

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
Τομέας (I) Χημικών Επιστημών  
Εργαστήριο Οργανικής Χημείας



Μελέτη και βελτιστοποίηση της διεργασίας  
παρασκευής καινοτόμων υδρογελών φυσικών  
βαθέως ευτηκτικών διαλυτών - χιτοζάνης με  
ενσωματωμένο εκχύλισμα ελιάς

*Διπλωματική Εργασία*

**Ντιρογιάννη Αγγελική**

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Δέτση Αναστασία

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2022

NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS  
SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING  
DEPARTMENT (I): CHEMICAL SCIENCES  
ORGANIC CHEMISTRY LABORATORY



Study and optimization of the process for the  
preparation of innovative hydrogels of natural deep  
eutectic solvents - chitosan with integrated olive  
extract

*Diploma Thesis*

**by Ntirogianni Angeliki**

Supervisor:

Detsi Anastasia

Athens, September 2022

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. κ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021 – 2022.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω την κα Αναστασία Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον θέμα, το οποίο κατάφερε να με κρατήσει το ίδιο ενθουσιασμένη από την πρώτη έως και την τελευταία ημέρα. Η συμπαράσταση και η εμπιστοσύνη της καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου, αλλά και η ελευθερία που μου προσέφερε, ήταν καθοριστικές για την εξέλιξή μου. Φυσικά, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα Ιωάννα Πιττερού για την πολύτιμη βοήθειά της, τις ιδέες της και την καθοδήγησή της.

Με την παρούσα εργασία, κλείνει αυτός ο κύκλος της πενταετούς διάρκειας φοίτησής μου στη σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Τέλος, σίγουρα θέλω να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου σε όλη αυτή την πορεία και, πρώτα από όλα την οικογένειά μου που ήταν πλάι μου σε κάθε μου βήμα και με στήριζε καθημερινά. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, ακόμη, στα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., τους διδάκτορες, τους υποψήφιους διδάκτορες, καθώς και τους υπόλοιπους συμφοιτητές μου, οι οποίοι δημιούργησαν ένα υπέροχο κλίμα συνεργασίας και αλληλοβοήθειας σε όλη τη διάρκεια της παρουσίας μας στο εργαστήριο.

## Περίληψη

Δεδομένου ότι σήμερα η χημική βιομηχανία αναζητά μεθόδους και μέσα για το σχεδιασμό πράσινων τεχνολογιών και βιώσιμων προϊόντων, η παρούσα εργασία κινείται στους άξονες της Πράσινης Χημείας, με σκοπό την παρασκευή καινοτόμων υδρογελών φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών χιτοζάνης με ενσωματωμένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς, φιλικών προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον.

Ειδικότερα, στην παρούσα διπλωματική εργασία οι υδρογέλες χιτοζάνης (CS) που συντέθηκαν με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες ως μέσα διάλυσης και ως παράγοντες διασύνδεσης, αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν διατροφικά λιπίδια και νερό από τον οργανισμό, με απώτερο στόχο τη χρήση τους σε διατροφικά συμπληρώματα για τον έλεγχο του σωματικού βάρους. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα διόγκωσης, συγκράτησης νερού, καθώς και η ικανότητα απορρόφησης ελαίου, προκειμένου να εντοπιστούν οι βέλτιστες αναλογίες των μεταβλητών αυτών και να πραγματοποιηθεί πλήρης χαρακτηρισμός.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας, συντέθηκαν δύο φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES). Ο πρώτος αποτελούταν από χλωριούχο χολίνη (ChCl) και γαλακτικό οξύ (LA) σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2, ενώ ο δεύτερος συντέθηκε από γλυκόζη (Glu), γαλακτικό οξύ (LA) και νερό (W) σε γραμμομοριακή αναλογία 1:5:6.2. Μόνο το NaDES (ChCl:LA) χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των υδρογελών κατά τον πειραματικό σχεδιασμό. Ακολούθως, έγινε η βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής των υδρογελών, με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό (Design of Experiments – DoE) Box Benhken Design τριών παραγόντων, τριών επιπέδων ( $3^3$ ). Ως εξαρτημένες μεταβλητές ορίστηκαν η ικανότητα διόγκωσης (R1), η ικανότητα συγκράτησης νερού (R2) και η απορρόφηση ελαίου (R3), ενώ ως ανεξάρτητες μεταβλητές μελετήθηκε η περιεκτικότητα του διαλύματος ChCl:LA (%v/v), η περιεκτικότητα της περιεχόμενης χιτοζάνης στην τελική υδρογέλη (%w/v) και η περιεκτικότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα Tween 80 (%v/v). Οι εξαρτημένες μεταβλητές αποτέλεσαν τις αποκρίσεις και στόχο ήταν η συσχέτισή τους με τις ανεξάρτητες μεταβλητές και η βελτιστοποίησή τους. Για τη μελέτη της ικανότητας διόγκωσης και συγκράτησης νερού χρησιμοποιήθηκε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl) 0.1 N, pH 1.2 και θερμοκρασία 37°C, ενώ για την απορρόφηση ελαίου χρησιμοποιήθηκε ελαιόλαδο. Τελικά, η βέλτιστη σύσταση για την υδρογέλη που προέκυψε, η οποία, με βάση τη στατιστική μελέτη, έδινε ταυτόχρονα τις μέγιστες αποκρίσεις των εξαρτημένων μεταβλητών, αποτελούνταν από διάλυμα ChCl:LA περιεκτικότητας 7.00 %v/v, περιεκτικότητα χιτοζάνης στην τελική υδρογέλη 20.0 %w/v και περιεκτικότητα Tween 80 0.55 %v/v. Στη συνέχεια, μέσω φασματοσκοπίας υπεράυθρου (FT-IR), πραγματοποιήθηκε δομικός χαρακτηρισμός της υδρογέλης βέλτιστης σύστασης, καθώς επίσης και των διαλυμάτων διαφορετικών περιεκτικότητας ChCl:LA και φυσικού μίγματος (απλή ανάμιξη των επιμέρους συστατικών), προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση του νερού στη δομή των καθαρών διαλυτών, ενώ μετρήθηκε και η τιμή

pH για όλα τα διαλύματα, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της αραίωσης στην τιμή αυτή. Τέλος, η υδρογέλη βέλτιστης σύστασης που παρασκευάστηκε με διαλύτη και παράγοντα διασύνδεσης τόσο το φυσικό μίγμα όσο και το NaDES ChCl:LA αναλύθηκε μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, προκειμένου να διερευνηθεί η κρυσταλλική τους δομή.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση φύλλων ελιάς υποβοηθούμενη με υπερήχους, χρησιμοποιώντας ως εκχυλιστικά μέσα τους δύο βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες που παρασκευάστηκαν (ChCl:LA και Glu:LA:W). Οι υδρογέλες με τα ενσωματωμένα εκχυλίσματα (E/ChCl:LA και E/Glu:LA) αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα διόγκωσής τους, την ικανότητα συγκράτησης νερού, αλλά και την ικανότητα απορρόφησης ελαίου, έτσι ώστε να συγκριθούν με εκείνες που έχουν προκύψει με διαλύτη το καθαρό NaDES. Επιπλέον, τα E/ChCl:LA και E/Glu:LA αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, μέσω της μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH. Παρατηρήθηκε ότι υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει το E:ChCl/LA με τιμές  $IC_{50} = 24.8, 16.3$  και  $13.1$   $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος / mL διαλύματος στα 30, στα 60 και στα 90 min αντίστοιχα, ενώ το E:Glu/LA παρουσιάζει χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση με τιμές  $IC_{50} = 25.9, 19.6$  και  $16.7$   $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος / mL διαλύματος στους αντίστοιχους χρόνους. Τέλος, το E:ChCl/LA, καθώς και η υδρογέλη βέλτιστης σύστασης που παρασκευάστηκε με διαλύτη και παράγοντα διασύνδεσης το εκχύλισμα αξιολογήθηκαν ως προς την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH), με το E:ChCl/LA να παρουσιάζει ανασταλτική δράση με ποσοστό 77.2% και η υδρογέλη 69.0%.

**Επιστημονική περιοχή:** Πράσινη Χημεία, Φαρμακευτική Χημεία, Χημική Μηχανική

**Λέξεις κλειδιά:** χιτοζάνη, υδρογέλη, φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, χλωριούχος χολίνη, γαλακτικό οξύ, Tween 80, ικανότητα διόγκωσης, ικανότητα συγκράτησης νερού, απορρόφηση ελαίου, πειραματικός σχεδιασμός, εκχύλιση με υπερήχους, φύλλα ελιάς, αντιοξειδωτική δράση, DPPH, AAPH

## Abstract

Given that today the chemical industry is looking for methods and tools for the design of green technologies and sustainable products, this work moves along the lines of Green Chemistry, aiming at the preparation of innovative hydrogels of natural deep eutectic chitosan solvents with integrated olive leaf extract, friendly to humans and the environment.

In particular, in this thesis, chitosan hydrogels (CS) synthesized with deep eutectic solvents as dissolution media and as cross-linking agents were evaluated for their ability to adsorb dietary lipids and water from the body, with the ultimate aim of using them in dietary supplements for weight control. More specifically, the ability to swell, water retention, and oil absorption capacity were studied in order to identify the optimal proportions of these variables and to perform a complete characterisation.

Firstly, two natural deep eutectic solvents (NaDES) were synthesized. The first one consisted of choline chloride (ChCl) and lactic acid (LA) in a 1:2 linear ratio, while the second one was synthesized from glucose (Glu), lactic acid (LA) and water (W) in a linear ratio of 1:5:6.2. Only the first NaDES (ChCl:LA) was used to prepare the hydrogels in the experimental design. Subsequently, the optimization of the hydrogel preparation process was carried out based on the three-factor, three-level Benhken Design of Experiments (DoE) Box Benhken Design (33). The swelling ratio (R1), water retention ratio (R2) and oil absorption (R3) were defined as dependent variables, while the ChCl:LA solution content (%v/v), the content of chitosan content in the final hydrogel (%w/v) and the content of the surfactant Tween 80 (%v/v) were studied as independent variables. The dependent variables were the responses and the aim was to correlate them with the independent variables and to optimize them. A 0.1 N hydrochloric acid (HCl) solution, pH 1.2 and temperature 37°C was used to study the swelling and water retention capacity, while olive oil was used for oil absorption. Finally, the optimum composition for the resulting hydrogel, which, based on the statistical study, simultaneously gave the maximum responses of the dependent variables, consisted of ChCl:LA solution of 7.00 %v/v, chitosan content in the final hydrogel of 20.0 %w/v and Tween 80 content of 0.55 %v/v. As a result, structural characterization of the hydrogel of optimal composition, as well as of the solutions of different ChCl:LA contents and natural mixture (simple mixing of the individual components) was carried out by means of infrared spectroscopy (FT-IR), in order to determine the effect of water on the structure of the pure solvents, and the pH value was also measured for all solutions in order to study the effect of dilution on this value. Finally, the hydrogel of optimal composition prepared with both the natural mixture and NaDES ChCl:LA solvent and cross-linking agent was analyzed by X-ray crystallography to investigate their crystal structure.

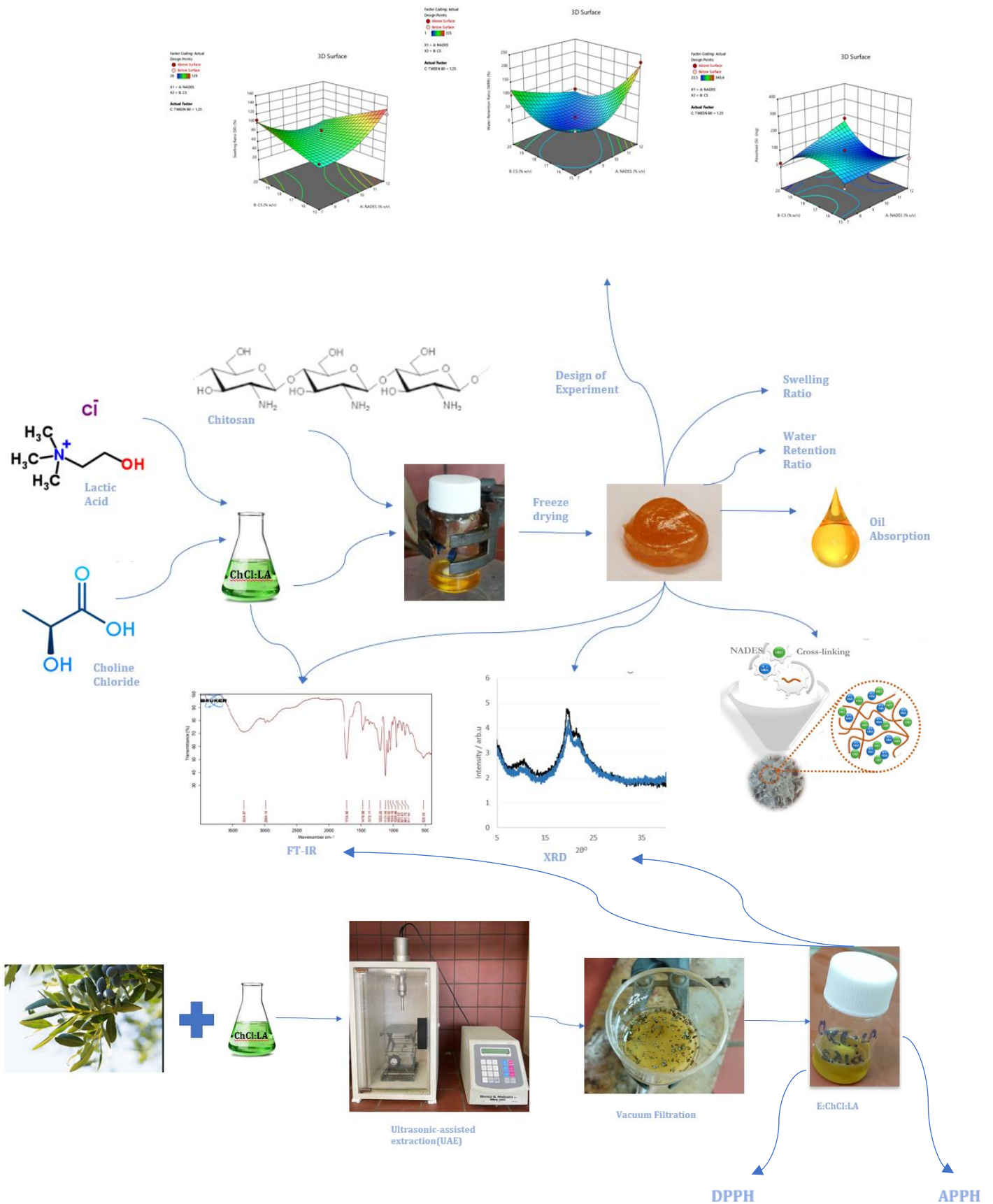
Secondly, ultrasound-assisted extraction of olive leaves was performed using as extractants the two deep eutectic solvents prepared (ChCl:LA and Glu:LA:W). The hydrogels with the incorporated extracts (E/ChCl:LA and E/Glu:LA) were evaluated in terms of their swelling ratio, water retention ratio and oil absorption

capacity, in order to compare them with those obtained with pure NaDES as solvent. In addition, E/ChCl:LA and E/Glu:LA were evaluated for their antioxidant activity by means of the DPPH radical binding capacity determination method. It was observed that E:ChCl/LA exhibited higher antioxidant activity with IC<sub>50</sub> values = 24.8, 16.3 and 13.1 µg of extract/mL of solution at 30, 60 and 90 min respectively, while E:Glu/LA exhibited lower antioxidant activity with IC<sub>50</sub> values = 25.9, 19.6 and 16.7 µg of extract/mL of solution at the respective times. Finally, E:ChCl/LA, as well as the hydrogel of optimal composition prepared with solvent and cross-linking agent extract were evaluated for the inhibition of lipid peroxidation (AAPH), with E:ChCl/LA showing an inhibitory activity of 77.2% and hydrogel 69.0%.

**Scientific area:** green chemistry, pharmaceutical chemistry, chemical engineering

**Keywords:** chitosan, hydrogel, natural deep eutectic solvents, choline chloride, lactic acid, Tween 80, swelling ratio, water retention ratio, oil absorption, experimental design, ultrasonic extraction, olive leaves, antioxidant activity, DPPH, AAPH

# Graphical Abstract





## Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	1
Περίληψη.....	2
Abstract.....	4
Graphical Abstract .....	6
Ευρετήριο εικόνων.....	10
Ευρετήριο πινάκων.....	13
Πίνακας Συντομογραφιών .....	15
1. Εισαγωγή.....	16
1.1. Πράσινη Χημεία.....	16
1.1.1. Εισαγωγή στην Πράσινη Χημεία.....	16
1.1.2. Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES).....	17
1.1.3. Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES) .....	19
1.1.4. Φυσικοχημικές Ιδιότητες των DES και των NaDES.....	22
1.1.5. Πλεονεκτήματα NaDES.....	23
1.1.6. Εφαρμογές των DES και NaDES.....	24
1.1.7. Μέθοδοι παρασκευής NaDES .....	25
1.1.8. Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Therapeutic Deep Eutectic Solvents, THEDES) .....	25
1.2. Σχηματισμός υδρογελών	
1.3. Χιτοζάνη (Chitosan, CS).....	26
1.3.1. Συμβολή της χιτοζάνης στην παχυσαρκία .....	29
1.3.2. Υδρογέλες χιτοζάνης (Hydrogels of chitosan).....	32
1.3.2.1. Ιδιότητες υδρογελών χιτοζάνης.....	34
1.3.2.2. Εφαρμογές υδρογελών χιτοζάνης .....	35
1.3.3. Υδρογέλες χιτοζάνης με Φυσικούς Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες (NaDES) .....	36
1.3.3.1. Προσθήκη επιφανειοδραστικού παράγοντα (Tween 80) στις υδρογέλες χιτοζάνης .....	37
1.4. Φύλλα ελιάς και βιοδραστικές ουσίες.....	38
1.4.1. Βιοδραστικές ουσίες: προέλευση και χρήση.....	38
1.4.2. Αξιοποίηση φύλλων ελιάς .....	39
1.4.3. Χημική σύσταση φύλλων ελιάς.....	39
1.4.4. Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς.....	41

1.4.5.	Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών .....	41
1.4.6.	Εκχύλιση με υπερήχους (UAE) .....	43
1.4.7.	Εκχύλιση με υπερήχους (UAE) και φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES).....	44
1.5.	Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE) .....	45
1.5.1.	Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) .....	45
1.5.2.	Πειραματικός Σχεδιασμός Box-Behnken .....	46
2.	Πειραματικό Μέρος.....	47
2.1.	Σκοπός .....	47
2.2.	Όργανα, συσκευές και αντιδραστήρια.....	49
2.3.	Διαδικασία παρασκευής φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES) .....	50
2.4.	Παρασκευή υδρογελών χιτοζάνης.....	53
2.4.1.	Προκαταρκτικά πειράματα .....	53
2.4.2.	Πειραματικός Σχεδιασμός – Design of Experiments (DoE).....	55
2.4.3.	Προσδιορισμός της βέλτιστης υδρογέλης.....	57
2.5.	Χαρακτηρισμός υδρογελών.....	58
2.5.1.	Προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης – Swelling Ratio (SR).....	58
2.5.2.	Προσδιορισμός ικανότητας συγκράτησης του νερού – Water Retention Ratio (WRR) .....	59
2.5.3.	Προσδιορισμός ικανότητας απορρόφησης ελαίου – Oil Absorption .60	
2.6.	Δομικός χαρακτηρισμός υδρογελών και διαλυμάτων NaDES .....	60
2.6.1.	Φασματοσκοπία υπέρυθρου FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy FT-IR).....	60
2.6.2.	Κρυσταλλογραφία ακτίνων X (X-ray crystallography / XRD) .....	61
2.7.	Εκχύλιση φύλλων ελιάς με NaDES και υπερήχους.....	62
2.7.1.	Προετοιμασία φύλλων ελιάς (πρώτη ύλη) .....	62
2.7.2.	Διεργασία εκχύλισης φύλλων ελιάς υποβοηθούμενη με υπερήχους .63	
2.7.3.	Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH .....	64
2.7.4.	Προσδιορισμός της αναγωγής των θερμικών ελευθέρων ριζών (AAPH) – Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης .....	68
3.	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	70
3.1.	Πειραματικός Σχεδιασμός.....	70
3.1.1.	Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων .....	70

3.1.2. Βελτιστοποίηση του μοντέλου – Βελτιστοποίηση της σύστασης .....	79
3.1.3. Αξιολόγηση των αποκρίσεων της υδρογέλης με τη βέλτιστη σύσταση .....	88
3.1.4. Επιβεβαίωση του μοντέλου (Confirmation) .....	95
3.2. Χαρακτηρισμός φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (ChCl:LA) και του εκχυλίσματός του (E/ChCl:LA) μέσω φασματομετρίας υπερύθρου (FT-IR) .....	96
3.3. Χαρακτηρισμός του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη και των διαλυμάτων του (ChCl:LA) μέσω φασματομετρίας υπερύθρου (FT-IR) ...	98
3.4. Χαρακτηρισμός υδρογελών βέλτιστης σύστασης μέσω φασματομετρίας υπερύθρου (FT-IR) .....	101
3.5. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH .....	104
3.6. Αξιολόγηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH) .....	106
3.7. Ανάλυση υδρογελών με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (wide angle X-ray diffraction / WAXD) .....	107
4. Συμπεράσματα.....	111
5. Μελλοντικές προτάσεις.....	115
Συμμετοχή σε διεθνή συνέδρια .....	117
Βιβλιογραφία.....	118
Παράρτημα.....	129

## Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1-1. Οι Δώδεκα αρχές της πράσινης χημείας .....	17
Εικόνα 1-2. Δομές δοτών δεσμών υδρογόνου (HBD).....	18
Εικόνα 1-3. Δομές δεκτών δεσμών υδρογόνου (HBA).....	18
Εικόνα 1-4. : Σχηματική απεικόνιση της διαφοράς μεταξύ α) «ευτηκτικού διαλύτη» α) και «βαθέως ευτηκτικού διαλύτη» σε διάγραμμα δύο φάσεων .....	18
Εικόνα 1-5. Απεικόνιση ευτηκτογένεσης σε μοριακό επίπεδο .....	19
Εικόνα 1-6. Σχηματισμός υδρογέλης με χρήση NaDES ως παράγοντα διασύνδεσης (crosslinker) .....	20
Εικόνα 1-7. Συνηθέστεροι HBD και HBA σε NaDES .....	21
Εικόνα 1-8. Κύριοι τομείς εφαρμογών DES.....	24
Εικόνα 1-9. Σχηματική αναπαράσταση κατασκευής της υδρογέλης και της διόγκωσής της στο νερό.....	27
Εικόνα 1-10. Απόκριση ερεθισμάτων σε υδρογέλη που διογκώνεται.....	28
Εικόνα 1-11. Απακετυλιωμένο και μη απακετυλιωμένο πολυμερές.....	30
Εικόνα 1-12. Παραδείγματα προέλευσης χιτίνης και χιτοζάνης.....	31
Εικόνα 1-13. Τομείς εφαρμογής χιτοζάνης και παραγώγων αυτής .....	31
Εικόνα 1-14. Σχηματική απεικόνιση της αναστολής της πέψης του λίπους χάρη στη χιτοζάνη .....	33
Εικόνα 1-15. Καθαρό διάλυμα Tween 80 .....	37
Εικόνα 1-16. Χημικές δομές φαινολικών ενώσεων σε εκχύλισμα φύλλων ελιάς.40	
Εικόνα 2-1. Πειραματική διάταξη παρασκευής NaDES με ελεγχόμενη θέρμανση, κάθετο ψυκτήρα και μαγνητική ανάδευση.....	51
Εικόνα 2-2. Σύνθεση NaDES χλωριούχου χολίνης – γαλακτικού οξέος.....	52
Εικόνα 2-3. Πειραματική διάταξη παρασκευής υδρογέλης χιτοζάνης με NaDES.55	
Εικόνα 2-4. Ξηρή και διογκωμένη υδρογέλη πριν και μετά τον προσδιορισμό της ικανότητας διόγκωσής της .....	59
Εικόνα 2-5. Τυπικό φάσμα FT-IR .....	61
Εικόνα 2-6. Συσκευή εκχύλισης με υπερήχους .....	63
Εικόνα 2-7. Διήθηση υπό κενό εκχυλίσματος NaDES.....	64
Εικόνα 2-8. Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH• ) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) .....	65
Εικόνα 2-9. Πλακίδιο 96 θέσεων με τα δείγματα που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική δράση .....	67
Εικόνα 2-10. Χημική δομή του εκκινητή ελευθέρων ριζών 2,2'-αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)διϋδροχλώριο (AAPH) .....	69

Εικόνα 3-1. Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της ικανότητας διόγκωσης.....	72
Εικόνα 3-2. Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της ικανότητας συγκράτησης νερού .....	75
Εικόνα 3-3. Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών του απορροφούμενου ελαίου.....	78
Εικόνα 3-4. Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών σύνθεσης υδρογελών και αναμενόμενες αποκρίσεις.....	80
Εικόνα 3-5. 3D επιφάνεια του SR (%) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για το βέλτιστο C.....	81
Εικόνα 3-6. 3D επιφάνεια του SR (%) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για το βέλτιστο B.....	82
Εικόνα 3-7. 3D επιφάνεια του WRR (%) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για βέλτιστο C.....	83
Εικόνα 3-8. 3D επιφάνεια του WRR (%) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για βέλτιστο B.....	84
Εικόνα 3-9. 3D επιφάνεια του WRR (%) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για βέλτιστο A.....	85
Εικόνα 3-10. 3D επιφάνεια του Absorbed Oil (mg) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για βέλτιστο C.....	86
Εικόνα 3-11. 3D επιφάνεια του Absorbed Oil (mg) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για βέλτιστο B.....	87
Εικόνα 3-12. 3D επιφάνεια του Absorbed Oil (mg) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για βέλτιστο A.....	88
Εικόνα 3-13. Ποσοστό διόγκωσης της υδρογέλης με τη βέλτιστη σύσταση συναρτήσει του χρόνου.....	89
Εικόνα 3-14. Ποσοστό συγκράτησης νερού της υδρογέλης με τη βέλτιστη σύσταση σε συνάρτηση με το χρόνο.....	90
Εικόνα 3-15. Ποσοστό διόγκωσης των υδρογελών με τη βέλτιστη σύσταση και με διαλύτη το εκχύλισμα E:ChCl/LA συναρτήσει του χρόνου .....	91
Εικόνα 3-16. Ποσοστό συγκράτησης νερού των υδρογελών με τη βέλτιστη σύσταση με το E:ChCl/LA συναρτήσει του χρόνου .....	92
Εικόνα 3-17. Ποσοστό διόγκωσης της υδρογέλης με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους περιεκτικότητας 10 % w/v σε συνάρτηση με το χρόνο .....	93
Εικόνα 3-18. Ποσοστό συγκράτησης νερού υδρογέλης με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους περιεκτικότητας 10 % w/v συναρτήσει του χρόνου .....	94
Εικόνα 3-19. Φάσμα FT-IR του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη ChCl:LA ..	96
Εικόνα 3-20. Χημική δομή χλωριούχου χολίνης και γαλακτικού οξέος .....	97
Εικόνα 3-21. Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/ChCl:LA .....	98

Εικόνα 3-22. Υδρογέλη χιτοζάνης με διαλύτη NaDES ChCl:LA στις βέλτιστες συνθήκες (20 %w/v CS, 7 %v/v NaDES, 0.55 %v/v Tween80) .....	102
Εικόνα 3-23. Υδρογέλη χιτοζάνης με διαλύτη φυσικό μίγμα ChCl:LA στις βέλτιστες συνθήκες (20 %w/v CS, 7 %v/v ΦΜ, 0.55 %v/v Tween80) .....	102
Εικόνα 3-24. Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH από τα εκχυλίσματα, χρησιμοποιώντας ως ένωση αναφοράς τα NaDES ChCl:LA και Glu:LA .....	105
Εικόνα 3-25. Διάγραμμα % αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των εξεταζόμενων δειγμάτων που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκέντρωση 1 μL εκχυλίσματος/100μL .....	106
Εικόνα 3-26. Διάγραμμα % αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των δειγμάτων αναφοράς σε συγκέντρωση 100μM .....	107
Εικόνα 3-27. WAXD αποτύπωμα της υδρογέλης με NaDES (μαύρη γραμμή) και της υδρογέλης με φυσικό μίγμα (μπλε γραμμή) .....	108
Εικόνα 3-28. WAXD αποτύπωμα της υδρογέλης με διάλυμα NaDES 10 % v/v .	110

## Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1. Εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας .....	49
Πίνακας 2. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία .....	49
Πίνακας 3. Συστατικά και συνθήκες παρασκευής NaDES με θέρμανση και ανάδευση.....	51
Πίνακας 4. Χημικές δομές NaDES.....	52
Πίνακας 5. Ποσότητες επιμέρους συστατικών για την παρασκευή των NaDES..	52
Πίνακας 6. Παράμετροι και αποκρίσεις που εξετάζονται κατά τον πειραματικό προσδιορισμό .....	56
Πίνακας 7. Όρια ανεξάρτητων μεταβλητών .....	56
Πίνακας 8. Τιμές παραμέτρων των προτεινόμενων πειραμάτων .....	56
Πίνακας 9. Αποκρίσεις των 14 πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού.....	57
Πίνακας 10. Τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών για τη βέλτιστη υδρογέλη .....	57
Πίνακας 11. Υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθερής ρίζας DPPH .....	66
Πίνακας 12. Υλικά και όργανα για τον προσδιορισμό της αναγωγής των θερμικών ελευθέρων ριζών (AAPH).....	69
Πίνακας 13. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την ικανότητα διόγκωσης .....	71
Πίνακας 14. Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την ικανότητα διόγκωσης .....	72
Πίνακας 15. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την ικανότητα συγκράτησης νερού .....	74
Πίνακας 16. Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την ικανότητα συγκράτησης νερού .....	75
Πίνακας 17. Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την απορρόφηση ελαίου .....	76
Πίνακας 18. Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει το απορροφούμενο έλαιο.....	77
Πίνακας 19. Όρια τιμών εξαρτημένων και ανεξάρτητων μεταβλητών για την εύρεση της βέλτιστης σύστασης της υδρογέλης.....	79
Πίνακας 20. Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της σύστασης της υδρογέλης .....	80
Πίνακας 21. Αποτελέσματα απορρόφησης ελαίου από τη βέλτιστη υδρογέλη ..	90
Πίνακας 22. Αποτελέσματα απορρόφησης ελαίου από τις υδρογέλες με διαλύτη το εκχύλισμα E:ChCl/LA .....	92

Πίνακας 23. Αποτελέσματα απορρόφησης ελαίου από την υδρογέλη με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους.....	94
Πίνακας 24. Αποτελέσματα επαναληπτικών πειραμάτων για την επιβεβαίωση του μοντέλου .....	95
Πίνακας 25. Εύρη αποκρίσεων για τις ανεξάρτητες μεταβλητές του πειραματικού σχεδιασμού .....	95
Πίνακας 26. Σημαντικές κορυφές των διαλυμάτων NaDES και φυσικών μιγμάτων που μελετήθηκαν και οι τιμές pH τους.....	100
Πίνακας 27. Αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων που μελετήθηκαν [IC50 (μg/mL)].....	104
Πίνακας 28. Αντιοξειδωτική δράση ορισμένων ενώσεων αναφοράς [IC50 (μg/mL)].....	104
Πίνακας 29. Τιμές εντάσεων και γωνιών για την υδρογέλη με NaDES .....	109
Πίνακας 30. Τιμές εντάσεων και γωνιών για την υδρογέλη με φυσικό μίγμα ...	109
Πίνακας 31. Τιμές εντάσεων και γωνιών για την υδρογέλη με διάλυμα NaDES 10% v/v .....	110
Πίνακας 32. Αποκρίσεις για βέλτιστη σύσταση υδρογέλης NaDES, υδρογέλης με E:ChCl/LA και υδρογέλης με χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους .....	112
Πίνακας 33. Τιμές εντάσεων και γωνιών για όλες τις υδρογέλες που μελετήθηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X .....	114



## Πίνακας Συντομογραφιών

### Συντομογραφίες

<b>ChCl</b>	Χλωριούχος χολίνη
<b>LA</b>	Γαλακτικό οξύ
<b>Glu</b>	Γλυκόζη
<b>CS</b>	Χιτοζάνη
<b>FT-IR</b>	Φασματοσκοπία υπερώθρου
<b>NaDES</b>	Φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης
<b>Tween80</b>	Πολυσορβικό 80
<b>E:ChCl/LA</b>	Εκχύλισμα φύλλων ελιάς με διαλύτη το NaDES ChCl/LA
<b>UV-Vis</b>	Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού
<b>DES</b>	Βαθέως ευτηκτικός διαλύτης
<b>TheDES</b>	Θεραπευτικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης
<b>SR</b>	Ικανότητα διόγκωσης (Swelling Ratio)
<b>WRR</b>	Ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Retention Ratio)
<b>RSM</b>	Μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης
<b>HBA</b>	Δότης Δεσμού Υδρογόνου
<b>HBD</b>	Δέκτης Δεσμού Υδρογόνου
<b>VOCs</b>	Πτητικές Οργανικές Ενώσεις
<b>Glu:LA:W</b>	NaDES γλυκόζη, γαλακτικό οξύ και νερό
<b>ChCl:LA</b>	NaDES χλωριούχου χολίνης – γαλακτικού οξέος
<b>ChCl:CA</b>	NaDES χλωριούχου χολίνης – κιτρικού οξέος

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Πράσινη Χημεία

### 1.1.1. Εισαγωγή στην Πράσινη Χημεία

Η πράσινη χημεία περιλαμβάνει το σχεδιασμό χημικών προϊόντων και διεργασιών, με σκοπό τη μείωση ή την εξάλειψη της χρήσης και παραγωγής επικίνδυνων ουσιών. Ο ορισμός και η ιδέα της πράσινης χημείας προέκυψε στις αρχές του 1990. Πλέον, η χρήση της αντικατοπτρίζεται σε πολλούς βιομηχανικούς κλάδους και δεν περιορίζεται μόνο σε εργαστηριακό επίπεδο, με την αυτοκινητοβιομηχανία, τη φαρμακοβιομηχανία, τη γεωργία και την ενέργεια να αποτελούν μερικούς από αυτούς. Έτσι, έχει αποδειχτεί ο τρόπος να σχεδιαστούν προϊόντα και διεργασίες επόμενης γενιάς, ώστε να είναι κερδοφόρες και ταυτόχρονα όχι επιζήμιες για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. [1]

Τα χημικά προϊόντα που αναπτύσσονται, σχεδιάζονται και εφαρμόζονται με βάση την πράσινη χημεία έχουν ως στόχο την ελαχιστοποίηση των αποβλήτων, την ελαχιστοποίηση ή ακόμα και την εξάλειψη της χρήσης και της παραγωγής επικίνδυνων ουσιών και, τέλος, τη βέλτιστη αξιοποίηση των ενεργειακών πόρων. Ταυτόχρονα, σε βιομηχανική κλίμακα, τα προϊόντα αυτά πρέπει να μπορούν να παρασκευαστούν, έχοντας οικονομικό συμφέρον, αλλά και να ελαχιστοποιούν τη ρύπανση και τον κίνδυνο για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Για αυτό το λόγο, όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας εστιάζουν στη χρήση διαλυτών και καταλυτών φιλικών προς το περιβάλλον, αποκαλούμενοι και ως «πράσινοι» διαλύτες και καταλύτες, αλλά και «πράσινες» ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. [1]

Οι «Δώδεκα Αρχές της Πράσινης Χημείας», όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 1-1 [2], στοχεύουν στην υιοθέτηση μεθόδων που μειώνουν ή εξαλείφουν τους κινδύνους που προκύπτουν μέσα από τη διαχείριση των χημικών διαδικασιών. Συνοπτικά, περιλαμβάνουν την πρόληψη της παραγωγής αποβλήτων, την οικονομία ατόμων, τη χρήση λιγότερο επικίνδυνων συνθετικών μεθοδολογιών, το σχεδιασμό ασφαλέστερων χημικών προϊόντων, τη χρήση ασφαλέστερων διαλυτών και αντιδραστηρίων, το σχεδιασμό ενεργειακά αποδοτικών χημικών διεργασιών, τη χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών, την ελαχιστοποίηση χημικών τροποποιήσεων, τη χρήση εκλεκτικών διαλυτών, το σχεδιασμό για αποικοδόμηση των χημικών προϊόντων, την ανάλυση ρύπων σε πραγματικό χρόνο και, τέλος, την πρόληψη ατυχημάτων μέσω σχεδιασμού ασφαλέστερων χημικών διεργασιών. [3]



Εικόνα 1-1: Οι Δώδεκα αρχές της πράσινης χημείας

Η έρευνα μέσω της πράσινης χημείας επικεντρώνεται, κυρίως, στην ανάπτυξη νέων καταλυτών, στη διερεύνηση νέων διαλυτών, με τα ιοντικά υγρά και τους βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες να είναι αυτά που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, αλλά και στη δοκιμή εναλλακτικών μηχανισμών για διάφορες διεργασίες. Ο κλάδος θεωρείται διεπιστημονικός και αφορά στη χημεία, στη χημική μηχανική, στην τοξικολογία και στην οικολογία. [3]

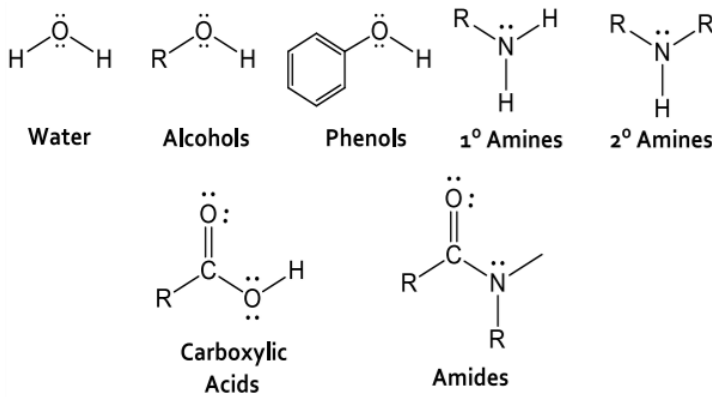
### 1.1.2. Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES)

Η ανάγκη για αντικατάσταση των υπάρχοντων συμβατικών οργανικών διαλυτών από καινούριους πιο φιλικούς προς το περιβάλλον είναι επιτακτική. Έτσι, ανακαλυφθήκαν τα ιοντικά υγρά, τα οποία, ωστόσο, εμφανίζουν τοξικότητα και υψηλό κόστος. Για αυτό το λόγο, αναγκαία ήταν η εύρεση νέων ακόμη πιο πράσινων διαλυτών. Το 2002 ανακαλύφθηκαν διαλύτες ικανοί να αντικαταστήσουν τα ιοντικά υγρά, χάρη στις παρόμοιες ιδιότητές τους και της «πράσινης» φύσης τους, οι οποίες αποκαλούνται σήμερα ως Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES). [4]

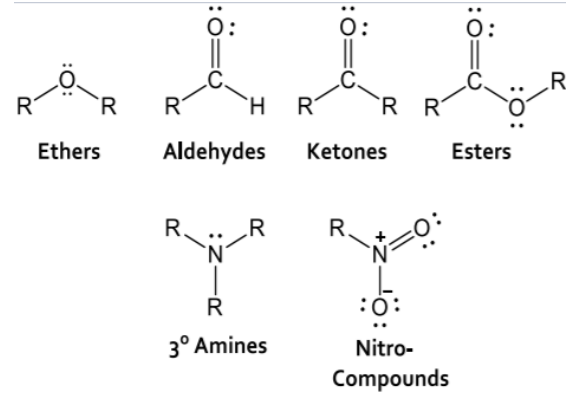
Οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες αποτελούν μίγματα τουλάχιστον δύο συστατικών, στερεών ή υγρών, από τα οποία, το ένα είναι δέκτης δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor-HBA) και το άλλο είναι δότης δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor-HBD). Τα δύο συστατικά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε συγκεκριμένη μοριακή αναλογία λόγω ανάπτυξης διαμοριακών

δεσμών υδρογόνου, οδηγώντας σε μίγμα με σημαντικά μικρότερο σημείο τήξης από αυτό του κάθε συστατικού ξεχωριστά ( $\Delta T=100-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), δημιουργώντας μία νέα ευτηκτική φάση (ευτεκτογένεση) και καθιστώντας τα υγρά σε θερμοκρασία δωματίου. [5]

Οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως δότες και ως δέκτες δεσμών υδρογόνου παρουσιάζονται στις εικόνες 1-2 και 1-3 αντίστοιχα.

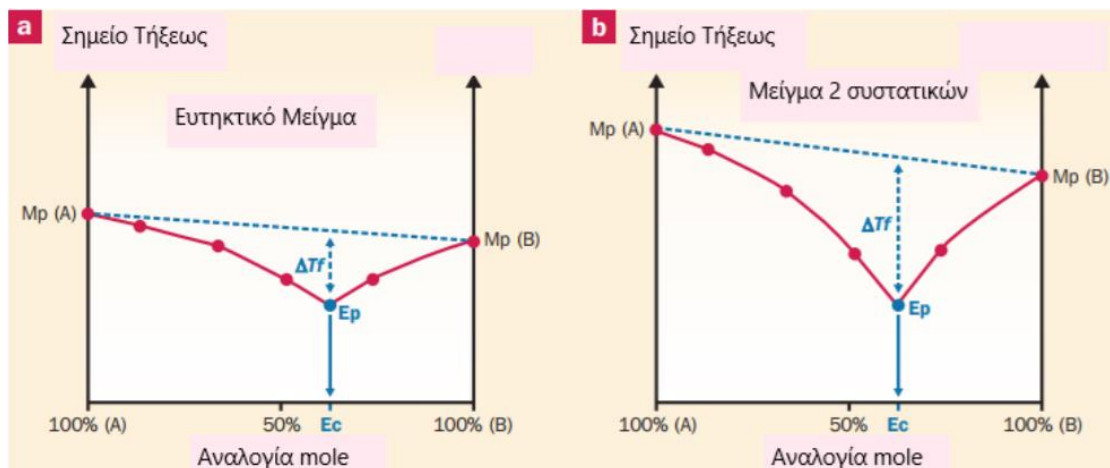


Εικόνα 1-2: Δομές δοτών δεσμών υδρογόνου (HBD)



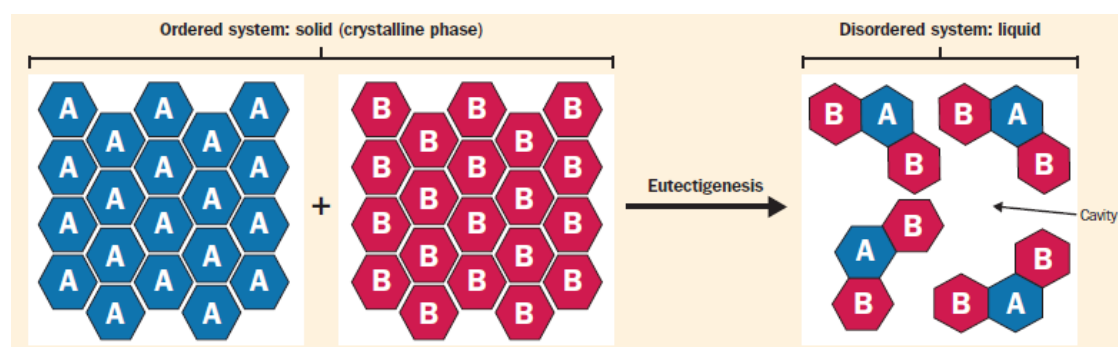
Εικόνα 1-3: Δομές δεκτών δεσμών υδρογόνου (HBA)

Ο όρος «βαθέως» έχει προστεθεί, καθώς, συγκριτικά με άλλα ευτηκτικά μίγματα, η απόκλιση του σημείου τήξης ενός DES από τα συστατικά του μπορεί να είναι  $100-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , όπως προαναφέρθηκε (εικόνα 1-4). Στην ευτηκτική αναλογία, το μίγμα είναι ομογενές υγρό που χαρακτηρίζεται από υπερμοριακή δομή και τα συστατικά του αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις, κυρίως δεσμούς υδρογόνου. Τελικά, από τους παραπάνω συνδυασμούς προκύπτουν διαυγή, ιξώδη ρευστά, η σταθερότητα και το ιξώδες των οποίων εξαρτάται από την αναλογία των επιμέρους συστατικών. [4]



Εικόνα 1-4: Σχηματική απεικόνιση της διαφοράς μεταξύ α) «ευτηκτικού διαλύτη» α) και «βαθέως ευτηκτικού διαλύτη» σε διάγραμμα δύο φάσεων, όπου  $M_p$ : σημείο τήξης,  $\Delta T_f$ : πτώση σημείου τήξης,  $E_c$ : ευτηκτική σύσταση και  $E_p$ : ευτηκτικό σημείο [4]

Σε αντίθεση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι συνήθως έχουν ομοιογενές σύστημα δεσμών υδρογόνου, στα DES σχηματίζονται «πακέτα», ώστε να μεγιστοποιείται το δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ των διαφορετικών χημικών ενώσεων που αποτελούν τα συστατικά του DES. Τελικά, σχηματίζεται ένα περίπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων που είναι αποτέλεσμα της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ όλων των δυνάμεων που συμμετέχουν, δημιουργώντας έναν αυξημένο κενό όγκο, αφού τα μοριακά δίκτυα των επιμέρους συστατικών του διαταράσσονται. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1-5, το ένα συστατικό του DES, έστω στερεό A, παρουσιάζει πολύ συμπαγή δομή με ελάχιστο κενό χώρο μεταξύ των μορίων. Αν όμως αλληλεπιδράσει με δεσμούς υδρογόνου με άλλο συστατικό, έστω B, δημιουργώντας ένα ευτηκτικό μίγμα, το κρυσταλλικό του πλέγμα διαταράσσεται. Έτσι, οι κοιλότητες μεταξύ των μορίων είναι περισσότερες, επιτρέποντας τη διάχυσή τους εντός του συστήματος, ενώ το τελικό μίγμα βρίσκεται στην υγρή φάση. [4]

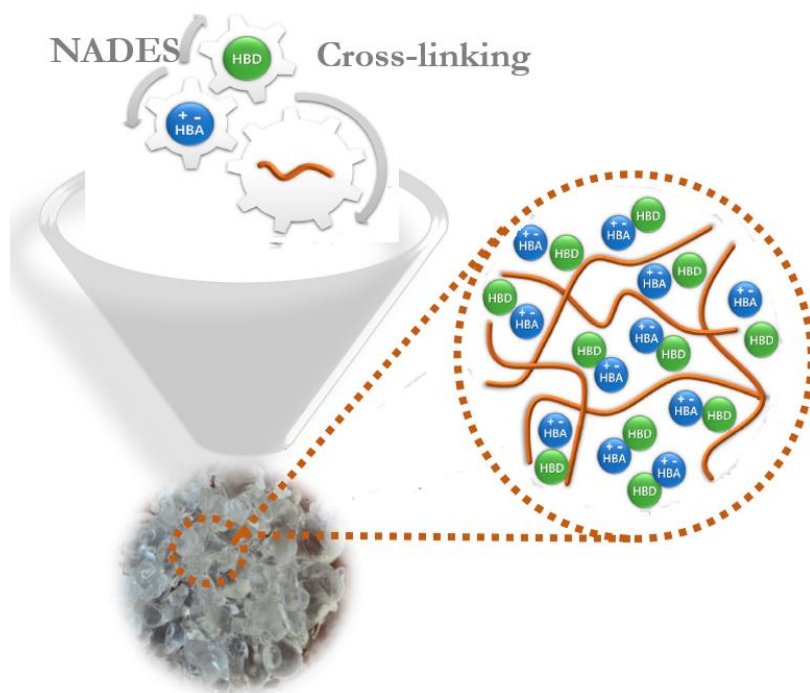


Εικόνα 1-5: Απεικόνιση ευτηκτογένεσης σε μοριακό επίπεδο [4]

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

Το 2011 οι Choi et al. προσπαθώντας να ερμηνεύσουν την παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών (όπως γλυκόζη, αμινοξέα, πολυόλες και τεταρτοταγή άλατα αμμωνίου) σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις από φυτά σε συνθήκες ξηρασίας ή ακραίων θερμοκρασιών, πρότειναν τη δημιουργία από το φυτό μιας νέας τάξης DES, τους φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες. Υπέθεσαν ότι τα κυτταρικά τοιχώματα που παράγονται σε περίσσεια σε αυτές τις συνθήκες, σχηματίζουν NaDES εντός του κυττάρου και δημιουργούν ένα εναλλακτικό ως προς το νερό μέσο για τη διατήρηση της λειτουργίας των ενδοκυτταρικών βιοχημικών αντιδράσεων, αλλά και τη διαλυτοποίηση, αποθήκευση και μετακίνηση μη υδατοδιαλυτών δευτερογενών μεταβολιτών (όπως τα φαινολικά παράγωγα, τα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες). Εκτός αυτού, το δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζουν τα NaDES συγκρατεί ελάχιστα μόρια νερού που υπάρχουν εντός του κυττάρου, ενώ το χαμηλό ευτηκτικό σημείο αποτρέπει το πάγωμα των κυτταρικών μεμβρανών. Επομένως,

ο πρωταρχικός ρόλος των NaDES στα φυτικά κύτταρα ήταν η διαλυτοποίηση δυσδιάλυτων συστατικών σε αυτά, εφόσον έχουν υψηλές ικανότητες διάλυσης βιοδραστικών μορίων. [4], [6]



Εικόνα 1-6: Σχηματισμός υδρογέλης με χρήση NaDES ως παράγοντα διασύνδεσης (crosslinker)

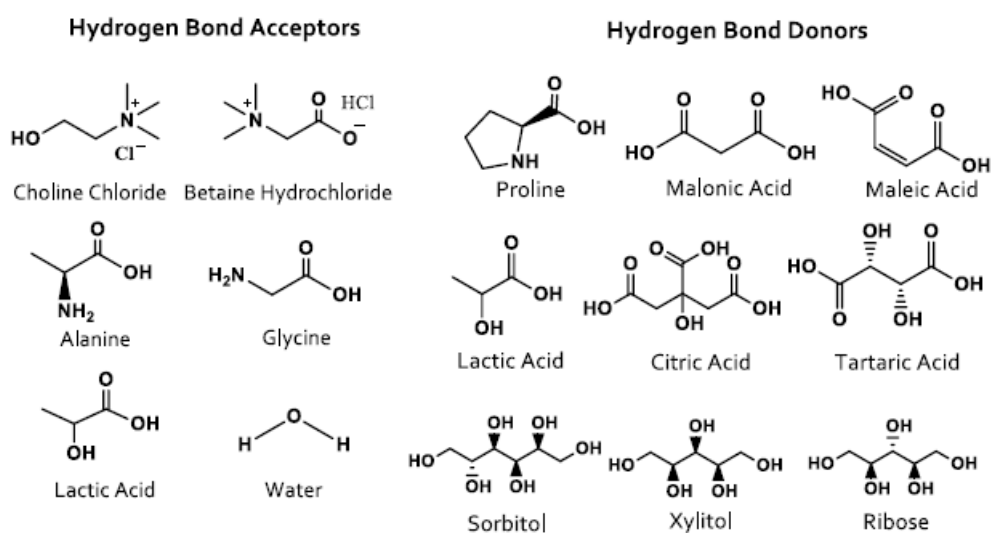
Τελικά, τα NaDESs απαρτίζονται κυρίως από φυσικά συστατικά όπως οργανικά οξέα, βάσεις, σάκχαρα και πολυαλκοόλες. Με τον τρόπο αυτό έχει αυξηθεί σημαντικά ο αριθμός των υποψήφιων DES και έχουν επεκταθεί οι εφαρμογές τους σε διάφορους κλάδους. Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν μία άφθονη και ιδανική πηγή DES λόγω της τεράστιας χημικής ποικιλομορφίας τους, της ιδιότητάς τους να βιοδιασπώνται και του φαρμακευτικού αποδεκτού προφίλ τοξικότητας. [6]

Η ικανότητα σχηματισμού βαθέων ευτηκτικών διαλυτών από φυσικά και πλήρως βιοδιασπώμενα υλικά, τα λεγόμενα φυσικά DES (NaDESs), οδηγούν σε σχηματισμό χαμηλής τοξικότητας και χαμηλού κόστους προϊόντων για την ανάπτυξη εφαρμογών στο πλαίσιο της βιώσιμης χημείας. Η χαμηλή τοξικότητά τους, αλλά και η τάση ατμών μειώνουν τις εκπομπές στην ατμόσφαιρα και το αποτύπωμα στο περιβάλλον. Τέλος, είναι ανανεώσιμοι και μπορούν εύκολα να ανακυκλώθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν. [5]

Το βασικό τους πλεονέκτημα συγκριτικά με τα ιοντικά υγρά και τα DESs είναι οι σαφώς καλύτερες ιδιότητές τους ως διαλύτες εκχύλισης, αφού χαρακτηρίζονται από ρυθμιζόμενο ιξώδες, είναι βιώσιμα και παραμένουν σε υγρή φάση ακόμα και σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 0 °C. Έρευνες έχουν δείξει πως δρουν και ως μέσα σταθεροποίησης ευπαθών ενώσεων, εξαιτίας του δικτύου δεσμών υδρογόνου που δημιουργείται. Ακόμη, έχουν χαμηλό ενεργειακό και οικονομικό

κόστος παραγωγής, χρησιμοποιώντας μη τοξικές και ανανεώσιμες φυσικές πρώτες ύλες και έχουν την ικανότητα να διαλύουν πολικές και μη πολικές ενώσεις. Σημειώνεται ότι μερικοί μεταβολίτες είναι σημαντικά πιο διαλυτοί στα NaDESs παρά στο νερό. [7] Έχει αποδειχθεί, επίσης, ότι μπορούν να διαλύσουν ακόμη και μακρομόρια, επομένως καθίστανται κατάλληλοι διαλύτες για δευτερογενείς μεταβολίτες, έτσι να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων ή φαρμάκων. Σε ορισμένες μοριακές αναλογίες (π.χ. ισομοριακή), τα NaDESs δείχνουν ισχυρές διαμορικές αλληλεπιδράσεις. [8]

Πλέον έχουν συντεθεί πάνω από 100 NaDESs – μίγματα χλωριούχο χολίνης με πλήθος φυσικών προϊόντων, όπως ChCl/οργανικά οξέα, ChCl/αλκοόλες, ChCl/σάκχαρα. Οι έρευνες έχουν προχωρήσει στοχεύοντας στη σύνθεση και ανάπτυξη NaDES χωρίς τη χρήση της χλωριούχου χολίνης, αλλά μόνο με μίγματα οργανικών οξέων/σακχάρων, αμινοξέων/οργανικών οξέων και αμινοξέων/σακχάρων.



Εικόνα 1-7: Συνηθέστεροι HBD και HBA σε NaDES

Με βάση τα συστατικά τους, τα NaDESs μπορούν να χωριστούν σε πέντε βασικές κατηγορίες:

1. NaDES που αποτελούνται από ένα οξύ ή μία βάση
2. NaDES που αποτελούνται μόνο από σάκχαρα ή σάκχαρα και πολυαλκοόλες (ουδέτερα DES)
3. NaDES που αποτελούνται από σάκχαρα/πολυαλκοόλες και οργανικά οξέα (ουδέτερα DES με οξέα)
4. NaDES που αποτελούνται από σάκχαρα/πολυαλκοόλες και οργανικές βάσεις (ουδέτερα DES με βάσεις)
5. NaDES που αποτελούνται από αμινοξέα και οργανικά οξέα ή σάκχαρα [9]

#### 1.1.4. Φυσικοχημικές Ιδιότητες των DES και των NaDES

Τα DES είναι χημικά προσαρμόσιμοι διαλύτες, αφού μπορούν να σχεδιαστούν συνδυάζοντας σωστά διάφορα άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου (π.χ.  $\text{ChCl}$ ) με διαφορετικούς δότες δεσμών υδρογόνου (HBD). Ως εκ τούτου, μπορούν να παρασκευαστούν DES για συγκεκριμένες διεργασίες με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες όπως σημείο τήξης, ιξώδες, αγωγιμότητα και pH, μεταξύ άλλων. Ανάλογα με την εφαρμογή των DES, οι φυσικοχημικές ιδιότητες προσδίδουν κάθε φορά τα επιθυμητά χαρακτηριστικά στους διαλύτες και καθορίζονται από πολλούς παράγοντες.

Η αναλογία του συστατικού με ρόλο HBD φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το σημείο τήξης, καθώς αυξημένες αλληλεπιδράσεις ανιόντων με δεσμούς υδρογόνου επιφέρουν μείωση αντίστοιχων αλληλεπιδράσεων με κατιόντα. Έτσι, η πτώση του σημείου τήξεως είναι αποτέλεσμα την εξασθένισης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ιόντων θετικού και αρνητικού φορτίου. Όπως αναφέρεται στην ενότητα 1.1.2., το σημείο τήξης των DES είναι χαμηλότερο από αυτό των επιμέρους συστατικών τους και κυμαίνονται σε τιμές κάτω των  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ιδιαίτερα ελκυστικά είναι τα DES με σημείο τήξης χαμηλότερο από τους  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , αφού η χρήση τους είναι ευρεία σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές. Πέρα από το σημείο τήξης που επηρεάζεται από τη μοριακή αναλογία των συστατικών, επηρεάζεται σημαντικά και η πυκνότητα, το ιξώδες, η αγωγιμότητα, η πολικότητα και η επιφανειακή τάση του τελικού ευτηκτικού μίγματος. [10]

Σε θερμοκρασία δωματίου, τα περισσότερα DES εμφανίζουν σχετικά υψηλά ιξώδη ( $>100\text{ cP}$ ). Το υψηλό ιξώδες οφείλεται στην παρουσία ισχυρού δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ κάθε συστατικού που περιορίζει την κινητικότητα. Το μεγάλο μέγεθος ιόντων και ο πολύ μικρός κενός όγκος των περισσοτέρων DES, αλλά και άλλες δυνάμεις όπως οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ή οι Van der Waals μπορούν να συμβάλλουν στο υψηλό ιξώδες του DES. Λόγω των πιθανών εφαρμογών τους ως πράσινων μέσων, η ανάπτυξη DES με χαμηλό ιξώδες είναι ιδιαίτερα επιθυμητή. Γενικά, τα ιξώδη των ευτηκτικών μιγμάτων επηρεάζονται κυρίως από τη χημική φύση των συστατικών του DES (τύπος αλάτων αμμωνίου και HBDs, γραμμομοριακή αναλογία οργανικού άλατος/HBD κ.λπ.), τη θερμοκρασία και την περιεκτικότητα σε νερό. Όπου το υψηλό ιξώδες αποτελεί εμπόδιο για τη χρήση των διαλυτών αυτών, μπορεί να γίνει ελεγχόμενη προσθήκη νερού. [10], [11]

Όσον αφορά στην πυκνότητα των DESs, είναι υψηλότερη του νερού και του καθαρού HBD. Η γραμμομοριακή αναλογία οργανικού άλατος/HBD επηρεάζει σημαντικά τις πυκνότητες του DES. Αυξάνοντας την ποσότητα του οργανικού άλατος, η πυκνότητα του DES μειώνεται. [11]

Επίσης, τα DESs επιδεικνύουν πολύ καλή διαλυτότητα για διάφορες ουσίες, όπως φάρμακα, οξείδια μετάλλων και  $\text{CO}_2$  και, μάλιστα, μελέτες (Morrison et al.) έχουν αποδείξει ότι πέντε συγκεκριμένα φάρμακα είναι 5-22000 φορές πιο διαλυτά σε DESs από ότι στο νερό. [4] Η φύση του HBA του DESs είναι καθοριστική για την ενίσχυση της διαλυτοποίησης φαρμακευτικών συστατικών, όπως φαινυλαιθανικό, ακετυλοσαλικυλικό και βενζοϊκό οξύ. Ακόμα, το DNA φαίνεται



να διαλυτοποιείται καλύτερα στους DESs με αποδόμηση χαμηλότερη από ότι στα ιοντικά υγρά. [10]

Λόγω του σχετικά υψηλού ιξώδους τους, τα περισσότερα DES παρουσιάζουν κακή ιοντική αγωγιμότητα (μικρότερη από  $2 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Οι αγωγιμότητες των DES γενικά αυξάνονται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας λόγω μείωσης του ιξώδους DES. Λαμβάνοντας υπόψη πως το ιξώδες επηρεάζεται σημαντικά από την γραμμομοριακή αναλογία οργανικού άλατος/HBD είναι φανερό πως η παράμετρος αυτή επηρεάζει και την αγωγιμότητα των DES.

Η επιφανειακή τάση αναμένεται επίσης να ακολουθήσει παρόμοια τάση με το ιξώδες αφού εξαρτάται αυστηρά από τη δύναμη της διαμοριακής αλληλεπίδρασης που διέπει τον σχηματισμό των DES. [6]

Τέλος, σχετικά με τις πιο «πράσινες» ιδιότητές τους, έχει παρατηρηθεί ότι τα DESs με βάση τη χλωριούχο χολίνη παρουσιάζουν χαμηλή προς μέτρια κυτταροτοξικότητα, σημαντική αντιβακτηριακή δράση και χαρακτηρίζονται ως άμεσα βιοαποικοδομήσιμα. [12],[13] Συνολικά, όμως, έχει παρατηρηθεί ένας βαθμός τοξικότητας ως προς έμβιους οργανισμούς, ιδίως όταν προκύπτουν από οξέα ή όταν αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη, καθώς έτσι μπορούν να εισχωρήσουν στο κύτταρο, να συσσωρευθούν στην επιφάνεια του, καταστρέφοντας την κυτταρική μεμβράνη και τις εσωτερικές πρωτεΐνες και ένζυμα, προκαλώντας, τελικά, κυτταρικό θάνατο. Για τον περιορισμό της τοξικότητας, λοιπόν, τα επιμέρους συστατικά των DESs επιλέγονται ώστε να αποτελούν ουσίες που συναντώνται συχνά στα μεταβολικά μονοπάτια των κυττάρων.[14]

### 1.1.5. Πλεονεκτήματα NaDES

- ✓ Χαμηλή τάση ατμών – Μη πτητικοί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- ✓ Υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα
- ✓ Δρουν σταθεροποιητικά για τα βιοδραστικά προϊόντα τα οποία εκχυλίζουν, καλές διαλυτικές ιδιότητες για οργανικά συστατικά
- ✓ Χημικά και θερμικά σταθερά, μη αναφλέξιμα
- ✓ Χαμηλό κόστος πρώτων υλών – Εύκολη παρασκευή
- ✓ Μπορούν να παρασκευαστούν από φυσικά προϊόντα συμβατά με εφαρμογές σε φαρμακευτικά, καλλυντικά και προϊόντα τροφίμων
- ✓ Καλή αναμιξιμότητα με το νερό, σημαντική μείωση του ιξώδους τους

### 1.1.6. Εφαρμογές των DES και NaDES



Εικόνα 1-8: Κύριοι τομείς εφαρμογών DES

Τα DESs επιδεικνύουν χαμηλό κόστος παραγωγής, χημική αδράνεια με το νερό, βιοαποικοδομησιμότητα και φαρμακευτικά αποδεκτή τοξικότητα και ασφάλεια στη χρήση. Οι ιδιότητές τους αυτές τα διαχωρίζει από τα σχετικά επικίνδυνα και ακριβά ιοντικά υγρά και τα καθιστά προτιμότερα. Πλέον, χρησιμοποιούνται σε διάφορα επιστημονικά και τεχνολογία πεδία, όπως είναι η οργανική σύνθεση, η εκχύλιση, η κατάλυση, η ηλεκτροχημεία, η επιστήμη των υλικών, ο καθαρισμός καυσίμων, η επεξεργασία βιομάζας, η σύνθεση βιοντίζελ, σε αντιδράσεις καταλυόμενες από ένζυμα, στην προσρόφηση διοξειδίου του άνθρακα και στη νανοτεχνολογία. [15], [16]

Πιο συγκεκριμένα, μεγάλες δυνατότητες εφαρμογής των DESs παρουσιάζονται στον τομέα της κατάλυσης και της οργανικής σύνθεσης. Οι διαδικασίες που πραγματοποιούνται είναι οικολογικά αποδοτικές, δίνοντας τη δυνατότητα για εκλεκτική εκχύλιση προϊόντων της αντίδρασης από τη φάση DES, διαλύοντας όχι μόνο οργανικά και ανόργανα άλατα, αλλά και σύμπλοκα ή νανοσωματίδια που προέρχονται από μεταβατικά μέταλλα. Ωστόσο, σε σχέση με τα ιοντικά υγρά, οι DES έχουν λιγότερες εφαρμογές στους τομείς οργανικών αντιδράσεων, στις οργανικές εκχυλίσεις, στην ηλεκτροχημεία και στις ενζυμικές αντιδράσεις. [17], [18]

Τα DES με βάση την χλωριούχο χολίνη έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον διαχωρισμό γλυκερόλης από βιοντίζελ, αλκοολών από εστέρες, υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF) από HMF-εστέρες και φαινόλης από έλαια (εξάνιο, τολουόλιο και π-ξυλόλιο), καθώς επίσης και για τον διαχωρισμό αζεοτροπικών μειγμάτων.

Ως φορέας στα συστήματα χορήγησης φαρμάκων, ορισμένα DES έχουν εφαρμοστεί για τη διαλυτοποίηση ασθενώς διαλυτών φαρμάκων αυξάνοντας το εύρος συγκεντρώσεων για αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα στην πρώιμη ανάπτυξη φαρμάκων. Πολύ συχνά χρησιμοποιούνται για εκχυλίσεις φυσικών προϊόντων, λόγω της δυνατότητας εκχύλισης πολικών και μη πολικών συστατικών και της

εύκολης βελτιστοποίησης παραμέτρων όπως το ιξώδες, την πολικότητα και τη θερμοκρασία, αυξάνοντας έτσι την απόδοση εκχύλισης σε σύγκριση με συμβατικούς διαλύτες όπως το νερό και η αιθανόλη.

Οι εφαρμογές των NaDES δεν έχουν περιοριστεί στη χρήση τους ως διαλύτες εκχύλισης. Έχει επίσης μελετηθεί η σκοπιμότητα της ενσωμάτωσής τους σε σκευάσματα ως μέσα διαλυτοποίησης μη υδατοδιαλυτών φυσικών ενώσεων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το γεγονός ότι τα συστατικά του NaDES είναι ασφαλή, μη τοξικά και ακόμη και βρώσιμα, επιτρέπει στα NaDES να ληφθούν υπόψη για φαρμακευτικές, καλλυντικές και τροφικές εφαρμογές, καθώς τα NaDES μπορούν εύκολα να συμμορφωθούν με τις αυστηρές απαιτήσεις για χρήση σε αυτές τις εφαρμογές. [19], [20]

### 1.1.7. Μέθοδοι παρασκευής NaDES

Οι συνηθέστερες μέθοδοι προετοιμασίας των DESs που έχουν καταγραφεί είναι η μέθοδος της θέρμανσης και της λυοφιλίωσης (freeze drying). Αρχικά, κατά την παρασκευή μέσω θέρμανσης, τα επιμέρους συστατικά του NaDES αναμειγνύονται στην κατάλληλη γραμμομοριακή αναλογία και θερμαίνονται σε θερμοκρασία εύρους 50-80 °C με συνεχή ανάδευση για χρονικό διάστημα 2-4 h. Η ανάδευση και η θέρμανση διακόπτεται όταν σχηματιστεί ένα ομογενές και διαυγές ρευστό. Σε περίπτωση πολύ ιξώδους DES προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα νερού. Στην παρασκευή NaDES με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης, τα συστατικά διαλυτοποιούνται αρχικά σε νερό και έπειτα αναμειγνύονται. Το τελικό υδατικό διάλυμα φυγοκεντρείται, καταψύχεται σε θερμοκρασίες έως -80 °C και ξηραίνεται μέσω εξάχνωσης του πάγου. Ακόμα, υπάρχει και η μέθοδος εξάτμισης υπό κενό κατά την οποία οι απαιτούμενες ποσότητες των συστατικών, αφού διαλυθούν σε νερό, οδηγούνται προς εξάτμιση στους 50 °C σε περιστροφικό εξάτμιστήρα. Μετά το πέρας της διαδικασίας το προϊόν αφήνεται σε ξηραντήρα με silica gel μέχρι σταθερού βάρους. Συνολικά, προτιμάται η μέθοδος της θέρμανσης ως οικονομικότερη και ασφαλέστερη, κυρίως σε περιπτώσεις που το DES αποτελείται από θερμικά ασταθείς πρώτες ύλες, όπως σάκχαρα ή αμινοξέα. [6],[21]

### 1.1.8. Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Therapeutic Deep Eutectic Solvents, THEDES)

Οι θεραπευτικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, THEDES (Therapeutic Deep Eutectic Solvents), αποτελούν υποσύνολο των DES με ενεργό φαρμακευτικό συστατικό. Συνιστούν ενισχυμένους φορείς βιοδραστικών μορίων, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του δραστικού φαρμάκου. Αποτελεί ιδανικό φορέα για υδρόφοβες ή υδρόφιλες δραστικές ουσίες, καθώς βελτιώνει τη διαλυτότητα και τη διαπερατότητά τους, ενώ παράλληλα διατηρείται η αντιβακτηριδιακή τους δράση, οδηγώντας σε αυξημένη σταθερότητα και ελεγχόμενη απελευθέρωση, η

οποία και συνεπάγεται τη χρήση μικρότερης δόσης της δραστικής ουσίας.[22],[23]

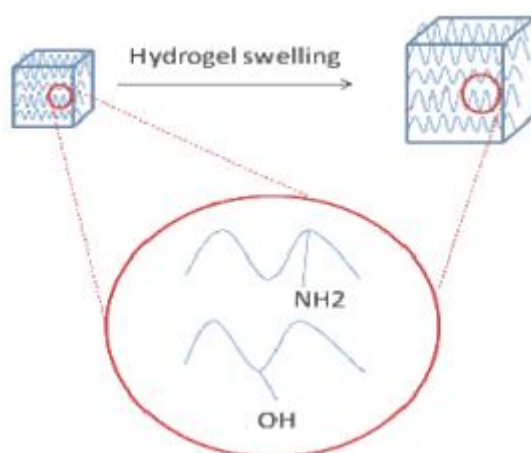
## 1.2. Σχηματισμός υδρογελών

Οι υδρογέλες είναι τρισδιάστατα δίκτυα υδρόφιλων πολυμερών που διασυνδέονται με χημικές ή φυσικές αλληλεπιδράσεις. Πρόκειται για ομογενή υλικά, οι εφαρμογές των οποίων διαπερνούν την καθημερινή ζωή και την προηγμένη βιομηχανία, ενώ η κατανόηση των μηχανισμών πηκτωματοποίησής τους συμβάλλει στο σχεδιασμό υδρογελών με βελτιωμένη μηχανική και λειτουργική απόδοση. Έχουν την ιδιότητα να διογκώνονται στο νερό, συκρατώντας μία μεγάλη ποσότητά του μέσα σε αυτές, ενώ ταυτόχρονα διατηρούν τη δομή τους και δε διαλύονται, χάρη στις χημικές ή στις φυσικές αλληλεπιδράσεις των επιμέρους πολυμερικών αλυσίδων. Εξ'ορισμού το νερό πρέπει να αποτελεί τουλάχιστον το 10% του συνολικού βάρους ή όγκου του υλικού, προκειμένου να χαρακτηρίζεται ως υδρογέλη. Η υδροφιλία του δικτύου οφείλεται στην παρουσία υδρόφιλων ομάδων, όπως  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-CONH$  και  $-SO_3H$ , ενώ η αντοχή τους στη διάλυση προκύπτει από διασταυρώσεις μεταξύ των αλυσίδων του δικτύου. [24] Τα δίκτυα αυτά έχουν μεγάλη συγγένεια με το νερό, αλλά δεν διαλύονται λόγω των χημικών ή φυσικών δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων. Το νερό, όπως προαναφέρθηκε, διεισδύει σε αυτά, προκαλώντας διόγκωση, δίνοντας τη μορφή υδρογέλης, ενώ ένα μέρος του, το οποίο κατακρατείται, είναι στενά συνδεδεμένο με το πολυμερές και το υπόλοιπο υπάρχει ως ελεύθερο νερό.

Ανάλογα με τις ιδιότητες του πολυμερούς ή των πολυμερών που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό τους, αλλά και ανάλογα με τη φύση και με την πυκνότητα των δεσμών στο σχηματιζόμενο δίκτυο, οι υδρογέλες μπορούν να δεσμεύουν διαφορετικές ποσότητες νερού. Τυπικά, σε διογκωμένη κατάσταση το κλάσμα μάζας του νερού είναι πολύ μεγαλύτερο από το κλάσμα μάζας του πολυμερούς. Στην πράξη, για την επίτευξη υψηλών ποσοστών διόγκωσης, είναι σύνηθες να χρησιμοποιούνται συνθετικά πολυμερή, τα οποία είναι υδατοδιαλυτά όταν δεν βρίσκονται σε διασταυρωμένη μορφή. Ακόμη, οι υδρογέλες, ανάλογα με τα φυσικά και τα χημικά ερεθίσματα που μπορεί να δεχτούν, μπορούν να πραγματοποιήσουν δραματική μεταβολή στον όγκο τους. [24]

Οι πλήρως διογκωμένες υδρογέλες έχουν ορισμένες φυσικές ιδιότητες όμοιες με ζωντανούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένης μιας μαλακής και ελαστικής σύστασης και χαμηλής διεπιφανειακής τάσης με το νερό και ορισμένα βιολογικά υγρά. Ομοιοπολικά συνδεδεμένες θεραπευτικές ουσίες απελευθερώνονται από τα δίκτυα υδρογέλης είτε λόγω υδρόλυσης του χημικού δεσμού μεταξύ των μορίων του φαρμάκου και του πολυμερούς, είτε λόγω της αποικοδόμησης του ίδιου του δικτύου της γέλης. Και οι δύο διαδικασίες οδηγούν σε σχετικά ανεπαρκή έλεγχο του ρυθμού απελευθέρωσης του φαρμάκου. [25], [26] Παρ'όλα αυτά, οι υδρογέλες που βασίζονται σε φυσικά πολυμερή έχουν πλέον πολύ μεγάλο ενδιαφέρον, αφού είναι αξιοσημείωτες για την ελεγχόμενη παροχή βιοδραστικών

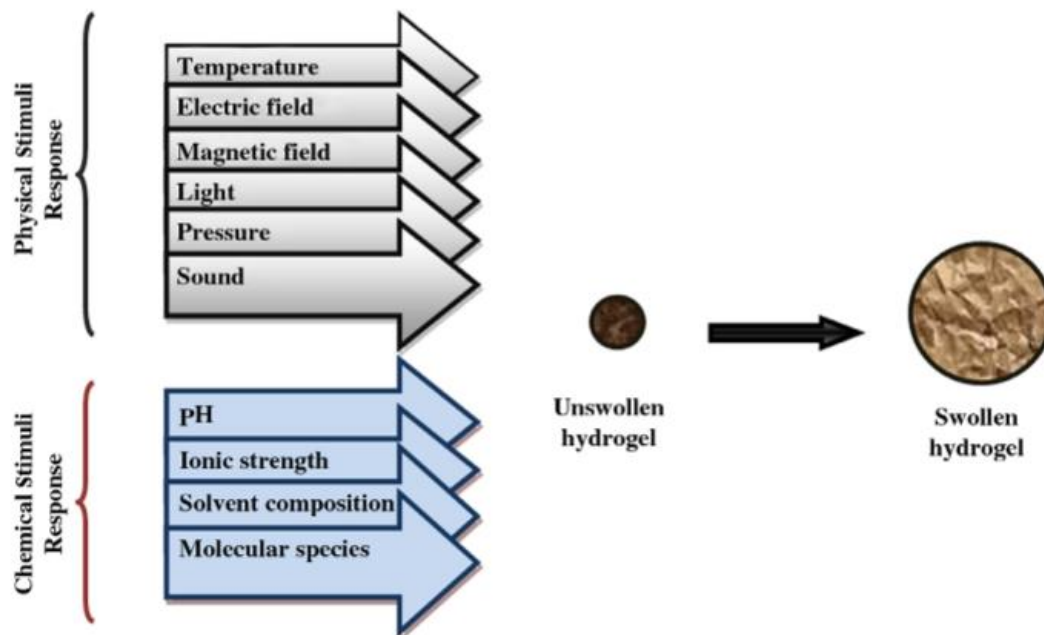
μορίων, δημιουργώντας νέα συστήματα χορήγησης φαρμάκων με μία ευρεία σειρά εφαρμογών, όπως η απελευθέρωση φαρμάκων (drug release). Παρουσιάζουν πολύ καλή βιοσυμβατότητα, ικανότητα αποικοδόμησης από τα ανθρώπινα ένζυμα και ευκολία επεξεργασίας. Ακόμη, έχουν αναπτυχθεί θερμοευαίσθητες παραλλαγές υδρογελών προς σχηματισμό υδρογελών *in situ*, αποκλείοντας την ανάγκη για χειρουργική εμφύτευση. Ωστόσο, παρά την ανακάλυψη μεγάλου αριθμού δραστικών ενώσεων που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως θεραπευτικές ουσίες, πολύ λίγες αποδεικνύουν *in vivo* επιτυχία. Η κακή *in vivo* δραστηριότητα αποδίδεται στη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, η οποία επηρεάζεται από την οδό χορήγησης, την έκταση και τον ρυθμό με τον οποίο ένα φάρμακο προσεγγίζει και επηρεάζει τον στόχο. [25], [43], [27]



Εικόνα 1-9: Σχηματική αναπαράσταση κατασκευής της υδρογέλης και της διόγκωσής της στο νερό. Ο κύκλος απεικονίζει μερικές από τις πιθανές λειτουργίες που είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση νερού

Στην εικόνα 1-9, αναπαρίσταται σχηματικά η διόγκωση της υδρογέλης. Τα μόρια νερού μπορεί να βρίσκονται είτε ως ελεύθερα, είτε ως ενδιάμεσα, είτε ως δεσμευμένα. Αρχικά, τα μόρια ελεύθερου νερού υποβάλλονται σε διαδικασία κατάψυξης στα σημεία πήξης, αφού δεν υπάρχει δεσμός μεταξύ ελεύθερου νερού και λειτουργικών ομάδων του πολυμερούς. Η ποσότητα των ελεύθερων μορίων νερού εξαρτάται από τη δομή της υδρογέλης, η οποία τελικά επηρεάζει την αναλογία διόγκωσης. Έτσι, μία συμπαγής δομή υδρογέλης περιέχει μικρότερη ποσότητα ελεύθερου νερού. Το ενδιάμεσο νερό μπορεί να σχηματίσει ασθενείς αλληλεπιδράσεις με λειτουργικές ομάδες των πολυμερικών αλυσίδων, ενώ οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ομάδων αυτών και των μορίων του νερού σχηματίζει το δεσμευμένο νερό. Αυτά τα μόρια νερού δεν καταψύχονται. Η ποσότητα και η ταχύτητα απορρόφησης νερού εξαρτάται από:

- 1) Την πυκνότητα διασταύρωσης
- 2) Τη χημική δομή των πολυμερών
- 3) Τις περιβαλλοντικές συνθήκες [26]



Εικόνα 1-10: Απόκριση ερεθισμάτων σε υδρογέλη που διογκώνεται

Σήμερα, οι έρευνες επιδιώκουν να συνθέσουν υδρογέλες, οι οποίες θα αλλάζουν την ικανότητά τους για διόγκωση υπό διαφορετικές συνθήκες, όπως η θερμοκρασία, το pH και το ηλεκτρικό πεδίο στο οποίο μπορεί να βρίσκονται. Οι υδρογέλες που παρασκευάζονται χρησιμοποιούν συνθετικά πολυμερή, όπως πολυακρυλαμίδιο, πολυβινυλική αλκοόλη, πολυακρυλικό οξύ και φυσικά πολυμερή, όπως το υαλουρονικό οξύ, η χιτοζάνη και το αλγινικό. [28]

Υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι διασύνδεσης των χημικών και φυσικών τεχνικών διασταύρωσης, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο σχηματισμό μιας υδρογέλης. Η χημική διασύνδεση είναι μία εξαιρετικά ευέλικτη μέθοδος που σχηματίζει πολύ σταθερές υδρογέλες που προκύπτουν από το σχηματισμό πρωτογενών δυνάμεων, όπως ομοιοπολικοί δεσμοί. Οι χημικά διασταυρωμένες υδρογέλες είναι επίσης πολύ ισχυρότερες και πιο σταθερές στη θερμότητα, σε μηχανικές ή άλλες εξωτερικές προκλήσεις, αφού αποτελούνται από ομοιοπολικούς δεσμούς. Αντίθετα, η φυσική διασταύρωση των γελών σχηματίζει δευτερεύοντες, αναστρέψιμους δεσμούς που είναι λιγότερο σταθεροί σε σύγκριση με εκείνους στις υδρογέλες που συνδέονται χημικά. Οι δεσμοί με τους οποίους συγκρατούνται είναι δεσμοί van der waals, ιοντικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο, είναι χρήσιμες, ειδικά για τον εγκλεισμό ασταθών βιοδραστικών ουσιών και ζωντανών κυττάρων σε υδρογέλες. Τέλος, μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τις πηγές τους, το μέγεθος των πόρων τους, τη φύση της διόγκωσής τους, το ιοντικό φορτίο, τη σύσταση της αλυσίδας και τον τύπο της διασταύρωσης από τον οποίο προκύπτουν. [29],[30]

Λόγω της ικανότητάς τους να απορροφούν νερό, οι υδρογέλες δεν βρίσκουν εφαρμογή μόνο λόγω της ικανότητας διόγκωσής τους, αλλά χρησιμοποιούνται και σε διαφορετικούς τεχνολογικούς τομείς, ως υλικά για φακούς επαφής και

διαχωρισμόν πρωτεϊνών, μήτρες για εγκλεισμό κυττάρων και συσκευές για την ελεγχόμενη απαλευθέρωση φαρμάκων και πρωτεϊνών.

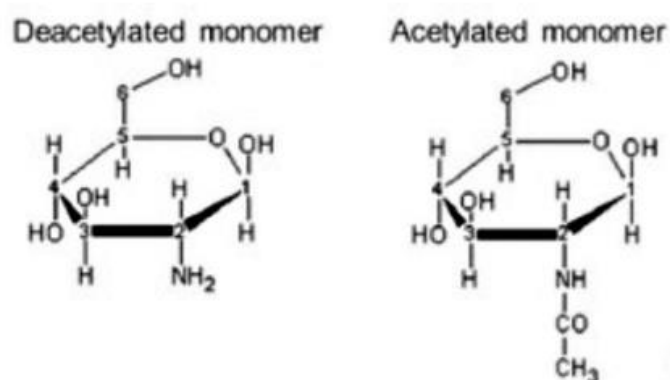
### 1.3. Χιτοζάνη (Chitosan, CS)

Η χιτοζάνη, ένας φυσικός κατιοντικός πολυσακχαρίτης, παρασκευάζεται βιομηχανικά από μερική ακετυλίωση της χιτίνης, ένα φυσικά διαθέσιμο πολυμερές, το οποίο βρίσκεται στον εξωσκελετικό σχηματισμό των εντόμων και των οστρακοειδών και αποτελεί το δεύτερο σε αφθονία βιοπολυμερές στη φύση μετά την κυτταρίνη. Όσον αφορά στη χιτοζάνη, πρόκειται για ένα μη τοξικό, βιοδιασπώμενο και βιοσυμβατό πολυμερές, το οποίο παρουσιάζει ενδιαφέρον όσον αφορά σε βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές, αφού παρουσιάζει αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Σημειώνεται, επίσης, ότι και τα άλατα χιτοζάνης είναι βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα. Σωματίδια με βάση τη χιτοζάνη έχουν μελετηθεί εκτενώς για χορήγηση αντικαρκινικών παραγόντων και θεραπευτικών πρωτεϊνών. Οι ιδιότητες της χιτοζάνης και η διαλυτότητά της συνδέεται στενά με το μοριακό βάρος και τον βαθμό απακετυλίωσης, καθώς και με την τιμή του pH του υδατικού διαλύματος. Ενώ η χιτίνη είναι αδιάλυτη στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, η χιτοζάνη είναι εύκολα διαλυτή σε αραιά όξινα διαλύματα με pH μικρότερο του 6. Παρ'όλ' αυτά, λόγω της υψηλής κρυσταλλικότητας, αλλά και της ύπαρξης αμινομάδων, η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε ουδέτερες συνθήκες και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες.

Πιο συγκεκριμένα, αποτελεί ένα γραμμικό κατιονικό πολυσακχαρίτη που αποτελείται από τυχαία κατανεμημένα μόρια D-γλυκοζαμίνης (αποακετυλιωμένη μονάδα) και N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (ακετυλιωμένη μονάδα) συνδεδεμένα με β-(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Σε στερεή κατάσταση είναι ημικρυσταλλική, αδιάλυτη στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, ενώ διαλυτοποιείται σε αραιά υδατικά διαλύματα οξέων (π.χ. σε διάλυμα υδροχλωρικού, φορμικού, οξικού, οξαλικού και γαλακτικού οξέος). Λόγω των πολλών λειτουργικών ομάδων της (υδροξυλομάδες, αμινομάδες, ακετυλοαμινομάδες), η χιτοζάνη έχει πολλαπλές ιδιότητες. Οι αμινομάδες ευνοούν τη διάλυση της χιτοζάνης σε όξινα διαλύματα, οι οποίες αντιδρούν με πλήθος πολυσθενών ιόντων για τη δημιουργία υδρογελών. Επίσης, λόγω ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων και των αμινομάδων αποκτά κρυσταλλική δομή. Η κύρια αλυσίδα είναι υδρόφιλη, διαθέτει όμως και μια μικρή υδρόφοβη συμπεριφορά λόγω των N-ακέτυλο ομάδων, οι οποίες δυσχεραίνουν τη διάλυση σε ουδέτερο διάλυμα.

Ο βαθμός απακετυλίωσης (DDA) καθορίζει την περιεκτικότητα των ομάδων ακετυλίου σε σχέση με τη συνολική ποσότητα των ομάδων ακετυλίου και αμινών στον πολυσακχαρίτη. Η αυξημένη απακετυλίωση ενισχύει τη βιοσυμβατότητα της χιτοζάνης. Ωστόσο, η πρακτική εφαρμογή της μη τροποποιημένης χιτοζάνης είναι περιορισμένη, εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητάς της σε όξινα διαλύματα. Για αυτό το λόγο, υφίσταται χημική τροποποίηση με πολυαιθυλενογλυκόλη. Ουσιαστικά, όταν ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτίνης υπερβαίνει το 50%, αυτή διαλυτοποιείται σε όξινα υδατικά διαλύματα και καλείται χιτοζάνη. Ο βαθμός

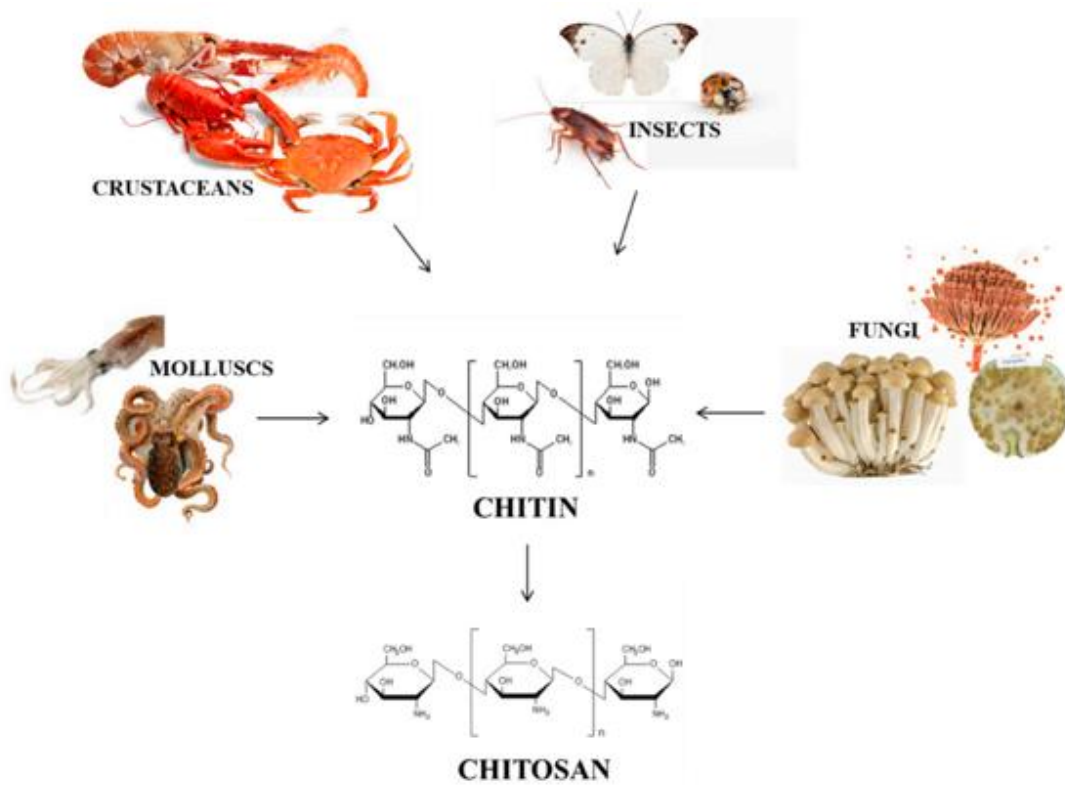
απακετυλίωσης 55-70% ορίζεται ως ένας χαμηλός βαθμός για τη χιτοζάνη, ο οποίος συνεπάγεται υψηλότερους λόγους διόγκωσης και μικρότερη ακαμψία, αφού υπάρχουν λιγότερες κρυσταλλικές περιοχές που λειτουργούν ως σταυροδεσμοί και η παρουσία νερού μπορεί να οδηγήσει σε κατάρρευση της δομής της. Αντίθετα, ένας βαθμός μεταξύ 70-85% χαρακτηρίζεται ως μέσος (μπορεί εν μέρει να διαλυθεί στο νερό) και, τέλος, το 85-95% αποτελεί έναν υψηλό βαθμό (καλή διαλυτότητα στο νερό). Τιμές απακετυλίωσης μεταξύ 95-100 % είναι αδύνατο να επιτευχθούν. Η διαδικασία της απακετυλίωσης (εικόνα 1-11) περιλαμβάνει την απομάκρυνση των ομάδων ακετυλίου (-NHCOCH<sub>3</sub>) από τη μοριακή αλυσίδα της χιτίνης, αφήνοντας πίσω αμινομάδες (-NH<sub>2</sub>).



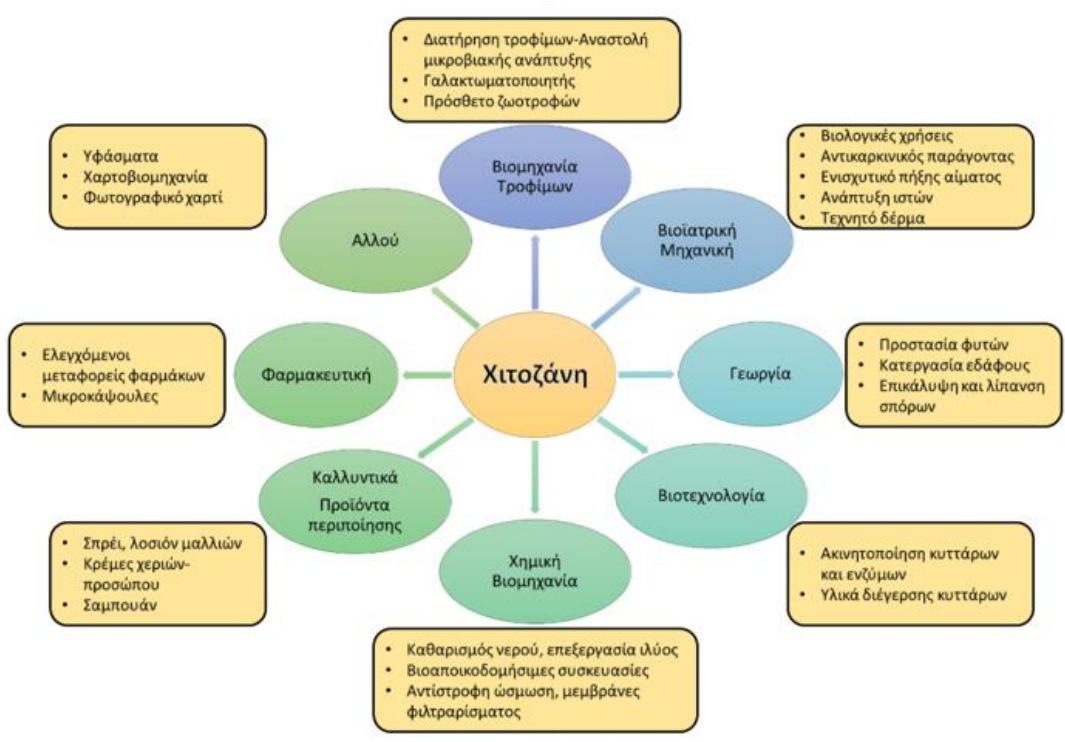
Εικόνα 1-11: Απακετυλιωμένο και μη απακετυλιωμένο πολυμερές

Σε χαμηλό pH (~4.5) οι αμίνες πρωτονιώνονται και φορτίζονται θετικά, καθιστώντας έτσι την χιτοζάνη διαλυτή στο νερό. Ωστόσο, καθώς το pH αυξάνεται πολύ πάνω από τον 6.8, οι αμίνες αποπρωτονιώνονται και έτσι η χιτοζάνη χάνει τα φορτία της, καθίσταται αδιάλυτη και καθιζάνει. Επομένως, η διαλυτότητά της εξαρτάται από το βαθμό απακετυλίωσης, τη συγκέντρωση ιόντων, το pH, τη φύση του οξέος που προκαλεί την πρωτονίωση, την κατανομή των ομάδων ακετυλίου κατά μήκος της αλυσίδας και τις συνθήκες απομόνωσης και ξήρανσης του πολυσακχαρίτη. Σημειώνεται ότι λόγω του φαινομένου εξαλάτωσης (salting-air effect) παρατηρείται πτώση της διαλυτότητας σε αυξημένες συγκεντρώσεις διαλύματος οξέος. Σύμφωνα με τον Panda, η αύξηση του μοριακού βάρους της χιτοζάνης οδηγεί σε μείωση της διαλυτότητας και των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων. Σημειώνεται ότι σε εφαρμογές όπου η χιτοζάνη χρησιμοποιείται για χορήγηση από το στόμα, το μοριακό βάρος παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς τα oligομερή απορροφώνονται ευκολότερα, ενώ οι μεγαλύτερου μοριακού βάρους αλυσίδες αποικοδομούνται αρκετά ώστε να αποβληθούν από τον οργανισμό. [24],[25],[26], [34]





Εικόνα 1-12: Παραδείγματα προέλευσης χιτίνης και χιτοζάνης [35]



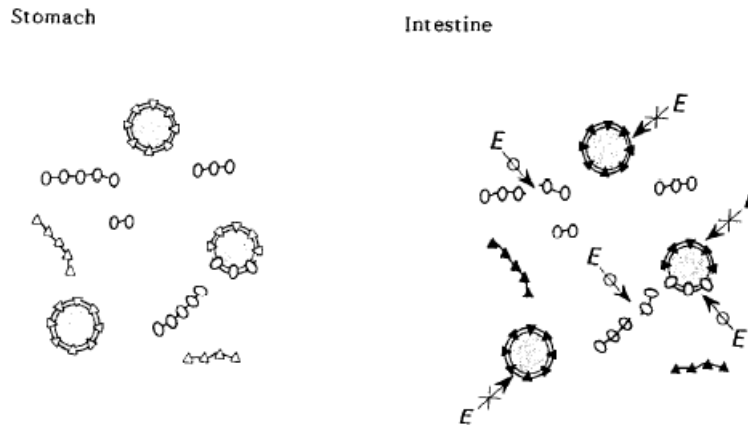
Εικόνα 1-13: Τομείς εφαρμογής χιτοζάνης και παραγώγων αυτής

Η πρώτη μελέτη που απέδειξε τις αντιβακτηριδιακές ιδιότητες της χιτοζάνης πραγματοποιήθηκε από τους Allan και Hardwiger (1979). Ανέφεραν ότι η χιτοζάνη είχε ένα ευρύ φάσμα δράσεων και υψηλό ποσοστό αναστολής τόσο έναντι των Gram θετικών (+) όσο και έναντι των Gram αρνητικών (-) βακτηρίων. Ωστόσο, τα κατά Gram αρνητικά (-) βακτήρια τείνουν να είναι πιο ευαίσθητα στη χιτοζάνη, παρουσιάζοντας μορφολογικές αλλαγές. Επιπλέον, ο Schnurich (2000) ανέφερε την τάση να περιγράφεται η χιτοζάνη ως βακτηριοστατική, δηλαδή να εμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων, αδιαφορώντας για το αν θανατώνονται. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η χιτοζάνη και αρκετά από τα συνθετικά παράγωγά της, έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, χάρη στην ικανότητά της για δέσμευση ελευθέρων ριζών και για χηλικοποίηση σε ιόντα σιδήρου. Μπορεί να θεωρηθεί επίσης βασικό συστατικό για την ανάπτυξη υδρόβιων ζώων, αφού σε αυτή αποδίδεται η βελτίωση της μορφολογικής δομής του λεπτού εντέρου, η οποία οδηγεί στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών, ενώ αποτελεί εξαιρετικό φορέα άλλων συστατικών, όπως βιταμινών και ακόρεστων λιπαρών οξέων. [36]

### 1.3.1. Συμβολή της χιτοζάνης στην παχυσαρκία

Η χιτοζάνη εμφανίζει αντιχοληστερολαιμικές, κατά του έλκους και αντιουραιμικές ιδιότητες όταν χορηγείται από το στόμα και είναι δυνητικά κατάλληλη για την πρόληψη της κοιλιοκάκης. Οι ιδιότητες αυτές πηγάζουν από την ικανότητά της να δεσμεύει ειδικά λιπαρά οξέα, χολικά οξέα, φωσφολιπίδια και ουρικό οξύ, ενώ αποτελεί και διαιτητική ίνα. Χρησιμοποιείται ως πρόσθετο σε διάφορα τρόφιμα χάρη στις πρεβιοτικές λειτουργίες που παρουσιάζει, οι οποίες είναι άμεσα συνδεδεμένες με την τροποποίηση της μικροχλωρίδας του εντέρου. Ωστόσο, πρέπει να χορηγείται με κατάλληλη χημική μορφή και κατάλληλο βαθμό πολυμερισμού. Όσον αφορά στη φαρμακοδυναμική της χιτοζάνης, μπορεί να μειώσει το επίπεδο της ζάχαρης και της χοληστερόλης στο αίμα, μειώνοντας τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και αυξάνοντας την HDL χοληστερόλη, να διευκολύνει την διαδικασία απορρόφησης του ασβεστίου, ενώ, τέλος, έχει αντιμυκητιακές και αντιβακτηριακές ιδιότητες. [29],[30],[39],[40]

Γενικά, οι διαιτητικές ίνες παρουσιάζουν υποχοληστερολαιμικό δυναμικό, αφού έχουν υψηλό ιξώδες, πολυμερική φύση και υψηλή υδατοδέσμευση, ενώ είναι δύσπεπτες στο άνω μέρος της γαστρεντερικής οδού, αντίθετα με το κατώτερο τμήμα της. Η χιτοζάνη τηρεί τα περισσότερα από αυτά τα κριτήρια, ενώ μπορεί να δεσμεύει ανιόντα, όπως χολικά ή ελεύθερα λιπαρά οξέα σε χαμηλό pH σχηματίζοντας ιοντικούς δεσμούς που προκύπτουν από την αμινομάδα της. Τα λιπαρά οξέα, όπως το ελαϊκό, το λινολεϊκό, το παλμιτικό, το στεατικό και το λινολενικό, δεσμεύονται σχηματίζοντας τα αντίστοιχα άλατα. Τα προκύπτοντα άλατα, μετά την κατάποση, δεσμεύουν επιπλέον λιπίδια, λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, και ένα μεγάλο μέρος αυτών απεκκρίνονται αντί να απορροφώνται. Στο στομάχι, το υδροχλωρικό οξύ δεν υδρολύει τα σχηματιζόμενα άλατα των λιπαρών οξέων με τη χιτοζάνη. [41]



Εικόνα 1-14: Σχηματική απεικόνιση της αναστολής της πέψης του λίπους χάρη στη χιτοζάνη. Στο στομάχι (αριστερά), η χιτοζάνη διαλύεται σε ένα όξινο μέσο και γαλακτωματοποιεί τα λίπη. Στο έντερο (δεξιά), εμφανίζεται μία αλλαγή στη μορφή της γέλης χιτοζάνης και οι παγιδευμένες σταγόνες ελαίου δεν προσβάλλονται από παγκρεατικά ή εντερικά ένζυμα. Τα σταγονίδια λαδιού που έχουν γαλακτωματοποιηθεί με καζεΐνη χωνεύονται. Τρίγωνα=χιτοζάνη, κύκλοι=καζεΐνη, E=πεπτικά ένζυμα [41]

Σήμερα, αποτελεί από τα πλέον δημοφιλή σκευάσματα αδυνατίσματος στην Ελλάδα, αφού θεωρείται ότι αναστέλλει την απορρόφηση του λίπους από τον γαστρεντερικό σωλήνα στο αίμα και τη συσσώρευση λίπους στο εντερικό τοίχωμα. Ενισχύει, ακόμη, την εντερική περισταλτική, σταθεροποιεί την εντερική μικροχλωρίδα, επιταχύνει τη διαδικασία απομάκρυνσης σκωριών, τοξικών ουσιών και βρώσιμων λιπών από το σώμα και δίνει μία προσωρινή αίσθηση κορεσμού. Ο μηχανισμός με τον οποίο δρα η χιτοζάνη είναι ο ακόλουθος:

- 1) η προσλαμβανόμενη χιτοζάνη διαλύεται στο στομάχι από το γαστρικό υγρό
- 2) η διαλυμένη χιτοζάνη αναμιγνύεται με το λίπος που προσλαμβάνεται από τη διατροφή και δημιουργείται ένα σύμπλοκο ανάμεσα στη χιτοζάνη και το λίπος
- 3) το σύμπλοκο με τη μορφή gel οδηγείται στο λεπτό έντερο
- 4) η ζελατινώδης αυτή μάζα αποβάλλεται [30],[32],[34],[45]

Ωστόσο, η συμβατική θεραπεία για τη διαχείριση της παχυσαρκίας βασίζεται σε διαιτητικούς περιορισμούς και τροποποίηση της συμπεριφοράς και γενικά οδηγεί σε περιορισμένη μόνο επιτυχία, με την πλειοψηφία των παχύσαρκων ασθενών να αδυνατούν να διατηρήσουν βραχυπρόθεσμες απώλειες βάρους. Επομένως, υπάρχει αναγνωρισμένη ανάγκη για ασφαλή και αποτελεσματική φαρμακοθεραπεία με την χρήση συμπληρωμάτων διατροφής, ειδικά αυτών για τον έλεγχο του βάρους, να αυξάνεται. Πρωτοποριακές μελέτες έδειξαν ότι η χιτοζάνη, σε μέτριες συγκεντρώσεις 4-5%, μπορεί να μειώσει σημαντικά τα επίπεδα της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στον ορό και το ήπαρ. Αρκετές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η χιτοζάνη θα μπορούσε να δεσμεύσει τα λιπίδια των διαιτητικών ουσιών και έτσι να επηρεάσει την απορρόφηση τους από το γαστρεντερικό σωλήνα. [15] Εκτός αυτού, περιορίζει την πρόσληψη τροφής ελαττώνοντας την όρεξη και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και σε άλλες φυσιολογικές διεργασίες εντός του λευκού λιπώδη ιστού. [46]

## 1.3.2. Υδρογέλες χιτοζάνης (Hydrogels of chitosan)

### 1.3.2.1. Ιδιότητες υδρογελών χιτοζάνης

Διάφορα συνθετικά, φυσικά και τροποποιημένα φυσικά πολυμερή, συμπεριλαμβανομένης και της χιτοζάνης χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό υδρογελών, οι οποίες παρουσιάζουν γενικά τις ιδιότητες που παρουσιάζονται στην ενότητα 1.2. Βασικό πλεονέκτημά της είναι ότι δεν προκαλεί ανοσοαπόκριση. Διαφέρει από άλλους κοινώς διαθέσιμους πολυσακχαρίτες λόγω της παρουσίας αζώτου στη μοριακή του δομή, της κατιονικότητάς του και της ικανότητάς του να σχηματίζει σύμπλοκα πολυηλεκτρολύτη. Η κατιονική φύση του πολυμερούς του επιτρέπει να γίνει υδατοδιαλυτό μετά το σχηματισμό καρβοξυλικών αλάτων. Επίσης, αποτελεί ένα εξαιρετικό έκδοχο, μη τοξικό, σταθερό και βιοαποικοδομήσιμο, το οποίο μπορεί να αποστειρωθεί. Οι ιδιότητες αυτές την καθιστούν ένα πολύ ευέλικτο υλικό με εκτεταμένη εφαρμογή στον βιοϊατρικό και βιοτεχνολογικό τομέα και ειδικότερα για σκευάσματα ελεγχόμενης βραχυπρόθεσμης απελευθέρωσης φαρμάκων. [43]

Ως γενική θεώρηση, κάθε τύπος χιτοζάνης είναι υδατοδιαλυτός σε όξινες συνθήκες λόγω της πρωτονίωσης των αμινομάδων στη θέση C2, όπου συμπεριφέρονται ως πολυηλεκτρολύτες με γραμμική πυκνότητα φορτίου. Η σύνδεση πολυμερούς επιτυγχάνεται είτε με μη ομοιοπολικές φυσικές συσχετίσεις, όπως οι δεσμοί υδρογόνου, οι ηλεκτροστατικοί δεσμοί και ο σχηματισμός κρυστάλλων, είτε με ομοιοπολικούς σταυροδεσμούς. Και οι δύο μέθοδοι μπορούν να περιορίσουν επαρκώς τη διάγκωση της υδρογέλης, αλλά οι φυσικές συσχετίσεις είναι αναστρέψιμοι δεσμοί, σε αντίθεση με τις ομοιοπολικές διασύνδεσεις. Αυτή η διάκριση είναι σημαντική για τις δυνατότητες βιοαποικοδόμησης και την κινητική απελευθέρωσης φαρμάκου από τις υδρογέλες. Οι υδρογέλες που έχουν προκύψει από φυσική διασύνδεση χαρακτηρίζονται από χαμηλότερες μηχανικές ιδιότητες σε σχέση με εκείνες που έχουν προκύψει από χημική διασύνδεση. Η χιτοζάνη, χρησιμοποιώντας την ως το βασικό δομικό συστατικό της γέλης, δηλαδή ως υδρόφιλο πολυμερές, παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς για τη χρήση της στην απελευθέρωση φαρμάκων, για αυτό και διασταυρώνονται. Αυτοί οι περιορισμοί μπορούν να ξεπεραστούν με χημική τροποποίηση, χρησιμοποιώντας διάφορους παράγοντες διασύνδεσης, όπως η γλουταραλδεϋδη, το τριπολυφωσφορικό νάτριο και η φορμαλδεϋδη. Ωστόσο, η φορμαλδεϋδη, επειδή είναι ιδιαιτέρως τοξική, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για φαρμακευτικές εφαρμογές. Αντί αυτής, συχνά χρησιμοποιείται το τριπολυφωσφορικό TPP, το οποίο δεν παρουσιάζει τοξικότητα. Στη σύνθεση της υδρογέλης είναι σημαντική τόσο η διασύνδεση όσο και η υδροφιλικότητα που αυτή παρουσιάζει. [25], [43], [44], [45]

Οι φυσικές και λειτουργικές ιδιότητες των υδρογελών χιτοζάνης καθορίζονται από το μοριακό βάρος του χρησιμοποιούμενου πολυμερούς, το βαθμό απακετυλίωσης, το είδος και τη συγκέντρωση των όξινων διαλυμάτων και των

πλαστικοποιητών, τη θερμοκρασία και το pH κατά την παρασκευή της υδρογέλης. [48]

Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι οι υδρογέλες που προέρχονται από χιτοζάνη υψηλότερου βαθμού απακετυλίωσης παρουσιάζουν υψηλότερη αντοχή σε εφελκυσμό λόγω του πυκνότερου «πακεταρίσματος» των πολυμερικών αλυσίδων, οι οποίες διαθέτουν μικρά αμινοξέα ως υποκαταστάτες και, έτσι, αλληλεπιδρούν ισχυρότερα μεταξύ τους. Παράλληλα, η επιμήκυνση στη θραύση και η απορροφητικότητα τους σε υγρασία είναι χαμηλότερες. Ακόμα, αύξηση του μοριακού βάρους της χιτοζάνης περιπλέκει και πυκνώνει το δίκτυο των αλυσίδων, με αποτέλεσμα την αύξηση της τάσης και της επιμήκυνσης κατά τον εφελκυσμό, καθώς, και της απορροφούμενης υγρασίας. [48]

Η χιτοζάνη διαθέτει αντιμικροβιακή δράση κατά των βακτηρίων, των νηματοειδών μυκήτων και των ζυμών. Μέσω των θετικά φορτισμένων αμινομάδων της αλληλεπιδρά με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη μικροβιακών κυττάρων, προκαλώντας τη διαρροή πρωτεϊνικών και άλλων ενδοκυτταρικών συστατικών των μικροοργανισμών. Τόσο στα Gram-θετικά όσο και στα Gram-αρνητικά βακτήρια, η αντιβακτηριακή δράση γίνεται εντονότερη με μείωση του βαθμού ακετυλίωσης. Όσον αφορά στην αντιμυκητιακή δράση, οι υδρογέλες χιτοζάνης περιορίζουν μολύνσεις από μύκητες μέσω αναστολής της ανάπτυξης μυκηλίων και της παραγωγής, απελευθέρωσης και βλάστησης σπορίων. [48]

Στις υδρογέλες χιτοζάνης μπορούν να προστεθούν άλλα φυσικά αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά, όπως εκχύλισμα αγρίου τριανταφύλλου, πρόπολης ή ελιάς που περιλαμβάνουν πληθώρα πολυφαινόλων, προς ενίσχυση και βελτίωση των ιδιοτήτων τους. [48]

Εξαιτίας της διαβάθμισης του pH στον ανθρώπινο οργανισμό, η ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου διευκολύνεται σημαντικά. Συγκεκριμένα, στην ανθρώπινη γαστρεντερική οδό το pH κυμαίνεται από 1 έως 7,5 (σάλιο 5-6, στομάχι 1-3, λεπτό έντερο 6.6-7.5 και παχύ έντερο 6.4-7.0). Η χιτοζάνη παρουσιάζει την ευαίσθητη στο pH συμπεριφορά μίας ασθενούς πολυβάσης, η οποία διαλύεται εύκολα σε χαμηλό pH, αλλά παραμένει αδιάλυτη σε υψηλότερα pH. Ένας καλύτερος έλεγχος απελευθέρωσης του φαρμάκου έχει αποδειχθεί ότι εντοπίζεται όταν στοχεύονται ένζυμα σε διαφορετικές περιοχές του σώματος, όπως για παράδειγμα τα βακτήρια που υπάρχουν στο έντερο και εκκρίνουν ένζυμα. Τα πολυμερή διασπώνται εύκολα όταν εκτίθενται σε αυτά τα τοπικά ένζυμα, οδηγώντας στην απελευθέρωση παγιδευμένων μορίων του φαρμάκου. [25]

### 1.3.2.2. Εφαρμογές υδρογελών χιτοζάνης

Οι υδρογέλες χιτοζάνης έχουν αποδώσει εξαιρετικές εφαρμογές ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκου, ανάλογα με τους τρόπους χορήγησης (υποδόρια, στοματική, οφθαλμική και διαδερμική) και ανάλογα με την εφαρμογή των

διαφόρων μηχανισμών. Η ευαισθησία στο pH τους και οι βλεννοσυγκολλητικές ιδιότητες που εμφανίζουν τις καθιστά κατάλληλες για την ελεγχόμενη απελευθέρωση των φαρμάκων που περιέχουν. Η διακύμανση του pH στη γαστρεντερική οδό προσφέρει σημαντική στόχευση απελευθέρωσης φαρμάκου, ρυθμίζοντας την διόγκωση της υδρογέλης. Η ικανότητα ενός υλικού να συνδέεται με τη βλεννογόνο της γαστρεντερικής οδού, ρυθμίζεται από τη συγγένειά του με τις γλυκοπρωτεΐνες της βλέννας. Οι πολυσακχαρίτες, όπως η χιτοζάνη, είναι πολύ καλά βλεννοκολλητικά λόγω της μη τοξικής φύσης τους και συνδέονται με τη βλεννογόνο είτε μέσω ηλεκτροστατικών είτε μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, οδηγώντας σε παρατεταμένο χρόνο παραμονής στο γαστρεντερικό σωλήνα. Ωστόσο, ένα εξαιρετικό όξινο περιβάλλον, καταστροφικά ένζυμα και χαμηλοί χρόνοι παραμονής μπορούν να περιορίσουν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι υδρογέλες χιτοζάνης μπορούν να παρασκευαστούν με ενεργοποιητές απελευθέρωσης ευαίσθητους στο pH ή ειδικούς για συγκεκριμένο ένζυμο, καθιστώντας τη χορήγησή τους από το στόμα ιδανική. [25]

### 1.3.3. Υδρογέλες χιτοζάνης με Φυσικούς Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες (NaDES)

Τα τελευταία χρόνια, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES), και ιδιαίτερα αυτοί με βάση τα φυσικά συστατικά (NaDES), έχουν μελετηθεί ως ένα εργαλείο για την ανάπτυξη πράσινων και βιώσιμων τεχνολογιών. Λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν ένα ισχυρό δίκτυο από δεσμούς υδρογόνου, μελετώνται ως τροποποιητές για πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο, η χιτοζάνη και το κόμμι γκουάρ. Συγκεκριμένα, το DES παρέχει ένα δίκτυο αναστρέψιμων δεσμών και ταυτόχρονα αυξάνει την κινητικότητα των αλυσίδων της χιτοζάνης, χάρη στις πλαστικοποιητικές του ιδιότητες, αφού αυξάνει τον ελεύθερο χώρο των πολυμερικών αλυσίδων. Οι μηχανικές ιδιότητες, όπως η ελαστικότητα και η αντοχή των υδρογελών, μπορούν να ποικίλλουν σημαντικά, ανάλογα με τις απαιτήσεις της κάθε εφαρμογής. Μέσω ανάλυσης FT-IR μπορεί να επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση του NaDES με τη χιτοζάνη με δεσμούς υδρογόνου. [47], [50]

Όταν τα συστατικά του NaDES προστίθενται στην υδρογέλη χωριστά, τότε έχει αποδειχθεί ότι ενσωματώνονται πιο ομοιόμορφα μεταξύ των αλυσίδων χιτοζάνης. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στους δεσμούς υδρογόνου του NaDES, οδηγώντας σε μεγαλύτερη διόγκωση του πολυμερούς, διευρύνοντας, έτσι, την απόσταση που σχηματίζεται μεταξύ των αλυσίδων πολυμερούς και επιτρέποντας στους διαπερατούς υδρατμούς να περάσουν πιο εύκολα. [48]

### 1.3.3.1. Προσθήκη επιφανειοδραστικού παράγοντα (Tween 80) στις υδρογέλες χιτοζάνης

Το συστατικό Polysorbate 80, γνωστό και ως Tween 80, είναι ένας γαλακτωματοποιητής και ένα μη ιονικό επιφανειοδραστικό, το οποίο συχνά χρησιμοποιείται σε τρόφιμα και καλλυντικά. Πρόκειται για μία συνθετική ένωση σε μορφή ενός κίτρινου παχύρρευστου υδατοδιαλυτού υγρού, παράγωγου του πολυοξυαιθυλενίου, το οποίο έχει καλή διαλυτότητα σε νερό, καθώς και σε ανόργανους διαλύτες. Χρησιμοποιείται ευρέως στη παρασκευή καλλυντικών, προκειμένου να μπορέσουν να αναμιχθούν μεταξύ τους υλικά με διαφορετική σύσταση - κυρίως έλαια με νερό - χωρίς τη χρήση κάποιας αλκοόλης. Επίσης, χρησιμοποιείται και ως διαλύτης σε στοματικά διαλύματα. Έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζει τα βακτήρια στο δέρμα και στο έντερο του ανθρώπου, ενώ επηρεάζει και την ανάπτυξη και την αντιμικροβιακή ευαισθησία του *Staphylococcus aureus*, της *Listeria monocytogenes* και του *Pseudomonas fluorescens*, τα οποία αποτελούν τις κύριες αιτίες αλλοίωσης των τροφίμων.



Εικόνα 1-15: Καθαρό διάλυμα Tween 80

Το επιφανειοδραστικό μπορεί να ταξινομηθεί ως κατιονικό, ανιονικό, αμφιτεριονικό ή μη ιονικό ανάλογα με την υδρόφιλη κεφαλή. Τα συστήματα που βασίζονται σε επιφανειοδραστικά μπορούν να λειτουργήσουν ως οχήματα παροχής υδρόφοβων και υδρόφιλων βιοδραστικών ενώσεων, λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα τους. Όσον αφορά σε φαρμακευτικά συστήματα ή συστήματα τροφίμων, η χρήση μη ιοντικών επιφανειοδραστικών είναι πιο κατάλληλη, λόγω της υψηλότερης τοξικότητας των ιοντικών επιφανειοδραστικών ουσιών. Επίσης, λόγω εξωτερικών παραγόντων η συμπεριφορά ενός επιφανειοδραστικού μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τη θερμοκρασία, το pH, την πίεση και την παρουσία προσθέτων, όπως τα βιοπολυμερή, όμως δεν προκαλεί ερεθισμούς. [51]–[53]

## 1.4. Φύλλα ελιάς και βιοδραστικές ουσίες

### 1.4.1. Βιοδραστικές ουσίες: προέλευση και χρήση

Οι βιοδραστικές ουσίες είναι «υπέρ-θρεπτικά» συστατικά που συνήθως απαντώνται σε μικρές ποσότητες σε φυτικά προϊόντα και πλούσια σε λιπίδια τρόφιμα. Διαφέρουν από τα θρεπτικά συστατικά, λόγω του ότι δεν κρίνονται απαραίτητες και του ότι επί του παρόντος, δεν υπάρχουν συνιστώμενες τιμές ημερήσιας πρόσληψης. Στις βιοδραστικές ουσίες, περιλαμβάνονται τα γνωστά μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά (βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, λιπαρά οξέα κ.α.), οι φυτοχημικές ουσίες, τα καροτενοειδή που δεν αποτελούν προβιταμίνη Α, οι πολυφαινόλες, οι φυτοστερόλες, τα φλαβονοειδή, οι ταννίνες και τα πεπτίδια. [54]–[56]

Τα βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων προκαλούν φυσιολογικές, συμπεριφορικές και ανοσολογικές επιδράσεις. [54] Από ένα πλήθος μελετών σε ζώα, κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες, αποδεικνύεται επαρκώς ότι έχουν θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, μέσω της μείωσης του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών ή της βελτίωσης της λειτουργίας των συστημάτων του οργανισμού.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί σύγχρονες τεχνολογίες απομόνωσης και ενσωμάτωσης πολλών βιοενεργών συστατικών κάποιων τροφίμων εντός άλλων στα οποία δε βρίσκονται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Με τον τρόπο αυτό, εξελίσσεται ραγδαία η βιομηχανική παραγωγή λειτουργικών τροφίμων με βιοενεργά συστατικά. [57]

Τα εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς καθώς και τα συστατικά που περιέχονται σε αυτά χαρακτηρίζονται από ποικίλες δράσεις, οι οποίες οφείλονται κυρίως στην περιεκτικότητά τους σε ελαιοευρωπεΐνη και υδροξυτυροσόλη. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζουν αντιθρομβωτικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επίσης, επιδρούν ευεργετικά σε πτυχές καρδιαγγειακών παθήσεων μέσω της αγγειοδιασταλτικής, αντιαιμοπεταλιακής συσσώρευσης και αντισχαιμικής δράσης της. [58] Μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης αναστέλλουν την οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και απομακρύνουν ελεύθερες ρίζες. Τα φύλλα ελιάς είναι συνδεδεμένα, εκτός των άλλων, με αντιδιαβητική και αντιυπερτασική δράση, χαρακτηριστικά που προέρχονται κυρίως από την ελαιοευρωπεΐνη και την υδροξυτυροσόλη, εξ' ου και η χρήση τους ως ιατρικό βότανο για θεραπεία διαβητικής υπεργλυκαιμίας και μολυσματικών ασθενειών. [59],[60], [61] Η υδροξυτυροσόλη έχει συνδεθεί με τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και την αποτροπή της διαβητικής νευροπάθειας. [62]



### 1.4.2. Αξιοποίηση φύλλων ελιάς

Η ελιά (*Olea europaea*) καλλιεργείται στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αφρική εδώ και χιλιάδες χρόνια, ενώ αρχικά χρησιμοποιούνταν για θεραπευτικό σκοπό στην αρχαία Αίγυπτο. Κατά τη δεκαετία του 1800, χρησιμοποιήθηκε τσάι από ελιές για να θεραπεύσει ασθενείς από ελονοσία, ενώ κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, η καλλιέργεια της ελιάς έχει αυξηθεί σε όλο τον κόσμο λόγω των οφελών για την υγεία που αποδίδονται στα βιοδραστικά της συστατικά. [63] Οι ελιές καλλιεργούνται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου που χαρακτηρίζονται από τις εκτεταμένες περιόδους ηλιοφάνειας, αλλά και του υψηλού ρυθμού προσβολής από παθογόνους μικροοργανισμούς και έντομα. Για την καταπολέμηση αυτών των στρεσογόνων καταστάσεων, τα ελαιόδεντρα συνθέτουν μεγάλους όγκους βιοδραστικών συστατικών, συγκεκριμένα, μεταξύ άλλων, πολυφαινόλων, οι οποίες αποθηκεύονται σε μεγάλο βαθμό στα παχιά φύλλα τους. [64]

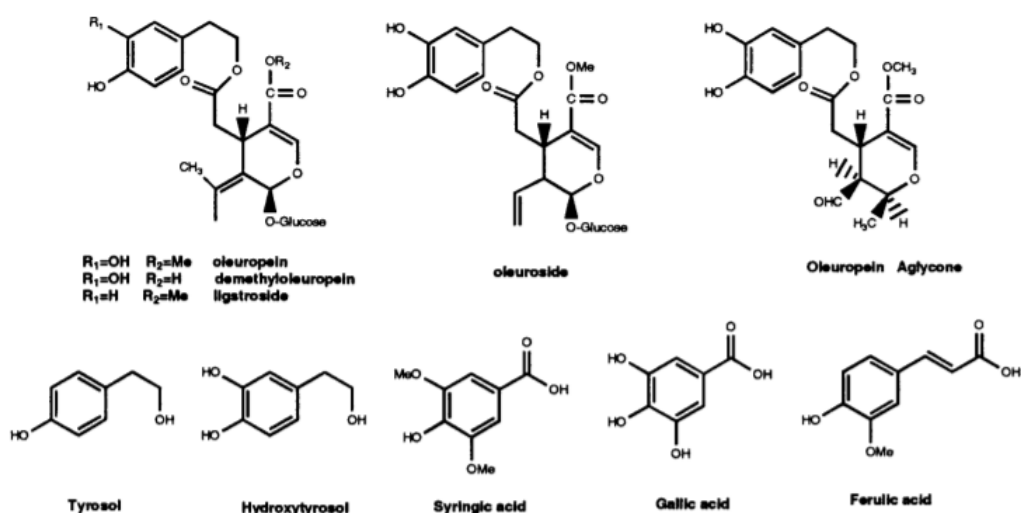
Πολλοί επιστήμονες έχουν στραφεί στην έρευνα των ευεργετικών ιδιοτήτων των φύλλων της ελιάς. Η πλούσια περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις και παράγωγα έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να συμβάλει στην καταπολέμηση πλήθους ασθενειών, παράλληλα έχοντας πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Ακόμη, θεωρούνται ότι έχουν ισχυρά αντιμικροβιακά, καρδιαγγειακά, αντιφλεγμονώδη, αναλγητικά, αντιυπερτασικά, αντί-HIV και αντικαρκινικά οφέλη. Για τους παραπάνω λόγους, αποτελεί ένα παραπροϊόν της ελαιοκαλλιέργειας που αποτελεί βιοδιαθέσιμη πηγή με αρκετά χαμηλό κόστος, μέσω της οποίας μπορούν να παραχθούν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η αναγκαία μετάβαση σε μία όλο και πιο κυκλική οικονομία και οι ολοένα αυξανόμενες ανάγκες και απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού επιτάσσουν την καλύτερη δυνατή αξιοποίησή των φύλλων προς παραγωγή ωφέλιμων προϊόντων για τον άνθρωπο με ταυτόχρονη προστασία του περιβάλλοντος, συνεπώς και την ανατίμησή τους. [65]

### 1.4.3. Χημική σύσταση φύλλων ελιάς

Η ελιά (*Olea europaea*) είναι ένα δέντρο ανθεκτικό και αιωνόβιο, χάρη στην ύπαρξη πολυφαινόλων σε όλα τα μέρη του. Οι σημαντικότερες από τις ενώσεις αυτές είναι η ελαιοευρωπεΐνη (oleuropein) και η υδροξυτυροσόλη (3,4-διυδροξυφαιθυλαιθανόλη). Οι δύο αυτές ουσίες είναι γνωστές και για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, ενώ το συνολικό εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα δύο αυτά συστατικά. Μεταξύ άλλων, στο εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς, έχουν απομονωθεί επίσης και άλλοι 3,4-διυδροξυφαιθυλεστέρες και γλυκοζίδια φλαβονοειδών, κυρίως της ρουτίνης και λουτεολίνης. Οι ιδιότητες των φύλλων της ελιάς έχουν αποδοθεί κατά κύριο λόγο στα ιριδοειδή του φύλλου της ελιάς και ειδικότερα, στα σεκοϊριδοειδή ελαιοευρωπεΐνη και υδροξυτυροσόλη. Πέραν της ικανότητάς τους να δεσμεύουν και να αδρανοποιούν ελεύθερες ρίζες, προκαλούν

επίσης, απόσβεση του οξυγόνου απλής κατάστασης, για αυτό το λόγο ανήκουν στην κατηγορία των τροφοφαρμάκων. Προκειμένου να είναι αποτελεσματικές οι φαινολικές αυτές ενώσεις, πρέπει η συγκέντρωσή τους να είναι υψηλότερη των 200 mg/kg. Η δομή που είναι υπεύθυνη για την αντιοξειδωτική τους δράση είναι η ο-διυδροξυ (κατεχόλη) που υπάρχει στις χαρακτηριστικές ομάδες τους. [58]-[61]

Από τα συστατικά των φύλλων της ελιάς, αυτά με αντιοξειδωτική δράση είναι: (α) **φαινολικά**: 3,4-διυδροξυφαινυλεστέρες/ σεκοϊριδοειδείς γλυκοζίτες/ ιριδοειδή μονοτερπένια/ φαινόλες (ελαιοευρωπείνη, υδροξυτοροσόλη (3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη), τυροσόλη, 7,11-διμεθυλεστέρας της ολεοσίδης (γλυκοσίδη του μεθυλεστέρα του ελεανολικού οξέος), λιγκστροσίδη (p-HPEA), αγλυκόνιο της λιγκστροσίδης (p-HPEA-EA), βερμπασκοσίδη, δι-αλδεΐδες του αγλυκόνου της ελαιοευρωπείνης (4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EDA, 4-DHPEA-EA)), φαινολικά οξέα (καφεϊκό, βανιλικό, κουμαρικό, πρωτοκατεχικό, συριγικό, γαλλικό, φερουλικό), (β) **τριτερπένια**: ολεανολικό οξύ, μασλινικό οξύ, β-αμυρίνη, (γ) **κουμαρίνες**: σκοπολετίνη, αισκουλίνη, (δ) **αλκαλοειδή**: παράγωγα κινγκονίνης, παράγωγα κινγκονιδίνης, (ε) **φλαβονοειδή/ γλυκοζίδια φλαβονοειδών**: ρουτίνη, λουτεολίνη, γλυκοζίδια λουτεολίνης, κατεχίνη, κουερσετίνη, καμφερόλη, ολεασίνη, ολεοκανθάλη, χρυσοεριοόλη, απιγενίνη και παράγωγα. [68]-[72]



Εικόνα 1-16: Χημικές δομές φαινολικών ενώσεων σε εκχύλισμα φύλλων ελιάς [73]

Ωστόσο, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες ικανοί να διαφοροποιήσουν την ποιοτική και ποσοτική φαινολική σύνθεση των φύλλων ελιάς όπως η περιοχή, η ημερομηνία συλλογής, η περιεκτικότητα σε υγρασία, οι συνθήκες αποθήκευσης, ο τρόπος ξήρανσης και εκχύλισης. [59], [74], [75] Αυτά τα συστατικά είναι υπεύθυνα για τις βιολογικές ιδιότητες των φύλλων ελιάς, όπως είναι μεταξύ άλλων η αντιοξειδωτική και η αντικαρκινική δράση. [76]

#### 1.4.4. Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς

Οι ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση έχουν τη δυνατότητα να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την οξειδωση λιπών και ελαίων και τις αλλαγές χρώματος των τροφίμων, αναστέλλοντας τις αντιδράσεις έναρξης και διάδοσης της αυτοοξειδωσης, και δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες, τα μέταλλα και το μοριακό οξυγόνο. Ειδικότερα, ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών συσχετίζεται σημαντικά με το φυσικό μεταβολισμό των αερόβιων κυττάρων, καθώς κατά την κατανάλωση οξυγόνου, δημιουργείται μία σειρά ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Κατ' επέκταση, η αλληλεπίδραση των ελευθέρων ριζών με μόρια λιπιδικής φύσης παράγει καινούριες ρίζες, όπως είναι τα υδροϋπεροξειδία και άλλα υπεροξειδία. Αυτές οι ρίζες ασκούν κυτταροτοξική συμπεριφορά στα βιολογικά συστήματα με τα οποία μπορεί να αλληλεπιδράσουν, προκαλώντας ασθένειες, όπως καρκίνος και καρδιαγγειακές παθήσεις. Έτσι, οι φαινόλες και τα φλαβονοειδή αναχαιτίζουν αυτή τη συμπεριφορά με την αντιοξειδωτική τους δράση, η οποία είναι κυρίως βασισμένη στις ιδιότητες οξειδοαναγωγής των φαινολικών υδροξυλομάδων τους και στις δομές τους. [77]

Υπάρχουν δύο κατηγορίες αντιοξειδωτικών, τα φυσικά και τα συνθετικά, βέβαια, αναλόγως τον τρόπο δράσης τους χωρίζονται σε πρωτογενή (κύρια) και σε δευτερογενή (συνεργιστικά).

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά προέρχονται από φυσικές πρώτες ύλες με αντιοξειδωτικές ενώσεις. Σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής τους δράσης, διαδραματίζουν διάφοροι παράγοντες, όπως το είδος του φυτού, οι συνθήκες καλλιέργειας, ο χρόνος συλλογής, ο τρόπος επεξεργασίας, οι συνθήκες, αλλά και ο διαλύτης εκχύλισης. Οι περισσότερες έρευνες για την αντιοξειδωτική δράση των φύλλων ελιάς έχουν βασιστεί στη μέθοδο προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH (2,2-δι-(4-tert-οκτυλφαινυλο)-1-πικρυλυδραζίλιο). Τελικά, διαπιστώθηκε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς οφείλεται στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, καθώς επίσης ότι ο διαλύτης εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα. [58], [64], [77]

#### 1.4.5. Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών

Το πιο σημαντικό βήμα στην απομόνωση των συστατικών που υπάρχουν σε βοτανικά και φυτικά παρασκευάσματα είναι η εκχύλιση. Τα φυτικά υλικά πλένονται, ξηραίνονται με θέρμανση ή κατάψυξη και αλέθονται για τη λήψη ομοιογενούς δείγματος, βελτίωση της κινητικής της αναλυτικής εκχύλισης και αύξηση της επιφάνειας επαφής του δείγματος με το σύστημα διαλυτών. Η επιλογή του συστήματος διαλυτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση της βιοδραστικής ένωσης που στοχεύεται. Η εκχύλιση υδρόφιλων ενώσεων απαιτεί πολικούς διαλύτες, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη ή ο οξικός αιθυλεστέρας. Για

εκχύλιση περισσότερο λιπόφιλων ενώσεων, χρησιμοποιείται διχλωρομεθάνιο ή μείγμα διχλωρομεθανίου/ μεθανόλης σε αναλογία 1:1. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η εκχύλιση με εξάνιο χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση της χλωροφύλλης. Σε κάθε περίπτωση, αν το εκχύλισμα προορίζεται για ανθρώπινη χρήση, το σύστημα διαλυτών πρέπει να χαρακτηρίζεται ως κατάλληλο για τρόφιμα (food grade solvent). Καθώς οι στοχευόμενες ενώσεις μπορεί να είναι μη πολικές έως πολικές και θερμικά ασταθείς, πρέπει να εξεταστεί η καταλληλότητα των μεθόδων εκχύλισης. [79]

Οι κλασικές τεχνικές βασίζονται στην ικανότητα εκχύλισης των διαφορετικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται, καθώς και την εφαρμογή θερμότητας ή/ και ανάμιξης. Για την απόκτηση βιοδραστικών ενώσεων από φυτά, οι υπάρχουσες κλασικές τεχνικές είναι:

- Εκχύλιση Soxhlet
- Διαβροχή με κατάλληλο διαλύτη
- Υδροαπόσταξη

Άλλες μέθοδοι είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους ή μικροκύματα και η θέρμανση υπό κάθετο ψυκτήρα.

Γενικά, κατά την εκχύλιση ακολουθούνται τα παρακάτω στάδια:

- 1) ο διαλύτης διεισδύει στη στερεά μήτρα του φυσικού προϊόντος,
- 2) η διαλυμένη ουσία διαλύεται στους διαλύτες,
- 3) η διαλυμένη ουσία διαχέεται από τη στερεά μήτρα,
- 4) συλλέγεται το εκχύλισμα

Καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει ο διαλύτης, ο οποίος αποτελεί παράγοντα διαχωρισμού και πρέπει να είναι εκλεκτικός και μη αναμίξιμος με την ουσία που επιθυμείται να απομακρυνθεί, καθώς και φθηνός και ασφαλής για χρήση σε μεγάλη ποσότητα. Η διεργασία βασίζεται στη διαφορετική διαλυτότητα της μεταφερόμενης ουσίας μεταξύ αρχικού και προστιθέμενου διαλύτη. Επίσης, ο έλεγχος της θερμοκρασίας είναι κρίσιμος, καθώς πολύ υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να αποφέρουν την αποσύνθεση θερμοευαίσθητων ουσιών, αλλά και του διαλύτη με αποτέλεσμα να παραμείνουν ακαθαρσίες στο εκχύλισμα. Ένας ακόμη παράγοντας είναι ο χρόνος εκχύλισης, που διαφέρει σημαντικά από μέθοδο σε μέθοδο, η αύξηση του οποίου αυξάνει την απόδοσή της εντός ενός συγκεκριμένου εύρους. Μετά το πέρας της ισορροπίας, η αύξηση του χρόνου δεν επιφέρει καμία αλλαγή.

Παρ'όλα αυτά, οι κύριες προκλήσεις της συμβατικής εκχύλισης είναι ο μεγάλος χρόνος εκχύλισης, η απαίτηση δαπανηρού και υψηλής καθαρότητας διαλύτη, η απομάκρυνση της τεράστιας ποσότητας διαλύτη, η χαμηλή εκλεκτικότητα εκχύλισης και η θερμική αποσύνθεση θερμοευαίσθητων ενώσεων. Για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, εισάγονται νέες και πολλά υποσχόμενες τεχνικές. Αυτές οι τεχνικές αναφέρονται ως μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης.

Μερικές από τις πιο πολύ υποσχόμενες τεχνικές είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ηλεκτρικό πεδίο, η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό και η υγρή εκχύλιση υπό πίεση. Ορισμένες από αυτές τις τεχνικές θεωρούνται «πράσινες», καθώς περιλαμβάνουν λιγότερο επικίνδυνη χημική σύνθεση, σχεδιασμό ασφαλέστερων χημικών ουσιών και διαλυτών, σχεδιασμό για ενεργειακή απόδοση, χρήση ανανεώσιμης πρώτης ύλης, μείωση παραγώγων, κατάλυση, σχεδιασμό για πρόληψη της υποβάθμισης, οικονομία ατόμου και ανάλυση χρόνου για την πρόληψη της ρύπανσης και εγγενώς ασφαλέστερη χημεία για την πρόληψη ατυχημάτων. Ακόμη, στην πρόσφατη βιβλιογραφία, αναφέρεται η εκχύλιση, η οποία πραγματοποιείται σε συνδυασμό με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (DES), αλλά και DES φυσικής προέλευσης, με τις ιδιότητες που αναφέρονται στην ενότητα 1.1. [80]

#### 1.4.6. Εκχύλιση με υπερήχους (UAE)

Η υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπερήχους περιλαμβάνει την εφαρμογή ηχητικών κυμάτων υψηλής έντασης, υψηλής συχνότητας και την αλληλεπίδρασή τους με υλικά. Πρόκειται για μία πράσινη και καινοτόμο τεχνολογία, η οποία χρησιμοποιείται για την εκχύλιση φυσικών προϊόντων και, κυρίως, για αυτά που είναι θερμοευαίσθητα και ασταθή [81]. Λόγω της δόνησης των στερεών και των υγρών σωματιδίων, από τους υπέρηχους, η διαλυμένη ουσία διαχέεται γρήγορα από τη στερεή φάση στον διαλύτη, παράλληλα αποτρέποντας τον κορεσμό του διαλύτη που περιβάλλει τον φυτικό ιστό. Κατά την εκχύλιση, πραγματοποιούνται δύο φαινόμενα, ο εμποτισμός της φυτικής ύλης από τον διαλύτη, με σκοπό τη διάχυση αυτού στο εσωτερικό των κυτταρικών τοιχωμάτων και η έκπλυση των συστατικών των κυττάρων όταν τα τοιχώματα διαρρηχθούν. Τελικά, η μεταφορά ουσιών στόχων στο διαλύτη πραγματοποιείται μέσω των φαινομένων διάχυσης και ώσμωσης. Συγκεκριμένα, οι υπέρηχοι διευκολύνουν την διόγκωση και την ενυδάτωση προκαλώντας μεγέθυνση των πόρων των κυτταρικών τοιχωμάτων ευνοώντας την διαδικασία έκπλυσης. [82]

Πρόκειται για μία διεργασία, η οποία δεν απαιτεί πολύπλοκα όργανα, είναι χαμηλού κόστους και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε μικρή όσο και σε μεγάλη κλίμακα. Περαιτέρω πλεονεκτήματα είναι ο βελτιωμένος ρυθμός εκχύλισης, που επιτυγχάνεται με αύξηση των ρυθμών μεταφοράς μάζας και ρήξη του τοιχώματος των κυττάρων λόγω του σχηματισμού μικροκοιλίων. Ως αποτέλεσμα, προκύπτουν υψηλότερες αποδόσεις προϊόντος με μειωμένο χρόνο επεξεργασίας, μικρότερη κατανάλωση διαλυτών και λιγότερες απώλειες θερμικής αποδόμησης και κατανάλωσης νερού και ενέργειας. [83] Συγκεκριμένα, για τα φύλλα ελιάς, αυτά απέδωσαν την υψηλότερη ελαιοευρωπαϊνή (92.3%) στο συντομότερο χρόνο εκχύλισης, χρησιμοποιώντας έναν μόνο κύκλο με τη μέθοδο UAE σε συνδυασμό με τη μέθοδο μειωμένης πίεσης. [84] Ο χρόνος που απαιτείται για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από φύλλα ελιάς είναι 15 λεπτά, σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους, που είναι 24 ώρες. [85]

Συχνά, κατά την εκχύλιση υπερήχων χρησιμοποιείται το probe υπερήχων. Σε αντίθεση με το λουτρό που επίσης χρησιμοποιείται, το probe διασφαλίζει την ομοιόμορφη διάχυση της ισχύος στο δείγμα προς μελέτη. Ακόμη, επιτρέπει την ενίσχυση και τη συμπύκνωση της ενέργειας υπερήχων σε όλη την έκταση του μίγματος, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, σε σύγκριση με αυτή των λουτρών και δίνοντας τη δυνατότητα ευρύτερης επιλογής παραμέτρων για ερευνητικούς λόγους. [86], [87] Κατά την εκχύλιση, το probe υπερήχων βυθίζεται στο δοχείο μέσα στο οποίο βρίσκεται η πρώτη ύλη και ο διαλύτης. Ο όγκος του δείγματος προς εκχύλιση καθορίζει το μέγεθος του probe, ενώ οι νεκρές ζώνες του δοχείου, δηλαδή τα σημεία που δεν ακουμπά το probe, πρέπει να είναι ελαχιστοποιημένες. [86]

#### 1.4.7. Εκχύλιση με υπερήχους (UAE) και φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES)

Όπως προαναφέρθηκε, η ανάπτυξη μίας τεχνικά και οικονομικά εφικτής οδού για την απομόνωση ενώσεων προστιθέμενης αξίας από φυτικά υλικά είναι η τρέχουσα αναγκαιότητα. Εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν νεωτερικούς διαλύτες (τρίτης γενιάς), όπως επιφανειοδραστικά, υδρότροπα και ιοντικά υγρά, είναι τέτοιες πράσινες διαδρομές διαθέσιμες για μία επιλεκτική, γρήγορη, ενεργειακά αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον εκχύλιση φυτοχημικών προϊόντων. Αυτοί οι διαλύτες έχουν βελτιωμένη επιλεκτικότητα, εύκολη ανάκτηση, εύκολη επαναχρησιμοποίηση και φιλική προς το περιβάλλον φύση. Η εκχύλιση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Επιπλέον, η τεχνική εκχύλισης με διαλύτη μπορεί να συνδυαστεί με εκχύλιση με μικροκύματα ή υπερήχους. [88]

Σε αντίθεση με τους συνηθισμένους διαλύτες, όπως οι πτητικές οργανικές ενώσεις (Volatile Organic Compounds ή VOCs), οι DESs έχουν πολύ χαμηλή τάση ατμών και, ως εκ τούτου, δεν είναι εύφλεκτοι και δεν εισέρχονται στην ατμόσφαιρα, δεν οξειδώνονται και δε δεσμεύουν όζον. Επίσης, έχουν σχετικά υψηλά ιξώδη, που μπορεί να εμποδίσουν τις βιομηχανικές εφαρμογές τους, ευνοϊκά χαμηλές πυκνότητες και μπορούν να είναι υγροί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών. [89] Ακόμη, οι DESs έχουν χαμηλό κόστος και μερικές φορές, είναι βιοαποικοδομήσιμοι. Επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ασφαλείς, αποδοτικοί, απλοί και χαμηλού κόστους διαλύτες. Μεταβάλλοντας τα συστατικά των DESs και τη σχετική αναλογία δότη/ δέκτη δεσμού υδρογόνου, μπορούν να παραχθούν νέοι DESs. Για τον λόγο αυτό, πολλές νέες εφαρμογές παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία κάθε χρόνο.

Λαμβάνοντας υπόψη τις πολλές δομικές δυνατότητες των NADESs και τη δυνατότητα σχεδιασμού των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους, για να προσαρμοστούν σε διαφορετικούς σκοπούς, μπορούν χωρίς καμία αμφιβολία να χαρακτηριστούν «διαλύτες σχεδιασμού». Επί του παρόντος, η χρήση των DESs ως διαλύτες εκχύλισης για φαινολικές ενώσεις και γενικότερα, για την εκχύλιση φυσικών προϊόντων για φαρμακευτικές εφαρμογές είναι μακράν η πιο

μελετημένη εφαρμογή. Ένας μεγάλος αριθμός NADESs που βασίζεται σε φυσικές ενώσεις, ιδίως πρωτογενείς μεταβολίτες όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, ουρία και άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου, όπως η χλωριούχος χολίνη, έχουν αναφερθεί και δοκιμαστεί, δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα και αποδόσεις σε ελαιοευρωπεΐνη (oleuropein).

## 1.5. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE)

Σημαντικό ρόλο στην παρασκευή της βέλτιστης υδρογέλης, διαδραματίζουν όλοι οι παραπάνω παράγοντες (διάλυμα NaDES, περιεκτικότητα χιτοζάνης, περιεκτικότητα tween 80), ενώ στην τελική βέλτιστη γέλη που θα καθοριστεί, θα προστεθεί στη συνέχεια το εκχύλισμα ελαίου από φύλλα ελιάς. Όλοι οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και επηρεάζουν τη βιολογική δράση της υδρογέλης. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανάλυση της ταυτόχρονης επίδρασης των παραμέτρων αυτών σε κάθε απόκριση που εξετάζεται.

Προκειμένου να μειωθεί σημαντικά ο αριθμός των πειραμάτων και να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τη μελετούμενη διεργασία, γίνεται χρήση του προγράμματος Design Expert 12 και, συγκεκριμένα, του μοντέλου Box-Behnken. Έτσι, επιτυγχάνεται ελαχιστοποίηση του κόστους παραγωγής της συγκεκριμένης υδρογέλης με βάση την τεχνική αυτή. [90]

### 1.5.1. Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM)

Το 1951 αναπτύχθηκε από τους George E. P. Box και K. B. Wilson η μεθοδολογία της επιφάνειας απόκρισης, η οποία βασίζεται στη χρήση μίας ακολουθίας σχεδιασμένων πειραμάτων για την επίτευξη της βέλτιστης απόκρισης. Οι τεχνικές που χρησιμοποιεί αποτελούνται από μία ομάδα στατιστικών και μαθηματικών ακολουθιών βασισμένες στην προσαρμογή των εμπειρικών μοντέλων στα πειραματικά δεδομένα που λαμβάνονται σε σχέση με τον πειραματικό σχεδιασμό. Οι συναρτήσεις που χρησιμοποιούνται είναι γραμμικές ή τετραγωνικές πολυωνυμικές για την περιγραφή του συστήματος που μελετάται, με απώτερο στόχο την βελτιστοποίησή του με βάση τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται.

Σε πολλές διεργασίες, η σχέση μεταξύ της απόκρισης και των ανεξάρτητων μεταβλητών είναι συνήθως άγνωστη. Επομένως, το πρώτο βήμα στην RSM είναι η προσέγγιση της συνάρτησης (απόκρισης) όσον αφορά στην ανάλυση μεταβλητών (ανεξάρτητες μεταβλητές). Συνήθως, αυτή η διαδικασία χρησιμοποιεί μια πολυωνυμική εξίσωση χαμηλής τάξης σε μια προκαθορισμένη περιοχή των ανεξάρτητων μεταβλητών, η οποία αργότερα αναλύεται για να εντοπίσει τις βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών για την καλύτερη

απόκριση. Μάλιστα, τα γραφήματα επιφάνειας απόκρισης βοηθούν στην οπτικοποίηση των συσχετίσεων ανάμεσα στις πειραματικές συνθήκες και τις μελετούμενες αποκρίσεις. Ειδικότερα, τα τρισδιάστατα διαγράμματα της επιφάνειας απόκρισης αναπαριστούν τη σχέση ανάμεσα σε μία απόκριση και δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, όταν οι υπόλοιπες διατηρούνται σε σταθερά επίπεδα. Μάλιστα, τα γραφήματα επιφάνειας απόκρισης βοηθούν στην οπτικοποίηση των συσχετίσεων ανάμεσα στις πειραματικές συνθήκες και τις μελετούμενες αποκρίσεις. Η RSM εφαρμόζεται όταν μια απόκριση ή ένα σύνολο αποκρίσεων που μας ενδιαφέρουν επηρεάζονται από διάφορες μεταβλητές. Ο στόχος είναι η ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των τιμών αυτών των μεταβλητών για την επίτευξη της καλύτερης απόδοσης του συστήματος. [91]

Μερικά από τα στάδια που εφαρμόζονται στην μέθοδο RSM είναι τα ακόλουθα: [92]

- (1) Η επιλογή ανεξάρτητων μεταβλητών σημαντικών επιδράσεων στο σύστημα μέσω μελετών διαλογής και οριοθέτησης της πειραματικής περιοχής
- (2) Η επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού και η εκτέλεση των πειραμάτων σύμφωνα με την πειραματική περιοχή
- (3) Η μαθηματική-στατιστική επεξεργασία των πειραματικών αποκρίσεων που λαμβάνονται με βάση τα πειραματικά δεδομένα μέσω της προσαρμογής μιας πολυωνυμικής συνάρτησης
- (4) Η αξιολόγηση της καταλληλότητας του μοντέλου
- (5) Η επαλήθευση της δυνατότητας εκτέλεσης του πειράματος στις βέλτιστες συνθήκες που καθορίστηκαν
- (6) Η απόκτηση των βέλτιστων τιμών για κάθε μεταβλητή που μελετήθηκε

Το βασικότερο πλεονέκτημα της RSM είναι ότι μειώνει τον αριθμό πειραματικών δοκιμών, εξοικονομώντας ενέργεια, χρόνο και πρώτες ύλες, καθώς ταυτόχρονα βελτιώνεται η ποιότητα των πληροφοριών που λαμβάνονται από τα αποτελέσματα σε σύγκριση με την μεμονωμένη μελέτη κάθε μεταβλητής. Χρησιμοποιείται ευρέως για βελτιστοποίηση της εξαγωγής πολυσακχαριτών, ελαίων, φλαβονοειδών, φαινολικών ενώσεων, ανθοκυανινών, διαλυτών σακχάρων, πρωτεϊνών και πολυφαινολών από διαφορετικά φυτικά υλικά. [93]

### 1.5.2. Πειραματικός Σχεδιασμός Box-Behnken

Ο σχεδιασμός Box-Behnken είναι ένα εργαλείο της μεθοδολογίας της επιφάνειας απόκρισης μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η βελτιστοποίηση των πειραματικών δοκιμών και προκύπτει ένα μοντέλο πρόβλεψης. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί ευρέως στον προσδιορισμό των βέλτιστων παραμέτρων εκχύλισης σε φυτικές πρώτες ύλες. [94] Χρησιμοποιείται, επίσης, σε φαρμακευτικά προϊόντα, στη βιοεπεξεργασία, στη μηχανική τροφίμων και σε άλλες βιομηχανίες εξαγωγής βιολογικών δραστικών ενώσεων που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση. [95]



Πρόκειται για έναν ανεξάρτητο τετραγωνικό σχεδιασμό, ο οποίος βασίζεται σε έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό τριών επιπέδων (χαμηλό, ενδιάμεσο, υψηλό). Η γεωμετρική αναπαράστασή του είναι ένα σύνολο σημείων τοποθετημένα στα μέσα των ακμών ενός κύβου συν το κεντρικό σημείο, το οποίο επαναλαμβάνεται. Η μέθοδος αυτή είναι εύκολη στην παρατήρηση των σημείων, αφού απουσιάζουν σημεία στα άκρα της κυβικής περιοχής. Η ανάπτυξη του μοντέλου Box-Behnken πραγματοποιείται με βάση τον αριθμό των πειραμάτων (N), ο οποίος ορίζεται ως  $N = 2k(k - 1) + C_0$ , όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων και το  $C_0$  είναι ο αριθμός των κεντρικών σημείων. Όλα τα επίπεδα συντελεστών πρέπει να προσαρμόζονται σε μόνο τρία επίπεδα (-1, 0, +1) με συγκεκριμένα διαστήματα μεταξύ τους. Οι παράγοντες κωδικοποιούνται με βάση την εξίσωση:

$$\text{κωδικοποιημένη μορφή} = \frac{\text{πραγματική τιμή} - 0.5 * (\text{υψηλή τιμή} + \text{χαμηλή τιμή})}{0.5 * (\text{υψηλή τιμή} + \text{χαμηλή τιμή})}$$

Έτσι, προκύπτουν για κάθε παράγοντα τρεις τιμές, με τις δύο ακραίες να ισαπέχουν από την κεντρική. Ένα άλλο πλεονέκτημα του πειραματικού σχεδιασμού BBD είναι ότι δεν περιέχει συνδυασμούς για τους οποίους όλοι οι παράγοντες βρίσκονται ταυτόχρονα στα υψηλότερα ή χαμηλότερα επίπεδα. Συνεπώς αποφεύγονται πειράματα που εκτελούνται σε ακραίες συνθήκες, για τα οποία μπορεί να προκύψουν μη ικανοποιητικά αποτελέσματα. Με άλλα λόγια, δεν ενδείκνυνται για καταστάσεις στις οποίες θα θέλαμε να γνωρίζουμε τις απαντήσεις στα άκρα, δηλαδή στις κορυφές του κύβου. [92], [96], [97]

Ο σχεδιασμός μέσω Box-Behnken αποτελεί μία μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης ιδιαίτερα σημαντική, αφού επιτρέπει τη χρήση μπλοκ, την ανίχνευση ελλιπούς προσαρμογής του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα, την κατασκευή διαδοχικών σχεδίων και την εκτίμηση των παραμέτρων του τετραγωνικού μοντέλου. [96]

## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1. Σκοπός

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτελεί η σύνθεση υδρογελών χιτοζάνης με χρήση πράσινων διαλυτών, οι οποίες θα έχουν την ικανότητα να προσροφούν διατροφικά λιπίδια και νερό από τον οργανισμό, με απώτερο στόχο τη χρήση τους σε διατροφικά συμπληρώματα για τον έλεγχο του σωματικού βάρους. Η βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής των υδρογελών θα πραγματοποιηθεί μέσω του προγράμματος Box-Behnken για τριπλό επίπεδο

εξάρτησης. Στις υδρογέλες με τη βέλτιστη σύσταση θα ενσωματωθεί εκχύλισμα φύλλων ελιάς.

Η συγκεκριμένη μελέτη ξεκίνησε με την επιλογή του κατάλληλου NaDES, το οποίο πρέπει να έχει τις επιθυμητές ιδιότητες, προκειμένου να μπορεί να διαλύσει τη χιτοζάνη. Σημαντικό ρόλο σε αυτή την επιλογή διαδραμάτισε το pH του διαλύτη αυτού και το ιξώδες του. Έπειτα, από μελέτη διαφόρων διαλυτών, η τελική επιλογή του διαλύτη προέκυψε από το συνδυασμό της χλωριούχου χολίνης με το γαλακτικό οξύ σε αναλογία 1:2, ο οποίος αποτελεί μία πράσινη εναλλακτική στο πλαίσιο παρασκευής υδρογελών. Σημειώνεται ότι παράλληλα με το NaDES αυτό παρασκευάστηκε και ένα επιπλέον, αποτελούμενο από γλυκόζη, από γαλακτικό οξύ και νερό (Glu:LA:W 1:5:6.2). Στη συνέχεια, με χρήση του λογισμικού Design Expert, πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση των πειραμάτων, με βάση τις μεταβλητές που καθορίστηκαν. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές εξετάστηκαν: η περιεκτικότητα (% v/v) του διαλύματος του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES) που παρασκευάστηκε (ChCl:LA 1:2), η περιεκτικότητα της χιτοζάνης (% w/v), αλλά και η περιεκτικότητα (% v/v) του επιφανειοδραστικού παράγοντα Tween 80. Οι υδρογέλες αξιολογούνται με βάση την ικανότητα διόγκωσής τους, την ικανότητα συγκράτησης νερού και την ικανότητα απορρόφησης ελαίου. Η βελτιστοποίηση της πράσινης διεργασίας επιτεύχθηκε με την χρήση του πειραματικού σχεδιασμού Bow-Behnken τριών επιπέδων. Έπειτα, παρασκευάστηκαν οι υδρογέλες με τη βέλτιστη σύσταση και αξιολογήθηκαν εκ νέου ως προς της ικανότητα διόγκωσής τους, συγκράτησης νερού και απορρόφησης ελαίου. Έτσι, πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση του βελτιστοποιημένου μοντέλου που προτάθηκε από τον πειραματικό σχεδιασμό και εξετάστηκε η επαναληψιμότητα των αποκρίσεων. Τελικά, στην υδρογέλη με τη βέλτιστη σύσταση ενσωματώθηκε και το εκχύλισμα ελαίου, το οποίο παρασκευάστηκε εκχυλίζοντας με τη μέθοδο των υπερήχων τα φύλλα ελιάς, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το ChCl:LA. Η υδρογέλη αυτή μελετήθηκε και ως προς την ικανότητα διόγκωσής της, την ικανότητα συγκράτησης νερού που παρουσιάζει και την ικανότητα απορρόφησης ελαίου, προκειμένου να γίνει σύγκριση με εκείνη που παρασκευάστηκε με το διάλυμα ChCl:LA και να καθοριστούν οι πιθανές διαφορετικές ιδιότητες που προσδίνονται.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε δομικός χαρακτηρισμός των υδρογελών, αλλά και των διαλυμάτων διαφορετικής περιεκτικότητας του NaDES που παρασκευάστηκαν μέσω φασματομετρίας υπερύθρου (FT-IR). Στόχος ήταν η σύγκριση των υδρογελών που προέκυψαν με διαλύτη το NaDES με εκείνες που προέκυψαν από απλή ανάμιξη της χιτοζάνης με το φυσικό μίγμα χλωριούχου χολίνης-γαλακτικού οξέος. Όσον αφορά στα διάφορα διαλύματα NaDES που παρασκευάστηκαν, στόχος ήταν να μελετηθεί η επίδραση του νερού στους διαλύτες αυτούς και πώς αυτό επηρεάζει τις ιδιότητές τους. Τέλος, η υδρογέλη που παρασκευάστηκε με το NaDES, αφού μελετήθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, συγκρίθηκε με την υδρογέλη που παρασκευάστηκε με το φυσικό μίγμα των επιμέρους συστατικών της, προκειμένου να ταυτοποιηθεί η ατομική και η

μοριακή δομή τους, ενώ μελετήθηκε και η επίδραση της περιεκτικότητας του διαλύματος NaDES που χρησιμοποιείται.

Ακόμη, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των δύο εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν από τα 2 NaDES (ChCl:LA και Glu:LA:W) μέσω της μεθόδου υπολογισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH, ενώ πραγματοποιήθηκε και αξιολόγηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης στο εκχύλισμα NaDES ChCl:LA (E:ChCl/LA), αλλά και στην υδρογέλη που παρασκευάστηκε από αυτό.

## 2.2. Όργανα, συσκευές και αντιδραστήρια

Στους πίνακες 1 και 2 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα όργανα, οι συσκευές και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση όλης της πειραματικής διαδικασίας.

Πίνακας 1: Εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας

Όργανο / Σκεύος	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210 mg)	Kern	ADJ 200-4
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2 mg)	Sartorius	M2P
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	Witeg	MSH-20A
Probe υπερήχων	Sonics & Materials Inc	Vibra cell
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp	ZX4
Λουτρό υπερήχων	Branson	2210 Ultrasonic Bath
Πεχάμετρο	Metrohm	744
Φασματόμετρο FT-IR	Jasco	4200
Φυγόκεντρος	Thermo scientific	Sorvall LYNX 6000
Επωαστήρας (Incubator)	Gallenkamp	
Αντλία κενού	Edwards	RV-5
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Περιστροφικός εξατμιστήρας	Buchi	Rotavapor R-114
Συσκευή λυοφιλίωσης	Frozen In time	Lablyo Mini

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήριο	Μοριακός Τύπος	Προμηθευτής
Νερό (απιονισμένο)	H <sub>2</sub> O	-
Χλωριούχος χολίνη	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> ClNO	Alfa Aesar
Γαλακτικό οξύ	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Labbox

Χιτοζάνη	Glentham Life Sciences	
Υδροχλώριο	HCl	-
DPPH	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	Aldrich
Διαθυλαιθέρας	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	-
Αιθανόλη	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Sigma – Aldrich
Υδροξείδιο του νατρίου	NaOH	Sigma – Aldrich
DMSO	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Alfa Aesar
Tween 80	C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> O <sub>26</sub>	Alfa Aesar
Γλυκόζη	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Sigma – Aldrich

### 2.3. Διαδικασία παρασκευής φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES)

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν τα αρχικά συστατικά, τα οποία επιλέχθηκαν σε συγκεκριμένες μοριακές αναλογίες και, στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε θέρμανση υπό ήπια ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα σε εύρος θερμοκρασιών 60-80 °C για 1 έως 4 ώρες. Στη διάταξη εφαρμόστηκε επίσης κάθετος ψυκτήρας. Το τελικό υγρό πρέπει να είναι διαυγές και ομοιογενές με ένα σχετικά υψηλό ιξώδες, το οποίο αφού αφηθεί για ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αποθηκεύεται σε ξηραντήρα. Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών παρουσιάζεται στην εικόνα 2-1.



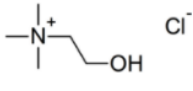
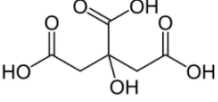
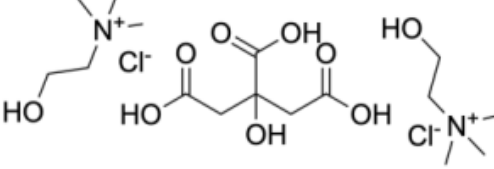
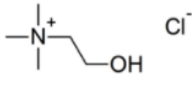
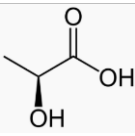
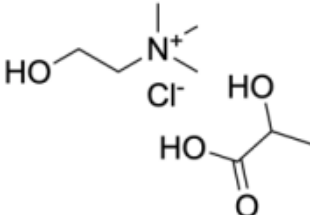
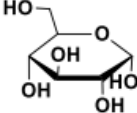
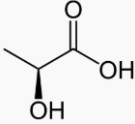
Εικόνα 2-1: Πειραματική διάταξη παρασκευής NaDES με ελεγχόμενη θέρμανση, κάθετο ψυκτήρα και μαγνητική ανάδευση

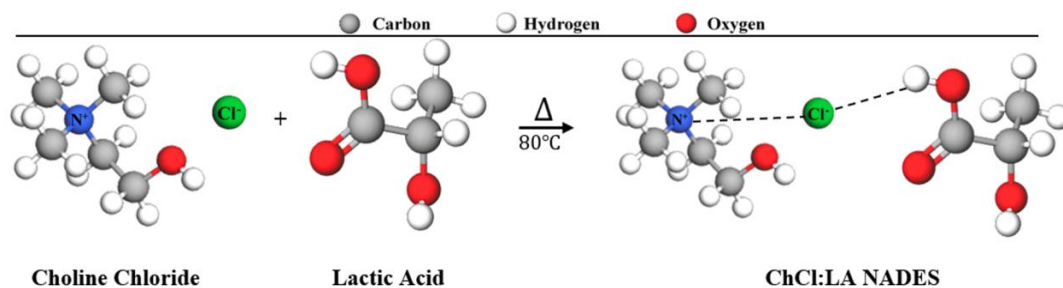
Η θερμοκρασία και ο χρόνος ανάδευσης μεταβάλλονταν ελαφρώς ανάλογα με το επιθυμητό παραγόμενο NaDES. Τα NaDES που παρασκευάστηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3, ενώ οι χημικές δομές τους στον πίνακα 4. Σημειώνεται ότι η συνθετική πορεία για την παρασκευή του NaDES Glu:LA:W διαφέρει ελαφρώς από εκείνη των υπολοίπων NaDES, αφού περιλαμβάνει την ανάμειξη των συστατικών σε μοριακή αναλογία 1:5:6.2.

Πίνακας 3: Συστατικά και συνθήκες παρασκευής NaDES με θέρμανση και ανάδευση

Όνομασία NaDES	Συστατικό 1 (HBA)	Συστατικό 2 (HBD)	Μοριακή Αναλογία	T (°C)	t (h)
<b>ChCl:CA</b>	Χλωριούχος χολίνη	Κιτρικό οξύ	2:1	80	3
<b>ChCl:LA</b>	Χλωριούχος χολίνη	Γαλακτικό οξύ	1:2	60	3
<b>Glu:LA:W</b>	Γλυκόζη	Γαλακτικό οξύ + Νερό	1:5:6.2	60	1

Πίνακας 4: Χημικές δομές NaDES

Όνομασί α NaDES	Συστατικό 1 (HBA)	Συστατικό 2 (HBD)	Χημική δομή NaDES
ChCl:CA			
ChCl:LA			
Glu:LA:W			-



Εικόνα 2-2: Σύνθεση NaDES χλωριούχου χολίνης – γαλακτικού οξέος

Και τα 3 NaDES του πίνακα 3, παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της θέρμανσης. Για τη χλωριούχο χολίνη, η οποία είναι υγροσκοπική, απομακρύνθηκε πρώτα η υγρασία σε αντλία κενού Edwards μέχρι σταθερού βάρους. Κατόπιν, οι ζυγισμένες ποσότητες εισάχθηκαν σε σφαιρική φιάλη. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από τα επιμέρους συστατικά ώστε να επιτευχθούν οι μοριακές αναλογίες που αναγράφονται στον πίνακα 3, παρουσιάζονται στον πίνακα 5. Σημειώνεται ότι σχετικά με το Glu:LA:W, ζυγίστηκαν 10.5214 g γλυκόζης και 26.3041 g υδατικού διαλύματος γαλακτικού οξέος (80%).

Πίνακας 5: Ποσότητες επιμέρους συστατικών για την παρασκευή των NaDES

Όνομασία NaDES	Συστατικό 1 (HBA) (g)	Συστατικό 2 (HBD) (g)
ChCl:CA	10.6706	7.3508
ChCl:LA	10.1729	13.1333
Glu:LA:W	10.5214	26.3041

Σημειώνεται ότι το NaDES χλωριούχου χολίνης – κιτρικού οξέος (ChCl:CA) που παρασκευάστηκε δεν είχε τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, καθώς όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια δεν διέλυσε ικανοποιητικά καμία ποσότητα χιτοζάνης. Επομένως, το NaDES αυτό δεν χρησιμοποιήθηκε σε κάποιο άλλο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Ακόμη, με το NaDES γλυκόζης, γαλακτικού οξέος και νερού (Glu:LA:W) δεν παρασκευάστηκαν υδρογέλες σε πρωταρχικό στάδιο, αλλά χρησιμοποιείται για την εκχύλιση φύλλων ελιάς και, έπειτα, για την παρασκευή υδρογελών με τη βέλτιστη σύσταση, όπως αυτή προέκυψε από τον πειραματικό σχεδιασμό.

## 2.4. Παρασκευή υδρογελών χιτοζάνης

### 2.4.1. Προκαταρκτικά πειράματα

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES) που παρασκευάστηκαν έχουν όξινο pH, επομένως η χιτοζάνη θεωρείται ότι διαλύεται εύκολα σε αυτούς. Ωστόσο, πρέπει να καθοριστούν τόσο τα διαλύματα του NaDES που θα παρασκευαστούν, όσο και η περιεκτικότητα της χιτοζάνης σε κάθε υδρογέλη. Όσον αφορά στα διαλύματα NaDES, παρασκευάστηκαν διαλύματα από 2 % v/v έως και 70 % v/v, έτσι ώστε να μελετηθεί κατά πόσο ένα πυκνό ή ένα αραιό διάλυμα NaDES έχει την ικανότητα να διαλύσει διαφορετικές περιεκτικότητες χιτοζάνης. Σημειώνεται ότι το pH όλων των διαλυμάτων NaDES που παρασκευάστηκαν κυμαίνεται σε πολύ όξινες τιμές (0.95 – 2.13). Έπειτα, όσον αφορά στις περιεκτικότητες της χιτοζάνης σε κάθε υδρογέλη, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές από 10 % w/v έως και 20 % w/v για όλες τις διαφορετικές περιεκτικότητες των διαλυμάτων NaDES που αναφέρθηκαν παραπάνω. Σε κάθε περίπτωση, παραλαμβάνονταν 3 ml από το διάλυμα NaDES και η κατάλληλη ποσότητα χιτοζάνης, ώστε τελικά να παρασκευάζονται οι υδρογέλες με την επιθυμητή περιεκτικότητα χιτοζάνης. Ο όγκος του διαλύματος NaDES παρέμενε σταθερός, έτσι ώστε οι τελικές υδρογέλες να μπορούν να είναι και οπτικά συγκρίσιμες μεταξύ τους. Το Tween 80 δεν προστέθηκε στα προκαταρκτικά πειράματα, αφού δεν θεωρήθηκε ότι διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο στην παρασκευή της υδρογέλης, αλλά στην πρόσδοση ορισμένων χαρακτηριστικών, τα οποία δεν παρουσιάζουν ενδιαφέρον στο πρωταρχικό αυτό στάδιο. Σε όλες τις υδρογέλες με τους διαφορετικούς συνδυασμούς που προέκυψαν, αφού ξηράνθηκαν υπό κατάψυξη, έγιναν πειράματα σχετικά με την ικανότητα διόγκωσης και τη συγκράτηση νερού που μπορούν να επιτύχουν, αλλά και σχετικά με το έλαιο που μπορούν να απορροφήσουν, έτσι ώστε τελικά να καθοριστούν κατάλληλα τα όρια των ανεξάρτητων μεταβλητών, ώστε να επιτυγχάνονται ικανοποιητικά αποτελέσματα για τα εύρη τιμών που τελικά θα επιλεγθούν.

Έπειτα από πληθώρα διαφορετικών δοκιμών με το NaDES χλωριούχου χολίνης – κιτρικού οξέος, σε κανένα συνδυασμό διαλύματος NaDES με περιεκτικότητα χιτοζάνης στα εύρη που αναφέρθηκαν προηγουμένως δεν προέκυψε το επιθυμητό αποτέλεσμα. Φάνηκε ότι η χιτοζάνη δεν μπορούσε να διαλυθεί επαρκώς, ώστε να προκύψει η τελική υδρογέλη σε μία συμπαγή μορφή και με τα χαρακτηριστικά που αναμενόταν να έχει. Για αυτό το λόγο, ο διαλύτης αυτός δεν χρησιμοποιήθηκε σε κάποιο άλλο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας και φυλάχθηκε για μελλοντική χρήση σε άλλες εφαρμογές. Αντίθετα, τα διαλύματα NaDES χλωριούχου χολίνης – γαλακτικού οξέος με περιεκτικότητες από 7 % v/v έως 12 % v/v φαίνεται να διαλύουν ικανοποιητικά τις διαφορετικές περιεκτικότητες χιτοζάνης, επομένως τα εύρη των περιεκτικότητων των διαλυμάτων NaDES περιορίστηκαν σε αυτές τις τιμές με το pH τους να κυμαίνεται από 1.65 έως 1.85. Τα πιο πυκνά και τα πιο αραιά διαλύματα NaDES παρασκευάστηκαν με σκοπό να χαρακτηριστούν δομικά με φασματοσκοπία υπέρυθρου FT-IR, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.6.1.

Πιο συγκεκριμένα, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε γυάλινο βial των 30 ml, προστίθεται ορισμένη μάζα χιτοζάνης, ανάλογα με την περιεκτικότητα που επιθυμείται να επιτευχθεί. Ακόμη, τοποθετείται μαγνητικός αναδευτήρας και το βial στηρίζεται πάνω από ένα θερμαινόμενο μάτι. Στη συγκεκριμένη διαδικασία, δεν επιθυμείται θέρμανση, παρά μόνο ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, με σιφώνι των 5 ml, προστίθενται στάγδην 3 ml διαλύματος NaDES επιθυμητής περιεκτικότητας και το μίγμα αφήνεται να αναδευτεί με ήπιο τρόπο για περίπου 30 min, μέχρις ότου να αποκτήσει συμπαγή και διαυγή μορφή υδρογέλης, όπως αυτή της εικόνας 2-3. Μετά το πέρας του διαστήματος των 30 min, η ανάδευση σταματά, αφαιρείται ο μαγνητικός αναδευτήρας και η υδρογέλη που παρασκευάστηκε οδηγείται σε ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying), με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας της. Στη συνέχεια, μελετάται η ικανότητα διόγκωσής της, η ικανότητα συγκράτησης νερού και η ικανότητα απορρόφησης ελαίου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5, με τα αποτελέσματα να καταγράφονται ώστε να μπορέσουν να προσδιοριστούν τα όρια του πειραματικού σχεδιασμού.





Εικόνα 2-3: Πειραματική διάταξη παρασκευής υδρογέλης χιτοζάνης με NaDES

## 2.4.2. Πειραματικός Σχεδιασμός – Design of Experiments (DoE)

Αφού πραγματοποιηθούν τα προκαταρκτικά πειράματα που περιγράφηκαν στην ενότητα 2.4.1. και λήφθηκαν τα αποτελέσματα των εξαρτημένων μεταβλητών για υδρογέλες με διαφορετική σύσταση, καθορίστηκαν τα άνω και τα κάτω όρια των τριών παραμέτρων οι οποίες αποφασίστηκε να μελετηθούν. Εξετάστηκε, δηλαδή, η επίδραση της περιεκτικότητας (% v/v) του διαλύματος του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη που παρασκευάστηκε (ChCl:LA), της περιεχόμενης χιτοζάνης, αλλά και του επιφανειοδραστικού παράγοντα Tween 80. Με σκοπό τον καθορισμό των βέλτιστων τιμών των τριών αυτών παραμέτρων, διεξάγεται ένας πειραματικός σχεδιασμός Box Benhken Design τριών παραγόντων, τριών επιπέδων ( $3^3$ ) για τη στατιστική βελτιστοποίηση της σύστασης παρασκευής των υδρογελών. Η κατασκευή και η εκτίμηση του πειραματικού σχεδιασμού πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Design- Expert® Έκδοση 12, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA. Οι υδρογέλες αξιολογούνται με βάση την ικανότητα διόγκωσής τους, την ικανότητα συγκράτησης νερού και την ικανότητα απορρόφησης ελαίου. Σημαντική κρίθηκε η προσθήκη του Tween 80 στις υδρογέλες, το οποίο δρα ως επιφανειοδραστικό, καθιστώντας τις υδρογέλες πιο ομοιογενείς.

Οι παράμετροι και οι αποκρίσεις που εξετάζονται παρουσιάζονται στον πίνακα 6:

Πίνακας 6: Παράμετροι και αποκρίσεις που εξετάζονται κατά τον πειραματικό προσδιορισμό

Παράμετροι-Ανεξάρτητες Μεταβλητές	Αποκρίσεις-Εξαρτημένες Μεταβλητές
Περιεκτικότητα NaDES (% v/v)	Ποσοστό Διόγκωσης (Swelling Ratio) (%)
Περιεκτικότητα CS (% w/v)	Ποσοστό Συγκράτησης Νερού (Water Retention) (%)
Περιεκτικότητα Tween 80 (% v/v)	Απορροφούμενο Έλαιο (Absorbed Oil) (mg)

Τα όρια που τέθηκαν στις ανεξάρτητες μεταβλητές παρουσιάζονται στον πίνακα 7:

Πίνακας 7: Όρια ανεξάρτητων μεταβλητών

Παράμετροι	Μονάδες	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Coded Low	Coded High	M.O	Std. Dev.
NaDES	% v/v	7.0	12.0	-1↔7.0	+1↔12.0	9.5	1.96
CS	% w/v	15.0	20.0	-1↔15.0	+1↔20.0	17.5	1.96
Tween 80	% w/v	0.50	2.00	-1↔0.50	+1↔2.00	1.25	0.59

Ακολουθεί πίνακας με τις τιμές των παραμέτρων των προτεινόμενων πειραμάτων, οι οποίες προέκυψαν μέσω του Design Expert. Σημειώνεται ότι το διάλυμα NaDES 7% v/v είχε τιμή pH ίση με 1.70, το διάλυμα NaDES 9.5% v/v είχε τιμή pH ίση με 1.62 και, τέλος, το διάλυμα NaDES 12% v/v ίση με 1.48.

Πίνακας 8: Τιμές παραμέτρων των προτεινόμενων πειραμάτων

Run	Factor 1 A: NaDES (%v/v)	Factor 2 B: CS (%w/v)	Factor 3 C: Tween 80 (%v/v)
1	12.0	15.0	1.25
2	9.5	20.0	2.00
3	12.0	20.0	1.25
4	9.5	17.5	1.25
5	9.5	20.0	0.50
6	7.0	17.5	0.50
7	12.0	17.5	2.00
8	7.0	20.0	1.25
9	9.5	15.0	2.00
10	9.5	17.5	1.25
11	12.0	17.5	0.50
12	7.0	15.0	1.25
13	7.0	17.5	2.00

14

9.5

15.0

0.50

### 2.4.3. Προσδιορισμός της βέλτιστης υδρογέλης

Στόχος του πειραματικού σχεδιασμού είναι η βελτιστοποίηση της σύστασης της υδρογέλης αυξάνοντας στον μέγιστο βαθμό την ικανότητα διόγκωσής της, την ικανότητα συγκράτησης νερού και την ικανότητα απορρόφησης ελαίου. Μετά την διεξαγωγή των 14 πειραμάτων προέκυψαν τα αποτελέσματα του πίνακα 9:

Πίνακας 9: Αποκρίσεις των 14 πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού

Run	Factor 1 R1: Swelling Ratio (%)	Factor 2 R2: Water Retention (%)	Factor 3 R3: Absorbed Oil (mg)
1	123	223	54.1
2	100	88	63.2
3	52	48	177.2
4	60	23	66.4
5	28	15	230.5
6	83	25	343.4
7	100	42	101.1
8	108	113	23.5
9	92	36	89.5
10	87	1	103.3
11	129	34	92.4
12	67	69	37.4
13	69	43	75.3
14	50	49	281.8

Στα παραπάνω αποτελέσματα, μέσω του προγράμματος Design Expert 12, γίνεται στατιστική μελέτη και επιλέγεται το κατάλληλο μοντέλο παλινδρόμησης, έτσι ώστε οι ανεξάρτητες μεταβλητές να συσχετίζονται όσο το δυνατόν περισσότερο. Τελικά, η βέλτιστη σύσταση για την υδρογέλη που προέκυψε, η οποία, με βάση τη στατιστική μελέτη, θα δίνει ταυτόχρονα τις μέγιστες αποκρίσεις των εξαρτημένων μεταβλητών, παρουσιάζεται στον πίνακα 10:

Πίνακας 10: Τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών για τη βέλτιστη υδρογέλη

A: NaDES (%v/v)	B: CS (%w/v)	C: Tween 80 (%v/v)
7.00	20.0	0.55

Τέλος, αφού προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες τιμές των εξαρτημένων μεταβλητών, πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση του μοντέλου (Confirmation), προκειμένου να επιβεβαιωθεί εάν η σύσταση της υδρογέλης που προσδιορίστηκε είναι όντως εκείνη που δίνει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

## 2.5. Χαρακτηρισμός υδρογελών

### 2.5.1. Προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης – Swelling Ratio (SR)

Όλες οι υδρογέλες τόσο των προκαταρκτικών πειραμάτων όσο και του πειραματικού σχεδιασμού, αφού παρασκευαστούν, υπόκεινται σε ξήρανση με κατάψυξη / Freeze Drying (λυοφιλοποίηση), προκειμένου να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα υγρασίας που περιέχεται σε αυτές. Στη συνέχεια, παραλαμβάνεται ποσότητα από 0.2 έως 0.7 g της κάθε υδρογέλης και εισάγεται σε φιαλίδιο που περιέχει διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl) 0.1 N με pH ίσο με 1.2. Ο προσδιορισμός του ρυθμού διόγκωσης πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας τιμές της μάζας των διογκωμένων υδρογελών στα χρονικά διαστήματα 2 min, 5 min, 7 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 75 min, 90 min, 105 min και 120 min. Η μέτρηση της μάζας των διογκωμένων υδρογελών πραγματοποιήθηκε μετά από την αφαίρεση της υδρογέλης από το φιαλίδιο και την απομάκρυνση της επιφανειακής περίσσειας HCl με διηθητικό χαρτί, ώστε τελικά οι μετρήσεις που λαμβάνονται να αφορούν μόνο στην προσροφούμενη ποσότητα διαλύματος HCl στην υδρογέλη.

Η ικανότητα διόγκωσης υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση που ακολουθεί:

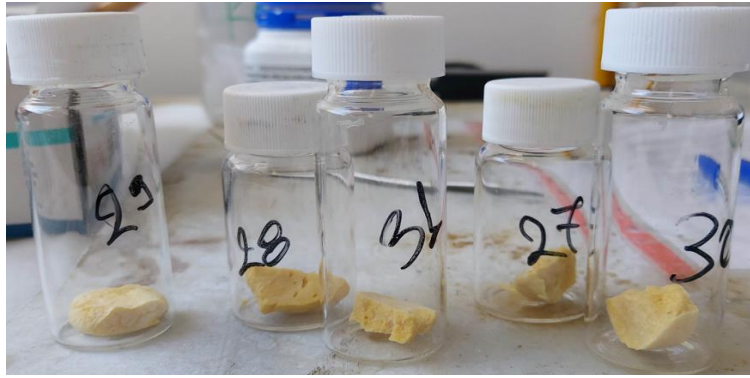
$$SR (\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} * 100 \quad (1)$$

Όπου:

$SR$ , η ικανότητα διόγκωσης (%)

$W_s$ , η μάζα της διογκωμένης υδρογέλης (mg)

$W_d$ , η μάζα της ξηρής υδρογέλης που ζυγίστηκε στο χρόνο 0 min (mg)



Εικόνα 2-4: Ξηρή και διογκωμένη υδρογέλη πριν και μετά τον προσδιορισμό της ικανότητας διόγκωσής της

## 2.5.2. Προσδιορισμός ικανότητας συγκράτησης του νερού – Water Retention Ratio (WRR)

Η ικανότητα συγκράτησης του νερού προσδιορίζεται από το χρονικό σημείο όπου η υδρογέλη έχει φτάσει στο σημείο ισορροπίας, όπου θεωρείται ότι η μάζα της διατηρείται πρακτικά σταθερή. Μετά το πέρας της χρονικής στιγμής όπου η γέλη συγκρατεί τη μεγαλύτερη ποσότητα νερού που είναι σε θέση να συγκρατήσει, θεωρείται ότι η μάζα της υδρογέλης διατηρείται. Το ποσοστό συγκράτησης νερού εκφράζεται ως το ποσοστό της ποσότητας του νερού που συγκρατείται σε σχέση με τη μάζα της ξηρής υδρογέλης που ζυγίστηκε στο χρόνο 0 min. Η ικανότητα συγκράτησης νερού υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$WRR (\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} * 100 \quad (2)$$

Όπου:

$WRR$ , το ποσοστό συγκράτησης νερού (%)

$W_s$ , η μάζα της διογκωμένης υδρογέλης – Σημείο ισορροπίας (mg)

$W_d$ , η μάζα της ξηρής υδρογέλης που ζυγίστηκε στο χρόνο 0 min (mg)

Σημαντικός είναι ο καθορισμός της χρονικής στιγμής όπου θεωρείται ότι η υδρογέλη έχει φτάσει στο σημείο ισορροπίας και έχει συγκρατήσει τη μέγιστη δυνατή ποσότητα νερού που θα μπορούσε για συνολικό χρόνο 2 ωρών.

### 2.5.3. Προσδιορισμός ικανότητας απορρόφησης ελαίου – Oil Absorption

Η μελέτη απορρόφησης ελαίου γίνεται με πεπτικό χημικό πειραματικό μοντέλο, το οποίο επιτρέπει την προσομοίωση των *in vivo* αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο στομάχι του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, σε ένα ποτήρι ζέσης προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl) 0.1 N με pH = 1.2, το οποίο φέρεται σε θερμοκρασία 37 °C. Με αυτόν τον τρόπο, γίνεται προσομοίωση του γαστρικού περιβάλλοντος και επιτρέπεται η μίμηση στο εργαστήριο των *in vivo* αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στο στομάχι. Στη συνέχεια, ποσότητα υδρογέλης ίση με 0.2 – 0.6 g προστίθεται στο διάλυμα και αναδεύεται ήπια για 1 h ήπια, προσεγγίζοντας τις συνθήκες του στομάχου κατά την πέψη. Έπειτα, προστίθεται ποσότητα ελαίου και συγκεκριμένα ελαιόλαδο και η ανάδευση συνεχίζεται για ακόμη 30 min. Μετά το πέρας των 30 min, η υδρογέλη αφαιρείται από το διάλυμα και απομακρύνεται η εξωτερική ποσότητα ελαίου και HCl με διηθητικό χαρτί, έτσι ώστε να μπορέσει να υπολογιστεί η ποσότητα του ελαίου που συγκρατήθηκε αποκλειστικά στο εσωτερικό της υδρογέλης. Η υδρογέλη μεταφέρεται σε κενό vial όπου γίνονται τρεις εκπλύσεις με διαιθυλαιθέρα, ο οποίος δεσμεύει το ελαιόλαδο που απορροφήθηκε από τη γέλη. Ο αιθέρας με το ελαιόλαδο που συγκράτησε αποχύνεται σε προζυγισμένη κενή και καθαρή σφαιρική φιάλη, υφίσταται εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα κατάλληλο για την εξάτμιση διαλυτών και τη συμπύκνωση διαλυμάτων και, τέλος, η σφαιρική φιάλη ζυγίζεται εκ νέου, προκειμένου να προσδιοριστεί η μάζα του ελαιόλαδου που απορροφήθηκε από την υδρογέλη.

## 2.6. Δομικός χαρακτηρισμός υδρογελών και διαλυμάτων NaDES

### 2.6.1. Φασματοσκοπία υπέρυθρου FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy FT-IR)

Η φασματομετρία υπέρυθρου FT-IR αποτελεί ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο μοριακής εξειδίκευσης κατάλληλο για ανάλυση δειγμάτων χωρίς προετοιμασία σε λιγότερο από 1 min. Χρησιμοποιείται για τη λήψη υπέρυθρου φάσματος απορρόφησης, εκπομπής και φωτοαγωγιμότητας. Ο μετασχηματισμός Fourier στην υπέρυθρη φασματοσκοπία, χρησιμοποιεί μία μαθηματική διαδικασία για να μεταφράσει τα ακατέργαστα δεδομένα στο πραγματικό φάσμα.

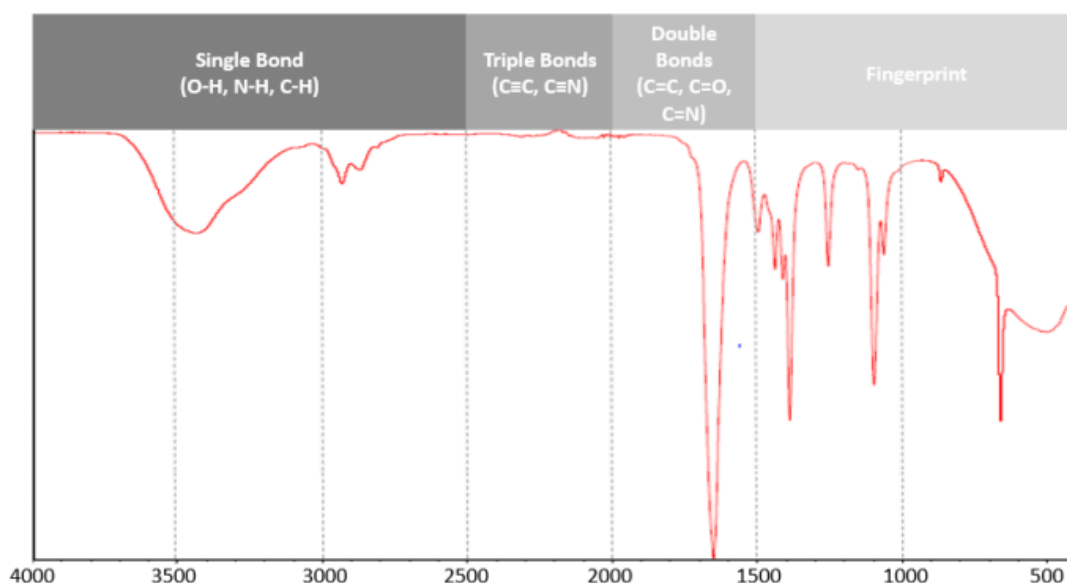
Τα δείγματα που μπορούν να χαρακτηρισθούν με FT-IR είναι στερεά, υγρά και αέρια. Το FT-IR προσδιορίζει την ύπαρξη οργανικών και ανόργανων ενώσεων και πολυμερικών υλικών στο δείγμα υπό μελέτη. Η ταυτοποίηση γίνεται με υπέρυθρο φως για τη σάρωση των δειγμάτων. Αλλαγές στον χαρακτηρισμό της απορρόφησης υποδηλώνουν μια αλλαγή στη σύνθεση του υλικού. Η FT-IR

ανάλυση είναι χρήσιμη για τον χαρακτηρισμό άγνωστων υλικών, εντοπισμό πρόσθετων και εντοπισμό οξειδωσης και αποσύνθεσης. [98], [99]

Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας, δείγματα NaDES, αλλά και φυσικών μιγμάτων των επιμέρους συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για να παρασκευαστούν, εκτίθενται σε υπέρυθη ακτινοβολία όπου μερικό μέρος της απορροφάται και μετατρέπεται σε δονητική ή περιστροφική ενέργεια και το υπόλοιπο μέρος της περνά διαμέσου χωρίς καμία μεταβολή. Το σήμα που τελικά καταλήγει στον ανιχνευτή (τελικό σήμα) είναι ένα φάσμα από 4000 έως 400  $\text{cm}^{-1}$  το οποίο αντιπροσωπεύει το μοριακό αποτύπωμα του δείγματος υπό μελέτη. Κάθε μόριο έχει μοναδικό δακτυλικό αποτύπωμα καθιστώντας το FT-IR χρήσιμο για χημική ταυτοποίηση. [98]

Ένα τυπικό φάσμα FT-IR παρουσιάζει την μετάδοση (Transmission) συναρτήσει του κυματαριθμού (Wavenumber). Το φάσμα χωρίζεται σε τέσσερις περιοχές, όπως φαίνεται και στην εικόνα 2-5.

- Περιοχή απλού δεσμού / Single Bond ( $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ )
- Περιοχή τριπλού δεσμού / Triple Bonds ( $2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ )
- Περιοχή διπλού δεσμού / Double Bonds ( $2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ )
- Δακτυλικό αποτύπωμα / Fingerprint ( $1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$ )



Εικόνα 2-5: Τυπικό φάσμα FT-IR [100]

## 2.6.2. Κρυσταλλογραφία ακτίνων X (X-ray crystallography / XRD)

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της ατομικής και της μοριακής δομής ενός κρυστάλλου. Πρόκειται για μία αναλυτική

τεχνική στην οποία χρησιμοποιούνται ακτίνες X για να προσδιοριστεί με ακρίβεια η θέση των ατόμων σε κρυσταλλικό στερεό, δηλαδή η ατομική δομή. Μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα κρυσταλλικών στερεών, αποτελούμενο είτε από διακριτά άτομα και μόρια είτε από πολύπλοκες δομές συμπεριλαμβανομένων ανόργανων και οργανομεταλλικών συμπλόκων, φυσικών προϊόντων και βιολογικών μακρομορίων.

Συγκεκριμένα, η δέσμη προσπιπτουσών ακτίνων X περιθλάται σε πολλές ειδικές κατευθύνσεις λόγω των κρυσταλλικών μορίων που περιέχονται. Έτσι, ο κρυσταλλογράφος μπορεί να παράξει μία τρισδιάστατη εικόνα της πυκνότητας των ηλεκτρονίων στον κρύσταλλο, μετρώντας τις γωνίες και τις εντάσεις αυτών των περιθλώμενων δεσμών. Από αυτή την ηλεκτρονική πυκνότητα, μπορούν να προσδιοριστούν οι μέσες θέσεις των ατόμων στον κρύσταλλο, καθώς και οι χημικοί δεσμοί και η αταξία τους.

## 2.7. Εκχύλιση φύλλων ελιάς με NaDES και υπερήχους

### 2.7.1. Προετοιμασία φύλλων ελιάς (πρώτη ύλη)

Τα φύλλα ελιάς αποτελούν σημαντικά παραπροϊόντα της γεωργικής παραγωγής στην Ελλάδα και είναι δυνατόν να παραληφθούν σημαντικές ποσότητες βιοδραστικών ενώσεων από αυτά. Τα εκχυλίσματα των ελαίων γενικά θεωρούνται υψηλής προστιθέμενης αξίας, αφού περιέχουν μεγάλη ποσότητα βιοδραστικών ενώσεων. Σε συνεργασία με τον πράσινο διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση, οι βιοδραστικές ενώσεις παραλαμβάνονται σε μεγάλο ποσοστό και ενσωματώνονται στον διαλύτη, ο οποίος χρησιμοποιείται στη συνέχεια για περαιτέρω χρήση.

Έτσι, λοιπόν, αφού συλλέχθηκαν, πλύθηκαν με άφθονο νερό για να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες και η σκόνη που περιείχαν. Στη συνέχεια, αφέθηκαν για φυσική ξήρανση σε σκιερό μέρος σε ατμοσφαιρικό αέρα για διάστημα περίπου μίας εβδομάδας. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος, τεμαχίστηκαν με πολυκόφτη και τρίφτηκαν σε γουδί, από όπου συλλέχθηκαν ως πούδρα φύλλων ελιάς με κοκκομετρία περίπου ίση με 212 nm. Τελικά, η αποθήκευσή τους έγινε σε σκουρόχρωμα γυάλινα φυαλίδια σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία ίση με 4°C, με σκοπό να διατηρούν τις περισσότερες από τις ιδιότητές τους αναλλοίωτες μέχρι να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω. Η πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε σε μορφή πούδρας, ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής της με τον διαλύτη και να βελτιωθεί η μεταφορά μάζας των βιοενεργών ενώσεων από το στερεό στο υγρό.



## 2.7.2. Διεργασία εκχύλισης φύλλων ελιάς υποβοηθούμενη με υπερήχους

Ζυγίζονται σε καθαρό γυάλινο σκεύος 15 g βαθέως ευτηκτικού διαλύτη χλωριούχου χολίνης : γαλακτικού οξέος, ο οποίος παρασκευάστηκε με τον τρόπο που προαναφέρθηκε, και προστίθενται 830 mg πούδρας φύλλων ελιάς. Το σκεύος μεταφέρεται σε παγόλουτρο, με σκοπό να υπάρχει συνεχής ψύξη του μίγματος καθ' όλη τη διάρκεια των υπερήχων. Το παγόλουτρο μαζί με το γυάλινο σκεύος τοποθετείται στο probe υπερήχων. Σημειώνεται ότι το probe υπερήχων πρέπει να είναι βυθισμένο στο δείγμα, αλλά να μην ακουμπά στον πυθμένα του σκεύους, έτσι ώστε να μην υπάρχει η πιθανότητα θραύσης του. Το σύστημα αφήνεται να εκχυλιστεί για 15 min σε θερμοκρασία 37 °C. Μετά το τέλος της εκχύλισης, το δείγμα παραλαμβάνεται από το γυάλινο σκεύος και μεταφέρεται σε κατάλληλα φιαλίδια φυγοκέντρησης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 7000 στροφές για διάστημα 15 λεπτών. Το τελικό εκχύλισμα παραλαμβάνεται, αφού πρώτα έχει διηθηθεί υπό κενό και φυλάσσεται σε γυάλινα σκεύη σε σκοτεινό μέρος υπό ψύξη μέχρι να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και με τον βαθέως ευτηκτικό διαλύτη γλυκόζη, γαλακτικού οξέος και νερού σε αναλογία 1:5:6.2 που επίσης παρασκευάστηκε σε προηγούμενο στάδιο. Τα δύο NaDES που παρασκευάστηκαν δεν είχαν ιδιαίτερα υψηλό ιξώδες, επομένως δεν παρατηρήθηκε δυσκολία στη διήθηση και στην παραλαβή του εκχυλίσματος.



Εικόνα 2-6: Συσκευή εκχύλισης με υπερήχους



Εικόνα 2-7: Διήθηση υπό κενό εκχυλίσματος NaDES

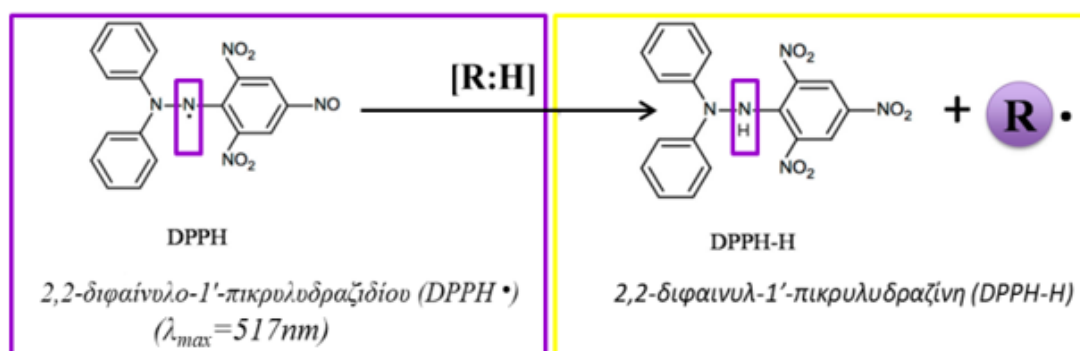
Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης φύλλων ελιάς με τους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες που παρασκευάστηκαν (χλωριούχος χολίνη : γαλακτικό οξύ 1:2 και γλυκόζη, γαλακτικού οξέος και νερού σε αναλογία 1:5:6.2), πραγματοποιείται ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών τους και, στη συνέχεια, τα παραγόμενα εκχυλίσματα ενσωματώνονται στις υδρογέλες. Αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν τα εκχυλίσματα μόνο στις βέλτιστες συνθήκες των υδρογελών που παρουσιάζονται στην ενότητα 2.4.3, όπως αυτές προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό που αναλύθηκε. Οι υδρογέλες αυτές αξιολογούνται ως προς την ικανότητα διόγκωσής τους, την ικανότητα συγκράτησης νερού, αλλά και την ικανότητα απορρόφησης ελαίου, έτσι ώστε να συγκριθούν και με εκείνες που έχουν προκύψει με διαλύτη το NaDES. Τέλος, προκειμένου να αξιολογηθούν τα NaDES με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, προσδιορίζεται η ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH.

Για ευκολία, στο εξής ο συμβολισμός των παραγόμενων εκχυλισμάτων είναι *E/ChCl:LA* για το NaDES χλωριούχου χολίνης : γαλακτικού οξέος (ChCl:LA) και *E/Glu:LA* για το NaDES γλυκόζης, γαλακτικού οξέος και νερού (Glu:LA:W).

### 2.7.3. Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας του 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ή DPPH•) με την αλληλεπίδρασή της με τα αντιοξειδωτικά μόρια. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH πραγματοποιείται τόσο στα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν όσο και στις

υδρογέλες που παρασκευάστηκαν μέσω μιας φασματοφωτομετρικής μεθόδου. Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε ενός ατόμου υδρογόνου (HAT). Συγκεκριμένα, πρόκειται για μία σταθερή και εμπορικά διαθέσιμη ρίζα αζώτου που απορροφά στο ορατό και υπεριώδες μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος με μέγιστο μήκος κύματος τα 515 nm, ενώ δεν αποσυντίθεται, δε διμερίζεται και δεν αντιδρά με το οξυγόνο. Το αρχικό χρώμα είναι μωβ, ενώ όταν αντιδρά με αντιοξειδωτικά, δηλαδή άλλες ρίζες, ηλεκτρόνια ή άτομα υδρογόνου, η υδραζίνη που προκύπτει είναι αποχρωματισμένη. Οι διαλύτες πρέπει να είναι οργανικοί, καθώς η ρίζα είναι υδρόφοβη. Το DPPH δεν δρα επιλεκτικά ως προς μία συγκεκριμένη αντιοξειδωτική δράση, αλλά ως προς τη συνολική του δείγματος προς επεξεργασία. Οι αντιδράσεις αυτές είναι πολύ φωτοευαίσθητες για αυτό και κατά την πραγματοποίησή τους πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στο φως στο οποίο εκτίθεται η ρίζα DPPH. [101], [102]



Εικόνα 2-8: Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Ανάλογα με το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει η απορρόφηση σε μία σταθερή τιμή, η κινητική συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών διακρίνεται σε γρήγορη <5 min, ενδιάμεση 5-30 min και αργή >30 min. Κάποια αντιοξειδωτικά απαιτούν πολικούς διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη), ενώ γίνεται χρήση αιθυλακετόνης και χλωροφόρμιου για την εκχύλιση λιποφιλικών αντιοξειδωτικών. Έχει, επίσης, παρατηρηθεί ότι σε αυτό το στάδιο η προσθήκη νερού βελτιστοποιεί την απόδοση της εκχύλισης. Μικρή σημασία φαίνεται να έχει το pH του διαλύματος σε περιπτώσεις χρήσης αιθανόλης ή μεθανόλης. [98]

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, είτε μετρώντας το ποσοστό του DPPH που παραμένει μετά τις αντιδράσεις, είτε μετρώντας το χρόνο που απαιτείται για να καταλήξει σε μία σταθερή τιμή συγκέντρωσης αντιοξειδωτικού που προκαλεί τη μείωση του DPPH κατά 50%. Τα όργανα και τα αντιδραστήρια τα οποία απαιτήθηκαν κατά τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης παρουσιάζονται στον πίνακα 11. [97]

Πίνακας 11: Υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθερής ρίζας DPPH

Υλικά	Όνομασία	Προμηθευτής
	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich
	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 97%	Acros Organics
	Αιθανόλη, 99.8%	AppliChem Panreac
	Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	Fischer Scientific
Όργανα & Συσκευές	Plate reader	SPECTRA MAX 250 Molecular Devices
	Vortex	VELP SCIENTIFICA ZX3 Advanced Vortex Mixer

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της αναστολής της ρίζας DPPH, ζυγίζονται με ακρίβεια 5 mg της ρίζας DPPH, τα οποία διαλύονται εντός ογκομετρικής φιάλης σε αιθανόλη έως τελικού όγκου 50 mL. Το διάλυμα αναδεύεται για περίπου μισή ώρα, μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέχρι το πολύ 48 ώρες, ώστε να αποφευχθεί η αυτοαναγωγή της ρίζας εφόσον φυλαχθεί ερμητικά κλειστό και απουσία φωτός σε θερμοκρασία μικρότερη των 4 °C. Στη συνέχεια, για την παρασκευή των διαλυμάτων των εκχυλισμάτων (stock), 50μl από κάθε εκχύλισμα προστίθενται σε 950μl αιθανόλης, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαλύματα εκχυλισμάτων συγκέντρωσης (C αρχική συγκέντρωση) 5%. Στη συνέχεια, πληρώνεται ένα πλακίδιο 96 θέσεων, τοποθετώντας σε κάθε κυψελίδα 100μl διαλύματος εκχυλίσματος (σε κατάλληλες αραιώσεις από το stock διάλυμα) και 100μl διαλύματος DPPH που παρασκευάστηκε. Τα stock διαλύματα των εκχυλισμάτων έχουν υποστεί αραιώση με αιθανόλη κατά τέτοιο τρόπο, ώστε στο πλακίδιο να υπάρχουν διαλύματα συγκεντρώσεων C, 0,8C, 0,6C, 0,4C και 0,2C. Για παράδειγμα, σε κυψελίδα που περιέχει διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης C, τοποθετούνται 100μl του αντίστοιχου stock και 100μl διαλύματος DPPH, σε κυψελίδα που περιέχει διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης 0,6C τοποθετούνται 60μl του stock, 40μl αιθανόλης και 100μl διαλύματος DPPH, κ.ο.κ.

Επιπλέον, τυφλά διαλύματα παρασκευάζονται από 100μl αιθανόλης και 100μl DPPH. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου, τόσο τα δείγματα που περιείχαν εκχύλισμα όσο και τα τυφλά διαλύματα, παρασκευάστηκαν εις τριπλούν, άρα στους υπολογισμούς θα υπεισέρχονται οι μέσες τιμές των

μετρήσεων που λήφθηκαν. Το πλακίδιο αφέθηκε σε σκοτεινό χώρο και ερμητικά κλειστό, για 30 min, 60 min και 90 min ώστε να επωαστούν τα διαλύματα και τελικά, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 510 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

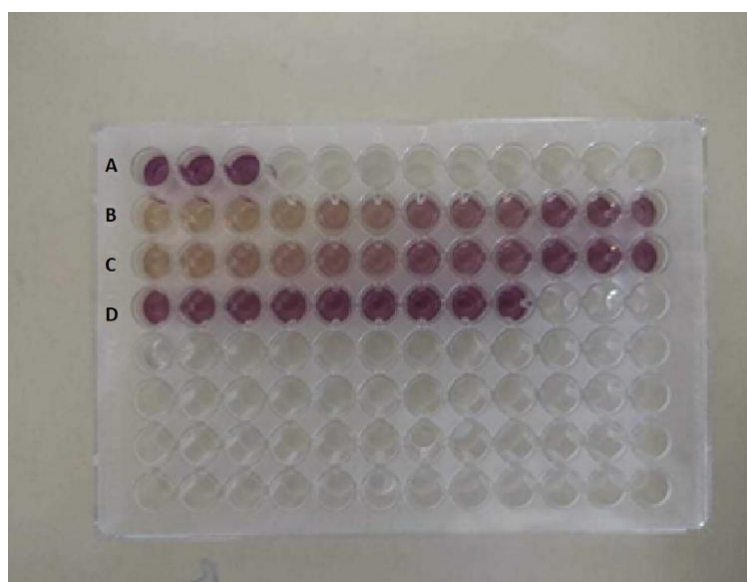
Μετά την λήψη των αποτελεσμάτων, σχεδιάστηκε το διάγραμμα της επί τοις εκατό αναστολής (inhibition) της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων των κυψελίδων (μL εκχυλίσματος / mL δείγματος). Η % αναστολή ορίζεται ως εξής:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} * 100 \quad (3)$$

Όπου:

$A_{blank}$ , η απορρόφηση των τυφλών διαλυμάτων αιθανόλης προς DPPH και  $A_{sample}$ , η απορρόφηση των δειγμάτων που περιέχουν εκχύλισμα.

Παρακάτω, παρατίθεται το πλακίδιο 96 θέσεων (εικόνα 2-9), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παραπάνω μέτρηση. Τα δείγματα που εμφανίζονται με μωβ χρώμα αποτελούν τις ενώσεις που δεν εμφανίζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Αντιθέτως, τα δείγματα που εμφανίζονται αποχρωματισμένα αποτελούν ενώσεις που εμφανίζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, καθώς αποδεικνύεται η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Σημειώνεται ότι η σειρά A του πλακιδίου αντιστοιχεί στο τυφλό δείγμα, η σειρά B στο E:ChCl/LA, η σειρά C στο E:Glu/LA και η σειρά D στα 2 NaDES που χρησιμοποιήθηκαν, προκειμένου να μπορέσει να συγκριθεί η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος με εκείνη του καθαρού NaDES.

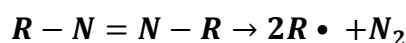


Εικόνα 2-9: Πλακίδιο 96 θέσεων με τα δείγματα που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική δράση

## 2.7.4. Προσδιορισμός της αναγωγής των θερμικών ελευθέρων ριζών (AAPH) – Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Τόσο το E/ChCl:LA όσο και η υδρογέλη με τη βέλτιστη σύσταση που παρασκευάστηκε με αυτό αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος, η οποία επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH.

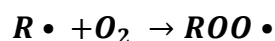
Η λιπιδική υπεροξειδωση αναφέρεται στην οξειδωτική φθορά των λιπιδίων που περιέχουν οποιονδήποτε αριθμό διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα, όπως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και τα φωσφολιπίδια. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) προσβάλουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ξεκινώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης. [103], [104] Η in vitro λιπιδική υπεροξειδωση, όπως στην περίπτωση του λινελαϊκού οξέος, μπορεί να αρχίσει είτε θερμικά με τη χρήση του υδατοδιαλυτού αζω-εκκινητή 2,2'-αζοδις-(2-αμιδινοπροπανο)διϋδροχλώριο (AAPH), είτε από μεταλλικά ιόντα  $Fe^{2+}$  ή  $Cu^+$  με  $H_2O_2$  (αντίδραση Fenton). Το AAPH αποσυντίθεται σε φυσιολογική θερμοκρασία ( $37^\circ C$ ) σε υδατικά διαλύματα σχηματίζοντας ρίζα αλκυλίου ( $R\cdot$ ), η οποία παρουσία οξυγόνου μετατρέπεται στις αντίστοιχες ρίζες υπεροξειδίου ( $ROO\cdot$ ). Πιο συγκεκριμένα, οι αζωενώσεις χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες ενώσεις για την παραγωγή ελευθέρων ριζών και διασπώνται μονομοριακά (χωρίς ένζυμα ή βιομετατροπές), παράγοντας ένα μόριο αζώτου και δύο ρίζες με κέντρο τον άνθρακα ( $R\cdot$ ):



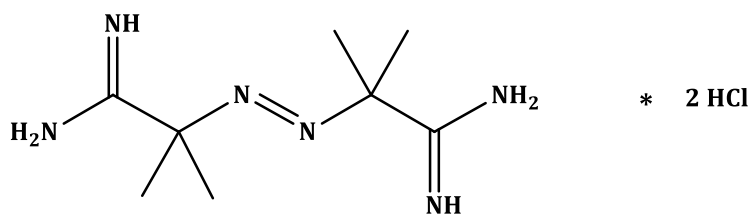
Οι ρίζες του άνθρακα σχηματίζονται σε ζεύγη και βρίσκονται πάρα πολύ κοντά μεταξύ τους, για αυτό μερικές ανασυνδέονται και σχηματίζουν σταθερά προϊόντα:



Όμως, πολλές από τις ρίζες διαχέονται χωριστά, αντιδρούν γρήγορα με μοριακό οξυγόνο και σχηματίζουν υπεροξειδικές ρίζες:



Επειδή το AAPH είναι υδατοδιαλυτό, ο ρυθμός δημιουργίας ελεύθερων ριζών από το AAPH μπορεί εύκολα να ελεγχθεί και να μετρηθεί. [105]



Εικόνα 2-10: Χημική δομή του εκκινητή ελευθέρων ριζών 2,2'-αζοδισ-(2- αμιδινοπροπανο)διϋδροχλώριο (AAPH)

Τα όργανα και τα αντιδραστήρια τα οποία απαιτήθηκαν κατά τον προσδιορισμό της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης παρουσιάζονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12: Υλικά και όργανα για τον προσδιορισμό της αναγωγής των θερμικών ελευθέρων ριζών (AAPH)

Υλικά	Όνομασία	Προμηθευτής
	2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)	Fluorochem
	Linoleic acid	Sigma-Aldrich
	Boric acid	Sigma-Aldrich
	Sodium hydroxide	Penta
	Tween20	Sigma-Aldrich
	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 97%	Acros Organics
	L-Ascorbic acid	Penta
	Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	Fischer Scientific
Όργανα & Συσκευές	UV-Vis spectrometer	Jasco V770
	Vortex	VELP SCIENTIFICA ZX3 Advanced Vortex Mixer

Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα των εκχυλισμάτων NaDES να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση εισάγονται αρχικά στην κυψελίδα του φασματόμετρου: 14  $\mu\text{L}$  λινελαϊκού οξέος (ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος-υδροξειδίου του νατρίου 50 mM, pH 9.0), 1302  $\mu\text{L}$  (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=7.4) και 14  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα της επί προσδιορισμού ουσίας (E/ChCl:LA), η οποία εξετάζεται ως προς την ικανότητά της να αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος. Στη συνέχεια, το διάλυμα στην κυψελίδα αναδεύεται και προστίθενται 70  $\mu\text{L}$  AAPH (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=7.4), ενώ στη συνέχεια παρασκευάζεται το ίδιο διάλυμα παραλείποντας την προσθήκη της βιοδραστικής ένωσης, η οποία αντικαθίσταται από 14  $\mu\text{L}$  DMSO (Control). Όσον αφορά στην υδρογέλη που παρασκευάστηκε με το εκχύλισμα, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητά της η οποία υπολογίζεται ότι περιέχει 14  $\mu\text{L}$  καθαρού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

Σε κάθε περίπτωση, μετράται η απορρόφηση στα 234 nm για t=0 και t=60 s και συγκρίνεται ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης του διαλύματος που περιέχει δείγμα με το ρυθμό αύξησης της απορρόφησης του control. Συγκεκριμένα σε κάθε μια απορρόφηση αφαιρείται η απορρόφηση του AAPH για t=0 και t=60 s αντίστοιχα και υπολογίζεται η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) ως εξής:

$$\% \text{Αναστολή LP} = (100 - \frac{\Delta A_{\text{δείγματος}}}{\Delta A_{\text{control}}} * 100) \quad (4)$$

Τα αποτελέσματα δίνονται σε (%) ποσοστό αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Σημειώνεται ότι χρησιμοποιήθηκαν 14 μg εκχυλίσματος σε συνολικά 1400 μL όλων των διαλυμάτων που απαιτήθηκαν, το (%) ποσοστό αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης δίνεται σε 1 μg εκχυλίσματος / 100 μL διαλυμάτων. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) και το ασκορβικό οξύ (Vitamin C), τα οποία δίνονται σε (%) ποσοστό αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε συγκέντρωση 100μM .

### 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### 3.1. Πειραματικός Σχεδιασμός

Μέσω του χρησιμοποιούμενου λογισμικού Design Expert, προέκυψαν τα 14 πειράματα τα οποία εκπονήθηκαν στα πλαίσια του πειραματικού σχεδιασμού Box – Behnken. Επιλέχθηκαν να γίνουν δύο επαναλήψεις του κεντρικού σημείου για την εκτίμηση του γνήσιου σφάλματος. Αφού συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα και οι τιμές των αποκρίσεων, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση αυτών και εξήχθη το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει ικανοποιητικά την κάθε απόκριση.

##### 3.1.1. Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων

###### A) Ικανότητα Διόγκωσης (SR)

Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής, επιλέχθηκε ένα τροποποιημένο μοντέλο (modified), κάνοντας χρήση των όρων A, B, C, AB, AC, A<sup>2</sup> και A<sup>2</sup>C όπου με A, B και C έχουν συμβολιστεί οι ανεξάρτητες μεταβλητές:

A: περιεκτικότητα NaDES κατ'όγκο (% v/v)

B: περιεκτικότητα χιτοζάνης (CS) κατά βάρος (% w/v)

C: περιεκτικότητα Tween 80 (% v/v)



Όταν η τιμή του p-value είναι μικρότερη από 0.05 υποδεικνύεται ότι οι όροι του μοντέλου είναι στατιστικά σημαντικοί. Σε αυτή την περίπτωση, τα A, C, AB, A<sup>2</sup> και A<sup>2</sup>C αποτελούν σημαντικούς όρους του μοντέλου, όπως αποδεικνύεται και από τις τιμές του πίνακα 13. Αντίθετα, τιμές του p-value μεγαλύτερες από 0.1000 υποδεικνύουν ότι οι όροι του μοντέλου δεν είναι στατιστικά σημαντικοί. Εάν υπάρχουν πολλοί ασήμαντοι όροι μοντέλου (χωρίς να υπολογίζονται αυτοί που απαιτούνται για την υποστήριξη της ιεραρχίας), η μείωσή του μπορεί να βελτιώσει το μοντέλο που περιγράφεται. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η τιμή του p-value είναι ίση με 0.0567, η οποία μπορεί να θεωρηθεί προσεγγιστικά ότι υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα των όρων του μοντέλου.

Η F-value του μοντέλου είναι 5.33 και δηλώνει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό. Υπάρχει μόνο 2.92 % πιθανότητα να προκύψει μία τιμή F τόσο μεγάλη λόγω θορύβου.

Η τιμή F-value του Lack of Fit του μοντέλου είναι 0.64, το οποίο σημαίνει ότι η κακή προσαρμογή δεν είναι σημαντική σε σχέση με το καθαρό σφάλμα. Υπάρχει 73.34 % πιθανότητα η F-value του Lack of Fit του μοντέλου να έχει αυτή την τιμή λόγω θορύβου.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την ικανότητα διόγκωσης

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	<b>Model</b>	9527,25	7	1361,04	5,33	0,0292	significant
	A-NADES	741,12	1	741,12	2,90	0,1392	
	B-CS	242,00	1	242,00	0,9486	0,3677	
	C-TWEEN 80	3249,00	1	3249,00	12,73	0,0118	
	AB	3136,00	1	3136,00	12,29	0,0127	
	AC	56,25	1	56,25	0,2205	0,6553	
	A <sup>2</sup>	1640,63	1	1640,63	6,43	0,0443	
	A <sup>2</sup> C	3081,12	1	3081,12	12,08	0,0132	
	<b>Residual</b>	1530,75	6	255,13			
	Lack of Fit	1166,25	5	233,25	0,6399	0,7334	not significant
	Pure Error	364,50	1	364,50			
	<b>Cor Total</b>	11058,00	13				

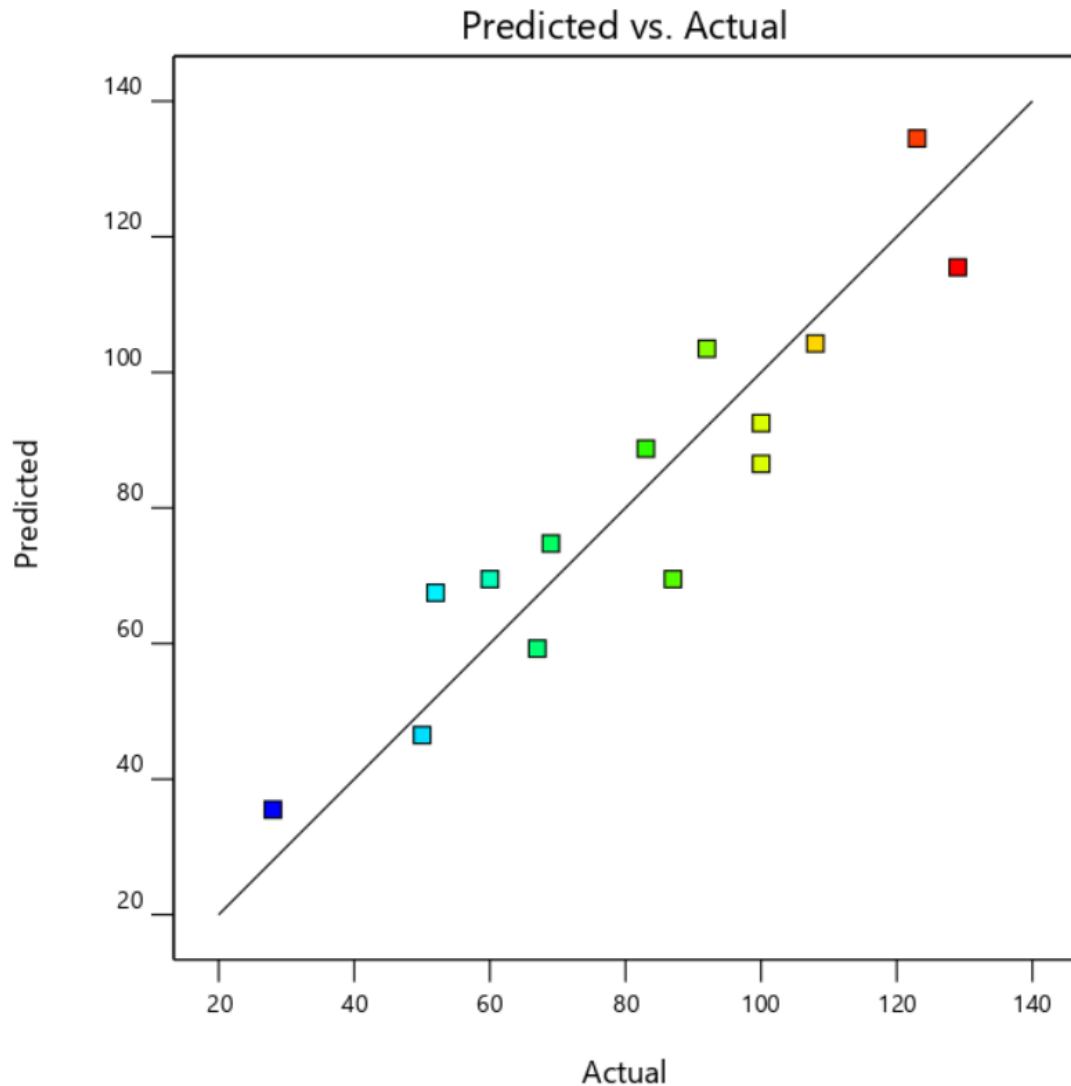
Σύμφωνα με τον πίνακα 14, ο συντελεστής πολλαπλής συσχέτισης (R<sup>2</sup>) έχει τιμή 0.8616, γεγονός που υποδηλώνει αρκετά καλή προσαρμογή του μοντέλου, δηλαδή υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης.

Ο όρος “Adeq Precision” μετρά την αναλογία σήματος προς θόρυβο και στην συγκεκριμένη περίπτωση έχει τιμή ίση με 8.1993. Μία αναλογία μεγαλύτερη από 4 είναι επιθυμητή και υποδεικνύει επαρκές σήμα.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την ικανότητα διόγκωσης

<b>Std. Dev</b>	15.97	<b>R<sup>2</sup></b>	0.8616
<b>Mean</b>	82.00	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0.7001
<b>C.V. %</b>	19.48	<b>Adeq Precision</b>	8.1993

Στην εικόνα 3-1 απεικονίζεται το διάγραμμα της συσχέτισης των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές που ελήφθησαν πειραματικά.



Εικόνα 3-1: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της ικανότητας διόγκωσης

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, το μοντέλο εμφανίζει σχετικά καλή γραμμικότητα και προσαρμογή, ενώ τα σημεία εμφανίζουν ίδιο πλήθος από τις 2 πλευρές της ευθείας.

Το μοντέλο παλινδρόμησης που συσχετίζει τις παραμέτρους του σχεδιασμού της διεργασίας A, B και C με την % ικανότητα διόγκωσης  $R_1$  είναι:

### **Swelling Ratio (SR)**

$$= 69.50 + 9.62 * A - 5.50 * B + 28.50 * C - 28.00 * AB - 3.75 * AC + 21.88 * A^2 - 39.25 * A^2C \quad (5)$$

Αυτή η εξίσωση με τους κωδικοποιημένους παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Από προεπιλογή, τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων κωδικοποιούνται ως +1 και τα χαμηλά επίπεδα ως -1. Η κωδικοποιημένη εξίσωση είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων συγκρίνοντας τους παράγοντες των συντελεστών.

Τέλος, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση της ικανότητας διόγκωσης είναι η εξής:

### **Swelling Ratio (SR)**

$$= 515.8667 - 180.6167 * NaDES + 40.3600 * CS - 698.6933 * Tween\ 80 - 4.4800 * NaDES * CS + 157.0933 * NaDES * Tween\ 80 + 13.9667 * NaDES^2 - 8.3733 * NaDES^2 * Tween\ 80 \quad (6)$$

Αυτή η εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Τα επίπεδα των παραγόντων πρέπει να καθοριστούν στις αρχικές μονάδες για κάθε έναν. Αυτή η εξίσωση, σε αντίθεση με την προηγούμενη, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης κάθε συντελεστή, επειδή οι συντελεστές κλιμακώνονται ώστε να φιλοξενούν τις μονάδες κάθε παράγοντα.

## **B) Ικανότητα Συγκράτησης Νερού (WRR)**

Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής, επιλέχθηκε ένα τροποποιημένο μοντέλο (modified), κάνοντας χρήση των όρων A, B, C, AB, AC, BC, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup>, ABC, A<sup>2</sup>B. Στον πίνακα 15, φαίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την ικανότητα συγκράτησης νερού

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	39197,73	10	3919,77	9,75	0,0433	significant
A-NADES	1176,13	1	1176,13	2,92	0,1858	
B-CS	81,00	1	81,00	0,2014	0,6840	
C-TWEEN 80	924,50	1	924,50	2,30	0,2268	
AB	11990,25	1	11990,25	29,81	0,0121	
AC	25,00	1	25,00	0,0622	0,8192	
BC	1849,00	1	1849,00	4,60	0,1214	
A <sup>2</sup>	6516,05	1	6516,05	16,20	0,0276	
B <sup>2</sup>	10080,05	1	10080,05	25,06	0,0153	
C <sup>2</sup>	1428,05	1	1428,05	3,55	0,1560	
ABC	0,0000	0				
A <sup>2</sup> B	2775,13	1	2775,13	6,90	0,0785	
<b>Residual</b>	1206,62	3	402,21			
Lack of Fit	964,62	2	482,31	1,99	0,4478	not significant
Pure Error	242,00	1	242,00			
<b>Cor Total</b>	40404,36	13				

Όταν η τιμή του p-value είναι μικρότερη από 0.05, υποδεικνύεται ότι οι όροι του μοντέλου είναι σημαντικοί. Σε αυτή την περίπτωση, τα AB, A<sup>2</sup> και B<sup>2</sup> είναι σημαντικοί όροι του μοντέλου. Τιμές για το p-value μεγαλύτερες από 0.1000 υποδεικνύουν ότι οι όροι του μοντέλου δεν είναι σημαντικοί.

Η F-value του μοντέλου είναι 9.75 και δηλώνει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό. Υπάρχει μόνο 4.33 % πιθανότητα να προκύψει μία τόσο μεγάλη τιμή F λόγω θορύβου.

Η τιμή F-value του Lack of Fit του μοντέλου είναι 1.99, γεγονός που υποδεικνύει ότι η κακή προσαρμογή δεν είναι σημαντική σε σχέση με το καθαρό σφάλμα. Υπάρχει 44.78 % πιθανότητα η F-value του Lack of Fit του μοντέλου να έχει αυτήν την τιμή λόγω του θορύβου.

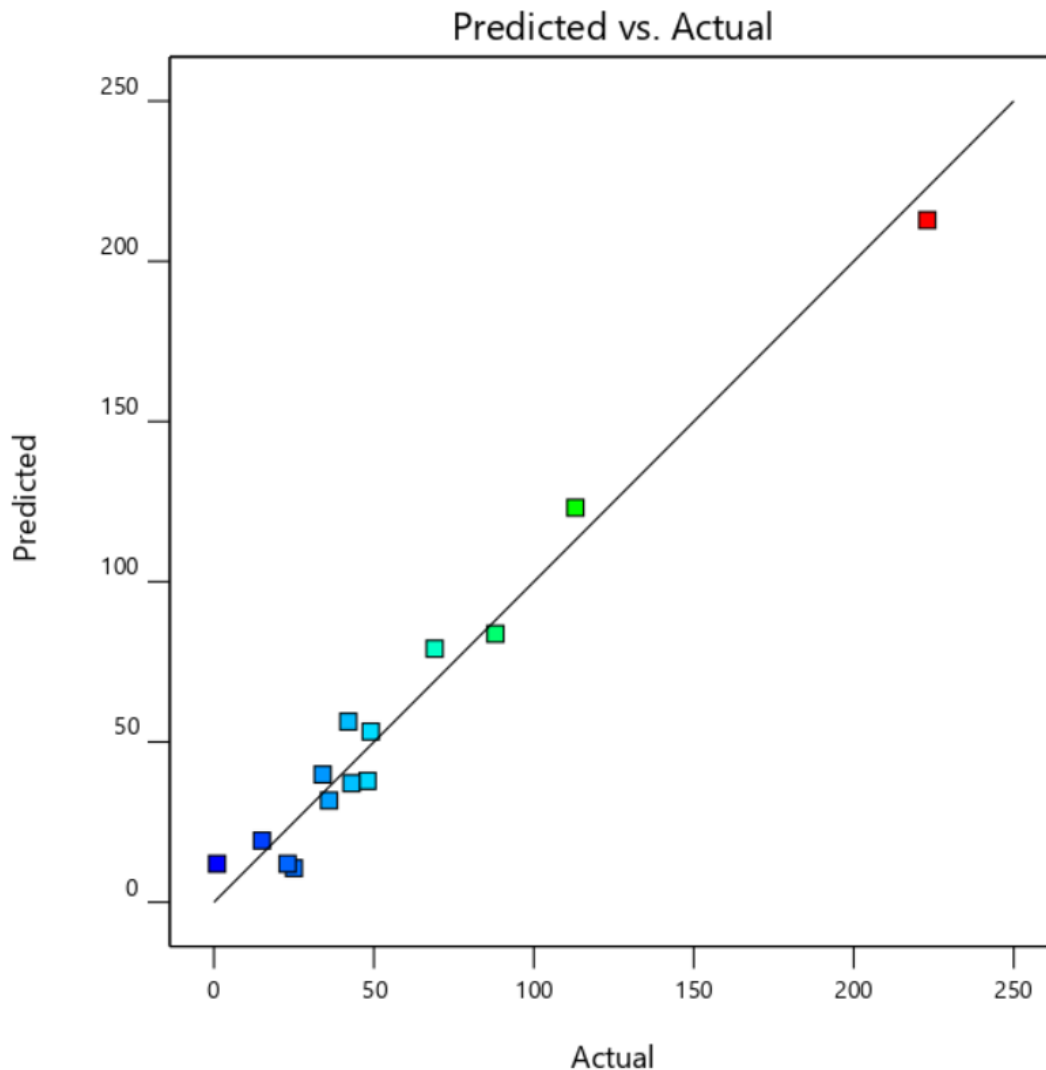
Σύμφωνα με τον πίνακα 16, ο συντελεστής πολλαπλής συσχέτισης (R<sup>2</sup>) έχει τιμή 0.9701, γεγονός που υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου, δηλαδή υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης.

Ο όρος “Adeq Precision” μετρά την αναλογία σήματος προς θόρυβο και στην συγκεκριμένη περίπτωση έχει λόγο 11.377. Μία αναλογία μεγαλύτερη από 4 είναι επιθυμητή και υποδεικνύει επαρκές σήμα.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την ικανότητα συγκράτησης νερού

<b>Std. Dev</b>	20.06	<b>R<sup>2</sup></b>	0.9701
<b>Mean</b>	57.79	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0.8706
<b>C.V. %</b>	34.71	<b>Adeq Precision</b>	11.3771

Στην εικόνα 3-2 απεικονίζεται το διάγραμμα της συσχέτισης των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές που ελήφθησαν πειραματικά.



Εικόνα 3-2: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της ικανότητας συγκράτησης νερού

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, το μοντέλο εμφανίζει αρκετά καλή γραμμικότητα και προσαρμογή, με τις τιμές να επικεντρώνονται στα χαμηλά διαστήματα (0-100).

Το μοντέλο παλινδρόμησης που συσχετίζει τις παραμέτρους του σχεδιασμού της διεργασίας A, B και C με την % ικανότητα συγκράτησης του νερού R<sub>2</sub> είναι:

### Water Retention Ratio (WRR)

$$= 12.00 + 12.12 * A + 4.50 * B + 10.75 * C - 54.75 * AB - 2.50 * AC + 21.50 * BC + 45.13 * A^2 + 56.13 * B^2 - 21.13 * C^2 - 37.25 * A^2B \quad (7)$$

Αυτή η εξίσωση με τους κωδικοποιημένους παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Από προεπιλογή τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων κωδικοποιούνται ως +1 και τα χαμηλά επίπεδα ως -1. Η κωδικοποιημένη εξίσωση είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων συγκρίνοντας τους παράγοντες των συντελεστών.

### Γ) Απορρόφηση Ελαίου (Absorbed Oil)

Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής, επιλέχθηκε ένα τροποποιημένο μοντέλο (modified), κάνοντας χρήση των όρων A, B, C, AB, AC, BC, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> και AB<sup>2</sup>. Στον πίνακα 17 φαίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την απορρόφηση ελαίου

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	1,154E+05	9	12825,00	7,55	0,0336	significant
A-NADES	12678,76	1	12678,76	7,46	0,0524	
B-CS	124,82	1	124,82	0,0734	0,7998	
C-TWEEN 80	47895,12	1	47895,12	28,18	0,0061	
AB	4692,25	1	4692,25	2,76	0,1719	
AC	19154,56	1	19154,56	11,27	0,0284	
BC	156,25	1	156,25	0,0919	0,7768	
B <sup>2</sup>	34,13	1	34,13	0,0201	0,8941	
C <sup>2</sup>	23074,13	1	23074,13	13,58	0,0211	
AB <sup>2</sup>	19562,42	1	19562,42	11,51	0,0275	
<b>Residual</b>	6797,59	4	1699,40			
Lack of Fit	6116,79	3	2038,93	2,99	0,3961	not significant
Pure Error	680,80	1	680,80			
<b>Cor Total</b>	1,222E+05	13				

Όταν η τιμή του p-value είναι μικρότερη από 0.05, υποδεικνύεται ότι οι όροι του μοντέλου είναι σημαντικοί. Σε αυτή την περίπτωση, τα C, AC, C<sup>2</sup> και AB<sup>2</sup> είναι σημαντικοί όροι του μοντέλου. Τιμές για το p-value μεγαλύτερες από 0.1000 υποδεικνύουν ότι οι όροι του μοντέλου δεν είναι σημαντικοί.

Η F-value του μοντέλου είναι 7.55 και δηλώνει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό. Υπάρχει μόνο 3.36 % πιθανότητα να προκύψει μία τόσο μεγάλη τιμή F λόγω θορύβου.

Η τιμή F-value του Lack of Fit του μοντέλου είναι 2.99, γεγονός που υποδεικνύει ότι η κακή προσαρμογή δεν είναι σημαντική σε σχέση με το καθαρό σφάλμα. Υπάρχει 39.61 % πιθανότητα η F-value του Lack of Fit του μοντέλου να έχει αυτήν την τιμή λόγω του θορύβου.

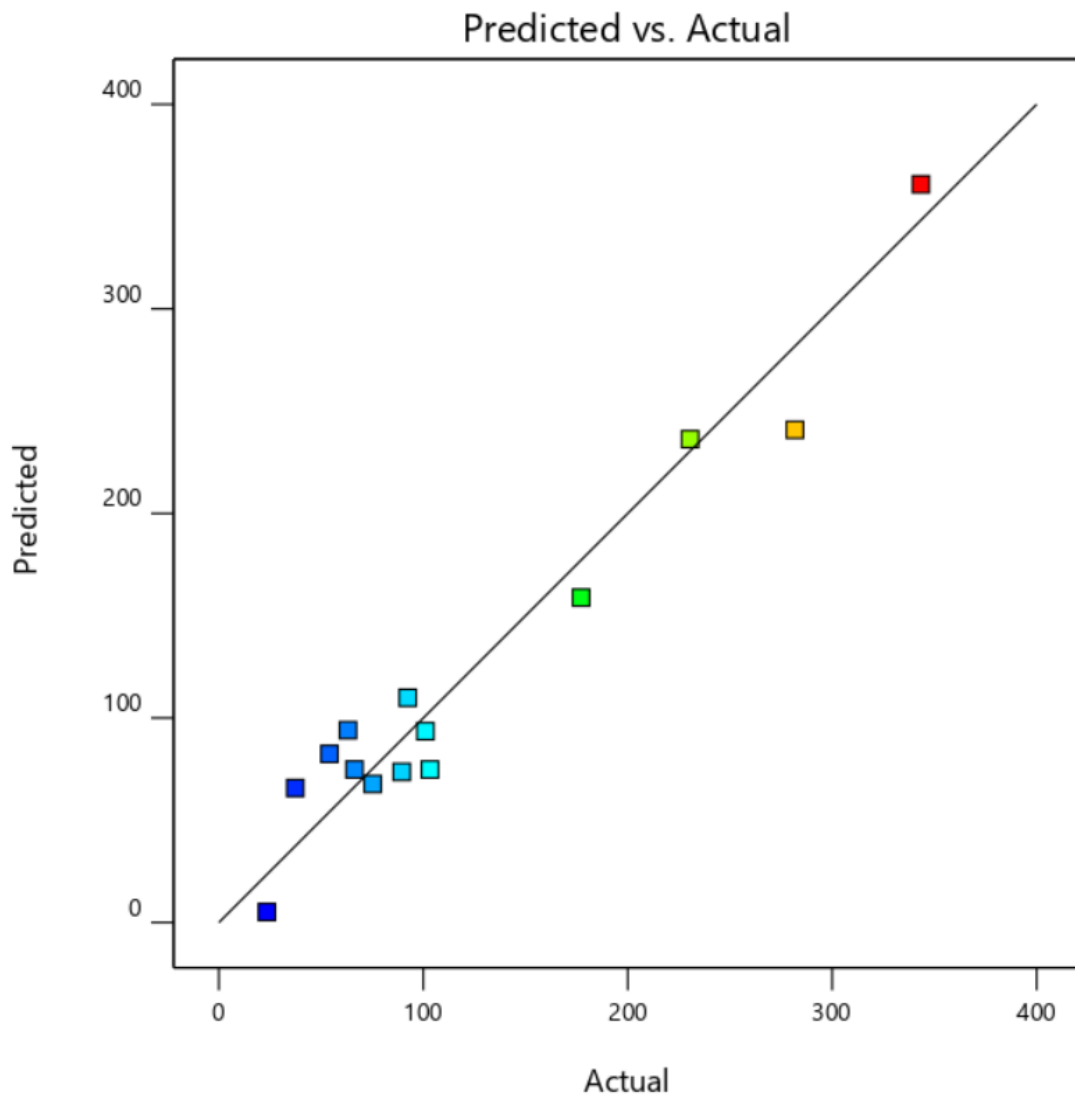
Σύμφωνα με τον πίνακα 18, ο συντελεστής πολλαπλής συσχέτισης ( $R^2$ ) έχει τιμή 0.9444, γεγονός που υποδηλώνει αρκετά καλή προσαρμογή του μοντέλου, δηλαδή υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης.

Ο όρος “Adeq Precision” μετρά την αναλογία σήματος προς θόρυβο και στην συγκεκριμένη περίπτωση έχει λόγο 10.2116. Μία αναλογία μεγαλύτερη από 4 είναι επιθυμητή και υποδεικνύει επαρκές σήμα.

*Πίνακας 18: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει το απορροφούμενο έλαιο*

<b>Std. Dev</b>	41.22	<b>R<sup>2</sup></b>	0.9444
<b>Mean</b>	124.22	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0.8192
<b>C.V. %</b>	33.19	<b>Adeq Precision</b>	10.2116

Στην εικόνα 3-3 απεικονίζεται το διάγραμμα της συσχέτισης των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές που ελήφθησαν πειραματικά.



Εικόνα 3-3: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών του απορροφούμενου ελαίου

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, το μοντέλο εμφανίζει αρκετά καλή γραμμικότητα και προσαρμογή, με τις τιμές να επικεντρώνεται στα χαμηλά διαστήματα (0-100).

Το μοντέλο παλινδρόμησης που συσχετίζει τις παραμέτρους του σχεδιασμού της διεργασίας A, B και C με το απορροφούμενο έλαιο R<sub>3</sub> είναι:

**Absorbed Oil (AO)**

$$= 74.85 - 56.30 * A + 3.95 * B - 77.37 * C + 34.25 * AB + 69.20 * AC + 6.25 * BC + 3.20 * B^2 + 83.20 * C^2 + 98.90 * AB^2 \quad (8)$$

Αυτή η εξίσωση με τους κωδικοποιημένους παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Από προεπιλογή τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων κωδικοποιούνται ως +1 και τα χαμηλά επίπεδα ως -1. Η κωδικοποιημένη εξίσωση



είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων συγκρίνοντας τους παράγοντες των συντελεστών.

Τέλος, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του απορροφούμενου ελαίου είναι η εξής:

**Absorbed Oil (AO)**

$$= -16214.9372 + 1773.8867 * NaDES + 2032.0253 * CS - 881.8911 * Tween\ 80 - 216.0560 * NaDES * CS + 36.9067 * NaDES * Tween\ 80 + 3.3333 * CS * Tween\ 80 - 59.6192 * CS^2 + 147.9111 * Tween\ 80^2 + 6.3296 * NaDES * CS^2\ (9)$$

Αυτή η εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Τα επίπεδα των παραγόντων πρέπει να καθοριστούν στις αρχικές μονάδες για κάθε έναν. Αυτή η εξίσωση, σε αντίθεση με την προηγούμενη, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης κάθε συντελεστή, επειδή οι συντελεστές κλιμακώνονται ώστε να φιλοξενούν τις μονάδες κάθε παράγοντα.

### 3.1.2. Βελτιστοποίηση του μοντέλου – Βελτιστοποίηση της σύστασης

Με στόχο τη βελτιστοποίηση του μοντέλου, ορίζεται το εύρος των τιμών μέσα στο οποίο πρέπει να κυμαίνονται τόσο οι εξαρτημένες όσο και οι ανεξάρτητες μεταβλητές. Το εύρος αυτό καθορίστηκε με βάση τις τιμές των προκαταρκτικών πειραμάτων, ενώ εξαιρέθηκαν οι τιμές που παρατηρήθηκε ότι δεν ευνόησαν τις ιδιότητες της υδρογέλης (ικανότητα διόγκωσης, συγκράτησης νερού και απορρόφησης ελαίου). Τα όρια μέσα στα οποία τελικά σχηματίστηκαν οι υδρογέλες του πειραματικού σχεδιασμού παρουσιάζονται στον πίνακα 19.

Πίνακας 19: Όρια τιμών εξαρτημένων και ανεξάρτητων μεταβλητών για την εύρεση της βέλτιστης σύστασης της υδρογέλης

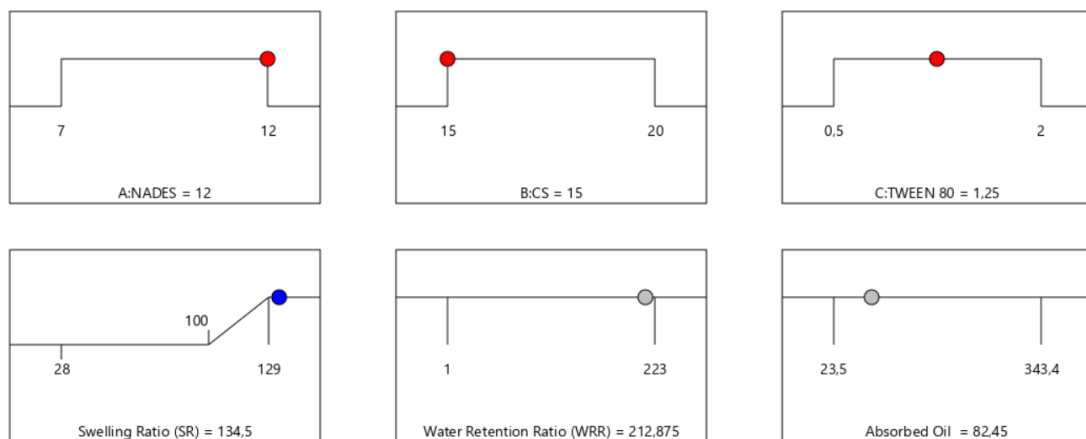
Ανεξάρτητες Μεταβλητές	Ελάχιστη τιμή	Ενδιάμεση τιμή	Μέγιστη τιμή
X <sub>1</sub> : NaDES (%v/v)	7.0	9.50	12.0
X <sub>2</sub> : Χιτοζάνη (%w/v)	15.0	17.5	20.0
X <sub>3</sub> : Tween 80 (%v/v)	0.50	1.25	2.00
Εξαρτημένες Μεταβλητές	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Κριτήριο
Y <sub>1</sub> : Ικανότητα Διόγκωσης (%)	28	129	μεγιστοποίηση

<b>Υ<sub>2</sub>: Ικανότητα Συγκράτησης Νερού (%)</b>	1	223	μεγιστοποίηση
<b>Υ<sub>3</sub>: Ικανότητα Απορρόφησης Ελαίου (mg)</b>	23.5	343.4	μεγιστοποίηση

Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης φαίνονται στον πίνακα 20 και στην εικόνα 3-4:

Πίνακας 20: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της σύστασης της υδρογέλης

<b>NaDES (%v/v) (A)</b>	<b>Χιτοζάνη (%w/v) (B)</b>	<b>Tween 80 (%v/v) (C)</b>
<b>7.0</b>	<b>20.0</b>	<b>0.545</b>



Εικόνα 3-4: Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών σύνθεσης υδρογελών και αναμενόμενες αποκρίσεις

Στη συνέχεια, παρατίθενται τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσει δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών κάθε φορά, όπου η τρίτη τιμή λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της.

## A) Ικανότητα Διόγκωσης – Swelling Ratio (SR) (%)

Factor Coding: Actual

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

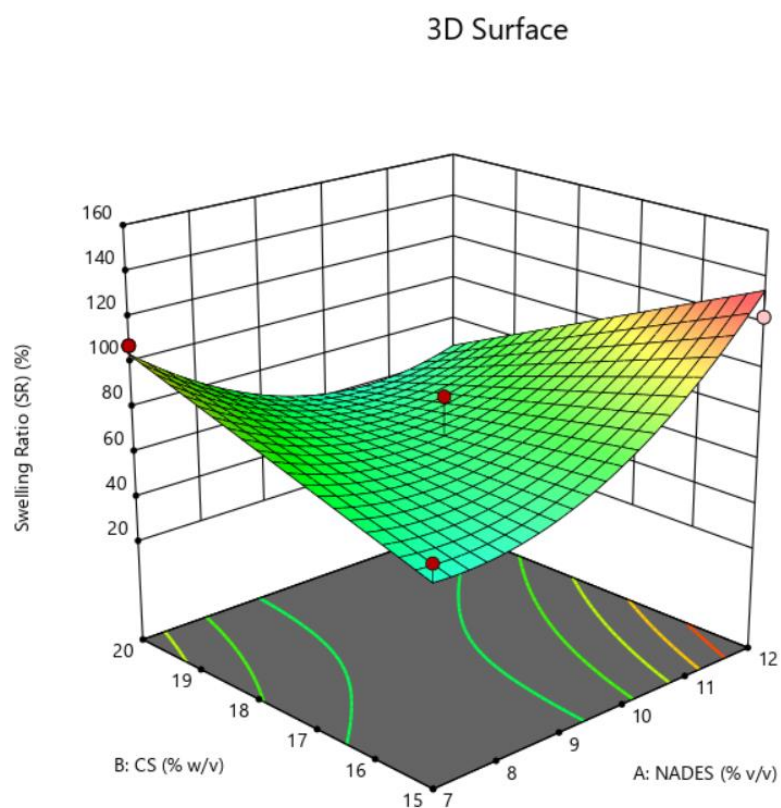
28  129

X1 = A: NADES

X2 = B: CS

**Actual Factor**

C: TWEEN 80 = 1,25



Εικόνα 3-5: 3D επιφάνεια του SR (%) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για το βέλτιστο C

Στο διάγραμμα της εικόνας 3-5 παρουσιάζεται η συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NaDES (%v/v) και της περιεκτικότητας της χιτοζάνης (%w/v) σε συνάρτηση με την ικανότητα διόγκωσης των υδρογέλων για συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε διάλυμα Tween 80 (%v/v). Για παράδειγμα, για 9.5% w/v διαλύματος NaDES και 17.5% w/v σε χιτοζάνη στην υδρογέλη, αναμένεται ότι η ικανότητα διόγκωσης SR θα είναι 87%.

Factor Coding: Actual

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

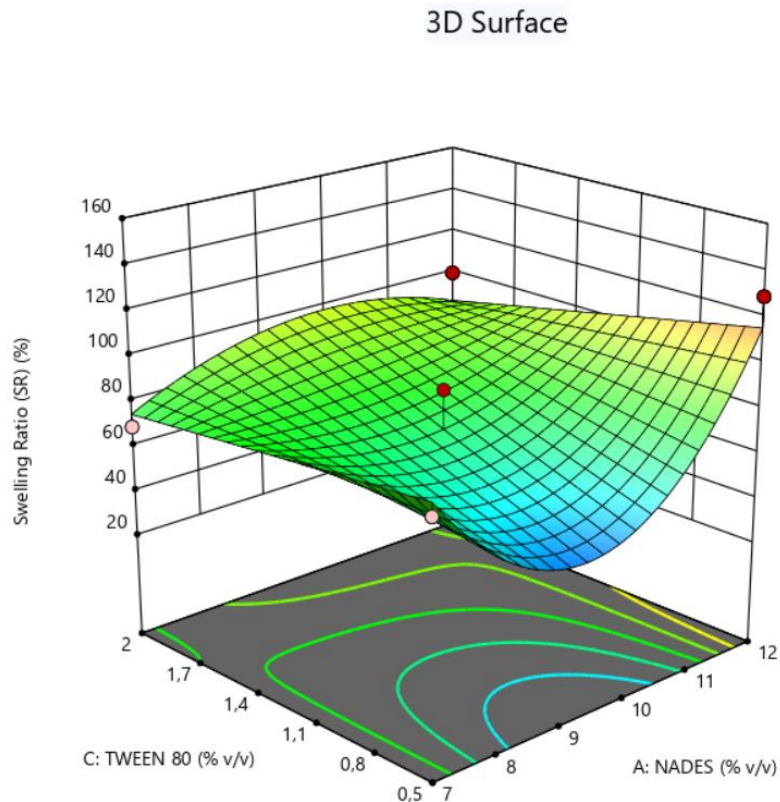
28  129

X1 = A: NADES

X2 = C: TWEEN 80

**Actual Factor**

B: CS = 17,5



Εικόνα 3-6: 3D επιφάνεια του SR (%) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για το βέλτιστο B

Αντίστοιχα, στο διάγραμμα της εικόνας 3-6, παρουσιάζεται η συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NaDES (% v/v) και της περιεκτικότητας σε διάλυμα Tween 80 (% v/v) σε συνάρτηση με την ικανότητα διόγκωσης των υδρογελών για συγκεκριμένη περιεκτικότητα χιτοζάνης (%w/v). Για παράδειγμα, για 12% w/v διαλύματος NaDES και 2% v/v σε διάλυμα Tween 80 στην υδρογέλη, αναμένεται ότι η ικανότητα διόγκωσης SR θα είναι 100%.

## B) Ικανότητα Συγκράτησης Νερού – Water Retention Ratio (WRR)

Factor Coding: Actual

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

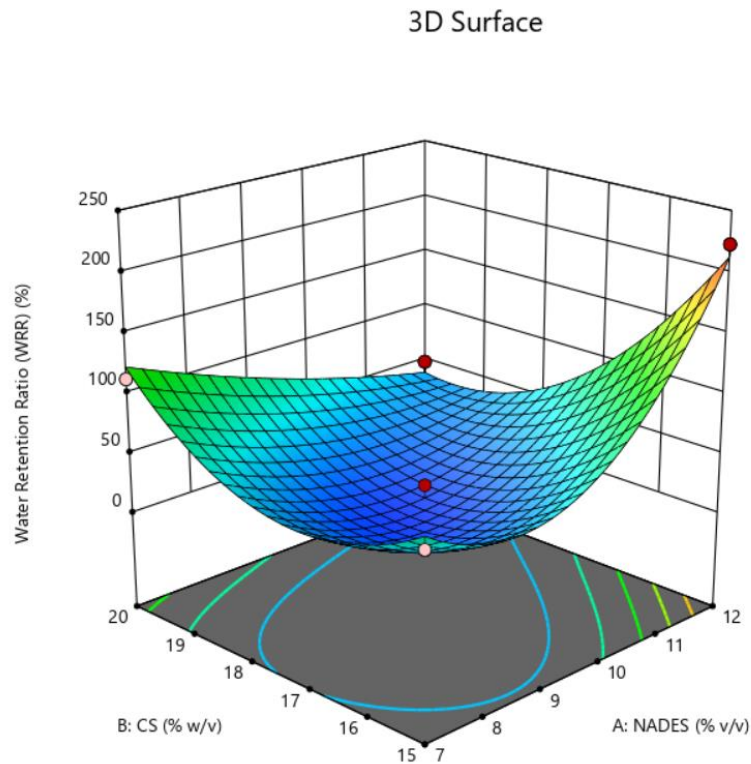
1  223

X1 = A: NADES

X2 = B: CS

**Actual Factor**

C: TWEEN 80 = 1,25



Εικόνα 3-7: 3D επιφάνεια του WRR (%) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για βέλτιστο C

Το διάγραμμα της εικόνας 3-7 επιτρέπει τη συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NaDES (% v/v) και της περιεκτικότητας της χιτοζάνης (% w/v) σε συνάρτηση με την ικανότητα συγκράτησης νερού των υδρογελών για συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε διάλυμα Tween 80 (% v/v). Για παράδειγμα, για 7% w/v διαλύματος NaDES και 15% w/v σε χιτοζάνη στην υδρογέλη, αναμένεται ότι η ικανότητα συγκράτησης νερού WRR θα είναι 69%.

Factor Coding: Actual

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

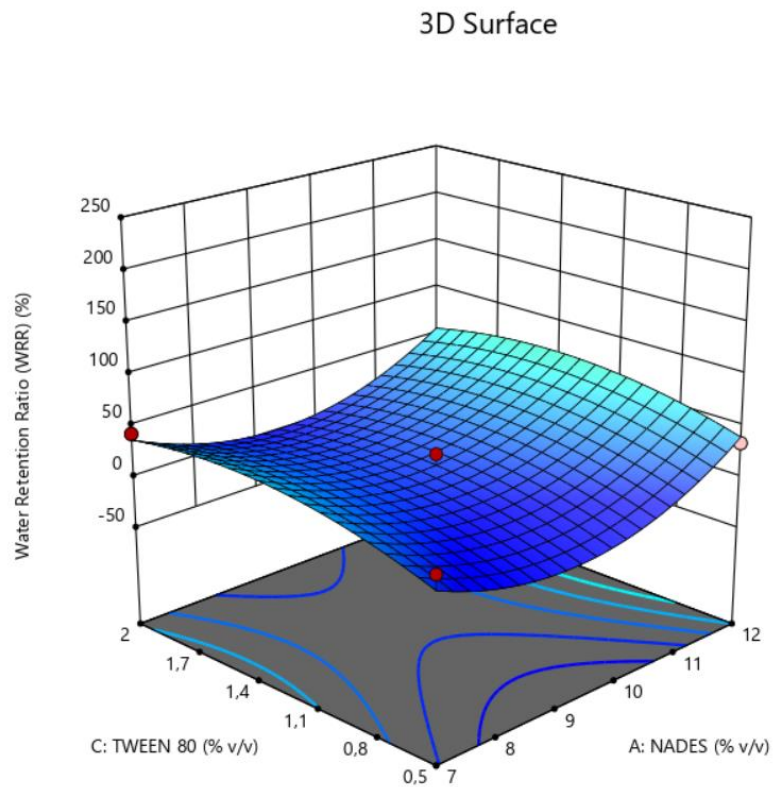
1  223

X1 = A: NADES

X2 = C: TWEEN 80

**Actual Factor**

B: CS = 17,5



Εικόνα 3-8: 3D επιφάνεια του WRR (%) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για βέλτιστο B

Το διάγραμμα της εικόνας 3-8 επιτρέπει τη συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NaDES (% v/v) και της περιεκτικότητας σε διάλυμα Tween 80 (% v/v) σε συνάρτηση με την ικανότητα διόγκωσης των υδρογελών για συγκεκριμένη περιεκτικότητα χιτοζάνης (%w/v). Για παράδειγμα, για 9.5% w/v διαλύματος NaDES και 1.25% v/v σε διάλυμα Tween 80 στην υδρογέλη, αναμένεται ότι η ικανότητα συγκράτησης νερού WRR θα είναι 23%.

Factor Coding: Actual

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

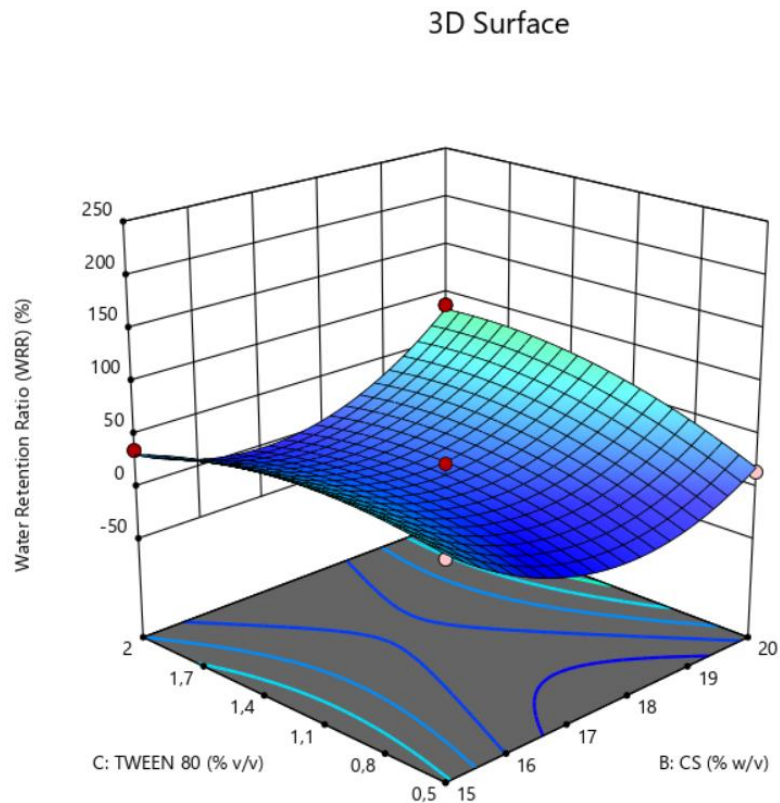
1  223

X1 = B: CS

X2 = C: TWEEN 80

**Actual Factor**

A: NADES = 9,5



Εικόνα 3-9: 3D επιφάνεια του WRR (%) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για βέλτιστο A

Το διάγραμμα της εικόνας 3-9 επιτρέπει τη συσχέτιση της περιεκτικότητας της χιτοζάνης (%w/v) και της περιεκτικότητας σε διάλυμα Tween 80 (% v/v) σε συνάρτηση με την ικανότητα διόγκωσης των υδρογελών για συγκεκριμένη περιεκτικότητα διαλύματος NaDES (% v/v). Για παράδειγμα, για 15% w/v περιεκτικότητας σε χιτοζάνη και 0.5% v/v σε διάλυμα Tween 80 στην υδρογέλη, αναμένεται ότι η ικανότητα συγκράτησης νερού WRR θα είναι 49%.

## Γ) Απορρόφηση Ελαίου (Absorbed Oil)

Factor Coding: Actual

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

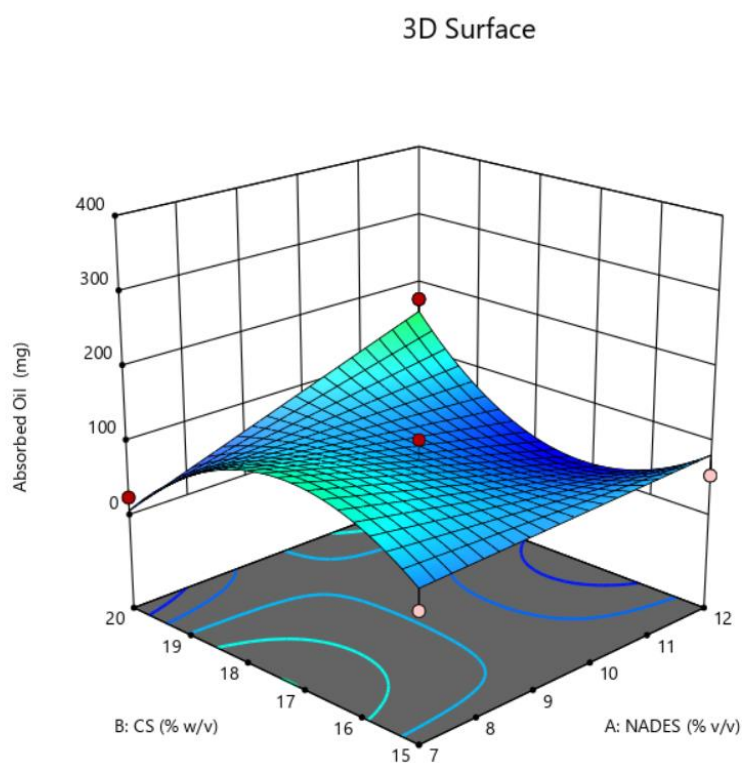
23,5  343,4

X1 = A: NADES

X2 = B: CS

**Actual Factor**


C: TWEEN 80 = 1,25



Εικόνα 3-10: 3D επιφάνεια του Absorbed Oil (mg) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για βέλτιστο C

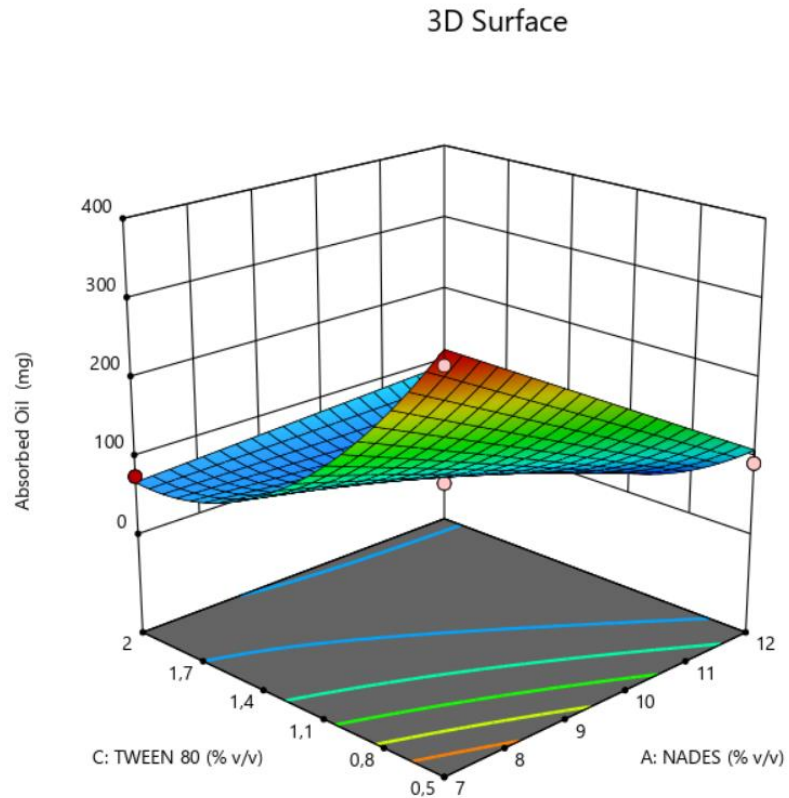
Το διάγραμμα της εικόνας 3-10 επιτρέπει τη συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NaDES (% v/v) και της περιεκτικότητας της χιτοζάνης (% w/v) σε συνάρτηση με την ικανότητα απορρόφησης ελαίου των υδρογελών για συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε διάλυμα Tween 80 (% v/v). Για παράδειγμα, για 12% w/v διαλύματος NaDES και 15% w/v σε χιτοζάνη στην υδρογέλη, αναμένεται ότι η ποσότητα του ελαίου που απορροφήθηκε θα είναι 54.1 mg.



Factor Coding: Actual  
 Design Points:  
 ● Above Surface  
 ○ Below Surface  
 23,5  343,4


X1 = A: NADES  
 X2 = C: TWEEN 80

**Actual Factor**  
 B: CS = 17,5



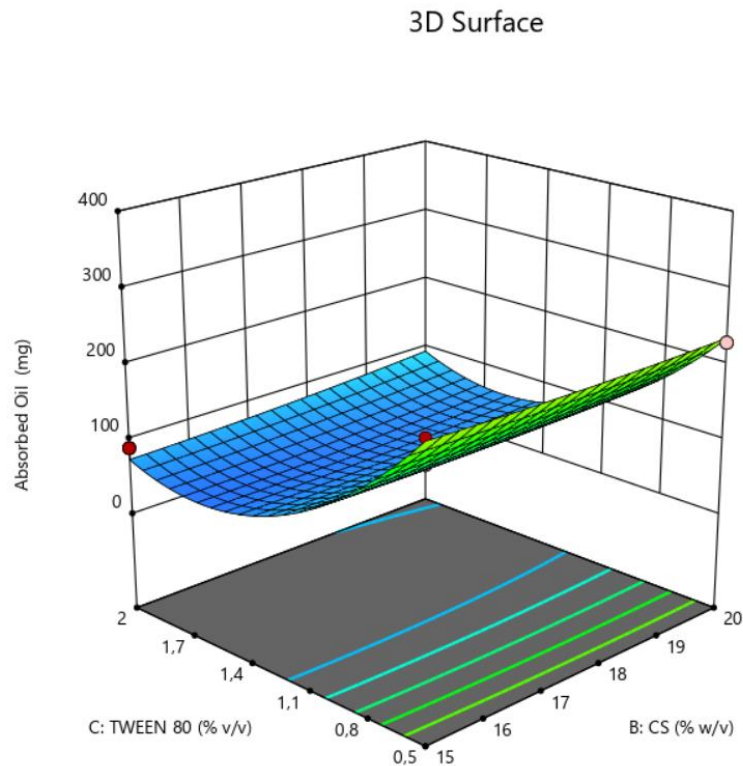
Εικόνα 3-11: 3D επιφάνεια του Absorbed Oil (mg) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για βέλτιστο B

Το διάγραμμα της εικόνας 3-11 επιτρέπει τη συσχέτιση της περιεκτικότητας του διαλύματος NaDES (% v/v) και της περιεκτικότητας σε διάλυμα Tween 80 (% v/v) σε συνάρτηση με την ικανότητα απορρόφησης ελαίου των υδρογελών για συγκεκριμένη περιεκτικότητα χιτοζάνης (%w/v). Για παράδειγμα, για 9.5% w/v διαλύματος NaDES και 1.25% v/v σε διάλυμα Tween 80 στην υδρογέλη, αναμένεται ότι η ποσότητα του ελαίου που απορροφήθηκε θα είναι 66.4 mg.

Factor Coding: Actual  
 Design Points:  
 ● Above Surface  
 ○ Below Surface  
 23,5  343,4

X1 = B: CS  
 X2 = C: TWEEN 80

**Actual Factor**  
 A: NADES = 9,5

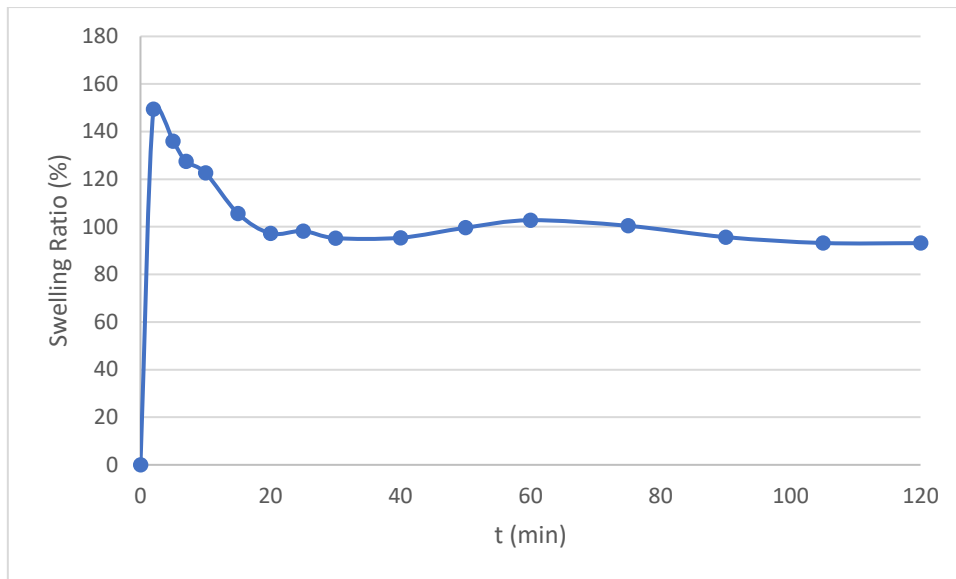


Εικόνα 3-12: : 3D επιφάνεια του Absorbed Oil (mg) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για βέλτιστο A

Το διάγραμμα της εικόνας 3-12 επιτρέπει τη συσχέτιση της περιεκτικότητας της χιτοζάνης (%w/v) και της περιεκτικότητας σε διάλυμα Tween 80 (% v/v) σε συνάρτηση με την ικανότητα απορρόφησης ελαίου των υδρογελών για συγκεκριμένη περιεκτικότητα διαλύματος NaDES (% v/v) Για παράδειγμα, για 15% w/v περιεκτικότητας σε χιτοζάνη και 2% v/v σε διάλυμα Tween 80 στην υδρογέλη, αναμένεται ότι η ποσότητα του ελαίου που απορροφήθηκε θα είναι 89.5 mg.

### 3.1.3.Αξιολόγηση των αποκρίσεων της υδρογέλης με τη βέλτιστη σύσταση

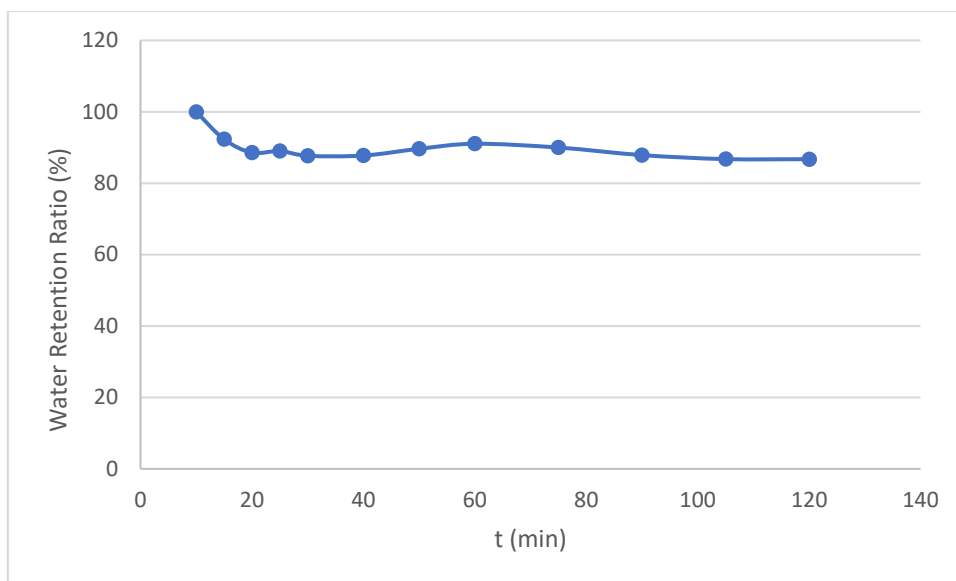
Το διάγραμμα της εικόνας απεικονίζει το ποσοστό διόγκωσης σε συνάρτηση με το χρόνο για τη βέλτιστη υδρογέλη που σχεδιάστηκε με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό. Οι τιμές των μεταβλητών αυτών παρουσιάστηκαν στον πίνακα 20.



Εικόνα 3-13: Ποσοστό διόγκωσης της υδρογέλης με τη βέλτιστη σύσταση συναρτήσει του χρόνου

Σύμφωνα με το διάγραμμα της εικόνας 3-13, παρατηρείται πως η μέγιστη διόγκωση της υδρογέλης παρουσιάζεται στα 2 min, με ποσοστό 149%, έχοντας μία πολύ απότομη αύξηση στο ποσοστό διόγκωσής της τη χρονική στιγμή αυτή. Από το χρόνο των 10 min και για όλη τη διάρκεια του πειράματος, το ποσοστό διόγκωσης ακολουθεί μία πιο σταθερή, ελαφρώς μεταβαλλόμενη πορεία. Για το λόγο αυτό, μη λαμβάνοντας υπόψη τις ακραίες τιμές του πειράματος, λαμβάνεται ότι ο χρόνος που παρουσιάζεται το μέγιστο ποσοστό διόγκωσης (123%) είναι τα 10 min, το οποίο παραμένει σε ικανοποιητικά επίπεδα καθ'όλη τη διάρκεια της μελέτης, δηλαδή για διάστημα 2 ωρών.

Στη συνέχεια, στην εικόνα 3-14 παρατίθεται το διάγραμμα με το ποσοστό συγκράτησης νερού από την υδρογέλη με τη βέλτιστη σύσταση συναρτήσει του χρόνου.



Εικόνα 3-14: Ποσοστό συγκράτησης νερού της υδρογέλης με τη βέλτιστη σύσταση σε συνάρτηση με το χρόνο

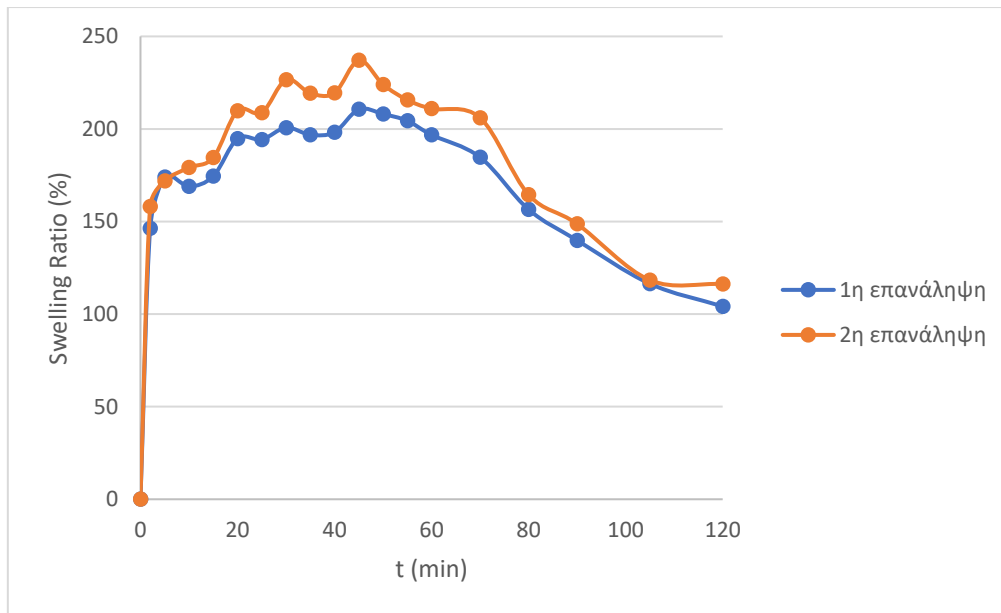
Παρατηρείται ότι η συγκράτηση νερού από την υδρογέλη διατηρείται σε υψηλά επίπεδα και, μάλιστα, σε ποσοστό περίπου ίσο με 90 % σε διάστημα 2 ωρών.

Τα αποτελέσματα που αφορούν στη μελέτη απορρόφησης ελαίων και συγκεκριμένα του ελαιολάδου, φαίνονται στον πίνακα 21:

Πίνακας 21: Αποτελέσματα απορρόφησης ελαίου από τη βέλτιστη υδρογέλη

<b>Μάζα αρχικής υδρογέλης (mg)</b>	<b>Μάζα ελαιολάδου που συγκρατήθηκε (mg)</b>
212.1	265.3

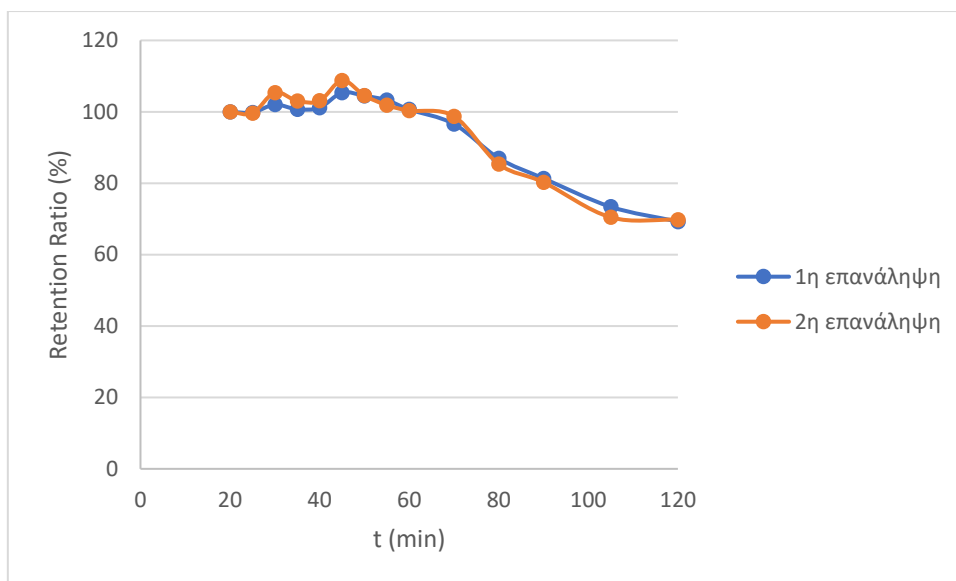
Η ίδια μελέτη, όπως προαναφέρθηκε, εφαρμόζεται και στις υδρογέλες οι οποίες παρασκευάστηκαν με διαλύτη το εκχύλισμα που προέκυψε από την εκχύλιση των φύλλων ελιάς με το NaDES (E:ChCl/LA), με σκοπό να παρατηρηθούν οι διαφορές που μπορεί να εμφανίζονται στις ιδιότητές τους. Εξετάζεται, ταυτόχρονα, και η ικανότητα του εκχυλίσματος να επιδράσει ως παράγοντας διασύνδεσης στην παρασκευή της υδρογέλης. Το διάγραμμα της εικόνας 3-15 απεικονίζει το ποσοστό διόγκωσης σε συνάρτηση με το χρόνο, ενώ παρασκευάστηκαν 2 υδρογέλες με τα ίδια συστατικά, έτσι ώστε να μελετηθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 3-15: Ποσοστό διόγκωσης των υδρογελών με τη βέλτιστη σύσταση και με διαλύτη το εκχύλισμα E:ChCl/LA συναρτήσει του χρόνου

Παρατηρείται ότι στο διάστημα 20 – 70 min, το ποσοστό διόγκωσης παραμένει σε ικανοποιητικό επίπεδο (άνω του 185%) και στις 2 επαναλήψεις των υδρογελών που μελετήθηκαν. Η βέλτιστη χρονική στιγμή θεωρείται αυτή στα 20 min, κατά την οποία παρατηρείται ποσοστό διόγκωσης ίσο με 195 και 210 % αντίστοιχα, το οποίο είναι αρκετά μεγαλύτερο συγκριτικά με εκείνο που προέκυψε για τις υδρογέλες που παρασκευάστηκαν με το NaDES.

Στη συνέχεια, στην εικόνα 3-16 παρατίθεται το διάγραμμα με το ποσοστό συγκράτησης νερού των βέλτιστων υδρογελών με το E:ChCl/LA. Όπως παρατηρείται, και για τις δύο υδρογέλες που παρασκευάστηκαν, η ικανότητα συγκράτησης νερού διατηρείται σε αρκετά μεγάλο ποσοστό καθ'όλη τη διάρκεια της μελέτης που πραγματοποιήθηκε, δηλαδή για διάστημα 2 ωρών. Συγκεκριμένα, το ποσοστό της τελικής μάζας της υδρογέλης ως προς τη μάζα που μετρήθηκε στο χρόνο των 20 λεπτών λαμβάνει τιμές ίσες με 95 % και για τις 2 υδρογέλες που παρασκευάστηκαν, γεγονός που υποδεικνύει πολύ καλή επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Το ποσοστό αυτό είναι λίγο μικρότερο συγκριτικά με αυτό που προέκυψε για τις υδρογέλες που παρασκευάστηκαν με το NaDES, επομένως οι τελευταίες υπερτερούν στην ικανότητα συγκράτησης νερού για μεγάλο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 3-16: Ποσοστό συγκράτησης νερού των υδρογελών με τη βέλτιστη σύσταση με το E:ChCl/LA συναρτήσει του χρόνου

Τα αποτελέσματα που αφορούν στη μελέτη απορρόφησης ελαίων και συγκεκριμένα του ελαιολάδου για τις δύο υδρογέλες που παρασκευάστηκαν με διαλύτη το εκχύλισμα, παρουσιάζονται στον πίνακα 22:

Πίνακας 22: Αποτελέσματα απορρόφησης ελαίου από τις υδρογέλες με διαλύτη το εκχύλισμα E:ChCl/LA

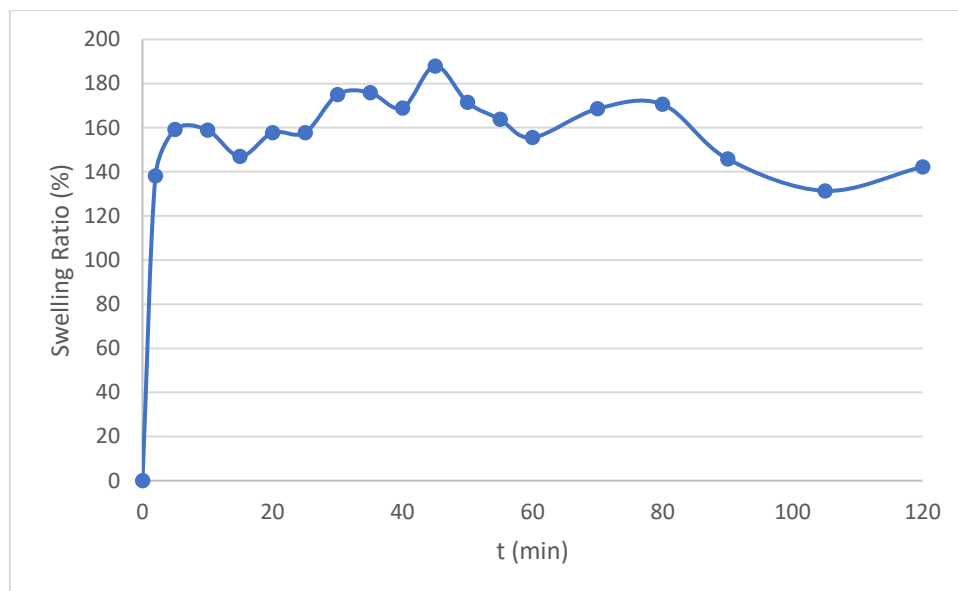
Μάζα αρχικής υδρογέλης (mg)	Μάζα ελαιολάδου που συγκρατήθηκε (mg)
245.7	198.9
247.3	220.2

Παρατηρείται ότι, παρόλο που οι υδρογέλες που παρασκευάστηκαν με το εκχύλισμα E:ChCl:LA είχαν μεγαλύτερη αρχική μάζα, συγκρατήθηκε μικρότερη ποσότητα ελαιολάδου σε σχέση με την υδρογέλη που παρασκευάστηκε με διαλύτη το NaDES.

Τέλος, θα μελετηθεί η επίδραση του μοριακού βάρους της χιτοζάνης που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των υδρογελών. Τόσο στις υδρογέλες του πειραματικού σχεδιασμού όσο και στις υδρογέλες που παρασκευάστηκαν με διαλύτη το εκχύλισμα E:ChCl:LA, χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους (20.00 g/mol). Για το λόγο αυτό, σκόπιμη κρίθηκε η χρήση χιτοζάνης μεσαίου μοριακού βάρους (5 – 20 mPa\*s) με σταθερές, όμως, τις τιμές των υπόλοιπων παραμέτρων, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η σύγκριση μεταξύ των αποκρίσεων. Η μόνη παράμετρος που μεταβάλλεται είναι η περιεκτικότητα της χιτοζάνης στην τελική υδρογέλη (10 % w/v αντί 15 % w/v σε αυτή του πειραματικού σχεδιασμού), καθώς αναμένεται ότι η υδρογέλη αυτή θα δώσει πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στις μεταβλητές που μελετήθηκαν. Τελικά, η υδρογέλη που παρασκευάστηκε περιείχε 3 ml διαλύματος NaDES

περιεκτικότητας 7% v/v, 0.3 g χιτοζάνης μεσαίου μοριακού βάρους, έτσι ώστε να προκύψει περιεκτικότητα 10 % w/v και 0.545 % v/v διαλύματος Tween 80.

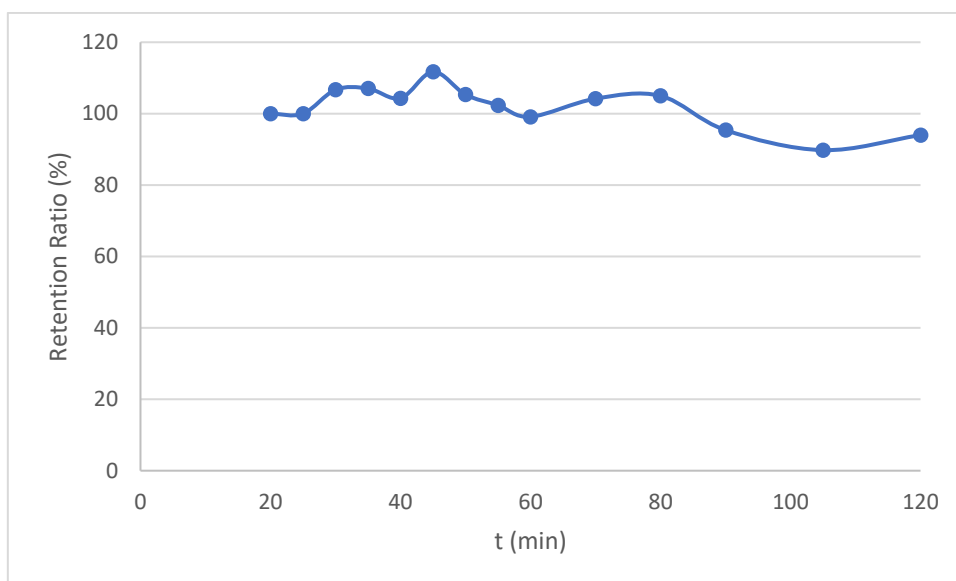
Το διάγραμμα της εικόνας 3-17 απεικονίζει το ποσοστό διόγκωσης σε συνάρτηση με το χρόνο για την υδρογέλη που παρασκευάστηκε με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους.



Εικόνα 3-17: Ποσοστό διόγκωσης της υδρογέλης με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους περιεκτικότητας 10 % w/v σε συνάρτηση με το χρόνο

Στην περίπτωση αυτή, σύμφωνα με το διάγραμμα της εικόνας 3-17, η υδρογέλη παρουσιάζει ικανοποιητικό ποσοστό διόγκωσης και πρακτικά αμετάβλητο σε όλη τη διάρκεια της μελέτης που πραγματοποιήθηκε. Πιο συγκεκριμένα, από τη χρονική στιγμή των 5 min μέχρι και τις 2 h, το ποσοστό διόγκωσης εμφανίζει τιμές από 159 % μέχρι και 142% αντίστοιχα με μερικές διακυμάνσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υδρογέλη εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερότητα και δεν αποδομείται στη διάρκεια της μελέτης.

Στη συνέχεια, στην εικόνα 3-18 παρατίθεται το διάγραμμα με το ποσοστό συγκράτησης νερού της υδρογέλης με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους σε συνάρτηση με το χρόνο. Όπως παρατηρείται, η ικανότητα συγκράτησης νερού διατηρείται σε αρκετά μεγάλο ποσοστό σε όλη τη διάρκεια της μελέτης που πραγματοποιήθηκε, δηλαδή για διάστημα 2 h. Συγκεκριμένα, το ποσοστό της συγκράτησης νερού της υδρογέλης μετρήθηκε ίσο με 94% στο χρόνο των 20 min, γεγονός που υποδεικνύει ότι η χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους καθιστά την υδρογέλη περισσότερο ανθεκτική στην αποδόμησή της στο όξινο pH του διαλύματος υδροχλωρικού οξέος που χρησιμοποιείται, ενώ ταυτόχρονα, η συγκράτηση νερού είναι μεγαλύτερη. Ωστόσο, η χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους παρουσιάζει δυσκολία στην πλήρη διάλυσή της κατά το σχηματισμό των υδρογελών.



Εικόνα 3-18: Ποσοστό συγκράτησης νερού υδρογέλης με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους περιεκτικότητας 10 % w/v συναρτήσει του χρόνου

Τα αποτελέσματα που αφορούν στη μελέτη απορρόφησης ελαίων και συγκεκριμένα του ελαιολάδου της υδρογέλης με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους, απεικονίζονται στον πίνακα 23:

Πίνακας 23: Αποτελέσματα απορρόφησης ελαίου από την υδρογέλη με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους

Μάζα αρχικής υδρογέλης (mg)	Μάζα ελαιολάδου που συγκρατήθηκε (mg)
261.3	578.7

Επομένως, σύμφωνα με τον πίνακα 23, γίνεται κατανοητό ότι η υδρογέλη που παρασκευάστηκε με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα και στη μάζα του ελαιολάδου που μπορεί να συγκρατήσει, με τη μάζα αυτού να είναι διπλάσια από εκείνη που συγκρατείται από τις υδρογέλες που έχουν παρασκευαστεί με τη χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους. Τα αποτελέσματα των αποκρίσεων των υδρογελών με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικά, ωστόσο σημειώνεται ότι σε εφαρμογές όπου η χιτοζάνη χρησιμοποιείται για χορήγηση από το στόμα, το μοριακό βάρος παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς τα ολιγομερή απορροφώνται ευκολότερα, ενώ οι μεγαλύτερου μοριακού βάρους αλυσίδες αποικοδομούνται αρκετά ώστε να αποβληθούν από τον οργανισμό. Επομένως, η χρήση χιτοζάνης μεσαίου μοριακού βάρους κατά τον πειραματικό σχεδιασμό δεν συνίσταται, αφού απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο διάλυσης κατά την παρασκευή των υδρογελών, αλλά και μεγαλύτερο χρόνο για να αποβληθεί από τον οργανισμό.



### 3.1.4. Επιβεβαίωση του μοντέλου (Confirmation)

Η υδρογέλη με τη βέλτιστη σύσταση με διαλύτη το NaDES παρασκευάστηκε τέσσερις φορές, με στόχο την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό, όσον αφορά στην ικανότητα διόγκωσης, στην ικανότητα συγκράτησης νερού και απορρόφησης ελαίου. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης παρουσιάζονται στον πίνακα 24.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα επαναληπτικών πειραμάτων για την επιβεβαίωση του μοντέλου

Runs	Ικανότητα διόγκωσης - Swelling Ratio (SR) (%)	Ικανότητα συγκράτησης νερού - Water Retention Ratio (WRR) (%)	Απορρόφηση ελαίου - Absorbed Oil (mg)
1	123	93	265.3
2	50	45	205.4
3	90	24	317.4
4	97	31	332.2

Το υπολογιστικό εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού, υπολογίζει τις τιμές που θα λάβουν οι αποκρίσεις που μελετώνται στις υδρογέλες που παρασκευάστηκαν. Στον πίνακα 25, παρουσιάζονται τα εύρη αποκρίσεων για τις ανεξάρτητες μεταβλητές του πειραματικού σχεδιασμού.

Πίνακας 25: Εύρη αποκρίσεων για τις ανεξάρτητες μεταβλητές του πειραματικού σχεδιασμού

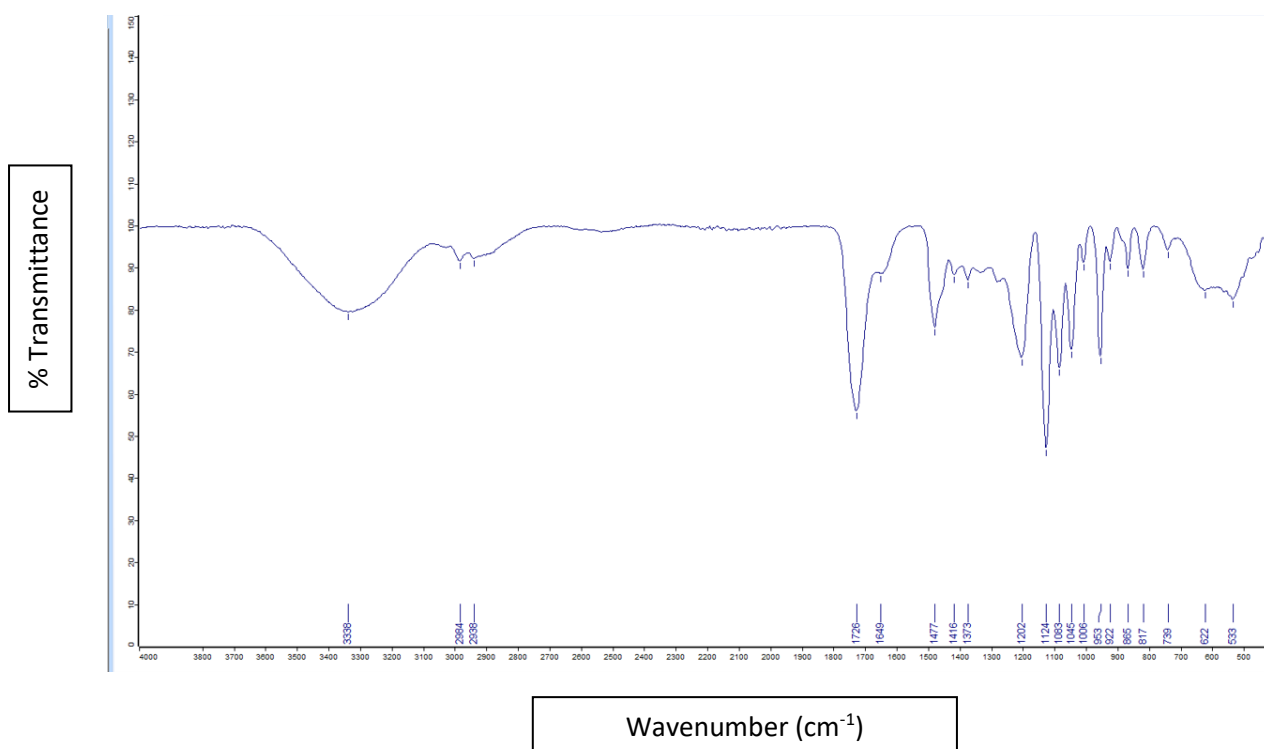
Two-sided Confidence = 95%

Response	Predicted Mean	Predicted Median	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean	95% PI high
Swelling Ratio (SR)	110,826	110,826		15,9726	4	18,3253	65,9857	90	155,667
Water Retention Ratio (WRR)	71,8343	71,8343		20,0551	4	26,144	-11,3675	48,25	155,036
Absorbed Oil	210,41	210,41		41,2237	4	52,0714	65,8368	280,075	354,983

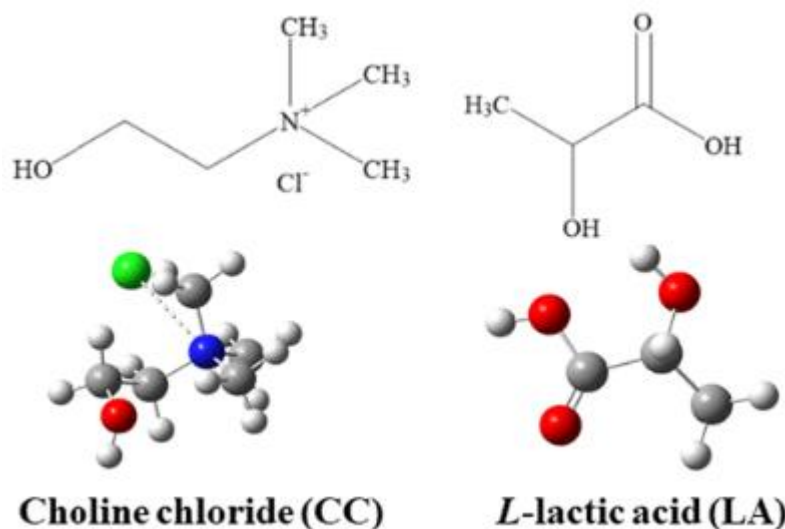
Όπως φαίνεται από τον πίνακα 25, οι αποκρίσεις των αποτελεσμάτων των επαναληπτικών πειραμάτων είναι εντός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού, οπότε θεωρείται ότι τα αποτελέσματά του επιβεβαιώθηκαν και, πράγματι, η υδρογέλη με τη βέλτιστη σύσταση παρουσιάζει τις ικανότητες διόγκωσης, συγκράτησης νερού και απορροφούμενου ελαίου που είχαν προβλεφθεί.

### 3.2. Χαρακτηρισμός φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (ChCl:LA) και του εκχυλίσματός του (E/ChCl:LA) μέσω φασματομετρίας υπερύθρου (FT-IR)

Ο δομικός χαρακτηρισμός του NaDES ChCl:LA πραγματοποιείται μέσω της φασματομετρίας υπερύθρου (FT-IR). Μέσω του φάσματος FT-IR (εικόνα 3-19) επιτυγχάνεται ταυτοποίηση των ενώσεων που περιέχονται στο NaDES και παρατηρείται η αλληλεπίδραση των δύο μορίων, της χλωριούχου χολίνης και του γαλακτικού οξέος, κατά το σχηματισμό του διαλύτη.



Εικόνα 3-19: Φάσμα FT-IR του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη ChCl:LA

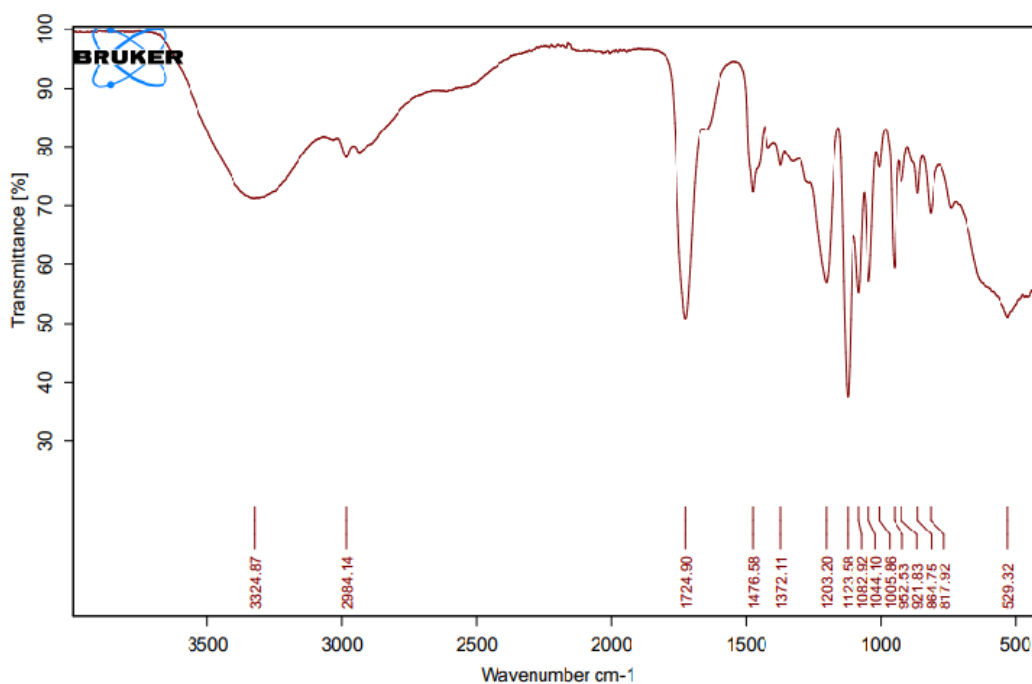


Εικόνα 3-20: Χημική δομή χλωριούχου χολίνης και γαλακτικού οξέος

Όσον αφορά στο γαλακτικό οξύ, οι χαρακτηριστικές κορυφές του παρουσιάζονται στα 1726, 1416, 1202, 1124 και 1045  $\text{cm}^{-1}$ , ενώ με την προσθήκη της χλωριούχου χολίνης κορυφές παρουσιάζονται στα 1477, 1373, 1124, 1083, 1006, 953 και 865  $\text{cm}^{-1}$ . Μπορεί να θεωρηθεί ότι από όλες τις κορυφές, αυτές που ξεχωρίζουν για την έντασή τους είναι αυτές στα 1726, 1477, 1124, 1083 και 953  $\text{cm}^{-1}$  [106]

Εκ πρώτης όψεως, το φάσμα του NaDES ChCl:LA δείχνει ορισμένες κορυφές στην περιοχή των 3600 – 2700  $\text{cm}^{-1}$ . Συγκεκριμένα, η κορυφή 3338  $\text{cm}^{-1}$  μπορεί να αποδοθεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού N-H της χλωριούχου χολίνης, καθώς και στο σχηματισμό ισχυρού δεσμού υδρογόνου μεταξύ αυτής και του γαλακτικού οξέος ( $\text{O} = \text{C} - \text{O} - \text{H} \cdots \text{N}$ ). [107] Ακόμη, η κορυφή 2984  $\text{cm}^{-1}$  αντιπροσωπεύει τις δονήσεις της ομάδας  $-\text{CH}_3$  του LA, ενώ η κορυφή 2938  $\text{cm}^{-1}$  τις δονήσεις τάσης της ομάδας  $-\text{CH}_2$ . Η έντονη κορυφή στα 1726  $\text{cm}^{-1}$  χαρακτηρίζει την ομάδα  $\text{C}=\text{O}$  του LA, η ένταση της οποίας αυξάνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας σε DES, ενώ η κορυφή στα 1124  $\text{cm}^{-1}$  τις δονήσεις τάσης του δεσμού C-C του ίδιου συστατικού. Μεταξύ των κυματαριθμών 1550 – 1700  $\text{cm}^{-1}$ , δεν παρατηρείται καμία κορυφή, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για καθαρό δείγμα NaDES χωρίς την παρουσία νερού. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, οι κορυφές που παρατηρούνται στο διάστημα 1477 – 1100  $\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης του δεσμού C-O και του C-N και σε δονήσεις κάμψης των δεσμών C-H και O-H, ενώ συγκεκριμένα η χαρακτηριστική κορυφή στα 1477  $\text{cm}^{-1}$  οφείλεται τον δεσμό C-N της χλωριούχου χολίνης και αποτελεί χαρακτηριστική κορυφή για την ταυτοποίησή της. [108], [109] Με την κορυφή 1006  $\text{cm}^{-1}$  αναπαρίστανται δονήσεις τάσης, κάμψης και αιώρησης, οι οποίες οφείλονται στην παρουσία των ομάδων C-H και C-O, η κορυφή στα 953  $\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του δεσμού C-N της χλωριούχου χολίνης, ενώ οι κορυφές στο εύρος 850 – 800  $\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-Cl της χλωριούχου χολίνης. [108]

Παραλαμβάνεται, επίσης, το φάσμα απορρόφησης στο μέσο υπέρυθρο φάσμα ακτινοβολίας του εκχυλίσματος του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη, με σκοπό την επιβεβαίωση ενσωμάτωσης του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς στο σύστημα NaDES και, κατά συνέπεια, στην υδρογέλη, αλλά και την αναγνώριση των κορυφών απορρόφησης που οφείλονται σε αυτό. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα 1-4.



Εικόνα 3-21: Φάσμα FT-IR του εκχυλίσματος E/ChCl:LA

Συγκρίνοντας τα φάσματα των εικόνων 3-19 και 3-21, οι οποίες αναπαριστούν το φάσμα του μέσου υπέρυθρου του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (ChCl:LA) και του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με τη χρήση του ως διαλύτη (E/ChCl:LA), είναι εμφανής η ομοιότητα με τις προαναφερθείσες κορυφές στο εύρος 4000 – 800  $\text{cm}^{-1}$ . Παρ' όλ' αυτά, παρατηρούνται σχετικά μικρές μετατοπίσεις, οι οποίες αποτελούν ένδειξη αλληλεπίδρασης των μορίων του NaDES με το εκχύλισμα. Ξεχωρίζει η μετατόπιση της κορυφής από τα 3338 στα 3325  $\text{cm}^{-1}$ , οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού N-H της χλωριούχου χολίνης και του ισχυρού δεσμού υδρογόνου μεταξύ των δύο επιμέρους συστατικών του NaDES, δηλαδή της χλωριούχου χολίνης και του γαλακτικού οξέος.

### 3.3. Χαρακτηρισμός του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη και των διαλυμάτων του (ChCl:LA) μέσω φασματομετρίας υπέρυθρου (FT-IR)

Αφού έχει μελετηθεί το φάσμα υπέρυθρου του NaDES χλωριούχου χολίνης – γαλακτικού οξέος, παρασκευάστηκαν διαλύματα διαφορετικών

περιεκτικότητας ως προς αυτό, προκειμένου να φανεί η επίδραση του νερού στους δεσμούς του και οι δομικές διαφορές που παρουσιάζονται. Συγκεκριμένα, τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν είχαν περιεκτικότητες 4, 7, 9.5, 12, 20, 50 και 70 %v/v ως προς το NaDES, έτσι ώστε να μελετηθούν τόσο αραιά όσο και πυκνά διαλύματά του. Όλα τα φάσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στο παράρτημα. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται σε κοινή απεικόνιση, τα φάσματα του NaDES και των φυσικών μιγμάτων που προέκυψαν των ίδιων περιεκτικότητας (7, 9.5 και 12 %v/v), για να μπορέσουν να γίνουν οι συγκρίσεις με μεγαλύτερη ακρίβεια (εικόνες Π11 – Π13). Σύγκριση γίνεται μεταξύ και όλων των τιμών pH που εμφανίζουν τα διαλύματα τόσο του NaDES όσο και του φυσικού μίγματος, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της αραιώσής τους με νερό.

Η παρουσία νερού καθώς και η περιεκτικότητά του στα διαλύματα NaDES καθορίζει κατά πολύ το φάσμα FT-IR που προκύπτει μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου, καθώς το νερό απορροφά κατά μεγάλο ποσοστό στη μέση υπέρυθη περιοχή, η οποία μελετάται. Συγκεκριμένες ζώνες του φάσματος του νερού μπορούν να επικαλυφθούν μόνο όταν η διαλυμένη ουσία περιέχεται σε επαρκή συγκέντρωση, όπως συμβαίνει για τα διαλύματα NaDES περιεκτικότητας μεγαλύτερης από 20 %v/v. Η προσθήκη νερού σε ορισμένα NaDES πραγματοποιείται με στόχο να βελτιώσει την κακή απόδοση εκχύλισης λόγω του υψηλού ιξώδους τους, ενώ για συγκεντρώσεις έως 25 %v/v οι βέλτιστες ιδιότητες του NaDES διατηρούνται σε μεγάλο ποσοστό.

Γενικά, τα φάσματα υπερύθρου μπορούν να διαιρεθούν στην περιοχή μεγάλων κυματαριθμών ( $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ ) και στην περιοχή όπου απεικονίζεται το δακτυλικό αποτύπωμα της ένωσης ( $1800 - 900 \text{ cm}^{-1}$ ). Ενώ η πρώτη περιοχή επηρεάζεται κατά πολύ από την παρουσία και την περιεκτικότητα του νερού στο διάλυμα, η δεύτερη περιοχή επηρεάζεται πιο έντονα από τη συνδυασμένη συνεισφορά των κορυφών της χλωριούχου χολίνης και του γαλακτικού οξέος.

Οι χαρακτηριστικές κορυφές που αφορούν στο νερό παρουσιάζονται στα  $3327 \text{ cm}^{-1}$  (ευρύτερη ζώνη που καλύπτει ένα φασματικό εύρος από περίπου  $3700$  έως  $3000 \text{ cm}^{-1}$ ) και στα  $1636 \text{ cm}^{-1}$ , όπου απεικονίζονται δονήσεις ψαλιδιού ή παραμόρφωσης με μέτρια ένταση. Η ευρύτερη ζώνη που παρουσιάζεται στα  $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  αποτελεί ένα συνδυασμό συμβολής συμμετρικών και ασύμμετρων δονήσεων τάσης των μορίων του νερού. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή υψηλών κυματαριθμών, οι δονήσεις τάσης του O-H που περιέχεται στο νερό επικαλύπτουν τις δονήσεις τάσης των O-H, N-H και C-H, οι οποίες προέρχονται από τη χλωριούχο χολίνη και το γαλακτικό οξύ που συνθέτουν το NaDES. Για παράδειγμα, οι κύριες διαφορές που παρατηρούνται σε όλα τα φάσματα τόσο για τα διαλύματα NaDES όσο και για τα διαλύματα του φυσικού μίγματος παρουσιάζονται στην ευρεία ζώνη  $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ , η οποία αντικατοπτρίζει κυρίως τη διαφορετική περιεκτικότητα σε νερό μεταξύ των διαλυμάτων αναφοράς. Όσο το ποσοστό νερού αυξάνεται, τόσοι οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών διαταράσσονται και για αυτό η κορυφή που παρουσιάζεται στην περιοχή αυτή γίνεται πιο έντονη και λιγότερο συμμετρική. Ακόμη, οι δύο κορυφές που παρατηρούνται στα  $2984$  και  $2938 \text{ cm}^{-1}$

παύουν να υπάρχουν για μεγάλες συγκεντρώσεις νερού, ενώ εμφανίζονται μόνο όταν η περιεκτικότητα NaDES είναι μεγαλύτερη από 50 %v/v, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι δονήσεις της ομάδας -CH<sub>2</sub> του γαλακτικού οξέος πλέον δεν είναι διακριτές.

Όσον αφορά στην περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων, στους κυματαριθμούς 1500 – 950 cm<sup>-1</sup> αντιστοιχίζονται οι δονήσεις τάσης, κάμψης και αιώρησης των δεσμών C-C, C-O, C-N και C-Cl, οι οποίες οφείλονται στα επιμέρους συστατικά του NaDES. Η προσθήκη νερού στον καθαρό διαλύτη οδηγεί στην σταδιακή επικάλυψη της χαρακτηριστικής αυτής περιοχής, ενώ στα πολύ αραιά διαλύματα του NaDES καμία κορυφή δεν εμφανίζεται σε αυτό το εύρος κυματαριθμών. Αντίθετη συμπεριφορά παρουσιάζει η κορυφή στα 1640 cm<sup>-1</sup>, η οποία για μεγαλύτερη περιεκτικότητα νερού στα διαλύματα (δηλαδή για τα πιο αραιά διαλύματα NaDES), γίνεται όλο και πιο έντονη και αποδίδεται αποκλειστικά και μόνο στην παρουσία του στο διάλυμα. Επισημαίνεται, επίσης, ότι ένα ισοσβεστικό σημείο παρατηρείται περίπου στα 1500 cm<sup>-1</sup>, όπου τόσο ο καθαρός διαλύτης όσο και τα διαλύματα των διαφορετικών περιεκτικότητας παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά, χωρίς να εμφανίζουν καμία κορυφή στην περιοχή αυτή.

Στη συνέχεια, συγκρίνονται τα φάσματα των διαφόρων διαλυμάτων του NaDES χλωριούχου χολίνης – γαλακτικού οξέος και του φυσικού μίγματος που προκύπτει από την απλή ανάμιξη των επιμέρους συστατικών. Οι σημαντικές κορυφές που παρατηρούνται παρουσιάζονται στον πίνακα 26:

Πίνακας 26: Σημαντικές κορυφές των διαλυμάτων NaDES και φυσικών μιγμάτων που μελετήθηκαν και οι τιμές pH τους

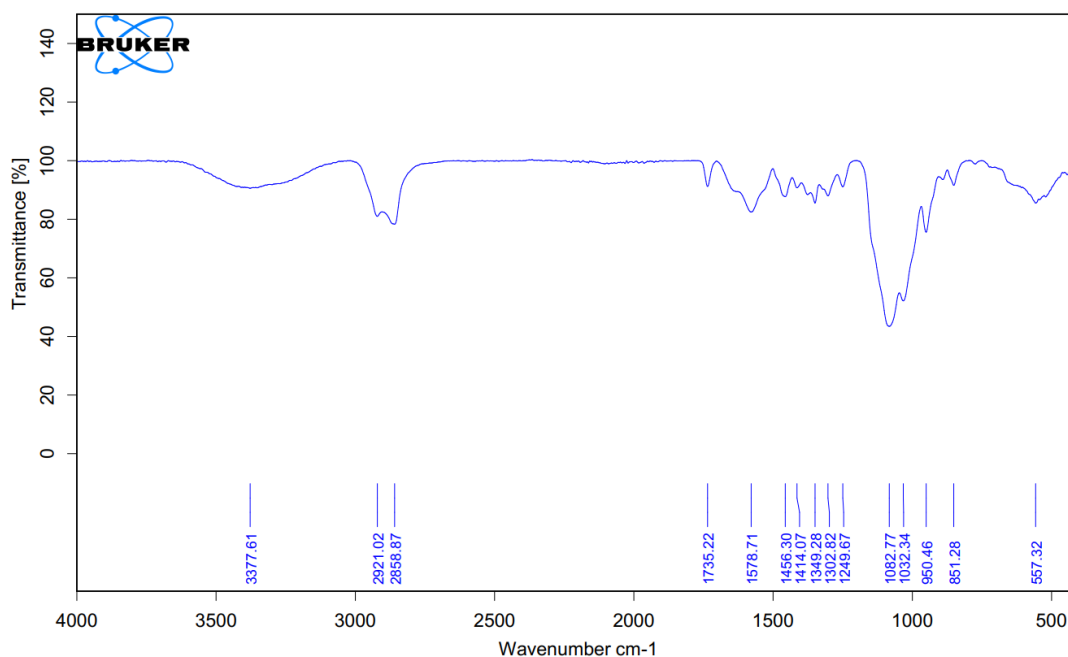
	pH	Peak 1 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 2 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 3 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 4 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 5 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 6 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 7 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 8 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 9 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 10 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 11 (cm <sup>-1</sup> )	Peak 12 (cm <sup>-1</sup> )
NaDES 7%	1.70	3342	-	-	-	1635	-	1238	1135	-	-	-	571
ΦΜ 7%	1.66	3339	-	-	-	1637	-	1236	1132	-	-	-	588
NaDES 9.5%	1.62	3341	-	-	-	1636	1479	1236	1132	-	-	964	588
ΦΜ 9.5%	1.58	3335	-	-	-	1636	1478	1238	1132	-	-	964	580
NaDES 12%	1.48	3328	2922	2853	1743	1637	1464	1237	1136	1092	-	-	722
ΦΜ 12%	1.50	3336	-	-	-	1635	1479	-	1132	1085	1048	954	605

Παρατηρώντας τον πίνακα 26, τα φάσματα FT-IR των διαλυμάτων του NaDES αλλά και των φυσικών μιγμάτων που δημιουργήθηκαν, παρουσιάζουν ευρεία ισχυρή κορυφή σε περίπου 3342 – 3328 cm<sup>-1</sup>, οι οποίες αποδίδονται κυρίως στις δονήσεις τάσης του δεσμού O-H του νερού, οι οποίες επικαλύπτουν τις δονήσεις τάσης των δεσμών O-H, N-H και C-H που προέρχονται από τη ChCl και το LA. Η απορρόφηση από την καρβοξυλομάδα του γαλακτικού οξέος δεν παρατηρείται

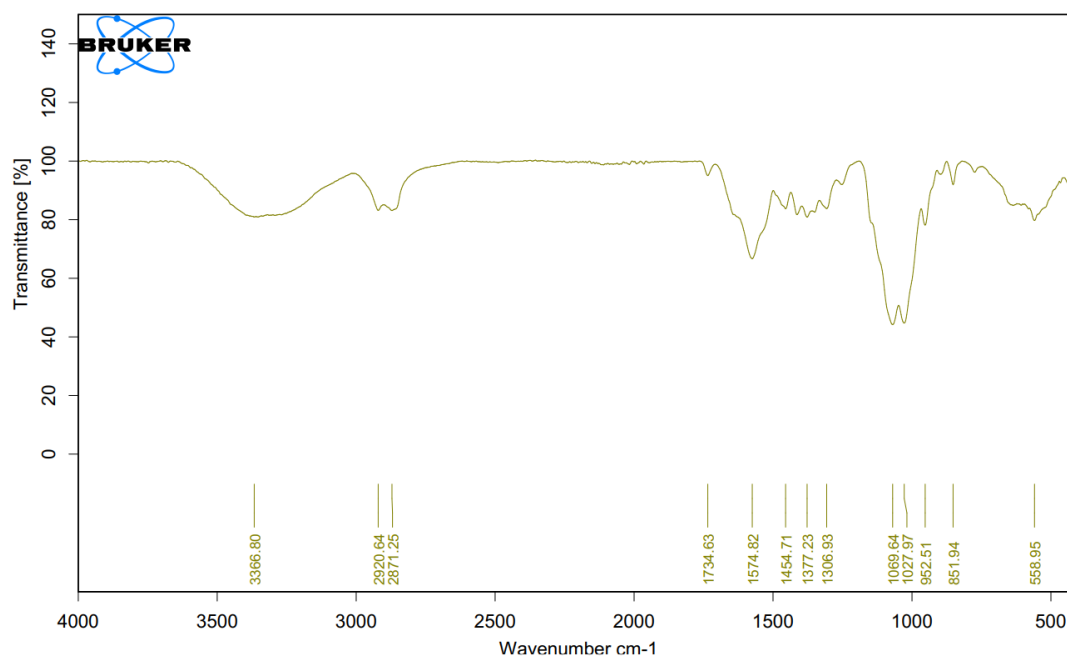
στα  $1731\text{ cm}^{-1}$  σε κανένα από τα διαλύματα NaDES που αναλύονται στον πίνακα, παρά μόνο στο NaDES περιεκτικότητας  $12\text{ \%v/v}$  (κορυφή  $1743\text{ cm}^{-1}$ ), όπου παρουσιάζεται με μία ελαφριά μετατόπιση. Όπως προαναφέρθηκε, η ένταση της κορυφής αυτής αυξάνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας του εκάστοτε διαλύματος σε NaDES. Τα δείγματα που μελετήθηκαν στον πίνακα 26 χαρακτηρίζονται ως αρκετά αραιά ως προς το NaDES, για αυτό το λόγο η κορυφή αυτή δεν είναι διακριτή. Αντίθετα, για τα πιο πυκνά διαλύματα NaDES περιεκτικότητας μεγαλύτερης από  $20\text{ \%v/v}$ , η κορυφή αυτή αρχίζει και εμφανίζεται. Όσον αφορά στις κορυφές στα  $1479 - 1464\text{ cm}^{-1}$ , αυτές αποδίδονται στην εμφάνιση της χαρακτηριστικής κορυφής της ομάδας C-N της ChCl, η οποία χρησιμοποιείται και για την ταυτοποίηση της ένωσης αυτής, ενώ οι κορυφές στα  $1136 - 1132\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται στις δονήσεις τάσης C-C του LA, με μικρές διακυμάνσεις σε σχέση με την κορυφή στα  $1124\text{ cm}^{-1}$  που παρατηρείται στον καθαρό διαλύτη της εικόνας 3-19. Η ενδιαφέρουσα παρατήρηση σε αυτό το εύρος των κορυφών είναι ότι οι σχετικές εντάσεις τους διαφέρουν μεταξύ των δειγμάτων. Για το NaDES, οι κορυφές  $1726$ ,  $1477$ ,  $1202$  και  $1124\text{ cm}^{-1}$  είναι οι ισχυρότερες, οι οποίες όμως δεν εμφανίζονται στα αραιά διαλύματά του, καθώς επικαλύπτονται από την παρουσία νερού. Η εμφάνιση των κορυφών αυτών σταδιακά γίνεται αισθητή στο διάλυμα NaDES  $12\text{ \%v/v}$ , ενώ στο αντίστοιχο διάλυμα του φυσικού μίγματος, οι κορυφές αυτές δεν εμφανίζονται. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι οι δεσμοί που σχηματίζονται κατά την παρασκευή του NaDES είναι πιο ισχυροί σε σχέση με εκείνους που σχηματίζονται κατά την παρασκευή του φυσικού μίγματος, από την απλή δηλαδή ανάμιξη των επιμέρους συστατικών και δεν επηρεάζονται σε τέτοιο βαθμό από την περίσσεια νερού. [108]

### 3.4. Χαρακτηρισμός υδρογελών βέλτιστης σύστασης μέσω φασματομετρίας υπερύθρου (FT-IR)

Με βάση τη βέλτιστη σύσταση που έχει προκύψει μέσω του πειραματικού σχεδιασμού, παρασκευάζεται μία υδρογέλη χρησιμοποιώντας ως κύριο διαλύτη το NaDES χλωριούχος χολίνη – γαλακτικό οξύ και μία με κύριο διαλύτη το φυσικό μίγμα που προκύπτει από την απλή ανάμιξη των δύο επιμέρους συστατικών. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να προσδιοριστούν οι δομικές διαφορές που προκύπτουν και, τελικά, να εξαχθεί ένα συμπέρασμα σχετικά με το πώς λειτουργεί ο φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης ως διασυνδέτης, αλλά και πώς αλληλοεπιδρά με τη χιτοζάνη. Τα φάσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στις εικόνες 3-22 και 3-23.



Εικόνα 3-22: Υδρογέλη χιτοζάνης με διαλύτη NaDES ChCl:LA στις βέλτιστες συνθήκες (20 %w/v CS, 7 %v/v NaDES, 0.55 %v/v Tween80)



Εικόνα 3-23: Υδρογέλη χιτοζάνης με διαλύτη φυσικό μίγμα ChCl:LA στις βέλτιστες συνθήκες (20 %w/v CS, 7 %v/v ΦΜ, 0.55 %v/v Tween80)

Οι χαρακτηριστικές κορυφές της καθαρής χιτοζάνης εμφανίζονται στα 3430, 1635, 1375 και 1080  $\text{cm}^{-1}$ . Η κορυφή στα 3430  $\text{cm}^{-1}$  οφείλεται στις δονήσεις έκτασης του δεσμού O-H και του N-H, ενώ η κορυφή στα 1635  $\text{cm}^{-1}$  οφείλεται στη δόνηση της ομάδας ακετυλίου μαζί με το δεσμό C=O. Επιπλέον, η κορυφή με κυματαριθμό 1375  $\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στη συμμετρική δόνηση κάμψης του -CH<sub>3</sub> και εκείνη στα 1080  $\text{cm}^{-1}$  οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-O-C. [110]



Όσον αφορά στο φάσμα της εικόνας 3-21, παρουσία γαλακτικού οξέος, η χαρακτηριστική ζώνη δόνησης της ομάδας O-H και της N-H, η οποία στην καθαρή χιτοζάνη εμφανίζεται στα  $3430\text{ cm}^{-1}$ , μετατοπίζεται προς χαμηλότερους κυματαριθμούς ( $3378$  και  $3367\text{ cm}^{-1}$  για τις υδρογέλες των εικόνων), αποδεικνύοντας ότι αυξάνεται η ποσότητα των δεσμευμένων ομάδων O-H με υδρογόνο, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του πολυμερούς με το οξύ, ενώ, ταυτόχρονα, η χιτοζάνη μετατρέπεται από βάση σε άλας λόγω πρωτονίωσης των ομάδων  $\text{NH}_2$  της (ιοντικές αλληλεπιδράσεις). Ακόμη, στη δόνηση της ομάδας C-H αποδίδεται η κορυφή στα  $2921\text{ cm}^{-1}$ , ενώ οι κορυφές στα  $2859$  και  $2871\text{ cm}^{-1}$  που παρατηρούνται στα παραπάνω φάσματα αντιπροσωπεύουν μία ασύμμετρη δόνηση της ομάδας  $-\text{CH}_2$ , κορυφές οι οποίες παρουσιάζονται και στο φάσμα υπερύθρου του NaDES (εικόνα 3-19). Η αντίδραση του γαλακτικού οξέος με τη χιτοζάνη επιβεβαιώνεται από την κορυφή στα  $1735\text{ cm}^{-1}$ , ενώ η κορυφή στα  $1635\text{ cm}^{-1}$  δεν παρατηρείται σε καμία από τις υδρογέλες που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν. Οι κορυφές στα  $1575$  και  $1578\text{ cm}^{-1}$  που εμφανίζονται στις παραπάνω εικόνες αποδίδονται στις δονήσεις της ομάδας  $\text{NH}_3^+$ , η οποία έχει σχηματιστεί κατά την παρασκευή των υδρογελών. Η κορυφή στα  $1083\text{ cm}^{-1}$  αντιπροσωπεύει τις δονήσεις τάσης της ομάδας C-O-C της χιτοζάνης και εμφανίζεται μόνο στη υδρογέλη, η οποία έχει παρασκευαστεί με το NaDES. Τέλος, ορισμένες μετατοπίσεις παρατηρούνται επίσης με την κορυφή  $1025\text{ cm}^{-1}$  της χιτοζάνης, η οποία στην υδρογέλη με το NaDES εμφανίζεται στα  $1032\text{ cm}^{-1}$ , ενώ στην υδρογέλη με το φυσικό μίγμα στα  $1028\text{ cm}^{-1}$ . Αυτές οι μετατοπίσεις μπορούν να αποδοθούν στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ της ομάδας -OH της χιτοζάνης και των καρβοξυλικών οξέων του γαλακτικού οξέος, καθώς και στην πιθανότητα σχηματισμού δεσμών  $-\text{O}-\text{H}\cdots\text{Cl}-$  παρόμοιων με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιμέρους συστατικών του NaDES. [111]–[113]

Ακόμη, οι χαρακτηριστικές κορυφές του γαλακτικού οξέος στα  $1726$ ,  $1416$ ,  $1202$ ,  $1124$  και  $1045\text{ cm}^{-1}$  καταγράφονται και στις δύο εικόνες των φασμάτων με ορισμένες διαφοροποιήσεις και μετατοπίσεις. Η κορυφή στα  $1735\text{ cm}^{-1}$  αποδεικνύει, όπως προαναφέρθηκε, την αντίδραση του γαλακτικού οξέος με τη χιτοζάνη. Όσον αφορά στην υδρογέλη με το NaDES ως διαλύτη, οι κορυφές στα  $1202$  και στα  $1124\text{ cm}^{-1}$  δεν καταγράφονται, ενώ η χαρακτηριστική κορυφή των  $1045\text{ cm}^{-1}$  έχει μετατοπιστεί και εμφανίζεται στα  $1032$  και  $1028\text{ cm}^{-1}$  για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η παρουσία της χλωριούχου χολίνης στην υδρογέλη επιβεβαιώνεται από την εμφάνιση κορυφών στα  $1456$ ,  $1349$ ,  $1032$ ,  $950$  και  $851\text{ cm}^{-1}$  για την υδρογέλη με το NaDES, ενώ για εκείνη με το φυσικό μίγμα οι μόνες κορυφές που μπορούν να αποδοθούν στη χλωριούχο χολίνη είναι αυτές στα  $1454$ ,  $953$  και  $852\text{ cm}^{-1}$  με τις υπόλοιπες κορυφές να παρουσιάζουν σημαντικές μετατοπίσεις. Το γεγονός αυτό μπορεί να επιβεβαιώσει τον σχηματισμό του NaDES μέσα στις υδρογέλες χιτοζάνης. Πιο συγκεκριμένα, οι κορυφές στα  $950$  και στα  $953\text{ cm}^{-1}$  οφείλονται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-N της  $\text{ChCl}$ , ενώ γενικά η ζώνη δόνησης που αντιστοιχεί στην αμινομάδα της επηρεάζει τις κορυφές με κυματαριθμούς  $1200 - 864\text{ cm}^{-1}$ . Τέλος, το Tween 80 δεν αλληλεπιδρά χημικά με τη χιτοζάνη, καθώς οι μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν συγκριτικά με το καθαρό φάσμα του ήταν ελάχιστες. [106]

Από την οπτική παρατήρηση των δύο διαφορετικών υδρογελών μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι εκείνη που είχε παρασκευαστεί με το NaDES είναι πιο άκαμπτη και πιο συμπαγής, ενώ εκείνη με το φυσικό μίγμα είναι πιο ελαστική. Η παρουσία του Tween 80 βοήθησε στο σχηματισμό αδιαφανών υδρογελών, προσδίδοντας επιπλέον ελαστικότητα. Γενικότερα, η χρήση κοινών πλαστικοποιητών, όπως το Tween 80, διευρύνει την απόσταση μεταξύ των αλυσίδων του πολυμερούς και, ταυτόχρονα, η παρουσία της χλωριούχου χολίνης απομακρύνει τις αλυσίδες της χιτοζάνης μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματίζονται πρόσθετοι δεσμοί υδρογόνου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις πολυμερικές λειτουργικές ομάδες και οι υδρογέλες να διογκώνονται. [108]

### 3.5. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – Δοκιμή DPPH

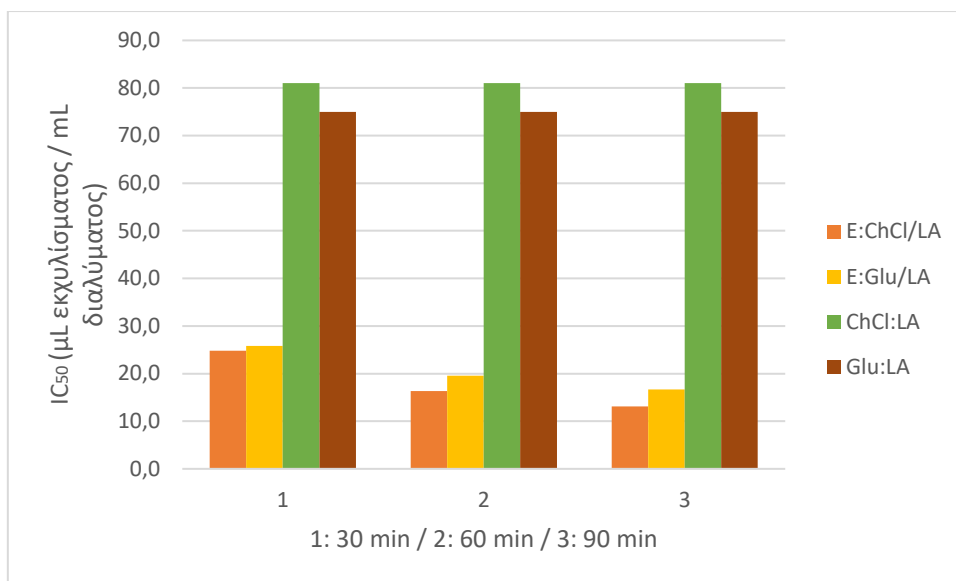
Η αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζουν τα εκχυλίσματα ελιάς με τα 2 NaDES που παρασκευάστηκαν κατά την πειραματική διαδικασία (E:ChCl/LA και E:Glu/LA) αξιολογήθηκε μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH. Στον πίνακα 27 παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε τιμές IC<sub>50</sub> (μg/mL) στα 30, 60 και 90 min, ενώ στον πίνακα 28 παρουσιάζονται ορισμένες μετρήσεις αντιοξειδωτικής δράσης συγκεκριμένων ενώσεων αναφοράς.

Πίνακας 27: Αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων που μελετήθηκαν [IC<sub>50</sub> (μg/mL)]

Ένωση	Ικανότητα δέσμευσης DPPH IC <sub>50</sub> (μg/mL)		
	30 min	60 min	90 min
E:ChCl/LA	24.8	16.3	13.1
E:Glu/LA	25.9	19.6	16.7
ChCl:LA		81	
Glu:LA		75	

Πίνακας 28: Αντιοξειδωτική δράση ορισμένων ενώσεων αναφοράς [IC<sub>50</sub> (μg/mL)]

Ενώσεις αναφοράς	Ικανότητα δέσμευσης DPPH IC <sub>50</sub> (μg/mL)
	30 min
Γαλλικό οξύ	2*10 <sup>-3</sup>
Trolox	7*10 <sup>-3</sup>
Ασκορβικό οξύ	8*10 <sup>-3</sup>
Χλωριούχος χολίνη	2.6
Γαλακτικό οξύ	24



Εικόνα 3-24: Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH από τα εκχυλίσματα, χρησιμοποιώντας ως ένωση αναφοράς τα NaDES ChCl:LA και Glu:LA

Ο δείκτης  $IC_{50}$  ή αλλιώς η μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση, αποτελεί ένα μέτρο της ισχύος μίας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 2.7.3., προσδιορίζεται η αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας του DPPH με την αλληλεπίδρασή της με τα αντιοξειδωτικά μόρια.

Παρατηρείται, αρχικά, ότι και τα δύο εκχυλίσματα παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, καθώς η τιμή του  $IC_{50}$  είναι σχετικά μικρή σε σχέση με την τιμή που παρουσιάζει ο καθαρός διαλύτης NaDES ChCl:LA. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την εκχύλιση ισχυρών αντιοξειδωτικών ενώσεων στη μήτρα των NaDES μέσω της μεθόδου εκχύλισης υπερήχων.

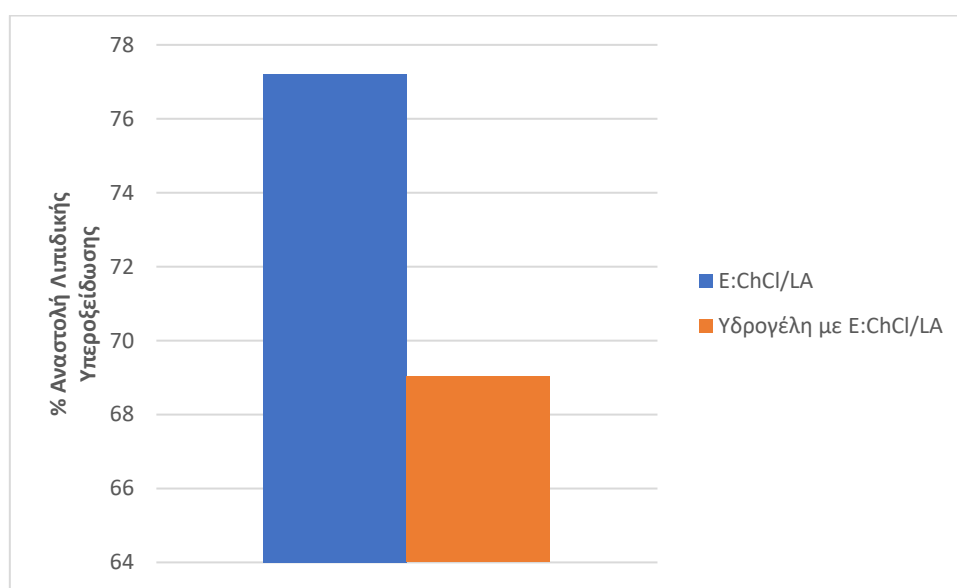
Αξιολογώντας τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη αναστολής της ρίζας σε όλους τους χρόνους που μελετήθηκαν, παρατηρείται ότι υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει το εκχύλισμα E:ChCl/LA με τιμές  $IC_{50} = 24.8, 16.3$  και  $13.1$   $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος / mL διαλύματος στα 30, στα 60 και στα 90 min αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι το εκχύλισμα προέκυψε έπειτα από χρήση υπερήχων σε συνθήκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 10 (15 g DES / 0.83 g OL), ισχύος 30% (120 W) και χρόνου εκχύλισης 15 min. Αντίθετα, το εκχύλισμα E:Glu/LA παρουσιάζει χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση με τιμές  $IC_{50} = 25.9, 19.6$  και  $16.7$   $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος / mL διαλύματος στους αντίστοιχους χρόνους.

Από μία συνολική μελέτη της επίδρασης του χρόνου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH των δειγμάτων (30, 60 και 90 min) στην αντιοξειδωτική δράση, είναι εμφανές πως, η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH. Το γεγονός αυτό αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω, καθώς αυτή η παρατήρηση μπορεί να αποτελεί ένδειξη του ότι ο φυσικά βαθέως ευτηκτικός διαλύτης εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε λειτουργεί ταυτόχρονα εκτός από εκχυλιστικό και ως προστατευτικό μέσο για τις εκχυλιζόμενες ενώσεις και, κατά συνέπεια, απαιτείται περισσότερος χρόνος,

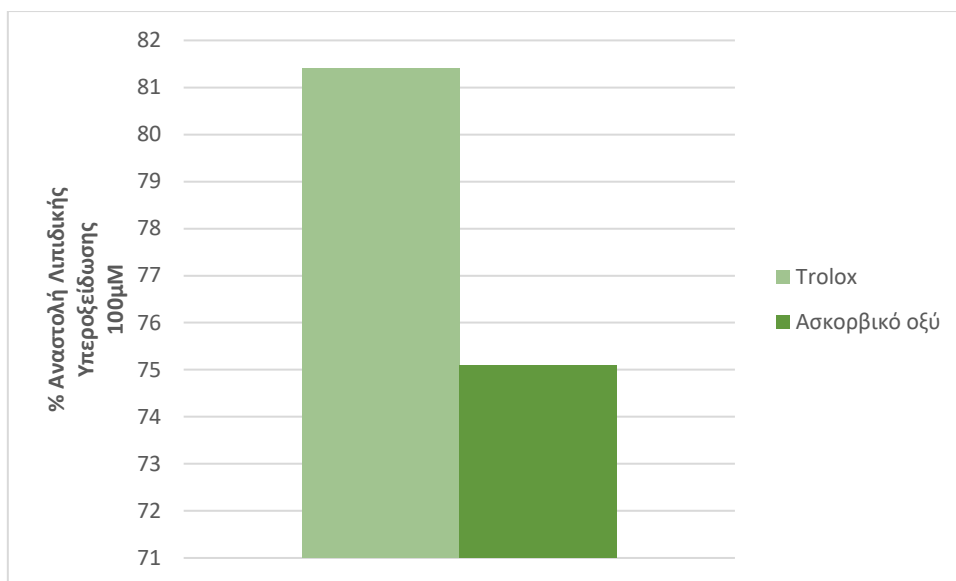
ώστε οι εκχυλιζόμενες ενώσεις να «ελευθερωθούν», να έρθουν σε επαφή και να δεσμεύσουν τη ρίζα DPPH.

### 3.6. Αξιολόγηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH)

Το E:ChCl:LA, αλλά και η υδρογέλη με τη βέλτιστη σύσταση που παρασκευάστηκε με αυτό, αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος, η οποία επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH. Τα αποτελέσματα της αναστολής που προέκυψαν για κάθε δείγμα που μελετήθηκε παρουσιάζονται στο διάγραμμα της εικόνας 3-25, ενώ στην εικόνα 3-26 παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής ορισμένων ενώσεων αναφοράς, όπως το Trolox και το ασκορβικό οξύ (Vitamin C) που μελετήθηκαν. Τέλος, επισημαίνεται ότι το καθαρό NaDES όπως επίσης και η υδρογέλη που παρασκευάστηκε με αυτό δεν παρουσίασαν καμία αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης και, για αυτό, τα αποτελέσματα δεν έχουν συμπεριληφθεί στο διάγραμμα της εικόνας 3-25.



Εικόνα 3-25: Διάγραμμα % αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των εξεταζόμενων δειγμάτων που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκέντρωση 1  $\mu$ L εκχυλίσματος/100 $\mu$ L



Εικόνα 3-26: Διάγραμμα % αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των δειγμάτων αναφοράς σε συγκέντρωση 100μΜ

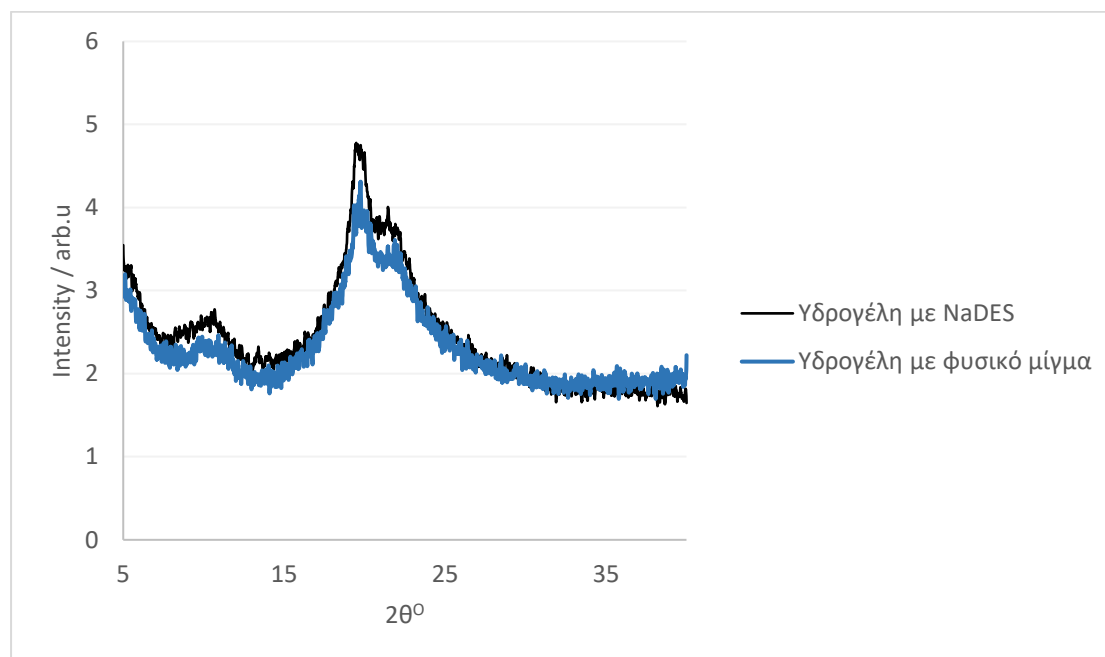
Όπως έχει αναφερθεί και στην ενότητα 1.4, από τα βιοενεργά συστατικά των φύλλων της ελιάς, το κύριο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στα φαινολικά, ενώ το περιεχόμενό τους σε τερπενοειδή και άλλες ενώσεις έχει μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό. Το υλικό, ως παραπροϊόν της ελαιοκαλλιέργειας έχει βρεθεί τα τελευταία χρόνια στο επίκεντρο του επιστημονικού αλλά και βιομηχανικού ενδιαφέροντος ιδίως επειδή περιέχει υδροξυτυροσόλη και ελαιοευρωπαΐνη, συστατικά με καλά τεκμηριωμένες βιοενεργές ιδιότητες. Ωστόσο, παρατηρώντας τα φαινολικά συστατικά (απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα, σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή) του υλικού και, λαμβάνοντας υπόψη τις γενικές αρχές δομής-αντιοξειδωτικής δράσης, καθώς και τις βιοενεργές ιδιότητες που τους έχουν αποδοθεί, αναμένεται το βιοενεργό δυναμικό του υλικού να οφείλεται στην πλειονότητα των συστατικών του. Τα συστατικά των φύλλων είναι είτε δευτερογενείς μεταβολίτες, είτε παράγωγά τους που προκύπτουν λόγω βιομετατροπών κατά τη διάρκεια διαχείρισης του υλικού (ξήρανση, αποθήκευση ή/και εκχύλιση). Για το λόγο αυτό, τα δείγματα που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, εφόσον προέρχονται από φύλλα ελιάς, αναμένεται να αναστέλλουν την λιπιδική υπεροξειδωση. [114]

Σύμφωνα με το διάγραμμα, το E/ChCl:LA επέδειξε ανασταλτική δράση με ποσοστό 77.2 % και η υδρογέλη βέλτιστης σύστασης με το E/ChCl:LA επέδειξε ανασταλτική δράση 69.0 %.

### 3.7. Ανάλυση υδρογελών με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (wide angle X-ray diffraction / WAXD)

Η υδρογέλη βέλτιστης σύστασης που προέκυψε μέσω του πειραματικού σχεδιασμού παρασκευάστηκε με διαλύτη τόσο το φυσικό μίγμα (απλή ανάδευση των επιμέρους συστατικών), αλλά και το φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη

χλωριούχου χολίνης – γαλακτικού οξέος. Υπενθυμίζεται ότι η υδρογέλη βέλτιστης σύστασης περιέχει 20 % w/v χιτοζάνη και διάλυμα NaDES περιεκτικότητας 7 % v/v. Στη συνέχεια, δείγμα των δύο υδρογελών αναλύεται μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, προκειμένου να διερευνηθεί η κρυσταλλική τους δομή.



Εικόνα 3-27: WAXD αποτύπωμα της υδρογέλης με NaDES (μαύρη γραμμή) και της υδρογέλης με φυσικό μίγμα (μπλε γραμμή)

Η απεικόνιση των τριών κορυφών υποδεικνύουν τον σχετικά υψηλό βαθμό κρυσταλλικότητας των υδρογελών, ο οποίος οφείλεται στην παρουσία της χιτοζάνης σε αυτές. Πιο συγκεκριμένα, η χιτοζάνη αποτελεί ένα ημικρυσταλλικό πολυμερές με δύο χαρακτηριστικές ανακλάσεις στις θέσεις  $2\theta = 9.5^\circ$  και  $20.3^\circ$ . Η προσθήκη του NaDES ή του φυσικού μίγματος για το σχηματισμό των υδρογελών οδηγεί σε χαμηλότερη κρυσταλλικότητα σε σχέση με την καθαρή χιτοζάνη, ωστόσο δεν παρατηρείται δραστική μείωση της έντασης των κορυφών, αλλά ούτε απώλεια κάποιας εξ αυτών. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η περιεκτικότητα των δύο διαλυτών που επιλέχθηκε για τον σχηματισμό των υδρογελών με τη βέλτιστη σύσταση δεν οδηγεί στην απώλεια κρυσταλλικότητας, η οποία προσδίδεται χάρη στο πολυμερές, δηλαδή στη χιτοζάνη που χρησιμοποιείται.

Όσον αφορά στην υδρογέλη που παρασκευάστηκε με το NaDES ChCl:LA, παρατηρείται ότι οι κορυφές εμφανίζονται στις θέσεις  $2\theta = 10.7^\circ$ ,  $20.0^\circ$  και  $21.5^\circ$ . Για την υδρογέλη που παρασκευάστηκε με το φυσικό μίγμα, οι κορυφές παρουσιάζονται σε παρόμοιες θέσεις και συγκεκριμένα για  $2\theta = 10.8^\circ$ ,  $19.7^\circ$  και  $22.0^\circ$ . Η μετατόπιση που παρατηρείται είναι αμελητέα μεταξύ των δειγμάτων, ενώ σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των δύο αποτυπωμάτων των υδρογελών αναφορικά με την ένταση των κορυφών. Αναλυτικότερα, οι κορυφές που παρατηρούνται στην υδρογέλη με το φυσικό μίγμα είναι χαμηλότερης

έντασης, δηλαδή ο βαθμός κρυσταλλικότητας της υδρογέλης αυτής είναι μικρότερος, και για αυτό θεωρείται ότι η κρυσταλλικότητα είναι χαμηλότερη. [106],[115]–[117]. Στους πίνακες 29 και 30, παρουσιάζονται οι τιμές έντασης και γωνιών για τις υδρογέλες που μελετήθηκαν, όπως αυτές προέκυψαν από την κρυσταλλογραφία ακτίνων X.

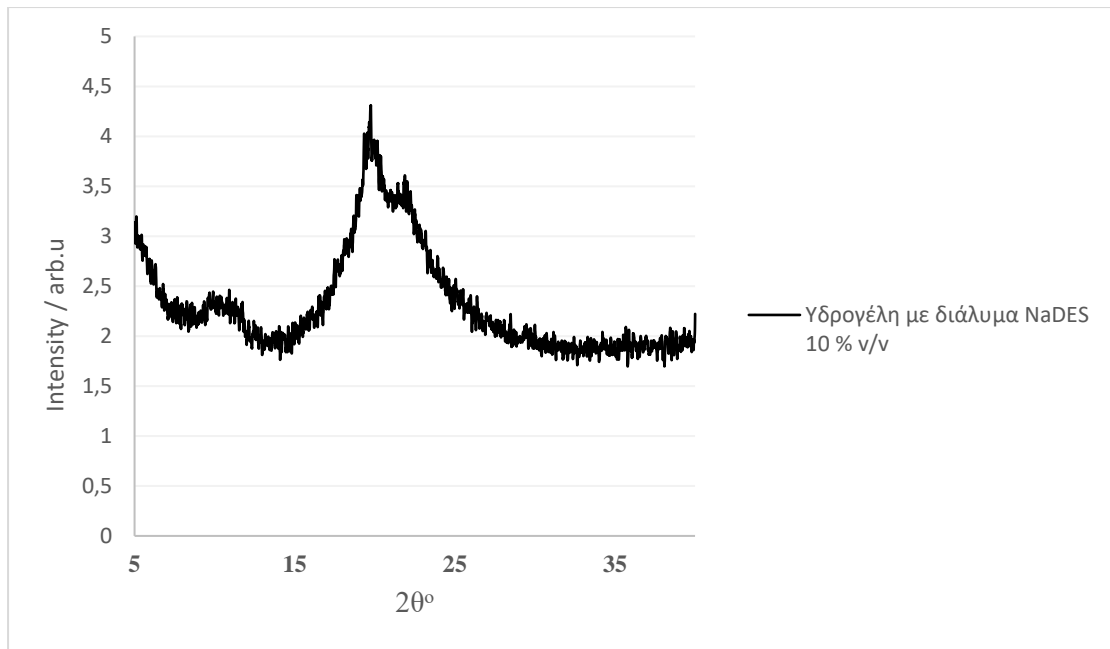
Πίνακας 29: Τιμές εντάσεων και γωνιών για την υδρογέλη με NaDES

<b>Υδρογέλη με NaDES</b>	
<b>Ένταση</b>	<b>2θ</b>
2.68	10.7
4.66	20.0
3.93	21.5

Πίνακας 30: Τιμές εντάσεων και γωνιών για την υδρογέλη με φυσικό μίγμα

<b>Υδρογέλη με φυσικό μίγμα</b>	
<b>Ένταση</b>	<b>2θ</b>
2.42	10.8
4.30	19.7
3.53	22.0

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ανάλυση κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και σε υδρογέλη με διαφορετική σύσταση από τη βέλτιστη, προκειμένου να εξαχθούν σημαντικά συμπεράσματα όσον αφορά στην κρυσταλλικότητα των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε υδρογέλη περιεκτικότητας 20 % w/v χιτοζάνης με διάλυμα NaDES ChCl:LA περιεκτικότητας 10 % v/v. Αναμένεται ότι η χιτοζάνη θα δίνει την κρυσταλλικότητα που περιγράφηκε παραπάνω, ενώ αξίζει να μελετηθεί η επίδραση της περιεκτικότητας του διαλύματος του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της υδρογέλης αυτής στην κρυσταλλικότητά της.



Εικόνα 3-28: WAXD αποτύπωμα της υδρογέλης με διάλυμα NaDES 10 % v/v

Με βάση το διάγραμμα της εικόνας 3-28, παρατηρείται ότι οι κορυφές εμφανίζονται στις θέσεις  $2\theta = 10.1^\circ$ ,  $19.7^\circ$  και  $21.9^\circ$ . Ωστόσο, συγκρίνοντας τις τιμές της έντασης των κορυφών που εμφανίζονται μεταξύ των υδρογελών με διάλυμα NaDES 7% v/v και με διάλυμα NaDES 10% v/v, παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη περιεκτικότητα του διαλύματος του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη οδηγεί σε μείωση της κρυσταλλικότητας της υδρογέλης, αφού οι χαρακτηριστικές κορυφές του πολυμερούς έχουν χαμηλότερη ένταση. Τα αποτελέσματα των τιμών των εντάσεων και των κορυφών που προέκυψαν για την υδρογέλη με διάλυμα NaDES 10% v/v παρουσιάζονται στον πίνακα 31.

Πίνακας 31: Τιμές εντάσεων και γωνιών για την υδρογέλη με διάλυμα NaDES 10%v/v

Υδρογέλη με διάλυμα NaDES 10% v/v	
Ένταση	2θ
2.42	10.1
4.30	19.7
3.53	21.9



## 4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση υδρογελών χιτοζάνης με χρήση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES) ως παράγοντα διασύνδεσης για τον σχηματισμό τους. Το NaDES που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των υδρογελών αποτελείται από χλωριούχο χολίνη και γαλακτικό οξύ (ChCl:LA) σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2, ενώ παρασκευάστηκε ακόμη ένας διαλύτης NaDES αποτελούμενος από γλυκόζη, γαλακτικό οξύ και νερό (Glu:LA:W) σε γραμμομοριακή αναλογία 1:5:6.2 και ένα διαλύτης NaDES από χλωριούχο χολίνη και κιτρικό οξύ (ChCl:CA) σε γραμμομοριακή αναλογία 2:1. Σημειώνεται ότι το NaDES ChCl:CA δεν είχε τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, καθώς δεν διέλυσε ικανοποιητικά τη χιτοζάνη και, για αυτό, δεν χρησιμοποιήθηκε σε κάποιο άλλο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας.

Στη συνέχεια, μέσω πειραματικού σχεδιασμού με το εργαλείο Box Benhken Design 3x3 και με βάση τις αποκρίσεις των εξαρτημένων μεταβλητών που προέκυψαν για την κάθε μία υδρογέλη ξεχωριστά (ικανότητα διόγκωσης, ικανότητα συγκράτησης νερού και απορρόφηση ελαίου), προέκυψαν οι βέλτιστες συνθήκες ανεξάρτητων μεταβλητών από τις οποίες πρέπει να παρασκευαστεί η υδρογέλη για να δίνει τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα. Σημειώνεται ότι ως ανεξάρτητες μεταβλητές εξετάστηκαν η περιεκτικότητα (% v/v) του διαλύματος του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES) που παρασκευάστηκε (ChCl:LA 1:2), η περιεκτικότητα της χιτοζάνης (% w/v), αλλά και η περιεκτικότητα (% v/v) του επιφανειοδραστικού παράγοντα Tween 80 που τελικά θα προκύψει στην κάθε υδρογέλη.

Από την αξιολόγηση των αποκρίσεων προέκυψαν οι παρακάτω βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών, όπως φαίνονται στον πίνακα 20.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της σύστασης της υδρογέλης

NaDES (%v/v) (A)	Χιτοζάνη (%w/v) (B)	Tween 80 (%v/v) (C)
7.0	20.0	0.545

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση φύλλων ελιάς με υπερήχους, χρησιμοποιώντας ως εκχυλιστικά μέσα τα NaDES ChCl:LA και Glu:LA:W που παρασκευάστηκαν. Τελικά, το εκχύλισμα με το NaDES ChCl:LA (E:ChCl/LA) επιλέχθηκε ως διαλύτης και παράγοντας διασύνδεσης για την παρασκευή υδρογέλης με τις βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών, όπως αυτές παρουσιάζονται στον πίνακα 20. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του μοριακού βάρους της χιτοζάνης που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των υδρογελών. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους, της οποίας η περιεκτικότητα διαμορφώνεται σε 10% w/v στην τελική υδρογέλη, με σταθερές, όμως, τις τιμές των υπόλοιπων παραμέτρων, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η σύγκριση μεταξύ των αποκρίσεων.

Τα αποτελέσματα των αποκρίσεων σε σχέση με τις ανεξάρτητες μεταβλητές για όλες τις υδρογέλες που παρασκευάστηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 32.

Πίνακας 32: Αποκρίσεις για βέλτιστη σύσταση υδρογέλης NaDES, υδρογέλης με E:ChCl/LA και υδρογέλης με χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους

	<b>Ικανότητα διόγκωσης - Swelling Ratio (SR) (%)</b>	<b>Ικανότητα συγκράτησης νερού - Water Retention Ratio (WRR) (%)</b>	<b>Απορρόφηση ελαίου - Absorbed Oil (mg)</b>
<b>Υδρογέλη με ChCl:LA (10 min)</b>	123	90	265.3
<b>Υδρογέλη με E:ChCl/LA (20 min) (M.O.)</b>	200	69	210
<b>Υδρογέλη με ChCl:LA και με χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους (20 min) (M.O.)</b>	150	94	578.7

Παρατηρείται ότι η υδρογέλη που παρασκευάστηκε με διαλύτη και παράγοντα διασύνδεσης το ChCl:LA παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στην ικανότητα συγκράτησης νερού, αλλά και στην απορρόφηση ελαίου, ωστόσο το ποσοστό διόγκωσής της είναι χαμηλότερο. Πιο συγκεκριμένα, η υδρογέλη ChCl:LA διατηρεί ποσοστό διόγκωσης της τάξεως του 100% σταθερό μέχρι το τέλος του χρόνου μελέτης, ενώ η υδρογέλη με E:ChCl/LA μπορεί να παρουσιάζει υψηλότερες τιμές, ωστόσο εμφανίζει μεγαλύτερες διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ακόμη, πιο ομαλή συμπεριφορά ως προς την ικανότητα συγκράτησης νερού δείχνει να παρουσιάζει και πάλι η υδρογέλη ChCl:LA, εμφανίζοντας αυτή τη φορά και υψηλότερες τιμές από την υδρογέλη με E:ChCl/LA. Όσον αφορά στην υδρογέλη που παρασκευάστηκε με διαλύτη και παράγοντα διασύνδεσης το ChCl:LA και με χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους, παρατηρείται ότι παρουσιάζει ικανοποιητικό ποσοστό διόγκωσης (150%) και πρακτικά αμετάβλητο σε όλη τη διάρκεια της μελέτης που πραγματοποιήθηκε, παρόλο που εμφανίζονται ορισμένες διακυμάνσεις. Συγκρίνοντας το ποσοστό συγκράτησης νερού, καθώς επίσης και τη διάρκεια συγκράτησής του (20 min έναντι των 10 min της υδρογέλης ChCl:LA με τη χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους), εξάγεται το συμπέρασμα ότι η υδρογέλη με τη χιτοζάνη μεσαίου μοριακού βάρους καθιστά την υδρογέλη περισσότερο ανθεκτική στην αποδόμησή της στο όξινο pH του διαλύματος υδροχλωρικού οξέος που

χρησιμοποιείται, ενώ ταυτόχρονα, η συγκράτηση νερού είναι μεγαλύτερη, γεγονός που οδηγεί σε αίσθημα κορεσμού μεγαλύτερης διάρκειας. Τέλος, είναι προφανές ότι η ποσότητα του ελαίου που απορροφάται είναι διπλάσια από εκείνη που απορροφάται από τις 2 υδρογέλες με τη χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους. Ωστόσο, στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι η αύξηση του μοριακού βάρους της χιτοζάνης οδηγεί σε μείωση της διαλυτότητας και των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων. Ιδιαίτερα σε εφαρμογές όπου η χιτοζάνη χρησιμοποιείται για χορήγηση από το στόμα, το μοριακό βάρος παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς τα oligομερή απορροφώνται ευκολότερα, ενώ οι μεγαλύτερου μοριακού βάρους αλυσίδες αποικοδομούνται αρκετά ώστε να αποβληθούν από τον οργανισμό. Επομένως, η χρήση χιτοζάνης μεσαίου μοριακού βάρους κατά τον πειραματικό σχεδιασμό δεν συνίσταται, αφού απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο διάλυσης κατά την παρασκευή των υδρογελών, αλλά και μεγαλύτερο χρόνο για να αποβληθεί από τον οργανισμό.

Ακολουθεί δομικός χαρακτηρισμός μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR) για το ChCl:LA και για το E/ChCl:LA, καθώς επίσης και για διαλύματα διαφορετικών περιεκτικοτήτων τόσο του ChCl:LA όσο και του φυσικού μίγματος που προκύπτουν από τα επιμέρους συστατικά του, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του νερού σε αυτά. Ακόμη, λαμβάνονται οι τιμές του pH για όλα τα διαλύματα, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση της αραίωσής τους με νερό. Τέλος, μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου μελετάται και η υδρογέλη βέλτιστης σύστασης που παρασκευάστηκε με διαλύτη το ChCl:LA, αλλά και με το φυσικό μίγμα των επιμέρους συστατικών. Από όλα τα παραπάνω και έπειτα από την σύγκρισή τους, εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές που εμφανίζονται λόγω της παρουσίας της χλωριούχου χολίνης, του γαλακτικού οξέος και της χιτοζάνης. Ακόμη, γίνεται κατανοητή η επίδραση του νερού στα διαλύματα του ChCl:LA και του φυσικού μίγματος και πώς μπορεί αυτό να αλλοιώσει τη χημική τους δομή, το pH και τις ιδιότητες που μπορούν να προσδώσουν στην υδρογέλη που παρασκευάζεται. Φαίνεται, λοιπόν, ότι οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των συστατικών του ChCl:LA, δημιουργούν ένα ισχυρό δίκτυο, οι ιδιότητες του οποίου δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό όταν η ποσότητα του νερού που προστίθεται είναι μικρή. Αντίθετα, στην περίπτωση του φυσικού μίγματος, το νερό παίζει καθοριστικό ρόλο, με αποτέλεσμα οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται να μην είναι το ίδιο ισχυροί και το δίκτυο να καταστρέφεται. Γενικότερα, τα NaDES δημιουργούν ένα ιδιαίτερο χημικό περιβάλλον και τείνουν να προστατεύουν τα συστατικά τους χάρη στους δεσμούς που αναπτύσσουν. Αυτή η συμπεριφορά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι είναι συμβατά με φαρμακευτικά σκευάσματα, οδηγεί στην αξιοποίηση των NaDES ως διαλύτες, ως παράγοντες διασύνδεσης και ως μέσα αποθήκευσης των εκχυλισμάτων για μακρά χρονικά διαστήματα.

Τα 2 εκχυλίσματα ελιάς που προέκυψαν με τα 2 NaDES ως διαλύτες (E:ChCl/LA και E:Glu/LA) αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με δοκιμή DPPH, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχημένη εκχύλιση των βιοενεργών ενώσεων από την πρώτη ύλη. Από μία συνολική μελέτη της επίδρασης του χρόνου

αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH των δειγμάτων (30, 60 και 90 min) στην αντιοξειδωτική δράση, είναι εμφανές πως, η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει το E:ChCl/LA με τιμές IC<sub>50</sub> = 24.8, 16.3 και 13.1 μg εκχυλίσματος / mL διαλύματος στα 30, στα 60 και στα 90 min αντίστοιχα, ενώ το E:Glu/LA παρουσιάζει χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση με τιμές IC<sub>50</sub> = 25.9, 19.6 και 16.7 μg εκχυλίσματος / mL διαλύματος στους αντίστοιχους χρόνους. Από την άλλη, τα αντίστοιχα NaDES εμφανίζουν τιμές 81 και 75 μg/mL. Οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων είναι αρκετά χαμηλότερες από αυτές των αντίστοιχων NaDES, γεγονός που αποδεικνύει την εκχύλιση ισχυρών αντιοξειδωτικών ενώσεων από τα φύλλα ελιάς.

Στη συνέχεια, το E:ChCl/LA, καθώς και η υδρογέλη βέλτιστης σύστασης που παρασκευάστηκε με διαλύτη και παράγοντα διασύνδεσης το E:ChCl/LA, αξιολογούνται ως προς την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH). Συγκεκριμένα το E:ChCl/LA επέδειξε ανασταλτική δράση με ποσοστό 77.2% και η υδρογέλη με το E:ChCl/LA 69.0%, τη στιγμή που το καθαρό NaDES ChCl:LA και η υδρογέλη που παρασκευάστηκε με τον συγκεκριμένο διαλύτη, δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτο ποσοστό αναστολής.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση υδρογελών με κρυσταλλογραφία ακτίνων X για την υδρογέλη βέλτιστης σύστασης (7.0 %v/v ChCl:LA, 20.0 %w/v CS και 0.55 %v/v Tween 80) με διαλύτη και παράγοντα διασύνδεσης το ChCl:LA, αλλά και με διαλύτη το φυσικό μίγμα των επιμέρους συστατικών. Παρατηρήθηκε ότι οι κορυφές που απεικονίζονται στο αποτύπωμα της υδρογέλης με το φυσικό μίγμα είναι χαμηλότερης έντασης, δηλαδή ο βαθμός κρυσταλλικότητας της υδρογέλης αυτής είναι μικρότερος. Μελετήθηκε, επίσης, υδρογέλη περιεκτικότητας 20 % w/v χιτοζάνης με διάλυμα ChCl:LA περιεκτικότητας 10 % v/v, με σκοπό να προσδιοριστεί η επίδραση της περιεκτικότητας του διαλύματος του NaDES ChCl:LA στην κρυσταλλικότητά της. Παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη περιεκτικότητα του διαλύματος του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη οδηγεί σε μείωση της κρυσταλλικότητας της υδρογέλης, αφού οι χαρακτηριστικές κορυφές του πολυμερούς έχουν χαμηλότερη ένταση. Όλες οι τιμές των εντάσεων που σημειώθηκαν στις αντίστοιχες γωνίες των αποτυπωμάτων των υδρογελών που μελετήθηκαν, παρουσιάζονται στον πίνακα 33.

Πίνακας 33: Τιμές εντάσεων και γωνιών για όλες τις υδρογέλες που μελετήθηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X

Ένταση	2θ
<b>Υδρογέλη με NaDES</b>	
2.68	10.7
4.66	20.0
3.93	21.5
<b>Υδρογέλη με φυσικό μίγμα</b>	
2.42	10.8
4.30	19.7
3.53	22.0

Υδρογέλη με διάλυμα NaDES 10% v/v	
2.42	10.1
4.30	19.7
3.53	21.9

## 5. Μελλοντικές προτάσεις

Η παρούσα μελέτη προσέφερε αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά στο σχεδιασμό και στη σύνθεση διαφόρων NaDES, στην αξιοποίησή τους στην εκχύλιση βιοενεργών συστατικών από τα φύλλα ελιάς υποβοηθούμενη από υπερήχους και, τελικά, στο σχηματισμό υδρογελών χιτοζάνης του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη χλωριούχου χολίνης – γαλακτικού οξέος με ενσωματωμένο το εκχύλισμα. Πρόκειται, ωστόσο, για μία μελέτη με μεγάλες προοπτικές συνέχισης, καθώς αποτελεί ένα σχετικά καινούριο πεδίο με λίγες ολοκληρωμένες έρευνες. Για το λόγο αυτό προτείνονται κάποιες δυνατότητες συνέχισης και εξέλιξης της έρευνας στον τομέα αυτό.

- ✓ Διεξαγωγή θερμοσταθμικών αναλύσεων των NaDES στα λαμβανόμενα εκχυλίσματα, με σκοπό να διερευνηθεί η θερμοκρασία διάσπασής τους, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αποδόμησης και παραγωγής παραπροϊόντων κατά την εκχύλιση. Μια σειρά τέτοιων αναλύσεων μπορεί να ενισχύσει την πεποίθηση πως η καινοτομία που φέρουν ως διαλύτες είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως μήτρες αποθήκευσης βιοενεργών ενώσεων χωρίς την ανάγκη διαχωρισμού τους και με επιπλέον, πιθανόν, δράση
- ✓ Λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού,  $^1\text{H}$  NMR, με σκοπό την πιο ολοκληρωμένη εικόνα ως προς τον τρόπο που αλληλεπιδρούν τα επιμέρους συστατικά των NaDES μεταξύ τους, και συνεπώς, θα ήταν δυνατή η αιτιολόγηση του τρόπου αλληλεπίδρασης των NaDES τόσο με τις βιοενεργές ενώσεις των φύλλων ελιάς όσο και με τη χιτοζάνη
- ✓ Πλήρης ταυτοποίηση του φυτοχημικού προφίλ των παραλαμβανόμενων εκχυλισμάτων με χρωματογραφική μέθοδο, όπως HPLC, με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων μέτρησης ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών, καθώς και η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το είδος των ενώσεων που τείνουν να αλληλεπιδράσουν περισσότερο με κάθε NaDES
- ✓ Διερεύνηση για το αν ο φυσικά βαθέως ευτηκτικός διαλύτης εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε λειτουργεί ταυτόχρονα εκτός από εκχυλιστικό και ως προστατευτικό μέσο για τις εκχυλιζόμενες ενώσεις και, κατά συνέπεια, απαιτείται περισσότερος χρόνος, ώστε οι εκχυλιζόμενες ενώσεις να «ελευθερωθούν», να έρθουν σε επαφή και να δεσμεύσουν τη ρίζα DPPH
- ✓ Ανάλυση των θερμικών ιδιοτήτων βέλτιστων υδρογελών (TGA, DSC) για τον καθορισμό της καθαρότητας και της οργανικής περιεκτικότητας του υλικού, αλλά και για τον αν παρουσιάζουν απώλεια ή ωφέλεια βάρους λόγω της διάσπασης, οξείδωσης ή αφυδάτωσής τους

- ✓ Μέτρηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (TPC) και φλαβονοειδών ενώσεων με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου (TFC) στα εκχυλίσματα NaDES που παρασκευάστηκαν, καθώς επίσης και στις υδρογέλες που προκύπτουν από αυτά
- ✓ Ρεολογικός χαρακτηρισμός των βέλτιστων υδρογελών
- ✓ Εγκλεισμός διαφορετικών βιταμινών (ασκορβικό οξύ, α-τοκοφερόλη, βιταμίνη Α) στις υδρογέλες, με στόχο την ανάπτυξη ενός καινοτόμου συστήματος μεταφοράς φαρμάκου (drug delivery system). Στην περίπτωση αυτή, οι υδρογέλες θα λειτουργούν ταυτόχρονα και ως συμπληρώματα διατροφής και λιποδιαλύτες, αλλά και ως φορείς βιταμινών, απαραίτητων για τον ανθρώπινο οργανισμό
- ✓ Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υδρογελών με τη μέθοδο DPPH που έχουν παρασκευαστεί με διαλύτη τα εκχυλίσματα NaDES

## Συμμετοχή σε διεθνή συνέδρια

Pitterou I., **Ntirogianni A.**, Tzani A., Tsiantas K., Batrinou A., Zoumpoulakis P., Detsi A., “Development of bioactive chitosan-based hydrogels using natural deep eutectic solvents (NADES) as dissolution and gelating agents”, 9th IUPAC International Conference on Green Chemistry, 5–9 September 2022, Athens, Greece

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] P. Anastas and N. Eghbali, "Green Chemistry: Principles and Practice," *Chem Soc Rev*, vol. 39, no. 1, pp. 301–312, Dec. 2010, doi: 10.1039/b918763b.
- [2] E. Harrison and I. Dekker, "Designing & Facilitating a Bioeconomy in the Capital Regional District Learning Through the Lenses of Biomimicry, Industrial Symbiosis, and Green Chemistry." [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/351060324>
- [3] H. C. Erythropel *et al.*, "The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles," *Green Chemistry*, vol. 20, no. 9. Royal Society of Chemistry, pp. 1929–1961, 2018. doi: 10.1039/c8gc00482j.
- [4] A. Lavaud, "The rise of deep eutectics from nature to cosmetics Biocatalysis of lipids modifications View project Mickaël Laguerre Naturex," 2016. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/309634972>
- [5] R. Alcalde, A. Gutiérrez, M. Atilhan, and S. Aparicio, "An experimental and theoretical investigation of the physicochemical properties on choline chloride – Lactic acid based natural deep eutectic solvent (NADES)," *J Mol Liq*, vol. 290, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2019.110916.
- [6] Y. Dai, J. van Spronsen, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, "Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology," *Anal Chim Acta*, vol. 766, pp. 61–68, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.aca.2012.12.019.
- [7] Z. Wei *et al.*, "Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography," *Sep Purif Technol*, vol. 149, pp. 237–244, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.seppur.2015.05.015.
- [8] Y. Dai, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, "Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L.," *Anal Chem*, vol. 85, no. 13, pp. 6272–6278, Jul. 2013, doi: 10.1021/ac400432p.
- [9] C. G. González, N. R. Mustafa, E. G. Wilson, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, "Application of natural deep eutectic solvents for the 'green' extraction of vanillin from vanilla pods," *Flavour Fragr J*, vol. 33, no. 1, pp. 91–96, Jan. 2018, doi: 10.1002/ffj.3425.
- [10] M. H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, A. Hayyan, and N. S. Jayakumar, "New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 979. Elsevier B.V., pp. 1–23, Aug. 01, 2017. doi: 10.1016/j.aca.2017.05.012.
- [11] Q. Zhang, K. de Oliveira Vigier, S. Royer, and F. Jérôme, "Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications," *Chem Soc Rev*, vol. 41, no. 21, pp. 7108–7146, Oct. 2012, doi: 10.1039/c2cs35178a.



- [12] K. Radošević, M. Cvjetko Bubalo, V. Gaurina Srček, D. Grgas, T. Landeka Dragičević, and R. I. Redovniković, "Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents," *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 112, pp. 46–53, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.
- [13] Q. Wen, J. X. Chen, Y. L. Tang, J. Wang, and Z. Yang, "Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents," *Chemosphere*, vol. 132, pp. 63–69, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.061.
- [14] D. J. Ramón and G. Guillena, "Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications," 2020.
- [15] Z. Wei *et al.*, "Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography," *Sep Purif Technol*, vol. 149, pp. 237–244, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.seppur.2015.05.015.
- [16] M. W. Nam, J. Zhao, M. S. Lee, J. H. Jeong, and J. Lee, "Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*," *Green Chemistry*, vol. 17, no. 3, pp. 1718–1727, Mar. 2015, doi: 10.1039/c4gc01556h.
- [17] A. Tzani *et al.*, "Green synthesis of bis-( $\beta$ -dicarbonyl)-methane derivatives and biological evaluation as putative anticandidal agents," *J Mol Struct*, vol. 1216, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.molstruc.2020.128276.
- [18] D. Skarpalezos and A. Detsi, "Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources," *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 9, no. 19. MDPI AG, Oct. 01, 2019. doi: 10.3390/app9194169.
- [19] H. Vanda, Y. Dai, E. G. Wilson, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, "Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents," *Comptes Rendus Chimie*, vol. 21, no. 6, pp. 628–638, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.crci.2018.04.002.
- [20] 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," *Mater Adv*, vol. 2, no. 12, pp. 3954–3964, Jun. 2021, doi: 10.1039/d0ma01008a.
- [21] M. C. Gutiérrez, M. L. Ferrer, C. R. Mateo, and F. del Monte, "Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures," *Langmuir*, vol. 25, no. 10, pp. 5509–5515, May 2009, doi: 10.1021/la900552b.
- [22] I. M. Aroso *et al.*, "Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 98, pp. 57–66, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.11.002.
- [23] A. Roda, F. Santos, A. A. Matias, A. Paiva, and A. R. C. Duarte, "Design and processing of drug delivery formulations of therapeutic deep eutectic systems

for tuberculosis," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 161, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.supflu.2020.104826.

- [24] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review," *Journal of Advanced Research*, vol. 6, no. 2. Elsevier B.V., pp. 105–121, 2015. doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [25] N. Bhattarai, J. Gunn, and M. Zhang, "Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, no. 1. pp. 83–99, Jan. 31, 2010. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.019.
- [26] F. Ahmadi, Z. Oveisi, S. M. Samani, and Z. Amoozgar, "Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications.," *Res Pharm Sci*, vol. 10, no. 1, pp. 1–16.
- [27] M. C. G. Pellá, M. K. Lima-Tenório, E. T. Tenório-Neto, M. R. Guilherme, E. C. Muniz, and A. F. Rubira, "Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications," *Carbohydrate Polymers*, vol. 196. Elsevier Ltd, pp. 233–245, Sep. 15, 2018. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.033.
- [28] N. A. Medellín-Castillo *et al.*, "Formaldehyde and tripolyphosphate crosslinked chitosan hydrogels: Synthesis, characterization and modeling," *Int J Biol Macromol*, vol. 183, pp. 2293–2304, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.020.
- [29] W. E. Hennink and C. F. van Nostrum, "Novel crosslinking methods to design hydrogels," 2002. [Online]. Available: [www.elsevier.com/locate/drugdeliv](http://www.elsevier.com/locate/drugdeliv)
- [30] M. Rezvanian, N. Ahmad, M. C. I. Mohd Amin, and S. F. Ng, "Optimization, characterization, and in vitro assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications," *Int J Biol Macromol*, vol. 97, pp. 131–140, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.079.
- [31] T. K. Giri, A. Thakur, A. Alexander, Ajazuddin, H. Badwaik, and D. K. Tripathi, "Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: Present status and applications," *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 2, no. 5. Chinese Academy of Medical Sciences, pp. 439–449, 2012. doi: 10.1016/j.apsb.2012.07.004.
- [32] E. Jakubowska, M. Gierszewska, J. Nowaczyk, and E. Olewnik-Kruszkowska, "Physicochemical and storage properties of chitosan-based films plasticized with deep eutectic solvent," *Food Hydrocoll*, vol. 108, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106007.
- [33] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 31, no. 7. pp. 603–632, Jul. 2006. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
- [34] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, and H. Ni, "Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique," *Colloids*

*Surf B Biointerfaces*, vol. 90, no. 1, pp. 21–27, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.09.042.

- [35] M. Maddaloni, I. Vassalini, and I. Alessandri, “Green Routes for the Development of Chitin/Chitosan Sustainable Hydrogels,” *Sustainable Chemistry*, vol. 1, no. 3, pp. 325–344, Dec. 2020, doi: 10.3390/suschem1030022.
- [36] H. M. Abdel-Ghany and M. E. S. Salem, “Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review,” *Reviews in Aquaculture*, vol. 12, no. 1. Wiley-Blackwell, pp. 438–452, Feb. 01, 2020. doi: 10.1111/raq.12326.
- [37] H. J. Jin, H. Zhang, M. L. Sun, B. G. Zhang, and J. W. Zhang, “Urokinase-coated chitosan nanoparticles for thrombolytic therapy: Preparation and pharmacodynamics in vivo,” *J Thromb Thrombolysis*, vol. 36, no. 4, pp. 458–468, Nov. 2013, doi: 10.1007/s11239-013-0951-7.
- [38] M. Larsson, A. Borde, E. Mattisson, D.-M. Liu, and A. Larsson, “Evaluation of Carboxymethyl-Hexanoyl Chitosan as a Protein Nanocarrier Short Communication,” 2013. [Online]. Available: [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
- [39] M. Saheb, N. Fereydouni, S. Nemati, G. E. Barreto, T. P. Johnston, and A. Sahebkar, “Chitosan-based delivery systems for curcumin: A review of pharmacodynamic and pharmacokinetic aspects,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 234, no. 8. Wiley-Liss Inc., pp. 12325–12340, Aug. 01, 2019. doi: 10.1002/jcp.28024.
- [40] D. Tang, Y. Wang, W. Kang, J. Zhou, R. Dong, and Q. Feng, “Chitosan attenuates obesity by modifying the intestinal microbiota and increasing serum leptin levels in mice,” *J Funct Foods*, vol. 64, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.jff.2019.103659.
- [41] R. A. A. Muzzarelli, “Chitosan-based dietary,” 1996.
- [42] C. N. Mhurchu, C. Dunshea-Mooij, D. Bennett, and A. Rodgers, “Effect of chitosan on weight loss in overweight and obese individuals: a systematic review of randomized controlled trials,” 2005.
- [43] T. Ahmad Khan, K. Khiang Peh, and H. Seng Ch, “Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods,” 2002. [Online]. Available: [www.ualberta.ca/~csps](http://www.ualberta.ca/~csps)
- [44] “NII-Electronic Library Service.”
- [45] A. Peña, N. S. Sánchez, and M. Calahorra, “Effects of chitosan on candida albicans: Conditions for its antifungal activity,” *Biomed Res Int*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/527549.
- [46] M. S. Rodríguez and L. E. Albertengo, “Interaction between chitosan and oil under stomach and duodenal digestive chemical conditions,” *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 69, no. 11, pp. 2057–2062, 2005, doi: 10.1271/bbb.69.2057.
- [47] D. R. Rohindra, A. v Nand, and J. R. Khurma, “Swelling properties of chitosan hydrogels.”

- [48] E. Jakubowska, M. Gierszewska, J. Nowaczyk, and E. Olewnik-Kruszkowska, "Physicochemical and storage properties of chitosan-based films plasticized with deep eutectic solvent," *Food Hydrocoll*, vol. 108, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106007.
- [49] M. A. Smirnov *et al.*, "Self-healing films based on chitosan containing citric acid/choline chloride deep eutectic solvent," *Polym Test*, vol. 97, May 2021, doi: 10.1016/j.polymertesting.2021.107156.
- [50] 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," *Mater Adv*, vol. 2, no. 12, pp. 3954–3964, Jun. 2021, doi: 10.1039/d0ma01008a.
- [51] L. H. Fasolin, C. S. F. Picone, R. C. Santana, and R. L. Cunha, "Production of hybrid gels from polysorbate and gellan gum," *Food Research International*, vol. 54, no. 1, pp. 501–507, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2013.07.026.
- [52] S. Zou, Z. Wei, Y. Hu, Y. Deng, Z. Tong, and C. Wang, "Macroporous antibacterial hydrogels with tunable pore structures fabricated by using Pickering high internal phase emulsions as templates," *Polym Chem*, vol. 5, no. 14, pp. 4227–4234, Jul. 2014, doi: 10.1039/c4py00436a.
- [53] F. Yang *et al.*, "Mechanically tough and recoverable hydrogels via dual physical crosslinkings," *J Polym Sci B Polym Phys*, vol. 56, no. 19, pp. 1294–1305, Oct. 2018, doi: 10.1002/polb.24729.
- [54] A. S. C. Teles, D. W. H. Chávez, F. dos Santos Gomes, L. M. C. Cabral, and R. V. Tonon, "Effect of temperature on the degradation of bioactive compounds of Pinot Noir grape pomace during drying," *Brazilian Journal of Food Technology*, vol. 21, 2018, doi: 10.1590/1981-6723.5917.
- [55] K. Stamatopoulos, E. Katsoyannos, and A. Chatzilazarou, "Antioxidant activity and thermal stability of oleuropein and related phenolic compounds of olive leaf extract after separation and concentration by salting-out-assisted cloud point extraction," *Antioxidants*, vol. 3, no. 2, pp. 229–244, Jun. 2014, doi: 10.3390/antiox3020229.
- [56] S. H. Omar, "Oleuropein in olive and its pharmacological effects," *Scientia Pharmaceutica*, vol. 78, no. 2, pp. 133–154, 2010. doi: 10.3797/scipharm.0912-18.
- [57] E. Medicines Agency, "Assessment report on *Olea europaea* L., folium Final." [Online]. Available: [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact)
- [58] B. Barbaro *et al.*, "Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, no. 10. MDPI AG, pp. 18508–18524, Oct. 14, 2014. doi: 10.3390/ijms151018508.

- [59] S. N. El and S. Karakaya, "Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health," *Nutrition Reviews*, vol. 67, no. 11. pp. 632–638, Nov. 2009. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x.
- [60] H. F. Al-Azzawie and M. S. S. Alhamdani, "Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits," *Life Sci*, vol. 78, no. 12, pp. 1371–1377, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.lfs.2005.07.029.
- [61] E. Zurob *et al.*, "Design of natural deep eutectic solvents for the ultrasound-assisted extraction of hydroxytyrosol from olive leaves supported by COSMO-RS," *Sep Purif Technol*, vol. 248, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.seppur.2020.117054.
- [62] A. K. Marković, J. Torić, M. Barbarić, and C. J. Brala, "Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health," *Molecules*, vol. 24, no. 10. MDPI AG, 2019. doi: 10.3390/molecules24102001.
- [63] I. Khemakhem, O. Abdelhedi, I. Trigui, M. A. Ayadi, and M. Bouaziz, "Structural, antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides extracted from olive leaves," *Int J Biol Macromol*, vol. 106, pp. 425–432, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.037.
- [64] G. Difonzo *et al.*, "Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: Antioxidant characterization and biological activity," *J Funct Foods*, vol. 31, pp. 63–70, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.jff.2017.01.039.
- [65] A. N. Sudjana *et al.*, "Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract," *Int J Antimicrob Agents*, vol. 33, no. 5, pp. 461–463, May 2009, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026.
- [66] B. le Tutour and D. Guedon, "ANTIOXIDATIVE ACTIVITIES OF OLEA EUROPAEA RELATED PHENOLIC COMPOUNDS LEAVES AND," 1992.
- [67] E. L. Ghisalberti, "Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids," 1998.
- [68] C. Negro *et al.*, "Phenolic Profile and antioxidant activity of Italian Monovarietal extra virgin olive oils," *Antioxidants*, vol. 8, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.3390/antiox8060161.
- [69] A. K. M. Muktedirul Bari Chowdhury, C. S. Akrotos, D. v. Vayenas, and S. Pavlou, "Olive mill waste composting: A review," *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 85. pp. 108–119, Nov. 2013. doi: 10.1016/j.ibiod.2013.06.019.
- [70] M. Servili *et al.*, "Phenolic compounds in olive oil: Antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure," *Inflammopharmacology*, vol. 17, no. 2. pp. 76–84, Apr. 2009. doi: 10.1007/s10787-008-8014-y.

- [71] X. L. Ouyang, L. X. Wei, H. S. Wang, and Y. M. Pan, "Antioxidant activity and phytochemical composition of *Osmanthus fragrans* pulps," *South African Journal of Botany*, vol. 98, pp. 162–166, May 2015, doi: 10.1016/j.sajb.2015.03.180.
- [72] A. Cardinali, S. Pati, F. Minervini, I. D'Antuono, V. Linsalata, and V. Lattanzio, "Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants," *J Agric Food Chem*, vol. 60, no. 7, pp. 1822–1829, Feb. 2012, doi: 10.1021/jf204001p.
- [73] R. Briante, M. Patumi, S. Terenziani, E. Bismuto, F. Febbraio, and R. Nucci, "Olea europaea L. leaf extract and derivatives: Antioxidant properties," *J Agric Food Chem*, vol. 50, no. 17, pp. 4934–4940, Aug. 2002, doi: 10.1021/jf025540p.
- [74] L. Abaza, A. Taamalli, H. Nsir, and M. Zarrouk, "Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds," *Antioxidants*, vol. 4, no. 4. MDPI, pp. 682–698, Dec. 01, 2015. doi: 10.3390/antiox4040682.
- [75] O. Ghomari *et al.*, "Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity," *Biotechnology Reports*, vol. 23, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.btre.2019.e00347.
- [76] M. Irakli, P. Chatzopoulou, and L. Ekateriniadou, "Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities," *Ind Crops Prod*, vol. 124, pp. 382–388, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.07.070.
- [77] O. Benavente-Garcõ A, J. Castillo, J. Lorente, A. Ortunã O B, and J. A. del Rio, "Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves." [Online]. Available: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)
- [78] N. Rahmanian, S. M. Jafari, and T. A. Wani, "Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 42, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 150–172, Apr. 01, 2015. doi: 10.1016/j.tifs.2014.12.009.
- [79] M. C. Achilonu and D. O. Umesiobi, "Bioactive phytochemicals: Bioactivity, sources, preparations, and/or modifications via silver tetrafluoroborate mediation," *Journal of Chemistry*, vol. 2015. Hindawi Publishing Corporation, 2015. doi: 10.1155/2015/629085.
- [80] J. Azmir *et al.*, "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review," *J Food Eng*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- [81] V. Kothari, A. Gupta, and M. Naraniwal, "Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts."

- [82] M. G. Cares, Y. Vargas, L. Gaete, J. Sainz, and J. Alarcón, "Ultrasonically assisted Extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina," in *Physics Procedia*, Jan. 2010, vol. 3, no. 1, pp. 169–178. doi: 10.1016/j.phpro.2010.01.024.
- [83] S. Rodrigues and F. A. N. Fernandes, "Ultrasound-assisted extraction," *Stewart Postharvest Review*, vol. 5, no. 5, pp. 1–11, Oct. 2009. doi: 10.2212/spr.2009.5.1.
- [84] M. D. Esclapez, J. v. García-Pérez, A. Mulet, and J. A. Cárcel, "Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products," *Food Engineering Reviews*, vol. 3, no. 2, pp. 108–120, Jun. 2011. doi: 10.1007/s12393-011-9036-6.
- [85] M. H. Ahmad-Qasem, J. Cánovas, E. Barrajión-Catalán, V. Micol, J. A. Cárcel, and J. V. García-Pérez, "Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound," *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 17, pp. 120–129, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.ifset.2012.11.008.
- [86] J. J. Yuan, C. Z. Wang, J. Z. Ye, R. Tao, and Y. S. Zhang, "Enzymatic hydrolysis of oleuropein from *Olea europea* (olive) leaf extract and antioxidant activities," *Molecules*, vol. 20, no. 2, pp. 2903–2921, Feb. 2015, doi: 10.3390/molecules20022903.
- [87] I. Khemakhem *et al.*, "Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range," *Ultrason Sonochem*, vol. 34, pp. 466–473, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.010.
- [88] S. Vallabhbai, M. A. Desai, J. K. Parikh, M. R. Thakker, M. A. Desai, and J. K. Parikh, "Extraction of Phytochemicals using Neoteric Solvents Selective extraction using hydrotropes from biomass View project Catalytic hydrogenation of biomass derived platform molecules to fuel and chemicals View project Miral Thakker Extraction of Phytochemicals using Neoteric Solvents." [Online]. Available: <http://www.krishisanskriti.org/janrm.html>
- [89] G. García, S. Aparicio, R. Ullah, and M. Atilhan, "Deep eutectic solvents: Physicochemical properties and gas separation applications," *Energy and Fuels*, vol. 29, no. 4, pp. 2616–2644, Apr. 2015, doi: 10.1021/ef5028873.
- [90] E. D. O. Silva, L. L. Borges, E. C. da Conceição, and M. T. F. Bara, "Box-behnken experimental design for extraction of artemisinin from *artemisia annua* and validation of the assay method," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 27, no. 4, pp. 519–524, 2017, doi: 10.1016/j.bjp.2017.03.002.
- [91] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, and L. A. Escaleira, "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry," *Talanta*, vol. 76, no. 5, Elsevier, pp. 965–977, Sep. 15, 2008. doi: 10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- [92] A. Lavaud, "The rise of deep eutectics from nature to cosmetics Biocatalysis of lipids modifications View project Mickaël Laguerre Naturex," 2016. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/309634972>

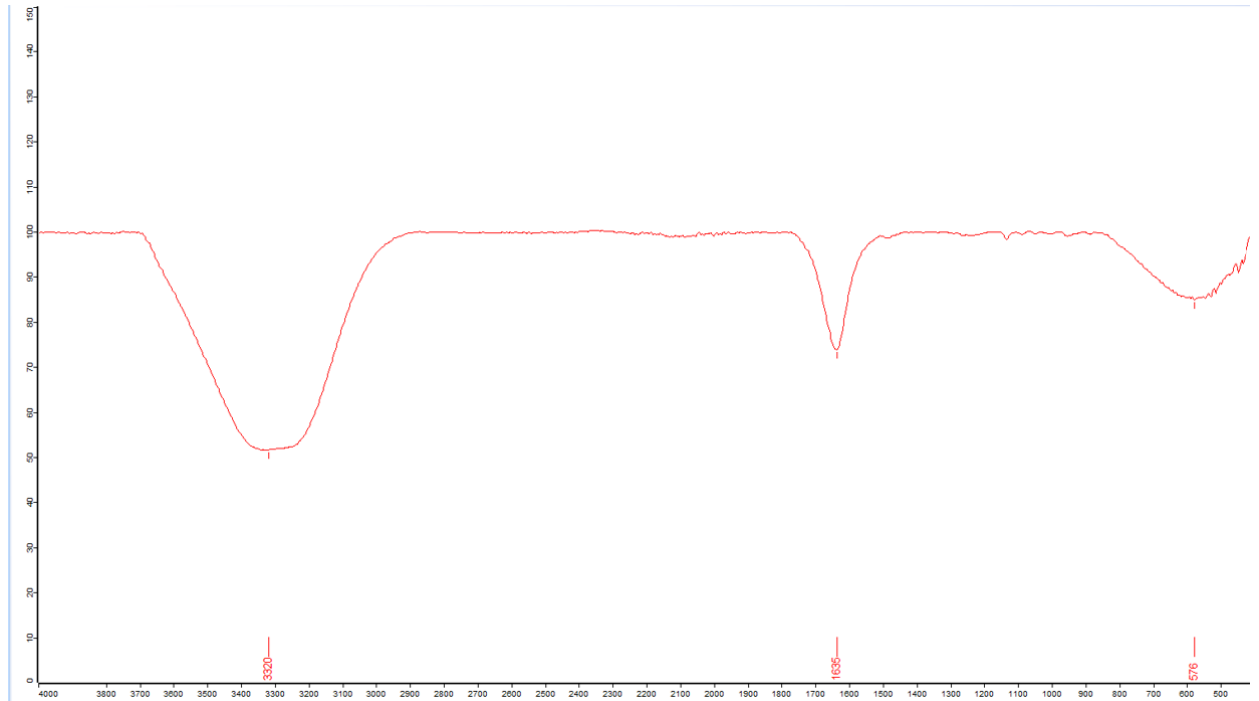
- [93] B. Yang, M. Zhang, H. Weng, Y. Xu, and L. Zeng, "Optimization of Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Ginsenoside Compound from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl by Response Surface Methodology (RSM)," *Molecules*, vol. 25, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/molecules25010193.
- [94] A. Gow-Chin Yen and H.-Y. Chen, "Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their," 1995. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [95] A. Ahmad *et al.*, "Box–Behnken Response Surface Design of Polysaccharide Extraction from *Rhododendron arboreum* and the Evaluation of Its Antioxidant Potential," *Molecules*, vol. 25, no. 17, Sep. 2020, doi: 10.3390/molecules25173835.
- [96] "The Chemical Effects of Ultrasound."
- [97] M. Vinatoru, "An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs." [Online]. Available: [www.elsevier.nl/locate/ultsonch](http://www.elsevier.nl/locate/ultsonch)
- [98] D. Titus, E. James Jebaseelan Samuel, and S. M. Roopan, "Nanoparticle characterization techniques," *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, pp. 303–319, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5.
- [99] P. Mohamed Shameer and P. Mohamed Nishath, "Exploration and enhancement on fuel stability of biodiesel: A step forward in the track of global commercialization," *Advanced Biofuels: Applications, Technologies and Environmental Sustainability*, pp. 181–213, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-08-102791-2.00008-8.
- [100] A. B. D. Nandiyanto, R. Oktiani, and R. Ragadhita, "How to read and interpret ftir spectroscopy of organic material," *Indonesian Journal of Science and Technology*, vol. 4, no. 1, pp. 97–118, 2019, doi: 10.17509/ijost.v4i1.15806.
- [101] D. Huang, O. U. Boxin, and R. L. Prior, "The chemistry behind antioxidant capacity assays," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 6, pp. 1841–1856, Mar. 23, 2005. doi: 10.1021/jf030723c.
- [102] "1-s2.0-S0076687999990055-main".
- [103] T. S. H. Leong, T. J. Wooster, S. E. Kentish, and M. Ashokkumar, "Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification," *Ultrason Sonochem*, vol. 16, no. 6, pp. 721–727, 2009, doi: 10.1016/j.ultsonch.2009.02.008.
- [104] S. Raj, U. Sumod, S. Jose, and M. Sabitha, "Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges," *J Pharm Bioallied Sci*, vol. 4, no. 3, p. 186, 2012, doi: 10.4103/0975-7406.99016.
- [105] P. Mura, "Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 101, pp. 238–250, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2014.02.022.



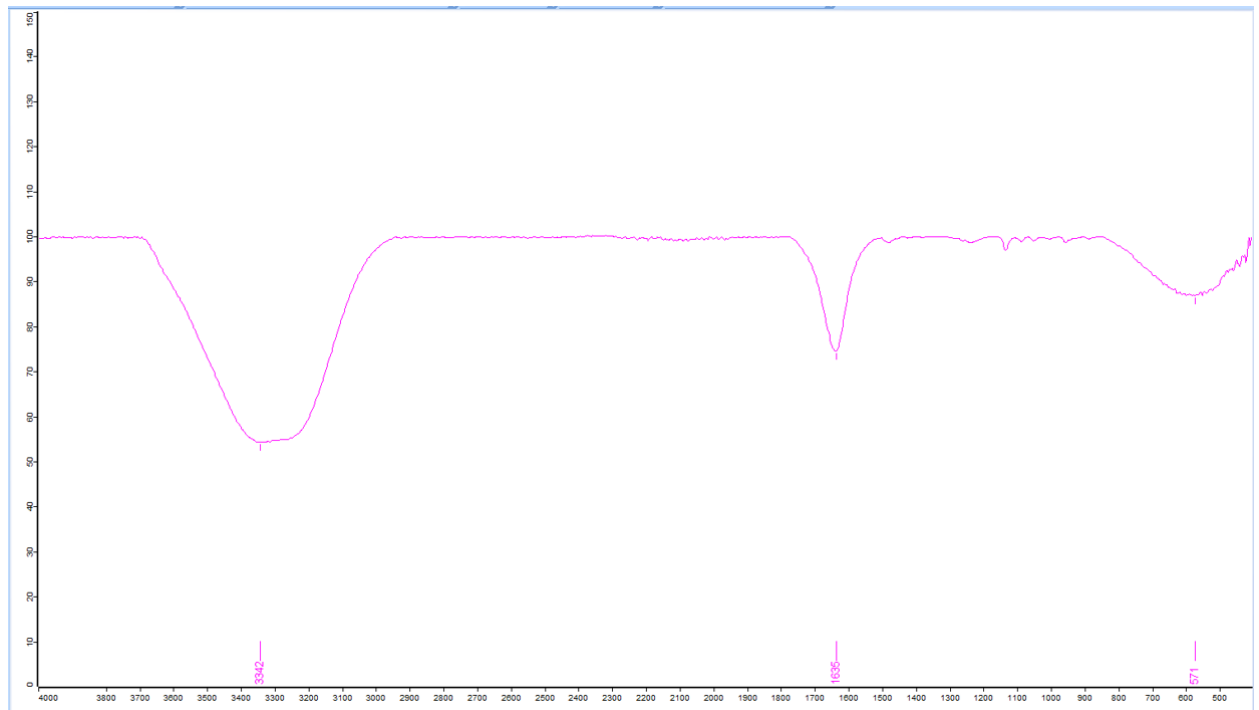
- [106] M. A. Smirnov *et al.*, "Ionic conductivity and structure of chitosan films modified with lactic acid-choline chloride NADES," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.3390/polym12020350.
- [107] A. K. Jangir, H. Mandviwala, P. Patel, S. Sharma, and K. Kuperkar, "Acumen into the effect of alcohols on choline chloride: L-lactic acid-based natural deep eutectic solvent (NADES): A spectral investigation unified with theoretical and thermophysical characterization," *J Mol Liq*, vol. 317, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2020.113923.
- [108] 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," *Mater Adv*, vol. 2, no. 12, pp. 3954–3964, Jun. 2021, doi: 10.1039/d0ma01008a.
- [109] J. K. U. Ling, Y. S. Chan, J. Nandong, S. F. Chin, and B. K. Ho, "Formulation of choline chloride/ascorbic acid natural deep eutectic solvent: Characterization, solubilization capacity and antioxidant property," *LWT*, vol. 133, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.lwt.2020.110096.
- [110] L. Carson *et al.*, "Synthesis and characterization of chitosan-carbon nanotube composites," *Mater Lett*, vol. 63, no. 6–7, pp. 617–620, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.matlet.2008.11.060.
- [111] M. P. Sokolova *et al.*, "Plasticizing of chitosan films with deep eutectic mixture of malonic acid and choline chloride," *Carbohydr Polym*, vol. 197, pp. 548–557, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.037.
- [112] M. A. Smirnov *et al.*, "Self-healing films based on chitosan containing citric acid/choline chloride deep eutectic solvent," *Polym Test*, vol. 97, May 2021, doi: 10.1016/j.polymertesting.2021.107156.
- [113] M. P. Arulmoorthy, G. Anbarasi, M. Srinivasan, and B. Vishnupriya, "Biosynthesis and characterization of chitosan based hydrogel: A potential in vitro wound healing agent," in *Materials Today: Proceedings*, 2019, vol. 48, pp. 263–275. doi: 10.1016/j.matpr.2020.07.186.
- [114] N. Nenadis, A. Mastralexi, and M. Tsimidou, "Physicochemical characteristics and antioxidant potential of the Greek PDO and PGI virgin olive oils (VOOs): Greek PDO/PGI VOO," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 121, p. 1800172, Nov. 2018, doi: 10.1002/ejlt.201800172.
- [115] X. Wang, P. Zhou, X. Lv, and Y. Liang, "Insight into the structure-function relationships of the solubility of chitin/chitosan in natural deep eutectic solvents," *Mater Today Commun*, vol. 27, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.mtcomm.2021.102374.
- [116] M. P. Sokolova *et al.*, "Plasticizing of chitosan films with deep eutectic mixture of malonic acid and choline chloride," *Carbohydr Polym*, vol. 197, pp. 548–557, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.037.

- [117] M. A. Smirnov *et al.*, "Self-healing films based on chitosan containing citric acid/choline chloride deep eutectic solvent," *Polym Test*, vol. 97, May 2021, doi: 10.1016/j.polymertesting.2021.107156.

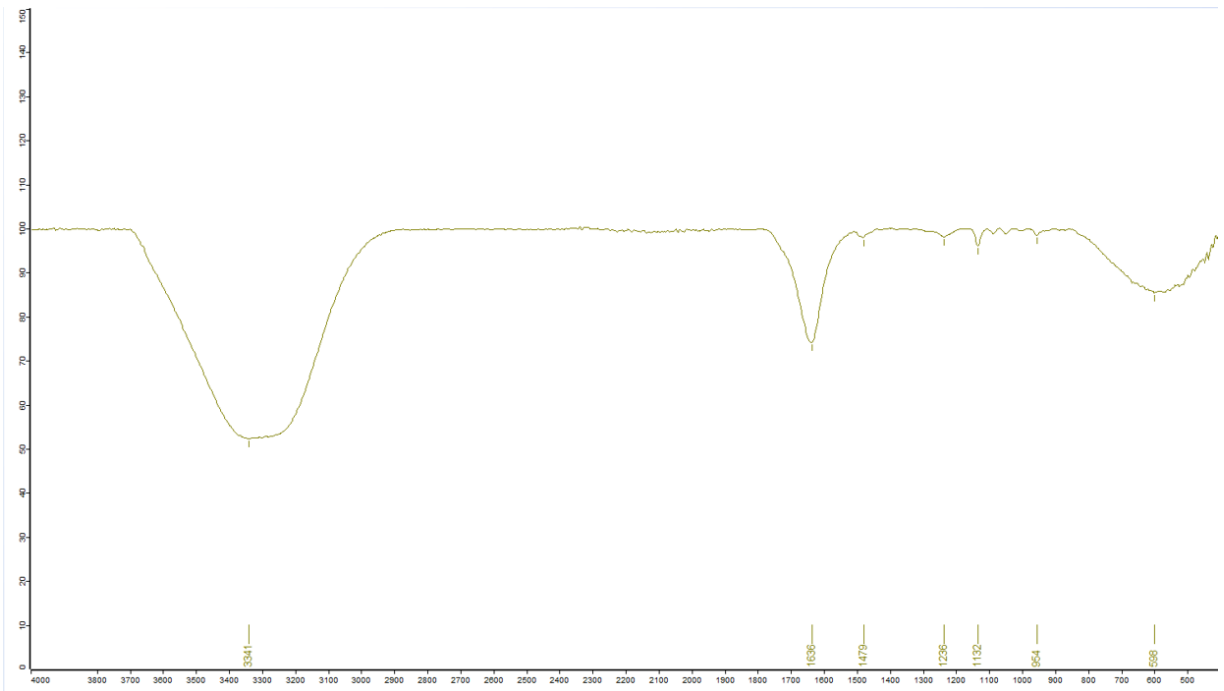
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



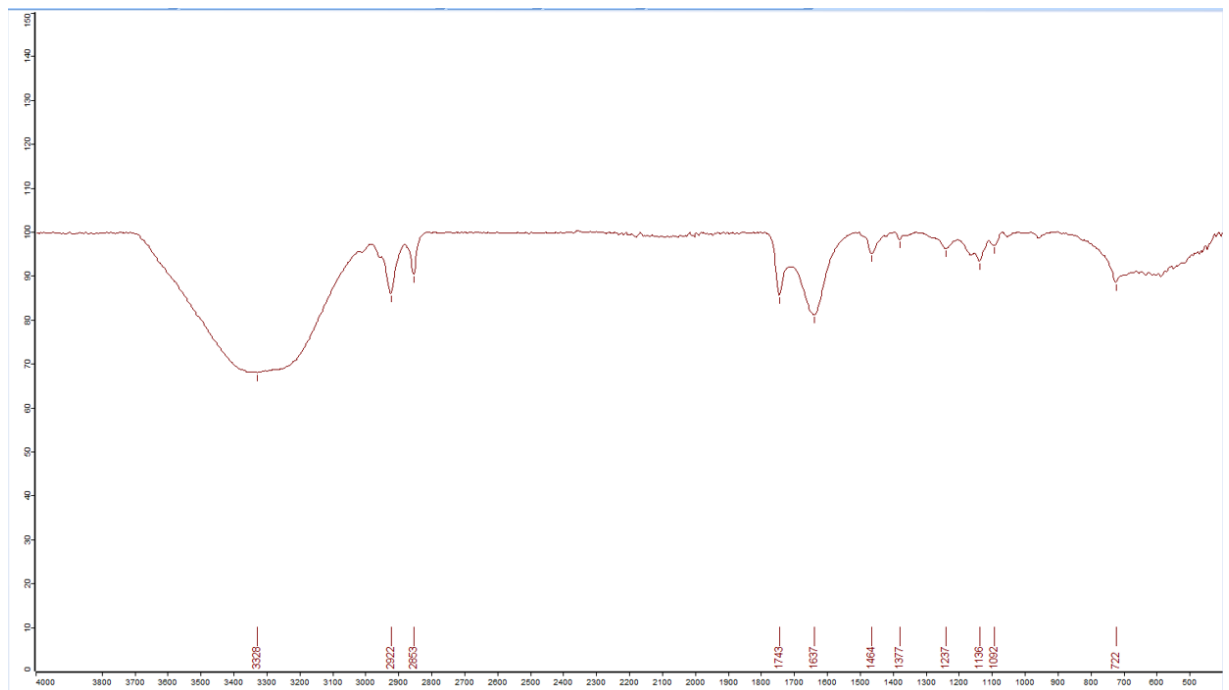
Εικόνα Π-1: Φάσμα FT-IR διαλύματος 4 %v/v φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη  $CHCl_3:LA$



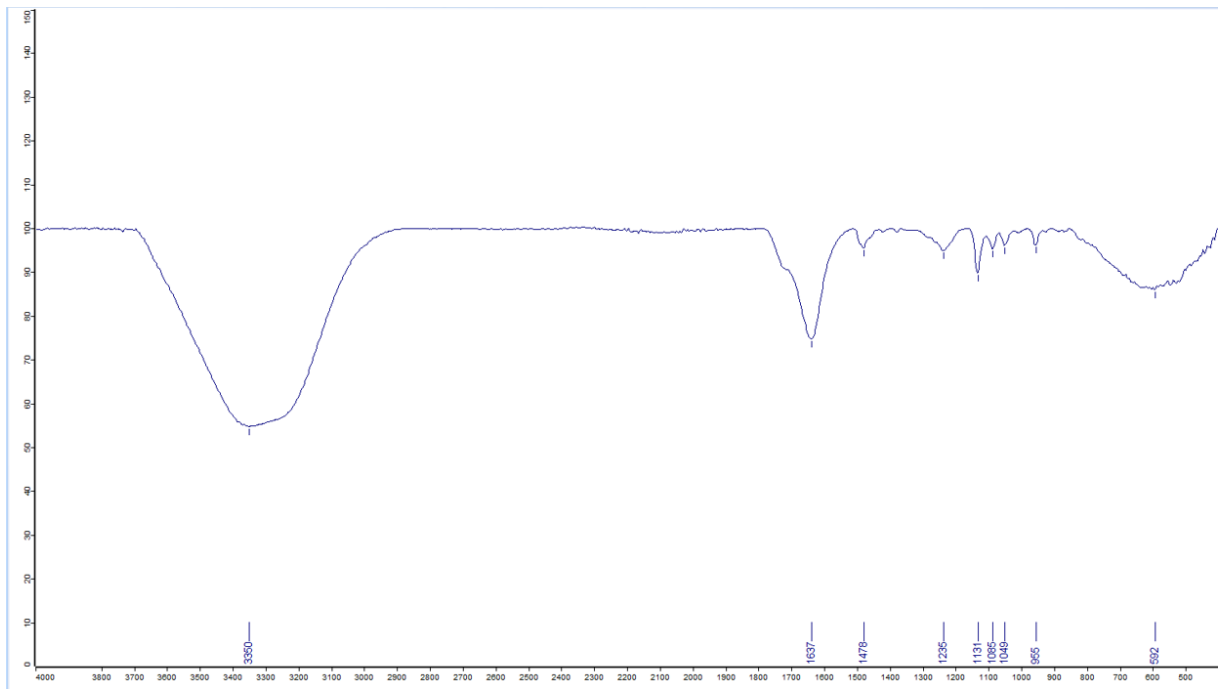
Εικόνα Π-2: Φάσμα FT-IR διαλύματος 7 %v/v φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη  $CHCl_3:LA$



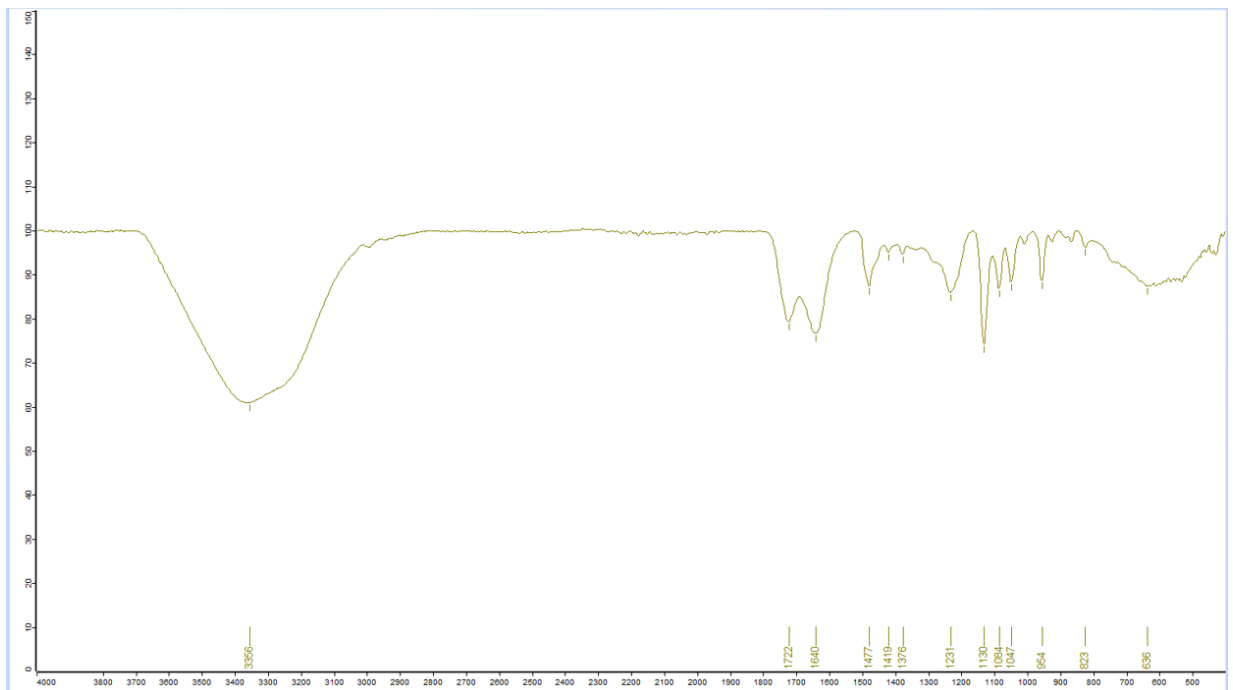
Εικόνα Π-3: Φάσμα FT-IR διαλύματος 9.5 %v/v φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη CHCl<sub>3</sub>:LA



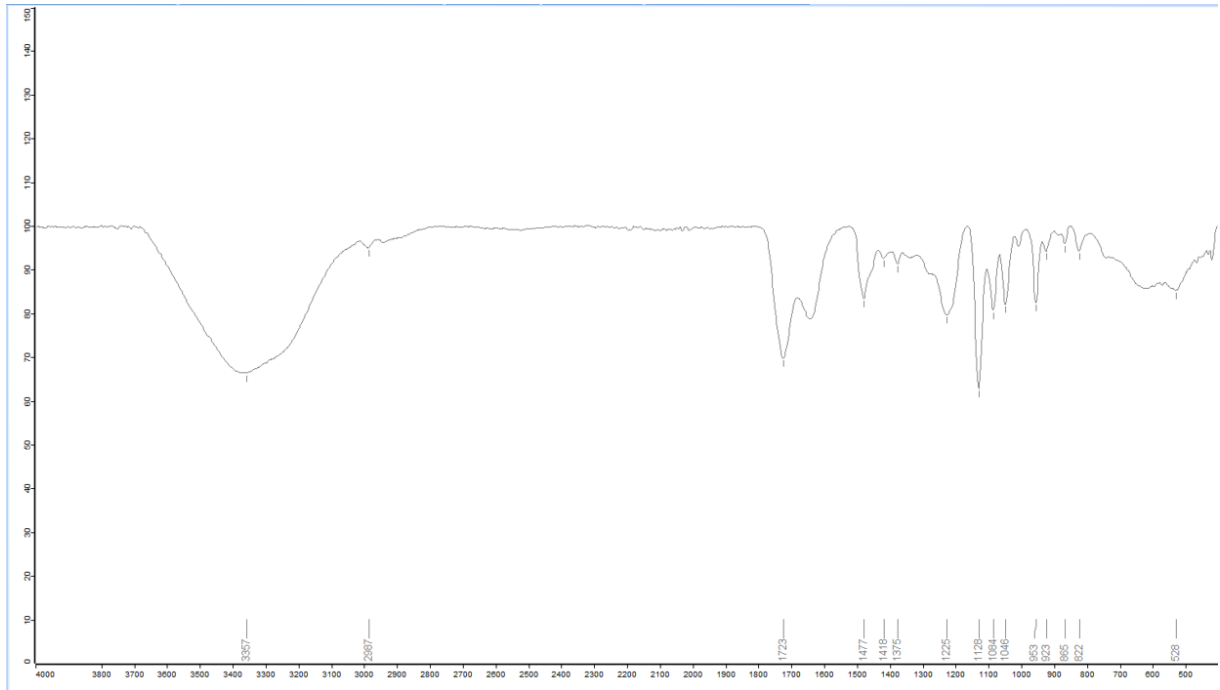
Εικόνα Π-4: Φάσμα FT-IR διαλύματος 12 %v/v φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη CHCl<sub>3</sub>:LA



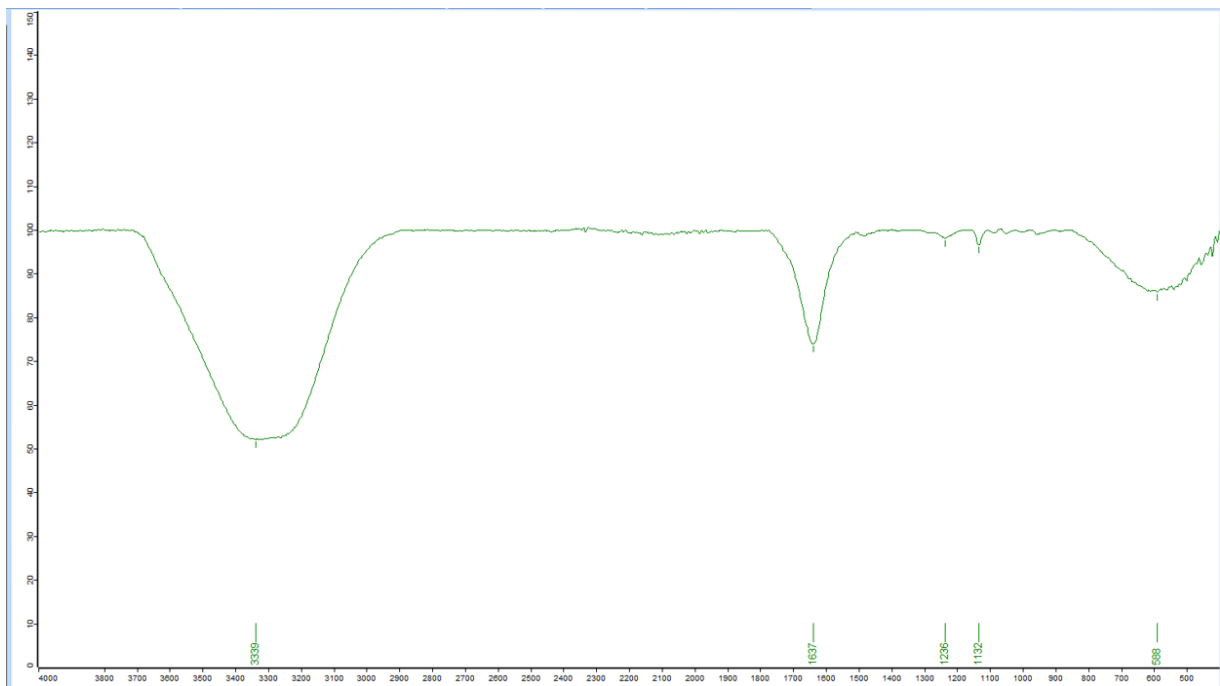
Εικόνα Π-5: Φάσμα FT-IR διαλύματος 20 %v/v φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη  $CHCl_3:LA$



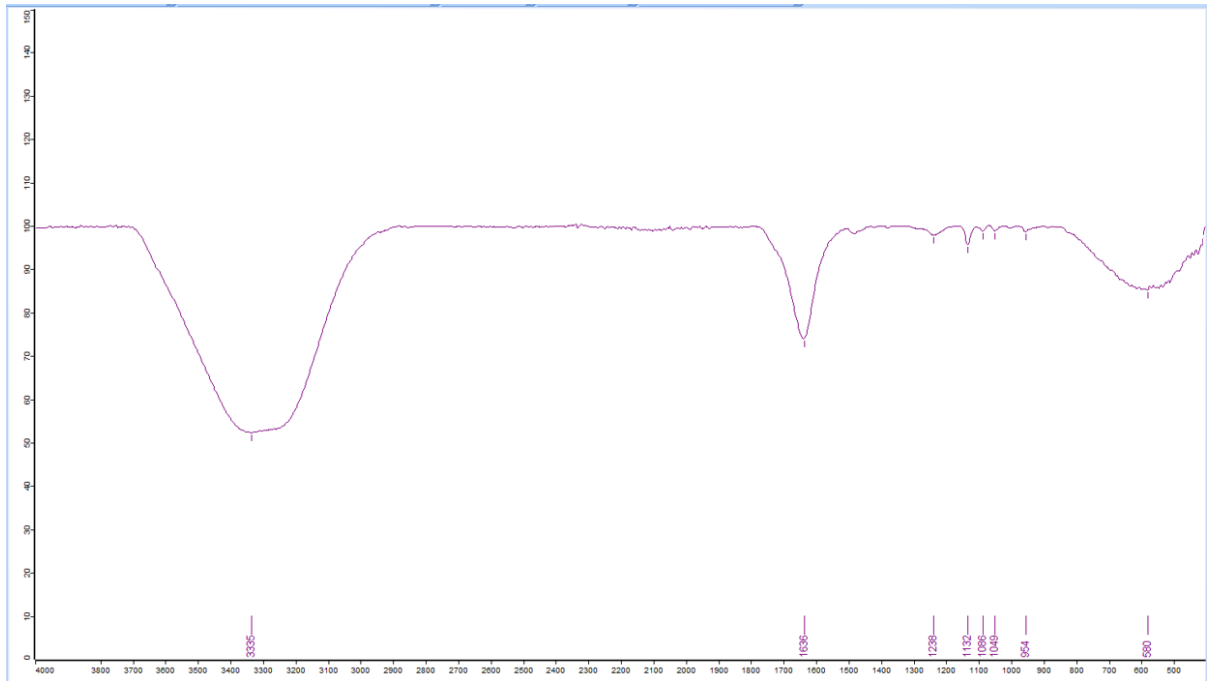
Εικόνα Π-6: Φάσμα FT-IR διαλύματος 50 %v/v φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη  $CHCl_3:LA$



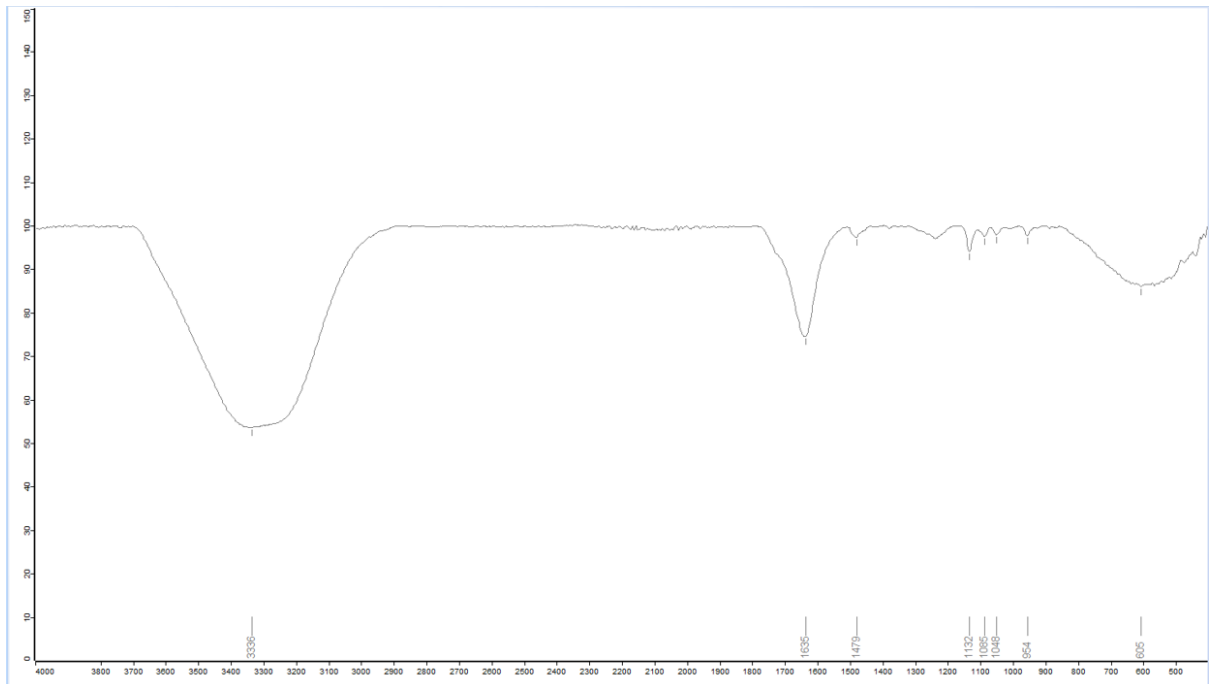
Εικόνα Π-7: Φάσμα FT-IR διαλύματος 70 %v/v φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη  $CHCl_3:LA$



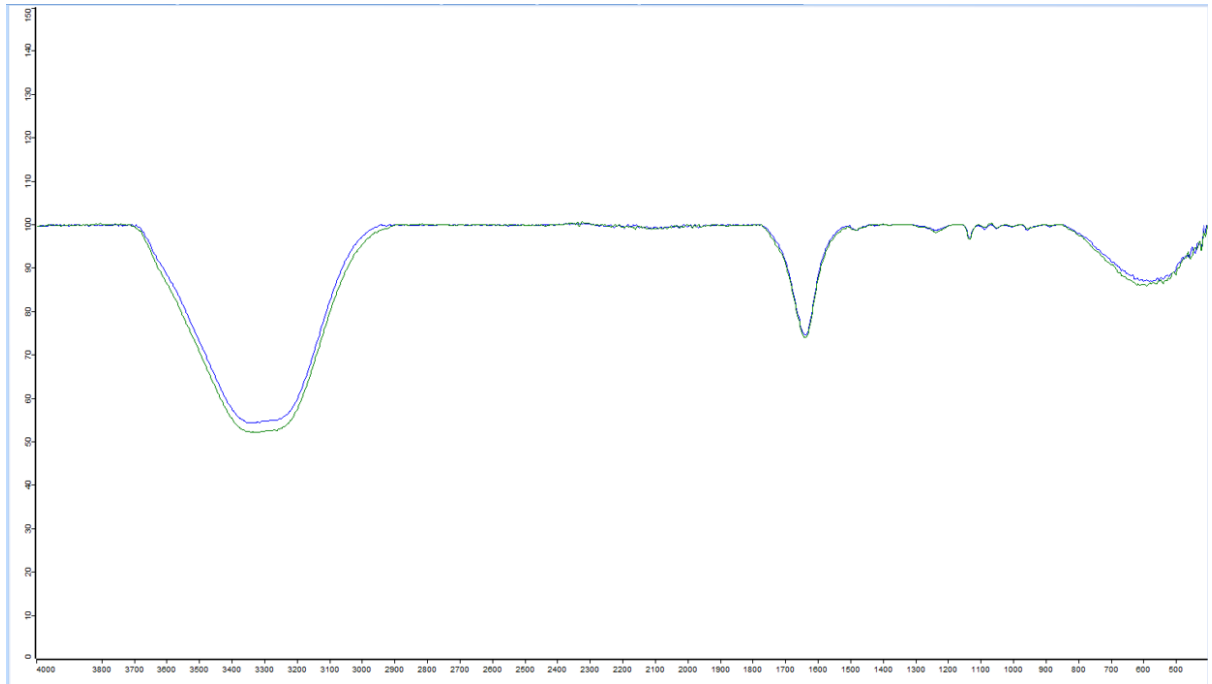
Εικόνα Π-8: Φάσμα FT-IR διαλύματος 7 %v/v φυσικού μίγματος  $CHCl_3:LA$



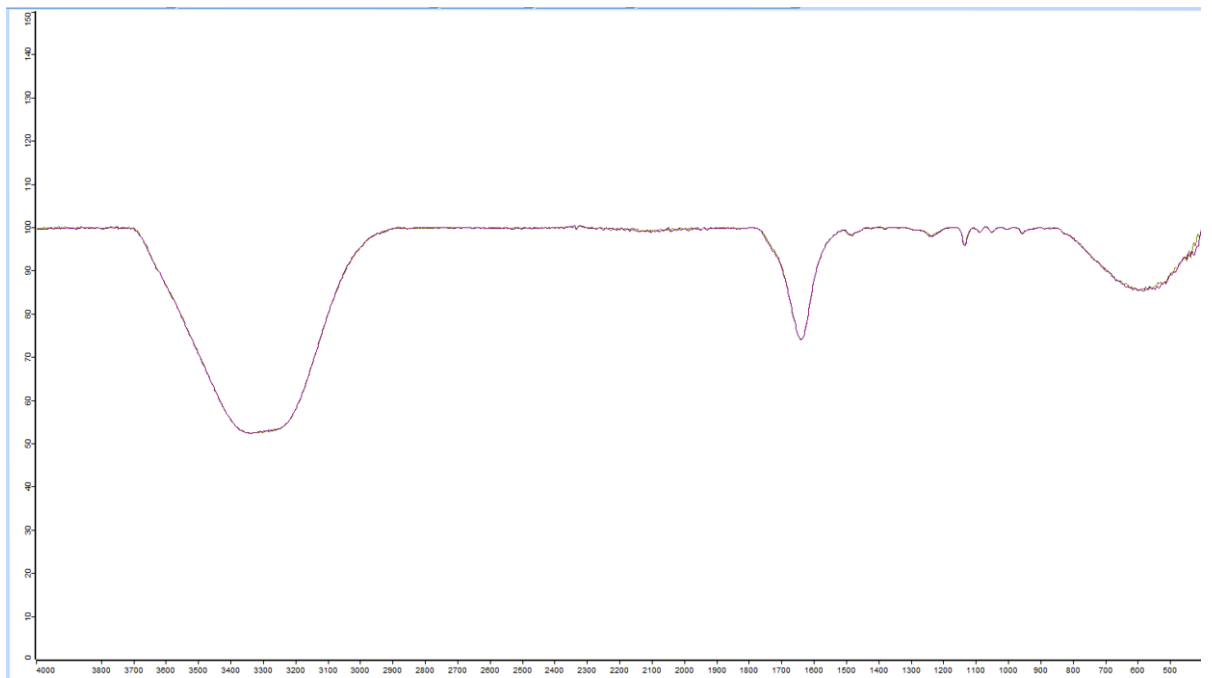
Εικόνα Π-9: Φάσμα FT-IR διαλύματος 9.5 %v/v φυσικού μίγματος  $CHCl_3:LA$



Εικόνα Π-10: Φάσμα FT-IR διαλύματος 12 %v/v φυσικού μίγματος  $CHCl_3:LA$

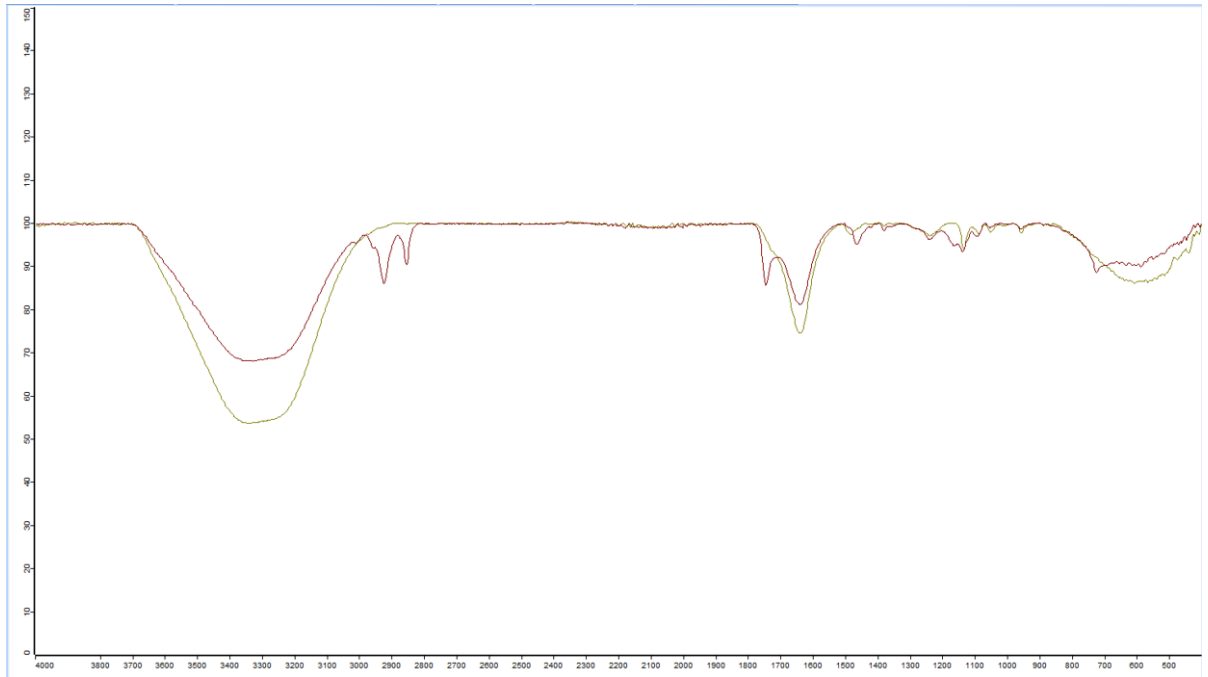


Εικόνα Π-11 Σύγκριση φασμάτων FT-IR διαλυμάτων 7 %/ν φυσικού μίγματος και NaDES ChCl:LA



Εικόνα Π-12: Σύγκριση φασμάτων FT-IR διαλυμάτων 9.5 %/ν φυσικού μίγματος και NaDES ChCl:LA





Εικόνα Π-13: Σύγκριση φασμάτων FT-IR διαλυμάτων 12 %ν/ν φυσικού μίγματος και NaDES ChCl:LA