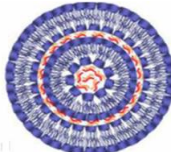
Τα νανοςωματίδια (Nano Particles-NPs) μπορούν να οριστούν ως διασπορές ή στερεά σωματίδια με μέγεθος που κυμαίνεται τυπικά από 10 έως 100 nm [1], [2] και κατά περιπτώσεις έως και 1000 nm [1]–[5]. Ο αντίκτυπος της νανοκλίμακας σε υλικά και συστήματα σχετίζεται συχνά με τη μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, που οδηγεί σε αυξημένη ενεργή επιφάνεια, χημική και κινητική σταθερότητα και βέλτιστες μηχανικές ιδιότητες. Συνολικά τα νανοϋλικά αποτελούν ένα ισχυρό διεπιστημονικό εργαλείο για την ανάπτυξη καινοτόμων προϊόντων [1]–[4], [6], [7].

Τα συστήματα νανοεγκλεισμού βιοδραστικών ενώσεων αναπτύσσονται συνεχώς, με εφαρμογή σε πολλούς τομείς. Κύριος ρόλος τους είναι να προστατεύουν την εγκλεισμένη ένωση από το περιβάλλον και κατ' επέκταση την υποβάθμιση ενώ ταυτόχρονα τροποποιούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του συνολικού συστήματος. Τα συστήματα μεταφοράς δραστικών ουσιών διαδραματίζουν έναν ζωτικής σημασίας ρόλο στη φαρμακολογική δράση του μορίου, καθώς μπορούν να επηρεάσουν την φαρμακοκινητική του, το ποσοστό της αποδέσμευσης του φαρμάκου, την περιοχή και τη διάρκεια της δράσης του και συνεπώς, το σύνολο των ανεπιθύμητων ενεργειών του [8]–[10].

Υπάρχει ποικιλία νανοφορέων με ξεχωριστή μορφολογία για διαφορετικές εφαρμογές. Ενδεικτικά παραδείγματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 [3], [11].

Πίνακας 2 Τύποι νανοφορέων[3], [11]

Όνομασία	Δομή	Χαρακτηριστικά
Ανόργανα NPs		Νανοςωματίδια από ανόργανα υλικά, νανοσωλήνες άνθρακα, κεραμικά, μέταλλα, οξείδια μετάλλων

Μικύλλια		Σειρά επιφανειοδραστικών μορίων που αυτοδιοργανώνονται σε υδατικό περιβάλλον (υδρόφοβος πυρήνας)
Πολυμερικά NPs		Τρισδιάστατη διάταξη από φυσικά ή συνθετικά πολυμερή
Λιποσώματα		Σφαιρικό κυστίδιο διπλοστοιβάδας λιπιδίων με αμφίφιλη φύση και υδατικό πυρήνα
Νανოსωματίδια στερεών λιπιδίων (SNLs)		Σταθερά NPs με βάση τα λιπίδια με στερεό υδρόφοβο πυρήνα
Λιπιδικά νανოსωματίδια (LNPs)		Κολλοειδή συστήματα λιπιδίων με μυκηλιακές δομές στον πυρήνα τους
Δενδριμερή		Υπερ-διακλαδισμένα μακρομόρια σε μονοδιασπορά
Κυκλοδεξτρίνες		Κυκλικοί υδατοδιαλυτοί ολιγοσακχαρίτες σε σχήμα κόλουρου κώνου με εσωτερική υδρόφοβη κοιλότητα και εξωτερική υδρόφιλη επιφάνεια

2.2. Πολυμερικά νανოსωματίδια

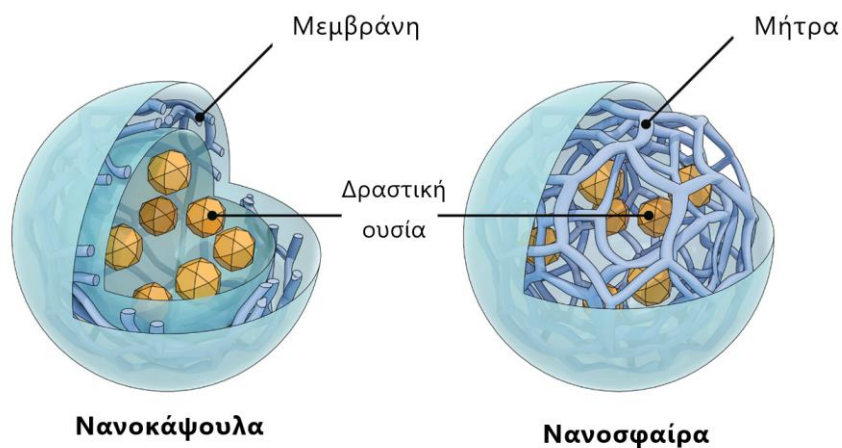
Τα πολυμερικά νανοςωματίδια (PNPs) έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια λόγω των ιδιοτήτων τους και έχουν μελετηθεί εκτενώς. Προέρχονται είτε από συνθετικά (πολυ(γαλακτικό οξύ), πολυ(γλυκολικό οξύ), πολυ(γαλακτικό οξύ-γλυκολικό οξύ), πολυ(ε-καπρολακτόνη)) είτε από φυσικά πολυμερή (κολλαγόνο, χιτίνη, χιτοζάνη,

κερατίνη, μετάξι και ελαστίνη, άμυλο, κυτταρίνη, πηκτίνη κ.λπ.). Τα συνθετικά πολυμερή παράγονται χημικά, ενώ τα φυσικά πολυμερή λαμβάνονται από φυσικές πηγές [12], [13].

Στα πλεονεκτήματα των νανοσωματιδίων συγκαταλέγονται οι βελτιωμένες ιδιότητες έναντι των συμβατικών υλικών φορέων, με ταυτόχρονη διατήρηση της βιοσυμβατότητας και βιοαποικοδομησιμότητας, καθώς και η ικανότητα εγκλεισμού τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων ουσιών. Επιπλέον προσφέρουν βελτιωμένη σταθερότητα πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων ενώσεων, δυνατότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης και ενισχυμένη αποτελεσματικότητα σε συγκεκριμένο στόχο. Όσον αφορά τις βιοϊατρικές εφαρμογές, είναι ικανά να προστατεύουν το περιεχόμενό τους από τον ηπατικό μεταβολισμό και την ενζυμική αποικοδόμηση [9], [12].

2.2.1. Νανοσφαίρες και νανοκάψουλες

Έως τώρα αναφέρεται ο όρος νανοσωματίδια, ο οποίος αποτελεί υπερσύνολο που περιλαμβάνει τις νανοσφαίρες και τις νανοκάψουλες, δομές που διαφέρουν ως προς τη μορφολογία τους. Αφενός, οι νανοσφαίρες έχουν δομή τύπου μήτρας. Τα μόρια της βιοδραστικής ουσίας μπορεί να είναι προσροφημένα στην επιφάνεια της σφαίρας ή εγκλεισμένα μέσα σε αυτή. Αφετέρου, οι νανοκάψουλες είναι συστήματα με τη μορφή δεξαμενής. Περιβάλλονται από μια πολυμερική μεμβράνη και η βιοδραστική ουσία βρίσκεται-συνήθως διαλυμένη-στον υγρό εσωτερικό πυρήνα. Οι δύο δομές διακρίνονται σχηματικά στην Εικόνα 9 [4], [10], [14].



Εικόνα 9 Δομή νανοκάψουλας και νανοσφαίρας [14].

2.2.2. Τεχνικές παρασκευής

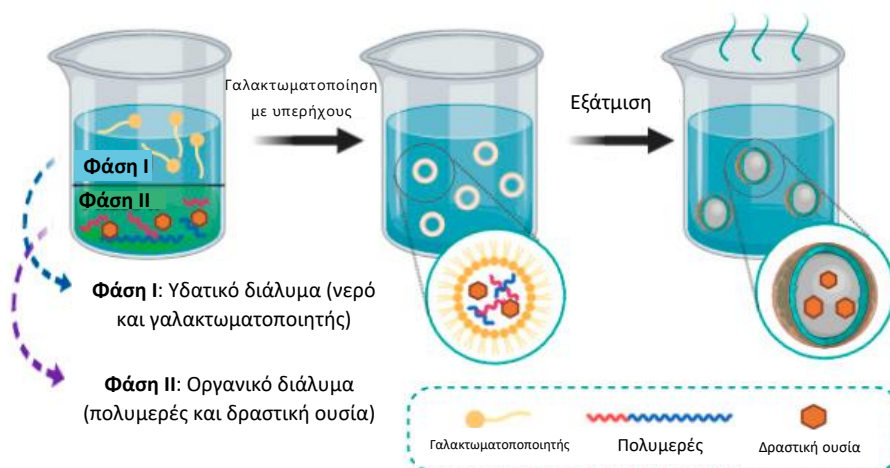
Στη βιβλιογραφία συναντώνται διάφορες μέθοδοι για τη σύνθεση πολυμερικών νανοσωματιδίων. Υπάρχουν δύο κατηγορίες μεθόδων, αυτές που βασίζονται στον επί τόπου πολυμερισμό και εκείνες που οδηγούν σε καθίζηση προσχηματισμένων πολυμερών. Οι περισσότερες από τις τεχνικές που απαιτούν τη χρήση προσχηματισμένων πολυμερών αποτελούνται από δύο στάδια και γίνεται χρήση οργανικών διαλυτών για τη διάλυση του πολυμερούς. Οι διαλύτες αυτοί είναι συνήθως τοξικοί και τα υπολείμματα τους πρέπει να αφαιρούνται από το τελικό προϊόν. Από την άλλη, οι τεχνικές που βασίζονται στον επί τόπου πολυμερισμό γίνονται σε ένα στάδιο και έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο παρασκευής, τα τελικά προϊόντα λαμβάνονται συνήθως ως υδατικά κolloειδή εναιωρήματα [4], [7], [10].

Στον Πίνακα 3 και στις αντίστοιχες εικόνες (Εικόνα 10, Εικόνα 11, Εικόνα 12 και Εικόνα 13) συνοψίζονται οι βασικές τεχνικές παρασκευής πολυμερικών νανοσωματιδίων καθώς και το είδος του τελικού προϊόντος (νανοσφαίρες ή νανοκάψουλες) [4], [7], [10].

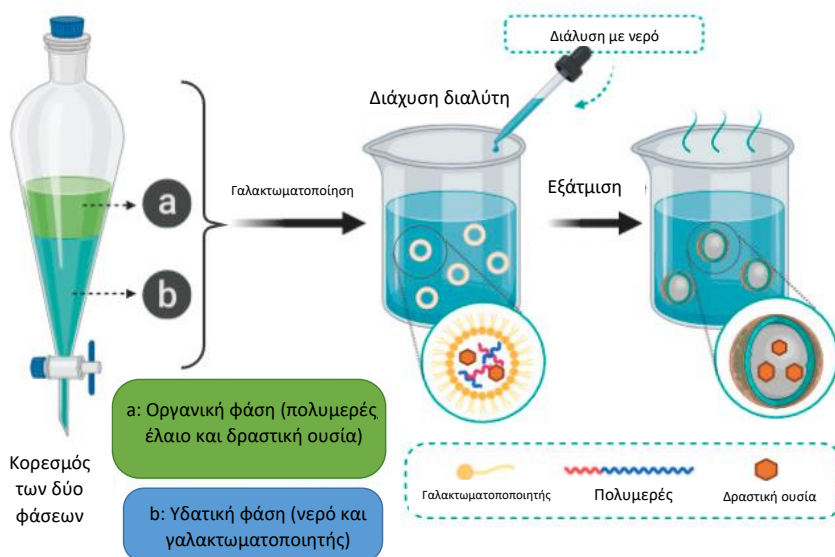
Πίνακας 3 Τεχνικές παρασκευής πολυμερικών νανοσωματιδίων [4], [7], [10]

Τεχνική παρασκευής	Σύντομη περιγραφή	Νανοσωματίδια
Γαλακτωματοποίηση/ Εξάτμιση διαλύτη- απλό γαλάκτωμα (oil-in-water) (Εικόνα 10)	-Διάλυση πολυμερούς και ένωσης σε πτητικό οργανικό διαλύτη -Γαλακτωματοποίηση με υδατική φάση που περιέχει γαλακτωματοποιητή -Ήπια εξάτμιση οργανικού διαλύτη -Συλλογή και επαναδιασπορά σωματιδίων	Νανοσφαίρες
Γαλακτωματοποίηση/ Εξάτμιση διαλύτη- διπλό γαλάκτωμα ((water-in-oil)-in- water)	-Διάλυση ουσίας σε υδατική φάση και πολυμερούς σε πτητικό οργανικό διαλύτη -Γαλακτωματοποίηση -Διασπορά γαλακτώματος σε δεύτερη υδατική φάση	Νανοκάψουλες

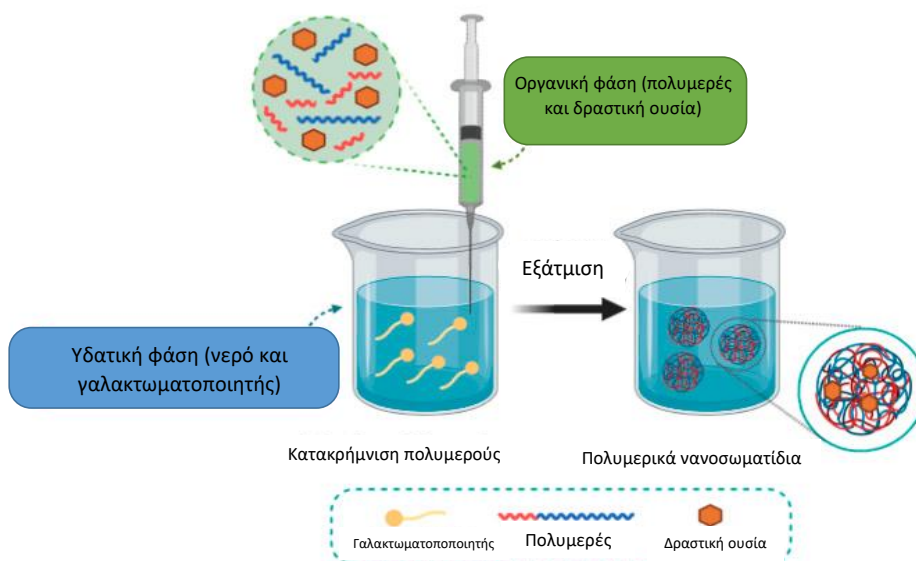
	<ul style="list-style-type: none">- Εξάτμιση οργανικού διαλύτη- Συλλογή και επαναδιασπορά σωματιδίων	
Γαλακτωματοποίηση/ Διάχυση διαλύτη (Εικόνα 11)	<ul style="list-style-type: none">- Διάλυση πολυμερούς σε διαλύτη μερικώς αναμίξιμου με το νερό- Διάλυση της ουσίας σε υδατικό διάλυμα με γαλακτωματοποιητή- Γαλακτωματοποίηση- Αραίωση με μεγάλη ποσότητα νερού (προκαλεί διάχυση διαλύτη από τα διεσπαρμένα σταγονίδια και σχηματισμό των κολλοειδών σωματιδίων)	Νανοσφαίρες
Νανοκαθίζηση (Εικόνα 12)	<ul style="list-style-type: none">- Διαλυτή φάση: οργανικός διαλύτης με πολυμερές, ουσία, λιπόφιλο τασιενεργό- Μη διαλυτή φάση: υδατικό διάλυμα που δεν διαλύει το πολυμερές με τασιενεργά- Προσθήκη διαλυτής φάσης αργά και υπό μέτρια ανάδευση στην υπό ανάδευση μη διαλυτή φάση- Καθώς ο διαλύτης διαχέεται από τα σταγονίδια, καθιζάνουν τα νανοσωματίδια	Νανοκάψουλες
Διαχωρισμός με τη βοήθεια αλάτων (Εικόνα 13)	<ul style="list-style-type: none">- Διάλυση πολυμερούς σε διαλύτη αναμίξιμο με το νερό- Διάλυση ουσίας σε νερό με πηκτικό παράγοντα, παράγοντα αλάτισης και σταθεροποιητή- Σχηματισμός γαλακτώματος υπό έντονη ανάδευση- Αραίωση με νερό (διάχυση διαλύτη και σχηματισμός σωματιδίων)	Νανοσφαίρες



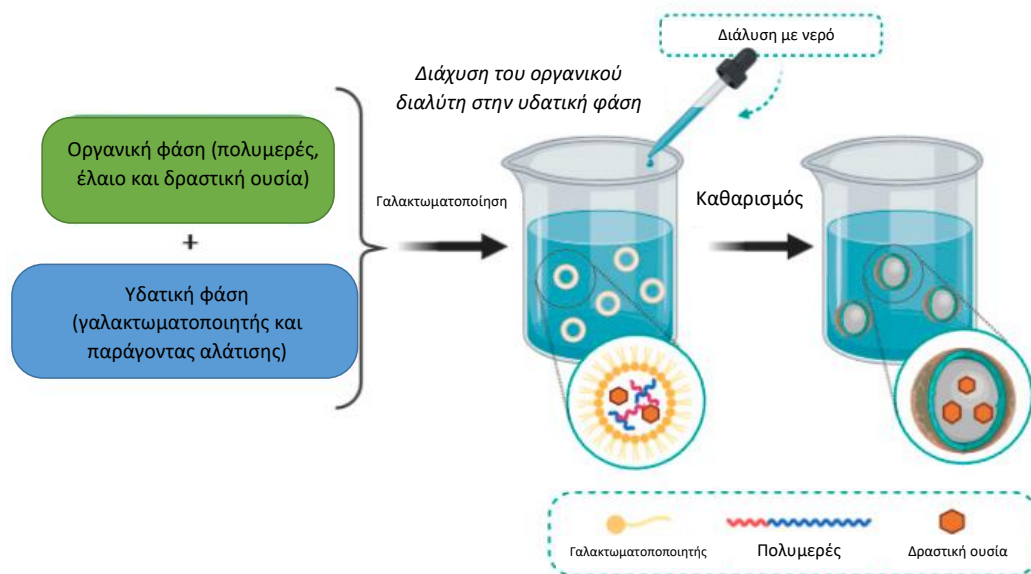
Εικόνα 10 Σχηματική απεικόνιση τεχνικής απλού γαλακτώματος [10].



Εικόνα 11 Σχηματική απεικόνιση τεχνικής διάχυσης διαλύτη [10].



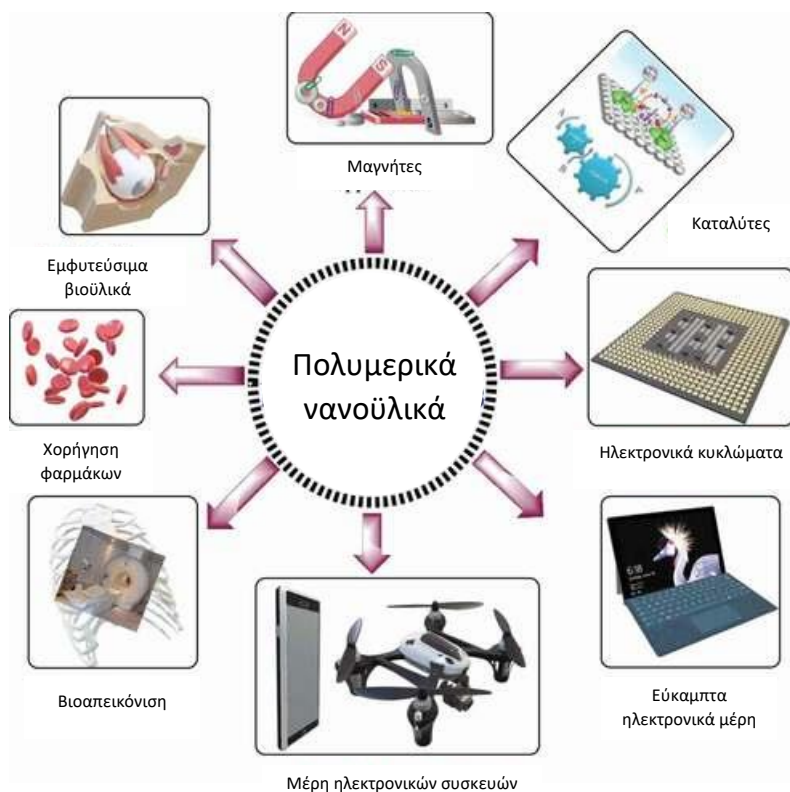
Εικόνα 12 Σχηματική απεικόνιση τεχνικής νανοκαθίζησης [10].



Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση τεχνικής διαχωρισμού με τη βοήθεια αλάτων [10].

2.2.3. Εφαρμογές

Η χρήση πολυμερικών νανοσωματιδίων διεισδύει σε όλο και περισσότερα τεχνολογικά και επιστημονικά πεδία τα τελευταία χρόνια, όπως ηλεκτρονικές συσκευές, κατάλυση, βιοϊατρική κ.α. (Εικόνα 14) [15].



Εικόνα 14 Σύγχρονες εφαρμογές πολυμερικών νανοσωματιδίων [15].

Πιο συγκεκριμένα, ο εγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών σε πολυμερικούς νανοφορείς βρίσκει εφαρμογές κυρίως στην κοσμητολογία και τον ιατροφαρμακευτικό κλάδο ενώ γίνεται προσπάθεια να εισέλθει στον τομέα της επεξεργασίας και συσκευασίας τροφίμων.

Όσον αφορά στη βιοϊατρική, τα πολυμερικά σωματίδια ερευνώνται προκλινικά για τη θεραπεία του καρκίνου (για καρκίνωμα, καρκίνο του ήπατος, των πνευμόνων και των νεφρών) με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της στόχευσης συγκεκριμένων κυττάρων και της παροχής θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου στα καρκινικά κύτταρα [16]–[18]. Εκτός αυτού, εξετάζεται κυρίως *in vitro* η εφαρμογή πολυμερικών νανοσωματιδίων στην αντιμετώπιση ασθενειών του αναπνευστικού και του νευρικού συστήματος και η χρήση τους σε επιδερμικά επιθέματα [3], [19]–[22].

Επιπλέον, αξιοσημείωτη προσπάθεια πραγματοποιείται για ενσωμάτωση των πολυμερικών νανοφορέων στην παραγωγή και κυρίως στη συσκευασία τροφίμων. Συγκεκριμένα, υπάρχει προοπτική εφαρμογής των πολυμερικών νανοφορέων στις ενεργές συσκευασίες, καθώς δύνανται να απελευθερώσουν θρεπτικά ή αντιμικροβιακά συστατικά με σκοπό την βελτιστοποίηση του χρόνου ζωής των τροφίμων. Τα πολυμερή που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για το σκοπό αυτό είναι το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), η φθαλική οξική κυτταρίνη (CAP), η αιθυλοκυτταρίνη, η πολυ(ε-καπρολακτόνη) (PCL), και πολυ(D, L-λακτίδιο-συν-γλυκολίδιο) (PLGA). Αντίστοιχα τα συστατικά που απελευθερώνονται για την παράταση του χρόνου ζωής του τροφίμου είναι κυρίως βιοδραστικές ουσίες πολυφαινόλης, όπως κουρκουμίνη, αιθέρια έλαια, ρεσβερατρόλη κ.α. [4], [5], [23]–[25].

Σε κάθε περίπτωση, η υψηλή δραστηριότητα των νανοϋλικών είναι παράγοντας ανησυχίας για την πρακτική εφαρμογή τους σε ζωντανούς οργανισμούς και κρίνεται αναγκαία η ελεγχόμενη χρήση τους [5], [17], [23]–[25]

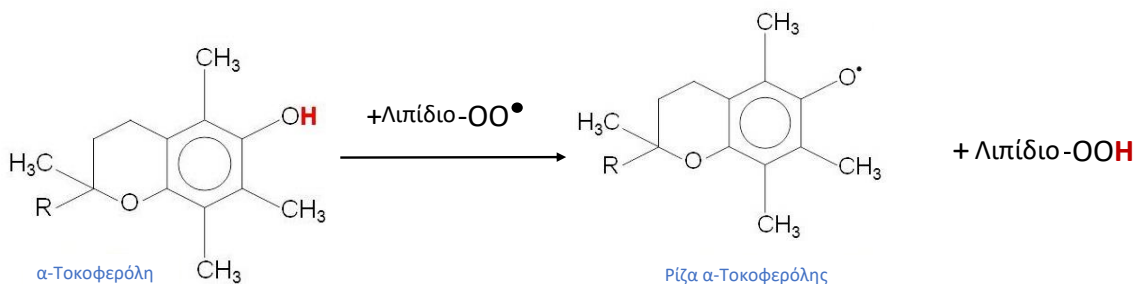
2.3. Βιοδραστικά συστατικά-Αντιοξειδωτικές δραστικές ουσίες

Τα βιοδραστικά συστατικά ερευνώνται σε βάθος τον τελευταίο αιώνα λόγω των πολλαπλών ιδιοτήτων τους και των αποδεδειγμένων οφελών που επιφέρουν

στην υγεία. Μια κατηγορία που έχει προσελκύσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας αλλά και της βιομηχανίας είναι τα αντιοξειδωτικά. Πρόκειται για ουσίες που αντιδρούν με χημικά είδη με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (ελεύθερες ρίζες). Με αυτό τον τρόπο καθυστερούν την οξείδωση άλλων ενώσεων (πρωτεϊνών, υδατανθράκων, DNA κ.α.) και βοηθούν στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα [26]–[28].

Συγκεκριμένα, το οξειδωτικό στρες είναι αποτέλεσμα μιας ανισορροπίας μεταξύ των αντιδραστικών ενώσεων οξυγόνου (συμπεριλαμβανομένων ελευθέρων ριζών) και της αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου. Ως αποτέλεσμα απορυθμίζεται μια σειρά κυτταρικών λειτουργιών και κατ' επέκταση δημιουργούνται προβλήματα στην κυτταρική λειτουργία. Όταν αυτό γίνεται σε επίπεδο οργανισμού οδηγεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Αποδεδειγμένα το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία των περισσότερων καρκίνων, του διαβήτη, καρδιαγγειακών, πνευμονικών και άλλων ασθενειών. Όλα αυτά οδηγούν στην ανάγκη βαθύτερης γνώσης των αντιοξειδωτικών βιοδραστικών ουσιών [27], [28].

Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα βασικά-φυσικά αντιοξειδωτικά και τα δευτερεύοντα-συνθετικά αντιοξειδωτικά. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά αντιδρούν με τις λιπιδικές ρίζες και τις μετατρέπουν σε σταθερά προϊόντα. Απλουστευμένο παράδειγμα αυτής της δράσης παρουσιάζεται στην Εικόνα 15. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι κυρίως φαινολικής δομής και περιλαμβάνουν: μεταλλικά στοιχεία (σελήνιο, χαλκός, σίδηρος κ.α.), βιταμίνες (C, D, E κ.α.) και φυτοχημικά (ενώσεις που δεν κατατάσσονται στις άλλες δύο κατηγορίες) [26].



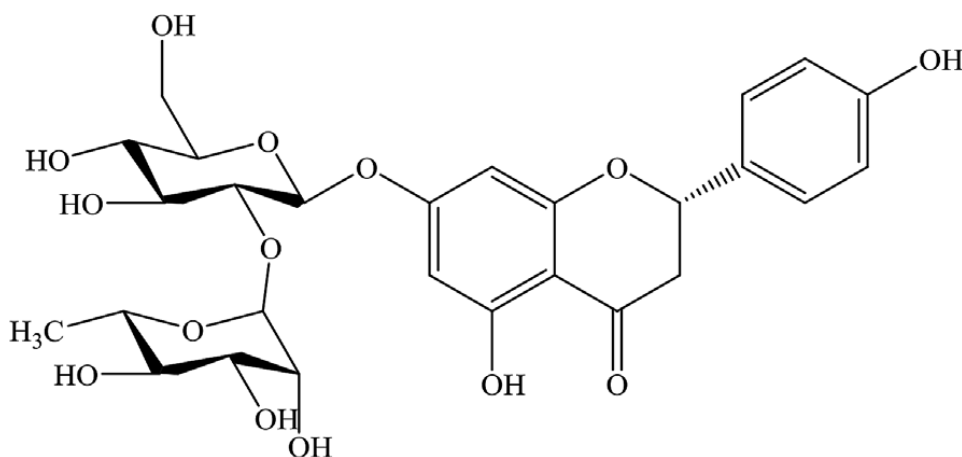
Εικόνα 15 Αντίδραση της α -τοκοφερόλης (οικογένειας βιταμινών E) με λιπιδική ρίζα.

Στα φυτοχημικά περιλαμβάνονται τα φλαβονοειδή, μια κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους που προσδίδουν στα φυτά το χρώμα τους. Πέρα από αυτό, συνδέονται με ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών για την υγεία επιδράσεων και αποτελούν απαραίτητο συστατικό σε μια ποικιλία διατροφικών, φαρμακευτικών και καλλυντικών εφαρμογών. Αυτό οφείλεται στις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητές τους σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να ρυθμίζουν τις βασικές λειτουργίες των κυτταρικών ενζύμων [26], [29].

Τα φλαβονοειδή με τη σειρά τους έχουν αρκετές υποομάδες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις χαλκόνες, τις φλαβόνες, τις φλαβονόλες και τις ισοφλαβόνες. Αυτές οι υποομάδες προέρχονται από διαφορετικά είδη φυτών. Μια σημαντική σειρά φλαβονοειδών είναι αυτά που προέρχονται από εσπεριδοειδή, στα οποία κυριαρχούν οι φλαβόνες. Συγκεκριμένα, τα σημαντικότερα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από εσπεριδοειδή είναι η ναρινγίνη (naringin), η ναρινγενίνη (naringenin), η ναριρουτίνη (narirutin) και η εσπεριδίνη (hesperidin), ουσίες με ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [29], [30].

2.3.1. Ναρινγίνη

Ξεχωριστή θέση μεταξύ των φλαβονοειδών κατέχει η ναρινγίνη, ένα αντιοξειδωτικό αντιφλεγμονώδες που βρίσκεται σε άνθη γκρέιπφρουτ. Ο χημικός της τύπος είναι $C_{27}H_{32}O_{14}$ και η δομή της, η οποία είναι γνωστή από το 1928, απεικονίζεται στην Εικόνα 16 [31].



Εικόνα 16 Χημική δομή ναρινγίνης.

Η ναρινγίνη έχει παρουσιάσει αποτελεσματικότητα στην καταπολέμηση πληθώρας ασθενειών και διαταραχών. Συγκεκριμένα, έχει δείξει να επιδρά ανασταλτικά στα ακόλουθα [32]:

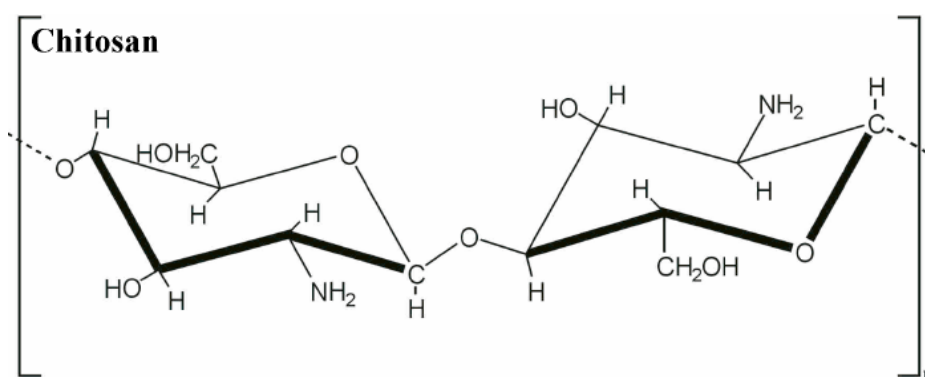
Παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος <ul style="list-style-type: none">• Βήχας και βρογχίτιδα	Παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος <ul style="list-style-type: none">• Αθηροσκλήρωση και άλλες θρομβωτικές διαταραχές• Υπέρταση• Καρδιοτοξικότητα από άλλα φάρμακα• Έμφραγμα του μυοκαρδίου	Μεταβολικά νοσήματα <ul style="list-style-type: none">• Διαβήτης τύπου II• Παχυσαρκία• Διαβητική νευροπάθεια• Υπερλιπιδαιμία	Παθήσεις του νευρικού συστήματος <ul style="list-style-type: none">• Επιληψία• Νόσος του Πάρκινσον• Νόσος του Αλτσχάιμερ• Εγκεφαλικό επεισόδιο• Κάκωση του νωτιαίου μυελού• Κατάθλιψη• Άγχος	
Καρκίνος <ul style="list-style-type: none">• του μαστού• του παχέος εντέρου• του τραχήλου της μήτρας• της ουροδόχου κύστης• του πνεύμονα• του ήπατος• σάρκωμα	Παθήσεις των οστών <ul style="list-style-type: none">• Οστεοπόρωση• Ρευματοειδής αρθρίτιδα• Οδοντική τερηδόνα	Λοιμώξεις <ul style="list-style-type: none">• Σαλμονέλα• Φιλαρίαση• Δάγκειος πυρετός	Οφθαλμικές παθήσεις <ul style="list-style-type: none">• Ραγοειδίτιδα• Καταράκτης	Άλλες παθήσεις <ul style="list-style-type: none">• Ελκώδης κολίτιδα• Δερματίτιδα εξ επαφής• Αλλεργική ρινίτιδα• Γαστρικό έλκος

Το κύριο εμπόδιο για τη χρήση της ναρινγίνης και των αντίστοιχων ενώσεων είναι ότι έχουν πολύ χαμηλή διαλυτότητα σε κοινούς οργανικούς διαλύτες και είναι αδιάλυτες στο νερό [27]. Για το λόγο αυτό, καθώς και για την κάλυψη της πικρής τους γεύσης, την στοχευμένη απελευθέρωση στα κύτταρα στόχους και την μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητάς τους εγκλείονται σε φορείς, όπως προαναφέρθηκε (Υποενότητα 2.1).

2.4. Επικαλύψεις-επιφανειακές τροποποιήσεις χιτοζάνης σε νανοφορείς

2.4.1. Χιτοζάνη-Δομή, ιδιότητες και εφαρμογές

Η χιτοζάνη είναι ένα βιοπολυμερές που παράγεται από την αποακετυλίωση της χιτίνης. Πρόκειται για έναν υψηλής κρυσταλλικότητας κατιονικό γραμμικό πολυσακχαρίτη που βρίσκεται σε αφθονία στη φύση αμέσως μετά την κυτταρίνη [33]–[35]. Η δομή της χιτοζάνης παρουσιάζεται στην Εικόνα 17 [36].



Εικόνα 17 Χημική δομή χιτοζάνης[36].

Η χιτοζάνη ανήκει στα βιοπολυμερή που έχουν τραβήξει την προσοχή τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των πολλαπλών βιολογικών ιδιοτήτων της. Συγκεκριμένα, έχει αντιβακτηριακή, αντιμικροβιακή και αντιμυκητιασική δράση ενώ είναι βιοσυμβατή, μη τοξική και βιοαποικοδομήσιμη [33], [34], [37].

Είναι αξιοσημείωτο ότι η χιτοζάνη συμπεριλαμβάνεται στην κατηγορία GRAS (Generally Recognized As Safe-Γενικά Αναγνωρισμένο ως Ασφαλές) από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA)[35]

Λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων η χιτοζάνη έχει πολλές προοπτικές εφαρμογής στην παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών και συσκευασιών τροφίμων. Αφενός μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συστήματα χορήγησης φαρμάκων και νανοεγκλεισμού και αφετέρου οι μεμβράνες χιτοζάνης έχουν διερευνηθεί ως υλικό συσκευασίας για την παράταση της διάρκειας ζωής ορισμένων τροφίμων [35], [37].

Η δυνατότητα χημικών ή ενζυμικών τροποποιήσεων του βιοπολυμερούς, καθώς και η συμπληρωματική χρήση του με άλλα πολυμερή, προσελκύουν περαιτέρω την επιστημονική κοινότητα, προσφέροντας βελτιωμένες και συνδυασμένες ιδιότητες στα τελικά υλικά. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, τα νανοσωματίδια χιτοζάνης έχουν ήδη ενσωματωθεί σε μεμβράνες, γέλες νανοϊνών και ικριώματα [34], [35].

2.4.2. Χρήση χιτοζάνης για την επικάλυψη-επιφανειακή τροποποίηση νανοφορέων

Όσον αφορά στη νανοτεχνολογία, η χιτοζάνη δεν χρησιμοποιείται μόνο ως μήτρα για τον εγκλεισμό βιοδραστικών ενώσεων, αλλά και ως υλικό επιφανειακής επικάλυψης. Τα επικαλυμμένα σωματίδια παρουσιάζουν βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. αυξημένη υδατοδιαλυτότητα), καλύτερες βλεννοσυγκολλητικές ιδιότητες και διεισδυτικότητα σε ιστούς, ενισχυμένη αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση, προσαρμοσμένη ελεγχόμενη αποδέσμευση και αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα εγκλεισμένης ουσίας. Οι τελικές προσαρμοσμένες ιδιότητες των νανοσωματιδίων σχετίζονται στενά με τις ιδιότητες της χιτοζάνης όπως το μοριακό βάρος, το ιξώδες και ο βαθμός αποακετυλίωσης. Έτσι επιλέγεται το είδος της χιτοζάνης που θα χρησιμοποιηθεί ανάλογα με τις απαιτήσεις για την εκάστοτε εφαρμογή [35].

Αναφορικά με τα υλικά που χρησιμοποιούνται ως μήτρες σε τέτοια συστήματα, πρόκειται κυρίως για ανιονικής φύσης πολυμερή που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τη χιτοζάνη ηλεκτροστατικά. Αυτό οδηγεί σε σχηματισμό νανοσωματιδίων χωρίς τη χρήση άλλων παραγόντων διασύνδεσης [34], [35]

Συμπερασματικά, οι νανοφορείς με επικάλυψη χιτοζάνης παρουσιάζουν ποικιλία πλεονεκτημάτων σε σχέση με τα απλά συστήματα και αποτελούν υποσχόμενα υλικά για αρκετές εφαρμογές. Μερικές από τις ήδη υπάρχουσες προσπάθειες παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Παρόλα αυτά, απαιτείται ο άμεσος προσδιορισμός της *in vitro* και *in vivo* τοξικότητας και ασφάλειας των νανοδομών που βασίζονται σε χιτοζάνη, όπως προαναφέρθηκε (υποενότητα 2.2.3) για όλα τα νανοσυστήματα.

Πίνακας 4 Επικαλυμμένα/τροποποιημένα νανοσυστήματα με χιτοζάνη με εγκλεισμένα φυσικά προϊόντα[35], [38]–[42]

Βιοδραστική ουσία	Νανοφορέας	Χρήση
Κουρκουμίνη	Νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων με επικάλυψη χιτοζάνης	Καταπολέμηση καρκίνου του μαστού <i>in vitro</i>
Πάλιπεριδόνη	Νανοσωματίδια πολυκαπρολακτόνης με επικάλυψη χιτοζάνης	Ελαχιστοποίηση κυτταροτοξικότητας και οξειδωτικού στρες
Ρεσβερατρόλη	Μικκύλια ελαϊκού οξέος επικαλυμμένα με PLGA και χιτοζάνη	Ενισχυμένη αποτελεσματικότητα στον εγκέφαλο μέσω ρινικής χορήγησης και αυξημένη νευροπροστατευτική δράση
Βουτυρικό οξύ	Λιποσώματα με επικάλυψη χιτοζάνης	Αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδης δράση σε κύτταρα HepG2 ανθρώπινου ηπατώματος
Αμφοτερικίνη Β και δοξορουβικίνη	Νανοσωματίδια PLGA με επικάλυψη χιτοζάνης	Αυξημένη αποτελεσματικότητα κατά της λείσμανιασης <i>in vitro</i>
Φερουλικό οξύ	Νανοσωματίδια PLGA με επικάλυψη χιτοζάνης	Πολλά υποσχόμενοι φορείς για την ελεγχόμενη απελευθέρωση φερουλικού οξέος με χορήγηση από το στόμα
Φορσκολίνη	Νανοσωματίδια PLGA με επικάλυψη χιτοζάνης	αυξημένη αποτελεσματικότητα μετά από ενστάλαξη στη μείωση της ενδοφθάλμιας πίεσης

2.5. Βιβλιογραφία

- [1] "Nanotechnology-Over a Decade of Progress and Innovation," 2020. Accessed: Apr. 25, 2022. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/media/140395/download>
- [2] S. D. F. Mihindukulasuriya and L.-T. Lim, "Nanotechnology development in food packaging: A review," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 40, no. 2, pp. 149–167, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.009>
- [3] R. Sandhir, A. Yadav, A. Sunkaria, and N. Singhal, "Nano-antioxidants: An emerging strategy for intervention against neurodegenerative conditions," *Neurochemistry International*, vol. 89, pp. 209–226, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.08.011>
- [4] C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, Ribeiro António J., and F. Veiga, "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 2, no. 1, pp. 8–21, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- [5] S. Sahani and Y. C. Sharma, "Advancements in applications of nanotechnology in global food industry," *Food Chemistry*, vol. 342, p. 128318, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128318>
- [6] M. A. Cerqueira, A. A. Vicente, and L. M. Pastrana, "Nanotechnology in Food Packaging: Opportunities and Challenges," in *Nanomaterials for Food Packaging*, M. Â. P. R. Cerqueira, J. M. Lagaron, L. M. Pastrana Castro, and A. A. M. de Oliveira Soares Vicente, Eds. Elsevier, 2018, pp. 1–11. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51271-8.00001-2>
- [7] S. S. Guterres, M. P. Alves, and A. R. Pohlmann, "Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications," *Drug Target Insights*, vol. 2, p. 117739280700200000, 2007, doi: 10.1177/117739280700200002.

- [8] M. Kesente *et al.*, "Encapsulation of Olive Leaves Extracts in Biodegradable PLA Nanoparticles for Use in Cosmetic Formulation," *Bioengineering*, vol. 4, no. 3, 2017, doi: 10.3390/bioengineering4030075.
- [9] M. Roussaki *et al.*, "Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 108, pp. 182–187, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.08.004>
- [10] A. Zielińska *et al.*, "Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology," *Molecules*, vol. 25, no. 16, 2020, doi: 10.3390/molecules25163731.
- [11] A. A. Yaqoob *et al.*, "Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review," *Frontiers in Chemistry*, vol. 8, 2020, doi: 10.3389/fchem.2020.00341.
- [12] S. M. A. Sadat, S. T. Jahan, A. Haddadi, and others, "Effects of size and surface charge of polymeric nanoparticles on in vitro and in vivo applications," *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, vol. 7, no. 02, p. 91, 2016.
- [13] K. Kızılbey, "Optimization of Rutin-Loaded PLGA Nanoparticles Synthesized by Single-Emulsion Solvent Evaporation Method," *ACS Omega*, vol. 4, no. 1, pp. 555–562, 2019, doi: 10.1021/acsomega.8b02767.
- [14] G. Suffredini, J. East, and L. Levy, "New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging," *AJNR Am J Neuroradiol*, vol. 35, Apr. 2013, doi: 10.3174/ajnr.A3543.
- [15] C. Adhikari, "Polymer nanoparticles-preparations, applications and future insights: a concise review," *Polymer-Plastics Technology and Materials*, vol. 60, no. 18, pp. 1996–2024, 2021, doi: 10.1080/25740881.2021.1939715.
- [16] R. R. Remya *et al.*, "Role of Nanoparticles in Biodegradation and Their Importance in Environmental and Biomedical Applications," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2022, p. 6090846, 2022, doi: 10.1155/2022/6090846.

- [17] C. Englert *et al.*, "Pharmapolymers in the 21st century: Synthetic polymers in drug delivery applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 87, pp. 107–164, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.07.005>
- [18] E. T. Baran, N. Özer, and V. Hasirci, "Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an in vitro study," *Journal of Microencapsulation*, vol. 19, no. 3, pp. 363–376, 2002, doi: 10.1080/02652040110105355.
- [19] D. Yoo, K. Guk, H. Kim, G. Khang, D. Wu, and D. Lee, "Antioxidant polymeric nanoparticles as novel therapeutics for airway inflammatory diseases," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 450, no. 1, pp. 87–94, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.028>
- [20] M. P. Vinardell and M. Mitjans, "Nanocarriers for Delivery of Antioxidants on the Skin," *Cosmetics*, vol. 2, no. 4, pp. 342–354, 2015, doi: 10.3390/cosmetics2040342.
- [21] A. Vogt, C. Wischke, A. T. Neffe, N. Ma, U. Alexiev, and A. Lendlein, "Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges?," *Journal of Controlled Release*, vol. 242, pp. 3–15, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.027>
- [22] L. F. Santos, I. J. Correia, A. S. Silva, and J. F. Mano, "Biomaterials for drug delivery patches," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 118, pp. 49–66, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.03.020>
- [23] V. G. L. Souza and A. L. Fernando, "Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food—A review," *Food Packaging and Shelf Life*, vol. 8, pp. 63–70, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.04.001>
- [24] P. R. Salgado, L. di Giorgio, Y. S. Musso, and A. N. Mauri, "Recent Developments in Smart Food Packaging Focused on Biobased and Biodegradable Polymers," *Frontiers in Sustainable Food Systems*, vol. 5, 2021, doi: 10.3389/fsufs.2021.630393.

- [25] L. Kuai, F. Liu, B.-S. Chiou, R. J. Avena-Bustillos, T. H. McHugh, and F. Zhong, "Controlled release of antioxidants from active food packaging: A review," *Food Hydrocolloids*, vol. 120, p. 106992, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106992>
- [26] A. Rasheed and R. F. A. Azeez, "A Review on Natural Antioxidants," in *Traditional and Complementary Medicine*, C. Mordeniz, Ed. Rijeka: IntechOpen, 2019. doi: 10.5772/intechopen.82636.
- [27] M. Chatzidaki *et al.*, "β-Cyclodextrin as carrier of novel antioxidants: A structural and efficacy study," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 603, p. 125262, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125262>
- [28] V. Sindhi, V. Gupta, K. Sharma, S. Bhatnagar, R. Kumari, and N. Dhaka, "Potential applications of antioxidants – A review," *Journal of Pharmacy Research*, vol. 7, no. 9, pp. 828–835, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>
- [29] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra, "Flavonoids: an overview," *Journal of Nutritional Science*, vol. 5, p. e47, Dec. 2016, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [30] E. Tripoli, M. la Guardia, S. Giammanco, D. di Majo, and M. Giammanco, "Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review," *Food Chemistry*, vol. 104, no. 2, pp. 466–479, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.054>
- [31] S. Ahmed, H. Khan, M. Aschner, M. M. Hasan, and S. T. S. Hassan, "Therapeutic potential of naringin in neurological disorders," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 132, p. 110646, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110646>
- [32] S. Bharti, N. Rani, B. Krishnamurthy, and D. S. Arya, "Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review," *Planta Med*, vol. 80, no. 06, pp. 437–451, 2014.

- [33] G. C. Feyzioglu and F. Tornuk, "Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications," *LWT*, vol. 70, pp. 104–110, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.037>
- [34] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, and H. Ni, "Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 90, pp. 21–27, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>
- [35] A. Detsi *et al.*, "Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products: The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 7, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12070669.
- [36] J. García, M. Lehocký, P. Humpolíček, and P. Saha, "HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation," *J Funct Biomater*, vol. 5, pp. 43–57, Apr. 2014, doi: 10.3390/jfb5020043.
- [37] A. R. N. Pontillo, S. Koutsoukos, T. Welton, and A. Detsi, "Investigation of the influence of natural deep eutectic solvents (NaDES) in the properties of chitosan-stabilised films," *Materials Advances*, vol. 2, no. 12, pp. 3954–3964, 2021.
- [38] V. Quagliariello *et al.*, "Chitosan-coated liposomes loaded with butyric acid demonstrate anticancer and anti-inflammatory activity in human hepatoma HepG2 cells," *Oncol Rep*, vol. 41, no. 3, pp. 1476–1486, Mar. 2019, doi: 10.3892/or.2018.6932.
- [39] I. A. de Lima, N. M. Khalil, T. T. Tominaga, A. Lechanteur, B. Sarmiento, and R. M. Mainardes, "Mucoadhesive chitosan-coated PLGA nanoparticles for oral delivery of ferulic acid," *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol. 46, no. sup2, pp. 993–1002, 2018, doi: 10.1080/21691401.2018.1477788.
- [40] G.-E. Fathy Abd-Elatef *et al.*, "Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Bypass P-Glycoprotein Mediated Doxorubicin Resistance in Triple Negative

- Breast Cancer Cells," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 2, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12020096.
- [41] V. Trotta *et al.*, "Brain targeting of resveratrol by nasal administration of chitosan-coated lipid microparticles," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 127, pp. 250–259, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.010>
- [42] N. Khan, A. Meeduzzafar, K. Khanna, A. Bhatnagar, F. J. Ahmad, and A. Ali, "Chitosan coated PLGA nanoparticles amplify the ocular hypotensive effect of forskolin: Statistical design, characterization and in vivo studies," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 116, pp. 648–663, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.122>

3.1. Τεχνολογική στάθμιση

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με την ενζυμική σύνθεση του PBS είναι αρκετά περιορισμένη [1]–[4]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στην πλειοψηφία των διαθέσιμων ερευνητικών εργασιών επιλέγεται η συμβατική μέθοδος χημικής σύνθεσης του PBS. Εστιάζοντας στις δημοσιευμένες εργασίες ενζυμικού πολυμερισμού του PBS, διαπιστώνεται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτείται μεγάλος αριθμός διαλυτών (π.χ. διφαινυλαιθέρας, χλωροφόρμιο) για την ολοκλήρωση της διεργασίας και την παραλαβή του τελικού στερεού προϊόντος. Αυτό δυσχεραίνει την κλιμάκωση της εκάστοτε διεργασίας και μειώνει τις πιθανότητες για ένα φιλικό προς το περιβάλλον τελικό υλικό [2], [3]. Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα, διαπιστώνεται ότι ένας από τους περιορισμούς της ενζυμικής κατάλυσης είναι η δυσκολία απόκτησης πολυεστέρων κατάλληλου μοριακού βάρους για τη μετέπειτα επεξεργασία και χρήση τους [2]. Επομένως υπάρχει η αναγκαιότητα εύρεσης και ανάπτυξης μιας φιλικής προς το περιβάλλον διεργασίας, με τη χρήση ελάχιστων ή και καθόλου διαλυτών, παραγωγής oligομερών με ελεγχόμενο μοριακό βάρος και κρυσταλλικότητα, τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και σε εξειδικευμένες βιοϊατρικές εφαρμογές π.χ. σε συστήματα αποδέσμευσης φαρμάκων, όπου απαιτούνται υψηλοί ρυθμοί αποικοδόμησης του πολυμερούς [5].

Όσον αφορά τον συνδυασμό ενζυμικής κατάλυσης του PBS με κάποιου είδους μετεπεξεργασία, η βιβλιογραφία είναι ακόμα πιο περιορισμένη. Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα είναι ο συνδυασμός της ενζυμικής σύνθεσης με πολυμερισμό στερεάς κατάστασης (SSP). Ο συνδυασμός ενζυμικής σύνθεσης και SSP έχει εξεταστεί για διάφορους πολυεστέρες όπως PE 8.12, PE 8.14 και PBS. Για την παραγωγή μερικώς ανανεώσιμων πολυεστέρων PE 8.12 και PE 8.14 έχει προταθεί ο εξής κύκλος: ένα στάδιο προπολυμερισμού καταλυόμενο από λιπάση, σε συνδυασμό με ένα στάδιο μεταπολυμερισμού χαμηλής θερμοκρασίας, σε κατάσταση τήγματος ή στερεού [6].

Πιο συγκεκριμένα, για το PBS έχει εξεταστεί διαδικασία δύο σταδίων: (1) ενζυμικός προπολυμερισμός υπό κενό, με διφαινυλαιθέρα ως διαλύτη και N435 ως βιοκαταλύτη και (2) στάδιο μεταπολυμερισμού χαμηλής θερμοκρασίας για την αναβάθμιση των ιδιοτήτων του [7].

Εκτός αυτών, τα τελευταία χρόνια, αυξάνεται ο αριθμός των άρθρων που αφορούν τις εφαρμογές συμβατικού PBS στη συσκευασία τροφίμων και στη νανοτεχνολογία. Οι ιδιότητες του PBS το καθιστούν κατάλληλο για νανοεγκλεισμό δραστικών ουσιών και χρήση στην ενεργή συσκευασία, ένα σύγχρονο τρόπο για την παράταση του χρόνου ζωής των τροφίμων [1], [8]–[10]. Παρόλα αυτά, αμφισβητείται η ασφάλεια του χημικά συντεθειμένου PBS για τέτοιες εφαρμογές και η αγορά στρέφεται προς τα βιοπολυμερή [9]. Συνολικά, οι εφαρμογές ενζυμικά συντεθειμένου PBS δεν έχουν εξεταστεί εκτενώς, πόσο μάλλον η σύνθεση νανοφορέων για χρήση σε συσκευασίες τροφίμων [3], [8], [10].

3.2. Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στον συνδυασμό της ενζυμικής σύνθεσης προπολυμερούς PBS με τον μεταπολυμερισμό με στόχο την αναβάθμιση των ιδιοτήτων τους (μοριακό βάρος και θερμικές ιδιότητες). Ο μεταπολυμερισμός εξετάζεται σε μορφή SSP σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αλλά και ως μεταπολυμερισμός τήγματος. Μέσω της μελέτης αυτής παραλαμβάνονται προϊόντα που δεν φέρουν υπολείμματα μεταλλικών καταλυτών ή παραπροϊόντα που προέρχονται από θερμική υποβάθμιση και επομένως είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν σε βιοεφαρμογές και ενεργές συσκευασίες τροφίμων.

Σε αυτά τα πλαίσια, το παραγόμενο πολυμερές χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό του αντιοξειδωτικού ναρινγίνη σε μορφή νανοσφαιρών με την τεχνική απλού γαλακτώματος και εξάτμισης διαλύτη. Για λόγους σύγκρισης, σχηματίζονται οι αντίστοιχες νανοσφαίρες και με εμπορικό PBS.

Στόχος είναι ο σχηματισμός σταθερών νανοσωματιδίων που να εμποδίζουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων, ενώ παράλληλα θα διαθέτουν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά μεγέθους και διασποράς, και ικανοποιητικές αποδόσεις

εγκλεισμού και διεργασίας. Πιθανή μελλοντική χρήση των προϊόντων αποτελεί η ενσωμάτωσή τους σε ενεργές συσκευασίες τροφίμων.

3.3. Βιβλιογραφία

- [1] S. A. Rafiqah *et al.*, "A Review on Properties and Application of Bio-Based Poly(Butylene Succinate)," *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 9, 2021, doi: 10.3390/polym13091436.
- [2] C. Gkountela, M. Rigopoulou, E. M. Barampouti, and S. Vouyiouka, "Enzymatic prepolymerization combined with bulk post-polymerization towards the production of bio-based polyesters: The case of poly(butylene succinate)," *Eur Polym J*, vol. 143, p. 110197, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110197>
- [3] O. Platnieks, S. Gaidukovs, V. Kumar Thakur, A. Barkane, and S. Beluns, "Bio-based poly (butylene succinate): Recent progress, challenges and future opportunities," *Eur Polym J*, vol. 161, p. 110855, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110855>
- [4] J. W. Comerford *et al.*, "Thermal upgrade of enzymatically synthesized aliphatic and aromatic oligoesters," *Materials*, vol. 13, no. 2, p. 368, 2020.
- [5] J. Zhou *et al.*, "Enhanced mechanical properties and degradability of poly (butylene succinate) and poly (lactic acid) blends," *Iranian Polymer Journal*, vol. 22, no. 4, pp. 267–275, 2013.
- [6] S. N. Vouyiouka, E. Topakas, A. Katsini, C. D. Papaspyrides, and P. Christakopoulos, "A Green Route for the Preparation of Aliphatic Polyesters via Lipase-catalyzed Prepolymerization and Low-temperature Postpolymerization," *Macromol Mater Eng*, vol. 298, no. 6, pp. 679–689, 2013.
- [7] M. Kanelli *et al.*, "Production of biodegradable polyesters via enzymatic polymerization and solid state finishing," *J Appl Polym Sci*, vol. 131, no. 19, 2014.

- [8] "Development of active, intelligent and sustainable food PACKaging using PolybutyleneSUCCLnate," 2014. Accessed: Apr. 23, 2022. [Online]. Available: <https://cordis.europa.eu/project/id/289196/reporting>
- [9] P. R. Salgado, L. di Giorgio, Y. S. Musso, and A. N. Mauri, "Recent Developments in Smart Food Packaging Focused on Biobased and Biodegradable Polymers," *Front Sustain Food Syst*, vol. 5, 2021, doi: 10.3389/fsufs.2021.630393.
- [10] L. Kuai, F. Liu, B.-S. Chiou, R. J. Avena-Bustillos, T. H. McHugh, and F. Zhong, "Controlled release of antioxidants from active food packaging: A review," *Food Hydrocoll*, vol. 120, p. 106992, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106992>

Κεφάλαιο 4: Πειραματικό μέρος

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο αναφέρονται οι πρώτες ύλες που επιλέχθηκαν, οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επίτευξη του σκοπού της διπλωματικής εργασίας. Στη συνέχεια αναφέρονται οι μέθοδοι χαρακτηρισμού που εφαρμόστηκαν στα ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα.

4.1. Ενζυμικός προπολυμερισμός

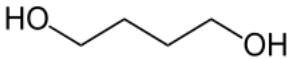
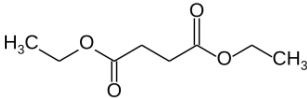
4.1.1. Υλικά

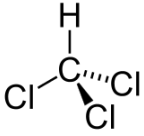
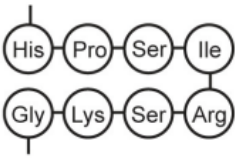
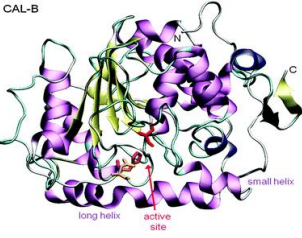
Τα μονομερή που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) (PBS) στο στάδιο του ενζυμικού προπολυμερισμού είναι η 1,4-βουτανοδιόλη (1,4-BDO) και ο ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας (DES). Και τα δύο μονομερή βρίσκονται σε υγρή μορφή υπό συνθήκες περιβάλλοντος.

Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η ακινητοποιημένη εμπορική λιπάση B του μύκητα *Candida antarctica* B (Novozym® 435, N435) και ως διαλύτης του PBS χρησιμοποιείται το χλωροφόρμιο. Σημαντική διαφορά σε σχέση με την συμβατική παραγωγή PBS είναι πως χρησιμοποιείται ο εστέρας του ηλεκτρικού οξέος αντί για το ίδιο το οξύ. Αυτό συμβαίνει καθώς το συγκεκριμένο ένζυμο παρουσιάζει εξειδίκευση σε υποστρώματα εστέρων [1].

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται βασικές πληροφορίες για τα αντιδραστήρια.

Πίνακας 5 Βασικές πληροφορίες αντιδραστηρίων για την ενζυμική παραγωγή PBS[1], [2]

Αντιδραστήριο	Τύπος	Δομή	Προμηθευτής	Χαρακτηριστικά
1,4-βουτανοδιόλη (1,4-BDO)	C ₄ H ₁₀ O ₂		Alfa Aesar	Καθαρότητας 99%
Ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας (DES)	C ₈ H ₁₄ O ₄		Alfa Aesar	Καθαρότητας 98%

Χλωροφόρμιο	CHCl_3		Sigma Aldrich	Καθαρότητας $\geq 99,8\%$
Ακινητοποιημένο ένζυμο Novozym® 435, N435			Novozymes	-Ενεργότητα: 10000 PLU/g -Βέλτιστες συνθήκες: pH 5-9, 30-60°C -Υπόστρωμα: Εστέρες και αλκοόλες

4.1.2. Όργανα και συσκευές

- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotavapor R-210, Buchi)
- Θερμόμετρο υδραργύρου (τοποθετημένο μέσα στο λουτρό για μεγαλύτερη ακρίβεια στη μέτρηση της θερμοκρασίας)
- Σφαιρική φιάλη των 200 mL
- Σύστημα διήθησης υπό κενό
- Ξηραντήρας συνδεδεμένος με αντλία υψηλού κενού-Rotary pump RV5, Edwards Vacuum)

4.1.3. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, ζυγίζεται συγκεκριμένη ποσότητα μονομερών 1,4-BDO και DES ώστε να υπάρχει στοιχειομετρική αναλογία 1:1 (0,12 mole από το καθένα). Τα μονομερή στη συνέχεια τοποθετούνται στη σφαιρική φιάλη των 200 ml. Αυτή με τη σειρά της συνδέεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα για να γίνει η προανάδευση των μη αναμίξιμων υγρών στους 40°C για μισή ώρα. Έτσι παραλαμβάνεται ένα ομοιογενές μίγμα.

Έπειτα, προστίθεται το ένζυμο N435 σε ποσότητα ίση με το 10% της συνολικής μάζας των μονομερών. Αυτή τη χρονική στιγμή ξεκινάει ο πολυμερισμός, ο οποίος πραγματοποιείται σε δύο στάδια: αρχικά στους 40°C, σε ατμοσφαιρική

πίεση για 24 ώρες και στη συνέχεια στους 90°C, σε μειωμένη πίεση 20 mbar για 2 ώρες. Οι συνθήκες του δεύτερου σταδίου καθορίστηκαν μετά από σχετική διερεύνηση προηγούμενης έρευνας του εργαστηρίου σε μικρότερη κλίμακα [3]. Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της αντίδρασης το μίγμα μετατρέπεται από ένα λεπτόρρευστο σε ένα παχύρρευστο υγρό ενώ το τελικό προϊόν του δεύτερου σταδίου είναι ένα λευκό στερεό που συνυπάρχει με το ένζυμο. Η διάταξη φαίνεται στην Εικόνα 18.



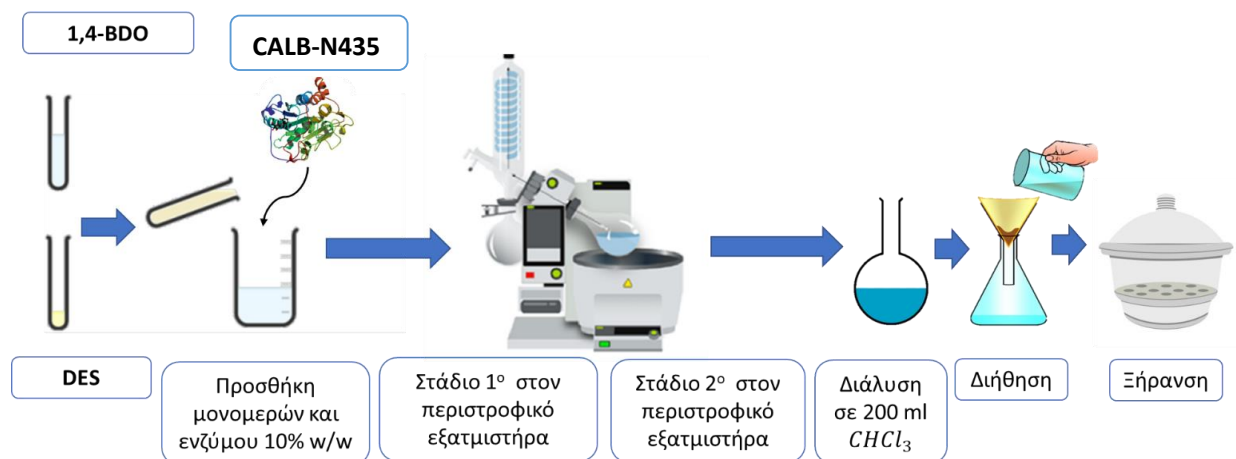
Εικόνα 18 Πειραματική διάταξη περιστροφικού εξατμιστήρα με συνδεδεμένη αντλία κενού.

Μετά το πέρας και του δεύτερου σταδίου, η σφαιρική φιάλη απομακρύνεται από τον περιστροφικό εξατμιστήρα και προστίθενται 200 ml χλωροφορμίου ώστε να διαλυθεί το PBS. Η πλήρης διαλυτοποίηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια ήπιας μαγνητικής ανάδευσης.

Έπειτα, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό ώστε να απομακρυνθεί το ένζυμο από το διάλυμα χλωροφορμίου-προϊόντος. Το διήθημα τοποθετείται στον απαγωγό ώστε να εξατμιστεί η μεγαλύτερη ποσότητα του χλωροφορμίου. Μετά

από 24 ώρες το δείγμα μεταφέρεται σε ξηραντήρα συνδεδεμένο με αντλία υψηλού κενού μέχρι να απομακρυνθούν υπολειπόμενα ίχνη διαλύτη.

Η πειραματική διαδικασία του ενζυμικού προπολυμερισμού παρουσιάζεται συνοπτικά στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19 Πειραματική διαδικασία ενζυμικού προπολυμερισμού PBS.

Η απόδοση της ενζυμικής σύνθεσης των προπολυμερών υπολογίζεται με βάση την Εξίσωση 1:

Εξίσωση 1 Απόδοση διεργασίας προπολυμερισμού

$$\text{Απόδοση διεργασίας (\%)} = \frac{W_{\text{πειραματικό}}}{W_{\text{θεωρητικό}}} 100\%$$

Όπου $w_{\text{πειραματικό}}$ η παραλαμβανόμενη μάζα του προϊόντος (g) και $w_{\text{θεωρητικό}}$ η θεωρητική μάζα του προϊόντος με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης (g).

4.2. Μεταπολυμερισμός

4.2.1. Υλικά

Για το πείραμα του μεταπολυμερισμού τήγματος χρησιμοποιείται το ενζυμικά συντεθειμένο προπολυμερές (PBS) όπως παραλαμβάνεται μέσω της πειραματικής διαδικασίας που περιγράφεται στην παράγραφο 4.1.3.

4.2.2. Όργανα και συσκευές

- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotavapor R-210, Buechi)

- Θερμόμετρο υδραργύρου (τοποθετημένο μέσα στο λουτρό για μεγαλύτερη ακρίβεια στη μέτρηση της θερμοκρασίας)
- Σφαιρική φιάλη των 5 mL

4.2.3. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, ζυγίζεται συγκεκριμένη ποσότητα προπολυμερούς (1g) και τοποθετείται στη σφαιρική φιάλη των 5 ml. Η σφαιρική φιάλη συνδέεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα όπου πραγματοποιείται προκρυστάλλωση στους 90°C για δύο ώρες σε μειωμένη πίεση (20 mbar), όταν πρόκειται να ακολουθήσει μεταπολυμερισμός στερεάς κατάστασης.

Έπειτα αυξάνεται η θερμοκρασία για την επίτευξη του μεταπολυμερισμού. Διερευνήθηκαν διάφορες συνθήκες μεταπολυμερισμού στερεάς κατάστασης (SSP) και μεταπολυμερισμού τήγματος (melt) και συνδυασμοί τους (Πίνακας 6).

Πίνακας 6 Συνθήκες διερεύνησης μεταπολυμερισμού

Δείγμα	Συνθήκες SSP	Συνθήκες melt
S8_95	8h, 95°C	-
S2_M2	2h, 100°C	2h, 100°C
S2_M4	2h, 100°C	4h, 100°C
S2_M6	2h, 100°C	6h, 100°C
M4_110	-	4h, 110°C

*Ονομασία δειγμάτων: **SX_Y** και **MZ_W** όπου **S**: το δείγμα υπέστη SSP, **M**: το δείγμα υπέστη μεταπολυμερισμό τήγματος, **X**: χρόνος σε h του SSP, **Y**: θερμοκρασία σε °C του SSP, **Z**: ο χρόνος σε h του μεταπολυμερισμού τήγματος, **W**: θερμοκρασία σε °C του μεταπολυμερισμού τήγματος. Για τα δείγματα που γίνεται συνδυασμός μεθόδων δεν αναγράφεται η θερμοκρασία καθώς είναι σε όλες τις περιπτώσεις 100°C.

4.3. Εγκλεισμός ναρινγίνης σε νανοσφαίρες PBS

4.3.1. Υλικά

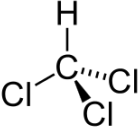
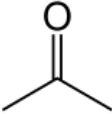
Το πολυμερές που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των νανοφορέων είναι PBS που συντέθηκε ενζυμικά, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 4.1.3. Επιπλέον για λόγους σύγκρισης ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται και εμπορικό PBS (Natureplast PBE003, film grade). Εντός αυτών των φορέων εγκλείεται η βιοδραστική ουσία ναρινγίνη (Nar-Naringin Hydrate).

Εκτός αυτών, χρησιμοποιείται πολυβινυλική αλκοόλη (PVA) ως γαλακτωματοποιητής, χλωροφόρμιο ως διαλύτης του PBS, ακετόνη ως διαλύτης της ναρινγίνης και απεσταγμένο νερό.

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται βασικές πληροφορίες για τα αντιδραστήρια.

Πίνακας 7 Βασικές πληροφορίες αντιδραστηρίων για τον σχηματισμό νανοφορέων PBS με εγκλεισμένη ναρινγίνη

Αντιδραστήριο	Τύπος	Δομή	Προμηθευτής	Χαρακτηριστικά
Ενζυμικά συντεθειμένο PBS	$(C_8H_{12}O_4)_n$		-	MW= 1700 g/mol
Χημικά συντεθειμένο εμπορικό PBS PBE003 , film grade	$(C_8H_{12}O_4)_n$		Natureplast	MW= 13800 g/mol
Ναρινγίνη	$C_{27}H_{32}O_{14}$		Tokyo Chemical Industry	MW= 580,54 g/mol
Πολυβινυλική αλκοόλη (PVA)	$(C_2H_4O)_n$		Biochemica	MW= 72000 g/mol Βαθμός υδρόλυσης 85-89%

Χλωροφόρμιο	CHCl_3		Sigma Aldrich	Καθαρότητας $\geq 99,8\%$
Ακετόνη	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$		Καλογερόπου λος χημικά Α.Ε.	Καθαρότητας $\geq 99,5\%$

4.3.2. Όργανα και συσκευές

- Αναδευτήρας Τύπου Vortex
- Συσκευή Υπερήχων (Hielscher Ultrasonics GmbH, UP100H)
- Επωαστήρας (Temperature Controlled Shaker Gallenkamp)
- Συσκευή Φυγοκέντρησης (Hitachi High-Speed Refrigerated Centrifuge Model CR22N/ CR21N)
- Κεφαλή Φυγοκέντρησης (Hitachi 46,R20A2, 20 000 RPM)
- Συσκευή Λυοφιλοποίησης (B. Braun Biotech International, Chris Alpha 1-4)

4.3.3. Πειραματική διαδικασία

Η τεχνική που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των νανοσωματιδίων από PBS (με και χωρίς εγκλεισμένη ναρινγίνη) είναι αυτή του απλού γαλακτώματος και εξάτμισης διαλύτη.

4.3.3.1. Εγκλεισμός Ναρινγίνης σε πολυμερικά Νανοσωματίδια (Loaded NPs)

Αρχικά, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PVA) περιεκτικότητας 1% w/v με σκοπό τη χρήση του ως υδατική/συνεχή φάση για τις δοκιμές εγκλεισμών.

Παρασκευάζεται η οργανική φάση, η οποία στην περίπτωση των κενών NPs, αποτελείται μόνο από το διαλυμένο PBS. Ζυγίζονται 300 mg στερεού PBS, το οποίο τοποθετείται σε φιαλίδιο με 30 mL χλωροφορμίου. Το φιαλίδιο υπόκειται σε ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων. Επιπλέον, ζυγίζονται 120 mg ναρινγίνης

(ποσοστιαία φόρτωση ίση με 40 % w/w)-για κάθε δοκιμή και τοποθετείται σε φιαλίδιο. Προστίθενται 9 mL ακετόνης και υπόκειται σε ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων. Στη συνέχεια, αναμιγνύεται με το διαλυμένο PBS και σχηματίζεται η οργανική φάση.

Τα 39 mL οργανικής φάσης αναμιγνύονται με 150mL υδατικής φάσης (1% w/v PVA), σε ποτήρι ζέσεως. Το μίγμα τοποθετείται απευθείας σε παγόλουτρο (για την εξασφάλιση της ψύξης του συστήματος κατά τη γαλακτωματοποίηση) και στο Sonication Probe με δυναμικότητα 160 Watt για 6 λεπτά. Το γαλάκτωμα που σχηματίζεται, τοποθετείται για 24 ώρες σε επωαστήρα (θερμοκρασία 37 °C, 100 rpm), ώστε να εξατμιστεί ο οργανικός διαλύτης και να σχηματισθούν τα νανοσωματίδια.

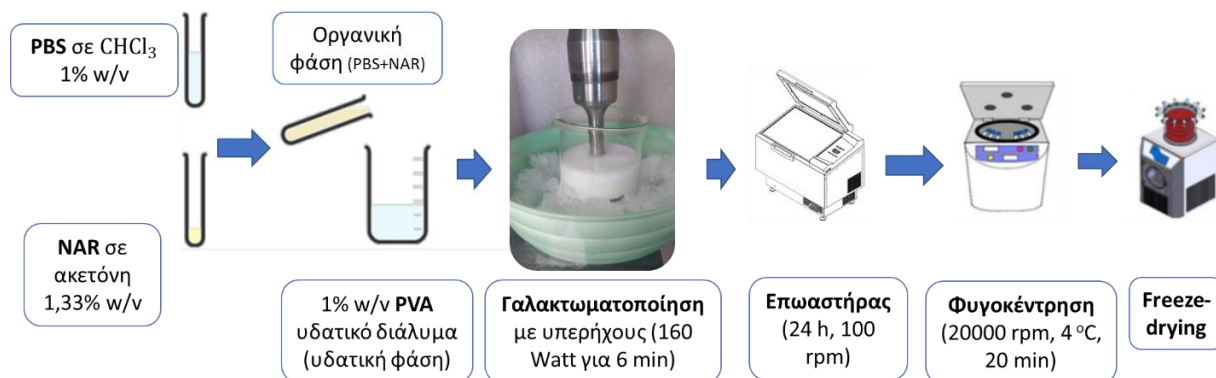
Η διεργασία απομόνωσης των NPs πραγματοποιείται με τη βοήθεια διάταξης φυγοκέντρησης. Η διασπορά των NPs, με συμπλήρωση από απιονισμένο νερό, τοποθετείται εντός πλαστικών σωληνάρων τύπου Oak Ridge των 50 mL. Η υπερφυγόκεντρος ρυθμίζεται στις 20000 στροφές (rpm) για λειτουργία 20 λεπτών σε θερμοκρασία 4°C. Μετά τη διαδικασία της φυγοκέντρησης σχηματίζεται στρώση στερεών πολυμερικών σωματιδίων στο τοίχωμα των σωληνάρων και τα υπερκείμενα τα υπερκείμενα υγρά μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως και φυλάσσονται για τον υπολογισμό της απόδοσης με έμμεσο τρόπο. Προστίθεται απιονισμένο νερό για την επαναδιασπορά των σωματιδίων με τη βοήθεια αναδευτήρα Vortex. Έπειτα, προστίθεται απιονισμένο νερό στα σωληνάρια ώστε να είναι κοινή η μάζα τους και επαναλαμβάνεται η διαδικασία φυγοκέντρησης-έκπλυσης μέχρι τα υπερκείμενα να είναι διαυγή.

4.3.3.2. Παρασκευή κενών πολυμερικών Νανοσωματιδίων (Blank NPs)

Η διαδικασία παρασκευής των κενών NPs είναι παρόμοια με την προαναφερθείσα των φορτωμένων NPs. Συγκεκριμένα, οι βασικές διαφοροποιήσεις εμφανίζονται μόνο στα εξής σημεία:

- I. Όσον αφορά την οργανική φάση, πριν τη γαλακτοματοποίηση δεν περιέχει ναρινγίνη.
- II. Κατά τη διεργασία της φυγοκέντρησης, τα υπερκείμενα υγρά απορρίπτονται.

Η πειραματική διαδικασία του σχηματισμού των νανοσωματιδίων με την τεχνική απλού γαλακτώματος και εξάτμισης διαλύτη παρουσιάζεται συνοπτικά στην Εικόνα 20.



Εικόνα 20 Πειραματική διαδικασία σχηματισμού των νανοσωματιδίων με την τεχνική απλού γαλακτώματος και εξάτμισης διαλύτη.

Από το άθροισμα των αρχικών ποσοτήτων του PBS και της προς εγκλεισμό ένωσης καθώς και από τη ποσότητα σωματιδίων που ανακτάται, μπορεί να υπολογιστεί η απόδοση διεργασίας από την Εξίσωση 2:

$$\text{Εξίσωση 2 Απόδοση συνολικής διεργασίας}$$
$$\text{Απόδοση διεργασίας} = \frac{[\text{τελική μάζα σωματιδίων}]}{[\text{αρχική μάζα ένωσης} + \text{αρχική μάζα πολυμερούς}]} \times 100\%$$

4.4. Χαρακτηρισμός πρώτων υλών και προϊόντων

4.4.1. Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος είναι από τους 12.500 έως τους 10 κυμματαριθμούς (cm^{-1}) ($=1/\lambda$) ενώ συνήθως οι μετρήσεις της συγκεκριμένης μεθόδου γίνονται στην περιοχή του μέσου IR ($4000\text{-}40\text{cm}^{-1}$). Η υπέρυθρη φασματοσκοπία είναι μια οπτική μη καταστρεπτική μέθοδος ανάλυσης, χρησιμεύει κυρίως στην ποιοτική ανάλυση και συνήθως μετρά την απορρόφηση του φωτός από το δείγμα σε σχέση με συχνότητα η οποία εκφράζεται από το νόμο των Lambert-Beer (στην γραμμική περιοχή όπου η συγκέντρωση είναι ανάλογη του σήματος του οργάνου) [4].

Κατά την απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας τα μόρια μιας ένωσης διεγείρονται σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Κατά την αποδιέγερση τους εκπέμπουν την απορροφημένη ενέργεια. Το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι χαρακτηριστικό του υλικού από το οποίο αυτή εκπέμπεται [4].

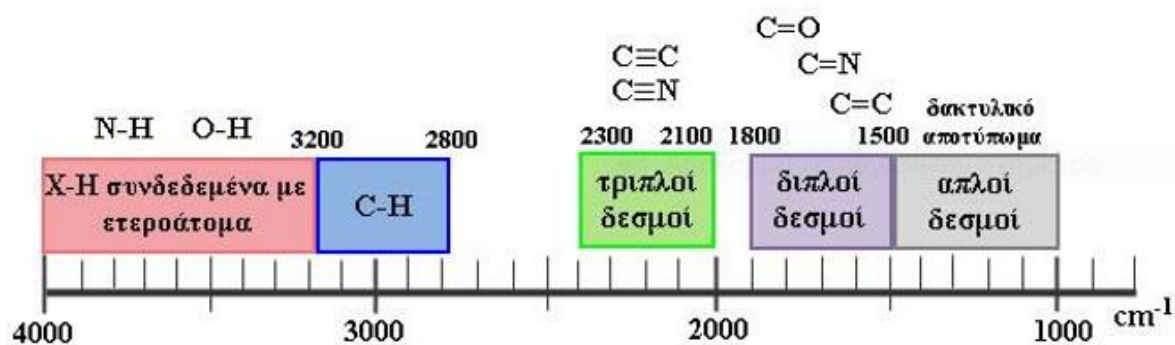
Για να ανιχνευθεί μια δονητική μετάπτωση (ενεργή) θα πρέπει το μόριο να έχει διπολική ροπή. Εάν ένα μη γραμμικό μόριο αποτελείται από N άτομα θα έχει $3N-6$ δονητικούς βαθμούς ελευθερίας (vibrational). Αντίστοιχα στην περίπτωση γραμμικών μορίων είναι $3N-5$. Έτσι μεγάλος αριθμός ατόμων σε ένα μόριο μπορεί να προκαλέσει μεγάλο αριθμό απορροφήσεων, καθιστώντας τα φάσματα IR πολύπλοκα.

Συνήθως στα μόρια συναντώνται οι ακόλουθοι βασικοί τύποι δονήσεων [4]:

- Δονήσεις τάσης (stretching vibrations) οι οποίες παράγονται όταν δύο συνδεδεμένα άτομα πάλλονται συνεχώς μεταξύ τους, μεταβάλλοντας τη μεταξύ τους απόσταση κατά μήκος του άξονα του δεσμού.
- Δονήσεις κάμψης (bending vibrations) οι οποίες χαρακτηρίζονται από μία συνεχή μεταβολή της γωνίας μεταξύ δύο δεσμών και διακρίνονται στους εξής τέσσερις τύπους:
 - Δονήσεις ψαλιδιού ή παραμόρφωσης (scissoring or deformation vibrations) οι οποίες παράγονται όταν δύο άτομα που είναι συνδεδεμένα με ένα κεντρικό άτομο κινούνται εμπρός πίσω εντός του επιπέδου ισορροπίας (in-plane) και προς τη μεταξύ τους διεύθυνση.
 - Δονήσεις αιώρησης (rocking vibrations) οι οποίες συμβαίνουν όταν μία μη γραμμική δομική μονάδα τριών ατόμων δονείται εμπρός και πίσω εντός του επιπέδου ισορροπίας (in-plane) που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δύο δεσμούς.
 - Δονήσεις σείσης (wagging vibrations) οι οποίες παράγονται όταν μία μη γραμμική δομική μονάδα τριών ατόμων δονείται εκτός του επιπέδου ισορροπίας (out-of-plane) που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δύο δεσμούς.

- Δονήσεις συστροφής (twisting vibrations) οι οποίες λαμβάνουν χώρα όταν μία δομική μονάδα τριών ατόμων συστρέφεται γύρω από τον δεσμό σύνδεσης με το υπόλοιπο τμήμα του μορίου εκτός του επιπέδου ισορροπίας (out-of-plane).

Η ερμηνεία του φάσματος απλοποιείται λαμβάνοντας υπόψιν συγκεκριμένες ταινίες τις οποίες αναμένεται να απορροφούν χαρακτηριστικές ομάδες και δεσμοί μεταξύ ατόμων που υπάρχουν στο μόριο της ένωσης (Εικόνα 21) [4].



Εικόνα 21 Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών δεσμών.

4.4.1.1. Πειραματική διαδικασία FTIR-ATR

Μετά την παραλαβή των προϊόντων (PBS, νανοσωματίδια) η χημική τους δομή αναλύεται στο Platinum-ATR ALFA II Bruker (Εικόνα 22): Μια μικρή ποσότητα δείγματος τοποθετείται πάνω στον κρύσταλλο του οργάνου και γίνεται η σάρωση του σε εύρος 400-4000 cm^{-1} .



Εικόνα 22 Όργανο Platinum-ATR ALFA II Bruker.

4.4.2. Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης DSC

Η Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) είναι μια μέθοδος θερμικής ανάλυσης για τη μελέτη των ιδιοτήτων πολυμερικών υλικών. Η αρχή της λειτουργίας ενός DSC είναι η σάρωση συγκεκριμένης θερμοκρασιακής περιοχής και μελετά τη συμπεριφορά του δείγματος καθώς θερμαίνεται με συγκεκριμένο ρυθμό [5].

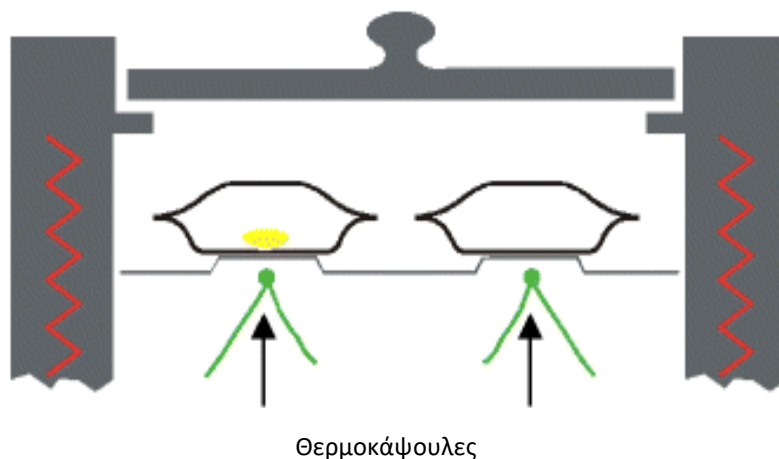
Επιτρέπει τον προσδιορισμό των θερμοκρασιών τήξης, κρυστάλλωσης και των αντίστοιχων μεταβολών ενθαλπίας και εντροπίας και άλλων επιδράσεων που δείχνουν αλλαγές στη θερμοχωρητικότητα ή στη λανθάνουσα θερμότητα [5].

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η ταχύτητα, η ευκολία στη χρήση και η διαθεσιμότητά της [6].

Η διάταξη του οργάνου DSC έχει συνήθως δύο θέσεις δείγματος, μία για το υπό διερεύνηση δείγμα και μία για το δείγμα αναφοράς. Το περιβάλλον των υποδοχέων είναι κλειστό και συνήθως αδρανές γεγονός που επιτυγχάνεται με ροή αζώτου ή ευγενές αερίων. Οι δύο κάψουλες διαφέρουν ως προς το περιεχόμενό τους (μία που περιέχει το δείγμα και μια άδεια), επομένως, η κάψουλα με το δείγμα απαιτεί περισσότερη θερμότητα/ενέργεια για να διατηρηθεί ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας της ίσος με τον αντίστοιχο ρυθμό στην κάψουλα αναφοράς. Η αρχή της DSC βασίζεται στη μέτρηση των διαφορών της ροής θερμότητας μεταξύ του δείγματος και του δείγματος αναφοράς ως συνάρτηση του χρόνου ή/και της θερμοκρασίας για τη διατήρηση της ίδιας θερμοκρασίας καθώς τα δύο δείγματα θερμαίνονται ή ψύχονται υπό το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα [5]–[7].

Στα διαγράμματα DSC, οι ενδόθερμες διεργασίες, όπως η τήξη, καταγράφονται ως κορυφές, συνήθως θετικές, και οι εξώθερμες διεργασίες, όπως η κρυστάλλωση, συνήθως αρνητικές κορυφές, ανάλογα με τη ρύθμιση του υπολογιστή. Τα εμβαδά που περικλείονται στις κορυφές εκφράζουν την απορροφούμενη (για τις ενδόθερμες διεργασίες) ή εκλυόμενη (για τις εξώθερμες διεργασίες) θερμότητα, η οποία ανάγεται στη μάζα του δείγματος που χρησιμοποιείται (διαδικασία κανονικοποίησης)[7].

Στην Εικόνα 23 φαίνεται η βασική διάταξη μέσα στο φούρνο.



Εικόνα 23 Εσωτερικό τυπικού θερμιδομέτρου διαφορικής σάρωσης (DSC).

4.4.2.1. Πειραματική διαδικασία DSC

Ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων πραγματοποιείται με χρήση της συσκευής DSC 1 STAR^e System της Mettler Toledo (Εικόνα 24). Για την προετοιμασία των δειγμάτων λαμβάνονταν 10-15 mg υλικού προς μέτρηση σε ειδικά κυλινδρικά καψίδια (pans) αλουμινίου. Έπειτα καταγράφεται το βάρος τους και ακολουθεί αεροστεγής σφράγιση των καψιδίων με μεταλλικά καλύμματα με τη βοήθεια ειδικής πρέσας. Επιπλέον στο κάλυμμα δημιουργείται οπή εξαερισμού στο μέγεθος της μύτης βελόνας. Τέλος, το εκάστοτε δείγμα τοποθετείται στον αντίστοιχο υποδοχέα της διάταξης DSC.

Η επιλογή των θερμοκρασιακών συνθηκών για τις μετρήσεις επιλέγονται για την ανάδειξη των θερμικών ιδιοτήτων των προϊόντων. Στο περιβάλλον των υποδοχέων δημιουργήθηκε αδρανής ατμόσφαιρα με ροή αζώτου (20 ml/min).

Για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων PBS και ναρινγίνης εφαρμόζεται ο θερμικός κύκλος:

- 25 → 260°C (1η θέρμανση)
- 2 min στους 260°C
- 2600 → -10°C (ψύξη)
- 2 min στους -10°C
- -10 → 260°C (2η θέρμανση)

Το βήμα αλλαγής θερμοκρασίας ήταν 10°C/min



Εικόνα 24 DSC 1 STAR[®] System Mettler Toledo.

4.4.3. Θερμοβαρυμετρική ανάλυση TGA

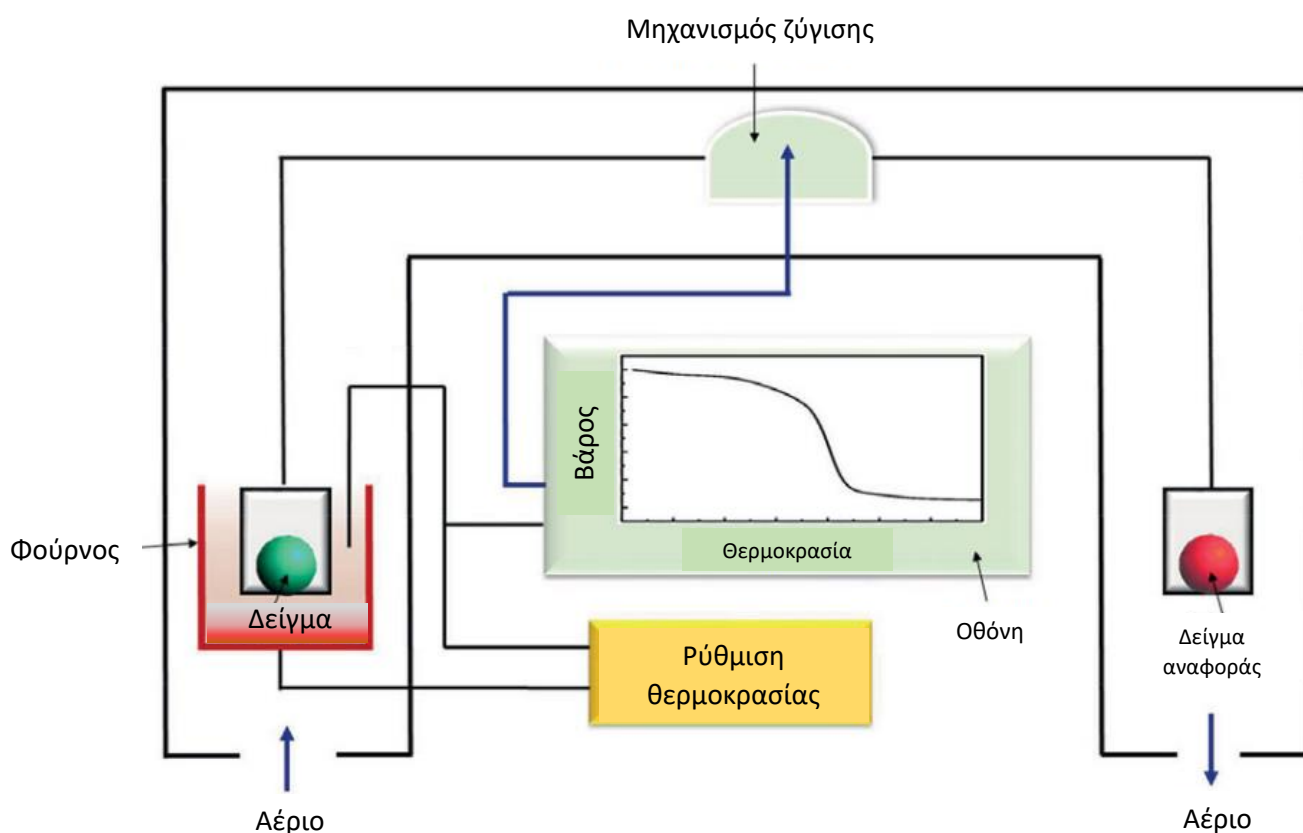
Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση (Thermogravimetry Analysis-TGA) αποτελεί μια ακόμη μέθοδο θερμικής ανάλυσης. Μελετά τη θερμική συμπεριφορά των υλικών και πιο συγκεκριμένα εφαρμόζεται συνήθως για τη μελέτη της θερμικής διάσπασης και της θερμικής σταθερότητάς τους, όταν αυτά θερμαίνονται κάτω από διάφορες συνθήκες. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κινητικής των φυσικοχημικών δράσεων που εμφανίζονται κατά τη θερμική καταπόνηση του υλικού [7].

Το δείγμα θερμαίνεται σε ελεγχόμενες συνθήκες (ατμόσφαιρα, συγκεκριμένο αέριο στο χώρο, αρχική και τελική θερμοκρασία), και καταγράφεται συνεχώς η μάζα του σε σχέση με τη θερμοκρασία και τον χρόνο. Από αυτά τα μεγέθη μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την ποσοτική αντίδραση που έλαβε μέρος αλλά και άλλα ποιοτικά σχετικά με το χρόνο και τη θερμοκρασία της αντίδρασης [7].

Σημαντικές πληροφορίες είναι ο ρυθμός θέρμανσης του δείγματος (heating rate), από τον οποίο επομένως εξαρτάται και ο χρόνος της αντίδρασης, η αρχική και τελική θερμοκρασία του φούρνου, το περιβάλλον αέριο μέσα στο φούρνο αλλά και η ποσότητα του δείγματος. Όσον αφορά το περιβάλλον αερίου δύναται να είναι αδρανές (π.χ. He, N₂, Ar), οξειδωτικό (π.χ. O₂, αέρας) ή αναγωγικό (π.χ. 8 – 10 % H₂ σε N₂) [7].

Ο θερμοζυγός αποτελείται από: έναν ευαίσθητο αναλυτικό ζυγό, φούρνο, φιάλη παροχής αερίου, 2 ροόμετρα, ένα για το προστατευτικό αέριο και ένα για το αέριο του φούρνου, αντλία του ψυκτικού υγρού.

Με τη βοήθεια του υπολογιστή σχηματίζεται αυτόματα η καμπύλη διαφοράς βάρους σε σχέση με την θερμοκρασία (καμπύλη TG), αλλά και η πρώτη παράγωγος της καμπύλης αυτής (DTG). Φαίνονται επίσης τα ποσοστά μεταβολής βάρους στις τιμές της θερμοκρασίας που αυτή παρατηρείται. Οι συχνά παρατηρούμενες απώλειες βάρους του υλικού σε χαμηλές θερμοκρασίες οφείλονται συνήθως σε εκροφήσεις συστατικών, όπως π.χ. της υγρασίας γύρω στους 100°C. Η διάσπαση των πολυμερών που ακολουθεί συνήθως σε υψηλότερες θερμοκρασίες δύναται να είναι ενός ή περισσότερων σταδίων. Ως θερμοκρασία αποικοδόμησης/διάσπασης (T_d) ορίζεται συχνά η θερμοκρασία όπου παρατηρείται η μέγιστη μεταβολή βάρους. Το σημείο αυτό καθορίζεται εύκολα μέσω του γραφήματος της πρώτης παραγώγου της μεταβολής βάρους ως προς τη θερμοκρασία. Η διάταξη φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 25 [8].



Εικόνα 25 Σχηματική αναπαράσταση θερμοζυγού[8]

4.4.3.1. Πειραματική διαδικασία TGA

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιείται θερμοζυγός TGA/DSC 1 STAR^e System της Mettler Toledo (Εικόνα 24). Τα δείγματα θερμαίνονται από τους 30 στους 600°C με ρυθμό θέρμανσης 10°C/min και ροή φέροντος αέριου αζώτου 20 ml/min.

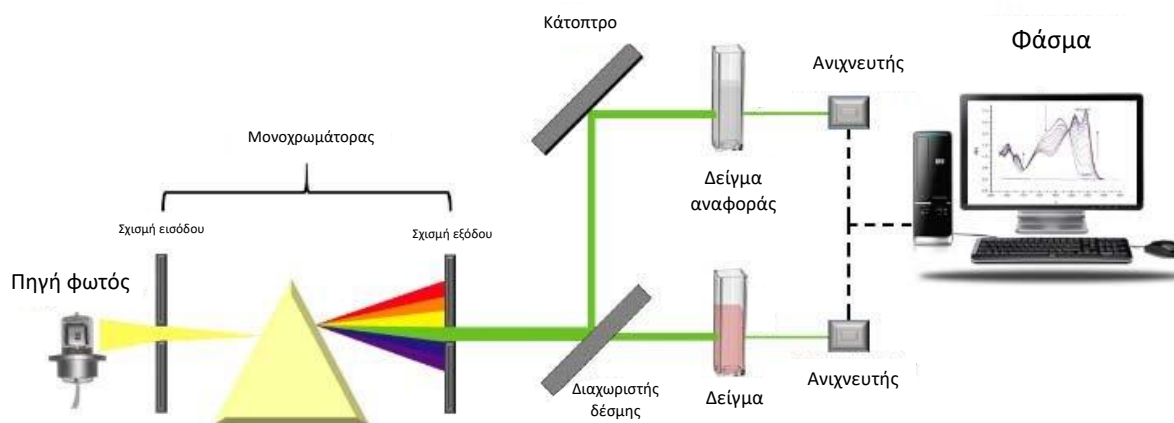
Από το θερμογράφημα που προκύπτει εξάγονται με κατάλληλη επεξεργασία η θερμοκρασία αποικοδόμησης (T_d) και το επί τοις εκατό υπόλειμμα μάζας (% Y.M.) το οποίο προκύπτει ως το % κλάσμα της τελικής μάζας που παραμένει στο θερμοζυγό προς την αρχική μάζα του δείγματος.

4.4.4. Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis)

Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού είναι μια ακόμα φασματομετρική μέθοδος ανάλυσης. Ασχολείται με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού και της ύλης. Η υπεριώδης (UV) περιοχή καλύπτει περίπου την περιοχή 10-380 nm του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Συνήθως χωρίζεται σε τρεις κύριες υποπεριοχές, οι οποίες είναι οι εξής: UVA στα 320-380 nm, UVB στα 280-320 nm και UVC στα 100-280 nm [7], [9].

Η φασματοσκοπία UV-Vis σχετίζεται με τη διέγερση των εξωτερικών ηλεκτρονίων των ατόμων. Πιο συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στα μοριακά δεσμικά ή μη δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας μεταπηδούν στα αντιδεσμικά τροχιακά υψηλότερης ενέργειας [7], [10]. Το μέγεθος που μετράται είναι η διαπερατότητα, η οποία είναι το κλάσμα της εισερχόμενης ακτινοβολίας που διέρχεται από το δείγμα και ορίζεται ως η αρχική ένταση ακτινοβολίας προς την ένταση ακτινοβολίας μετά από μερική απορρόφηση της από το δείγμα [7]. Η φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού χρησιμεύει κυρίως στην ποσοτική ανάλυση καθώς η συγκέντρωση ενός στοιχείου προσδιορίζεται με τη μέτρηση της απορροφητικότητας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και εφαρμογή του νόμου Lambert-Beer (στην γραμμική περιοχή όπου η συγκέντρωση είναι ανάλογη του σήματος του οργάνου) [9].

Στην Εικόνα 26 Σχηματική αναπαράσταση του φασματόμετρου διπλής δέσμης UV-Vis [11] Εικόνα 26 φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση του φασματόμετρου διπλής δέσμης UV-Vis [11].



Εικόνα 26 Σχηματική αναπαράσταση του φασματόμετρου διπλής δέσμης UV-Vis [11].

Για όλα τα πειράματα που περιλαμβάνουν UV-Vis χρησιμοποιήθηκε το όργανο Jasco V – 770, Spectrophotometer (Εικόνα 27).



Εικόνα 27 Jasco V – 770, Spectrophotometer.

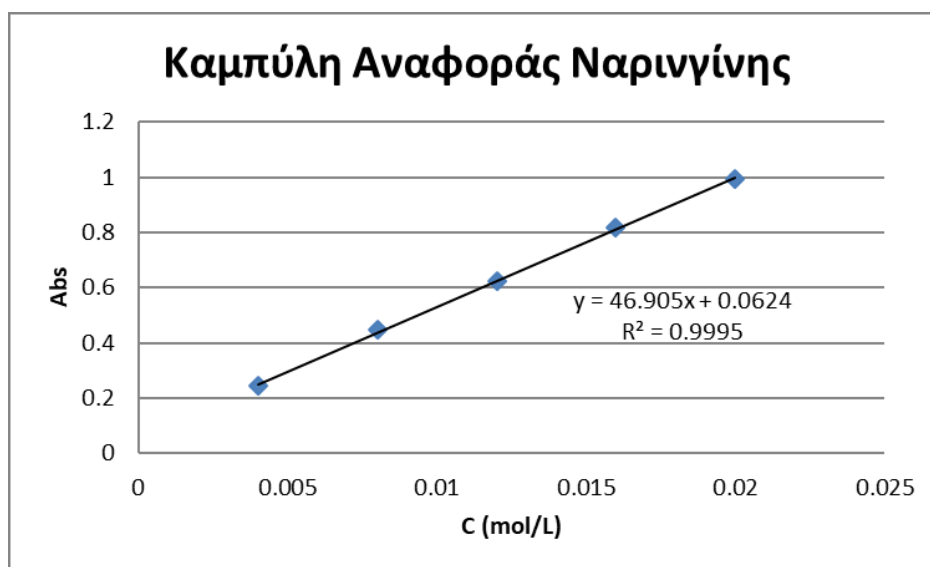
4.4.4.1. Απόδοση εγκλεισμού με έμμεσο τρόπο

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού (έμμεσα) είναι απαραίτητο να βρεθεί η μάζα της μη εγκλεισμένης ένωσης, η οποία επιτυγχάνεται με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της μη εγκλεισμένης ένωσης στο υπερκείμενο υγρό των δύο πρώτων φυγοκεντρήσεων. Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ογκομέτρηση των υπερκείμενων και έπειτα τη διήθησή

τους. Από το διήθημα λαμβάνονται 0,2 mL, αραιώνονται με 2,8 mL υπερκάθαρου νερού και το διάλυμα προστίθεται στην κυψελίδα.

Η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος στα 280 nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση μέσω της καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη κατασκευάστηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων ναρινγίνης σε αιθανόλη με γνωστή συγκέντρωση, μήκος κύματος (280 nm) και απορρόφηση. Η καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε φαίνεται στο Διάγραμμα 1 που ακολουθεί.



Διάγραμμα 1 Καμπύλη αναφοράς ναρινγίνης.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού, χρησιμοποιείται η εξής σχέση:

Απόδοση Εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency- E.E.):

Εξίσωση 3 Έμμεση απόδοση εγκλεισμού

$$E.E. = \frac{([αρχική\ ποσότητα\ ένωσης] - [ποσότητα\ ένωσης\ στα\ υπερκείμενα])}{[αρχική\ ποσότητα\ ένωσης]} \times 100\%$$

4.4.4.2. Μελέτη αποδέσμευσης δραστηκής ουσίας

Η αποδέσμευση της ναρινγίνης από τα πολυμερικά NPs διερευνάται επίσης χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-Vis.

Ποσότητα από τα νανοσωματίδια με εγκλεισμένη ναρινγίνη διασπείρεται σε 20 mL νερό και μεταφέρεται σε μεμβράνη SERVAPOR® με διάμετρο 29mm. Η

μεμβράνη εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων σε τιμή ίση με $\text{pH}=7,4$.

Το σύστημα αναδεύεται μαγνητικά στους $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνεται δείγμα 1 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα και στο δοχείο προστίθεται ξανά 1mL καθαρού ρυθμιστικού διαλύματος.

Η ποσότητα της ναρινγίνης που απελευθερώνεται στο υπερκείμενο απορρέει από την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε για τον υπολογισμό της ΕΕ% (Διάγραμμα 1). Με αυτά τα δεδομένα σχεδιάζονται τα διαγράμματα ποσοστιαίου ρυθμού αποδέσμευσης.

4.4.5. Μέτρηση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων που περιέχουν την εγκλεισμένη ναρινγίνη, των κενών και επικαλυμμένων νανοσωματιδίων σχετικά με το μέγεθος (size), το δείκτη πολυδιασποράς (polydispersity index, PDI) και το ζ-δυναμικό (zeta potential) πραγματοποιείται μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

Η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS), επίσης γνωστή ως φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων μελετά τη συμπεριφορά διάχυσης μακρομορίων σε διάλυμα (κολλοειδείς διασπορές). Ο συντελεστής διάχυσης, και συνεπώς οι υδροδυναμικές ακτίνες που υπολογίζονται από αυτόν, εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα των μακρομορίων [12].

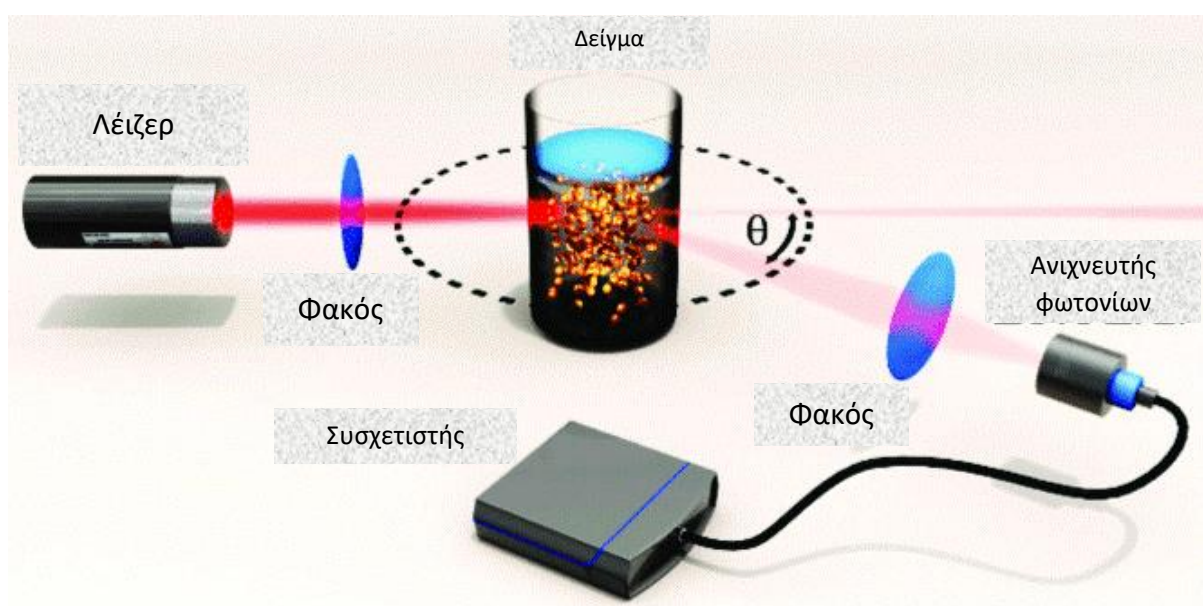
Το DLS είναι μη επεμβατική μέθοδος ανάλυσης, απαιτεί μικρή προετοιμασία του δείγματος καθώς και μικρές ποσότητες δείγματος [13].

Σε ένα τυπικό πείραμα σκέδασης φωτός, το δείγμα εκτίθεται σε μονοχρωματικό κύμα φωτός και μετράται η ταχύτητα με την οποία διαχέονται τα σωματίδια λόγω της κίνησης Brown. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μέτρηση του ρυθμού με τον οποίο παρουσιάζει διακυμάνσεις η ένταση του σκεδασμένου φωτός, καθώς αυτή ανιχνεύεται από κατάλληλη οπτική διάταξη [12], [14].

Τα συμβατικά όργανα δυναμικής σκέδασης φωτός χρησιμοποιούν γωνία ανίχνευσης 90° . Αυτή η οπτική διαμόρφωση μπορεί να μην είναι αρκετά

ευαίσθητη για την επιτυχή μέτρηση μικρών σωματιδίων. Μια οπτική διαμόρφωση που επιτρέπει μετρήσεις δειγμάτων σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικρότερων μεγεθών είναι η ανίχνευση οπισθοσκέδασης στις 173° . Αυτή η οπτική διαμόρφωση παρέχει την εξαιρετική ευαισθησία που απαιτείται για τη μέτρηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων και των μορίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις [14].

Ένα τυπικό σύστημα δυναμικής σκέδασης φωτός αποτελείται από έξι κύρια συστατικά (Εικόνα 28). Αρχικά, ένα λέιζερ παρέχει μια πηγή φωτός για να φωτίζει το δείγμα σε ένα κελί. Σε αραιά διαλύματα, οι περισσότερες από τις δέσμες φωτός του λέιζερ διαπερνούν το δείγμα, αλλά μερικές σκεδάζονται από τα σωματίδια που βρίσκονται μέσα σε αυτό, προς όλες τις γωνίες. Ένας ανιχνευτής χρησιμοποιείται για να μετράει το σκεδαζόμενο φως. Η θέση του ανιχνευτή είναι συνήθως είτε στις 173° είτε στις 90° , ανάλογα το μοντέλο. Το σήμα της σκεδαζόμενης έντασης περνά από τον ανιχνευτή σε ένα σύστημα ψηφιακής επεξεργασίας που ονομάζεται συσχετιστής. Ο συσχετιστής συγκρίνει την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα για να αντλήσει το ρυθμό με τον οποίο ποικίλλει η ένταση. Έπειτα, οι πληροφορίες από το συσχετιστή μεταβιβάζονται σε έναν υπολογιστή, όπου το λογισμικό θα αναλύσει τα δεδομένα και θα εξάγει πληροφορίες για το μέγεθος [13].



Εικόνα 28 Απεικόνιση της συσκευής δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) [13].

4.4.5.1. Πειραματική διαδικασία DLS

Το όργανο που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις ήταν το Zetasizer Nano ZS (Εικόνα 29).

Για την παρασκευή του δείγματος που προορίζεται για μέτρηση DLS, λαμβάνεται 1 mg από το ξηρό δείγμα των νανοσωματιδίων και επαναιωρούνται σε 20 mL απιονισμένου νερού. Το δείγμα οδηγείται προς ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου Vortex και σε sonication probe με δυναμικότητα 120 Watt για 3 λεπτά.

Έπειτα, με χρήση σύριγγας λαμβάνεται μία ποσότητα του διαλύματος που εμπεριέχεται μέσα στο φιαλίδιο και τοποθετείται στην κυψελίδα Disposable capillary cell DTS1070 για την λήψη των μετρήσεων.



Εικόνα 29 Zetasizer Nano ZS.

Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο ειδών μετρήσεις, μία πρώτη για τον προσδιορισμό του μεγέθους (size) των νανοσωματιδίων και μία δεύτερη για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού τους (z-potential). Τόσο για τον προσδιορισμό του μεγέθους όσο και για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού πραγματοποιούνται 3 μετρήσεις σε θερμοκρασία 25 ± 1 °C και λαμβάνεται ο μέσος όρος αυτών.

4.4.6. Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

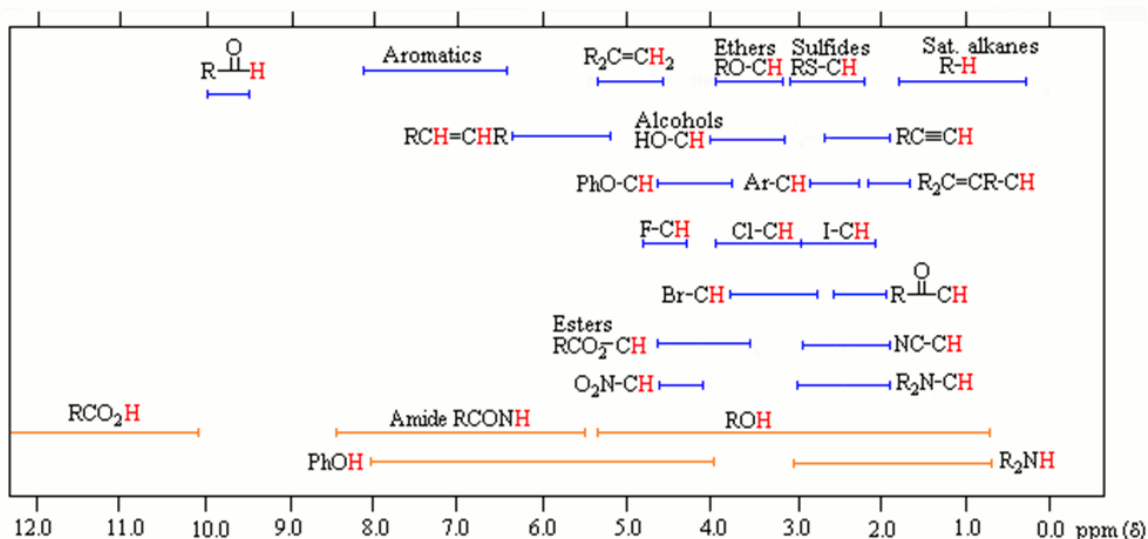
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για την εξακρίβωση της δομής μικρών μορίων αλλά και μακρομορίων [15]. Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

(NMR) είναι ένα φαινόμενο απορρόφησης ενέργειας που συμβαίνει όταν οι πυρήνες συγκεκριμένων ατόμων, οι οποίοι βρίσκονται σε στατικό μαγνητικό πεδίο, εκτίθενται σε ένα δεύτερο μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο. Αυτή η απορρόφηση ενέργειας είναι χαρακτηριστική για κάθε συζευγμένο ή ελεύθερο άτομο και χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του μορίου [16].

Η συχνότητα στην οποία εξετάζεται ένα σήμα NMR εξαρτάται κυρίως από την ένταση του μαγνητικού πεδίου. Το χημικό περιβάλλον ενός ενεργού (θετικού) πυρήνα (π.χ. ^1H , ^{13}C) οδηγεί σε μια μικρή μετατόπιση της συχνότητας συντονισμού. Οι λειτουργικές ομάδες γύρω από τον ενεργό πυρήνα προσανατολίζονται ανάλογα με αυτή τη μετατόπιση [17].

Το αποτέλεσμα είναι ένα διάγραμμα έντασης/συχνότητας, το φάσμα NMR. Σε ένα φάσμα ^1H -NMR ο οριζόντιος άξονας καταγράφει το πραγματικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο που υφίστανται οι πυρήνες, ενώ ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την ένταση απορρόφησης της ενέργειας. Κάθε άτομο H οδηγεί σε τουλάχιστον ένα σήμα (κορυφή). Δεδομένου ότι τα περισσότερα μόρια αναλυτικού ενδιαφέροντος περιέχουν περισσότερα από ένα άτομα H, τα φάσματα είναι αρκετά πολύπλοκα.

Στα φάσματα ^1H -NMR πολύπλοκων μιγμάτων, συχνά δεν είναι δυνατή η ανίχνευση μεμονωμένων συστατικών, αλλά μπορεί να προσδιοριστεί το άθροισμα των λειτουργικών ομάδων στο μίγμα [17]. Γενικά τα υδρογόνα δίπλα σε κορεσμένα κέντρα εμφανίζονται με απαιτούν ισχυρότερο μαγνητικό πεδίο, λόγω της μεγαλύτερης προστασίας τους από τα περιβάλλοντα ηλεκτρόνια. Αντίθετα, τα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα με άνθρακες που έχουν δίπλα τους ηλεκτραρνητικά άτομα (π.χ. N, O) προστατεύονται λιγότερο αποτελεσματικά και χρειάζονται ασθενέστερο εφαρμοζόμενο πεδίο για να συντονιστούν. Εφόσον η ισχύς του εφαρμοζόμενου πεδίου αυξάνεται από αριστερά προς τα δεξιά στο γράφημα, το αριστερό τμήμα του γραφήματος είναι η πλευρά χαμηλού πεδίου και το δεξί η πλευρά υψηλού πεδίου [18]. Ενδεικτικά στην Εικόνα 30 φαίνεται η θέση χαρακτηριστικών ομάδων ανάλογα με την ισχύ του πεδίου [19].



Εικόνα 30 Θέση χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ με την ισχύ του πεδίου [19].

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρέχει επίσης πληροφορίες σχετικά με την ποσοτική σχέση μεταξύ ενδομοριακών και διαμοριακών συντονισμών [15]. Το ολοκλήρωμα μιας κορυφής (εμβαδόν) είναι αυστηρά γραμμικό και ανάλογο της ποσότητας των πρωτονίων στον ανιχνευτή. Έτσι, τα σήματα αποτελούν μέτρο του σχετικού αριθμού των διάφορων ειδών πρωτονίων σε ένα μόριο, ανεξάρτητα από το μοριακό βάρος. Κατά περιπτώσεις, η απορρόφηση ενός πρωτονίου (μια κορυφή ενός πυρήνα) να διασπάται σε πολλές στενές κορυφές λόγω της αλληλεπίδρασης ή σύζευξης των πυρηνικών spin γειτονικών χημικά ισοδύναμων ατόμων [17].

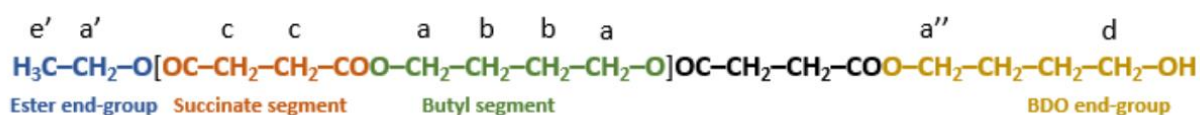
Συνολικά ένα φάσμα NMR δίνει πληροφορίες για:

- τον αριθμό των σημάτων: πόσα διαφορετικά είδη πρωτονίων υπάρχουν
- τη θέση (χημική μετατόπιση) των σημάτων: είναι το πρωτόνιο θωρακισμένο ή αποπροστατευμένο
- την ένταση (ολοκλήρωση) του σήματος: ανάλογη του πλήθους πρωτονίων αυτού του είδους
- τη σχάση σήματος (πολλαπλότητα): ο αριθμός των γειτονικών πρωτονίων

Πέρα από αυτά, είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος ενός πολυμερούς από το ληφθέν φάσμα. Ένα ιδιαίτερα χρήσιμο χαρακτηριστικό του $^1\text{H NMR}$ στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους είναι ότι οι περιοχές κάτω από τις κορυφές συντονισμού στα φάσματα είναι ανάλογες με τη μοριακή

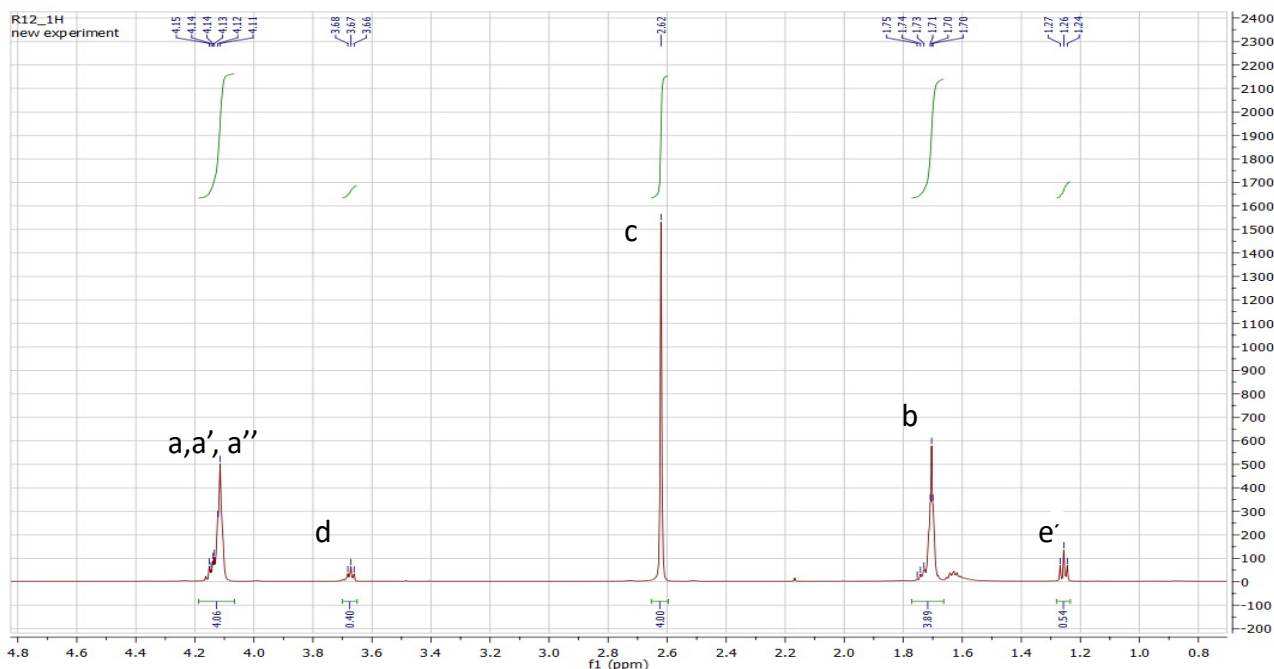
συγκέντρωση του είδους στο δείγμα που αναλύεται. Το εμβαδόν ή η ένταση του σήματος πρωτονίων ενός συγκεκριμένου είδους είναι ανάλογο της ποσότητας του εν λόγω είδους που υπάρχει σε ένα συγκεκριμένο δείγμα επομένως, το εμβαδόν της i-οστής κορυφής είναι ανάλογο του Ni (του αριθμού των μορίων του είδους i με μοριακό βάρος Mi) [20].

Συγκεκριμένα, όσον αφορά το PBS, τα υδρογόνα του κατηγοριοποιούνται όπως φαίνεται στην Εικόνα 31, ανάλογα με το περιβάλλον τους (ομάδες a, b, c, d, e, a', a'', e').



Εικόνα 31 Κατηγοριοποίηση πρωτονίων PBS.

Στην Εικόνα 32 παρουσιάζεται το ενδεικτικό φάσμα PBS που προκύπτει με αντιστοίχιση των κορυφών με τις ομάδες πρωτονίων.



Εικόνα 32 Ενδεικτικό φάσμα H-NMR PBS.

Για τον υπολογισμό του μοριακού του βάρους χρησιμοποιείται η Εξίσωση 4:

Εξίσωση 4 Υπολογισμός μοριακού βάρους PBS από την ένταση απορρόφησης στο φάσμα ¹H-NMR

$$\overline{M}_n = \frac{\left(I_a - I_d - \frac{2}{3} I_{e'} \right) M_a + \frac{I_c}{4} M_c + \frac{I_d}{2} M_d + \frac{I_{e'}}{3} M_{e'}}{0,5 \left(\frac{I_d}{2} + \frac{I_{e'}}{3} \right)}$$

Όπου:

- M_i : Μοριακό βάρος της ομάδας που ανήκει το υδρογόνο i
- I_i : η ένταση απορρόφησης (ολοκλήρωμα) που αντιστοιχεί στην ομάδα i του πρωτονίου
- $i = a, a', b, b', c, d, e, e'$

Εκτός αυτού, δίνεται η δυνατότητα υπολογισμού ποσοστού των ακραίων ομάδων του μακρομορίου. Για τον υπολογισμό του ποσοστού των εστερικών ομάδων χρησιμοποιείται η Εξίσωση 5:

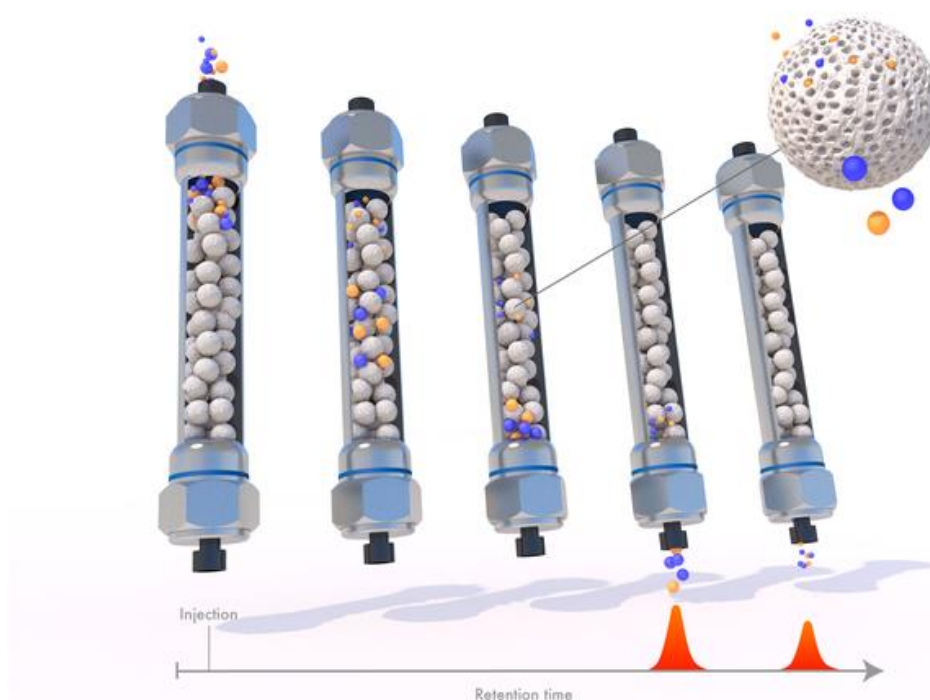
Εξίσωση 5 Υπολογισμός ακραίων εστερικών ομάδων PBS από την ένταση απορρόφησης στο φάσμα ¹H-NMR

$$\text{Ποσοστό ακραίων εστερικών ομάδων (\%)} = \frac{\frac{I_{e'}}{3}}{\frac{I_{e'}}{3} + \frac{I_d}{2}} 100 \%$$

4.4.7. Χρωματογραφία Διέλευσης μέσω Πηκτής (GPC)

Η Χρωματογραφία Διέλευσης μέσω Πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC) είναι ένα είδος υγρής χρωματογραφίας και είναι μία από τις πιο χρήσιμες αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των πολυμερών. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μακρομοριακών αλυσίδων βάσει του μεγέθους τους και για τον λόγο αυτόν η τεχνική ονομάζεται και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC). Τα μακρομόρια διαχωρίζονται με βάση τον υδροδυναμικό τους όγκο ανάλογα με την ικανότητά τους να διεισδύουν στους πόρους που υπάρχουν στη στατική φάση, όπου η κινητήρια δύναμη για την προώθηση της διεύθυνσης είναι η διαφορά στη συγκέντρωση του αναλύτη μεταξύ της ενδιάμεσης κινητής φάσης (μεταξύ των σωματιδίων) και της στατικής φάσης στο εσωτερικό των πόρων της χρωματογραφικής στήλης. Τα μεγαλύτερα μόρια δεν εισέρχονται στους μικρούς

πόρους και εκλούνται γρηγορότερα από τη στήλη (Εικόνα 33). Αντίθετα, τα μικρότερα μόρια εκλούνται σε δεύτερο χρόνο καθώς έχουν τη δυνατότητα να εισέρχονται σε περισσότερους μικροπόρους. Καθώς ο μηχανισμός κατακράτησης βασίζεται καθαρά σε εντροπικούς παράγοντες, δεν πρέπει να υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μακρομορίων και της κινητής ή της στατικής φάσης [21].



Εικόνα 33 Σχηματική αναπαράσταση έκλυσης διαφορετικών μεγεθών πολυμερών κατά την ανάλυση GPC.

Με την GPC προσδιορίζονται τα μέσα μοριακά βάρη των πολυμερών αλλά και η κατανομή του μοριακού βάρους (μοριακή διασπορά) που είναι υπεύθυνη για πολλές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν ένα πολυμερές, όπως ελαστική αντοχή, ευθραυστότητα, σκληρότητα, ιξώδες κ.λπ.) [21].

Μια τυπική διάταξη GPC αποτελείται από:

1. Δοχείο διαλύτη
2. Απαερωτή (degasser) για απομάκρυνση φυσαλίδων αέρα από τον διαλύτη
3. Αντλία (σύστημα παραλαβής του διαλύτη), η οποία αντλεί τον διαλύτη από το δοχείο του διαλύτη και τον οδηγεί προς το σύστημα έγχυσης
4. Μετρητή πίεσης για μέτρηση της πίεσης του συστήματος

5. Σύστημα έγχυσης (injector) με το οποίο γίνεται η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη
6. Στήλες χρωματογραφίας με υλικό πλήρωσης
7. Ανιχνευτή που ανιχνεύει τις ουσίες που εξέρχονται από τις στήλες
8. Καταγραφέα που παραλαμβάνει το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή και γράφει το χαρακτηριστικό χρωματογράφημα
9. Δοχείο συλλογής αποβλήτων στο οποίο συλλέγονται τα απόβλητα της χρωματογραφίας

Η GPC είναι μια έμμεση μέθοδος προσδιορισμού μοριακού βάρους των πολυμερών, διότι χρειάζεται βαθμονόμηση της στήλης, δηλ. την εγκαθίδρυση σχέσεως μεταξύ του μοριακού βάρους των προτύπων πολυμερών (στενής μοριακής κατανομής και γνωστού μοριακού βάρους που βρίσκεται από άλλες τεχνικές, όπως π.χ. με την τεχνική της σκέδασης του φωτός) και του όγκου έκλουσης [22].

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι βαθμονόμησης, με σημαντικότερες τη συμβατική καμπύλη (narrow standard) και με την παγκόσμια (universal).

Η συμβατική καμπύλη βαθμονόμηση στενών προτύπων είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη όταν είναι διαθέσιμα πρότυπα πολυμερών με στενή κατανομή μοριακών βαρών. Ενδεικτικά ακολουθεί τον τύπο στην Εξίσωση 6 [22].

Εξίσωση 6 Συμβατική καμπύλη βαθμονόμησης GPC

$$V = C_1 - C_2 \log(MW)$$

Όπου:

- C_1, C_2 : Σταθερές
- V : Όγκος έκλουσης
- MW : Μοριακό βάρος μονοδιάσπαρτου δείγματος

Από την άλλη, η παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης βασίζεται στο ότι ο διαχωρισμός των μορίων πολυμερούς στη στήλη διέπεται από το μοριακό μέγεθος (υδροδυναμικό όγκο) και όχι από το μοριακό βάρος. Το μέγεθος του μορίου του πολυμερούς εξαρτάται, εκτός του μοριακού βάρους και από τη δομή του μορίου (γραμμικό, διακλαδισμένο) και τη διαμόρφωση (που παίρνει το

μόριο από το διαλύτη και τη θερμοκρασία). Η συσχέτιση των μεγεθών επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τις σταθερές του Mark-Houwink. Η καμπύλη βαθμονόμησης παρουσιάζεται με το γινόμενο $[\eta]M$ (όπου $[\eta]$, το εσωτερικό ιξώδες και M η μοριακή μάζα δειγμάτων πολυμερών διαφορετικής χημικής φύσης και μορφολογίας) έναντι του όγκου έκλυσης, εκφράζει την πραγματική σχέση μεγέθους μακρομορίου-όγκου έκλυσης ανεξαρτήτως είδους πολυμερούς και διαλύτη έκλυσης [23].

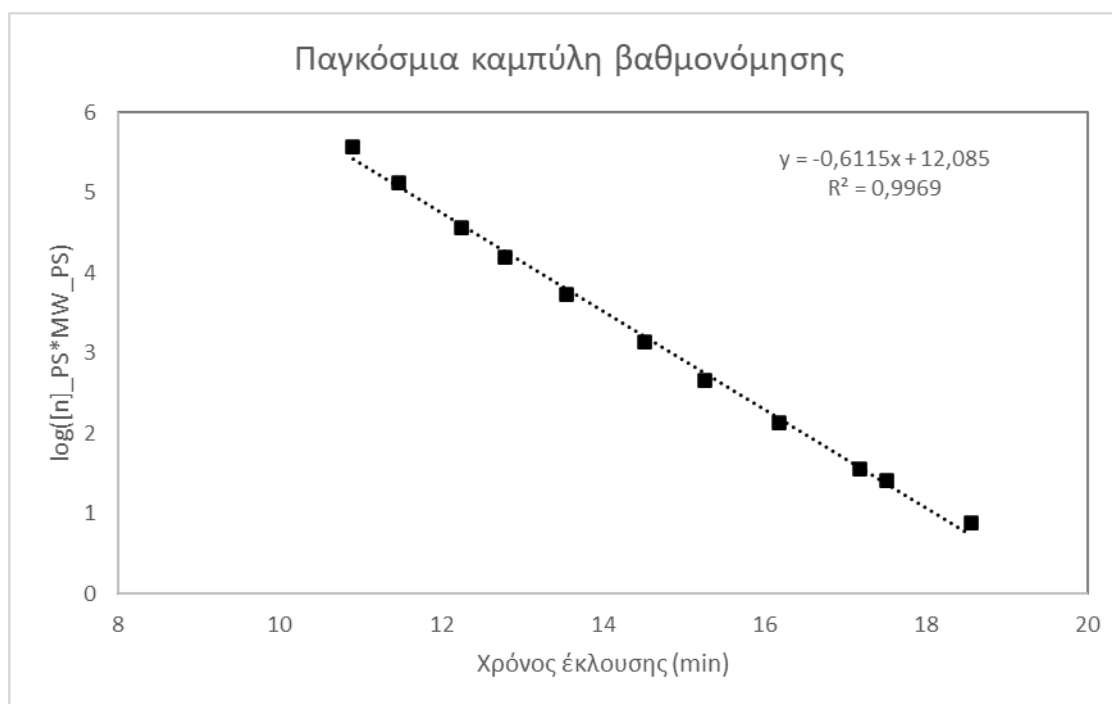
Ενδεικτικά, ακολουθεί η Εξίσωση 7 και η καμπύλη φαίνεται στο Διάγραμμα 2.

Εξίσωση 7 Παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης βάσει του πολυστυρενίου

$$\log([\eta]_{PS} * MW_{PS}) = a * RT + b$$

Όπου:

- a, b : Σταθερές
- RT : Χρόνος έκλυσης
- $[\eta]_{PS}$: Ιξώδες πολυστυρενίου
- MW_{PS} : Μοριακό βάρος πολυστυρενίου



Διάγραμμα 2 Παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης GPC βάσει του πολυστυρενίου.

4.4.7.1. Πειραματική διαδικασία GPC

Η GPC πραγματοποιείται με τη χρήση του οργάνου Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies) (Εικόνα 34), εξοπλισμένου με μια στήλη προστασίας (PLgel 5 μ m) και δύο στήλες PLgel MIXED-D 5 μ m (300 x 7,5 mm). Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με χλωροφόρμιο με ρυθμό ροής 1 ml/min. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RID) Agilent 1260 Infinity II (G7162A). Η βαθμονόμηση του οργάνου πραγματοποιήθηκε με πρότυπα πολυστυρενίου μοριακού βάρους από 162 έως 500.000 g/mol (EasiVial PS-M 2 ml) και κατασκευάστηκε η αντίστοιχη παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης.

Πριν την ανάλυση, κάθε δείγμα διαλύεται σε χλωροφόρμιο με τελική συγκέντρωση διαλύματος 2mg/ml, ομογενοποιείται και περνάει από φίλτρο Syringe Filters Nylon 25 mm 0,22 μ m. Έπειτα τοποθετείται στο όργανο, γίνονται οι κατάλληλες ρυθμίσεις θερμοκρασίας, παροχής διαλύτη κ.ο.κ. και ξεκινά η ανάλυση.



Εικόνα 34 Όργανο Agilent 1260 Infinity II.

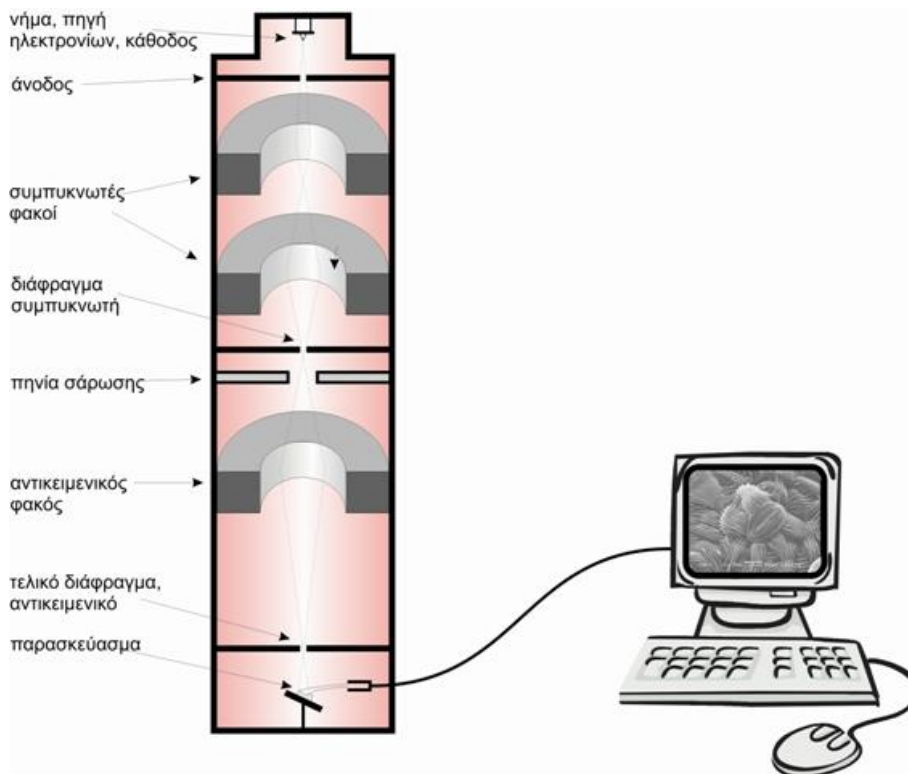
4.4.8. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Η απεικόνιση της μορφολογίας των σωματιδίων δίνει πληροφορίες τόσο για το μέγεθος τους όσο και για τα εξωτερικά τους χαρακτηριστικά όπως η παρουσία ρωγμών, το σχήμα τους, πιθανές συσσωματώσεις, το πορώδες τους και την τραχύτητα τους. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος απεικόνισης των σωματιδίων είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) [24].

Πρόκειται για μία επεμβατική μέθοδο, που απαιτεί αρχικά την εναπόθεση του δείγματος σε ξηρή μορφή στο δειγματοφορέα, είτε μετά από λυοφιλοποίηση είτε μετά από ξήρανση της διασποράς, σε αγώγιμη ανθρακική ή μεταλλική ταινία-βάση. Τα δείγματα πολυμερών επιμεταλλώνονται συνήθως με μία λεπτή επίστρωση αγώγιμου μετάλλου για να καθιστούν αγώγιμα και να γίνει αποτελεσματικά η απεικόνιση [25].

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώνει την επιφάνεια του επεξεργασμένου δείγματος με τη βοήθεια μίας δέσμης ηλεκτρονίων. Η δέσμη των ηλεκτρονίων σαρώνει το δείγμα με αποτέλεσμα κάποια από τα ηλεκτρόνια να το διαπερνούν, κάποια να σκεδάζονται ή να άγονται ενώ συγχρόνως να προκαλείται η παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων, ακτινών X και ηλεκτρονίων Auger. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, που προέρχονται από την επιφάνεια του παρασκευάσματος έχουν μικρή σχετικά ενέργεια που σχετίζεται με τη τοπογραφία του. Αυτά τα δευτερογενή ηλεκτρόνια συλλέγονται και οδηγούνται σαν ένα ηλεκτρονικό σήμα μέσω ενός ενισχυτή εικόνας όπου γίνεται και η παρατήρηση ή και η φωτογράφιση του δείγματος. Τα υπόλοιπα ηλεκτρόνια ή ακτινοβολίες που παράγονται μπορούν να μας δώσουν άλλες πληροφορίες σχετικές με την υφή και σύσταση του παρασκευάσματος [24], [25].

Στην Εικόνα 35 παρουσιάζεται η λεπτομερής οργάνολογία του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.



Εικόνα 35 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης [26].

4.4.8.1. Πειραματική διαδικασία SEM

Για την παρατήρηση της μορφολογίας των νανοσφαιρών χρησιμοποιήθηκε το όργανο SEM TM3030Plus (Εικόνα 36). Το συγκεκριμένο όργανο έχει εύρος μεγέθυνσης 15-60000x.

Το δείγμα κενών και φορτωμένων νανοσφαιρών ετοιμάζεται μετά από λυοφιλοποίηση και επιχρύσωση. Η επιχρύσωση έγινε στα 20 mA για 120 δευτερόλεπτα.



Εικόνα 36 SEM TM3030Plus.

4.5. Βιβλιογραφία

- [1] M. A. J. Veld, "Candida antarctica Lipase B catalysis in organic, polymer and supramolecular chemistry," *Chemical Engineering and Chemistry*, 2010. doi: 10.6100/IR656998.
- [2] D. Derawi, "Enzymatic glycerolysis of methyl laurate utilizing Candida Antarctica lipase b," *Malaysian Journal of Analytical Science*, vol. 20, pp. 1365–1372, May 2016, doi: 10.17576/mjas-2016-2006-15.
- [3] Δ. Μαρκουλάκης, "Παραγωγή πολυεστέρων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες: Ενζυμικός προπολυμερισμός και μεταπολυμερισμός μάζας," ΕΜΠ, 2022.
- [4] Μ. Κουή, Ν. Αβδελίδης, Π. Θεοδωρακέας, and Ε. Χειλάκου, "Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση," in *Μη καταστρεπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]*. , Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2015.
- [5] C. Schick, "Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers," *Anal Bioanal Chem*, vol. 395, no. 6, p. 1589, 2009, doi: 10.1007/s00216-009-3169-y.
- [6] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning, 2017.
- [7] Α. Παππά, *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης: χρωματογραφικές, θερμικές, ηλεκτρομετρικές, φασματομετρία μάζας*. . Αθήνα: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Ε.Μ.Π. , 2004.
- [8] H. M. Ng, N. mohamad saidi, F. S. Omar, R. Kasi, R. T subramaniam, and S. Baig, "Thermogravimetric Analysis of Polymers," pp. 1–29, May 2018, doi: 10.1002/0471440264.pst667.
- [9] M. Picollo, M. Aceto, and T. Vitorino, "UV-Vis spectroscopy," *Physical Sciences Reviews*, vol. 4, no. 4, p. 20180008, 2019, doi: doi:10.1515/psr-2018-0008.
- [10] T. Vo-Dinh, *Handbook of spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2006.

- [11] M. Sergio Braga, O. Gomes, R. Jaimes, E. Braga, W. Borysow, and W. Salcedo, *Multispectral colorimetric portable system for detecting metal ions in liquid media*. 2019. doi: 10.1109/INSCIT.2019.8868861.
- [12] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophys Rev*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, 2016, doi: 10.1007/s12551-016-0218-6.
- [13] S. Aleandri, A. Vaccaro, R. Id, Armenta, A. Völker, and M. Kuentz, "Dynamic Light Scattering of Biopharmaceutics—Can Analytical Performance Be Enhanced by Laser Power?," *Pharmaceutics*, vol. 10(3), Jul. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030094.
- [14] M. Kaszuba, D. McKnight, M. T. Connah, F. K. McNeil-Watson, and U. Nobbmann, "Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 10, no. 5, pp. 823–829, 2008, doi: 10.1007/s11051-007-9317-4.
- [15] S. K. Bharti and R. Roy, "Quantitative ¹H NMR spectroscopy," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 35, pp. 5–26, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>
- [16] Α. Μοροπούλου, "Χαρακτηρισμός, έλεγχος ποιότητας, διάγνωση φθοράς και συντήρηση δομικών υλικών. Μεθοδολογία ενόργανων και μη καταστρεπτικών τεχνικών," *Διδακτικές Σημειώσεις για το προπτυχιακό μάθημα κατεύθυνσης «Υλικά Ι» του 9ου εξαμ. Χημ. Μηχ., Αθήνα ΕΜΠ*, vol. 506, 2003.
- [17] U. Holzgrabe, B. W. K. Diehl, and I. Wawer, "NMR spectroscopy in pharmacy," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 17, no. 4, pp. 557–616, 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(97\)00276-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(97)00276-8)
- [18] Μ. Όξενκιουν-Πετροπούλου, "Φυσικές Μέθοδοι ανάλυσης-Οπτικές Μέθοδοι," *εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα*, pp. 2857–2870, 1987.
- [19] Magritek, "Using Proton NMR Spectroscopy for the Identification of the Isomers of Ethyl Acetate, Butyric Acid and Isobutyric Acid," *AZoM*, Aug. 06,

2022. Accessed: Aug. 06, 2022. [Online]. Available: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=12316>
- [20] J. U. Izunobi and C. L. Higginbotham, "Polymer Molecular Weight Analysis by ¹H NMR Spectroscopy," *J Chem Educ*, vol. 88, no. 8, pp. 1098–1104, Aug. 2011, doi: 10.1021/ed100461v.
- [21] E. Lubomirsky *et al.*, "Polymeric stationary phases for size exclusion chromatography: A review," *Anal Chim Acta*, vol. 1151, p. 338244, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338244>
- [22] G. Gellerstedt, "Gel permeation chromatography," in *Methods in lignin chemistry*, Springer, 1992, pp. 487–497.
- [23] T. G. Scholte, N. L. J. Meijerink, H. M. Schoffeleers, and A. M. G. Brands, "Mark–Houwink equation and GPC calibration for linear short-chain branched polyolefines, including polypropylene and ethylene–propylene copolymers," *J Appl Polym Sci*, vol. 29, no. 12, pp. 3763–3782, 1984.
- [24] K. D. Vernon-Parry, "Scanning electron microscopy: an introduction," *III-Vs Review*, vol. 13, no. 4, pp. 40–44, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0961-1290\(00\)80006-X](https://doi.org/10.1016/S0961-1290(00)80006-X)
- [25] R. and W. Z. L. and J. D. Zhou Weilie and Apkarian, "Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM)," in *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, Z. L. Zhou Weilie and Wang, Ed. New York, NY: Springer New York, 2007, pp. 1–40. doi: 10.1007/978-0-387-39620-0_1.
- [26] Κ. Γ. Π. Α. Κωνσταντίνος Φασσέας, "Τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια." <https://www.aua.gr/fasseas/electron%20microscopes.htm> (accessed Aug. 09, 2022)

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα και Συζήτηση-Ενζυμικός προπολυμερισμός PBS

5.1. Εισαγωγή

Ο ενζυμικός προπολυμερισμός του PBS πραγματοποιείται με τεχνική μάζας. Η τεχνική επιλέχθηκε καθώς δεν χρησιμοποιείται διαλύτης και έτσι ενισχύεται ο πράσινος χαρακτήρας της διεργασίας. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι είναι πιο αποδοτική τεχνική για την ενζυμική παραγωγή του PBS σε σχέση με διαλύτες χαμηλού σημείου βρασμού [1]. Το πρώτο στάδιο γίνεται για 24h σε ήπιες συνθήκες (θερμοκρασία 40°C, ατμοσφαιρική πίεση). Στο δεύτερο στάδιο εφαρμόζονται οι βελτιστοποιημένες συνθήκες αντίδρασης βάσει προηγούμενης έρευνας του εργαστηρίου (θερμοκρασία 90°C, μειωμένη πίεση 20 mbar, χρόνος 2h) [2].

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιείται κλιμάκωση της διεργασίας με στόχο την παραγωγή 20 g προπολυμερούς. Όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στην ενότητα 5.4.1, τα προϊόντα κλιμάκωσης παρουσιάζουν ελαφρώς μειωμένες τιμές μοριακών βαρών σε σχέση με προηγούμενα δείγματα μικρότερης κλίμακας, το πιθανότερο λόγω της ισχυρότερης επίδρασης φαινομένων μεταφοράς στο σύστημα. Επομένως μελετάται η επίδραση του χρόνου στην μετατόπιση της ισορροπίας της αντίδρασης, και δίνεται επιπλέον χρόνος στο σύστημα ώστε να διερευνηθεί αν η παράμετρος αυτή επηρεάζει το τελικό προϊόν. Εξετάζονται οι χρόνοι αντίδρασης 2, 4 και 6 ώρες (Πίνακας 8).

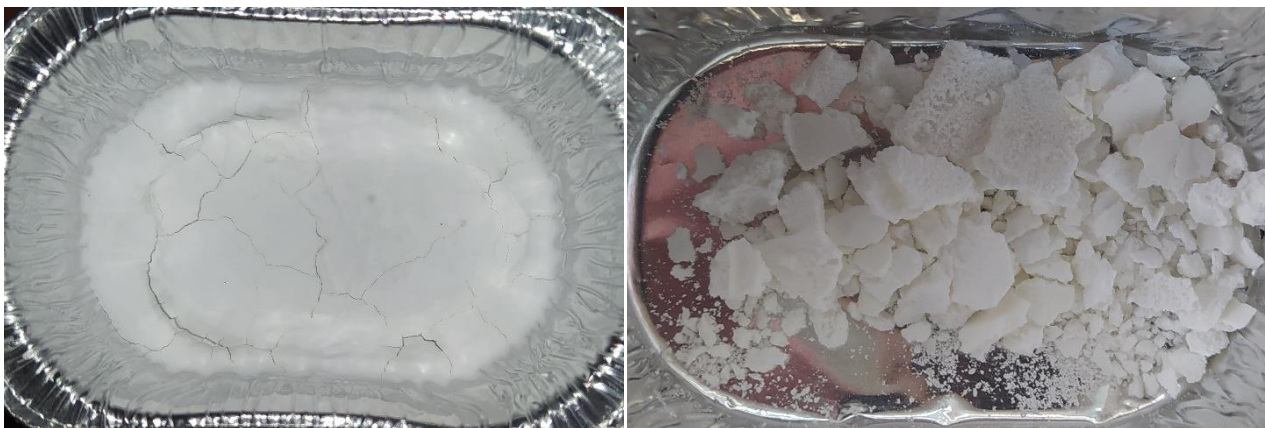
Πίνακας 8 Συνθήκες δειγμάτων πειραμάτων προπολυμερισμού και αποδόσεις διεργασίας

Δείγμα	1 ^ο στάδιο			2 ^ο στάδιο			Απόδοση διεργασίας (%)
	T(°C)	P(mbar)	t(h)	T(°C)	P(mbar)	t(h)	
90_20_2	40	1000	24	90	20	2	96
90_20_4	40	1000	24	90	20	4	94
90_20_6	40	1000	24	90	20	6	97

*Ονομασία δειγμάτων: συνθήκες δεύτερου σταδίου **X_Y_Z** όπου **X**: θερμοκρασία σε °C, **Y**: η πίεση σε mbar και **Z**: ο χρόνος σε h

5.2. Μακροσκοπική μορφολογία προϊόντων PBS ενζυμικού προπολυμερισμού και αποδόσεις διεργασίας

Το ενζυμικά συντεθειμένο προπολυμερές PBS παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό. Ενδεικτικά στην Εικόνα 37 φαίνεται το προϊόν για χρόνο δεύτερου σταδίου 2h (90_20_2).



Εικόνα 37 Μορφολογία προπολυμερούς PBS με διάρκεια 2ου σταδίου 2h.

Η μακροσκοπική μορφολογία των πολυμερών συσχετίζεται με τις ιδιότητές τους (π.χ. μοριακό βάρος). Αφενός, τα oligομερή με μειωμένο μοριακό βάρος είναι συνήθως ιξώδη υγρά, αφετέρου, τα υψηλότερου μοριακού βάρους βρίσκονται σε στερεή μορφή [1].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η μορφολογία των προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού που παραλαμβάνονται αξιολογείται ως ικανοποιητική, δεδομένου ότι ήταν σε όλες τις περιπτώσεις λευκά στερεά, που μετατρέπονται εύκολα σε ελευθέρως ρέουσα σκόνη (free-flowing powder), υποδηλώνοντας έναν ικανοποιητικό βαθμό πολυμερισμού. Αντίστοιχα, οι αποδόσεις διεργασίας των πειραμάτων είναι αρκετά υψηλές, όπως παρατηρείται και από τον Πίνακα 8. Για την ακρίβεια, κυμαίνονται από 94-97% σε όλες τις περιπτώσεις, με την υψηλότερη απόδοση να εμφανίζεται στο δείγμα 90_20_6 (97%).

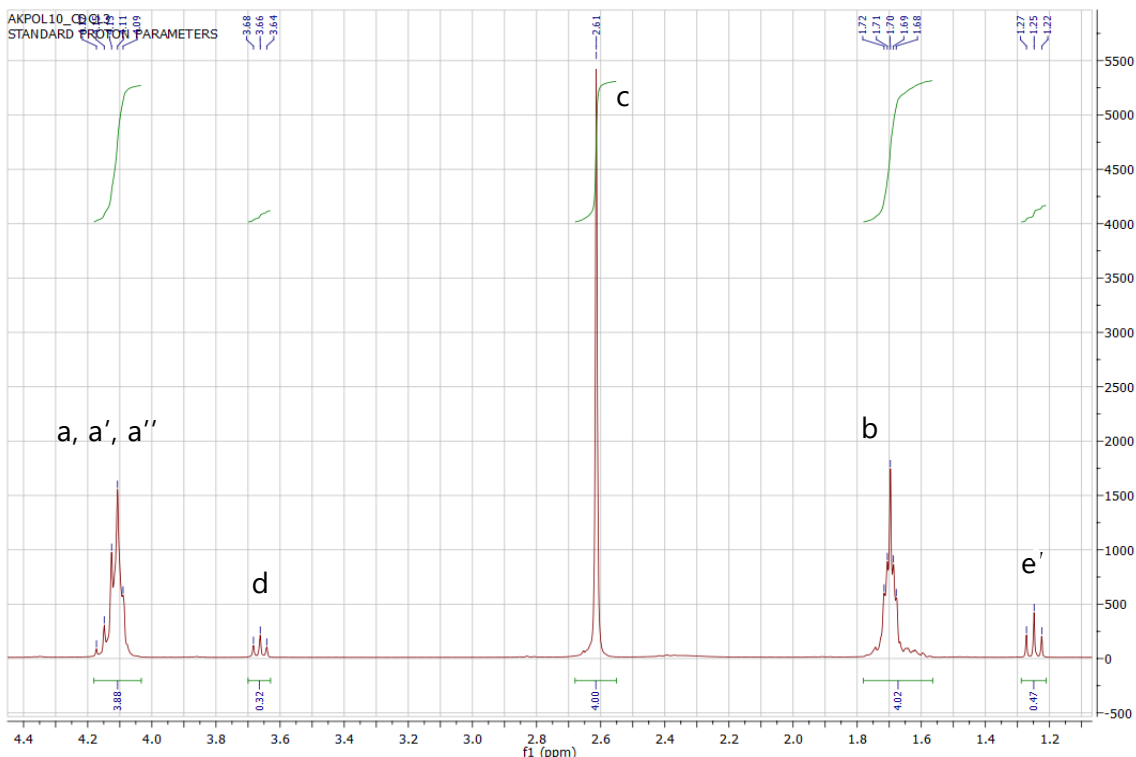
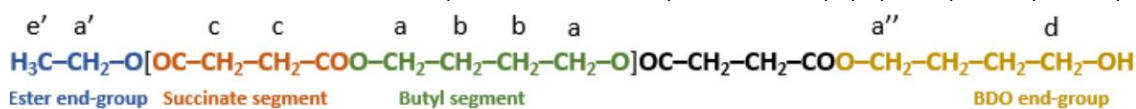
5.3. Ταυτοποίηση της δομής του PBS

5.3.1. $^1\text{H-NMR}$

Όλα τα προϊόντα ταυτοποιούνται μέσω $^1\text{H-NMR}$ και στη συνέχεια υπολογίζεται το μέσου-αριθμού μοριακό τους βάρος (\overline{M}_n). Ενδεικτικά, το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του προϊόντος PBS από τον ενζυμικό προπολυμερισμό για τις 2h παρουσιάζεται στην Εικόνα 38. Η ταυτοποίηση των πρωτονίων γίνεται όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 4.4.6:

- Τα υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση c είναι εντός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας και προέρχονται από το τμήμα του ηλεκτρικού διαιθυλεστέρα (succinate segment) ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2-$).
- Τα υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση a αντιστοιχούν στο άτομο του άνθρακα που βρίσκεται δίπλα από τον εστερικό δεσμό ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2-$) εντός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας.
- Τα υδρογόνα b προέρχονται επίσης από το τμήμα της βουτανοδιόλης (butyl segment) και διαχωρίζονται λόγω διαφορετικού χημικού περιβάλλοντος από αυτά της θέσης a.
- Τα υδρογόνα d ($-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$) και e ($-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$), αντίστοιχα ανήκουν έξω από τη δομική μονάδα.
- Έξω από τη δομική μονάδα βρίσκονται επίσης τα υδρογόνα a', a'' τα οποία αλληλεπικαλύπτονται με τα υδρογόνα a.

Η κανονικοποίηση ορίζεται ως προς τα υδρογόνα στη θέση c, με απορρόφηση στα 2,61 ppm και ένταση απορρόφησης 4. Τα υδρογόνα στη θέση a παρουσιάζουν απορρόφηση στα 4,09 – 4,17 ppm, με ένταση απορρόφησης 3,88. Αυτά της θέσης b εμφανίζουν απορρόφηση στα 1,68 – 1,72 ppm και ένταση απορρόφησης 4,02. Επίσης, τα σήματα χαμηλής έντασης των κορυφών στα 3,64 – 3,68 ppm και στα 1,22 – 1,27 ppm αντιστοιχούν στα υδρογόνα d και e.



Εικόνα 38 Φάσμα H-NMR για το δείγμα 90_20_2.

Παρατηρείται ότι οι ολοκληρώσεις στις κορυφές a και b πλησιάζουν κοντά στο 4, κάτι που συμφωνεί με τον αριθμό των υδρογόνων τύπου a και τύπου b της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας. Επιπλέον, τα φάσματα που παραλαμβάνονται είναι παρόμοια με αντίστοιχα φάσματα PBS (χημικά και ενζυμικά συνθετημένα), όπως συναντώνται στη βιβλιογραφία. Ταυτοποιείται λοιπόν μέσω ¹H-NMR η δομική μονάδα του ενζυμικά συνθετημένου PBS. [1], [3], [4].

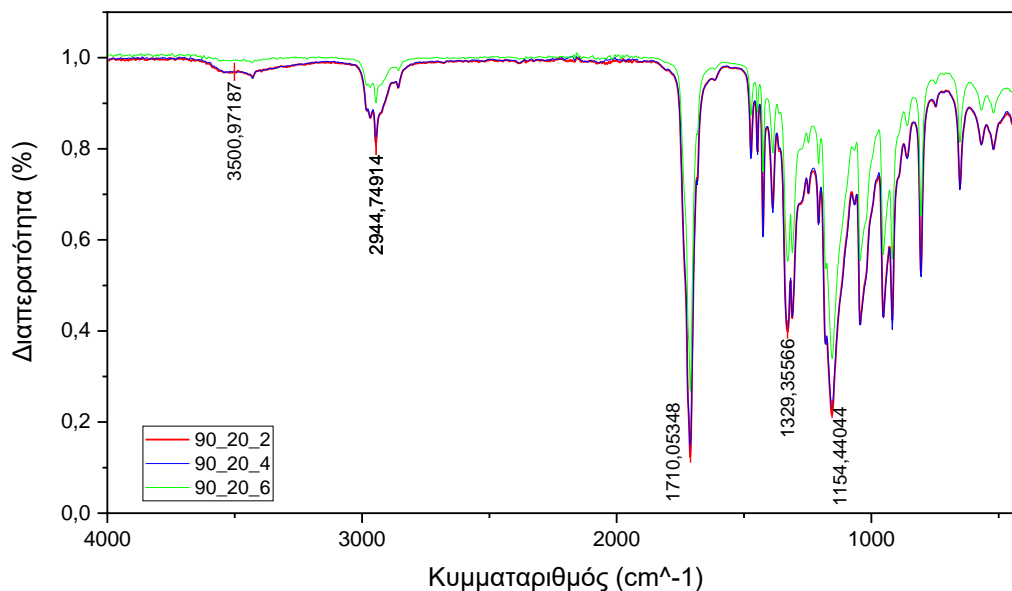
5.3.2. FTIR-ATR

Από την ανάλυση FTIR-ATR των δειγμάτων προπολυμερισμού λαμβάνεται το Διάγραμμα 3. Σε αυτό, εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές [4]–[6]:

- 3500 cm⁻¹ που αντιστοιχεί στην τάση του δεσμού O-H
- 2945 cm⁻¹ που αντιστοιχεί στην τάση του δεσμού C-H
- 1710 cm⁻¹ που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=O

- 1329 cm^{-1} που αντιστοιχεί στην τάση του δεσμού -COO-
- 1154 cm^{-1} που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-O-C

Επομένως, ταυτοποιείται και μέσω του FTIR η χημική δομή του PBS για όλα τα δείγματα.



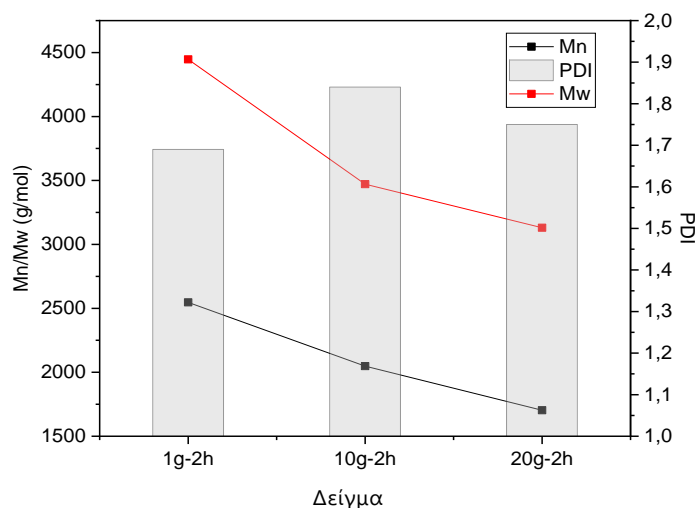
Διάγραμμα 3 Φάσμα FTIR προπολυμερών PBS.

5.4. Προσδιορισμός μοριακού βάρους

5.4.1. Προσδιορισμός μοριακού βάρους μέσω GPC

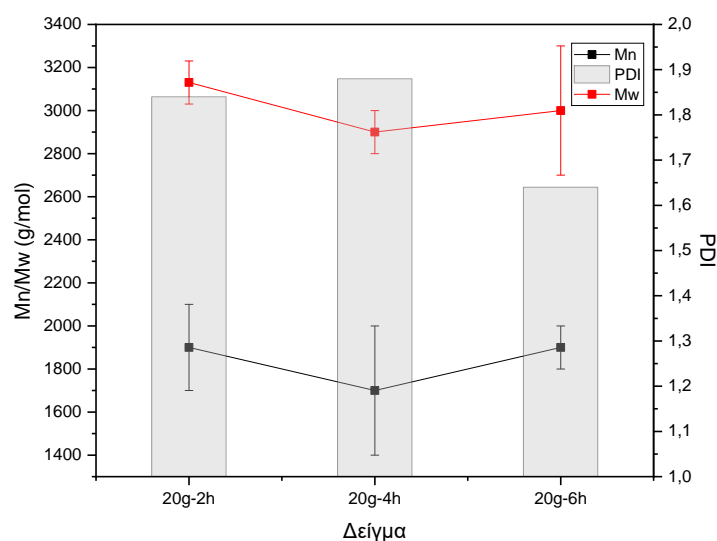
Όπως προαναφέρθηκε, η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί τη συνέχεια προηγούμενης έρευνας του εργαστηρίου όπου είχε γίνει διερεύνηση για τις βέλτιστες συνθήκες δεύτερου σταδίου προπολυμερισμού του PBS σε κλίμακα 1g προϊόντος [2]. Κατά την κλιμάκωση στα 10 και έπειτα στα 20 g παρατηρείται μικρή πτώση στο μοριακό βάρος, όπως αυτό προσδιορίζεται με χρωματογραφία διέλευσης μέσω πηκτής (Gel Permeation Chromatography ή GPC). Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4, το προϊόν της κλίμακας 20g παρουσιάζει μείωση στο \overline{M}_n $24\pm 8\%$, (από 2500 g/mol σε $1900\pm 200\text{ g/mol}$) ενώ το μέσου-βάρους μοριακό βάρος (\overline{M}_w) παρουσιάζει μείωση $33\pm 2\%$ (από 4500 g/mol σε $3000\pm 100\text{ g/mol}$). Η εντονότερη μείωση του \overline{M}_w υποδηλώνει ότι οι μεγαλύτερου μήκους αλυσίδες είναι σημαντικά λιγότερες σε σχέση με τις μικρότερες, επιβεβαιώνοντας έτσι την επίδραση των φαινομένων διάχυσης στις μεγαλύτερες κλίμακες. Παράλληλα, η διασπορά των τιμών αυτών (PDI)

παραμένει σταθερή και σε τιμές κάτω του 2, υποδηλώνοντας μέτρια πολυδιασπορά στο δείγμα [7]. Διαπιστώνεται, λοιπόν, ότι τα φαινόμενα μεταφοράς και διάχυσης επηρεάζουν σημαντικά τον ρυθμό του πολυμερισμού στις μεγαλύτερες κλίμακες και οδηγούν στο σχηματισμό αλυσίδων προπολυμερούς μικρότερου μήκους.



Διάγραμμα 4 Μοριακό βάρος και δείκτης διασποράς για τις κλιμακωμένες διεργασίες προπολυμερισμού-επίδραση ποσότητας τελικού προϊόντος.

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, δίνεται επιπλέον χρόνος στο σύστημα ώστε να διερευνηθεί αν η παράμετρος αυτή επηρεάζει το τελικό προϊόν. Ως δείγμα αναφοράς από εδώ και πέρα θεωρείται αυτό με μοριακό βάρος 1700 g/mol. Εξετάστηκαν οι χρόνοι 2 (αρχικό δείγμα), 4 και 6 ώρες και τα μοριακά βάρη των προϊόντων φαίνονται στο Διάγραμμα 5.



Διάγραμμα 5 Μοριακό βάρος και δείκτης διασποράς για τις κλιμακωμένες διεργασίες προπολυμερισμού-επίδραση χρόνου.

Από το Διάγραμμα 5 παρατηρείται πως η αύξηση του χρόνου του δεύτερου σταδίου δεν προσφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Το μοριακό βάρος παραμένει σχεδόν σταθερό (1700 ± 300 g/mol στο 90_20_4 και 1900 ± 100 στο 90_20_6). Επομένως, όσον αφορά στο μοριακό βάρος, η επίδραση του χρόνου του δεύτερου σταδίου είναι αμελητέα και δεν φαίνεται να αντισταθμίζει τα φαινόμενα μεταφοράς που επηρεάζουν την διεργασία μεγαλύτερης κλίμακας. Αυτό συμβαίνει πιθανώς διότι η θερμοκρασία αντίδρασης είναι μικρότερη από τη θερμοκρασία τήξης του τελικού προϊόντος (παραλαμβάνεται στερεό προϊόν - Εικόνα 37). Συνέπεια αυτού είναι οι αλυσίδες που σχηματίζονται να βρίσκονται σε στερεά κατάσταση και να περιορίζεται έτσι η διάχυσή τους στους πόρους του ενζύμου. Η αντίδραση έτσι σταματά λόγω της απουσίας κινητικότητας των πολυμερικών αλυσίδων.

5.4.2. Προσδιορισμός μοριακού βάρους μέσω $^1\text{H-NMR}$

Χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 4 για την εύρεση του \overline{M}_n και αντικαθιστώντας τις τιμές των μοριακών βαρών ο τύπος διαμορφώνεται ως εξής:

Εξίσωση 8 Υπολογισμός μοριακού βάρους PBS από το φάσμα H-NMR

$$\overline{M}_n = \frac{\left(I_a - I_d - \frac{2}{3} I_{e'} \right) 88,1 + \frac{I_c}{4} 84,07 + \frac{I_d}{2} 89,11 + \frac{I_{e'}}{3} 45,06}{0,5 \left(\frac{I_d}{2} + \frac{I_{e'}}{3} \right)}$$

Αντικαθιστώντας και τις τιμές των εντάσεων απορρόφησης, υπολογίζεται το \overline{M}_n για κάθε δείγμα. Επιπλέον από την Εξίσωση 5 υπολογίζεται το ποσοστό των ακραίων εστερικών ομάδων των προϊόντων. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9 Υπολογισμοί \overline{M}_n και ποσοστού ακραίων ομάδων προπολυμερούς από το φάσμα H-NMR

Δείγμα	\overline{M}_n (g/mol)	Ποσοστό ακραίων εστερικών ομάδων (%)
90_20_2	1100	49
90_20_4	1100	49
90_20_6	1200	61

Από τον υπολογισμό του μέσου αριθμού μοριακού βάρους και με βάση το $^1\text{H-NMR}$ επιβεβαιώνεται πως παραμένει σταθερό για τις 2 και 4 ώρες και παρατηρείται μικρή αύξηση (10%). Επομένως και από αυτή τη μέθοδο εξάγεται το πόρισμα πως η επίδραση του χρόνου του δεύτερου σταδίου είναι αμελητέα και δεν επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα όσον αφορά το μοριακό βάρος.

Μια άλλη πληροφορία που λαμβάνεται από τη συγκεκριμένη ανάλυση είναι το ποσοστό ακραίων εστερικών ομάδων και έμμεσα των υδροξυλομάδων. Η περίσσεια των υδροξυλομάδων καθιστά τα άκρα των αλυσίδων πιο δραστικά και κατ' επέκταση τα αντίστοιχα δείγματα κρίνονται καταλληλότερα για μεταπολυμερισμό [1]. Παρατηρείται πως τα δείγματα με χρόνους 2 και 4 ώρες έχουν 49% εστερικά άκρα ενώ αυτό με χρόνο 6 ώρες 61%. Κατά συνέπεια, το ποσοστό των υδροξυλομάδων είναι περίπου ίσο με αυτό των εστερικών ομάδων στις δύο πρώτες περιπτώσεις ενώ στην τρίτη επικρατούν τα εστερικά άκρα. Έτσι, αποδεικνύεται πως το τελευταίο δείγμα είναι το λιγότερο κατάλληλο για μεταπολυμερισμό. Από την άλλη, τα δείγματα των 2 και 4 ωρών δεν διαφέρουν ως προς την ιδιότητα αυτή και έχουν αμελητέα μεγαλύτερο ποσοστό υδροξυλικών άκρων. Ακόμη μια φορά φαίνεται πως οι περισσότερες ώρες δεν προσδίδουν καλύτερες ιδιότητες στο προπολυμερές.

5.4.3. Σύγκριση αποτελεσμάτων GPC και $^1\text{H-NMR}$

Το μοριακό βάρος των δειγμάτων υπολογίζεται μέσω δύο διαφορετικών μεθόδων (GPC και $^1\text{H-NMR}$) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10 \overline{M}_n με βάση τις αναλύσεις GPC και $^1\text{H-NMR}$

Δείγμα	\overline{M}_n (g/mol)-HNMR	\overline{M}_n (g/mol)-GPC
90_20_2	1100	1700
90_20_4	1100	1500
90_20_6	1200	2000

Παρατηρείται πως τα αποτελέσματα για το μοριακό βάρος από το $^1\text{H-NMR}$ είναι σε όλα τα δείγματα 27-40% μικρότερα από τα αντίστοιχα της GPC. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο δείγμα (2h) το μοριακό βάρος από την ανάλυση $^1\text{H-NMR}$

NMR είναι κατά 35% μικρότερο από αυτό της GPC. Αντίστοιχα, τα άλλα δύο δείγματα (4h, 6h) η μείωση αυτή είναι 27% και 40%. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις και συνάδει με τη βιβλιογραφία, όπου σε χημικά συντεθειμένα δείγματα PBS (1^ο στάδιο-4h, 100°C και 2^ο στάδιο-6h, 150°C με προσθήκη βουτοξειδίου του τιτανίου (IV)) παρατηρήθηκε μείωση από 49 έως και 66% στο μοριακό βάρος από ανάλυση ¹H-NMR σε σχέση με τη GPC [8].

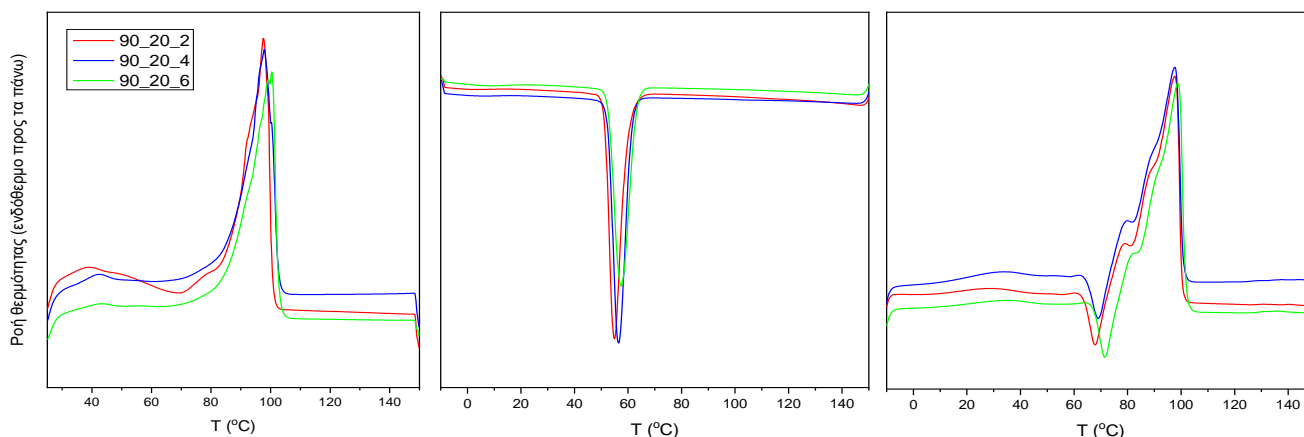
Τα αποτελέσματα του ¹H-NMR, παρουσιάζουν συνήθως μεγαλύτερη ακρίβεια. Παρόλο που η GPC είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών των πολυμερών, είναι μια έμμεση μέθοδος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε συνδυασμό με άλλες απόλυτες μεθόδους [8]–[10].

Σε κάθε περίπτωση οι δύο μέθοδοι παρουσιάζουν ίδια τάση παρά τις αριθμητικές αποκλίσεις. Αυτό επιβεβαιώνει πως η αύξηση του χρόνου δεν επιδρά σημαντικά στο μοριακό βάρος και πως υπάρχει ανάγκη για μεταπολυμερισμό και βελτίωση των ιδιοτήτων του προπολυμερούς PBS.

5.5. Θερμικές ιδιότητες προπολυμερούς PBS

5.5.1. Αποτελέσματα DSC

Στον Πίνακα Π1 στο Παράρτημα πινάκων παρουσιάζονται οι θερμικές ιδιότητες των προπολυμερών PBS και στο Διάγραμμα 6 οι αντίστοιχες καμπύλες DSC.



Διάγραμμα 6 Καμπύλες DSC προπολυμερούς με διαφορετικό χρόνο δεύτερου σταδίου (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).

Από τα αποτελέσματα του DSC φαίνεται πως και τα τρία προπολυμερή έχουν παρεμφερείς θερμικές ιδιότητες. Στην πρώτη θέρμανση, όπου διαγράφεται η θερμική ιστορία του υλικού, και για τα τρία δείγματα υπάρχει μια οξεία κορυφή στους 98-100°C και ίχνη υγρασίας πριν τους 80°C. Όσον αφορά την ψύξη, παρατηρείται πως όσο αυξάνεται ο χρόνος του δεύτερου σταδίου τόσο πιο γρήγορα γίνεται η κρυστάλλωση του δείγματος στο εύρος των 55-58°C. Ωστόσο οι διαφορές κρίνονται αμελητέες.

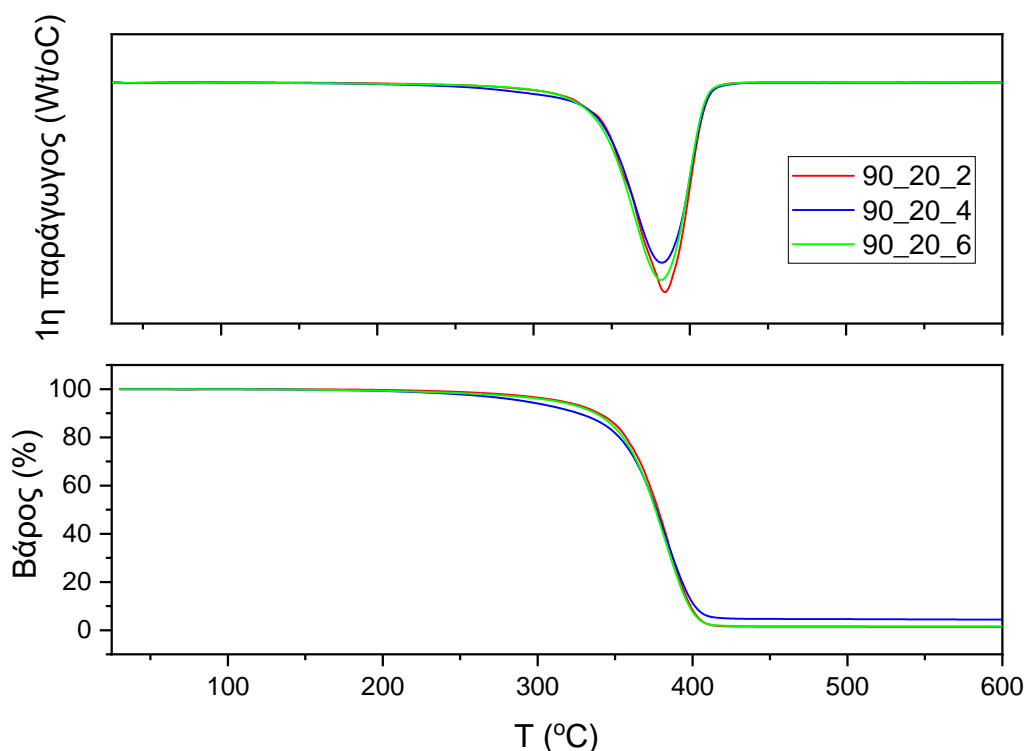
Κατά τη δεύτερη θέρμανση και τα τρία δείγματα κρυσταλλώνουν σε μικρό βαθμό πριν ξεκινήσει η τήξη στους 68-72°C (ψυχρή κρυστάλλωση ή cold crystallization). Πρόκειται για ένα μέρος του δείγματος που δεν είχε αρκετό χρόνο να κρυσταλλώσει κατά την ψύξη. Μετά την ψυχρή κρυστάλλωση, εμφανίζονται 3 ενδόθερμα τήξης (peaks), κάτι αναμενόμενο για το PBS. Η κορυφή που παρατηρείται στην υψηλότερη θερμοκρασία (98-99°C) αντιστοιχεί στην ανακρυστάλλωση των μερικώς λιωμένων κρυστάλλων κατά τη διάρκεια της 2^{ης} θέρμανσης, ενώ οι πρώτες δύο κορυφές οφείλονται πιθανώς στην τήξη του πραγματικού κρυστάλλου (77-82°C και 88-89°C) [11]. Σημειώνεται πως τα σημεία τήξης είναι ελαφρώς μειωμένα σε σχέση με εμπορικά διαθέσιμα PBS, αλλά είναι μέσα στο εύρος θερμοκρασιών που αναμένονται για το PBS (90-120°C) [1]. Για παράδειγμα το PBS (PBE 003) (Natureplast, France) έχει σημείο τήξης στους 114°C και \overline{M}_n 75000 g/mol [4]. Επομένως, δεδομένης της διαφοράς στο μοριακό βάρος οι διαφορές στα σημεία τήξης δεν είναι σημαντικές. Το σημείο τήξης του δείγματος των 6 ωρών είναι κατά 1°C μεγαλύτερο, κάτι το οποίο δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική διαφορά.

Όσον αφορά την κρυσταλλικότητα, οι διαφορές είναι πιο διακριτές. Το δείγμα 90_20_2 έχει κρυσταλλικότητα 64%, το 90_20_4 69% και το 90_20_6 59%. Όπως είναι φανερό, στις 6 ώρες η κρυσταλλικότητα μειώνεται κατά 8% σε σχέση με την αρχική των 2 ωρών. Αυτό πιθανώς συμβαίνει λόγω της μικρής αύξησης του μοριακού βάρους. Καθώς οι αλυσίδες είναι μακρύτερες είναι πιο δύσκολο για όλες τις περιοχές κατά μήκος των γειτονικών αλυσίδων να ευθυγραμμιστούν έτσι ώστε να παράγουν μια διατεταγμένη συστοιχία. Επομένως αυτό συνεπάγεται μειωμένη κρυσταλλικότητα [12].

Συμπερασματικά, η αύξηση του χρόνου του 2^{ου} σταδίου δεν βελτιώνει τις θερμικές ιδιότητες του προϊόντος.

5.5.2. Αποτελέσματα TGA

Στον Πίνακα Π2 στο Παράρτημα παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι θερμικές ιδιότητες που λήφθηκαν από την ανάλυση TGA. Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες TGA των προϊόντων PBS του ενζυμικού προπολυμερισμού.



Διάγραμμα 7 Καμπύλες TGA προπολυμερούς με διαφορετικό χρόνο δεύτερου σταδίου.

Από το Διάγραμμα 7 φαίνεται ότι η αποικοδόμηση του PBS πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο, σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία [13] σε θερμοκρασίες 382-384°C. Επιπλέον, το $T_{d(5\%)}$, το οποίο είναι πιο ευαίσθητο σε αλλαγές στο μοριακό βάρος είναι μειωμένο κατά 8% στο δείγμα των 4 ωρών, για το οποίο βρέθηκε και λίγο μικρότερη τιμή \overline{M}_n όπως υπολογίστηκε μέσω της GPC. Από τις υψηλές τιμές του $T_{d(5\%)}$ διαπιστώνεται η αυξημένη ποιότητα του ενζυμικά συντεθειμένου πολυμερούς, κυρίως λόγω της εκλεκτικότητας του ενζύμου. Επιπλέον, φαίνεται πως ο αυξημένος χρόνος αντίδρασης δεν

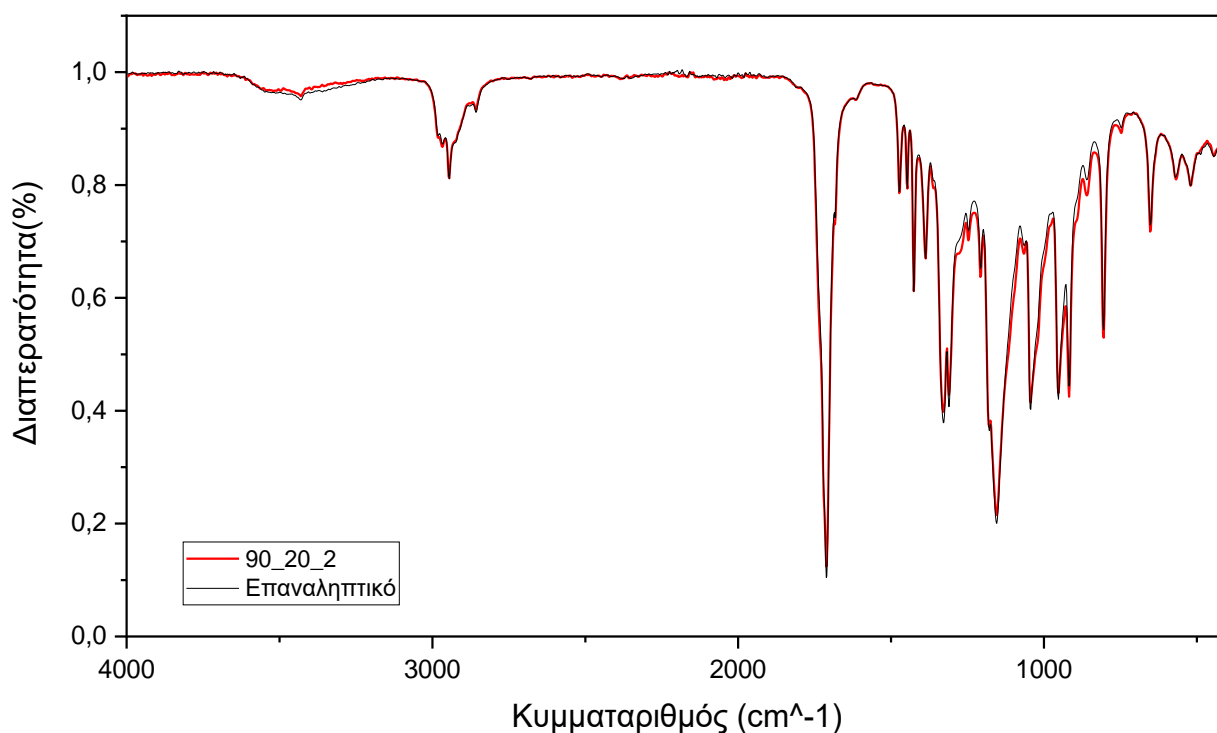
υποβαθμίζει το προπολυμερές, πιθανότατα λόγω της σχετικά χαμηλής θερμοκρασίας.

Συνολικά, οι θερμικές ιδιότητες του προπολυμερούς δεν επηρεάζονται σε αξιοσημείωτο βαθμό από την αύξηση του χρόνου του δεύτερου σταδίου.

5.6. Επανάληψη πειράματος προπολυμερισμού PBS

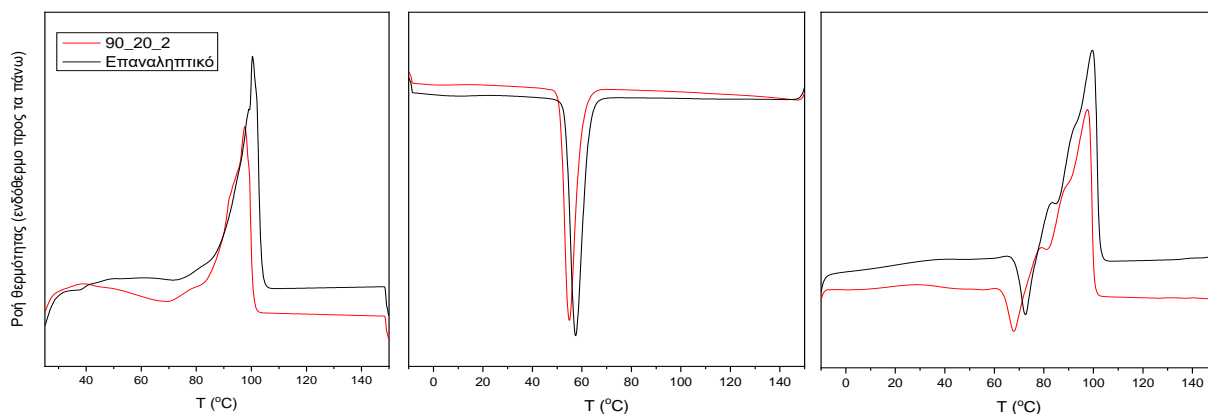
Γίνεται επανάληψη του πειράματος 90_20_2 για την επαλήθευση των ιδιοτήτων του.

Στο Διάγραμμα 9 παρουσιάζεται το φάσμα FT-IR του δείγματος 90_20_2 και του επαναληπτικού του. Όπως συμπεραίνεται, το PBS που παράγεται από το επαναληπτικό πείραμα παρουσιάζει πανομοιότυπες κορυφές στο φάσμα IR.



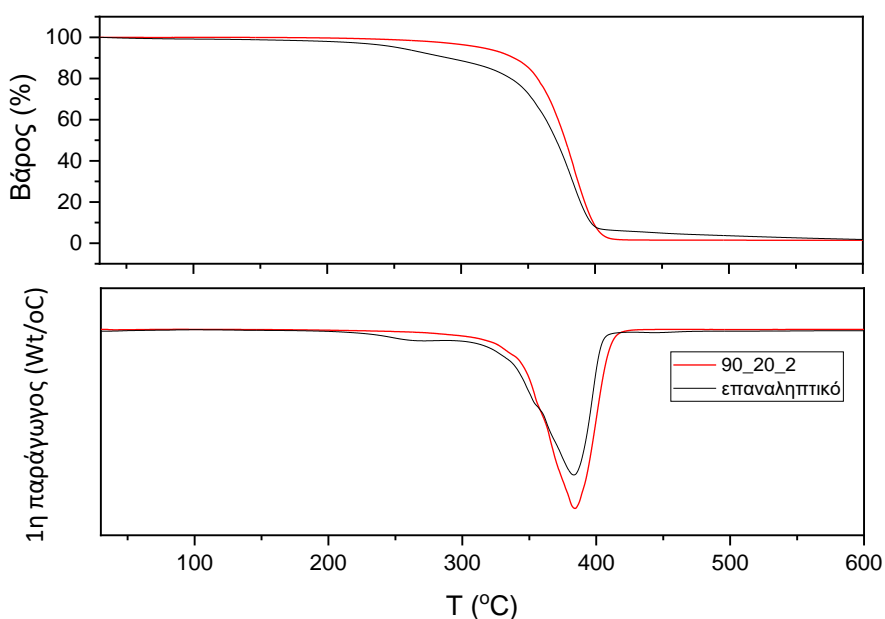
Διάγραμμα 8 Φάσμα FTIR πειράματος προπολυμερισμού και επαναληπτικού.

Ακολουθούν τα θερμικά διαγράμματα DSC και TGA (Διάγραμμα 9, Διάγραμμα 10) των δύο πειραμάτων. Οι αντίστοιχοι πίνακες με τα αναλυτικά αποτελέσματα βρίσκονται στο Παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π3, Πίνακας Π4).



Διάγραμμα 9 Καμπύλες DSC πειράματος 90_20_2 και επαναληπτικού (1^η θέρμανση, ψύξη, 2^η θέρμανση).

Από την ανάλυση DSC λαμβάνονται παρόμοια αποτελέσματα για τα δύο δείγματα. Στην πρώτη θέρμανση παρατηρούνται ίχνη υγρασίας πριν τους 90°C και οξεία κορυφή στους 98°C και 100°C, για το αρχικό και το επαναληπτικό δείγμα, αντίστοιχα. Στην ψύξη εμφανίζεται οξεία κορυφή για το αρχικό δείγμα στους 55°C και για το επαναληπτικό στους 57°C. Στη δεύτερη θέρμανση παρατηρείται ψυχρή κρυστάλλωση στους 68°C στο αρχικό δείγμα έναντι των 73°C του επαναληπτικού. Οι κορυφές τήξης είναι παρεμφερείς με τελική στους 98 και 99°C, για το αρχικό (90_20_2) και το επαναληπτικό δείγμα αντίστοιχα. Τέλος, η κρυσταλλικότητα στο επαναληπτικό πείραμα είναι στο 68%, αντί του 64% του αρχικού. Συμπερασματικά, καμία ιδιότητα από την ανάλυση DSC δε φαίνεται να αποκλίνει σημαντικά.



Διάγραμμα 10 Καμπύλες TGA πειράματος 90_20_2 και επαναληπτικού.

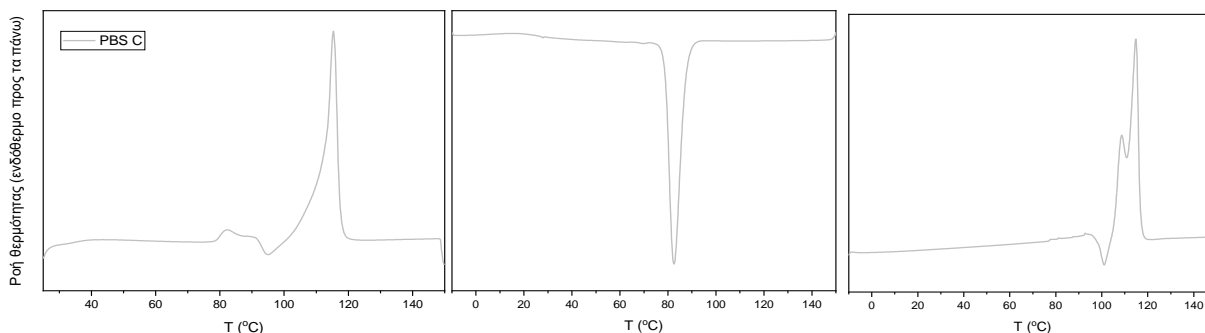
Στο TGA παρατηρείται πως το επαναληπτικό δείγμα έχει πιθανώς ίχνη υγρασίας, η οποία απομακρύνεται στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (έως 100°C) και επομένως εμφανίζει μειωμένο $T_{d(5\%)}$ (252°C). Παρόλα αυτά η θερμοκρασία αποικοδόμησης είναι μόνο κατά 1°C μικρότερη από αυτή του αρχικού δείγματος (383°C), υποδεικνύοντας ίδια θερμική σταθερότητα.

Όσον αφορά το μοριακό βάρος, παρατηρείται μικρή απόκλιση, καθώς το προϊόν του επαναληπτικού πειράματος έχει μέση τιμή \overline{M}_n 2400±50 g/mol έναντι των 1900±200 g/mol του αρχικού προϊόντος.

Συνολικά, φαίνεται πως τα δυο πειράματα εμφανίζουν καλή επαναληψιμότητα.

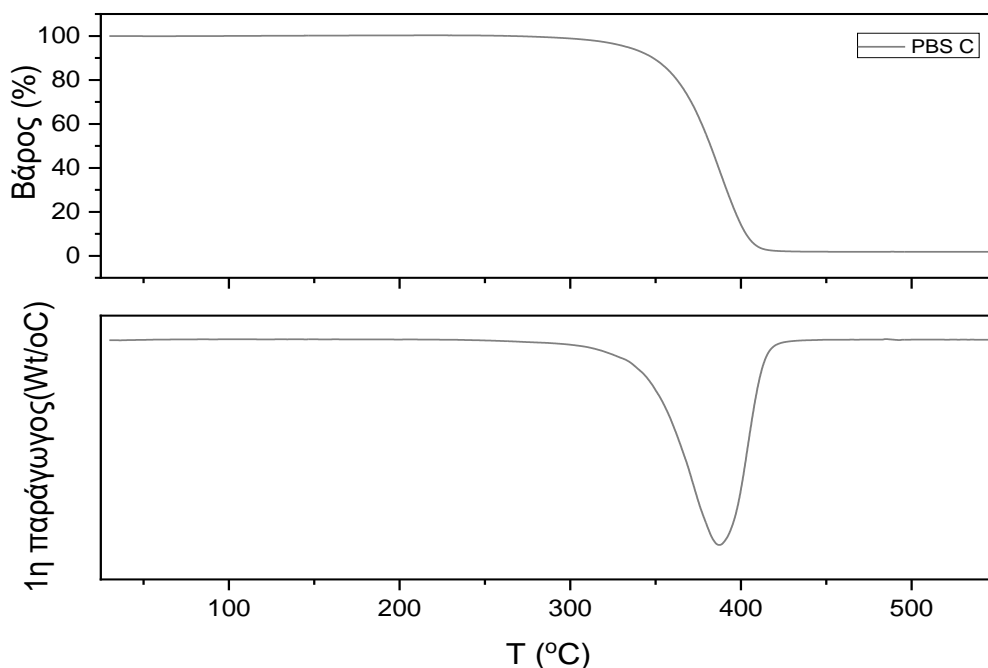
5.7. Ιδιότητες εμπορικού PBS

Για λόγους σύγκρισης αναλύεται το εμπορικό PBS Natureplast PBE003 (Natureplast, France). Τα διαγράμματα DSC και TGA παρουσιάζονται ακολούθως (Διάγραμμα 11, Διάγραμμα 12). Τα αντίστοιχα αναλυτικά νούμερα βρίσκονται στο Παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π 5, Πίνακας Π 6).



Διάγραμμα 11 Καμπύλες DSC εμπορικού PBS (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).

Στην ανάλυση DSC, στην πρώτη θέρμανση παρατηρούνται ίχνη υγρασίας πριν τους 100°C και μία οξεία κορυφή στους 115°C. Η κρυστάλλωση γίνεται νωρίτερα από το προϊόν του ενζυμικού προπολυμερισμού, στους 83°C, και η καμπύλη παρουσιάζει αρκετά στενό εύρος. Κατά τη δεύτερη θέρμανση παρατηρείται ψυχρή κρυστάλλωση στους 101°C και δύο κορυφές τήξης στους 109 και 115°C. Η θερμοκρασία τήξης είναι αυξημένη σε σχέση με το ενζυμικά συντεθειμένο PBS, το οποίο αναμένεται λόγω του υψηλότερου μοριακού του βάρους (13800 g/mol) [1], [14].



Διάγραμμα 12 Καμπύλες TGA εμπορικού PBS.

Κατά την ανάλυση TGA η αποικοδόμηση του PBS πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο στους 387°C, θερμοκρασία πολύ κοντινή με αυτή του ενζυμικά συντεθειμένου PBS (383°C). Αυτό αποτελεί ένδειξη της υψηλής ποιότητας του ενζυμικού PBS που οφείλεται στην εκλεκτικότητα των ενζύμων, στις εφαρμοζόμενες ήπιες συνθήκες κατά τον πολυμερισμό και στην απουσία καταλοίπων μεταλλικών καταλυτών και ανεπιθύμητων παραπροϊόντων που θα υποβάθμιζαν θερμικά το χαμηλότερου μοριακού βάρους PBS [1].

Το εμπορικό PBS υποβάλλεται επίσης σε ανάλυση GPC καθώς, λόγω του χρόνου που έχει παρέλθει, έχει υποβαθμιστεί και το μοριακό βάρος δεν είναι το αναγραφόμενο από την εταιρεία. Το \overline{M}_n υπολογίζεται στα 13800 g/mol με διασπορά 1,61. Όπως ήταν αναμενόμενο είναι πολλαπλάσιο από αυτό του ενζυμικά συντεθειμένου προϊόντος και μειωμένο σε σχέση με το αρχικό του.

5.8. Βιβλιογραφία

- [1] C. Gkountela, M. Rigoroulou, E. M. Barampouti, and S. Vouyiouka, "Enzymatic prepolymerization combined with bulk post-polymerization towards the production of bio-based polyesters: The case of poly(butylene succinate),"

- Eur Polym J*, vol. 143, p. 110197, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110197>
- [2] Δ. Μαρκουλάκης, "Παραγωγή πολυεστέρων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες: Ενζυμικός προπολυμερισμός και μεταπολυμερισμός μάζας," ΕΜΠ, 2022.
- [3] T. Debuissy, E. Pollet, and L. Avérous, "Enzymatic synthesis of a bio-based copolyester from poly (butylene succinate) and poly ((r)-3-hydroxybutyrate): study of reaction parameters on the transesterification rate," *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 12, pp. 4054–4063, 2016.
- [4] I.-N. Georgousopoulou, S. Vouyiouka, P. Dole, and C. D. Papaspyrides, "Thermo-mechanical degradation and stabilization of poly(butylene succinate)," *Polym Degrad Stab*, vol. 128, pp. 182–192, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.03.012>
- [5] Y. J. Phua, "Reactive processing of maleic anhydride-grafted poly(butylene succinate) and the compatibilizing effect on poly(butylene succinate) nanocomposites," *Express Polym Lett*, vol. 7, pp. 340–354, Feb. 2013, doi: 10.3144/expresspolymlett.2013.31
- [6] B. Abderrahim, E. Abderrahman, M. Aqil, T. Fatima Ezahra, T. Abdesselam, and O. Krim, "Kinetic Thermal Degradation of Cellulose, Polybutylene Succinate and a Green Composite: Comparative Study," Jan. 2015, doi: 10.12691/wjee-3-4-1.
- [7] U. Nobbmann, "Polydispersity – what does it mean for DLS and chromatography?," *Malvern Panalytical*, Oct. 23, 2017. <https://www.materials-talks.com/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/> (accessed Sep. 12, 2022).
- [8] V. C. da Costa, E. R. F. dos Santos, and F. G. de Souza Jr, "Poly(Butylene Succinate) Molar Mass Calculation by GPC and 1H-NMR," *Macromol Symp*, vol. 398, no. 1, p. 2000216, Aug. 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/masy.202000216>

- [9] J. U. Izunobi and C. L. Higginbotham, "Polymer Molecular Weight Analysis by ^1H NMR Spectroscopy," *J Chem Educ*, vol. 88, no. 8, pp. 1098–1104, Aug. 2011, doi: 10.1021/ed100461v.
- [10] O. Procházka and P. Kratochvíl, "An analysis of the accuracy of determining molar-mass averages of polymers by GPC with an on-line light-scattering detector," *J Appl Polym Sci*, vol. 34, no. 6, pp. 2325–2336, Nov. 1987, doi: <https://doi.org/10.1002/app.1987.070340622>
- [11] Z. Liang, P. Pan, B. Zhu, T. Dong, and Y. Inoue, "Mechanical and thermal properties of poly(butylene succinate)/plant fiber biodegradable composite," *J Appl Polym Sci*, vol. 115, no. 6, pp. 3559–3567, Mar. 2010, doi: <https://doi.org/10.1002/app.29848>
- [12] U. K. Murmu *et al.*, "Mechanical Properties of Crystalline and Semicrystalline Polymer Systems," in *Encyclopedia of Materials: Plastics and Polymers*, M. S. J. Hashmi, Ed. Oxford: Elsevier, 2022, pp. 917–927. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820352-1.00248-0>
- [13] C. D. Papaspyrides *et al.*, "Feasibility of Solid-State Postpolymerization on Fossil- and Bio-Based Poly(butylene succinate) Including Polymer Upcycling Routes," *Ind Eng Chem Res*, vol. 55, no. 20, pp. 5832–5842, May 2016, doi: 10.1021/acs.iecr.6b00588.
- [14] T.-X. Jin, M. Zhou, S. Hu, F. Chen, 傅强 Q., and Y. Fu, "Effect of molecular weight on the properties of poly(butylene succinate)," *Chinese Journal of Polymer Science*, vol. 32, Jul. 2014, doi: 10.1007/s10118-014-1463-4.

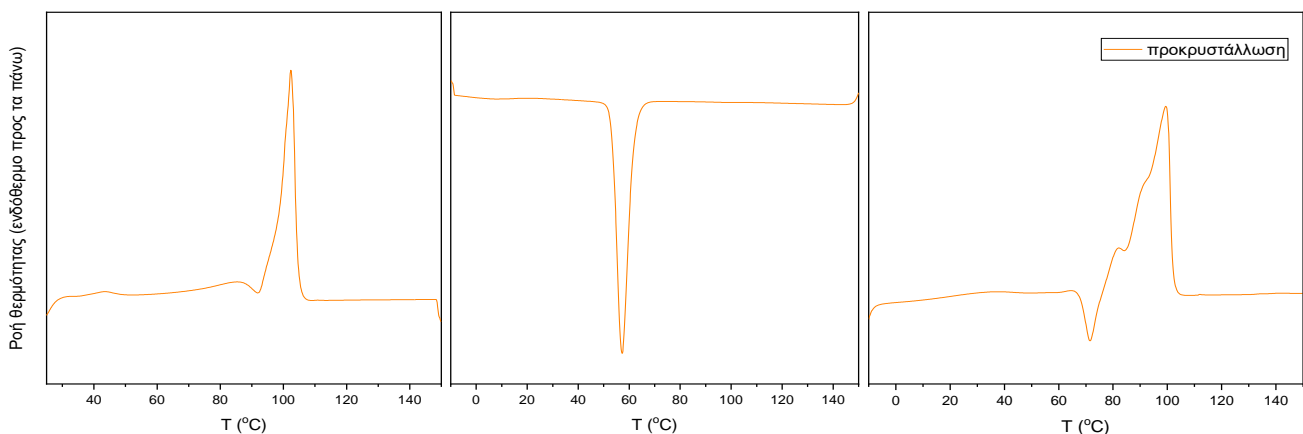
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα και Συζήτηση-Μεταπολυμερισμός PBS

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μεταπολυμερισμού του προπολυμερούς που έχει συντεθεί ενζυμικά σε κλίμακα 20g τελικού προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε πολυμερισμός στερεάς κατάστασης (Solid state polymerization ή SSP) καθώς και μεταπολυμερισμός τήγματος με αρχικό υλικό το δείγμα 90_20_2 (Πίνακας 6). Η αποτελεσματικότητα των υπό εξέταση μεθόδων ελέγχθηκε με κριτήριο την επίδρασή τους στο μοριακό βάρος και στις θερμικές ιδιότητες του ενζυμικά συντεθειμένου προπολυμερούς.

6.1. Πειράματα μεταπολυμερισμού στερεάς κατάστασης-SSP

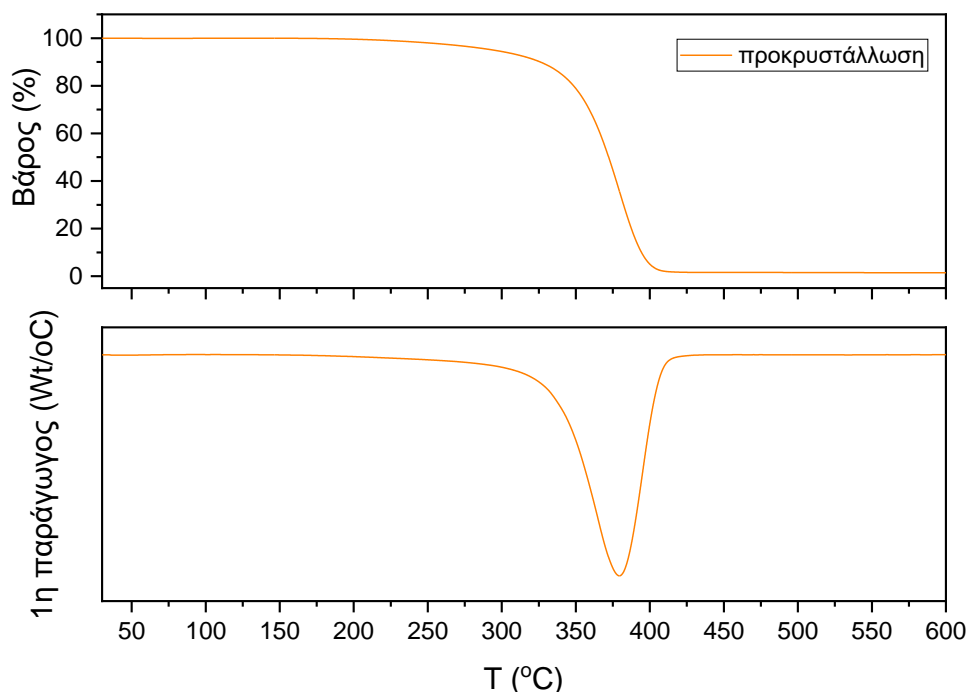
Αρχικά εξετάστηκε ο μεταπολυμερισμός στερεάς κατάστασης. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιείται αρχικά προκρυστάλλωση με στόχο την αναβάθμιση των θερμικών ιδιοτήτων και της κρυσταλλικότητας του πολυμερούς. Η προκρυστάλλωση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 90°C, μειωμένη πίεση 20 mbar και για χρόνο 2 ώρες. Αυτές οι συνθήκες βρέθηκαν ως βέλτιστες σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου [1].

Τα διαγράμματα DSC και TGA της προκρυστάλλωσης παρουσιάζονται ακολούθως (Διάγραμμα 13, Διάγραμμα 14) και οι αντίστοιχες ιδιότητες φαίνονται στον Πίνακα Π7 και τον Πίνακα Π8 στο Παράρτημα πινάκων.



Διάγραμμα 13 Καμπύλες DSC πειράματος προκρυστάλλωσης (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).

Όσον αφορά το DSC, παρατηρείται πως μέσω της προκρυστάλλωσης επιτυγχάνεται αύξηση της θερμοκρασίας τήξης του προπολυμερούς κατά 4°C στην πρώτη θέρμανση, η οποία υποδηλώνει μια κρυσταλλική αναδιοργάνωση των αλυσίδων [2]. Και πάλι παρατηρούνται υπολείμματα υγρασίας στην πρώτη θέρμανση πριν τους 95°C. Η κρυστάλλωση κατά την ψύξη πραγματοποιείται στους 57°C, σε υψηλότερη θερμοκρασία σε σχέση με το προπολυμερές. Κατά τη δεύτερη θέρμανση πραγματοποιείται ψυχρή κρυστάλλωση στους 72°C και τρεις κορυφές τήξης στους 82, 91 και 100°C. Παρόλα αυτά η κρυσταλλικότητα μειώνεται κατά 11%, γεγονός που βοηθάει τον SSP, καθώς οι αντιδράσεις των ακραίων ομάδων γίνονται στην άμορφη φάση του πολυμερούς [3].



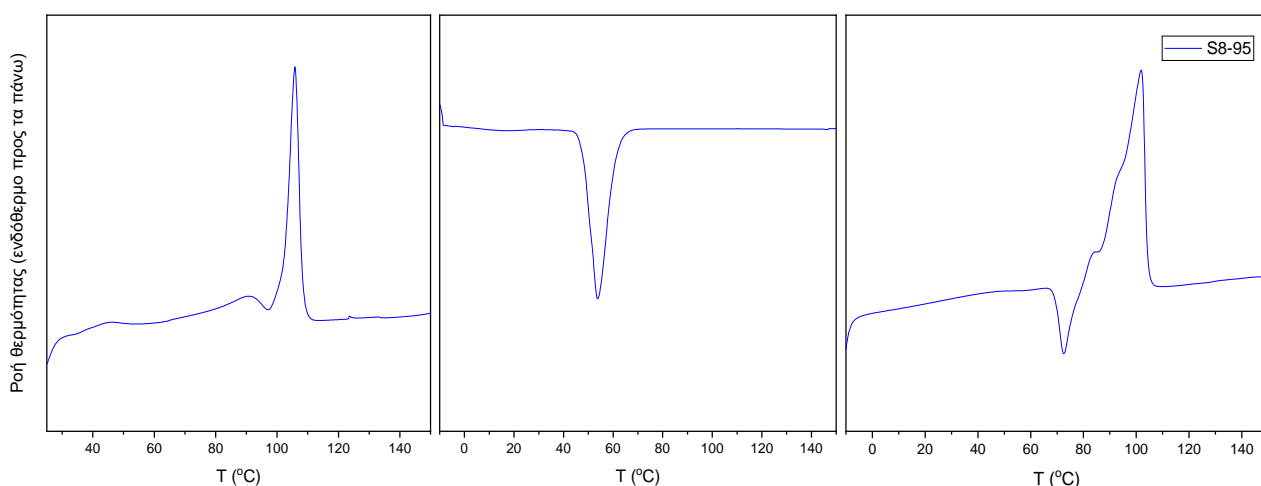
Διάγραμμα 14 Καμπύλες TGA πειράματος προκρυστάλλωσης.

Από την ανάλυση TGA φαίνεται πως η αποικοδόμηση του PBS πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο και η κορυφή είναι στους 379 °C, πολύ κοντά στο αρχικό υλικό (90_20_2).

Ακολουθεί ο SSP που πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 95°C, μειωμένη πίεση 20 mbar, για χρόνο 8 ώρες. Οι 95°C που εφαρμόζονται ήταν η μέγιστη θερμοκρασία στην οποία το δείγμα μακροσκοπικά διατηρεί τη στερεά του κατάσταση, με βάση και τα αποτελέσματα της ανάλυσης DSC, όπου η θερμοκρασία τήξης είναι 102°C (Πίνακας Π8). Η διαφορά $T_m - T_r$ είναι 7°C και ο

στόχος ήταν οι αλυσίδες του ολιγομερούς να παρουσιάσουν τη μέγιστη δυνατή κινητικότητα, διατηρώντας όμως τη στερεά κατάσταση του δείγματος [4].

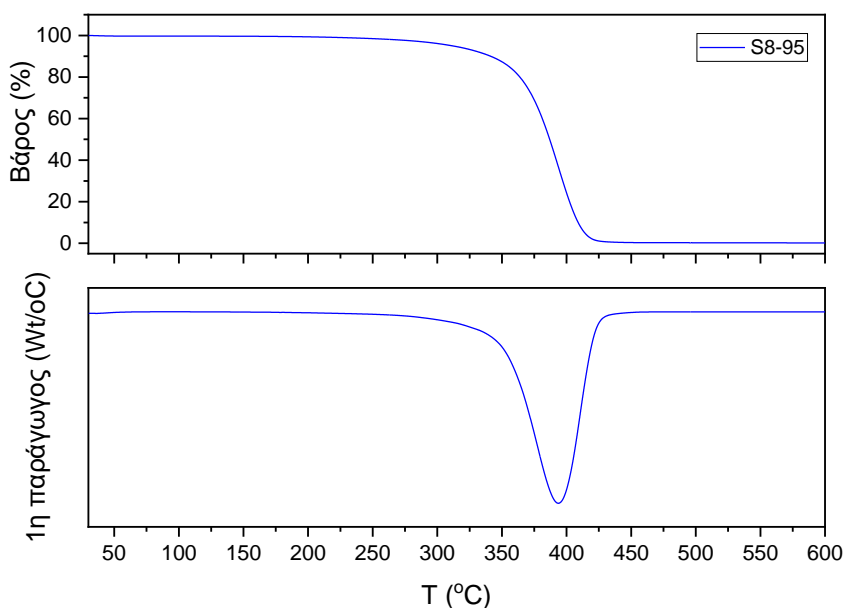
Τα διαγράμματα DSC και TGA του SSP παρουσιάζονται ακολούθως (Διάγραμμα 15, Διάγραμμα 16) και οι αντίστοιχες ιδιότητες φαίνονται στον Πίνακα Π7 και τον Πίνακα Π8 στο Παράρτημα πινάκων.



Διάγραμμα 15 Καμπύλες DSC πειράματος SSP (1^η θέρμανση, ψύξη, 2^η θέρμανση).

Το μεταπολυμερισμένο δείγμα (S8-95) παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με την προκρυστάλλωση με ίχνη υγρασίας πριν τους 95°C. Έχει αυξημένο σημείο τήξης στην πρώτη θέρμανση κατά 6°C από αυτό του προπολυμερούς και κατά 2°C από αυτό του προϊόντος προκρυστάλλωσης. Κατά την ψύξη εμφανίζεται μια κορυφή στους 49°C πιο ευρεία από αυτή της προκρυστάλλωσης και του προπολυμερούς. Στη δεύτερη θέρμανση παρουσιάζεται ψυχρή κρυστάλλωση στους 69°C και κορυφές τήξης στους 82, 89 και 100°C. Η κρυσταλλικότητα αυξήθηκε κατά 3% σε σχέση με την προκρυστάλλωση αλλά μειώθηκε συνολικά κατά 8%.

Αυτά υποδηλώνουν την αναβάθμιση των θερμικών ιδιοτήτων του πολυμερούς, πέρα από την κρυσταλλικότητα.



Διάγραμμα 16 Καμπύλες TGA πειράματος SSP.

Από την ανάλυση TGA φαίνεται πως η αποικοδόμηση του PBS και πάλι πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο. Η θερμοκρασία αποικοδόμησης αυξάνεται κατά 10°C στον SSP, γεγονός που αποδεικνύει την μεγαλύτερη σταθερότητα του τελικού προϊόντος. Το $T_{d(5\%)}$ παραμένει σχετικά σταθερό, υποδεικνύοντας πως δεν έχουν γίνει σημαντικές αλλαγές στο μοριακό βάρος.

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται τα μοριακά βάρη όπως αυτά υπολογίζονται από ανάλυση GPC.

Πίνακας 11 \overline{M}_n πειράματος προκρυστάλλωσης και SSP από την ανάλυση GPC

Δείγμα	\overline{M}_n (g/mol)	PDI
Αρχικό υλικό (90_20_2)	1700	1,84
προκρυστάλλωση	1700	1,67
S8-95	1900	1,74

Από τα αποτελέσματα της GPC είναι φανερό πως το μοριακό βάρος δεν αυξάνεται στο στάδιο της προκρυστάλλωσης. Αυτό είναι αναμενόμενο, εφόσον στόχος της προκρυστάλλωσης είναι η αναδιάταξη των αλυσίδων και η προετοιμασία για τον SSP. Παρόλα αυτά, ακόμα και η συνολική διεργασία

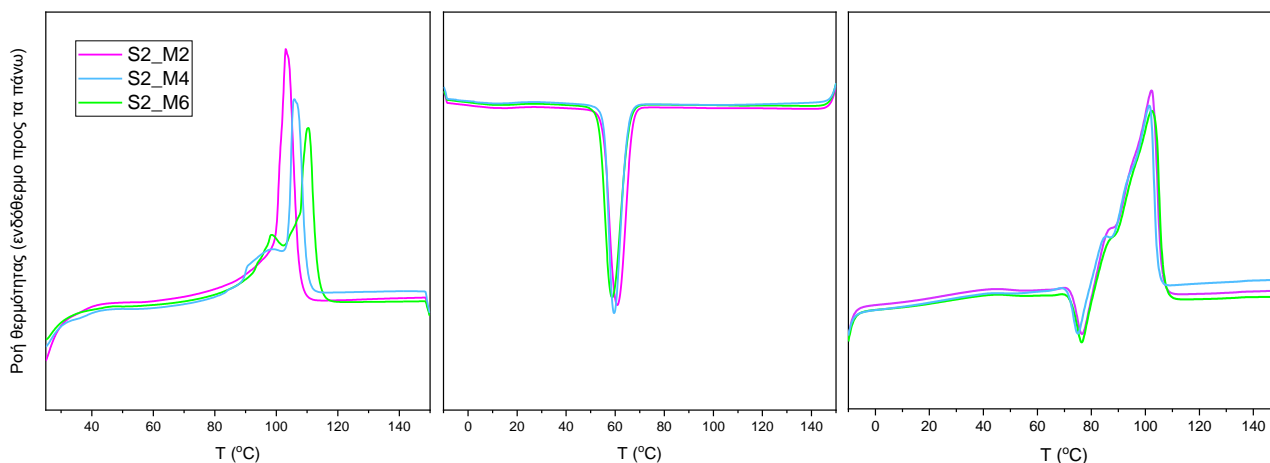
αυξάνει το μοριακό βάρος μόλις κατά 200 g/mol (κατά 12%). Η αναποτελεσματικότητα της μεθόδου συνολικά οφείλεται πιθανώς στον μειωμένο αριθμό ακραίων υδροξυλομάδων του προπολυμερούς (Πίνακας 9), που μειώνει τη δραστικότητα των αλυσίδων και στην εναπομείνουσα υγρασία που υδρολύει το πολυμερές και υποβαθμίζει το δείγμα.

Συμπερασματικά, θεωρείται πως για την επίτευξη μεγαλύτερου μοριακού βάρους είναι πιθανό να χρειάζεται περαιτέρω μείωση της διαφοράς $T_m - T_r$ ($< 7^\circ\text{C}$) [4]. Έτσι, εξετάζεται η εφαρμογή του SSP σε υψηλότερη θερμοκρασία. Αυτή τη φορά επιλέγεται θερμοκρασία 100°C χαμηλότερη κατά 2°C από τη θερμοκρασία τήξης του προκρυσταλλωμένου PBS ($T_{m1}=102^\circ\text{C}$ - Πίνακας Π8). Αφενός διατηρείται η χαμηλή θερμοκρασία και αποφεύγεται η υποβάθμιση του πολυμερούς. Αφετέρου, η αντίδραση των ακραίων ομάδων αναμένεται να είναι αποτελεσματικότερη, εφόσον οι αλυσίδες αποκτούν μεγαλύτερη κινητικότητα, κάτι που οδηγεί σε μεγαλύτερη αύξηση του μοριακού βάρους.

Το πρώτο και το δεύτερο στάδιο σε όλες τις περιπτώσεις είναι η προκρυστάλλωση για 2 ώρες σε θερμοκρασία 90°C και ο SSP σε θερμοκρασία 100°C . Παρατηρείται, ωστόσο, ότι μετά το πέρας των δύο πρώτων ωρών στους 100°C το πολυμερές μεταβαίνει σε κατάσταση τήγματος. Αντίστοιχο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί κατά την παραγωγή του Nylon-66 μέσω SSP με χρήση καταλυτών. Για να εξηγηθεί η μετάβαση από το στερεό στο τήγμα που παρατηρείται, λαμβάνεται υπόψιν ο ρόλος της υγρασίας και της αιθανόλης ως παραπροϊόν της πολυσυμπύκνωσης. Κατά την πορεία της αντίδρασης συσσωρεύεται αιθανόλη εντός του δείγματος σε διαφορετικά σημεία. Πιθανώς η συσσώρευση αυτή ενισχύει την υδρόλυση των εστερικών δεσμών από την προϋπάρχουσα υγρασία (DSC-Διάγραμμα 13) [5]. Έτσι δημιουργούνται περιοχές χαμηλού σημείου τήξης, οι οποίες τελικά επικαλύπτονται για να επιφέρουν πλήρη κατάρρευση της στερεής δομής [6].

Βάσει αυτών, αποφασίζεται να μελετηθεί η επίδραση του χρόνου στην κατάσταση τήγματος όπου οι αλυσίδες αποκτούν τη μέγιστη κινητικότητα και συγκεκριμένα ελέγχονται οι 2, 4 και 6 ώρες.

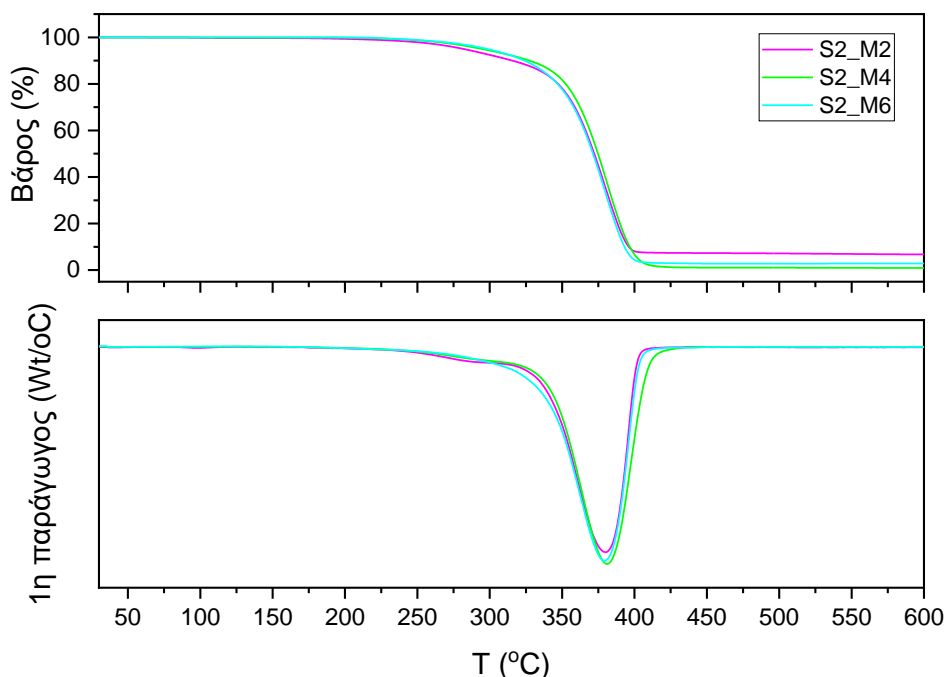
Τα διαγράμματα DSC και TGA των προϊόντων παρουσιάζονται ακολούθως (Διάγραμμα 17, Διάγραμμα 18) και οι αντίστοιχες ιδιότητες φαίνονται στο Παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π9, Πίνακας Π10).



Διάγραμμα 17 Καμπύλες DSC πειραμάτων συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).

Όλα τα δείγματα στην ανάλυση DSC παρουσιάζουν τα κύρια χαρακτηριστικά του PBS. Κατά την πρώτη θέρμανση εμφανίζεται ένδειξη ύπαρξης υγρασίας στα δείγματα πριν τους 100°C και οξεία κορυφή τήξης σε εύρος 103-110°C. Παρατηρείται αυξητική τάση στη θερμοκρασία τήξης σε σχέση με το προπολυμερές όσο αυξάνεται ο χρόνος παραμονής του δείγματος σε κατάσταση τήγματος. Κατά την ψύξη, τα δείγματα κρυσταλλώνουν σε εύρος θερμοκρασιών 59-61°C, νωρίτερα από το προπολυμερές, λόγω αυξημένου μοριακού βάρους. Κατά τη δεύτερη θέρμανση παρατηρείται το φαινόμενο της ψυχρής κρυστάλλωσης στους 75-77°C και κορυφές τήξης στους 86-87°C και 102-103°C. Στις 4 ώρες μεταπολυμερισμού τήγματος παρουσιάζεται η μέγιστη αύξηση της θερμοκρασίας τήξης (12°C στην πρώτη θέρμανση και 5°C στη δεύτερη). Στις 6 ώρες παρουσιάζεται μικρή μείωση, κάτι που πιθανώς δείχνει την αρχή της υποβάθμισης του πολυμερούς λόγω θερμικής καταπόνησης από τον αυξημένο χρόνο του μεταπολυμερισμού τήγματος.

Η κρυσταλλικότητα μειώνεται σημαντικά όσο αυξάνεται ο χρόνος αντίδρασης, φτάνοντας στο 50% στις 6 ώρες από το αρχικό 64%. Αυτό υποδηλώνει αύξηση του μοριακού βάρους του μεταπολυμερισμένου PBS [7].



Διάγραμμα 18 Καμπύλες TGA πειραμάτων συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος.

Αντίστοιχα, στην ανάλυση TGA η αποικοδόμηση του PBS πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο. Η θερμοκρασία αποικοδόμησης παραμένει σχετικά σταθερή στο εύρος των 379-381°C, αποδεικνύοντας τη θερμική σταθερότητα του προϊόντος, με μέγιστη τιμή στις 4 ώρες. Το $T_{d(5\%)}$ είναι στο εύρος 282-298°C και παρουσιάζει αυξητική τάση με την αύξηση του χρόνου του μεταπολυμερισμού τήγματος. Εφόσον αυτό είναι πιο ευαίσθητο σε αλλαγές στο μοριακό βάρος, η τάση αυτή υποδηλώνει την αναλογική εξάρτηση μοριακού βάρους-χρόνου μεταπολυμερισμού.

Όσον αφορά το μοριακό βάρος, στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι αναλυτικές τιμές του όπως αυτές υπολογίστηκαν από ανάλυση GPC.

Πίνακας 12 \overline{M}_n πειράματος συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση GPC

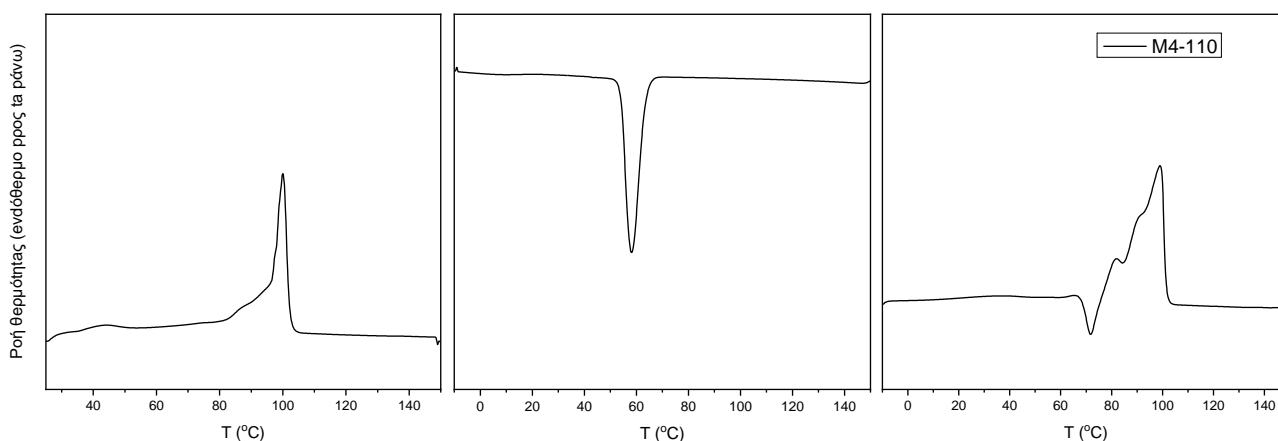
Δείγμα	\overline{M}_n (g/mol)	PDI
Αρχικό υλικό (90_20_2)	1700	1,84
προκρυστάλλωση	1700	1,67
2h SSP 2h melt	1700	1,71
2h SSP 4h melt	1900	1,62
2h SSP 6h melt	1900	1,54

Αποδεικνύεται πως το μοριακό βάρος αυξάνεται ελαφρώς με την αύξηση του χρόνου, κατά 200 g/mol (κατά 12%) στις 6 ώρες. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως πρόκειται για μια ασήμαντη αύξηση, σε σχέση με το χρόνο αντίδρασης και την αναμενόμενη επίδραση του SSP και ακόμα περισσότερο του μεταπολυμερισμού τήγματος στην ιδιότητα αυτή. Επομένως χρειάζεται να εξεταστούν διαφορετικές συνθήκες για την αναβάθμιση του μοριακού βάρους.

6.2. Πειράματα μεταπολυμερισμού τήγματος

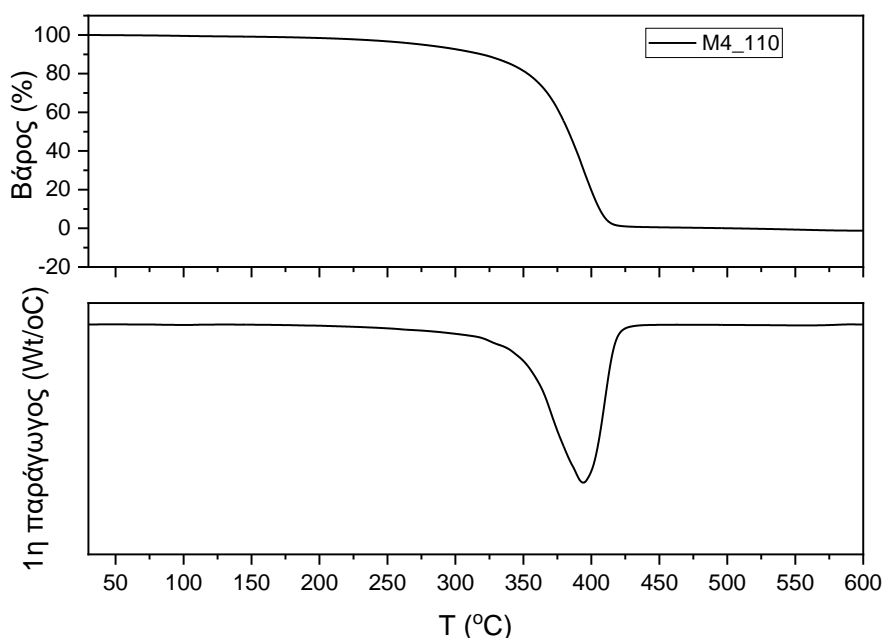
Εφόσον δεν βελτιώθηκε σημαντικά το μοριακό βάρος του PBS με τους προαναφερθέντες τρόπους γίνεται δοκιμή αναβάθμισης των ιδιοτήτων του αποκλειστικά με μεταπολυμερισμό τήγματος σε υψηλότερη θερμοκρασία (110°C), μειωμένη πίεση 20 mbar και για χρόνο 4 ώρες, όπου παρουσιάστηκαν οι βέλτιστες θερμικές ιδιότητες. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία επιλέγεται ώστε να είναι πάνω από τη θερμοκρασία τήξης του προπολυμερούς και να είναι η συνολική του μάζα σε κατάσταση τήγματος, χωρίς όμως να υπάρχουν παράπλευρες αντιδράσεις ή θερμική αποικοδόμηση και να μην υπάρξει μεγάλη κατανάλωση ενέργειας, άρα η διεργασία να είναι πιο πράσινη.

Τα διαγράμματα DSC και TGA για το πείραμα παρουσιάζονται ακολούθως (Διάγραμμα 21, Διάγραμμα 22) και οι αντίστοιχες ιδιότητες φαίνονται στο Παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π11, Πίνακας Π12).



Διάγραμμα 19 Καμπύλες DSC πειράματος M4_110 (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).

Στην ανάλυση DSC το δείγμα παρουσιάζει σχετικά οξείες κορυφές και τα κοινά χαρακτηριστικά του PBS. Παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας τήξης κατά 5°C στην πρώτη θέρμανση με κορυφή στους 100°C. Παρατηρείται περίσσεια υγρασίας στο δείγμα πριν τους 90°C. Κατά την ψύξη το πολυμερές κρυσταλλώνει στους 58°C, κατά 3°C ταχύτερα από το προπολυμερές. Όσον αφορά τη δεύτερη θέρμανση, παρουσιάζεται ψυχρή κρυστάλλωση στους 76°C και κορυφές τήξης στους 82, 91 και 99°C. Το τελικό σημείο τήξης (99°C) είναι κατά 1°C υψηλότερο από αυτό του προπολυμερούς. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ιδιότητες, η κρυσταλλικότητα έχει μειωθεί στο 49% από το αρχικό 64%.



Διάγραμμα 20 Καμπύλες TGA πειράματος M4_110.

Από την ανάλυση TGA φαίνεται πως η αποικοδόμηση του PBS πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο στους 394°C, μια αύξηση κατά 10°C. Αυτό υποδεικνύει πως η θερμική σταθερότητα του προϊόντος δεν υποβαθμίστηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 110°C. Το $T_{d(5\%)}$ είναι 275°C, 40°C μικρότερο από αυτό του προπολυμερούς, κάτι που προϋποθέτει για την αναποτελεσματικότητα της μεθόδου ως προς την αύξηση του μοριακού βάρους.

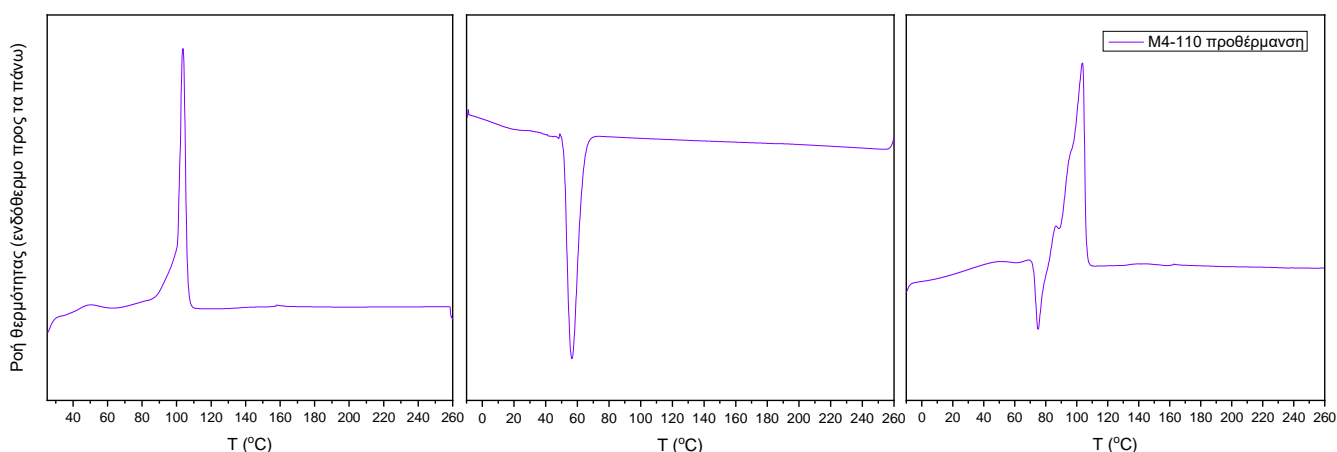
Σε αυτό το πνεύμα, το μοριακό βάρος υπολογίστηκε από την ανάλυση GPC 2100 g/mol με PDI 1,5 (Πίνακας Π 13). Επομένως παρουσιάζει αύξηση κατά 24%.

Πρόκειται για μια διαφορά που δεν είναι η επιθυμητή, δεδομένης της μεθόδου και των αναμενόμενων αποτελεσμάτων.

Ακόμα μια φορά είναι πιθανό κατά την πορεία της αντίδρασης να συσσωρεύεται αιθανόλη εντός του δείγματος σε διαφορετικά σημεία. Πιθανώς η συσσώρευση αυτή ενισχύει την υδρόλυση των εστερικών δεσμών από την προϋπάρχουσα υγρασία (DSC-Διάγραμμα 19). Έτσι, υποβαθμίζεται το τελικό προϊόν και δεν επιτυγχάνεται το επιθυμητό μοριακό βάρος [6].

Με αυτό το δεδομένο, εξετάζεται η προθέρμανση του δείγματος πριν την έναρξη του μεταπολυμερισμού τήγματος, για την απομάκρυνση της υγρασίας. Επιλέγονται ίδιες συνθήκες με την προκρυστάλλωση για αυτό το στάδιο (θερμοκρασία 90 °C, μειωμένη πίεση 20 mbar, 2 ώρες) δεδομένου ότι κρίθηκε αποτελεσματική, λόγω της αντίστοιχης αύξησης στο σημείο τήξης και την μείωση της υγρασίας στην πρώτη θέρμανση (Διάγραμμα 13). Όλα τα στάδια γίνονται σε μειωμένη πίεση 20 mbar.

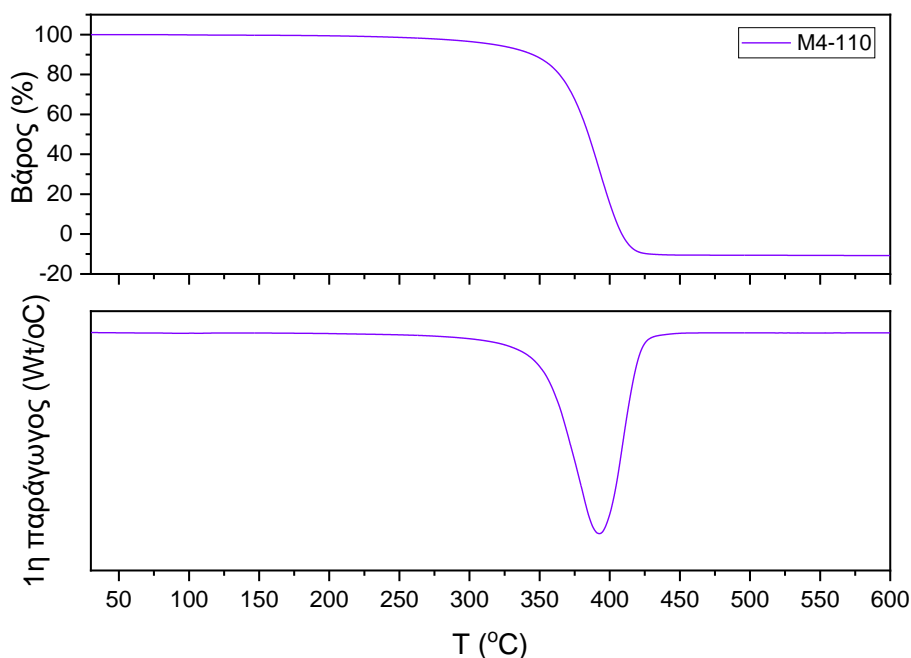
Τα διαγράμματα DSC και TGA για το πείραμα παρουσιάζονται ακολούθως (Διάγραμμα 23, Διάγραμμα 24) και οι αντίστοιχες ιδιότητες φαίνονται στο Παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π11, Πίνακας Π12).



Διάγραμμα 21 Καμπύλες DSC πειράματος M4_110 με προθέρμανση (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).

Και αυτό το δείγμα στην ανάλυση DSC παρουσιάζει οξείες κορυφές και τα κοινά χαρακτηριστικά του PBS. Παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας τήξης κατά 5°C στην πρώτη θέρμανση με οξεία κορυφή στους 104°C. Επιπλέον, η υγρασία

φαίνεται να έχει μειωθεί αρκετά σε σχέση με τα άλλα δείγματα πριν τους 95°C. Αυτό υποδηλώνει πως το στάδιο της προθέρμανσης ευνοεί τη διεργασία απομακρύνοντας ανεπιθύμητη υγρασία. Κατά την ψύξη το πολυμερές κρυσταλλώνει στους 57°C, κατά 2°C ταχύτερα από το προπολυμερές. Όσον αφορά την δεύτερη θέρμανση, παρουσιάζεται ψυχρή κρυστάλλωση στους 75°C και κορυφές τήξης στους 87, 94 και 104°C. Το τελικό σημείο τήξης (104°C) είναι κατά 6°C υψηλότερο από αυτό του προπολυμερούς, άρα το PBS έχει αναβαθμιστεί ελαφρώς ως προς τις θερμικές ιδιότητες. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ιδιότητες, η κρυσταλλικότητα έχει μειωθεί στο 47% από το αρχικό 64%. Αυτό πιθανώς υποδεικνύει πως αυξάνεται το μοριακό βάρος και ακολούθως η εμπλοκή των αλυσίδων, όπως έχει προαναφερθεί [8].



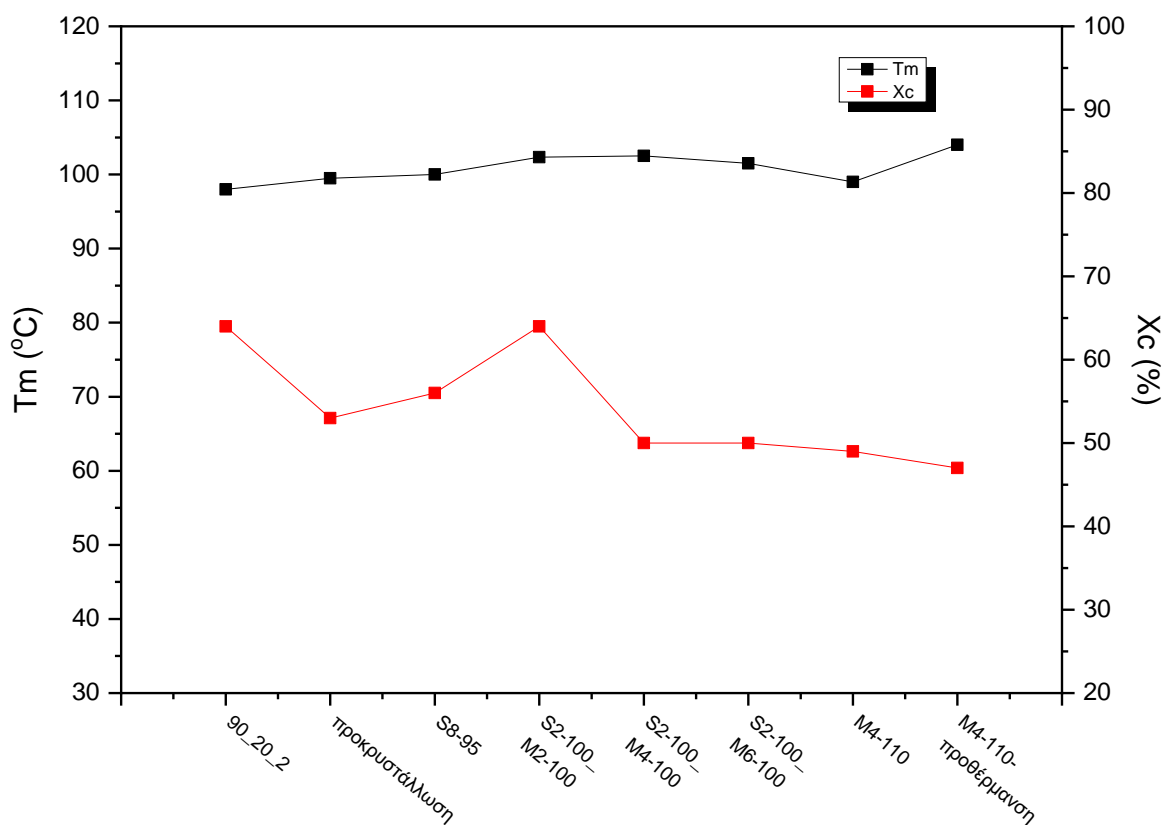
Διάγραμμα 22 Καμπύλες TGA πειράματος M4_110 με προθέρμανση.

Από την ανάλυση TGA φαίνεται πως η αποικοδόμηση του PBS πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο στους 392°C, μια αύξηση κατά 8°C. Αυτό υποδεικνύει πως η θερμική σταθερότητα του προϊόντος δεν υποβαθμίστηκε με την προσθήκη της προθέρμανσης. Το $T_{d(5\%)}$ είναι 318°C, 3°C μεγαλύτερο από αυτό του προπολυμερούς, κάτι που προιδεάζει για αύξηση του μοριακού βάρους.

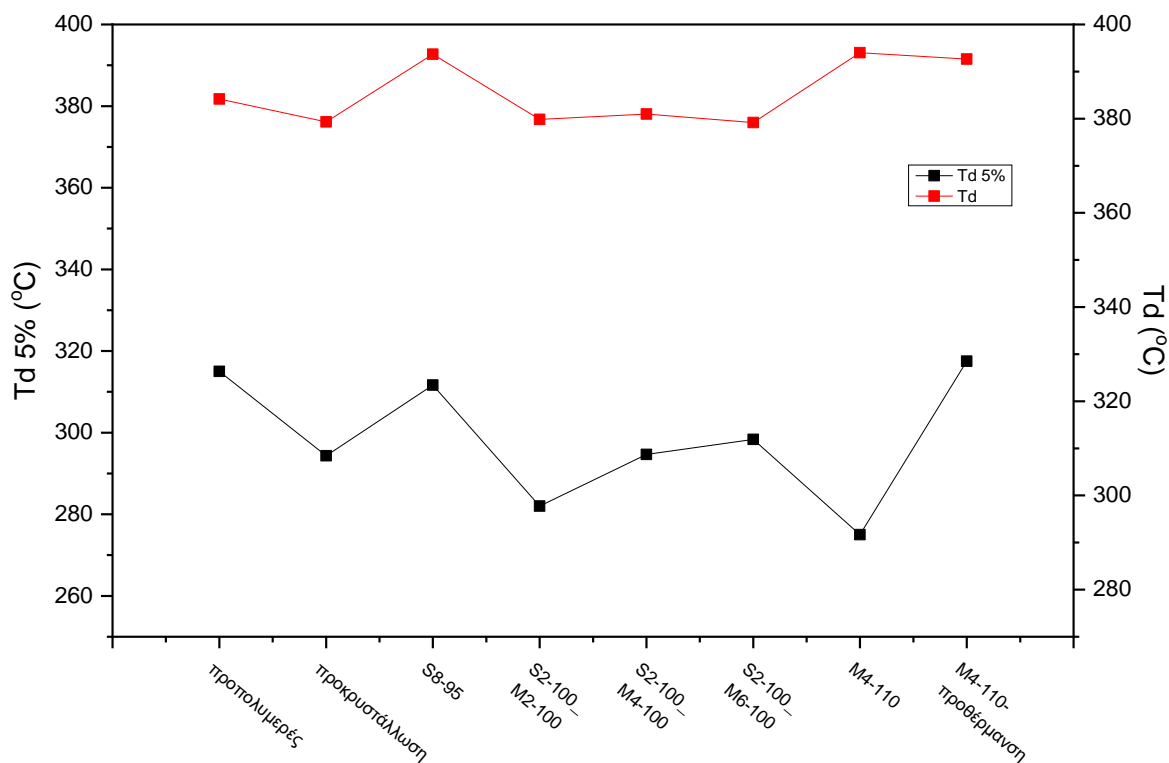
Τέλος, το μοριακό βάρος υπολογίστηκε από την ανάλυση GPC 3000 g/mol με PDI 2,0 (Πίνακας Π 13). Επομένως παρουσιάζει αύξηση κατά 75%. Πρόκειται για μια αξιοσημείωτη διαφορά που πλησιάζει το επιθυμητό τελικό προϊόν.

6.3. Σύγκριση πειραμάτων μεταπολυμερισμού

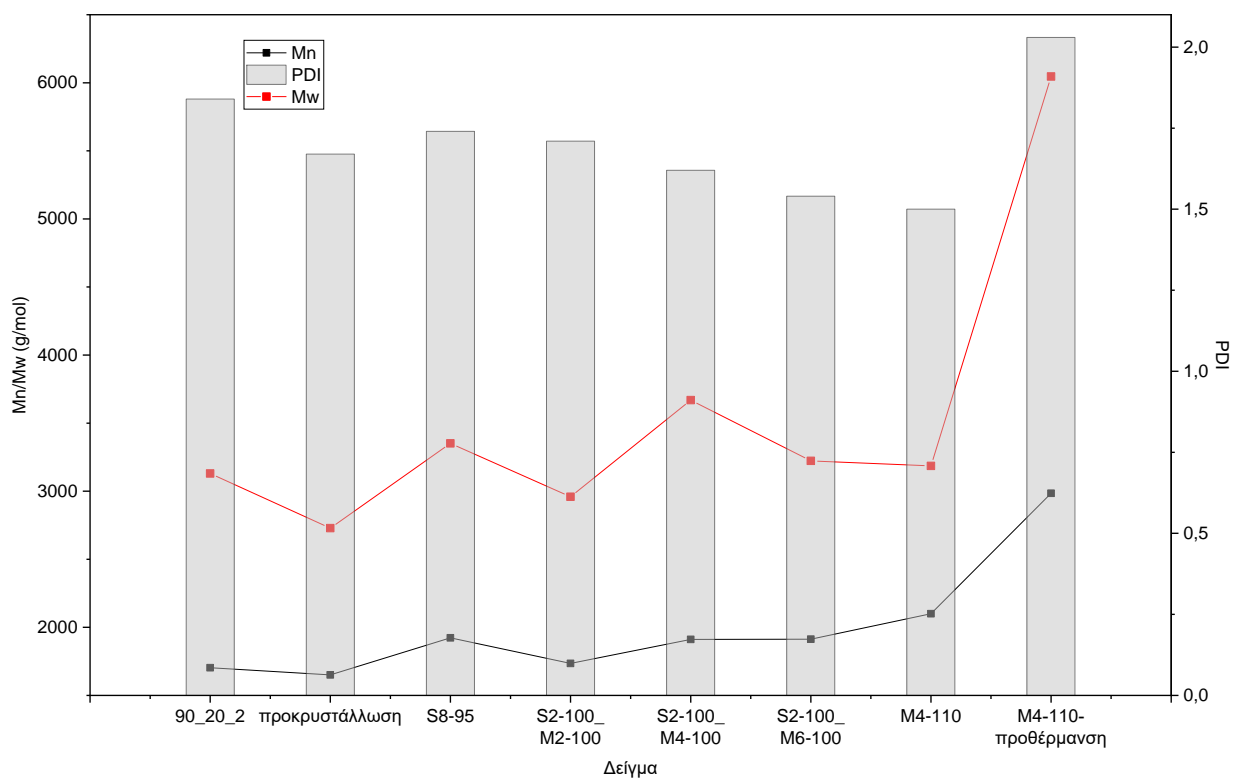
Για την άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων της διερεύνησης του μεταπολυμερισμού κατασκευάζονται τα διαγράμματα θερμοκρασίας τήξης και κρυσταλλικότητας (Διάγραμμα 23), T_d και $T_{d(5\%)}$ (Διάγραμμα 24) και μοριακού βάρους (Διάγραμμα 25) των δειγμάτων.



Διάγραμμα 23 Θερμοκρασία τήξης και κρυσταλλικότητα ανά δείγμα μεταπολυμερισμού.



Διάγραμμα 24 T_d και $T_{d(5\%)}$ ανά δείγμα μεταπολυμερισμού.



Διάγραμμα 25 Μέσου αριθμού, μέσου βάρους μοριακό βάρους και δείκτης διασποράς ανά δείγμα μεταπολυμερισμού.

Από τα διαγράμματα και τους πίνακες των αντίστοιχων δειγμάτων συμπεραίνεται πως το δείγμα που παρουσιάζει τις βέλτιστες ιδιότητες είναι αυτό που υπεβλήθη 4 ώρες μεταπολυμερισμό τήγματος στους 110°C με προθέρμανση 2 ωρών στους 90°C. Το μοριακό βάρος αυξήθηκε κατά 75%, η θερμοκρασία τήξης κατά 6°C, ενώ παρέμεινε θερμικά σταθερό (αύξηση T_d 8°C). Πρόκειται για το περισσότερο θερμικά σταθερό δείγμα, με τη μέγιστη αύξηση στην ιδιότητα που υπήρχε ανάγκη για βελτίωση, το μοριακό βάρος.

Η κρυσταλλικότητα από τη δεύτερη θέρμανση μειώθηκε περισσότερο από όλα τα δείγματα από 64% σε 47%, λόγω της αύξησης του μοριακού βάρους. Η μειωμένη κρυσταλλικότητα ευνοεί την ενζυμική υδρόλυση, καθώς οι πολυμερικές αλυσίδες έχουν περισσότερα «κενά» για την εισχώρηση ενζύμων. Αυτό καθιστά το δείγμα πιο φιλικό προς το περιβάλλον και κατάλληλο για χρήση σε βιοδιασπώμενες συσκευασίες τροφίμων [9].

Κατά την επανάληψη του πειράματος με το στάδιο της προθέρμανσης υπολογίστηκε από την ανάλυση GPC \overline{M}_n 2400 g/mol και PDI 1,47. Επομένως παρουσιάζεται αύξηση κατά 41% σε σχέση με το αρχικό υλικό (90_20_2) και μείωση 20% από το πρώτο πείραμα (M4_110-προθέρμανση). Εξακολουθεί συνολικά να είναι η καλύτερη τιμή που έφτασε η συγκεκριμένη ιδιότητα.

Συμπερασματικά, με υλικό αναφοράς το PBS, πραγματοποιήθηκε μια ενιαία, πράσινη πειραματική διαδικασία που συνδυάζει ενζυμικό πολυμερισμό με τον μεταπολυμερισμό τήγματος με προθέρμανση. Με το πέρας της σχηματίστηκαν ολιγομερή που δεν φέρουν υπολείμματα μεταλλικών καταλυτών ή παραπροϊόντα θερμικής υποβάθμισης, έχουν ελεγχόμενο μοριακό βάρος και κρυσταλλικότητα και είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν σε βιοϊατρικές εφαρμογές ή/και εφαρμογές όπως η συσκευασία τροφίμων.

6.4. Βιβλιογραφία

- [1] Δ. Μαρκουλάκης, "Παραγωγή πολυεστέρων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες: Ενζυμικός προπολυμερισμός και μεταπολυμερισμός μάζας," ΕΜΠ, 2022.

- [2] M. Kanelli *et al.*, "Production of biodegradable polyesters via enzymatic polymerization and solid state finishing," *J Appl Polym Sci*, vol. 131, no. 19, 2014.
- [3] Nirmala. R. James, C. Ramesh, and S. Sivaram, "Development of Structure and Morphology during Crystallization and Solid State Polymerization of Polyester Oligomers," *Macromol Chem Phys*, vol. 202, no. 7, pp. 1200–1206, Apr. 2001, doi: [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(20010401\)202:7<1200::AID-MACP1200>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3935(20010401)202:7<1200::AID-MACP1200>3.0.CO;2-C)
- [4] S. N. Vouyiouka, E. Topakas, A. Katsini, C. D. Papaspyrides, and P. Christakopoulos, "A Green Route for the Preparation of Aliphatic Polyesters via Lipase-catalyzed Prepolymerization and Low-temperature Postpolymerization," *Macromol Mater Eng*, vol. 298, no. 6, pp. 679–689, 2013.
- [5] F. Iñiguez-Franco *et al.*, "Concurrent solvent induced crystallization and hydrolytic degradation of PLA by water-ethanol solutions," *Polymer (Guildf)*, vol. 99, pp. 315–323, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.07.018>
- [6] C. D. Papaspyrides, "Solid state polyamidation processes," *Polym Int*, vol. 29, no. 4, pp. 293–298, Jan. 1992, doi: <https://doi.org/10.1002/pi.4990290409>
- [7] U. K. Murmu *et al.*, "Mechanical Properties of Crystalline and Semicrystalline Polymer Systems," in *Encyclopedia of Materials: Plastics and Polymers*, M. S. J. Hashmi, Ed. Oxford: Elsevier, 2022, pp. 917–927. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820352-1.00248-0>
- [8] T.-X. Jin, M. Zhou, S. Hu, F. Chen, 傅强 Q., and Y. Fu, "Effect of molecular weight on the properties of poly(butylene succinate)," *Chinese Journal of Polymer Science*, vol. 32, Jul. 2014, doi: 10.1007/s10118-014-1463-4.
- [9] E. Nikolaivits *et al.*, "A polyesterase from the Antarctic bacterium *Moraxella* sp. degrades highly crystalline synthetic polymers," *J Hazard Mater*, vol. 434, p. 128900, 2022.

Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα και Συζήτηση-Εγκλεισμός Ναρινγίνης σε νανοσφαίρες PBS

7.1. Εισαγωγή

Η πρώτη μελέτη εγκλεισμού της ναρινγίνης έγινε με το αρχικό ενζυμικά συντεθειμένο προπολυμερές (90_20_2). Έπειτα πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός με το τελικό προϊόν που είχε τεθεί σε μεταπολυμερισμό τήγματος (M2_110-προθέρμανση). Παράλληλα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για εμπορικό δείγμα PBS για λόγους σύγκρισης.

Κύριος στόχος ήταν η επιβεβαίωση του επιτυχούς εγκλεισμού της ναρινγίνης στα νανοσωματίδια PBS και ο πλήρης χαρακτηρισμός τους, έτσι ώστε η ίδια διεργασία να εφαρμοστεί για τον εγκλεισμό ναρινγίνης στο αναβαθμισμένο προϊόν του μεταπολυμερισμού τήγματος.

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται συνοπτικά τα πειράματα που έγιναν. Τα δείγματα διαφέρουν ως προς το είδος του αρχικού πολυμερούς (PBS εμπορικό ή ενζυμικά συντεθειμένο) που χρησιμοποιήθηκε και για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται το αντίστοιχο πείραμα αναφοράς (χωρίς ναρινγίνη, blank).

Πίνακας 13 Πειράματα εγκλεισμού ναρινγίνης σε PBS

Δείγμα	PBS	Φόρτωση NAR (%)
C_Nar	Εμπορικό	30
C_Blank	Εμπορικό	0
E1_Nar	Ενζυμικό προπολυμερές (90_20_2)	30
E1_Blank	Ενζυμικό προπολυμερές (90_20_2)	0
E2_Nar	Ενζυμικό προπολυμερές (90_20_2)	30
E2_Blank	Ενζυμικό προπολυμερές (90_20_2)	0
M_Nar	Ενζυμικό μεταπολυμερισμένο (M4-110)	30
M_Blank	Ενζυμικό μεταπολυμερισμένο (M4-110)	0

*Ονομασία δειγμάτων **Xy_Z** όπου **X**: C για εμπορικό ή E για ενζυμικό και M για μεταπολυμερισμένο ενζυμικό PBS, **y**: αριθμός παρτίδας αν υπάρχει πάνω από 1, **Z**: Nar για φορτωμένα ή Blank για κενά

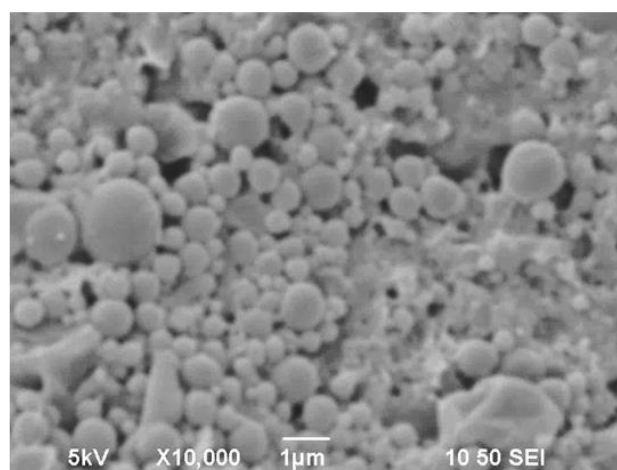
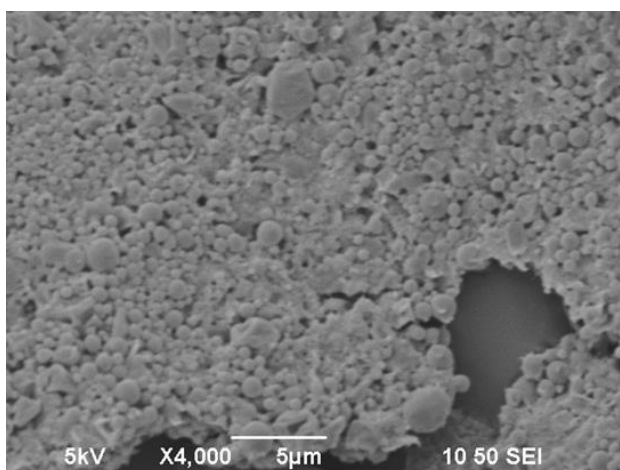
7.2. Μακροσκοπική και μικροσκοπική μορφολογία προϊόντων εγκλεισμού

Το τελικό προϊόν του εγκλεισμού μετά τη λυοφιλοποίηση (βλ. υποενότητα 4.3.3) είναι ένα λευκό στερεό (Εικόνα 39).

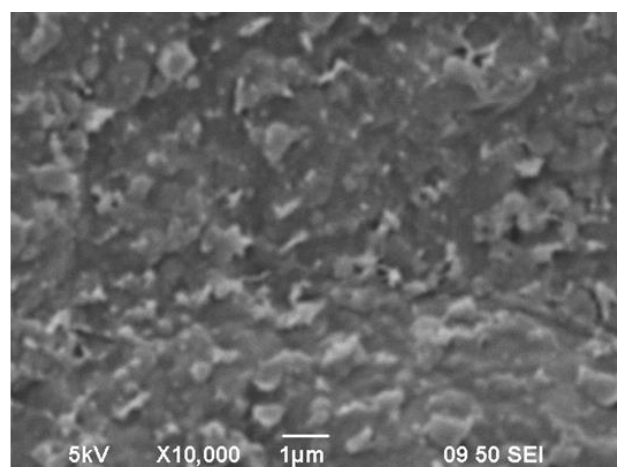
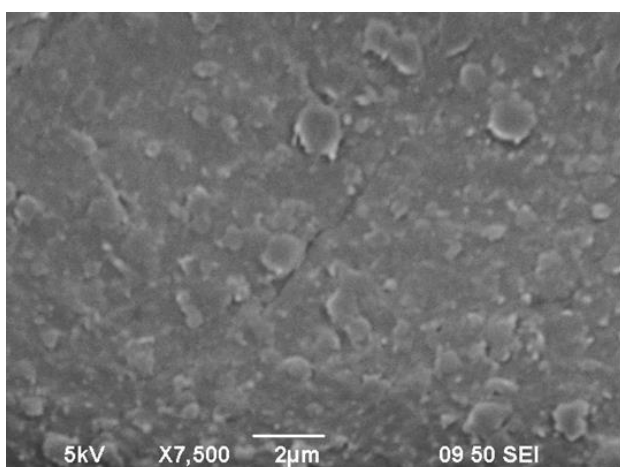
Η μορφολογία των δειγμάτων σε μικροσκοπικό επίπεδο μελετήθηκε με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων του εμπορικού και του ενζυμικού προπολυμερούς με εγκλεισμένη ναρινγίνη (C_Nar, E1_Nar) στις ακόλουθες εικόνες (Εικόνες 40 και 41).



Εικόνα 39 Προϊόν εγκλεισμού ναρινγίνης σε PBS



Εικόνα 40 Εικόνες SEM του δείγματος C_Nar.



Εικόνα 41 Εικόνες SEM για το δείγμα E1_Nar.

Όπως προκύπτει από τις εικόνες του SEM τα νανοσωματίδια με εμπορικό PBS έχουν σφαιρικό σχήμα, είναι πολυδιάσπαρτα με το μέγεθος της πλειοψηφίας να είναι κάτω από 1000 nm. Παρατηρείται πως υπάρχουν συσσωματώματα, κάποιες σφαίρες έχουν αλλοιωθεί και μερικές φτάνουν έως και 1,8 μm. Η εικόνα που λήφθηκε είναι παρόμοια με αντίστοιχη βιβλιογραφία όπου χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος εγκλεισμού σε PLGA [1].

Στις αντίστοιχες εικόνες του ενζυμικά συντεθειμένου PBS φαίνεται ότι τα όρια των σφαιρών δεν είναι τόσο διακριτά, ωστόσο η τραχύτητα της επιφάνειας υποδηλώνει την ύπαρξή τους. Επόμενος στόχος για περαιτέρω έρευνα είναι η μελέτη της μορφολογίας των σφαιρών σε μεγαλύτερες μεγεθύνσεις και με πιο εξειδικευμένα όργανα απεικόνισης νανοσωματιδίων (π.χ. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης-TEM). Επιπλέον, θα δοθεί έμφαση στις συνθήκες επιμετάλλωσης ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο αλλοίωσής των νανοσωματιδίων λόγω αυτών.

7.3. Αποδόσεις διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται οι αποδόσεις εγκλεισμού και διεργασίας για το κάθε πείραμα εγκλεισμού. Η απόδοση διεργασίας υπολογίζεται από την Εξίσωση 2 και η απόδοση εγκλεισμού (με έμμεσο τρόπο) από την Εξίσωση 3 (ενότητα 4.4.4.1).

Πίνακας 14 Απόδοση εγκλεισμού και απόδοση διεργασίας για τα πειράματα PBS-Nar

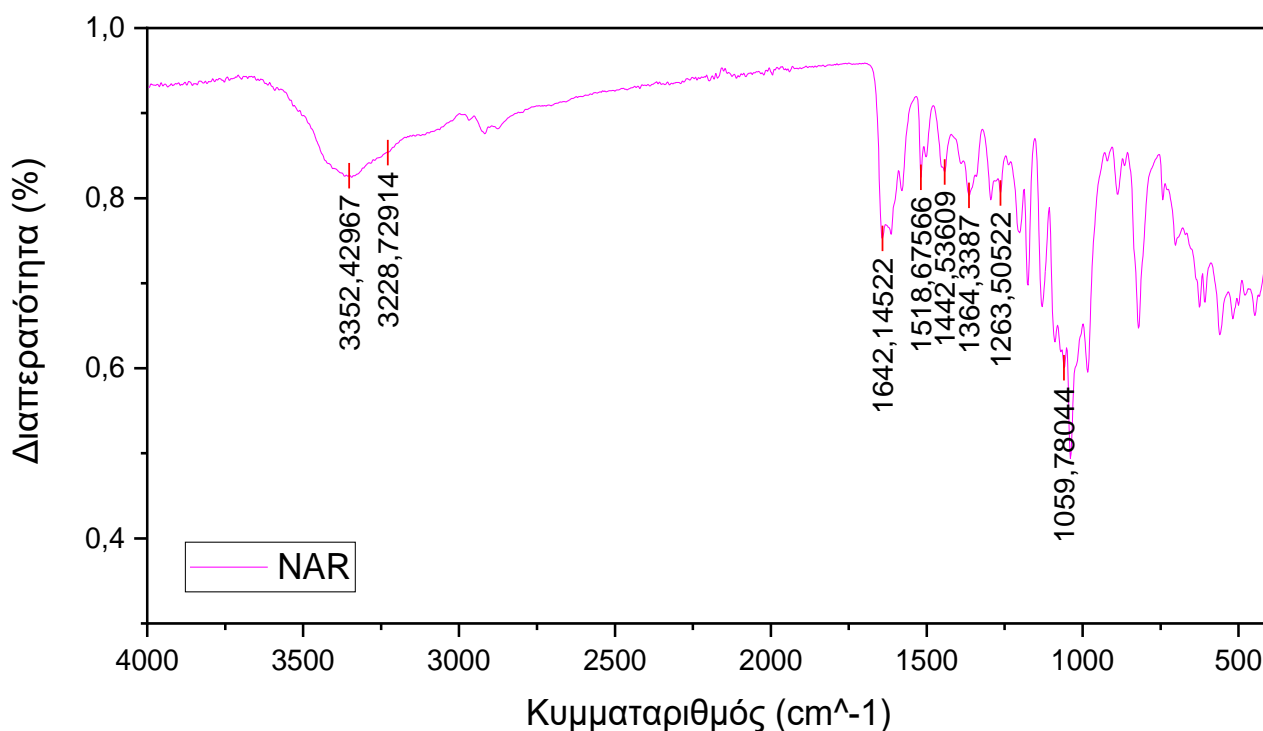
Δείγμα	Απόδοση εγκλεισμού προσδιορισμένη έμμεσα (%)	Απόδοση διεργασίας (%)
C_Nar	50	67
E1_Nar	47	82
E2_Nar	58	69
M_Nar	72	63

Επιβεβαιώνεται για κάθε δείγμα ότι επιτεύχθηκε εγκλεισμός της ναρινγίνης στα νανοσωματίδια. Οι αποδόσεις εγκλεισμού είναι ικανοποιητικές με ελάχιστη τιμή 47% και μέγιστη 72%.

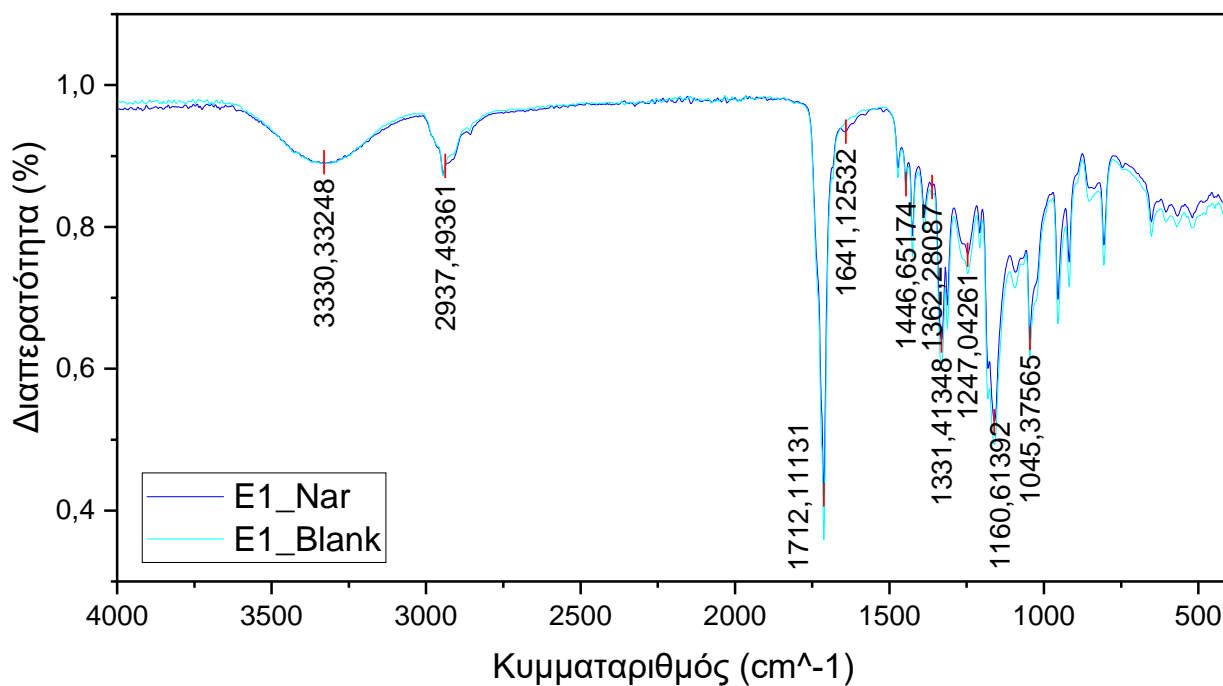
Η απόδοση της διεργασίας είναι εξίσου ικανοποιητική σε όλες τις περιπτώσεις και κυμαίνεται σε εύρος 63-82%. Στο στάδιο της φυγοκέντρησης οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα η απώλεια ποσότητας νανοσωματιδίων.

7.4. FTIR-ATR

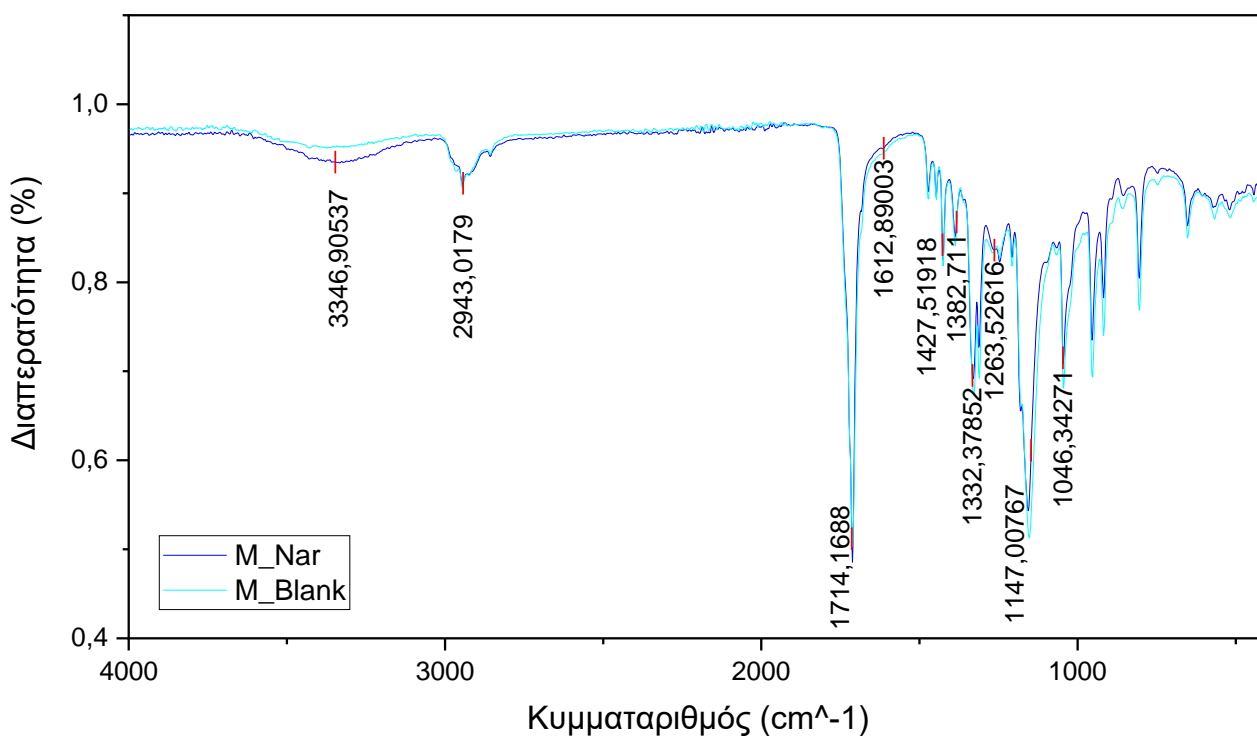
Η φασματοσκοπία FTIR-ATR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του «φιλοξενούμενου» μορίου και του μορίου «ξενιστή». Πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των φασμάτων FTIR του PBS (Διάγραμμα 3), της ναρινγίνης (Διάγραμμα 26), καθώς και των νανοσωματιδίων (Διάγραμμα 27, Διάγραμμα 28).



Διάγραμμα 26 Φάσμα FTIR Ναρινγίνης.



Διάγραμμα 27 Φάσμα FTIR E1_Nar και E1_Blank.



Διάγραμμα 28 Φάσμα FTIR M_Nar και M_Blank.

Στο φάσμα της ναρινγίνης, οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα [2]:

- 3352 cm^{-1} - δόνηση τάσης του δεσμού OH
- 3228 cm^{-1} - δόνηση τάσης των C-H των δακτυλίων
- 1642 cm^{-1} - δόνηση τάσης των ομάδων του καρβονυλίου
- 1518 cm^{-1} - δεσμός C=C του αρωματικού δακτυλίου
- 1442 cm^{-1} - δεσμός C-H του μεθυλενίου (-CH₂)
- 1364 cm^{-1} - κάμψη της ομάδας του μεθυλίου
- 1263 cm^{-1} - επίπεδη κάμψη του C- H
- 1059 cm^{-1} - τάση δόνησης C-O-C του αιθέρα

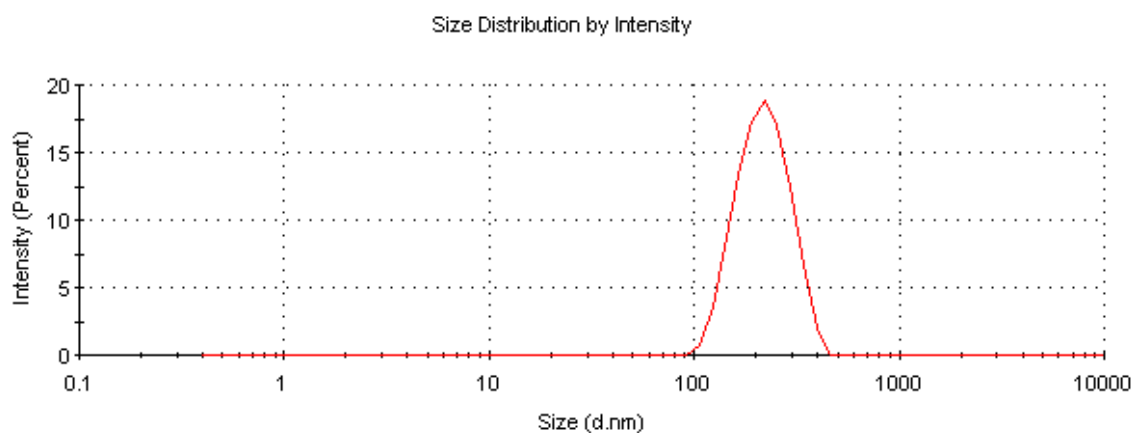
Παρατηρείται πως το φάσμα παρουσιάζει κάποιες επικαλύψεις με αυτό του PBS (Παράγραφος 5.3.2). Αυτό φαίνεται και στα διαγράμματα των νανοσωματιδίων (κενών και μη) όπου παρουσιάζονται κυρίως οι απορροφήσεις που οφείλονται στην πολυμερική μήτρα PBS. Υπάρχει μια ισχυρή ευρεία απορρόφηση περίπου στα 3330 cm^{-1} η οποία μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση τάσης της O-H της ναρινγίνης που απορροφάται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων και μετατοπίζονται, σε σύγκριση με το φάσμα της καθαρής ένωσης. Μια σημαντικά πιο ξεκάθαρη διαφορά παρουσιάζεται στα 1640 cm^{-1} περίπου η μόνη κορυφή που διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες και οφείλεται στο δεσμό C=O. Συνολικά, οι κορυφές της ναρινγίνης εμφανίζονται ελαφρώς μετατοπισμένες, γεγονός που υποδεικνύει αλληλεπίδραση μεταξύ της ένωσης και με του πολυμερικού φορέα και πιθανώς τον εγκλεισμό της [3].

7.5. Μέγεθος, κατανομή μεγέθους και ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων

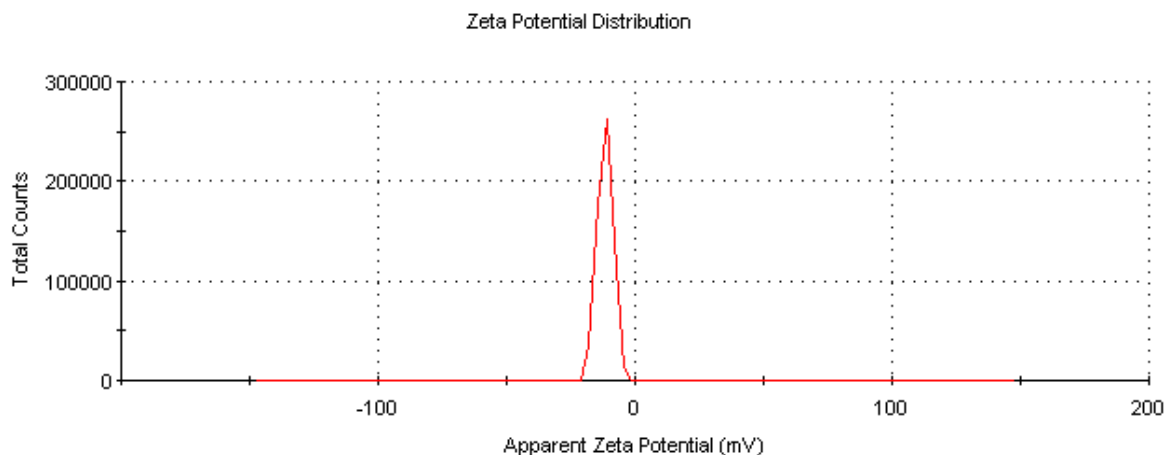
Τα χαρακτηριστικά μεγέθους των νανοσωματιδίων προσδιορίστηκαν με την μέθοδο DLS. Τα αποτελέσματα του μέσου μεγέθους (mean particle size), του δείκτη διασποράς (polydispersity index, PDI) και του ζ-δυναμικού (ζ-potential) συνοψίζονται παρακάτω (Πίνακας 15). Ενδεικτικά διαγράμματα κατανομής μεγέθους και ζ-δυναμικού για τα νανοσωματίδια παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 29 και Διάγραμμα 30, αντίστοιχα.

Πίνακας 15 Μέγεθος, κατανομή και ζ-δυναμικό νανοσφαιρών από την ανάλυση DLS

Δείγμα	Διάμετρος (nm)	Ποσοστό πληθυσμού (%)	PDI	ζ δυναμικό (mV)
C_Nar	442,5±106,9 925,8	83,7±24,8 42,5	0,366±0,014	-12,0±0,3
C_Blank	547,8±200,4 155,7	94,7±9,2 15,9	0,842±0,137	-14,8±0,3
E1_Nar	359,4±43,3	100	0,256±0,010	-5,9±0,4
E1_Blank	359,7±38,0	100	0,343±0,008	-10,3±0,3
E2_Nar	355,7±36,3 75,7	92,0±3,6 1,5	0,345±0,015	-8,6±0,7
E2_Blank	477,5±137,3 389,8±423,2	69,6±13,0 28,6±9,9	0,482±0,033	-11,5±1,2
M_Nar	494,8±49,6 120,6	98,0±3,4 5,9	0,764±0,005	-5,1±0,1
M_Blank	503,8±58,9 96,4	98,0±3,5 6,1	0,678±0,043	-11,3±0,9



Διάγραμμα 29 Ενδεικτικό γράφημα κατανομής υδροδυναμικής διαμέτρου νανοσωματιδίων.



Διάγραμμα 30 Ενδεικτικό γράφημα κατανομής ζ-δυναμικού νανοσωματιδίων.

Παρατηρείται πως τα νανοσωματίδια που συντέθηκαν παρουσίασαν μέσο μέγεθος σωματιδίων μεταξύ 356 και 548 nm και δείκτη πολυδιασποράς μεταξύ 0,256 και 0,842. Αυτό υποδεικνύει μέτρια προς ευρεία πολυδιασπορά νανοσωματιδίων, με τιμές του PDI εντός των αποδεκτών ορίων για την εφαρμογή που προορίζονται [4], [5]. Η ποικιλία μεγεθών επιβεβαιώνεται και από τις εικόνες SEM (παράγραφος 5.2). Παρόλα αυτά, σε αντίθεση με την ανάλυση DLS (υδροδυναμικό μέγεθος σε μορφή διαλύματος), η ανάλυση SEM εφαρμόζεται στα στερεά μορφή των νανοσωματιδίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μικρές διαφορές στο μέγεθος που μετράται και με τις δύο τεχνικές [6].

Τα αποτελέσματα για τα ενζυμικά δείγματα είναι επαναλήψιμα τόσο για τα κενά όσο και για τα φορτωμένα σωματίδια. Εξάιρεση αποτελεί η δεύτερη παρτίδα και το εμπορικό δείγμα, όπου παρουσιάστηκε διαφορά ως προς το μέγεθος μεταξύ των κενών και των εγκλεισμένων νανοσωματιδίων, αλλά και μεγαλύτερη διασπορά. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων από ενζυμικό προπολυμερές PBS είναι γενικά μικρότερο από αυτό του εμπορικού PBS και του μεταπολυμερισμένου κατά 100 nm περίπου. Αυτό συμβαίνει λόγω του μεγαλύτερου μοριακού βάρους του εμπορικού και του μεταπολυμερισμένου PBS, το οποίο οδηγεί σε αύξηση του ιξώδους του διαλύματος. Φυσικό επακόλουθο είναι η μεγαλύτερη δυσκολία στην ανάδευση, άρα η μειωμένη διατμητική τάση και, κατά συνέπεια, μεγαλύτερα νανοσωματίδια [7].

Το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική παράμετρο για τον χαρακτηρισμό τους, αφού παρέχει πληροφορίες σχετικά με

τη σταθερότητα του εναιωρήματος σε καθορισμένες συνθήκες. Οι τιμές ζ-δυναμικού των δειγμάτων ήταν αρνητικές, μεταξύ -5,1 mV και -14,8 mV. Το αρνητικό φορτίο είναι αναμενόμενο και μπορεί να αποδοθεί στη παρουσία των εστερομάδων στη δομή του PBS [8]. Συγκεκριμένα, το pK_a των εστερικών άκρων ($C_2H_5O^-$) του PBS είναι 3,6 [9], επομένως όταν βρίσκεται στο νερό, αποπρωτονιώνεται και αποκτά αρνητικό φορτίο. Επιπλέον, τα δείγματα με ναρινγίνη παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές ζ-δυναμικού (προς το ουδέτερο φορτίο) σε σχέση με τις κενές νανοσφαίρες. Αυτό συμβαίνει διότι η ναρινγίνη έχει pK_a 7,2 [10], μεγαλύτερο από αυτό των εστερικών άκρων και οδηγεί σε πιο ουδέτερα σωματίδια. Συνεπώς, η αύξηση του ζ-δυναμικού είναι και ένδειξη εγκλεισμού της ναρινγίνης στα νανοσωματίδια.

Αναλογιζόμενοι πως γενικά τιμές ζ-δυναμικού μικρότερες από τα +30 mV και αντίστοιχα μεγαλύτερες από -30 mV συνεπάγονται σταθερά σωματίδια, η πλειοψηφία των διασπορών τείνουν να συσσωματωθούν και δεν εμφανίζουν καλή σταθερότητα [11]. Αυτό οφείλεται και στην λυοφιλοποίηση των δειγμάτων, μέθοδος ξήρανσης που αποδεδειγμένα οδηγεί σε δυσχερείς διασπορές. Για αυτό και συνήθως χρησιμοποιείται σταθεροποιητής στις περισσότερες περιπτώσεις, ο οποίος όμως έχει επιπτώσεις στις υπόλοιπες ιδιότητες των σωματιδίων [1], [12].

7.6. Προσδιορισμός μοριακού βάρους μέσω GPC

Ανάλυση GPC για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών έγινε μόνο στα κενά νανοσωματίδια ώστε να μελετηθεί η επίδραση της διεργασίας του εγκλεισμού στο μοριακό βάρος των πολυμερικών σφαιρών. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16 \overline{M}_n κενών νανοσωματιδίων και αρχικού υλικού τους από την ανάλυση GPC

Δείγμα	\overline{M}_n (g/mol)	PDI
Εμπορικό PBS	14000	1,61
C_Blank	2400	5,22
90_20_2	1700	1,84
E1_Blank	1600	1,85
E2_Blank	2400	1,24

Παρατηρείται πως με τον σχηματισμό των σφαιρών μειώνεται ελαφρώς το μοριακό βάρος του PBS, πιθανώς λόγω θερμικής και μηχανικής καταπόνησης κατά τη διάρκεια της διεργασίας.

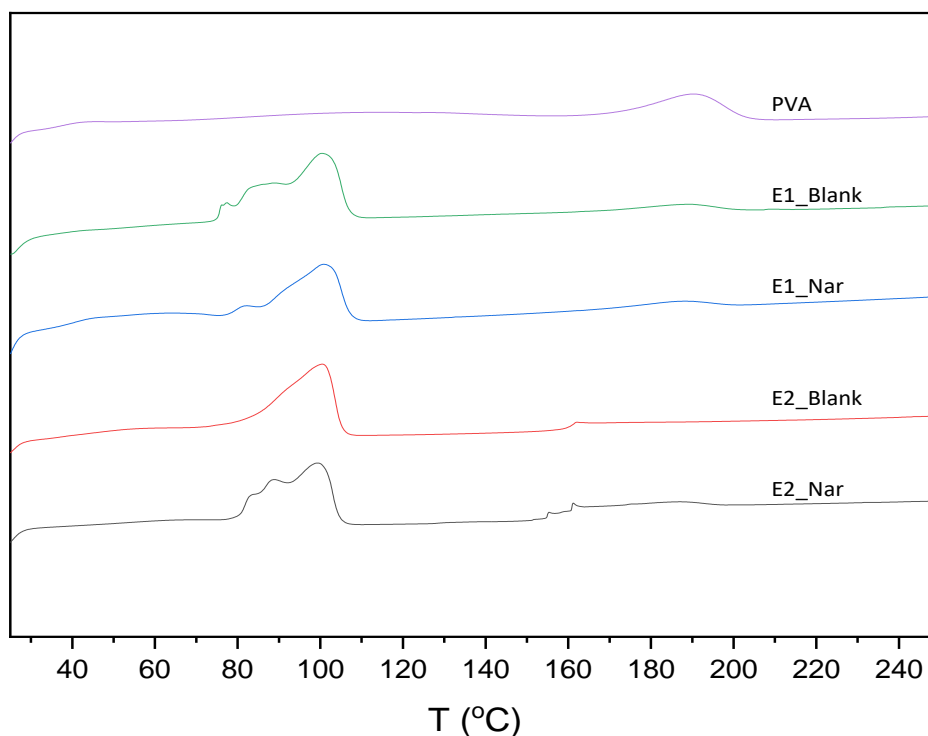
Επίσης, στα πρώτα δείγματα, που υπήρχαν υπολείμματα PVA, δεν παρατηρήθηκε πλήρης διάλυση γεγονός που επηρέασε τη μέτρηση και οδήγησε σε φαινομενικές μειώσεις των τιμών των μοριακών βαρών (π.χ. εμπορικό PBS, μείωση 82%).

7.7. Θερμικές ιδιότητες νανοσωματιδίων

Οι θερμικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, των κενών και με εγκλεισμένη ναρινγίνη, καθώς και της δραστικής ουσίας, ναρινγίνη, μελετήθηκαν μέσω DSC και TGA.

7.7.1. Αποτελέσματα DSC

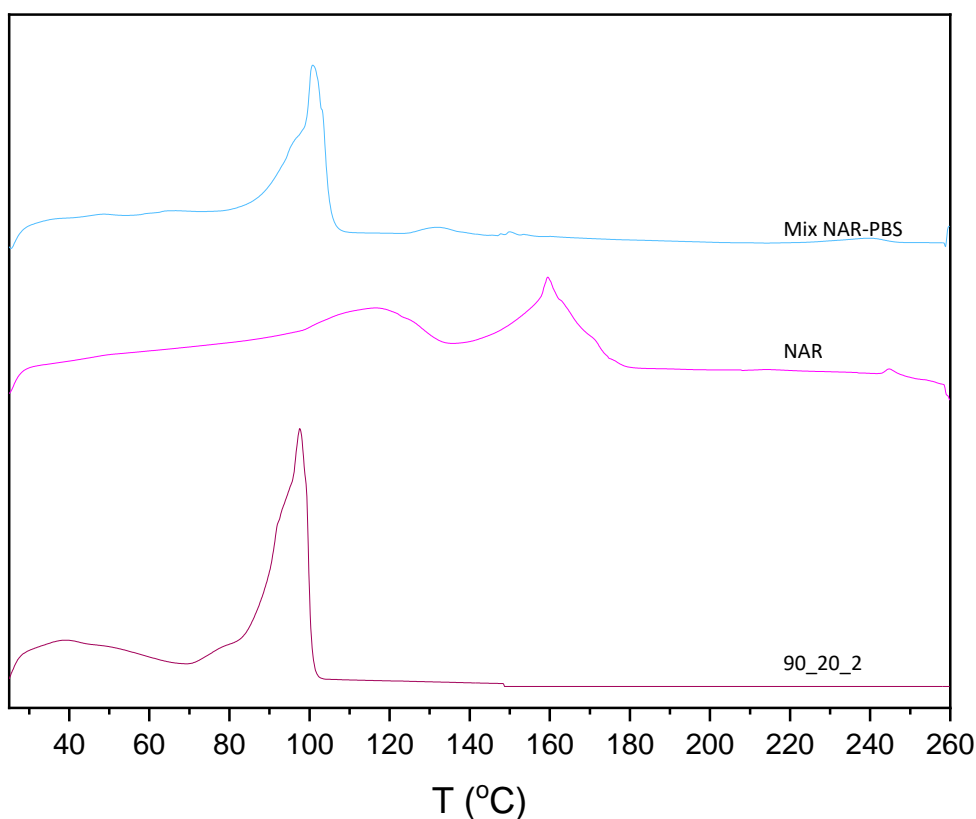
Το διαγράμματα DSC έγιναν για τις πρώτες ύλες, το φυσικό μείγμα PBS-NAR και τα νανοσωματίδια. Οι αντίστοιχες ιδιότητες φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα Π14 στο Παράρτημα πινάκων.



Διάγραμμα 31 Καμπύλες DSC νανοσωματιδίων ενζυμικού προπολυμερούς PBS και PVA (1η θέρμανση).

Ξεκινώντας από την εξέταση των ενζυμικών δειγμάτων (Διάγραμμα 31), στο πρώτο πείραμα (1^ο batch-E1) υπάρχουν υπολείμματα PVA, όπως διαπιστώθηκε από την πρώτη θέρμανση. Το PVA παρουσιάζει κορυφή τήξης στους 190°C, κάτι που συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται πως είναι κοντά στους 200°C [13]. Αυτή η κορυφή εμφανίζεται στα δείγματα E1_Nar και E1_Blank. Με την αύξηση του αριθμού των εκπλύσεων, κατά το στάδιο της φυγοκέντρησης (4.3.3), παρατηρήθηκε αντίστοιχη ελάττωση του εναπομείναντος PVA στο τελικό προϊόν (E2_Nar, E2_Blank).

Στα δείγματα που δεν υπάρχει περίσσεια PVA, εξετάζεται ο εγκλεισμός της ναρινγίνης και η επιρροή της στις θερμικές ιδιότητες. Για το σκοπό αυτό πρώτα αναλύονται οι πρώτες ύλες και το φυσικό τους μίγμα (Διάγραμμα 32).



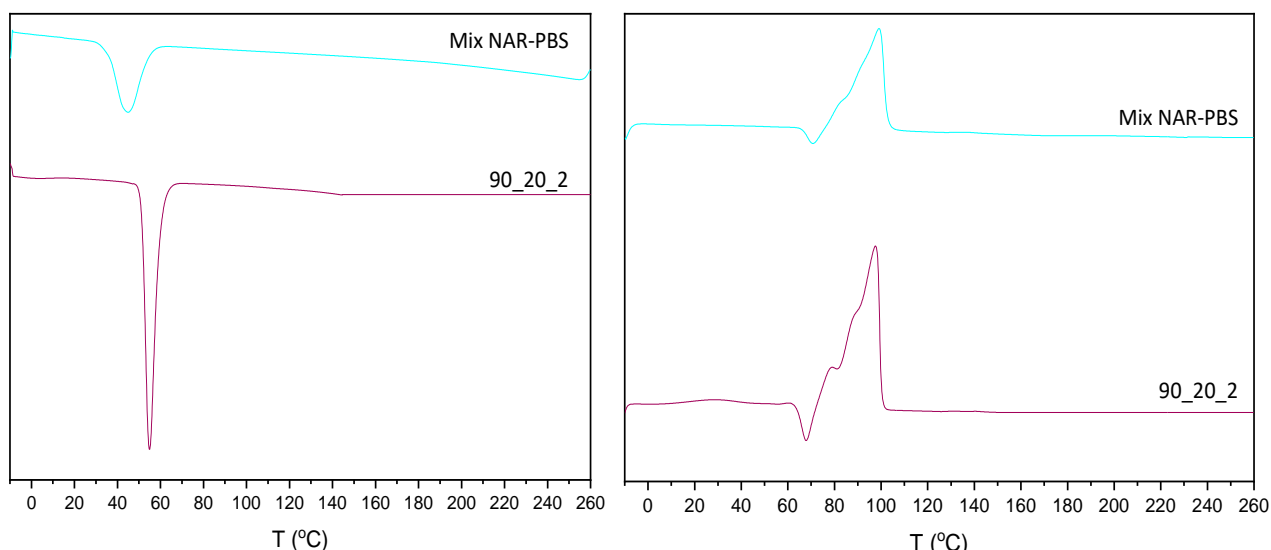
Διάγραμμα 32 Καμπύλες DSC πρώτων υλών νανοσωματιδίων (1η θέρμανση).

Η ναρινγίνη είναι μία άμορφη ουσία. Στη βιβλιογραφία έχουν εντοπιστεί δύο ενδόθερμες κορυφές, μία στους 83°C και άλλη μια στους 171°C, που αντιστοιχούν στη διαδοχική απώλεια δύο μορίων νερού [14]. Στο συγκεκριμένο δείγμα (NAR) πιθανώς η πρώτη ευρεία κορυφή (116°C) είναι η απώλεια αυτών

των μορίων νερού. Η δεύτερη πιο ξεκάθαρη κορυφή στους 160°C είναι το σημείο τήξης, σε συμφωνία και με το στο datasheet του προϊόντος (166°C) [15].

Από το διάγραμμα DSC του φυσικού μίγματος PBS-ναρινγίνης (Mix Nar-PBS) εξάγεται το συμπέρασμα πως αυτά αλληλεπιδρούν. Παρουσιάζεται η αναμενόμενη κορυφή για το PBS στους 100°C και δύο μετατοπισμένες ασθενείς κορυφές της ναρινγίνης στους 132 και 150°C.

Η ψύξη και η δεύτερη θέρμανση των πρώτων υλών παρουσιάζεται ακολούθως (Διάγραμμα 33). Για τη ναρινγίνη και το PVA δεν εξετάζονται τα δύο αυτά στάδια, καθώς πρόκειται για καθαρές, άμορφες ουσίες.



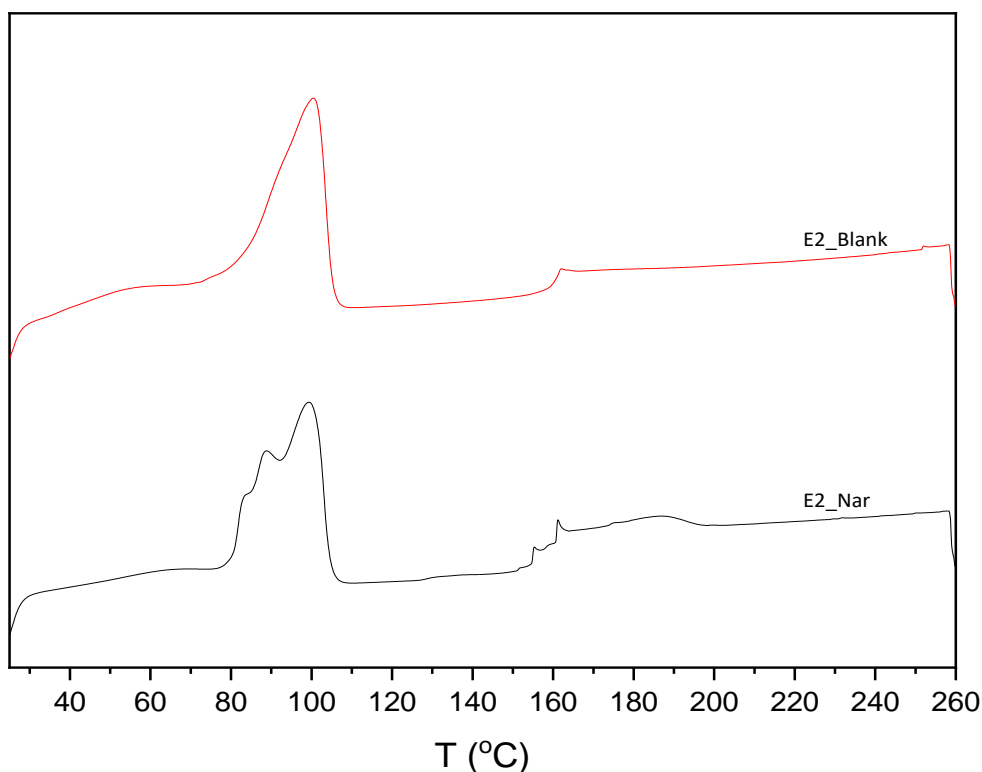
Διάγραμμα 33 Καμπύλες DSC πρώτων υλών νανοσωματιδίων (ψύξη, 2η θέρμανση).

Είναι φανερό από το διάγραμμα της ψύξης (αριστερά) πως το φυσικό μίγμα ναρινγίνης-PBS (mix NAR_PBS) κρυσταλλώνει αργότερα από το καθαρό PBS και η ενθαλπία είναι μειωμένη κατά 41%. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι η ναρινγίνη λειτουργεί ως ακαθαρσία στο PBS, αλλοιώνοντας το υλικό.

Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στη δεύτερη θέρμανση. Οι κορυφές τήξης παρουσιάζονται πολύ κοντά όμως η ενθαλπία τήξης είναι μειωμένη κατά 37%. Συνεπακόλουθα και η κρυσταλλικότητα από τη δεύτερη θέρμανση είναι μειωμένη από το 64 στο 42%. Αυτό υποδηλώνει την παρεμβολή της ναρινγίνης

ως μικρότερο μόριο στο πλέγμα του PBS και την επιβεβαίωση της αλλοίωσής του από αυτήν.

Μετά από την ανάλυση των πρώτων υλών, εξετάζονται τα δείγματα των νανοσωματιδίων με αρχικό υλικό το 90_20_2 χωρίς PVA (E2_Nar, E2_Blank)(Διάγραμμα 34).

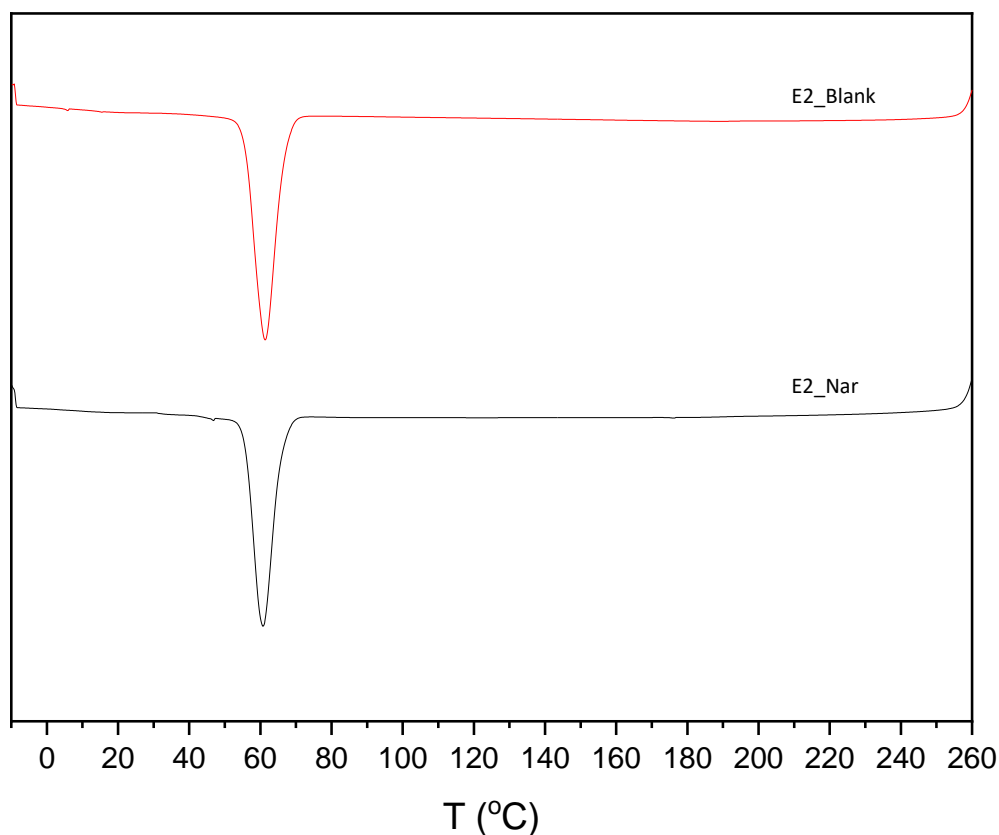


Διάγραμμα 34 Καμπύλες DSC E2_Nar και E2_Blank (1η θέρμανση).

Φαίνεται πως στη δεύτερη παρτίδα έχει εγκλειστεί επιτυχώς η ναρινγίνη, καθώς παρουσιάζονται κορυφές στους 83 και 89°C και μια ασθενής κορυφή στους 161°C, εκτός της κορυφής στους 99°C, που αποδίδεται στο PBS. Οι πρώτες δύο θεωρείται πως είναι τα μόρια νερού της ναρινγίνης και αυτή στους 161°C το σημείο τήξης της, όπως προαναφέρθηκε. Στο αντίστοιχο πείραμα αναφοράς (E2_Blank) δεν παρατηρούνται οι πρώτες κορυφές ενώ υπάρχει κατά πάσα πιθανότητα κάποια ακαθαρσία και εμφανίζει μια ακόμα κορυφή κοντά στους 161°C, με διαφορετική μορφολογία από αυτή του δείγματος E2_Nar.

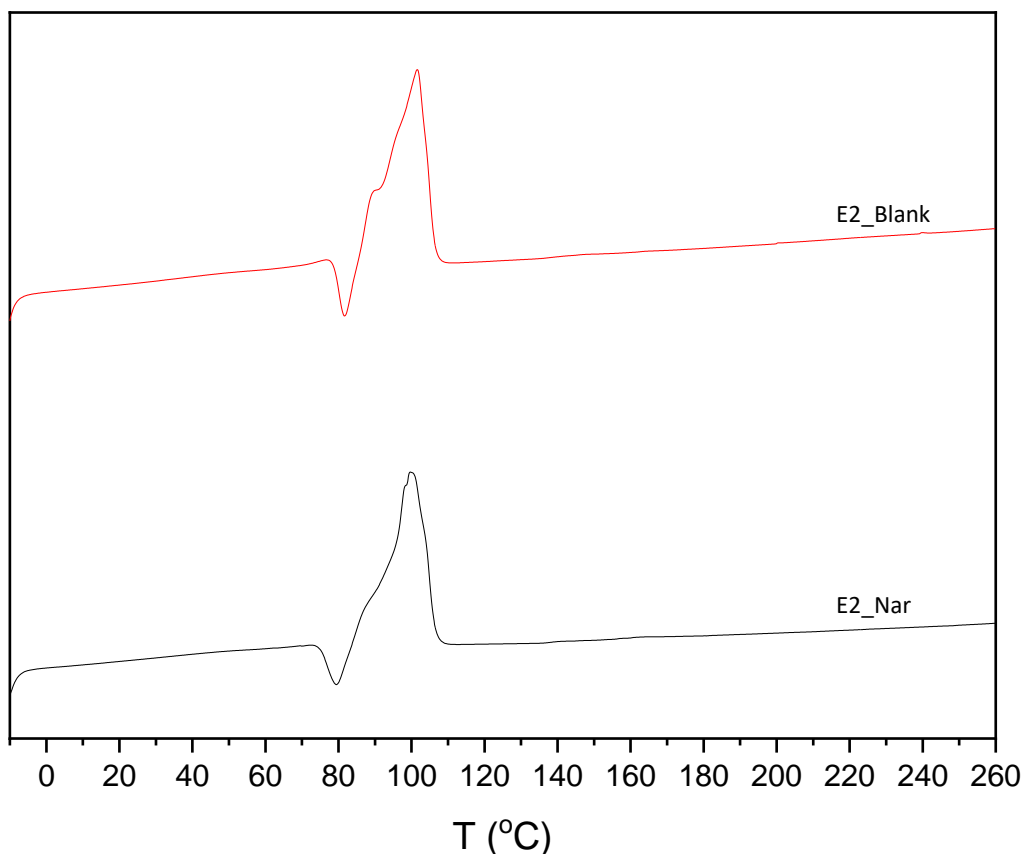
Ως προς το αρχικό υλικό, δεν φαίνεται να επηρεάζεται το κύριο σημείο τήξης (98-101°C) στην πρώτη θέρμανση από το σχηματισμό των σωματιδίων.

Ακολουθεί η ψύξη και η δεύτερη θέρμανση των δειγμάτων (Διάγραμμα 35, Διάγραμμα 36).



Διάγραμμα 35 Καμπύλες DSC E2_Nar και E2_Blank (ψύξη).

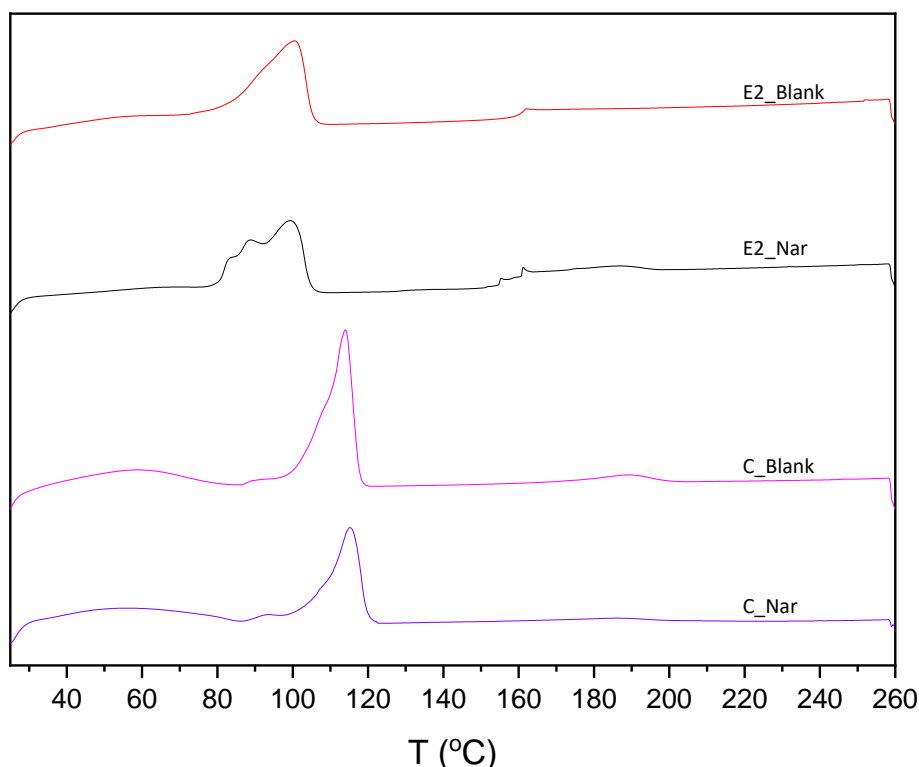
Συγκρίνοντας τα διαγράμματα κατά την ψύξη σε σχέση με το αρχικό υλικό, φαίνεται ήδη η μείωση της κρυσταλλικότητας με την προσθήκη της ναρινγίνης και γενικότερα με τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων. Τα δείγματα νανοσωματιδίων μπορεί να κρυσταλλώνουν νωρίτερα από το αρχικό δείγμα ($62 \pm 3^\circ\text{C}$) αλλά οι τιμές της ενθαλπίας είναι πολύ μικρότερες (κατά 31%). Αυτό κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στη διαδικασία της λυοφιλοποίησης, καθώς τα δείγματα διατηρήθηκαν για κάποιο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασίες χαμηλότερα από την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης [7]. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε και για το φυσικό μίγμα, είναι πιθανό η ναρινγίνη να λειτουργεί ως ακαθαρσία για το εγκλεισμένο δείγμα.



Διάγραμμα 36 Καμπύλες DSC E2_Nar και E2_Blank (2^η θέρμανση).

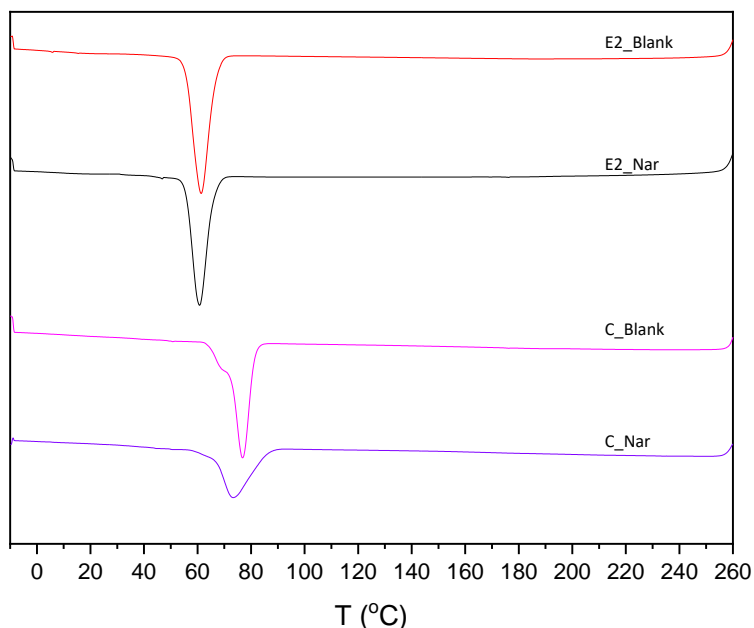
Κατά τη δεύτερη θέρμανση παρατηρείται πως σε όλα τα δείγματα εμφανίζονται τα αναμενόμενα χαρακτηριστικά του PBS. Αρχικά, τα νανοσωματίδια εμφανίζουν ψυχρή κρυστάλλωση στους $80 \pm 1^\circ\text{C}$. Έπειτα εμφανίζονται πολλαπλές κορυφές με κύρια στους $102 \pm 1^\circ\text{C}$. Η κρυσταλλικότητα, όπως ήταν αναμενόμενο από την ψύξη, έχει μειωθεί στο $40 \pm 5\%$ για τα νανοσωματίδια, σε αντίθεση με το αρχικό υλικό που ήταν 64%. Η καλύτερη κρυσταλλικότητα εμφανίζεται στα κενά νανοσωματίδια, λόγω της μη παρεμβολής των αλυσίδων από ναρινγίνη, μια σημαντική ιδιότητα αναφορικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα των προϊόντων.

Ακολουθεί η σύγκριση των δειγμάτων με το δείγμα εμπορικού PBS με εγκλεισμένη ναρινγίνη (Διάγραμμα 37, Διάγραμμα 38, Διάγραμμα 39).



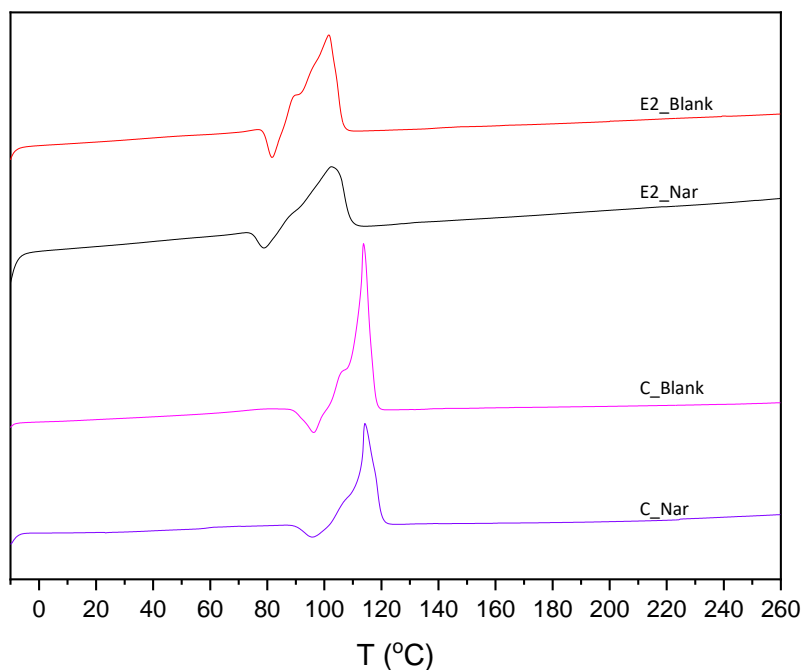
Διάγραμμα 37 Καμπύλες DSC νανοσωματιδίων προπολυμερούς και εμπορικού PBS (1η θέρμανση).

Όπως είναι αναμενόμενο, κατά την πρώτη θέρμανση, το δείγμα από εμπορικό PBS παρουσιάζει μεγαλύτερο σημείο τήξης (115°C), ακριβώς ίδιο με το αρχικό υλικό. Ο εγκλεισμός της ναρινγίνης επιβεβαιώνεται μερικώς από την κορυφή στους 93°C , που οφείλεται πιθανώς στα μόρια νερού της. Μορφολογικά η κορυφή του PBS είναι πιο οξεία και ξεκάθαρη σε σχέση με το ενζυμικά συντεθειμένο PBS που παρουσιάζει χαμηλότερο μοριακό βάρος. Μια ακόμη ένδειξη ύπαρξης της ναρινγίνης είναι η μειωμένη ενθαλπία του εγκλεισμένου εμπορικού δείγματος σε σχέση με το αντίστοιχο κενό. Η παρουσία της ναρινγίνης είναι πιο εμφανής στο ενζυμικό δείγμα (E2_Nar) σε σχέση με το εμπορικό (C_Nar). Αυτό αιτιολογείται και από τη μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού που υπολογίστηκε (Πίνακας 14).



Διάγραμμα 38 Καμπύλες DSC νανοσωματιδίων προπολυμερούς και εμπορικού PBS (ψύξη).

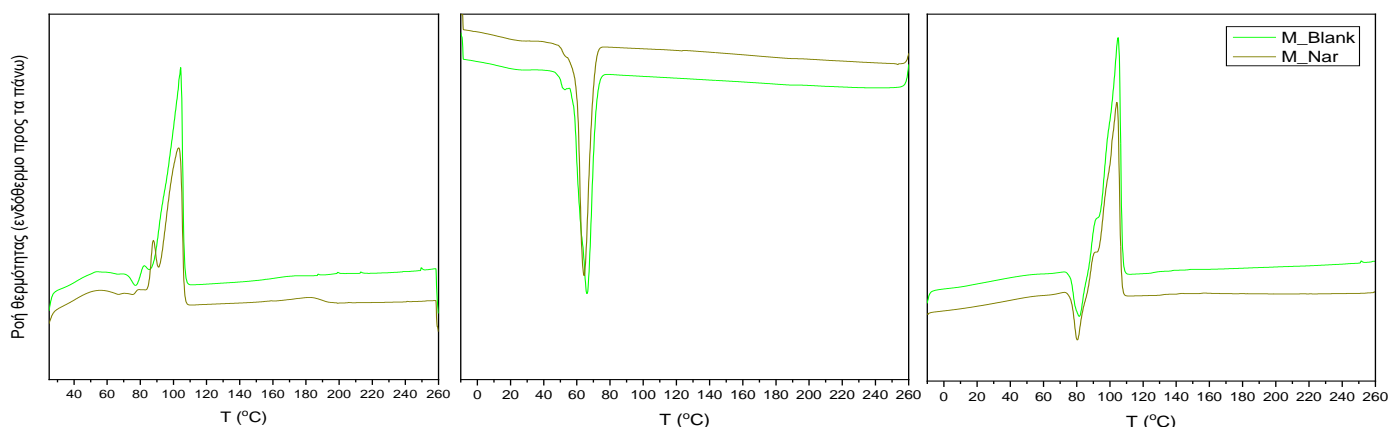
Από τα διαγράμματα ψύξης του C_Nar η μείωση της κρυσταλλικότητας είναι ακόμα πιο εμφανής και μεγαλύτερη από αυτή των ενζυμικών δειγμάτων. Συγκεκριμένα, το δείγμα από εμπορικό PBS κρυσταλλώνει σε χαμηλότερη θερμοκρασία από το υλικό της μήτρας (απόκλιση 12%) και οι τιμές της ενθαλπίας είναι εξίσου μειωμένες (κατά 51%).



Διάγραμμα 39 Καμπύλες DSC νανοσωματιδίων προπολυμερούς και εμπορικού PBS (2^η θέρμανση).

Όπως ήταν αναμενόμενο, το δείγμα εμπορικού PBS εξακολουθεί να έχει υψηλότερο σημείο τήξης στη δεύτερη θέρμανση. Εμφανίζεται ψυχρή κρυστάλλωση στους 96°C, ενώ στο εμπορικό PBS εμφανίζεται στους 101°C. Επίσης υπάρχει μόνο μια ξεκάθαρη κορυφή τήξης στους 114°C, σε αντίθεση με τις δύο του εμπορικού PBS. Η κορυφή αυτή απέχει μόλις 1°C από το τελικό σημείο τήξης του υλικού της μήτρας, γεγονός που υποδηλώνει πως δεν υποβαθμίστηκε θερμικά. Η κρυσταλλικότητα από την άλλη παρουσιάζει μεγάλη πτώση, όπως αναμενόταν, από το 64% στο 34%.

Τέλος, ακολουθούν οι καμπύλες DSC για τα τελευταία δείγματα με μήτρα το μεταπολυμερισμένο PBS (Διάγραμμα 40).



Διάγραμμα 40 Καμπύλες DSC M_Nar και M_Blank (1η θέρμανση, ψύξη, 2η θέρμανση).

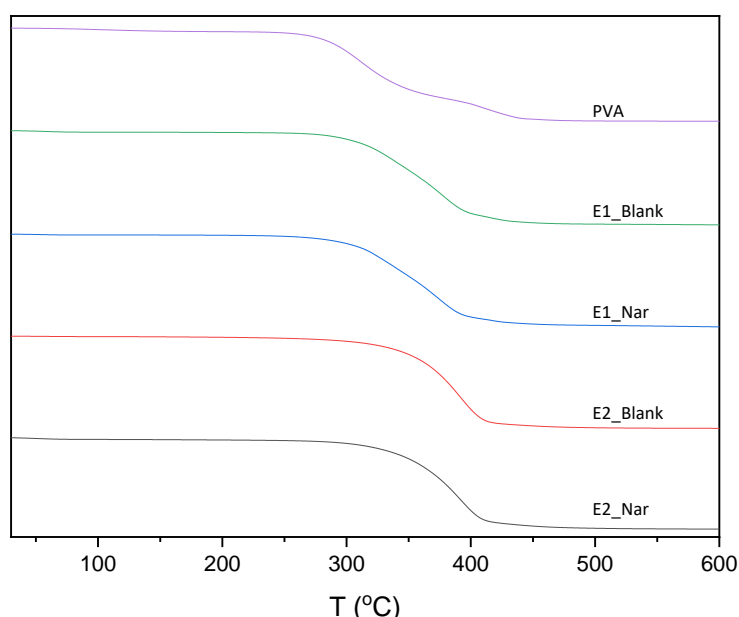
Κατά την πρώτη θέρμανση παρατηρείται υγρασία στα δείγματα πριν τους 80°C και στο εγκλεισμένο δείγμα (M_Nar) μια κορυφή στους 88°C, ένδειξη ύπαρξης της ναρινγίνης στο δείγμα. Η κορυφή τήξης στους 103-104°C οφείλεται στην τήξη του PBS. Κατά την ψύξη παρατηρούνται παρεμφερείς θερμοκρασίες 64-66°C για τα M_Nar και M_Blank. Στη δεύτερη θέρμανση εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά του PBS με ψυχρή κρυστάλλωση στους 80-82°C και πολλαπλές κορυφές τήξης με υψηλότερη στους 104-105°C.

Η εμφανής διαφορά μεταξύ των δύο που υποδηλώνει την ύπαρξη της ναρινγίνης είναι η μειωμένη ενθαλπία όλων των σταδίων και κατ' επέκταση τη μειωμένη κρυσταλλικότητα στη δεύτερη θέρμανση. Όπως αναφέρθηκε, στο εγκλεισμένο δείγμα, είναι πιθανό η ναρινγίνη να λειτουργεί ως ακαθαρσία για το PBS.

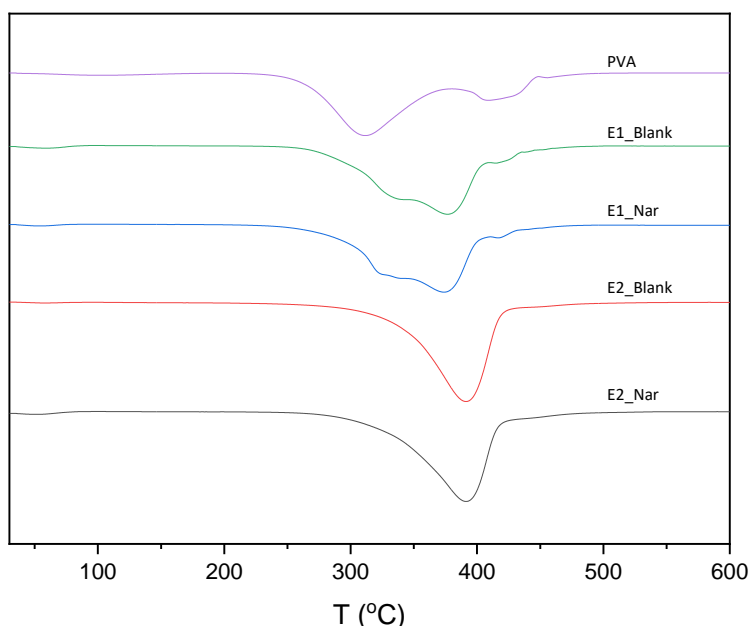
Συνολικά, οι θερμικές ιδιότητες του υλικού δεν επηρεάστηκαν ιδιαίτερα, πέραν της κρυσταλλικότητας που μειώθηκε κατά πολύ σε όλα τα δείγματα, όπως σημειώθηκε αρκετές φορές, λόγω της λυοφιλοποίησης και της επίδρασης της ναρινγίνης στα εγκλεισμένα δείγματα.

7.7.2. Αποτελέσματα TGA

Το διαγράμματα TGA έγιναν για τις πρώτες ύλες, το φυσικό μείγμα PBS-NAR και τα νανოსωματίδια. Οι αντίστοιχες ιδιότητες φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα Π15 στο Παράρτημα πινάκων.



Διάγραμμα 41 Απώλεια βάρους TGA νανოსωματιδίων ενζυμικού προπολυμερούς PBS και PVA.

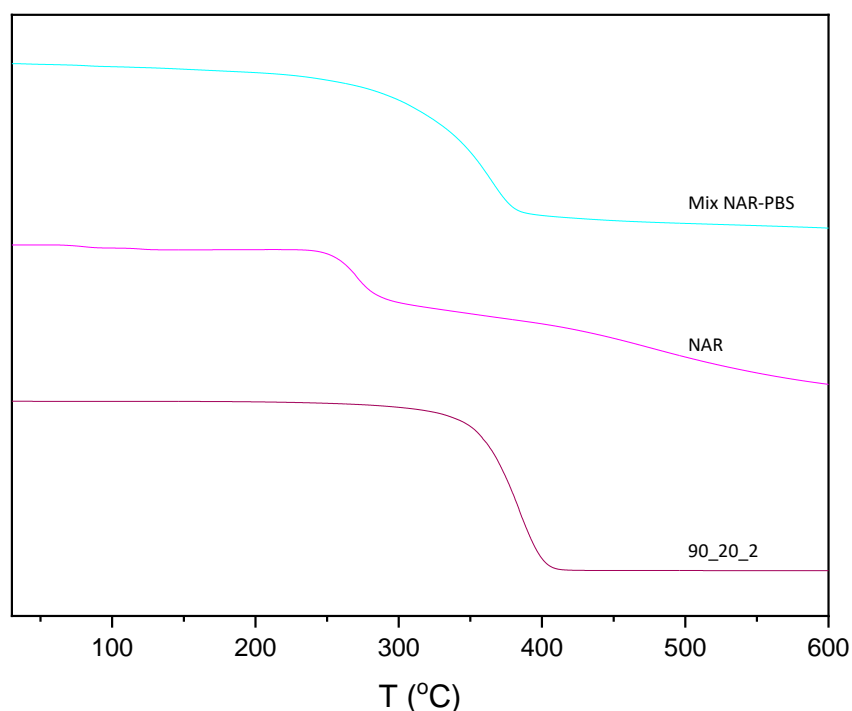


Διάγραμμα 42 1^η παράγωγος TGA νανοςωματιδίων ενζυμικού προπολυμερούς PBS και PVA.

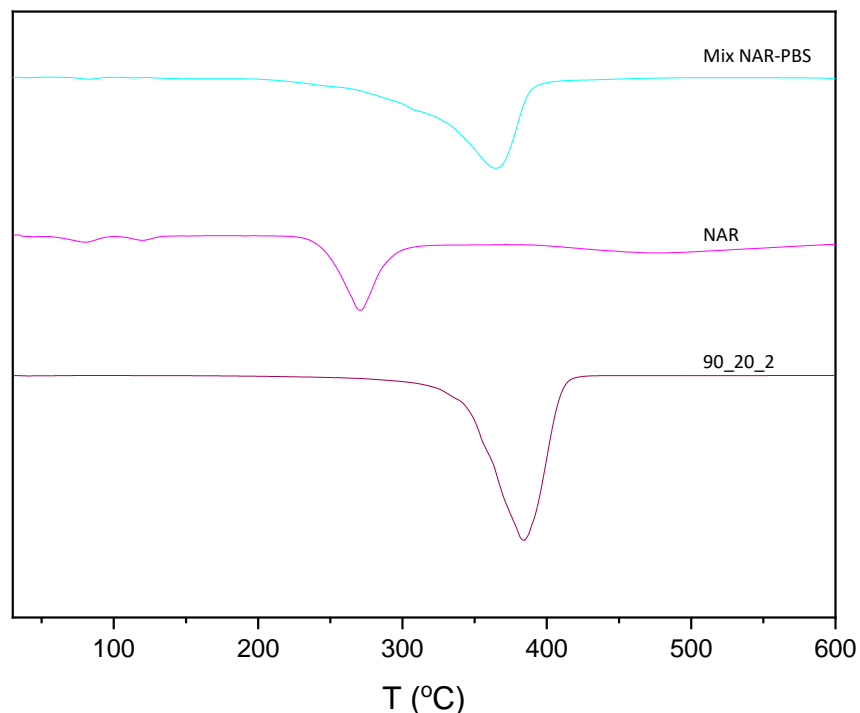
Ξεκινώντας και πάλι από την εξέταση των ενζυμικών δειγμάτων (Διάγραμμα 41, Διάγραμμα 42), επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση TGA πως στο πρώτο πείραμα (1^ο batch) υπάρχουν υπολείμματα PVA.

Το διάγραμμα του PVA δείχνει πως η αποικοδόμησή του πραγματοποιείται σε δύο στάδια, κάτι το οποίο συμφωνεί με τη βιβλιογραφία. Το πρώτο στάδιο παρατηρείται στους 242 - 367°C (εδώ στους 312°C) όπου αποσυντίθενται οι μακριές αλυσίδες PVA σε μικρότερες. Επακόλουθα, το δεύτερο στάδιο είναι στους 367 - 431°C (εδώ στους 409°C) όπου λαμβάνει χώρα η διάσπαση των δεσμών C-C προς σχηματισμό ανθρακικού [16]. Αυτές οι κορυφές εμφανίζονται στα δείγματα E1_Nar και E1_Blank μετατοπισμένες στους 320 και 420°C. Με την αύξηση του αριθμού των εκπλύσεων, κατά το στάδιο της φυγοκέντρησης (4.3.3), παρατηρήθηκε αντίστοιχη ελάττωση του εναπομείναντος PVA στο τελικό προϊόν (E2_Nar, E2_Blank) και στις αναλύσεις TGA.

Επιβεβαιώνοντας ακόμη μια φορά πως έχει απορριφθεί το PVA από τα δείγματα, εξετάζεται ο εγκλεισμός της ναρινγίνης και πως αυτή επηρεάζει τη θερμική σταθερότητα του προϊόντος. Όπως και προηγουμένως, πρώτα αναλύονται οι πρώτες ύλες και το φυσικό τους μίγμα (Διάγραμμα 43, Διάγραμμα 44).



Διάγραμμα 43 Απώλεια βάρους TGA πρώτων υλών νανοσωματιδίων PBS.

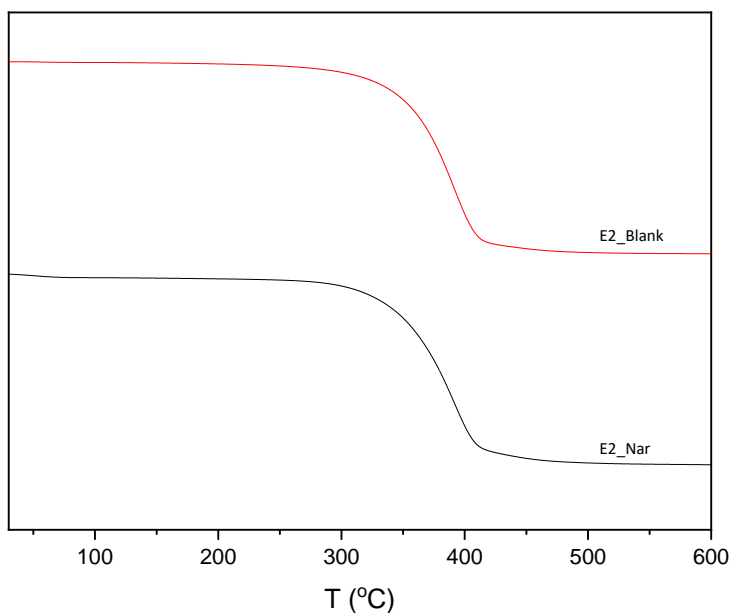


Διάγραμμα 44 1^η παράγωγος TGA πρώτων υλών νανοσωματιδίων PBS.

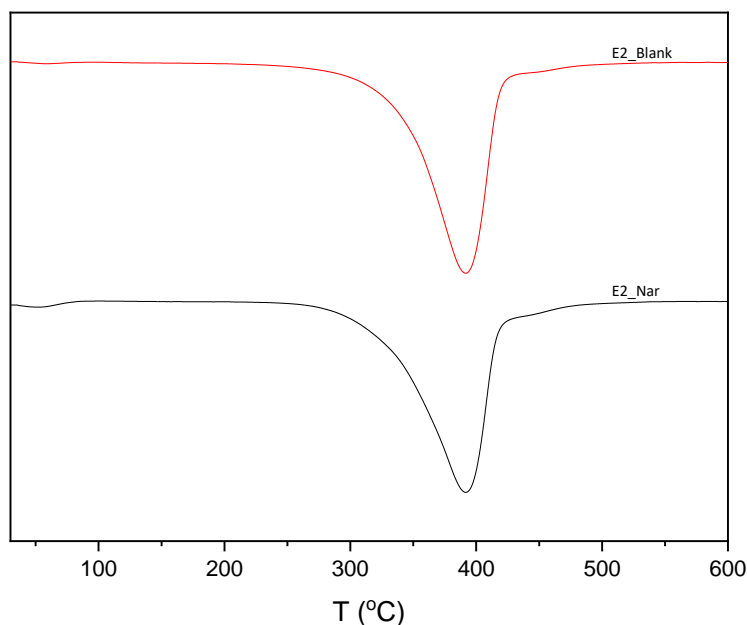
Η καμπύλη που αντιστοιχεί στην ναρινγίνη (NAR) παρουσιάζει δύο ενδόθερμες κορυφές, μία στους 83°C και μια άλλη στους 116°C, που αντιστοιχούν στη διαδοχική απώλεια δύο μορίων νερού, όπως προαναφέρθηκε. Οι κορυφές αυτές είναι διακριτές και στο TGA. Στη συνέχεια, όπως ήταν αναμενόμενο, ξεκινά η απώλεια μάζας από τη θερμοκρασία των 250°C με θερμοκρασία μέγιστου ρυθμού αποικοδόμησης στους 271°C [14].

Όσον αφορά το φυσικό μίγμα ναρινγίνης-PBS (Mix Nar-PBS), φαίνεται πως τα μόρια αλληλεπιδρούν καθώς το $T_{d(5\%)}$ έχει πέσει στους 195°C. Εκτός αυτού, η θερμοκρασία αποικοδόμησης είναι στους 365°C, ανάμεσα στις θερμοκρασίες αποικοδόμησης των δύο υλικών.

Μετά από την ανάλυση των πρώτων υλών, εξετάζονται τα δείγματα των νανοσωματιδίων με αρχικό υλικό το 90_20_2 χωρίς PVA (E2_Nar, E2_Blank)(Διάγραμμα 45, Διάγραμμα 46).



Διάγραμμα 45 Απώλεια βάρους TGA E2_Nar και E2_Blank.

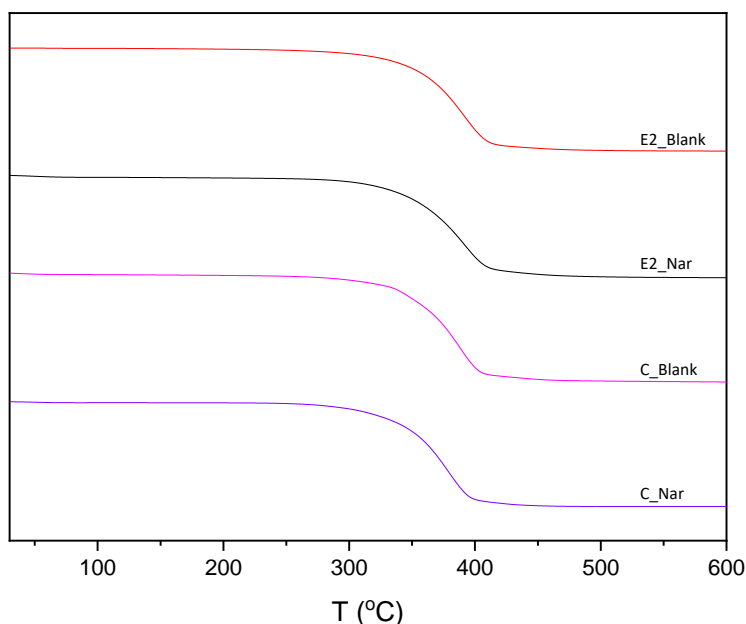


Διάγραμμα 46 1^η παράγωγος TGA E2_Nar και E2_Blank.

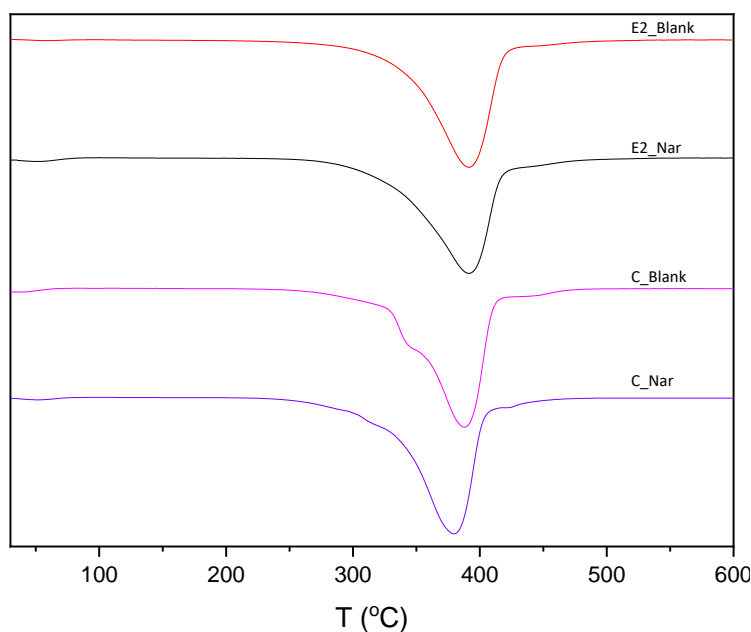
Από τις καμπύλες των κενών νανοσωματιδίων παρατηρείται το $T_{d(5\%)}$ από τη θερμοκρασία των 281-298°C. Αντίστοιχα για τα δείγματα που περιέχουν την εγκλεισμένη ουσία, παρατηρείται πως η απώλεια μάζας ξεκινάει από χαμηλότερες θερμοκρασίες (217-294°C). Η μείωση της θερμοκρασίας αυτής, μπορεί να αποδοθεί στην θερμική αποικοδόμηση της ναρινγίνης που είναι εγκλεισμένη στο PBS. Το $T_{d(5\%)}$ των νανοσωματιδίων σε σχέση με το αρχικό PBS

έχει μειωθεί κατά $8\pm 2\%$, κάτι το οποίο οφείλεται στη μείωση του μοριακού βάρους του πολυμερούς, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως. Η θερμοκρασία αποικοδόμησης στα δείγματα E2_Nar και E2_Blank είναι 391°C , 7°C υψηλότερη από αυτή του αρχικού υλικού, υποδηλώνοντας αυξημένη θερμική σταθερότητα.

Ακολουθεί η σύγκριση των δειγμάτων με αυτά του εμπορικού PBS (Διάγραμμα 47-Διάγραμμα 48).



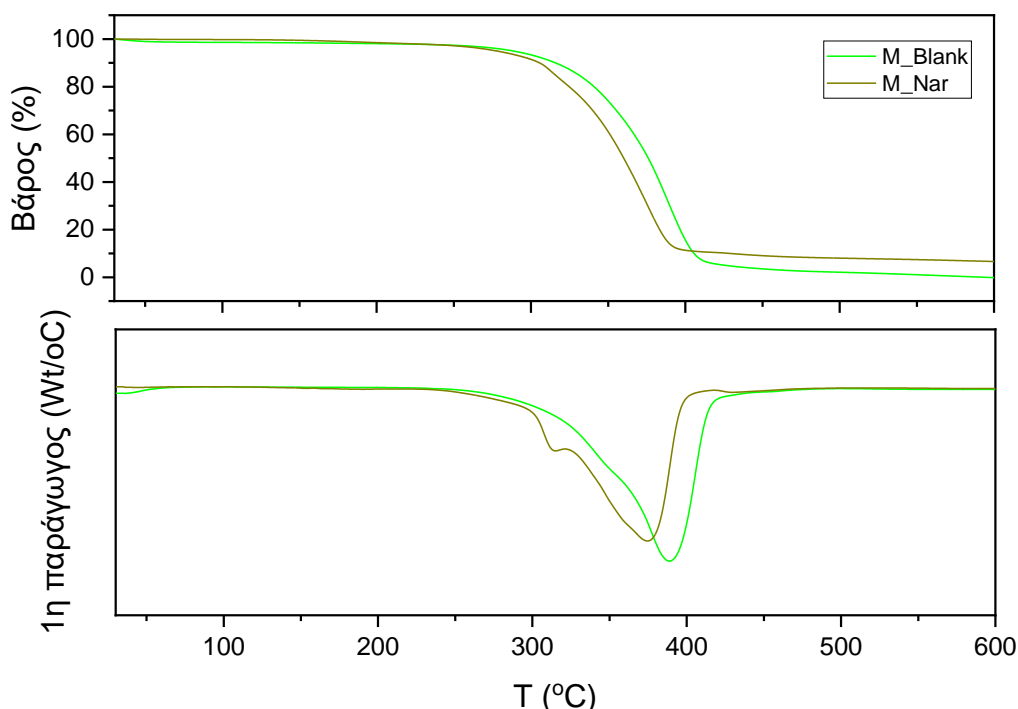
Διάγραμμα 47 Απώλεια βάρους TGA νανοσωματιδίων προπολυμερούς και εμπορικού PBS.



Διάγραμμα 48 1^η παράγωγος TGA νανοσωματιδίων προπολυμερούς και εμπορικού PBS.

Τα δείγματα από εμπορικό PBS παρουσιάζουν κοντινή θερμοκρασία αποικοδόμησης με αυτά από το ενζυμικό PBS και με το αρχικό εμπορικό PBS. Επομένως επιβεβαιώνεται η διατήρηση της θερμικής τους σταθερότητα. Το $T_{d(5\%)}$ στα C_Nar και C_Blank έχει μειωθεί κατά $7\pm 2\%$, και αυτό οφείλεται στη μείωση του μοριακού βάρους του πολυμερούς. Συνοπτικά, παρουσιάζεται ομοιότητα μεταξύ των δειγμάτων από το εμπορικό PBS με αυτά από ενζυμικά συντεθειμένο. Πιθανώς στο κενό δείγμα (C_Blank) έχει απομείνει PVA ή και κάποια άλλη ακαθαρσία και εμφανίζεται μια κορυφή στους 345°C .

Τέλος, ακολουθούν οι καμπύλες TGA για τα τελευταία δείγματα με μήτρα το μεταπολυμερισμένο PBS (Διάγραμμα 49).



Διάγραμμα 49 Καμπύλες TGA νανοσωματιδίων και πρώτων υλών μεταπολυμερισμένου ενζυμικού PBS.

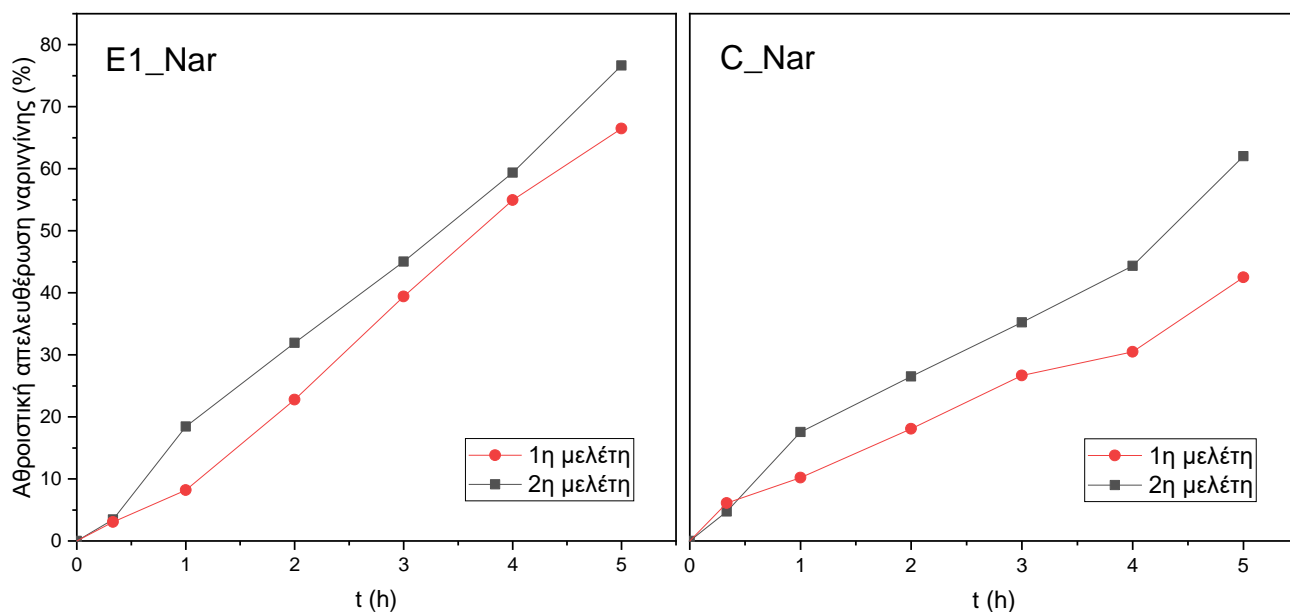
Από την ανάλυση TGA παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά με τα υπόλοιπα δείγματα. Το $T_{d(5\%)}$ είναι στους $277-288^\circ\text{C}$ παρουσιάζοντας μείωση κατά $11\pm 2\%$ από το αρχικό υλικό (M4_110-προθέρμανση). Αυτό υποδηλώνει και σε αυτά τα δείγματα τη μείωση του μοριακού βάρους της μήτρας που χρησιμοποιήθηκε. Για το εγκλεισμένο δείγμα (M_Nar) παρατηρείται και πάλι πως η απώλεια μάζας ξεκινάει από χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με το κενό δείγμα (M_Blank), κάτι που αποδίδεται στην θερμική αποικοδόμηση της ναρινγίνης που είναι

εγκλεισμένη στο PBS. Η κορυφή που παρουσιάζεται στο M_Nar στους 315°C είναι είτε μετατοπισμένη η κορυφή της ναρινγίνης, είτε υπολειπόμενο PVA, είτε κάποια ακαθαρσία του δείγματος. Η θερμοκρασία αποικοδόμησης είναι μειωμένη κατά πολύ μικρό και αμελητέο ποσοστό σε σχέση με το αρχικό υλικό δείχνοντας τη θερμική σταθερότητα των προϊόντων.

7.8. Μελέτη αποδέσμευσης In Vitro

Πραγματοποιήθηκε προκαταρκτικό πείραμα μελέτης αποδέσμευσης *in vitro* της ναρινγίνης από το σύστημα των νανοσωματιδίων από το προπολυμερές σε pH ίσο με 7,4 στους 37°C. Η επιλογή της θερμοκρασίας έγινε διότι ότι η αποθήκευση τροφίμων γίνεται σε θερμοκρασίες 20-40°C (ράφια, αποθήκες) και παρατηρείται ταχύτερη αποσύνθεση τους στις υψηλότερες θερμοκρασίες του φάσματος αυτού. Επιπλέον, η αποικοδόμηση των τροφίμων προκαλεί μεταβολές του pH και τα βακτήρια αναπτύσσονται καλύτερα σε ουδέτερο pH. Άρα ένα σύστημα με ελεγχόμενη αποδέσμευση σε τέτοιες τιμές pH θα πρέπει να έχει βελτιωμένη αντιβακτηριακή δράση [17].

Η δεύτερη μελέτη απείχε από την πρώτη διάστημα δύο μηνών. Το προφίλ αποδέσμευσης και για τις δύο παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 50 για τα δείγματα E1_Nar και C_Nar.



Διάγραμμα 50 Προφίλ αποδέσμευσης ναρινγίνης από τα E1_Nar, C_Nar για τις δύο μελέτες αποδέσμευσης.

Από την πρώτη μελέτη, παρατηρείται πως για χρόνο 5 ώρες παρουσιάζεται αποδέσμευση συνολικής ποσότητας 67% ναρινγίνης για το ενζυμικά συντεθειμένο προπολυμερές και 51% για το εμπορικό. Αν η αποδέσμευση συνεχιζόταν για περισσότερες ώρες ή και μέρες θα έφταναν σε σταθερή κατάσταση και θα ήταν δυνατή η εξαγωγή περισσότερων συμπερασμάτων ως προς το προφίλ αποδέσμευσης, αλλά στη δεδομένη περίπτωση δεν υπήρξε αρκετός χρόνος.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η μήτρα του ενζυμικού PBS (E1_Nar) υδρολύεται γρηγορότερα και απελευθερώνει περισσότερη ναρινγίνη σε συγκεκριμένο χρόνο. Αντίθετα, το εμπορικό PBS (C_Nar) παρουσιάζει σταθερότερη απελευθέρωση και φαίνεται στην πρώτη μελέτη να πλησιάζει στο να σχηματίσει ένα πλατό. Αυτό συμβαίνει λόγω της μειωμένης κρυσταλλικότητας και μοριακού βάρους που έχει το ενζυμικό PBS, κάτι που το κάνει πιο ευάλωτο στην υδρόλυση.

Συγκρίνοντας την πρώτη με τη δεύτερη μελέτη αποδέσμευσης για το κάθε δείγμα, παρατηρείται πως το τελικό ποσοστό ναρινγίνης αυξάνεται κατά 10% στα δείγματα ενζυμικού προπολυμερούς και 20% σε αυτά του εμπορικού. Αυτό συμβαίνει καθώς τα πολυμερή έχουν απορροφήσει υγρασία και συνεπακόλουθα έχουν υποβαθμιστεί οι μήτρες των νανοσωματιδίων. Αποτέλεσμα είναι πως τα σωματίδια είναι πιο επιρρεπή σε υδρόλυση και άρα ταχύτερη απελευθέρωση της ναρινγίνης.

7.9. Βιβλιογραφία

- [1] K. Kizilbey, "Optimization of Rutin-Loaded PLGA Nanoparticles Synthesized by Single-Emulsion Solvent Evaporation Method," *ACS Omega*, vol. 4, no. 1, pp. 555–562, 2019, doi: 10.1021/acsomega.8b02767.
- [2] A. Hakim, I. N. Loka, and N. W. W. S. Prastiwi, "New method for isolation of naringin compound from *Citrus maxima*," *Natural Resources*, vol. 10, no. 08, p. 299, 2019.
- [3] S. Mohanty, V. B. Konkimalla, A. Pal, T. Sharma, and S. C. Si, "Naringin as Sustained Delivery Nanoparticles Ameliorates the Anti-inflammatory Activity

- in a Freund's Complete Adjuvant-Induced Arthritis Model," *ACS Omega*, vol. 6, no. 43, pp. 28630–28641, Nov. 2021, doi: 10.1021/acsomega.1c03066.
- [4] U. Nobbmann, "Polydispersity – what does it mean for DLS and chromatography?," *Malvern Panalytical*, Oct. 23, 2017. <https://www.materials-talks.com/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/> (accessed Sep. 12, 2022).
- [5] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophys Rev*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, 2016, doi: 10.1007/s12551-016-0218-6.
- [6] I. de la Calle, D. Soto-Gómez, P. Pérez-Rodríguez, and J. E. López-Periago, "Particle Size Characterization of Sepia Ink Eumelanin Biopolymers by SEM, DLS, and AF4-MALLS: a Comparative Study," *Food Anal Methods*, vol. 12, no. 5, pp. 1140–1151, 2019, doi: 10.1007/s12161-019-01448-0.
- [7] M. Roussaki *et al.*, "Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles," *Polym Degrad Stab*, vol. 108, pp. 182–187, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.08.004>
- [8] M. Wiśniewska, V. Bogatyrov, I. Ostolska, K. Szewczuk-Karpisz, K. Terpiłowski, and A. Nosal-Wiercińska, "Impact of poly (vinyl alcohol) adsorption on the surface characteristics of mixed oxide $Mn_xO_y-SiO_2$," *Adsorption*, vol. 22, no. 4, pp. 417–423, 2016.
- [9] R. Williams, "pKa Data Compiled," ACS, *Organic Division*, Jul. 04, 2022. https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/pka/pka_data/pka-compilation-williams.pdf (accessed Sep. 07, 2022).
- [10] K. Khoshnevisan and M. Barkhi, "Information about zeta potential," *Institute of Agricultural Biotechnology, Nano Department: Karaj, Tehran, Iran*, pp. 1–6, 2015.
- [11] J. Varshosaz, S. Eskandari, and M. Tabbakhian, "Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants," *Carbohydr Polym*, vol. 88, no. 4, pp. 1157–1163, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.051>

- [12] R. K. Tubbs, "Melting point and heat of fusion of poly(vinyl alcohol)," *J Polym Sci A*, vol. 3, no. 12, pp. 4181–4189, Dec. 1965, doi: <https://doi.org/10.1002/pol.1965.100031213>
- [13] L. Malgarim Cordenonsi, R. Sponchiado, S. Chagas Campanharo, C. Garcia, R. Raffin, and E. Schapoval, "STUDY OF FLAVONOIDS PRESENT IN POMELO (Citrus Maxima) BY DSC, UV-VIS, IR, 1H AND 13C NMR AND MS," *Drug Analytical Research*, vol. 1, pp. 31–37, Aug. 2017, doi: 10.22456/2527-2616.74097.
- [14] "Datasheet of Naringin 10236-47-2." https://www.tsbiochem.com/ss/files/datasheets/Naringin_datasheet_Target_mol.pdf (accessed Aug. 19, 2022).
- [15] S. Salman, N. Bakr, and H. Humad, "Section C: Physical Sciences DSC and TGA Properties of PVA Films Filled with Na₂S₂O₃·5H₂O Salt," *J Chem Biol Phys Sci*, vol. 8, Mar. 2018, doi: 10.24214/jcbps.C.8.2.00111.
- [16] J. R. Westlake, M. W. Tran, Y. Jiang, X. Zhang, A. D. Burrows, and M. Xie, "Biodegradable Active Packaging with Controlled Release: Principles, Progress, and Prospects," *ACS Food Science & Technology*, vol. 2, no. 8, pp. 1166–1183, Aug. 2022, doi: 10.1021/acsfoodscitech.2c00070.

8.1. Συμπεράσματα που προκύπτουν από την εργασία

Ξεκινώντας από το στάδιο του ενζυμικού προπολυμερισμού, επιτεύχθηκε η κλιμάκωση της διεργασίας με τελικό προϊόν στα 20 g. Οι ιδιότητες είναι ελαφρώς υποβαθμισμένες σε σχέση με τις μικρότερες κλίμακες, λόγω της μεγαλύτερης επίδρασης των φαινομένων μεταφοράς μάζας και θερμότητας στο σύστημα. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά τη μελέτη παρουσιάζουν, στην πλειοψηφία τους λευκή, στερεή και συμπαγή μορφολογία ενώ οι αποδόσεις διεργασίας είναι αρκετά υψηλές (94-97%). Το πείραμα το προϊόν του οποίου παρουσίασε τα βέλτιστα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες δεύτερου σταδίου 90°C, 20 mbar, 2 h. Συγκεκριμένα, το προϊόν παρουσίασε $\overline{M}_n = 1900 \pm 200 \text{ g/mol}$, $T_{m2} = 99 \pm 1^\circ\text{C}$, $x_c = 66 \pm 3\%$ (2^η θέρμανση), $T_{d5\%} = 284 \pm 45^\circ\text{C}$, $T_d = 384 \pm 1^\circ\text{C}$ και υπόλειμμα = 1,7 ± 0,4%.

Έπειτα, επιδιώχθηκε η αναβάθμιση των ιδιοτήτων αυτών μέσω μεταπολυμερισμού. Έγινε δοκιμή SSP σε δύο θερμοκρασίες με $T_m - T_r = 7$ και 2°C. Στην πρώτη θερμοκρασία (95°C) δεν κρίθηκε αποτελεσματική η διεργασία ενώ στη δεύτερη (100°C) το δείγμα μετέβη σε κατάσταση τήγματος μετά τις 2h. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς παρατηρήθηκε λόγω της συσσώρευσης αιθανόλης, ως παραπροϊόν της πολυσυμπύκωσης, γεγονός που οδήγησε σε μείωση του σημείου τήξης της αντιδρώσας μάζας. Και πάλι τα αποτελέσματα στις ιδιότητες, ειδικά στο μοριακό βάρος, δεν ήταν τα επιθυμητά. Έτσι, έγινε δοκιμή μεταπολυμερισμού τήγματος στους 110°C. Και πάλι τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά λόγω της περίσσειας υγρασίας που είχε το δείγμα, κάτι που φάνηκε από την ανάλυση DSC. Για τον λόγο αυτό προστέθηκε ένα στάδιο προθέρμανσης στη διεργασία μεταπολυμερισμού τήγματος σε χαμηλότερη θερμοκρασία (95°C) για την απομάκρυνση του νερού και την αύξηση της θερμοκρασίας τήξης. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά και σημειώθηκε **αύξηση στο \overline{M}_n κατά 75%**.

Με στόχο την διερεύνηση πιθανών εφαρμογών των προϊόντων στη νανοτεχνολογία και μελλοντικά την ενεργή συσκευασία τροφίμων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εγκλεισμού της δραστικής ουσίας ναρινγίνης με μήτρα το ενζυμικά συντεθειμένο PBS. Οι αποδόσεις εγκλεισμού ήταν ικανοποιητικές με ελάχιστη τιμή 47% και μέγιστη 72% και οι αποδόσεις διεργασίας αντίστοιχα υψηλές 67-82%. Αφού αριστοποιήθηκε η διεργασία ως προς την απομάκρυνση του PVA, πραγματοποιήθηκε σύγκριση ενζυμικά συντεθειμένης μήτρας PBS με αντίστοιχη από εμπορικό, χημικά συντεθειμένο PBS. Επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός νανοσφαιρών, με μέγεθος $388 \pm 52 \text{ nm}$ και $443 \pm 107 \text{ nm}$ για το ενζυμικά και το χημικά συντεθειμένο, αντίστοιχα. Η διαφορά στα μεγέθη αποδόθηκε στο σημαντικά μεγαλύτερο μοριακό βάρος του εμπορικού PBS. Ουσιαστικά οι μεγαλύτερες αλυσίδες του οδηγούν σε υψηλότερο ιξώδες διαλύματος κατά τη διαδικασία της γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη και, κατά συνέπεια, σε μεγαλύτερα νανοσωματίδια. Επιπλέον, από τα διαγράμματα FTIR και τις θερμικές ιδιότητες διαπιστώνεται ο επιτυχής εγκλεισμός και η προστασία της ναρινγίνης στα νανοσωματίδια. Εκτός αυτών, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτικό πείραμα αποδέσμευσης από όπου διαπιστώθηκε ότι τα ενζυμικά συντεθειμένα δείγματα απελευθερώνουν γρηγορότερα ναρινγίνη σε σχέση με τα χημικά συντεθειμένα, λόγω του μειωμένου μοριακού βάρους τους. Αυτό μπορεί να είναι επιθυμητό σε συγκεκριμένες εφαρμογές. Τέλος, η αριστοποιημένη διεργασία εγκλεισμού εφαρμόστηκε στο προϊόν του μεταπολυμερισμού και προέκυψαν νανοσωματίδια με **μέσο μέγεθος $495 \pm 50 \text{ nm}$, ζ-δυναμικό $-5,1 \pm 0,1 \text{ mV}$, απόδοση διεργασίας 63% και απόδοση εγκλεισμού 72%.**

Συνολικά, αποδεικνύεται η δυνατότητα εγκλεισμού σε ενζυμικό PBS με ικανοποιητικά αποτελέσματα, τόσο ανεξάρτητα όσο και σε σύγκριση με το εμπορικό PBS, με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

8.2. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Όσον αφορά τα στάδια του πολυμερισμού, θα μπορούσε ο συνδυασμός του ενζυμικού πολυμερισμού με τον πολυμερισμό στερεάς κατάστασης (SSP) και

μεταπολυμερισμού τήγματος να μελετηθεί περαιτέρω σε αρκετά επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα:

- Στον ενζυμικό προπολυμερισμό προτείνεται να υπάρξει περαιτέρω κλιμάκωση της διεργασίας.
- Επίσης προτείνεται να δοκιμαστούν και άλλα ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων και των μη εμπορικών.
- Η εφαρμογή μεταπολυμερισμού τήγματος μπορεί να γίνει σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες και χρόνους μέχρι να μην υποβαθμίζονται οι θερμικές του ιδιότητες.

Όσον αφορά τη δυνατότητα εγκλεισμού δραστικών ενώσεων στις πολυμερικές νανοσφαίρες ενζυμικού PBS, υπάρχουν αρκετές πιθανότητες διερεύνησης:

- Δύναται να γίνει μελέτη της σταθερότητας και της βιολογικής δράσης (αντιοξειδωτική, αντιπαρασιτική, αντικαρκινική, τοξικότητας) των νανοσωματιδίων που περιέχουν την εγκλεισμένη ουσία.
- Θα μπορούσε να μελετηθεί η επίδραση φόρτωσης δραστικής ένωσης στα χαρακτηριστικά των NPs, διαφορετικοί γαλακτωματοποιητές, χρόνοι υπερήχων και ταχύτητες φυγοκέντρησης.
- Για την ολοκλήρωση της μελέτης δύναται να γίνει μελέτη αποδέσμευσης για περισσότερες μέρες και διερεύνηση ως προς το προφίλ αποδέσμευσης που ακολουθείται, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.
- Επικείμενο στόχο αποτελεί η επικάλυψη των NPs με χιτοζάνη για την προστασία του μικρότερου μοριακού βάρους πολυμερούς.
- Τελευταίο κομμάτι αποτελεί η διαδικασία μεταφοράς από την εργαστηριακή κλίμακα σε πιλοτική κλίμακα και στη συνέχεια σε βιομηχανική κλίμακα (scale up) προκειμένου όλα τα προηγούμενα πειράματα να γνωρίσουν εμπορική εφαρμογή.

Παράρτημα πινάκων

Πίνακας Π 1 Θερμικές ιδιότητες των ενζυμικά συντεθειμένων προπολυμερών PBS από την ανάλυση DSC

Δείγμα	1 ^η θέρμανση		Ψύξη		2 ^η θέρμανση		x_c (%)
	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	
90_20_2	98	85	55	78	77 88 98	79	64
90_20_4	98	83	57	78	80 89 98	81	69
90_20_6	100	83	58	74	82 89 99	74	59

Πίνακας Π 2 Θερμικές ιδιότητες των ενζυμικά συντεθειμένων προπολυμερών PBS από την ανάλυση TGA

Δείγμα	$T_{d(5\%)}(°C)$	$T_d(°C)$	Υπόλειμμα (%)
90_20_2	315	384	1,4
90_20_4	291	382	4,4
90_20_6	312	382	1,6

Πίνακας Π 3 Θερμικές ιδιότητες 90_20_2 και επαναληπτικού πειράματος από την ανάλυση TGA

Δείγμα	$T_{d(5\%)}(°C)$	$T_d(°C)$	Υπόλειμμα (%)
90_20_2	315	384	1,4
επαναληπτικό	252	383	1,9

Πίνακας Π 4 Θερμικές ιδιότητες 90_20_2 και επαναληπτικού πειράματος από την ανάλυση DSC

Δείγμα	1 ^η Θέρμανση		Ψύξη		2 ^η Θέρμανση		x_c (%)
	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	
90_20_2	98	85	55	78	77 88 98	79	64
επαναληπτικό	100	95	57	84	83 92 99	85	68

Πίνακας Π 5 Θερμικές ιδιότητες εμπορικού PBS από την ανάλυση TGA

Δείγμα	$T_{d(5\%)}(°C)$	$T_d(°C)$	Υπόλειμμα (%)
Εμπορικό PBS (C)	333	387	1,84

Πίνακας Π 6 Θερμικές ιδιότητες εμπορικού PBS από την ανάλυση DSC

Δείγμα	1 ^η Θέρμανση		Ψύξη		2 ^η Θέρμανση		x_c (%)
	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	
Εμπορικό PBS (C)	115	81	83	78	109 115	78	64

Πίνακας Π 7 Θερμικές ιδιότητες πειράματος SSP από την ανάλυση TGA

Δείγμα	$T_{d(5\%)}(°C)$	$T_d(°C)$	Υπόλειμμα (%)
Αρχικό υλικό (90_20_2)	315	384	1,4
προκρυστάλλωση	294	379	1,47
S8-95	312	394	0,17

Πίνακας Π 8 Θερμικές ιδιότητες πειράματος SSP από την ανάλυση DSC

Δείγμα	1 ^η Θέρμανση		Ψύξη		2 ^η Θέρμανση		x_c (%)
	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	
Αρχικό υλικό (90_20_2)	98	85	55	78	77 88 98	79	64
προκρυστάλλωση	102	61	57	78	82 91 100	70	53
S8-95	104	47	49	68	82 89 100	73	56

Πίνακας Π 9 Θερμικές ιδιότητες πειράματος συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση TGA

Δείγμα	$T_{d(5\%)} (°C)$	$T_d (°C)$	Υπόλειμμα (%)
Αρχικό υλικό (90_20_2)	315	384	1,4
προκρυστάλλωση	294	379	1,47
S2_M2	282	380	6,73
S2_M4	295	381	0,92
S2_M6	298	379	2,81

Πίνακας Π 10 Θερμικές ιδιότητες πειράματος συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση DSC

Δείγμα	1 ^η Θέρμανση		Ψύξη		2 ^η Θέρμανση		x_c (%)
	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	
Αρχικό υλικό (90_20_2)	98	85	55	78	77 88 98	79	64
προκρυστάλλωση	102	61	57	78	100	70	53
S2_M2	103	71	61	79	87 102	77	64
S2_M4	110	67	59	75	87 103	66	50
S2_M6	106	62	60	67	86 93 102	64	50

Πίνακας Π 11 Θερμικές ιδιότητες πειράματος πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση TGA

Δείγμα	$T_{d(5\%)} (°C)$	$T_d (°C)$	Υπόλειμμα (%)
Αρχικό υλικό (90_20_2)	315	384	1,4
M4_110	275	394	1,2
M4_110- προθέρμανση	318	392	0,8

Πίνακας Π 12 Θερμικές ιδιότητες M4-110 PBS και επαναληπτικού πειράματος από την ανάλυση DSC

Δείγμα	1 ^η Θέρμανση		Ψύξη		2 ^η Θέρμανση		x_c (%)
	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	
Αρχικό υλικό (90_20_2)	98	85	55	78	77 88 98	79	64
M4_110	100	51	58	60	82 90 99	60	49
M4_110- προθέρμανση	104	59	57	56	87 94 104	60	47

Πίνακας Π 13 \overline{M}_n πειράματος συνδυασμού SSP και πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση GPC

Δείγμα	\overline{M}_n (g/mol)	PDI
Αρχικό υλικό (90_20_2)	1700	1,4
M4_110	2100	1,5
M4_110- προθέρμανση	3000	2,0

Πίνακας Π 14 Θερμικές ιδιότητες NPs από την ανάλυση DSC

Δείγμα	1 ^η θέρμανση		Ψύξη		2 ^η θέρμανση		$x_c(\%)$
	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	
Nar	116 160	39 40	-	-	-	-	-
PVA	191	32	-	-	-	-	-
mix PBS-NAR	101	52	45	45	82	50	42
	132	-			92		
	150	-			99		
C_Nar	115	55	73	38	114	42	34
C_Blank	114	81	77	53	106 114	59	45
E1_Nar	101	55	59	47	103	51	41
E1_Blank	100	80	63	50	102	51	39
E2_Nar	99	65	66	56	100	56	45
E2_Blank	101	74	61	63	102	62	50
M_Nar	88	68	64	56	90	59	45
	103				98		
					104		
M_Blank	104	74	66	68	91 105	73	56

Πίνακας Π 15 Θερμικές ιδιότητες πειράματος πολυμερισμού τήγματος από την ανάλυση TGA

Δείγμα	$T_{d(5\%)}(^{\circ}\text{C})$	$T_d(^{\circ}\text{C})$	Υπόλειμμα (%)
Nar	250	271	23,8
PVA	250	312 409	6,3
mix PBS-NAR	195	365	4,7
C_Nar	291	380	5,7
C_Blank	289	345 388	2,1
E1_Nar	281	337 352 389 434	6,8
E1_Blank	285	354 392 440	5,2
E2_Nar	293	391	8,0
E2_Blank	298	391	7,3
M_Nar	277	315 375	6,7
M_Blank	288	389	0,2