



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Ανάπτυξη πράσινης διεργασίας για τον εγκλωβισμό του φυσικού φλαβονοειδούς ναρινγίνης σε υδρογέλες αλγινικού

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της
Αγγελικής Γ. Σκλαπάνη

Επιβλέπουσα:
Δέτση Αναστασία
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ
Ιούνιος 2023



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ανάπτυξη πράσινης διεργασίας για τον εγκλωβισμό του φυσικού φλαβονοειδούς ναρινγίνης σε υδρογέλες αλγινικού

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

Αγγελικής Γ. Σκλαπάνη

Επιβλέπουσα: Δέση Αναστασία
Καθηγήτρια Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή στις Ιουνίου 2023.

.....
Δέση Αναστασία
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

.....
Κυρίτσης Απόστολος
Αναπληρωτής Καθηγητής
Ε.Μ.Π.

.....
Παυλάτου Ευαγγελία
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούνιος 2023

.....
Αγγελική Γ. Σκλαπάνη

© (2023) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. *All rights reserved.*

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικό ή ερευνητικής φύσεως, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται η παρούσα σημείωση. Ζητήματα που αφορούν την εκτίμηση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτή τη δήλωση εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να θεωρηθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Η ναρινγίνη ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των φλαβονοειδών και πρόκειται για ένα φυσικό γλυκοζίτη φλαβανόνης που συναντάται φυσικά στα εσπεριδοειδή, και ιδιαίτερα στο γκρέιπφρουτ, προσδίδοντάς τους μάλιστα την πικρή τους γεύση. Χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα χάρη στις αντιοξειδωτικές, αντιφλοεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιπηκτικές ιδιότητές της. Ωστόσο, η χρήση της περιορίζεται λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας και κατ' επέκταση της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητάς της.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη πράσινης διεργασίας σύνθεσης υδρογελών για τον εγκλωβισμό του φυσικού φλαβονοειδούς ναρινγίνης με σκοπό την τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της. Οι τρόποι εφαρμογής αυτών των υδρογελών είναι είτε ως δερματικά επιθέματα πληγών είτε ως σκευάσματα για στοματική κατάποση.

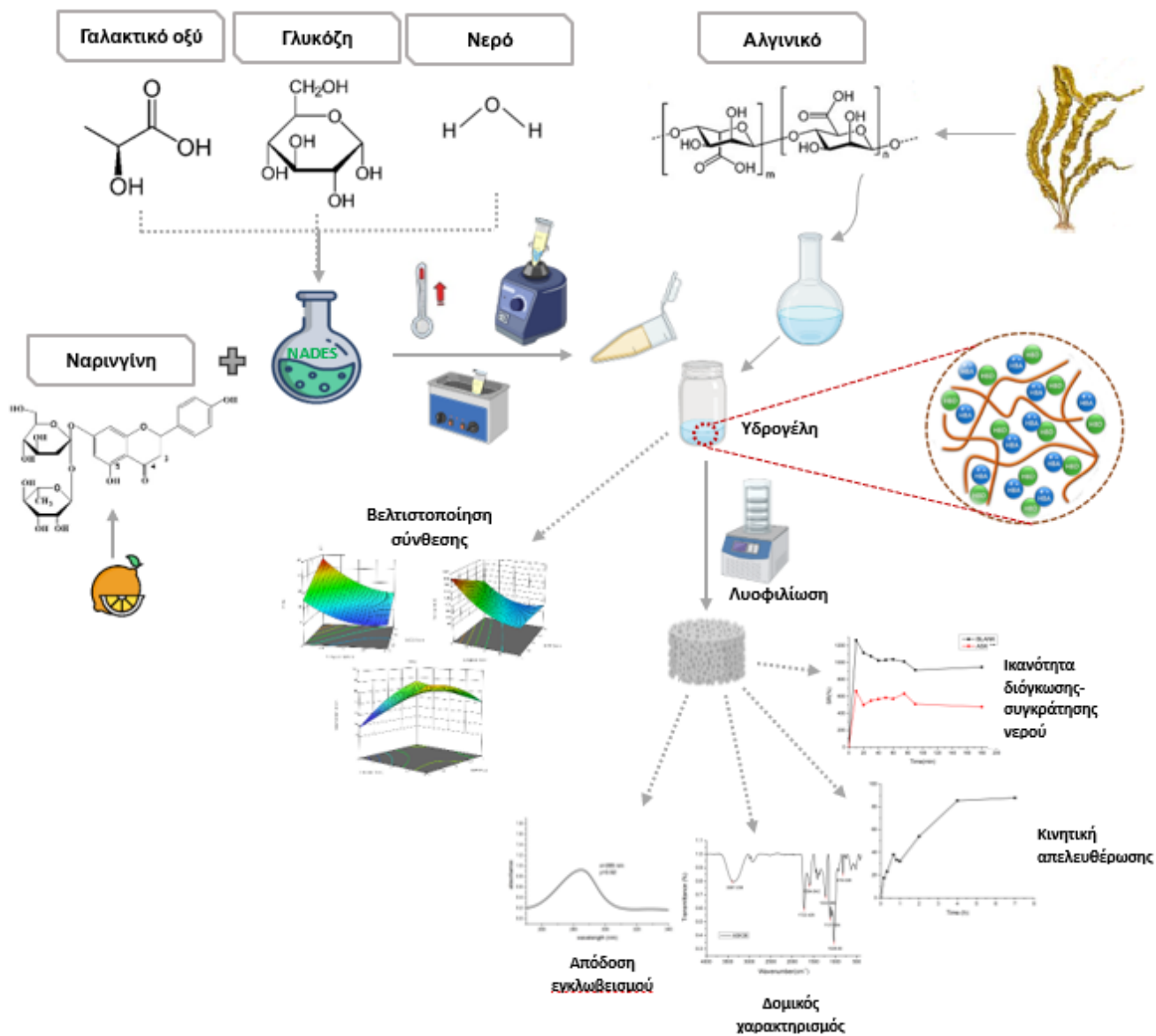
Η πράσινη σύνθεση των υδρογελών πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας αλγινικό -πολυσακχαρίτης που εξάγεται από καφέ φύκια- και φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη (NADES) γαλακτικού οξέος-γλυκόζης-νερού. Στη σύνθεση, κύριος στόχος είναι ο πράσινος διαλύτης να λειτουργήσει ταυτόχρονα και ως μέσο διάλυσης της ναρινγίνης αλλά και ως παράγοντας διασταύρωσης της υδρογέλης.

Η διεργασία σύνθεσης της υδρογέλης βελτιστοποιείται με εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken για τριπλό επίπεδο εξάρτησης. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές επιλέγονται η περιεκτικότητα του αλγινικού (% w/v), η περιεκτικότητα του NADES (% v/v) και το ποσοστό φόρτωσης της ναρινγίνης (%). Ως αποκρίσεις επιλέγονται το ποσοστό διόγκωσης των υδρογελών (SR %), το ποσοστό συγκράτησης νερού (WRR %) και η απόδοση εγκλωβισμού τους (EE %).

Οι βέλτιστες υδρογέλες αξιολογούνται εκ νέου προς τις τρεις αποκρίσεις τους. Το ποσοστό διόγκωσής τους ξεπερνάει το 600%, συγκρατούν 65% του νερού τους σε διάστημα 3 h και πετυχαίνουν περίπου 28% απόδοση εγκλωβισμού. Μελετούνται επίσης ως προς την κινητική αποδέσμευσής τους και επιλέγονται κατάλληλα μοντέλα που δύνανται να προβλέψουν τον μηχανισμό αποδέσμευσης. Ακολουθεί σύγκριση των υδρογελών με τη βέλτιστη σύσταση απουσία βιοδραστικής ουσίας με αντίστοιχες υδρογέλες αλγινικού και ασβεστίου. Τέλος, χαρακτηρίζονται δομικά με τη βοήθεια φασματοσκοπίας FTIR.

Επιστημονικό Πεδίο: Πράσινη Χημεία, Φαρμακευτική Χημεία, Εγκλωβισμός βιοδραστικών μορίων

Λέξεις-Κλειδιά: Υδρογέλες, Αλγινικό, Φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης, Ναρινγίνη, Ικανότητα διόγκωσης και συγκράτησης νερού, Απόδοση εγκλωβισμού, Κινητική απελευθέρωσης



Σχήμα 1: Γραφική περίληψη

Abstract

Naringin belongs to the wider family of flavonoids and is a natural flavonoid glycoside which is abundantly contained in the skin of citrus fruits, especially grapefruits, and is the origin of their bitterness. It is used since ancient times due to its antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-carcinogenic properties. However, its use is restrained because of its low solubility and therefore its low biodegradability.

The purpose of this study is the development of a green process for hydrogel synthesis which encapsulate the natural flavonoid of naringin and modify its physicochemical. The fields where these hydrogels can find application is whether as wound dressings or as pharmaceuticals aimed for oral administration.

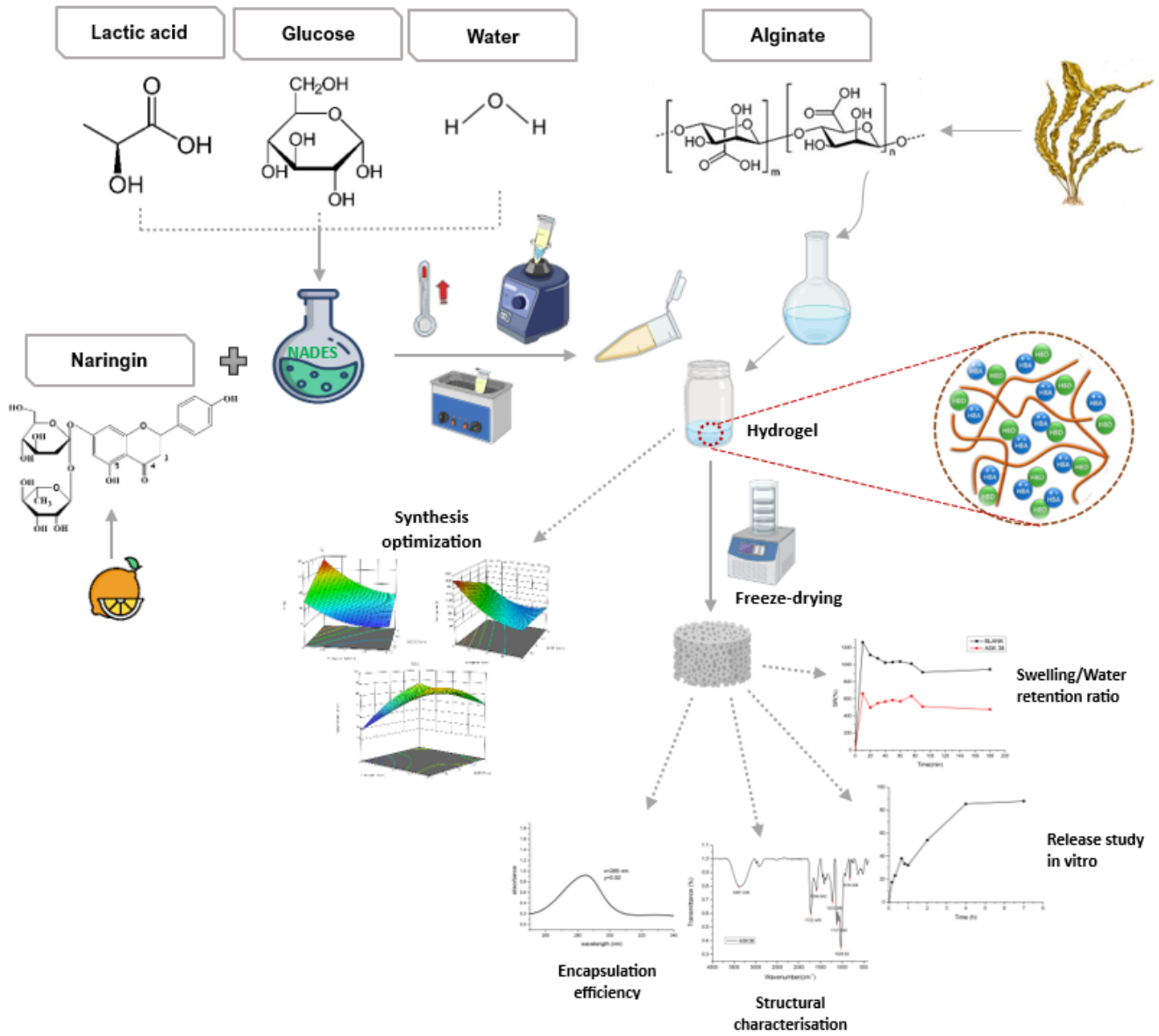
The green hydrogel synthesis is carried out with the use of alginate, a polysaccharide which is extracted from brown algae, and a Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) of lactic acid-glucose-water. One of the main targets during the synthesis process is the green solvent to act simultaneously as a means of dilution for naringin, but also as cross-linker for the hydrogel itself.

The synthesis process is optimised with the application of a three-level Box-Behnken experimental design. As independent variables, the alginate concentration (% w/v), the NADES concentration (% v/v) and the percentage of naringin loading (%) are selected. As responses, the swelling ratio (SR %), the water-retention ratio (WRR %) and the encapsulation efficiency (EE %) are evaluated.

The hydrogels with the optimised composition are re-evaluated regarding the above responses. Their swelling ratio exceeds 600%, they restrain 65% of their water capacity over a period of 3 h and they reach about 28% encapsulation efficiency. They are also studied in terms of kinetics release and models capable of predicting the release mechanism. A comparison between hydrogels with the optimised composition and the absence of naringin with hydrogels made of alginate and calcium, follows. Lastly, they are characterised structurally with the use of FTIR spectroscopy.

Scientific Field: Green chemistry, Pharmaceutical chemistry, Encapsulation of bioactive molecules

Key-words: Hydrogels, Alginate, Natural Deep Eutectic Solvent, Naringin, Swelling/Water retention ratio, Encapsulation Efficiency, Kinetics Release



Σχήμα 2: Graphical abstract

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας, Δρ. Αναστασίας Δέτση, Καθηγήτρια ΣΧΜ κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023. Με την ολοκλήρωσή της ολοκληρώνεται ο κύκλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών στην επιστήμη και τεχνολογία των υλικών. Η περάτωσή της θα ήταν αδύνατη χωρίς την εμπιστοσύνη της επιβλέπουσας καθηγήτριάς μου, Α. Δέτση την οποία ευχαριστώ θερμά.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην ερευνητική μου επιβλέπουσα, Πιττερού Ιωάννα, διδακτορική φοιτήτρια ΣΧΜ, για τη διεξοδική καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της επί της οργάνωσης και του περιεχομένου των πειραμάτων. Κυρίως όμως την ευχαριστώ για την ανεξάντλητη ενέργεια και προθυμία της για συζήτηση και διευκρινίσεις.

Τρίτον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και παράλληλα να επαινέσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου της οργανικής χημείας για το φιλικό και ζεστό περιβάλλον που έχουν καταφέρει να αναπτύξει στηρίζοντας και βοηθώντας ο ένας τον άλλον.

Τέλος, θα ήθελα να απευθύνω ευχαριστίες στην οικογένειά μου και στους φίλους μου για την ενθάρρυνση και την πίστη τους σε μένα. Ξεχωριστά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύντροφό μου για την αμείωτη στήριξη και την ώθηση να αποδίδω καλύτερα.

Αθήνα, Ιούνιος 2023

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	x
Κατάλογος Σχημάτων	xiii
Κατάλογος Πινάκων	xv
I Θεωρητικό μέρος	1
1 Πράσινη Χημεία	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Τι είναι πράσινη χημεία	1
2 Διαλύτες	3
2.1 Κατηγορίες Διαλυτών	3
2.2 Χρήση συμβατικών διαλυτών και κίνδυνοι	3
2.3 Πράσινοι διαλύτες	4
2.3.1 Ιοντικά υγρά	4
2.3.1.1 Περιορισμοί στη χρήση των ιοντικών υγρών	5
2.3.2 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES)	5
2.3.2.1 Ταξινόμηση βαθέων ευτηκτικών διαλυτών	5
2.3.2.2 Φυσικοί ευτηκτικοί διαλύτες σε ζωντανούς οργανισμούς NADESs	6
2.3.2.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες DESκαι NADES	6
3 Πολυσακχαρίτες	8
3.1 Κατηγοριοποίηση πολυσακχαριτών	8
3.2 Πολυσακχαρίτες σε ζωντανούς οργανισμούς	9
3.3 Αλγινικό	9
3.3.1 Ιδιότητες	10
3.3.2 Εφαρμογές	10
4 Υδρογέλες	12
4.1 Εισαγωγή	12
4.2 Τι είναι οι υδρογέλες και ποιες οι ιδιότητές τους	12
4.3 Κατηγορίες υδρογελών	12
4.4 Εφαρμογές υδρογελών	13
4.4.1 Μεταφορά φαρμάκων	13
4.4.2 Επιθέματα πληγών	14
4.4.2.1 Δομή του δέρματος	14
4.4.2.2 Ταξινόμηση πληγών	14
4.4.2.3 Διαδικασία επούλωσης πληγών	15
4.4.2.4 Χαρακτηριστικά ιδανικών επιθεμάτων	15
4.4.2.5 Είδη επιθεμάτων	15

4.4.3	Επιθέματα από αλγινικό	16
5	Ναρινγίνη	18
5.1	Εισαγωγή	18
5.2	Εξαγωγή ναρινγίνης	18
5.3	Ιδιότητες ναρινγίνης	18
5.4	Περιορισμοί στη χρήση της ναρινγίνης	19
5.5	Εγκλωβισμός ναρινγίνης σε νανοφορείς	19
6	Κινητική απελευθέρωσης	21
7	Πειραματικός σχεδιασμός-Design of experiments(DoE)	23
7.1	Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken	24
II	Πειραματικό μέρος	25
8	Σκοπός	27
9	Όργανα και συσκευές	28
9.1	Λυοφιλίωση - freeze drying	28
9.2	Επωαστήρας - incubator	29
9.3	Φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού - UV-VIS	30
9.4	Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier- FTIR	30
9.5	Αντιδραστήρια	31
10	Πειραματικός σχεδιασμός της παρούσας μελέτης	32
10.1	Προκαταρκτικά πειράματα	32
11	Μέθοδοι	34
11.1	Παρασκευή διαλύματος αλγινικού	34
11.2	Παρασκευή NADES	34
11.2.1	Γλυκόζη	35
11.2.2	Γαλακτικό οξύ	35
12	Χρήση πράσινου διαλύτη για την ανάπτυξη υδρογελών αλγινικού και τον εγκλωβισμό ναρινγίνης	37
12.1	Πράσινη σύνθεση υδρογελών αλγινικού για εγκλωβισμό ναρινγίνης	37
12.2	Χαρακτηρισμός υδρογελών	38
12.2.1	Προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης-Swelling Ratio	38
12.2.2	Προσδιορισμός ικανότητας συγκράτησης νερού -Water Retention Ratio	38
12.2.3	Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού-encapsulation efficiency	39
12.2.4	Μελέτη κινητικής απελευθέρωσης ναρινγίνης-Kinetics Release	39
12.2.5	Μελέτη δομικού χαρακτηρισμού υδρογελών FTIR	40
13	Βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής των υδρογελών	41
13.1	Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων	42
13.1.1	Ποσοστό διόγκωσης	42
13.1.2	Ικανότητα συγκράτησης νερού	44
13.1.3	Ποσοστό φόρτωσης ναρινγίνης	45

Περιεχόμενα	xii
III Αποτελέσματα - Συζήτηση	49
14 Αξιολόγηση των αποκρίσεων της υδρογέλης με τη βέλτιστη σύσταση	51
14.1 Αποτελέσματα της μελέτης διόγκωσης και συγκράτησης νερού	51
14.1.1 Σύγκριση υδρογέλης αλγινικού με NADES και με ασβέστιο	52
14.2 Αποτελέσματα μελέτης απόδοσης εγκλωβισμού	54
14.3 Αποτελέσματα μελέτης κινητικής αποδέσμευσης ναρινγίνης	54
14.3.1 Επιλογή βέλτιστου κινητικού μοντέλου	55
14.4 Αποτελέσματα της μελέτης δομικού χαρακτηρισμού	56
15 Συμπεράσματα	60
16 Προτάσεις για το μέλλον	61
17 Συμμετοχή σε διεθνή συνέδρια	62
Βιβλιογραφία	63

Κατάλογος Σχημάτων

1	Γραφική περίληψη	vi
2	Graphical abstract	viii
1.1	Οι 12 αρχές της πράσινης χημείας.	2
2.1	Παραδείγματα χημικών δομών αποδεκτών δεσμών υδρογόνου (HBAs) και δοτών δεσμών υδρογόνου (HBDs) που μπορούν να συνθέσουν DES	6
2.2	Σχηματική Αναπαράσταση ευτηκτικού σημείου σε ένα διάγραμμα φάσης δύο συστατικών.	7
3.1	Γλυκοσιδικός δεσμός	8
3.2	Γραμμικοί και διακλαδισμένοι ομοπολυσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες	9
3.3	Χημική διαμόρφωση μονομερών στο αλγινικό	10
4.1	Δομή υδρογέλης σε μοριακό επίπεδο	13
4.2	Κατηγοριοποίηση υδρογελών	14
4.3	Σχηματική αναπαράσταση υδρογελών ως επιθέματα τραύματος	16
5.1	Χημική δομή ναρινγίνης	18
5.2	Ναρινγίνη	18
6.1	Αποδέσμευση φαρμάκου σε υδρογέλες	22
7.1	Αναπαραγωγή σημείων σε μοντέλο κεντρικά σχεδιασμένα	24
7.2	Παράδειγμα μοντέλου Box-Behnken σε τρεις διαστάσεις	24
9.1	Τριπλό σημείο νερού	29
9.4	Σχηματική αναπαράσταση του νόμου Lambert Beer	30
9.5	Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης FTIR	31
10.1	Ναρινγίνη διαλυμένη σε NADES	33
11.1	Ογκομετρική φιάλη με αλγινικό και ογκομετρικός κύλινδρος με υπερκάθαρο νερό	34
11.2	Ογκομετρική φιάλη με γλυκόζη και γαλακτικό οξύ τοποθετημένη σε μαγνητικό αναδευτήρα υπό θέρμανση.	35
11.3	Χημική δομή γλυκόζης	35
11.4	Χημική δομή γαλακτικού οξέος	36
12.2	Σχηματισμός υδρογελών αλγινικού, NADES και ναρινγίνης	38
12.3	Διογκωμένη υδρογέλη που έχει αφαιρεθεί από διάλυμα HCl προς μέτρησης της μάζας της	38
13.1	Επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο ποσοστό διόγκωσης των υδρογελών (%)	43
13.3	Επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο ποσοστό συγκράτησης νερού των υδρογελών (%)	45
13.5	Επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στην απόδοση εγκλωβισμού των υδρογελών (%)	47
14.1	Ποσοστό διόγκωσης της υδρογέλης αλγινικού και NADES(μαύρο) απουσία βιουσίας,(κόκκινο) με εγκλωβισμένη ναρινγίνη σε συνάρτηση με το χρόνο.	51

14.2 Ποσοστό συγκράτησης νερού της υδρογέλης αλγινικού και NADES(μαύρο) απουσία βιου- σίας,(κόκκινο) με εγκλωβισμένη ναρινγίνη σε συνάρτηση με το χρόνο.	52
14.3 Ποσοστό διόγκωσης της υδρογέλης αλγινικού και NADES(μαύρο), αλγινικού και ασβεστίου (κόκκινο) σε συνάρτηση με το χρόνο.	53
14.4 Ποσοστό συγκράτησης νερού της υδρογέλης αλγινικού και NADES(μαύρο), αλγινικού και ασβεστίου (κόκκινο) σε συνάρτηση με το χρόνο.	53
14.5 Διάγραμμα απορρόφησης ναρινγίνης από δείγμα βέλτιστης υδρογέλης που έχει αφεθεί προς διάλυση για 3 μέρες.	54
14.6 Προφίλ αποδέσμευσης ναρινγίνης μέσα από υδρογέλη αλγινικού και NADES	55
14.7 Βέλτιστα στατιστικά μοντέλα	56
14.8 Φάσμα FTIRαλγινικού	56
14.9 Φάσμα FTIRναρινγίνης	57
14.10Φάσμα FTIR για υδρογέλες βέλτιστης σύστασης αλγινικού, NADESκαι ναρινγίνης	57
14.11Φάσμα FTIR για υδρογέλες βέλτιστης σύστασης αλγινικού και NADES	58
14.12Φάσμα FTIR υδρογέλης αλγινικού και NADES(μπλε), ναρινγίνης (μωβ) και υδρογέλης αλγι- νικού, NADESκαι ναρινγίνης (μαύρο)	59

Κατάλογος Πινάκων

2.1	Σχέση της διηλεκτρικής σταθεράς και της διπολικής ροπής των μορίων των διαλυτών με τον πολικό ή μη πολικό χαρακτήρα τους.	4
6.1	Μηχανισμοί απελευθέρωσης ανάλογα τη γεωμετρία και το συντελεστή διάχυσης	22
9.1	Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν	28
9.2	Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν	31
10.1	Παράγοντες και αποκρίσεις που επιλέχθηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό	32
10.2	Όρια των ανεξάρτητων μεταβλητών	33
10.3	Πειράματα που όρισε ο πειραματικός σχεδιασμός	33
13.1	Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων	41
13.2	Βέλτιστη σύσταση υδρογέλης	41
13.3	Αντιστοίχιση ανεξάρτητων μεταβλητών πειραματικού σχεδιασμού σε σύμβολα στατιστικών μοντέλων	42
14.1	Συντελεστές R^2 στατιστικών μοντέλων που εφαρμόστηκαν στις δύο μελέτες	55
14.2	Βασικοί κυματαριθμοί cm^{-1} κορυφών των μορίων αλγινικού, ναρινγίνης και των συστατικών του NADES και οι αντίστοιχες αναθέσεις τους.	58

Μέρος Ι
Θεωρητικό μέρος

Πράσινη Χημεία

1.1 Εισαγωγή

Η επιστήμη της χημείας έχει αδιαμφισβήτητα βελτιώσει την ποιότητα ζωής μας. Τρόφιμα, καλλιέργειες, ενέργεια, καλλυντικά, φάρμακα είναι λίγοι μόνο από τους τομείς στους οποίους έχει διαδραματίσει καίριο ρόλο. Ωστόσο, ο όρος "χημεία" χρωματίζεται πολλές φορές αρνητικά διότι ταυτίζεται στην κοινή αντίληψη με έννοιες όπως "χημική μόλυνση", "χημικά απόβλητα" ή ακόμα και με το σύμβολο της τοξικότητας που βρίσκεται σε ορισμένα δοχεία χημικών ουσιών [1].

Είναι γεγονός πως κατά την ανθρώπινη εξέλιξη, στην προσπάθεια επίλυσης προβλημάτων ή βελτίωσης του τρόπου ζωής ανακαλύφθηκαν ορισμένα εργαλεία-λύσεις των οποίων η χρήση έχει αρνητικές συνέπειες στο περιβάλλον ή την ανθρώπινη υγεία. Πολλές φορές τα υλικά ή οι διεργασίες που χρησιμοποιούνται στη χημεία, αποδεσμεύουν στο περιβάλλον ρύπους που είναι δυσδιάλυτοι με αποτέλεσμα τη σταδιακή μόλυνση του αέρα, των υδάτων, της γης και τελικά του ανθρώπου [2], [3],[4].

Το 1978, ο Trevor Kletz εμπνευσμένος από την καταστροφή στο Flixborough¹ θίγει για πρώτη φορά το θέμα του πιο ασφαλούς σχεδιασμού στις χημικές διεργασίες ώστε να μειώνονται ή ακόμα και να εξαλείφονται οι πιθανοί κίνδυνοι [5]. Ο όρος "πράσινη χημεία" επίσημα επινοήθηκε από τους Paul Anasta και John Warner το 1991 οι οποίοι συγκεκριμενοποίησαν τους στόχους αυτής της ιδεολογίας [6].

1.2 Τι είναι πράσινη χημεία

Πρόκειται για μια ολιστική προσέγγιση η οποία έχει ως κύριο στόχο τη λιγότερο δυνατή επιβλαβή επίδραση της χημείας στο περιβάλλον. Ο στόχος αυτός προφανώς είναι πολυδιάστατος καθώς υπάρχει παραπάνω από ένας τρόπος με τον οποίο η χημεία επιδρά στο περιβάλλον. Πρώτη βασική επιδίωξη είναι η χρήση λιγότερων φυσικών πόρων ώστε με σύνεση να προνοείται η διατήρησή τους για τις επόμενες γενιές. Στα πλαίσια αυτής της επιδίωξης, εκτός από τους φυσικούς πόρους σαν πρώτη ύλη, συμπεριλαμβάνεται ακόμα και η μείωση κατανάλωσης ενέργειας που απαιτείται για τις διάφορες διεργασίες. Δεύτερον, στοχεύει στο να περιορίσει όχι μόνο τη χρήση αλλά και τη δημιουργία επικίνδυνων ουσιών. Προτείνει μάλιστα όπου είναι εφικτό εναλλακτικούς ασφαλέστερους τρόπους υλοποίησης διεργασιών. Τρίτον, ασχολείται με την κατάληξη των αποβλήτων της περιορίζοντας και ανακυκλώνοντάς τα όπου αυτό είναι εφικτό. Δίνει σημασία στην τοξικότητα των προϊόντων και των παραπροϊόντων της και στον τρόπο πρόληψης μιας επικείμενης μόλυνσης. Εστιάζει, δηλαδή, στο να αντιμετωπίσει μελλοντικά προβλήματα πριν αυτά εμφανιστούν. Ανακεφαλαιωτικά, η πράσινη χημεία αναπτύχθηκε ως ιδεολογία για να διασφαλίσει ότι η επιστήμη της χημείας ασκείται με τον καλύτερο ευνοϊκό τρόπο ως προς το περιβάλλον, την κοινωνία και την οικονομία. Έχουν καθιερωθεί 12 αρχές οι οποίες συγκεντρώνουν συνοπτικά τις επιδιώξεις της και συνοψίζονται στην εικόνα 1.1 [1], [3], [4].

Μία εύλογη ερώτηση θα ήταν γιατί η παραπάνω προσέγγιση δεν εφαρμόστηκε από την αρχή της επιστήμης μιας και η επιστήμη υπηρετεί το καλό του ανθρώπου. Η κύρια αιτία είναι ότι στις μέρες μας υπάρχει

¹έκρηξη χημικού εργοστασίου στο Flixborough στις 1 Ιουνίου 1964 με 28 νεκρούς και 36 τραυματίες

η κατάλληλη γνώση για να σχεδιάζονται και να παρασκευάζονται ασφαλείς ενώσεις καθώς και να καθίσταται οι διεργασίες παρασκευής ακίνδυνες. Επιπλέον, διατίθονται περισσότερες πληροφορίες και στοιχεία τόσο για την τοξικότητα όσο και για τις συνέπειες των χημικών ουσιών, στοιχεία που δεν ήταν γνωστά με την έναρξη της ανάπτυξης της χημείας. Σημαντική υπήρξε επίσης η αύξηση ταχύτητας στην ανταλλαγή πληροφοριών από όλο τον κόσμο [2][7].



Σχήμα 1.1: Οι 12 αρχές της πράσινης χημείας.

Διαλύτες

Ένα από τα κύρια αντικείμενα της χημείας είναι η δημιουργία νέων ουσιών. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω των χημικών αντιδράσεων, δηλαδή ενώνει δύο ή περισσότερες ουσίες -συστατικά- μέσω χημικών αλλαγών [8]. Για την υλοποίηση αυτών των αλλαγών, καίριο ρόλο παίζουν οι διαλύτες.

Πρόκειται για υγρά, στερεά ή αέρια που μπορούν να αραιώσουν, να διαλύσουν ή να διασκορπίσουν ένα συστατικό μέσα σε ένα διάλυμα. Στην πραγματικότητα, ο διαλύτης αλληλεπιδρά με την προς διάλυση ουσία και συγκεκριμένα με τους δεσμούς συγκρότησης της με το διάλυμα είτε αυτοί είναι ιονικοί, ομοιοπολικοί, πολικοί ή δεσμοί υδρογόνου [9] [10].

2.1 Κατηγορίες Διαλυτών

Οι διαλύτες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με δύο διαφορετικά κριτήρια. Το πρώτο κριτήριο είναι η ύπαρξη ή όχι άνθρακα στη χημική δομή τους. Σύμφωνα με αυτό κατηγοριοποιούνται σε οργανικούς ή όχι αντίστοιχα. Ένα δεύτερο κριτήριο είναι η χημική πολικότητα σύμφωνα με την οποία διακρίνονται σε πολικούς πρωτικούς, διπολικούς απρωτικούς και μη πολικούς. Η πολικότητα των μορίων καθορίζεται από το είδος των ομάδων που περιέχουν. Οι πολικοί διαλύτες - όπως το νερό και οι αλκόολες - αποτελούνται κυρίως από ενώσεις που περιέχουν υδροξυλομάδα (-OH) και έχουν τη δυνατότητα να μοιραστούν ένα άτομο υδρογόνου H^+ προς σχηματισμό δεσμού υδρογόνου. Οι διπολικοί απρωτικοί διαλύτες - όπως η ακετόνη - δεν περιέχουν (-OH) και χρησιμοποιούνται για τη διάλυση λιγότερο πολικών ενώσεων. Οι μη πολικοί διαλύτες - όπως το βενζόλιο και το εξάνιο - δεν αναμειγνύονται με το νερό και δια τούτου χρησιμοποιούνται για τη διάλυση υδρόφοβων ενώσεων όπως έλαιων και λιπιδίων [10],[11].

Ένας γενικός, απλουστευμένος, κανόνας είναι ότι τα "όμοια διαλύουν όμοια", δηλαδή ένας πολικός διαλύτης διαλυτοποιεί μια πολική ουσία και ένας μη πολικός διαλυτοποιεί μία μη πολική ένωση αντίστοιχα. Ένα μέτρο ποσοτικοποίησης της πολικότητας είναι η διηλεκτρική σταθερά (ϵ) και η διπολική ροπή (μ). Όσο μεγαλύτερα είναι αυτά τα μεγέθη, τόσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη [12]. Τα παραπάνω συνοψίζονται στον πίνακα 2.1.

2.2 Χρήση συμβατικών διαλυτών και κίνδυνοι

Οι διαλύτες αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του βιομηχανικού κόσμου. Βαφές, φάρμακα, λιπαντικά, μελάνια, απορρυπαντικά, εντομοκτόνα, καλλυντικά είναι ένα δείγμα βιομηχανικών προϊόντων που περιέχουν διαλύτες. Έχει αποδειχθεί,ωστόσο, ότι η τοξικότητα των διαλυτών επιβαρύνει τόσο την ανθρώπινη υγεία όσο και το περιβάλλον [13].

Οι πρώτοι που πλήττονται άμεσα από τις αρνητικές τους επιδράσεις είναι οι εργαζόμενοι τέτοιων βιομηχανιών είτε εισπνέοντας τους ατμούς τους, είτε μέσω της δερματικής επαφής με αυτούς. Έρευνες με κέντρο τη νευροτοξικότητα των διαλυτών έχουν αποδείξει ότι ανάλογα τη δόση έκθεσης υπάρχουν επιδράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εργαζομένων με συμπτώματα όπως πονοκέφαλοι, ζαλάδες, φωτοευαισθησία τα οποία κλιμακώνονται σε αναισθησία, επιληπτικές κρίσεις ή ακόμα και θάνατο [14]. Άλλες έρευνες

Κατηγορία Διαλυτών	Διηλεκτρική σταθερά (ε)	Διπολική ροπή (μ)	Παραδείγματα	Διαλυτοποιούν
Πολικοί πρωτικοί	25-80	1.7-2.9	νερό, μεθανόλη, αιθανόλη	Ανιόντα, Κατιόντα και πολικές πρωτικές οργανικές ενώσεις
Πολικοί απρωτικοί	20-46	2.7-3.6	ακετονιτρίλιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο	Κατιόντα (DMSO)
Μη πολικοί πρωτικοί	6-15	1.4-1.9	οξικό οξύ, κυκλοεξανόλη	
Μη πολικοί απρωτικοί	1.9-12	0-2.4	αιθέρας, βενζόλιο, εξάνιο, white spirit	Άπολες ενώσεις (υδρογονάνθρακες), λίπη, κεριά

Πίνακας 2.1: Σχέση της διηλεκτρικής σταθεράς και της διπολικής ροπής των μορίων των διαλυτών με τον πολικό ή μη πολικό χαρακτήρα τους.

εστιάζουν στις μακροπρόθεσμες επιδράσεις όπως η εμφάνιση καρκινικών παθήσεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εμφάνιση λευχαιμίας σε εργάτες με συστηματική έκθεση στο βενζόλιο [15].

Οι εργαζόμενοι, ωστόσο, δεν είναι η μόνη παρτίδα ανθρώπων που υποφέρουν τις συνέπειες των διαλυτών. Όλοι οι άνθρωποι εκτιθόμαστε καθημερινά στους διαλύτες μέσω των αέριων βιομηχανικών εκπομπών, της μόλυνσης του πόσιμου νερού καθώς και της καθημερινής χρήσης οικιακών καθαριστικών [16].

Η τελική απόρριψη των προϊόντων που περιέχουν διαλύτες καθώς και των ίδιων των διαλυτών επιδρά και στο περιβάλλον μέσω του εδάφους και του υδροφόρου ορίζοντα [17]. Κάποια από τα απόβλητα που προκύπτουν από τις διεργασίες με διαλύτες δεν είναι εύκολα βιοαποδομήσιμα. Οι βιομηχανίες για να διαχειριστούν αυτό το πρόβλημα, προσπαθούν είτε να τους ανακτούν είτε να τους καταστρέφουν με ειδικές περιστρεφόμενες κλιβάνους. Παρ' όλα αυτά, πάντα υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης των υδάτων με συνέπεια όχι μόνο τη διατάραξη των τοπικών οικοσυστημάτων αλλά και τη μόλυνση του πόσιμου νερού ευρύτερα. Το ίδιο ισχύει και για το έδαφος. Σε περίπτωση μόλυνσης του χώματος και του υπεδάφους, καταστρέφεται η χλωρίδα ή οι αναπτυσσόμενες καλλιέργειες καθίστανται επικίνδυνες για τους καταναλωτές [18].

Η στροφή σε πιο "πράσινους" διαλύτες προέκυψε σαν επιτακτική ανάγκη αντιμετώπισης και πρόληψης των παραπάνω κινδύνων.

2.3 Πράσινοι διαλύτες

2.3.1 Ιοντικά υγρά

Τα ιοντικά υγρά (Ionic liquids-ILs) χρησιμοποιούνται πάνω από 30 χρόνια στην αεροναυπηγική ως ηλεκτρολύτες, ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται ευρέως στα πλαίσια της πράσινης χημείας αντικαθιστώντας τους πτητικούς οργανικούς διαλύτες. Πρόκειται για διαλύτες που αποτελούνται από μεμονωμένα ιόντα με σημείο τάξης χαμηλότερο των 100° C [19], συνιστούν δηλαδή "υγρά άλατα". Απαρτίζονται από οργανικά ή/και ανόργανα ιόντα και μπορούν να περιέχουν περισσότερα από ένα ιόν ή κατιόν. Η κυρίαρχη δύναμη για το σχηματισμό στερεής κατάστασης είναι η έλξη Coulomb μεταξύ των ιόντων, οπότε καθώς αυξάνεται το μέγεθος των ιόντων το σημείο τήξης ελαττώνεται. Οι ηλεκτροστατικές αυτές δυνάμεις προσδίδουν ανισοτροπικό χαρακτήρα σε ένα ιοντικό υγρό καθώς δεν είναι ίδιες σε όλη την έκτασή του.

Τα ιοντικά υγρά είναι πιο ιξώδη από τους σηνηθισμένους οργανικούς διαλύτες. Το ιξώδες τους κυμαίνεται από 10-500cP σε θερμοκρασία δωματίου και επηρεάζεται έντονα από τον τύπο του ανιόντος. Η πυκνότητά τους κυμαίνεται από 1.1-2.4 g/cm³ και είναι ανάλογη της μοριακής μάζας του ανιόντος. Αναφορικά με την πολικότητα ως ιοντικές ενώσεις, τα ILs είναι πολικοί διαλύτες, ωστόσο ο βαθμός της πολικότητας μπορεί να τροποποιηθεί με κατάλληλη επιλογή ιόντων. Κατέπεκταση μπορούν να είναι από τελείως διαλυτοί έως εντελώς αδιάλυτοι στο νερό.

Τα ILs διαθέτουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών οργανικών διαλυτών με ιδιαίτερα

σημαντική την αμελητέα τάση ατμών σε θερμοκρασία δωματίου που τους αποτρέπει να εξατμίζονται και να εκπέμπουν επιβλαβή συστατικά στο περιβάλλον. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητές τους όπως η θερμική σταθερότητα, το ιξώδες, η διαλυτότητα στο νερό και σε άλλους οργανικούς διαλύτες δύνανται να ρυθμίζονται με την αλλαγή του συνδυασμού των κατιόντων και των ανιόντων. Επιπλέον, μπορούν να τροποποιηθούν με την προσθήκη επιθυμητών λειτουργικών ομάδων στα ιόντα ώστε να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες διαλυμένες ουσίες [20].

2.3.1.1 Περιορισμοί στη χρήση των ιοντικών υγρών

Παρά τις υποσχόμενες προοπτικές και την συμβολή τους στην πράσινη χημεία, τα ILs έχουν ορισμένα μειονεκτήματα. Το πρώτο και πιο σημαντικό είναι το υψηλό κόστος καθώς η τιμή τους ανά κιλό είναι τουλάχιστον 4 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από εκείνη των οργανικών διαλυτών. Δεύτερον, παρά τη χαμηλή τάση ατμών που αναφέρθηκε παραπάνω, η υδατική διαλυτότητα των ILs τους καθιστά επικίνδυνους για το υδατικό περιβάλλον καθώς όχι μόνο είναι εύκολο να εισχωρήσουν αλλά παράλληλα είναι δύσκολο να βιοδιασπαστούν εξαιτίας της υψηλής σταθερότητάς τους. Επέκταση σε αυτό το μειονέκτημα αποτελεί και ο κίνδυνος προς τους ανθρώπους καθώς έχει βρεθεί πως ορισμένα ILs εμφανίζουν διάφορους βαθμούς τοξικότητας. Ανάλογα το είδος των ιόντων ορισμένα εμφανίζουν μεγαλύτερη τοξικότητα ακόμη και από κοινούς οργανικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη. Τέλος, δεν είναι κατάλληλα για κάθε είδους αντιδράσεις. Για παράδειγμα, λόγω του αυξημένου ιξώδους τους δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις που περιλαμβάνουν υψηλά μοριακά αντιδραστήρια (που είναι ιδιαίτερα ιξώδη) όπως οι πολυμερισμοί [21].

2.3.2 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES)

Μια δεύτερη κατηγορία πράσινων διαλυτών συνιστούν οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents-DES). Οι DES είναι μείγματα δύο (ή περισσότερων συστατικών) τα οποία σε συγκεκριμένη αναλογία έχουν χαμηλότερο σημείο τήξης από το κάθε συστατικό ξεχωριστά (εικόνα 2.2) [22]. Το ένα από τα συστατικά είναι συνήθως κάποιο άλας αμμωνίου ενώ το δεύτερο είναι κάποιο μεταλλικό άλας. Στην πραγματικότητα πρόκειται για συνδυασμό δύο αλάτων εκ των οποίων το ένα παρέχει ένα ελεύθερο υδρογόνο (Hydrogen Bond Donor-HBD) και το άλλο δύναται να δημιουργήσει ένα δεσμό υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor-HBA)(εικόνα 2.1).

Οι DESs μπορούν να περιγραφούν από τη γενική φόρμουλα $Cat^+X^-Y^-$ όπου Cat^+ είναι οποιοδήποτε οργανικό κατιόν(κυρίως κάποιο αμμώνιο ή επίσης φωσφόνιο ή κατιόν σουλφονίου), το X^- είναι μια βάση Lewis¹ ή γενικά ένα ανιόν αλογονιδίου και το Y^- είναι ένα οξύ Bronsted² το οποίο σχηματίζει ανιονικό σύμπλοκο με το X^- . Η μείωση του σημείου τήξης οφείλεται στη μετεγκατάσταση του φορτίου που συμβαίνει λόγω του σχηματισμού δεσμού υδρογόνου [23].

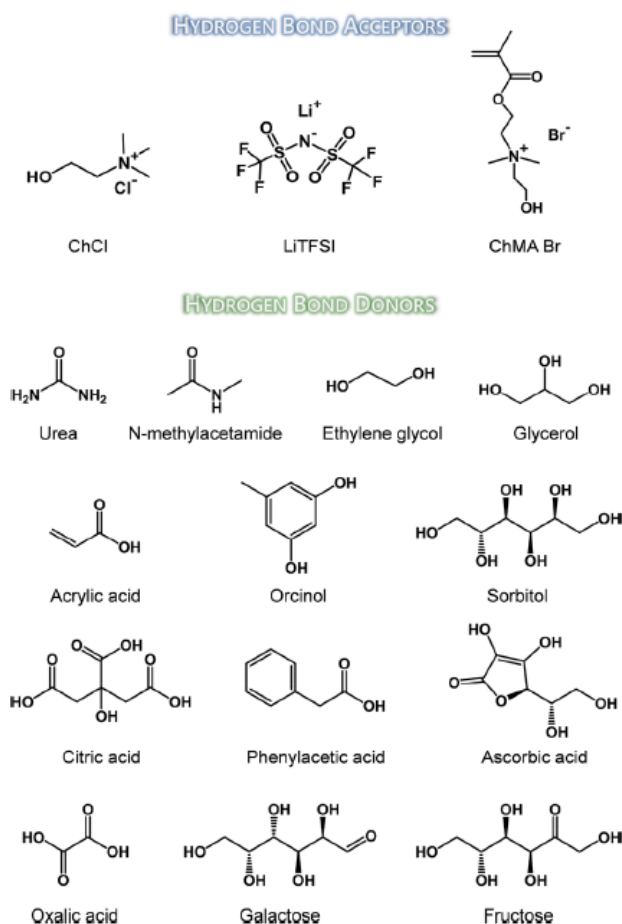
Ορισμένες φορές γίνεται σύγχυση των DESs με τους ιοντικούς διαλύτες. Ωστόσο οι DESs σε αντίθεση με τα ILs είναι λιγότερο κοστοβόροι, βιοδιαθέσιμοι, μη τοξικοί και εύκολοι στην παρασκευή [24].

2.3.2.1 Ταξινόμηση βαθέων ευτηκτικών διαλυτών

Η πλειονότητα των DES που έχουν παρασκευαστεί και μελετηθεί μέχρι στιγμής μπορούν να ταξινομηθούν σε 5 διαφορετικές κατηγορίες. Στην κατηγορία τύπου I και II ανήκουν τα DES που συνδυάζουν ένα άλας αμμωνίου τεταρτοταγούς δομής και ένα μεταλλικό χλωρίδιο σε άνυδρη μορφή (τύπος I) και σε ενυδατωμένη μορφή (τύπος II). Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν τα DES που συνιστούν συνδυασμό άλατος αμμωνίου με ένα μικρό οργανικό μόριο που παίζει το ρόλο HBD. Ο τύπος IV, είναι ένας συνδυασμός του τύπου II και του τύπου III, δηλαδή περιλαμβάνει τα βαθέως ευτηκτικά μείγματα που σχηματίζονται από ένα ενυδατωμένο μεταλλικό χλωρίδιο και ένα οργανικό HBD. Πρόσφατα, προστέθηκε και ένας πέμπτος τύπος ο οποίος περιλαμβάνει τα DES που αποτελούνται από μη-ιονικούς HBAs και HBDs [25].

¹Βάση κατά Lewis είναι κάθε ουσία που μπορεί να προσφέρει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων προς σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού

²Οξύ κατά Bronsted είναι το μόριο ή το ιόν που δίνει πρωτόνιο σε μια αντίδραση μεταφοράς πρωτονίου



Σχήμα 2.1: Παραδείγματα χημικών δομών αποδεκτών δεσμών υδρογόνου (HBAs) και δοτών δεσμών υδρογόνου (HBDs) που μπορούν να συνθέσουν DES

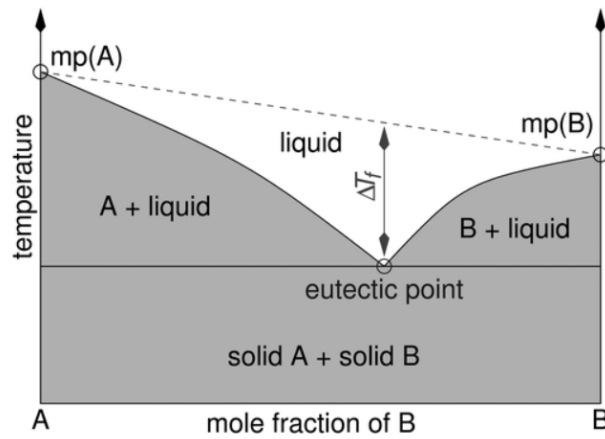
Υπάρχει και μία άλλη περίπτωση οι DES να σχηματίζονται από συστατικά που παράγονται από τη φύση και βρίσκονται σε αφθονία. Συγκεκριμένα, όταν οι ενώσεις που συνιστούν το DES είναι πρωτογενείς μεταβολίτες, δηλαδή αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα ή παράγωγα χολίνης, τότε πρόκειται για φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents-NADESs).

2.3.2.2 Φυσικοί ευτηκτικοί διαλύτες σε ζωντανούς οργανισμούς NADESs

Έχει προταθεί ότι τα NADESs σχετίζονται με την αντίσταση ορισμένων οργανισμών σε χαμηλές θερμοκρασίες και στην ξηρασία. Για παράδειγμα, η περόμουγα της Αλάσκας (*Nemoura arctica*) έχει βρεθεί να αυξάνει 3 φορές τη συγκέντρωση γλυκερόλης στο αίμα της όταν υπόκειται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Έχει επιβεβαιωθεί επίσης ότι τα σκαθάρια στην κεντρική Ευρώπη (*Ips Tyrographus*) παράγουν εποχιακά τρεχαλόζη, σάκχαρα και άλλες πολυόλες για να αντέξουν θερμοκρασίες έως και -20°C . Υπάρχουν και άλλα έντομα που για λόγους επιβίωσης παράγουν σάκχαρα τα οποία αναμειγνύονται με πολυόλες. Αυτό που καταφέρνουν είναι να μειώνουν το σημείο τήξης του νερού στο σώμα τους ώστε να μην "παγώνουν" τα όργανά τους. Η συμπεριφορά αυτή επιβεβαιώνεται κατ'επέκταση και όταν αυξάνεται η θερμοκρασία όπου η συγκέντρωση αυτών των σακχάρων σχεδόν μηδενίζεται στους οργανισμούς που μελετούνται [26].

2.3.2.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες DES και NADES

Μελετώντας ένα υλικό, ο καθορισμός των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων είναι υψίστης σημασίας για την αξιοποίησή του στους διάφορους ερευνητικούς τομείς. Παρά το γεγονός ότι ο κάθε ερευνητής στην εκάστοτε μελέτη μπορεί να διερευνήσει πολλές εσωτερικές ιδιότητες, υπάρχουν ορισμένες πιο γενικές που μπορούν να περιγράψουν την πλειονότητα των DES.



Σχήμα 2.2: Σχηματική Αναπαράσταση ευτηκτικού σημείου σε ένα διάγραμμα φάσης δύο συστατικών.

Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενος, οι DES αποτελούνται από δύο ή περισσότερα συστατικά, τα οποία μπορούν να συνδυαστούν σε διάφορες αναλογίες. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ιδιότητες των DES μεταβάλλονται σε τεράστιο βαθμό με τις διάφορες αναμειξεις των συστατικών τους. Η δυναμική τους μεταβάλλεται σημαντικά σε διαφορετικές συστάσεις γύρω ή μακριά από το ευτηκτικό σημείο.

Το ιξώδες είναι ένα μέτρο που περιγράφει την αντίσταση ενός ρευστού στην παραμόρφωση που επιβάλλει μια διατμητική τάση. Η τιμή του δίνει σημαντικές πληροφορίες για τις μοριακές αλληλεπιδράσεις της υγρής φάσης. Έχουν αναπτυχθεί δύο εμπειρικά μοντέλα για το ιξώδες των DES τα οποία εξαρτώνται από τη θερμοκρασία και τη μοριακή τους σύσταση. Πρόκειται για τα μοντέλα Eyring και Vogel-Fulcher-Tammann (VFT) τα οποία ανταποκρίνονται καλύτερα σε DES χαμηλού και υψηλού ιξώδους αντίστοιχα. Το δεύτερο μοντέλο περιγράφει πιο αποτελεσματικά υγρά με ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις όπως Van der Waals ή δεσμούς υδρογόνου [27].

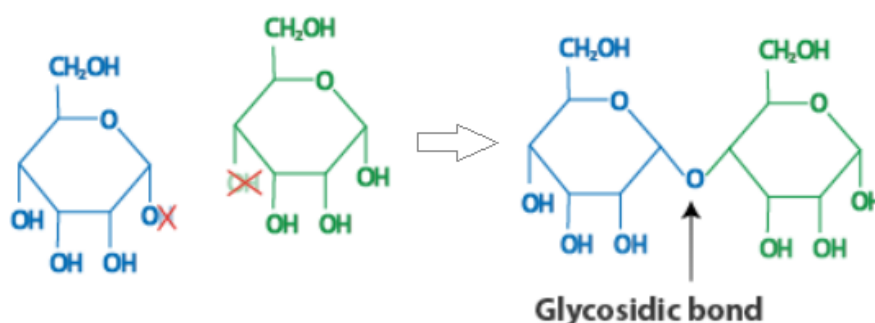
$$\eta_{VFT} = A' \exp \frac{B}{T - T_0} \quad (2.1)$$

Η τιμή της πυκνότητας για τα περισσότερα DES είναι συνήθως υψηλότερη από αυτή του νερού (π.χ. 1.14 g cm^{-3} για την αιθαλίνη). Η πυκνότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος των HBD. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι DES βασισμένοι σε αιθυλονογλυκόλη έχουν μικρότερη πυκνότητα συγκριτικά με εκείνα που έχουν ως βάση γλυκερόλη.

Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες συνιστούν ένα είδος υδρογονανθράκων¹ που παράγονται από επαναλαμβανόμενες μονάδες μονοσακχαριτών (όπως γλυκόζη, φρουκτόζη και γαλακτόζη) ή δισακχαριτών (σακχαρόζη και λακτόζη) ενωμένες με γλυκοσιδικούς δεσμούς [28], [29].

Γλυκοσιδικός δεσμός είναι ομοιοπολικός δεσμός που ενώνει δύο μονοσακχαρίτες όταν ο ένας χάνει μία υδροξυλική ομάδα (OH) ενός άνθρακα και ο άλλος χάνει ένα υδρογόνο μιας υδροξυλικής ομάδας. Κατά την ένωση αυτή χάνεται στην ουσία ένα μόριο νερού (H_2O) και δια τούτου η αντίδραση ονομάζεται και αντίδραση συμπύκνωσης [30].



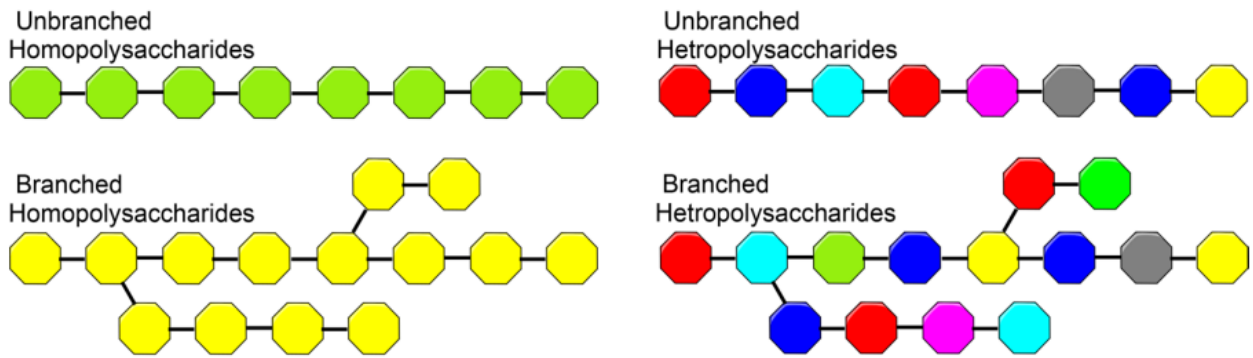
Σχήμα 3.1: Γλυκοσιδικός δεσμός

3.1 Κατηγοριοποίηση πολυσακχαριτών

Το βασικό κριτήριο σύμφωνα με το οποίο κατηγοριοποιούνται οι πολυσακχαρίτες είναι σύμφωνα με το εάν απαρτίζονται από ίδια είδη μονοσακχαριτών ή όχι. Στην πρώτη περίπτωση ονομάζονται ομοιολυσακχαρίτες, ενώ στη δεύτερη ετεροπολυσακχαρίτες. Αν σκεφτεί κανείς τους πολυσακχαρίτες ως μακριές αλυσίδες που σχηματίζονται από τη συστοιχία μονοσακχαριτών μπορεί να τους κατηγοριοποιήσει και περαιτέρω σύμφωνα με τη διάταξη των αλυσίδων, αν είναι δηλαδή γραμμική ή αν περιέχει διακλαδώσεις. Διαφορές στη δομή αντιστοιχούν σε διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και λειτουργίες.

Ένα τρίτο κριτήριο είναι με βάση την πηγή προέλευσή τους καθώς μπορούν να προέρχονται από φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, από φύκια ή από μικρόβια. Επιπρόσθετα, κατατάσσονται και σύμφωνα με το ηλεκτρικό τους φορτίο σε κατιονικούς, ανιονικούς ή μη ιονικούς πολυσακχαρίτες (εικόνα 3.2 [31]).

¹Υδρογονάνθρακες ονομάζονται οι οργανικές ενώσεις που περιέχουν μόνο άτομα άνθρακα (C), υδρογόνου (H) και οξυγόνου (O) με αναλογία H:O συνήθως 2:1 και γενική φόρμουλα $C_x(H_2O)_y$



Σχήμα 3.2: Γραμμικοί και διακλαδισμένοι ομοπολυσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες

3.2 Πολυσακχαρίτες σε ζωντανούς οργανισμούς

Η ποσότητα πολυσακχαριτών που παράγεται από φυτά κάθε χρόνο ξεπερνάει κατά πολλές τάξεις μεγέθους την συνθετική παραγωγή στην χημική βιομηχανία. Φυσικοί πολυσακχαρίτες συνθέτονται για να ικανοποιήσουν πολλές διαφορετικές λειτουργίες, όπως την αποθήκευση ενέργειας στα φυτά (π.χ. άμυλο), τη δομική στήριξη φυτικών κυττάρων (π.χ. κυτταρίνη) ή να αποτελέσουν πηκτωτικούς παράγοντες για το σχηματισμό ενδοκυτταρικής μήτρας αποθηκεύοντας διάφορα ιόντα όπως νάτριο, ασβέστιο και μαγνήσιο (π.χ. αλγινικό από καφέ φύκια)[32].

Εξίσου σημαντικός είναι και ο ρόλος των πολυσακχαριτών στα ζώα. Ασπόνδυλα ζώα όπως σαλιγκάρια, μέδουσες και έντομα διαθέτουν εξωσκελετούς των οποίων η βασική σύσταση είναι ο πολυσακχαρίτης χιτίνη. Πολυσακχαρίτες και στους ζωτικούς ιστούς καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος των εξωκυττάρων μητρών. Η μορφή γέλης που διαθέτουν συμβάλλει στην κυτταρική συνοχή και ανάπτυξη λειτουργώντας παράλληλα ως πορώδες διάφραγμα για την διάχυση θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου στα κύτταρα (π.χ. υαλουρονικό οξύ, ηπαρίνη,θειική χονδροϊτίνη) [33].

Πολυσακχαρίτες περιέχονται ακόμη και στο ανθρώπινο σώμα και μάλιστα σε τόσο μεγάλες ποσότητες που ο ανθρώπινος οργανισμός δεν τους αντιλαμβάνεται σαν ξενιστές. Επιπλέον διαθέτουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται σε εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα, ικανότητα η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί για την πρόκληση ενός θεραπευτικού αποτελέσματος σε επιθυμητό χρόνο και στόχο.

Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω, καθιστά τα μακρομόρια των πολυσακχαριτών κατάλληλα "οχήματα" φαρμάκων. Μέσω χημικής τροποποίησης μπορούν να ρυθμιστούν η διαλυτότητα, η υδροφοβικότητα, τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των πολυσακχαριτών σχηματίζοντας παράγωγα με προσαρμοσμένες ιδιότητες [34].

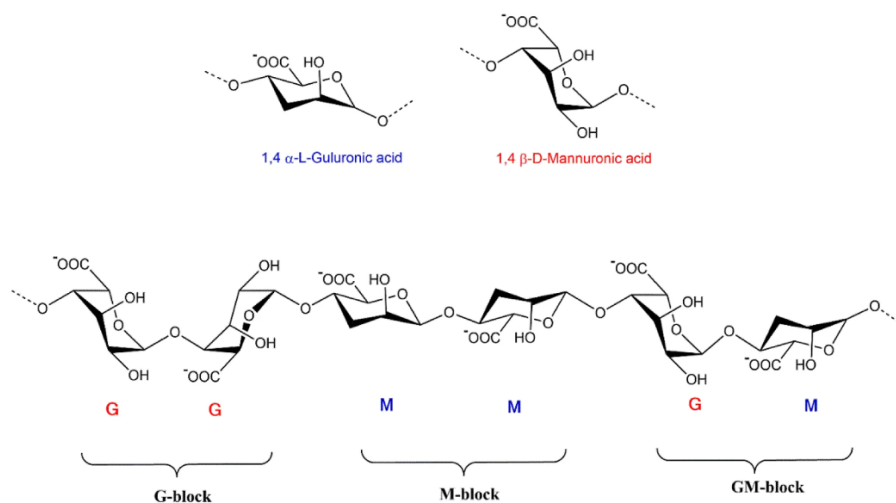
3.3 Αλγινικό

Το αλγινικό είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που απαντάται κυρίως σε καφέ φύκια. Μπορεί να βρεθεί επίσης σε κόκκινα φύκια καθώς και σε ορισμένα βακτήρια². Η εξαγωγή του από τα ακατέργαστα θαλάσσια φύκια γίνεται με εμβάπτιση σε αλκαλικά διαλύματα, συνήθως νατρίου (NaOH), όπου το φυσικό αλγινικό σε διάφορες μορφές αλατιού μετατρέπεται σε υδατοδιαλυτό αλγινικό νάτριο [35].

Από χημική σκοπιά, πρόκειται για ένα γραμμικό συμπολυμερές που απαρτίζεται από δύο μονομερή, το Δ-μαννουρονικό οξύ (M) και το L-γουλουρονικό οξύ (G), τα οποία συνδέονται με β-(1,4) δεσμούς. Η στερεοχημική μορφή του μορίου του αλγινικού μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την προέλευσή του, την τεχνική εξαγωγής του, την ηλικία και τον τύπο του ιστού των φυτών από τα οποία εξάγεται. Συγκεκριμένα, μπορεί να αποτελείται είτε από διαδοχικές μονάδες M (M-blocks), είτε από διαδοχικές μονάδες G (G-blocks), είτε από περιοχές που οι μονάδες M και G εναλλάσσονται. Η ποσότητα και η κατανομή των μονομερών ποικίλλουν κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας, ποικιλία που επεκτείνεται και στις φυσικοχημικές

²η εξαγωγή του από βακτήρια δεν έχει καθιερωθεί ακόμη για εμπορική παραγωγή

ιδιότητες του αλγινικού. Για παράδειγμα, ο σχηματισμός γελών με την προσθήκη ιόντων ασβεστίου στηρίζεται κυρίως σε G-blocks και δια τούτου όσο μεγαλύτερη η ποσότητα των G-blocks, τόσο μεγαλύτερη και η αντοχή της γέλης. Αντίστοιχα, αύξηση των M-Blocks οδηγεί στο σχηματισμό πιο ελαστικών γελών [36] [37].



Σχήμα 3.3: Χημική διαμόρφωση μονομερών στο αλγινικό

3.3.1 Ιδιότητες

Το αλγινικό είναι ένα ανιονικό πολυμερές το οποίο είναι βιοσυμβατό, υδρόφιλο, βιοδασπώμενο υπό κοινές φυσιολογικές συνθήκες και ως φυσικό πολυμερές υπάρχει σε άφθονες ποσότητες. Είναι μη τοξικό, γεγονός που το καθιστά ασφαλές υλικό να χρησιμοποιηθεί στο ανθρώπινο σώμα (π.χ. σε πληγές ή κοιλότητες).

Η πιο χαρακτηριστική ιδιότητα που παρουσιάζει το αλγινικό είναι να σχηματίζει γέλη. Πρακτικά, δύναται να λειτουργεί ως μεμβράνη που επιτρέπει την ανταλλαγή ιόντων με το αίμα. Συγκεκριμένα, όταν μια αδιάλυτη στο νερό αλγινική ίνα ασβεστίου έρθει σε επαφή με εκκρίσεις μια πληγής, τα ιόντα ασβεστίου ανταλλάσσονται με ιόντα νατρίου στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα ιόντα ασβεστίου που απελευθερώνονται λειτουργούν ως αιμοστατικός παράγοντας. Επιπλέον, κατά τη σταδιακή μετατροπή μιας αλγινικής ίνας ασβεστίου σε νατρίου, απορροφάται μεγάλη ποσότητα εκκρίσεων η οποία μετασχηματίζεται σε γέλη, γεγονός που βοηθάει στη διατήρηση της υγρασίας στην επιφάνεια της πληγής. Κατ' επέκταση διατηρείται και η θερμοκρασία. Οι δύο τελευταίες συνθήκες θεωρούνται ότι είναι ο κύριος μηχανισμός επούλωσης πληγών.

Εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός πως η επεξεργασία του αλγινικού λαμβάνει χώρα σε υδατικό διάλυμα. Σε ένα υδατικό πηκτικό διάλυμα σε ουδέτερο pH, πολλά βιοενεργά υλικά όπως φάρμακα και ένζυμα μπορούν να συνδυαστούν με τις αλγινικές ίνες χωρίς απώλεια της βιοαδραστικότητάς τους [38]. Επιπρόσθετα, διαθέτει ευχάριστη μυρωδιά και γεύση, δεν λεκιάζει αναμειγνύεται εύκολα, έχει χαμηλό κόστος και μεγάλη διάρκεια ζωής.

3.3.2 Εφαρμογές

Το αλγινικό ανακαλύφθηκε το 1881, αλλά η ιστορία των αλγινικών ξεκίνησε γύρω στις δεκαετίες του 1940. Το 1980 εφαρμόστηκαν στην επικάλυψη πληγών χάρη στις εξαιρετικές ιδιότητες που προαναφέρθηκαν. Το πρώτο εμπορικό αλγινικό για επικάλυψη πληγών κυκλοφόρησε το 1983 και έφερε το όνομα Sorbsan. Στην πορεία κυκλοφόρησαν και άλλα παρόμοια παρασκευάσματα όπως το Kaltostat, Algosteril, AlgiDERM κ.α. [36]

Το αλγινικό, στις μέρες μας, αξιοποιείται σε πληθώρα εφαρμογών, από τις βιομηχανίες υφασμάτων, τροφίμων και ποτών μέχρι καλλυντικών και χημικές. Χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής, γαλακτωματοποιητής, πηκτικός παράγοντας καθώς και παράγοντας σχηματισμού γέλης. Αυξανόμενη έχει υπάρξει η χρήση του στη φαρμακευτική βιομηχανία στην επούλωση πληγών (όπως είδαμε και προηγουμένως) αλλά και

στη μηχανική των οστών. Η άμεση έγχυση μυοβλαστών και η τοπική χορήγηση αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων (HGF) και παράγοντα ανάπτυξης ινοβλαστών (FGF2) ή αλγινικού ικριώματος σε τραυματισμένους μύες, ενισχύει σημαντικά την αναγέννηση των σκελετικών μυών. Πρόσφατα, το αλγινικό έχει χρησιμοποιηθεί επίσης ως τρισδιάστατη πλατφόρμα μικροσυστοιχιών για την επίτευξη επιφανειακών μικρο-μοτίβων.

Στον ίδιο τομέα, έχει αποδειχθεί όχι μόνο ότι είναι κατάλληλο για παρασκευή παρειακών, ρινικών, οφθαλμικών και γαστρεντερικών δοσολογικών σκευασμάτων, αλλά και κατάλληλο υπόστρωμα για την απορρόφηση βαρέων μετάλλων. Αναφορικά με τη δεύτερη εφαρμογή, η εφαρμογή αλγινικού έχει αναφερθεί να ενισχύει τις φυσικές οδούς αποτοξίνωσης στο σώμα συμβάλλοντας στην καταπολέμηση χρόνιων ασθενειών [37] [39].

Υδρογέλες

4.1 Εισαγωγή

Οι υδρογέλες συνιστούν αδιάλυτα υδατικά διογκωμένα δίκτυα τα οποία ερευνούνται ευρέως για ποικίλες εφαρμογές στην γεωργία, στα τρόφιμα αλλά και σε βιοφαρμακευτικές εφαρμογές όπως μεταφορά φαρμάκων ή μηχανική των ιστών. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 60 χρόνων, οι υδρογέλες μελετούνται και σχεδιάζονται ώστε να είναι εμφυτεύσιμες, ενέσιμες και ψεκάσιμες για πολλά όργανα και ιστούς [40].

4.2 Τι είναι οι υδρογέλες και ποιες οι ιδιότητές τους

Οι υδρογέλες είναι τρισδιάστατα δίκτυα πολυμερών συνδεδεμένα με σταυροδεσμούς¹ τα οποία μπορούν να απορροφήσουν και να διατηρήσουν μεγάλη ποσότητα νερού εξαιτίας των υδρόφιλων ομάδων όπως $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-CONH_2$, $-CONH$, $-SO_3H$. [40] Το ποσοστό διογκωσης των υδρογελών εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πολυμερούς και την πυκνότητα των σταυροδεσμών. Μεγάλο ποσοστό πυκνότητας διασύνδεσης προκαλεί μείωση στο ποσοστό διογκωσης και αυξάνει την ευθραστότητα της υδρογέλης Η ύπαρξη των σταυροδεσμών στη σύνθεσή τους, τους προσδίδει την ιδιότητα της αδιαλυτότητας. Θα μπορούσαμε εικλαϊκευμένα να πούμε ότι οι αλυσίδες μακρομορίων που τις συνιστούν είναι πολύ καλά δεμένες μεταξύ τους γεγονός που τις καθιστά σταθερές δομές. Το πορώδες αυτών των δομών παρουσιάζει ομοιότητα με τη δομή των ζωντανών ιστών. Σε μοριακό επίπεδο, οι πιο σημαντικές ιδιότητες που καθορίζουν τη δομή της υδρογέλης είναι το μέγεθος του πλέγματος και το μοριακό βάρος της πολυμερικής αλυσίδας.[41]

Υδρογέλες υπάρχουν και στη φύση όπως το κολλαγόνο και η γελατίνη ή μπορούν να παρασκευαστούν συνθετικά. Οι συνθετικές υδρογέλες πιθανώς να στερούνται τις ιδιότητες της βιοδιαθεσιμότητας² και της βιοσυμβατότητας³. Ωστόσο, αυτές οι ιδιότητες μπορούν να προσαρμοστούν με τροποποίηση της λειτουργικής ομάδας ή την ενσωμάτωση φυσικών πολυμερών.[42] Ως δομές, οι υδρογέλες, είναι επίσης ευαίσθητες σε εξωτερικά ερεθίσματα και δύνανται να ανταποκριθούν με μεταβολή των ιδιοτήτων τους. Κάποια συνήθη ερεθίσματα είναι η μεταβολή τιμής του pH, της θερμοκρασίας και της ιονικής δύναμης. [43] Χάρη σε αυτή την ικανότητα, οι υδρογέλες μπορούν να ενσωματωθούν σε ανιχνευτικά συστήματα ή να αξιοποιηθούν σε ελεγχόμενες αποδεσμεύσεις φαρμάκων, βιοαισθητήρες, ικρίωματα μηχανικής ιστών, τεχνητά όργανα, επιδέσμους πληγών, φακούς επαφής κ.α.

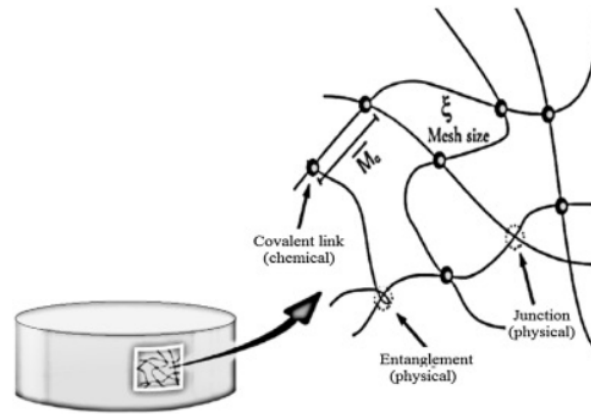
4.3 Κατηγορίες υδρογελών

Η κατηγοριοποίηση των υδρογελών μπορεί να γίνει με πληθώρα κριτηρίων όπως σύμφωνα με τις φυσικές τους ιδιότητες, τη φύση της διογκωσης, τη μέθοδο παρασκευής, την προέλευση, το φορτίο τους, το βαθμό

¹ομοιοπολικό δεσμό με τους οποίους συνδέονται διαμοριακά μεταξύ τους τα μακρομόρια (cross-links)

²το ποσοστό απορρόφησης μιας λαμβανόμενης ουσίας από ένα οργανισμό, που ποικίλει από άτομο σε άτομο

³η ιδιότητα που χαρακτηρίζει ένα βιοϋλικό κατά την οποία η επαφή με ένα ζωντανό ιστό πραγματοποιείται χωρίς να προκαλεί βλαβερή ιστολογική αντίδραση(πόνος, ερεθισμό ή νέκρωση), τοξική αντίδραση στο σύστημα ή να είναι δυνητικά εφικτή η καρκινογένεση



Σχήμα 4.1: Δομή υδρογέλης σε μοριακό επίπεδο

βιοαποδόμησης κ.α. Στην εικόνα που ακολουθεί βλέπουμε συγκεντρωμένες τις κατηγορίες των υδρογελών με κριτήριο την κάθε ιδιότητα.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, οι υδρογέλες σχηματίζονται από σταυροδεσμούς πολυμερικών αλυσίδων των οποίων οι πηγές μπορούν να είναι φυσικά, συνθετικά ή ημι-συνθετικά πολυμερή. Οι υδρογέλες που παράγονται από φυσικά πολυμερή (όπως κυτταρίνη, χιτοζάνη, κολλαγόνο, αλγινικό, υαλουρονικό, αγαρόζη, ζελατίνη κ.α.) διαθέτουν εγγενώς βιοσυμβατότητα και βιοδιαθεσιμότητα αλλά σχετικά ασθενή σταθερότητα και μηχανική αντοχή. Παρόλο που οι φυσικές υδρογέλες είναι ασφαλείς για την πλειονότητα του πληθυσμού, μπορεί να περιέχουν ορισμένα υλικά που είναι αλλεργιογόνα σε σπάνιες περιπτώσεις. Οι συνθετικές υδρογέλες παρασκευάζονται από πολυμερή που συνθέτονται από τον άνθρωπο μέσω πολυμερισμού μονομερών όπως είναι για παράδειγμα η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Παρόλο που τα περισσότερα συνθετικά πολυμερή δεν είναι βιοσυμβατά, είναι σταθερά και έχουν καλές μηχανικές ιδιότητες. Τα ημι-συνθετικά πολυμερή είναι χημικά τροποποιημένα φυσικά πολυμερή ή συνδυασμός φυσικών και συνθετικών πολυμερών. Οι υδρογέλες που παρασκευάζονται από αυτά τα πολυμερή διαθέτουν τα βιοδραστικά χαρακτηριστικά των φυσικών υδρογελών αλλά ρυθμιστικές ιδιότητες μέσω των χημικών παραμέτρων τους.

Με κριτήριο το είδος των πολυμερών που χρησιμοποιούνται και τον τρόπο διασύνδεσής τους, μπορούν να παρασκευαστούν υδρογέλες ομοιολυμερών (που αποτελούνται από ένα δίκτυο ίδιου μονομερούς), συμπολυμερών (που αποτελούνται από ένα δίκτυο διαφορετικών μονομερών) ή IPN υδρογελών (που αποτελούνται από περισσότερα δίκτυα που περιπλέκονται). Με κριτήριο τη διαμόρφωση των πολυμερών στην τελική δομή των υδρογελών, οι υδρογέλες μπορεί να είναι άμορφες, κρυσταλλικές ή ημικρυσταλλικές.

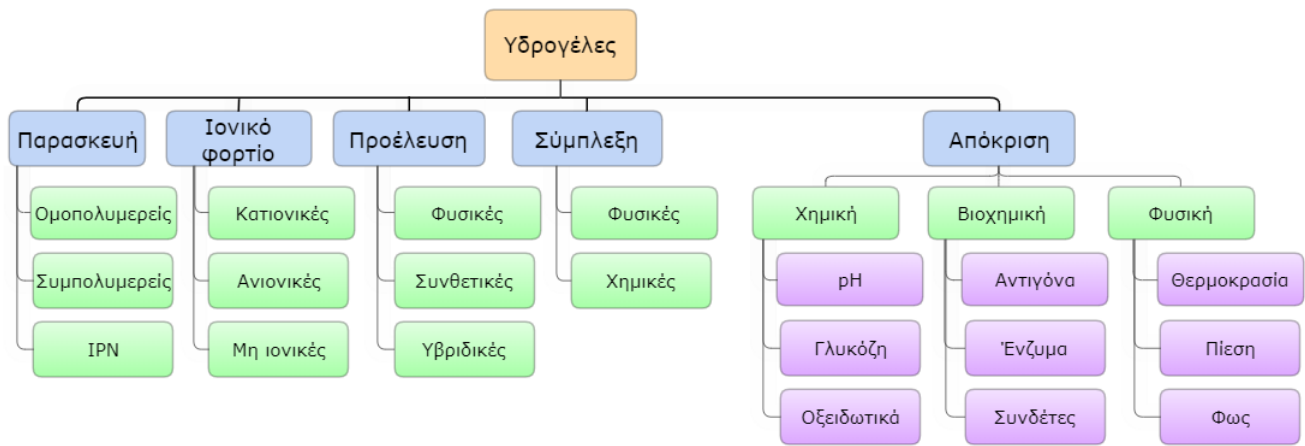
Με κριτήριο τον τρόπο διασύνδεσής τους μπορεί να είναι φυσικές ή χημικές. Οι χημικές υδρογέλες συνδέονται με ομοιοπολικούς σταυροδεσμούς και διαχωρίζονται σε 4 επιμέρους κατηγορίες ανάλογα το φορτίο τους: σε μη ιονικές, σε ανιονικές, σε κατιονικές και σε αμφολυτικές. Εκτός από τις μη ιονικές, οι υπόλοιπες υδρογέλες είναι ευαίσθητες στις μεταβολές του pH εξαιτίας των ιονικών ομάδων τους. Μέσω αυτών των ιονικών ομάδων μπορούν μάλιστα να σχηματίσουν σύμπλοκα με άλλα μόρια που περιέχουν αντίστοιχα φορτισμένες ομάδες γεγονός που μπορεί να εφαρμοστεί στη μεταφορά φαρμάκων. Όλα τα παραπάνω παρουσιάζονται στο σχήμα 4.2.

4.4 Εφαρμογές υδρογελών

Χωρίς περαιτέρω ανάλυση της ταξινόμησης των υδρογελών, θα προχωρήσουμε στην αναφορά ορισμένων εφαρμογών των υδρογελών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι υδρογέλες ως δομές μελετούνται και αξιοποιούνται σε ποικίλους τομείς. Παρακάτω θα αναλυθούν ορισμένες εφαρμογές στη βιοϊατρική ώστε να κατανοηθεί καλύτερα ο σκοπός παρασκευής τους στην παρούσα εργασία.

4.4.1 Μεταφορά φαρμάκων

Η συμβατική χορήγηση φαρμάκων περιλαμβάνει ορισμένα μειονεκτήματα όπως η συστηματική τοξικότητα και η επαναλαμβανόμενη δόσολογία. Οι υδρογέλες ως όχημα μεταφοράς φαρμάκων μπορούν να



Σχήμα 4.2: Κατηγοριοποίηση υδρογελών

ελαχιστοποιήσουν αυτά τα μειονεκτήματα αλλά και να βελτιστοποιήσουν τη βιοδραστικότητα φαρμακευτικών ουσιών. Ως οχήματα συχνά τους προσάπτεται ο προσδιορισμός "έξυπνα", διότι μπορούν να τροποποιηθούν και να προσαρμοστούν στον εκάστοτε στόχο που προορίζονται. Ενζυματικά, υδρολυτικά ή περιβαλλοντικά ερεθίσματα συχνά αρκούν για να ελέγξουν την απελευθέρωση του φαρμάκου στην επιθυμητή θέση. Ιδανικές παρουσιάζονται υδρογέλες που είναι ευαίσθητες σε μεταβολές pH, θερμοκρασία, ιονική δύναμη ή συγκέντρωση γλυκόζης διότι η αποδέσμευση γίνεται ελεγχόμενα και παρενέργειες σε περιοχές εκτός στόχου μετριάζονται. Οι υδρογέλες αυτές πλεονεκτούν στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο καρκίνος και ο διαβήτης οι οποίοι παρουσιάζουν τοπικές φυσιολογικές αλλαγές ανάλογα το στάθιο της ασθένειας [44].

4.4.2 Επιθέματα πληγών

4.4.2.1 Δομή του δέρματος

Το δέρμα θεωρείται το μεγαλύτερο όργανο στο σώμα και αποτελείται από τρία διακριτά στρώματα. Η επιδερμίδα συνιστά την εξωτερική στοιβάδα του δέρματος και απαρτίζεται κυρίως από νεκρά κύτταρα και κερατίνη. Η κερατίνη λειτουργεί ως φυσική ασπίδα προστατεύοντας το σώμα από περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως χαμηλές θερμοκρασίες, υπεριώδης ακτινοβολία, λοιμώξεις κ.α. Το αμέσως επόμενο στρώμα ονομάζεται χόριο και περιέχει αιμοφόρα αγγεία και νεύρα που τροφοδοτούν την εξωτερική στοιβάδα παρέχοντας στήριξη και προστασία. Η τρίτη και βαθύτερη στοιβάδα ονομάζεται λιπώδης ή υποδόριος ιστός και αποτελεί το πιο παχύ τμήμα του δέρματος. Περιέχει τα λιπώδη κύτταρα τα οποία σχηματίζουν ενεργειακά αποθέματα και επιτρέπουν τη θερμική ρύθμιση του σώματος. Τα κύτταρα στην επιφάνεια του δέρματος αντικαθίστανται συνεχώς με κύτταρα από χαμηλότερα στρώματα με τα πρώτα να απομακρύνονται από το σώμα [45].

4.4.2.2 Ταξινόμηση πληγών

Στην περίπτωση τραυματισμού, η προστασία της πληγής από παθογόνα συνιστά μια απαιτητική πρόκληση για την ανάκτηση τραυματισμένου δέρματος. Γενικά, οι πληγές ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, στις οξείες πληγές (acute wounds) και στις χρόνιες πληγές (chronic wounds). Οξεία είναι μια πληγή η οποία προκαλείται ξαφνικά και θεραπεύεται σε 1-12 εβδομάδες ανάλογα με τη φύση της πληγής. Οι χρόνιες πληγές προκαλούνται σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αιτίες όπως η ηλικία, η παχυσαρκία, η φλεβική ανεπάρκεια, ο διαβήτης κ.α. Οι χρόνιες πληγές δεν θεραπεύονται στην προβλεπόμενη περίοδο καθώς είναι πιο επιρρεπείς σε μολύνσεις και απαιτούν ειδικό χειρισμό [46] [47]. Μια οξεία πληγή μπορεί να μετατραπεί σε χρόνια όταν η πληγή αποτυγχάνει να θεραπευτεί μέσω των διαδοχικών φάσεων επούλωσης, ενδεχομένως από βακτήρια στο βιοϋμένιο (4.4.2.4), με αποτέλεσμα να παραμένει στη φλεγμονώδη φάση για παρατεταμένη περίοδο. Άλλος παράγοντας που μπορεί να κάνει μια οξεία πληγή χρόνια είναι η επανάληψη τραυματισμού του ιστού όπως φλεβικά έλκη ποδιών, κακή διατροφή, υποκείμενη νόσο, χρήση ακατάλληλου επίδεσμου τραύματος και βακτηριακές λοιμώξεις.

4.4.2.3 Διαδικασία επούλωσης πληγών

Η διαδικασία επούλωσης πληγών υλοποιείται σε πέντε στάδια: της αιμόστασης, της φλεγμονής, της μετανάστευσης, του πολλαπλασιασμού και της αναδιαμόρφωσης. Όταν το δέρμα τραυματίζεται, απευθείας λαμβάνει χώρα αιμόσταση και φλεγμονή. Το ινωδογόνο, συστατικό του συνδετικού ιστού του δέρματος, βοηθά στην πήξη των εκκριμάτων και του αίματος για να σταματήσει η αιμορρογία. Η φλεγμονώδης φάση εμφανίζεται ταυτόχρονα με τη φάση της αιμόστασης κατά την οποία το τραύμα καθαρίζεται από υπολείμματα και προστατεύεται από βακτηριακή μόλυνση μέσω της απελευθέρωσης πρωτεασών και οξυγόνου. Στη θέση του τραύματος απελευθερώνονται αυξητικοί παράγοντες από τα μακροφάγα καθώς και ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και κερατινοκύτταρα από κυτοκίνες για να επιδιορθώσουν τα κατεστραμμένα αιμοφόρα αγγεία. Στη φάση της μετανάστευσης υλοποιείται αντικατάσταση των νεκρών κυττάρων από τα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ στο στάδιο του πολλαπλασιασμού το τραύμα καλύπτεται πλήρως από επιθήλιο. Στην τελική φάση της αναδιαμόρφωσης, το τραύμα έχει πλέον καλυπτεί εκ νέου από ινοβλάστες και δεν υπάρχουν ενδείξεις πληγής. Η τελευταία φάση αναφέρεται επίσης ως φάση ωρίμανσης [48].

4.4.2.4 Χαρακτηριστικά ιδανικών επιθεμάτων

Σήμερα γνωρίζουμε τις συνθήκες που ευνοούν τη θεραπεία πληγών. Οι εν λόγω συνθήκες περιλαμβάνουν αρχικά ζεστό, καθαρό περιβάλλον με κατάλληλα ποσοστά υγρασίας. Πολλά τραύματα αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο ξηρότητας. Η υγρασία βοηθά τους αυξητικούς παράγοντες και διάφορα είδη κυττάρων όπως τα επιθηλιακά να μεταναστεύσουν στο τραύμα διευκολύνοντας τη συστολή των άκρων της πληγής. Χρειάζεται επίσης απομάκρυνση των υπολειμμάτων και απορρόφηση των περίσσειων εξιδρωμάτων. Αν η πληγή είναι μολυσμένη, χρειάζεται επίσης κατάλληλος αντιβακτηριαδικός παράγοντας. Άλλοι παράγοντες που ίσως χρειαστεί να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή κατάλληλου επιθέματος είναι ο σχηματισμός φράγματος για τα βακτήρια, η προσαρμογή στο σχήμα της πληγής, η πρόκληση ελάχιστου πόνου κατά τη διάρκεια της εφαρμογής και της αφαίρεσης, η ύπαρξη τοξικών ή ερεθιστικών εκχυλισμάτων, να μην απελευθερώνει σωματίδια ή μη βιοαποδομήσιμες ίνες στο τραύμα και να διατηρεί το τραύμα σε βέλτιστη θερμοκρασία και pH [;]. Επιπρόσθετα, τα βακτήρια σχηματίζουν μια πολυσακχαρική επίστρωση, ειδικά στις χρόνιες πληγές, που καλείται "βιουμένιο". Αυτή η επίστρωση δεν αναγνωρίζεται από τις άμυνες του ξενιστή και είναι αδιαπέραστη από τα περισσότερα συστηματικά και τοπικά αντιμικροβιακά. Γι' αυτόν τον λόγο η πρωταρχική παρέμβαση του καθαρισμού του τραύματος είναι απαραίτητη, διαταράσσοντας αυτό το φιλμ και επιτρέποντας τη διείσδυση των ευεργετικών κυττάρων-ξενιστών και των διαδραστικών υλικών από τους επιδέσμους [49].

4.4.2.5 Είδη επιθεμάτων

Στην αρχαιότητα για να θεραπεύσουν πληγές χρησιμοποιούσαν πολλά διαφορετικά υλικά από την καθημερινή ζωή. Το 1600 π.Χ. χρησιμοποιούσαν λωρίδες λινών υφασμάτων εμποτισμένες με λάδι ή γράσο, καλυμένες με γύψο για να αποφράξουν τις πληγές. Στη Μεσοποταμία περίπου το 2500 π.Χ. για τη θεραπεία τραυμάτων χρησιμοποίησαν πήλινες ταμπλέτες αφού πρώτα καθάριζαν τις πληγές με νερό ή γάλα και στη συνέχεια τις έντυναν με μέλη ή ρετσίνα. Το 460-370 π.Χ ο Ιπποκράτης στην αρχαία Ελλάδα αξιοποίησε κρασί ή ξύδι για τον καθαρισμό των πληγών. Ως επίδεσμο χρησιμοποιούσαν μαλλί βρασμένο σε νερό ή κρασί. Η άφιξη του σύγχρονου επιδέσμου ήταν τον 20ο αιώνα [50].

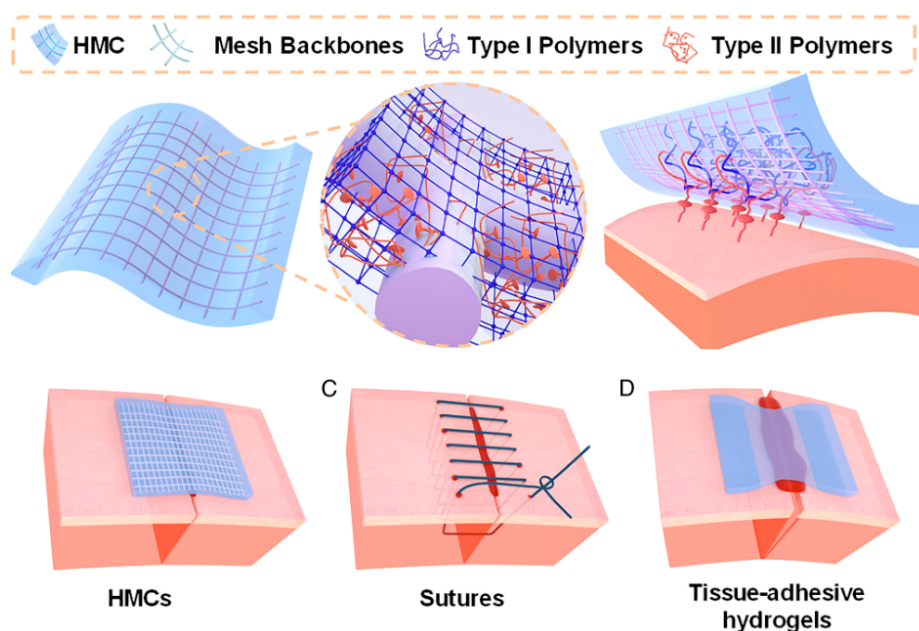
Στις μέρες μας υπάρχουν πολλά είδη επιθεμάτων πληγών. Τα συμβατικά επιθέματα έχουν ως κύριο στόχο να προστατεύσουν τις πληγές από επαφή με το περιβάλλον και να σταματήσουν την αιμορρογία. Επομένως η λειτουργία τους έχει παθητικό χαρακτήρα. Παράδειγμα συμβατικών επιθεμάτων συνιστούν οι γάζες ή παρόμοια σκευάσματα τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή απορροφητική ικανότητα. Παρόλο που η χρήση τους κυριαρχεί σε νοσοκομεία και ιατρικές εφαρμογές λόγω χαμηλού κόστους, υπάρχει πιθανότητα διαρροής εξιδρωμάτων⁴ από αυτούς τους επιδέσμους η οποία μπορεί να οδηγήσει σε βακτηριακές λοιμώξεις. Επιπλέον πολλές φορές η τοποθέτηση ή αφαίρεση αυτών των επιθεμάτων συχνά απαιτούν πίεση με κίνδυνο πρόκλησης αιμορρογίας ή/και πόνου. Σημειώνεται επίσης ότι παρουσιάζουν κακή διαπερατότητα ατμών

⁴εξίδρωμα είναι οποιοδήποτε υγρό απελευθερώνεται από το σώμα, το οποίο περιέχει μεγάλη συγκέντρωση πρωτεϊνών, κυττάρων ή στερεών συντριμμάτων

και καταστρέφουν το νεοσχηματισμένο επιθήλιο κατά την αφαίρεση. Λόγω των παραπάνω μειωνεκτημάτων, οι παραδοσιακοί επίδεσμοι τείνουν να αντικατασταθούν από σύγχρονα επιθέματα με προηγμένη σύνθεση [51].

Τα σύγχρονα επιθέματα συνήθως στηρίζονται σε συνθετικά πολυμερή και ταξινομούνται ως διαδραστικά ή βιοδραστικά. Τα διαδραστικά επιθέματα είναι ημι-διαπερατά ή αδιαπεράτα με τη μορφή μεμβρανών, αφρών, υδρογελών και υδροκολλοειδών και λειτουργούν ως φράγμα στη διείσδυση βακτηρίων. Εστιάζοντας στις υδρογέλες που είναι και ο πυρήνας της παρούσας μελέτης, αξίζει να σημειωθούν ορισμένα πλεονεκτήματα. Αρχικά, η ιδιότητα της ελαστικότητας των υδρογελών, τους προσδίδει ευκολία στην εφαρμογή σε πληγή και την αφαίρεση εφόσον η πληγή θεραπευτεί χωρίς καμία καταστροφή. Δεύτερον, παρέχουν καταπραϋντική και δροσιστική δράση καθώς δύνανται να μειώσουν τη θερμοκρασία των δερματικών πληγών, είναι μη ερεθιστικές, δεν αντιδρούν με βιολογικούς ιστούς και είναι διαπερατές στους μεταβολίτες. Γενικά, τα επιθέματα υδρογελών είναι κατάλληλα και για τα τέσσερα στάδια επούλωσης των πληγών και μπορούν να αξιοποιηθούν για μολυσμένα και βαριά τραύματα, για ξηρά χρόνια τραύματα, εγκαύματα, θεραπεία χρόνιων ελκών στα πόδια κ.α. [52]

Τέτοιου είδους επιθέματα παρασκευάζονται από βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή και βιολικά. Τα βιοπολυμερή μπορεί να είναι χιτοζάνη, αλγινικό, υαλουρονικό οξύ κ.α., ενώσεις δηλαδή μη-τοξικές, άμεσα διαθέσιμες, βιοδιαθέσιμες, βιοσυμβατές και μη ανοσολογικές.



Σχήμα 4.3: Σχηματική αναπαράσταση υδρογελών ως επιθέματα τραύματος

4.4.3 Επιθέματα από αλγινικό

Το αλγινικό, πολυσακχαρίτης που έχει αναφερθεί παραπάνω, χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή επιθεμάτων με σκοπό να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας τραυμάτων. Κυρίως το αλγινικό βελτιώνει την υδροφιλική φύση υλικών προορίζονται για επιθέματα με σκοπό να δημιουργήσουν την κατάλληλη υγρασία στο περιβάλλον του τραύματος, να αφαιρέσουν εκζέματα της πληγής και να αυξήσουν την ταχύτητα ανάπλασης του δέρματος της πληγής. Επιπλέον το αλγινικό μπορεί εύκολα να σχηματίσει σταυροδεσμούς με άλλα οργανικά ή ανόργανα υλικά ενισχύοντας τη θεραπευτική ιδιότητα των επιθεμάτων σε κλινικές εφαρμογές [53].

Έχουν παρασκευαστεί υδρογέλες από διάφορους συνδυασμούς πολυσακχαριτών όπως από αλγινικό νάτριο και γελatina [54], από αλγινικό και χιτοζάνη, γέλες που σχηματίστηκαν με εσωτερική γελοποίηση, εμφάνισαν αντιβακτηριδιακή δράση στο βακτήριο *Escherichia coli* και υψηλή πρόσληψη νερού [55]. Άλλες υδρογέλες έχουν παρασκευαστεί από αλγινικό και χιτοζάνη χρησιμοποιώντας ως συνδέτη λαυρινικό οξύ για ενίσχυση των μηχανικών τους ιδιοτήτων [56], από κυτταρίνη, χιτοζάνη και αλγινικό νάτριο [57], από

γελατίνη, αλγινικό νάτριο και υαλουρονικό οξύ τα οποία υποβάλλονται σε τεχνικής ξήρανσης με τη χρήση αιθυλενίου [58].

Με σκοπό την ενίσχυση της θεραπευτικής ιδιότητας των επιθεμάτων, σε πολλές υδρογέλες ενσωματώνονται βιοδραστικοί παράγοντες και νανοσωματίδια όπως για παράδειγμα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου [59], νανοσωματίδια αργύρου [60] ή ακόμα και μέλι (!). Τα μεταλλικά νανοσωματίδια έχουν βρεθεί να έχουν αντιβακτηριδιακές ιδιότητες ενώ η παρουσία μελιού διεγείρει την αγγειογένεση και την ανάπτυξη ινοβλαστών ως αποτέλεσμα της παροχής υπεροξειδίου του υδρογόνου [61].

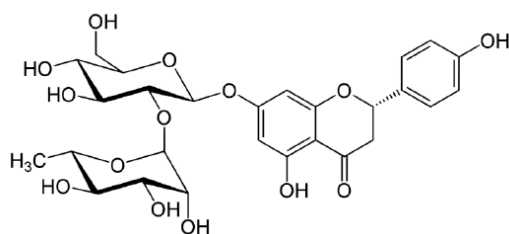
Για την αξιολόγηση των υδρογελών ως πιθανά επιθέματα σε πληγές, αξιολογείται πρωτίστως η ικανότητα διόγκωσής τους διότι αποκαλύπτει την προοπτική τους να διατηρούν την κατάλληλη υγρασία στο περιβάλλον της πληγής μειώνοντας τον κίνδυνο μόλυνσης από βακτήρια και επιταχύνοντας τη θεραπευτική διαδικασία [62].

Κεφάλαιο 5

Ναρινγίνη

5.1 Εισαγωγή

Η ναρινγίνη που είναι χημικώς γνωστή ως $C_{27}H_{32}O_{14}$ είναι ένας γλυκοζίτης φλαβονόνης που σχηματίζεται από τη φλαβονόνη ναρινγενίνη και το δισακχαρίτη νεοεπεριδόζη. Απαντάται σε πολλά είδη φυτών, κυρίως εσπεριδοειδών, στα οποία προσδίδει πικρή γεύση. Διαθέτει αξιοσημείωτες φαρμακευτικές και βιολογικές ιδιότητες και έχει υπάρξει ένα από τα κύρια συστατικά κινέζικων βοτανικών φαρμάκων εδώ και πολλά χρόνια. Εκτεταμένη βιβλιογραφική έρευνα έχει αποκαλύψει ότι η ναρινγίνη έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαποπρωτικές, αντιελκώδεις, αντιοστεοπορωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες [63].



Σχήμα 5.1: Χημική δομή ναρινγίνης

5.2 Εξαγωγή ναρινγίνης

Για την απομόνωση της ναρινγίνης από τα φρούτα απαιτείται πρώτα εκχύλιση, στη συνέχεια διαχωρισμός και τέλος καθαρισμός. Η περιεκτικότητα των καρπών σε ναρινγίνη εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως από το χρόνο και το μέρος που εξάγεται ο καρπός, από το μέρος του καρπού που χρησιμοποιείται, από το αν η φλούδα του καρπού περιέχει ναρινγίνη, και από το χρόνο ξήρανσης. Αντί του ήλιου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί φούρνος για την ξήρανση των καρπών ώστε αφενός να επιταχυνθεί η διαδικασία και αφετέρου να μειωθεί η έκθεση σε ατμοσφαιρικό αέρα μειώνοντας τον κίνδυνο μικροβιακής προσβολής και συνεπώς καταστροφής του καρπού.

Στοχεύοντας σε εξαγωγή ναρινγίνης μεγαλύτερης καθαρότητας, η εκχύλιση είναι πραγματοποιείται με παράλληλη χρήση μεθανόλης και υπερήχων. Στη συνέχεια ακολουθεί εκχύλιση με αναροή, επαναδιάλυση σε μεθανόλη και κρυστάλλωση με νερό [64].



Σχήμα 5.2: Ναρινγίνη

5.3 Ιδιότητες ναρινγίνης

Η ναρινγίνη ρυθμίζει τη αποστολή σημάτων ανάμεσα σε πολυάριθμες μοριακές οδούς κρίσιμες για τη φλεγμονή, τη μυοσκελετική ανάπτυξη και την κυτταρική διαφοροποίηση [64].

Η φλεγμονή είναι φυσιολογική απόκριση του ανθρώπινου οργανισμού σε επιβλαβή ερεθίσματα όπως παθογόνα, κατεστραμμένα κύτταρα ή ερεθιστικούς παράγοντες. Ωστόσο, αν δεν ελεγχθεί μπορεί να οδηγήσει σε χρόνιες αυτοάνοσες ασθένειες οι οποίες χρίζουν αντιφλεγμονοδών για τον περιορισμό της φλεγμονώδους απόκρισης. Φυτά πλούσια σε φλαβόνες χρησιμοποιούνται κατά παράδοση για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους. Πειράματα έχουν δείξει μάλιστα ότι συγκριτικά με ελεύθερη ναρινγίνη, επιτυγχάνονται καλύτερα αποτελέσματα όταν δημιουργούνται σύμπλοκα ναρινγίνης-χαλκού [65].

Η ναρινγίνη μπορεί επίσης να δράσει ως κατασταλτικός παράγοντας ή παράγοντας αποκλεισμού. Οι δύο αυτές λειτουργίες επιστρατεύονται στην προσπάθεια αντιμετώπισης του καρκίνου. Οι κατασταλτικοί παράγοντες αποτρέπουν το σχηματισμό καινούριων καρκινικών κυττάρων ενώ οι παράγοντες αποκλεισμού τις καρκινογόνες ενώσεις να φτάσουν σε κρίσιμες θέσεις έναρξης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ναρινγίνη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκαλεί απόπτωση στην πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων. Επεμβαίνει, μάλιστα, και στην κινητικότητα των κυττάρων μειώνοντας τη μετανάστευση και την εισβολή ορισμένων καρκινικών κυττάρων. Μελέτες διεξάγονται για πολλά είδη καρκίνου όπως δέρματος, στο στομάχι, στο θυρωειδή, στον προστάτη, στους πνεύμονες, στο συκώτι, στο λαιμό κ.α. [63]

Μέσα από πειράματα σε ποντίκια, η ναρινγίνη έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να μετριάσει και να επιδράσει θετικά σε πολλές παραμέτρους του οργανισμού. Αρχικά, μπορεί να επιδράσει σε πιθανή γενετική καταστροφή καθώς οι αντιοξειδωτικές της ιδιότητες μπορούν να προστατεύσουν ορισμένα κύτταρα από απώλεια H_2O_2 που παράγεται από θραύση και απώλεια χρωμοσωμάτων και καταστρέφει το DNA. Μάλιστα, η ναρινγίνη δεν μειώνει πιθανή βλάβη του DNA αποφεύγοντας μόνο την οξειδωτική βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 αλλά αυξάνοντας και την ικανότητα επιδιόρθωσής του [66]. Πρακτικά, ένας από τους τρόπους συμβολής της είναι ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών. Αυτή η ικανότητα μπορεί να μειώσει και το οξειδωτικό στρες. Έχει βρεθεί επίσης θετική επηρροή σε ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως αλτσχάιμερ, πάρκινσον και επιληψίες.

5.4 Περιορισμοί στη χρήση της ναρινγίνης

Η ναρινγίνη είναι σχεδόν αδιάλυτη στο νερό (1 mg/ml στους 40°). Όσον αφορά οργανικούς διαλύτες, η ναρινγίνη εμφανίζει μεγαλύτερη διαλυτότητα σε πολικούς διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη, αιθυλική ακετόνη) σε σχέση με μη πολικούς, πιθανώς εξαιτίας των υδροφιλικών κατάλοιπων σακχάρων στη δομή της. Η διαλυτότητα της ναρινγίνης σε διάφορους διαλύτες διευκολύνεται με αύξηση της θερμοκρασίας σε διάφορα εύρη. Σύμφωνα με τη βιοφαρμακευτική ταξινόμηση φαρμάκων, (BCS), η ναρινγίνη είναι φάρμακο τέταρτης τάξης, γεγονός που σημαίνει πως είναι φάρμακο με σημαντικούς περιορισμούς για χορήγηση δια του στόματος. Η έλλειψη διαλυτότητας και η χαμηλή διαπερατότητα έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα της ναρινγίνης εξαιτίας της υδρόφοβης δομής της. Επιπλέον παρουσιάζει αστάθεια σε όξινα pH και είναι ανθεκτική σε ενζυματικές επιθέσεις του στομαχίου και του λεπτού εντέρου. Επομένως, είναι βέβαιο ότι θα καταλήξει στο μεγάλο έντερο. Εκεί θα μεταβολιστεί στο τέλος σε φαινολικά οξέα με τη βοήθεια βακτηριακών ενζύμων [67].

Τέλος, έχει μετρηθεί ότι το μονομερές της ναρινγίνης απορροφάται σχεδόν ακαριαία κάνοντας μια κορυφή στη συγκέντρωση στα 15 λεπτά και μια επακόλουθη μετά από 3 ώρες έπειτα από χορήγηση δια του στόματος. Με άλλα λόγια, δε γίνεται σταδιακή αποδέσμευση.

5.5 Εγκλωβισμός ναρινγίνης σε νανοφορείς

Ο συνδυασμός των ευεργητικών ιδιοτήτων της ναρινγίνης και των παραπάνω περιορισμών δημιούργησε την επιταγή σχηματισμού νέων δομών οι οποίες θα μπορούσαν να αξιοποιήσουν τις ιδιότητες υπερνικώντας τους περιορισμούς. Μελέτες έχουν στραφεί σε νανοδομές είτε λιποσωμάτων, είτε μικυλλίων, είτε νανοσωματιδίων.

Παρόλο που τα λιποσώματα είναι από τα πιο διαδεδομένα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων για θεραπευτικούς σκοπούς χάρη στην ιδιότητά τους να ενσωματώνουν ουσίες υδρόφιλες, υδρόφοβες ή ακόμα και αμφίφιλες, πολύ λίγα συστήματα έχουν αποδειχθεί επιτυχημένα για τη μεταφορά ναρινγίνης. Αντίθετα, έχουν παρασκευαστεί επιτυχημένα συστήματα πολυμερικών μικυλίων φορτωμένα με ναρινγίνη όπως για

παράδειγμα ορισμένα που είχαν ως βάση το πλουρονικό F68(PF68)τα οποία παρουσίασαν έντονη αντικαρκινική δραστηριότητα [68]. Αναφορικά με τα νανοσωματίδια έχουν παρασκευαστεί επίσης αποτελεσματικά συστήματα όπως συστήματα ναρινγίνης-χιτοζάνης για αναγέννηση οστών με χρήση δισόξινου φωσφορικού άμυλου ως παράγοντα διασύνδεσης [69]. Έχουν αξιοποιηθεί επίσης γαλακτωματοποιητές όπως το TPGS οι οποίοι κατάφεραν να αυξήσουν τη διαλυτότητα των νανοσωματιδίων πριν ενωθούν με την χιτοζάνη. Άλλες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει για την ενθυλάκωση β-CD [70] ή PLGA [71].

Κινητική απελευθέρωσης

Αναπόσπαστο κομμάτι της μελέτης των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, των υδρογελών συμπεριλαμβανομένων, είναι η διήθησή τους σε ένα μέσο απελευθέρωσης αναπαριστώντας τις φυσιολογικές συνθήκες του οργανισμού σε όρους pH και θερμοκρασίας. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη λήψη δειγμάτων σε προκαθαρισμένα χρονικά διαστήματα και την επεξεργασία αυτών με σκοπό την ανάλυση συγκέντρωσης του φαρμάκου συναρτήσει του χρόνου. Κατά την ποσοτικοποίηση συνήθως σχεδιάζεται μια αντίστοιχη καμπύλη η οποία περιγράφει την ποσότητα ή το ποσοστό του φαρμάκου που απελευθερώνεται με την πάροδο του χρόνου.

Τέτοιου είδους καμπύλες παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την κινητική της απελευθέρωσης, την ποσότητα που απελευθερώνεται σε διάφορες φάσεις και ενδείξεις σχετικά με τους μηχανισμούς αποδέσμευσης. Θεωρητικά τα συστήματα των πολυμερών, φαρμάκων, παραγόντων αποδέσμευσης και κινητικής μπορούν να προσαρμοστούν σε απότομες, ελεγχόμενες, διφασικές, παλμικές ή σταθερές αποδεσμεύσεις με μηδενικής τάξης κινητική. Ωστόσο, η επιλογή του μηχανισμού αποδέσμευσης επηρεάζει σημαντικά το χαρακτηρισμό των συστημάτων υδρογελών-φαρμάκου. Οι παραπάνω παράμετροι απαιτείται να είναι πλήρως διασαφησμένες, ιδανικά προσαρμοσμένες και επικυρωμένες για την τελική εφαρμογή κάθε συστήματος. Για την επίτευξη αυτού, χρειάζονται περαιτέρω εργαλεία για την ανάλυση των καμπυλών, όπως μαθηματικά μοντέλα που μπορούν να εφαρμοστούν στα δεδομένα και να δώσουν προβλέψεις για τους μηχανισμούς αποδέσμευσης ή στατιστικές αναλύσεις που μπορούν να αναγνωρίσουν τις σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις πειραματικές και τις πραγματικές παραμέτρους. Σημαντικοί παράμετροι εκτός από το pH και τη θερμοκρασία που έχουν αναφερθεί, είναι η ανάδευση των συστημάτων, το είδος και η ποσότητα του μέσου που γίνεται η διήθηση [72].

Η αποδέσμευση φαρμάκου είναι πολυπαραγοντικό φαινόμενο και εξαρτάται από πολλά φαινόμενα όπως η διάχυση και η διόγκωση και δια τούτου απαιτείται η διερεύνηση του μηχανισμού της κινητικής αποδέσμευσης μέσω διάφορων καμπυλών που μπορούν να περιγράψουν διαφορετικές φάσεις. Οι πιο διαδεδομένες είναι η καμπύλη κινητικής μηδενικής τάξης που ανταποκρίνεται σε μια σταθερή αποδέσμευση, όπου απελευθερώνεται η ίδια ποσότητα φαρμάκου ανά μονάδα χρόνου, η καμπύλη κινητικής πρώτης τάξης όπου η αποδέσμευση εξαρτάται από τη συγκέντρωση φαρμάκου, όπου το ίδιο ποσοστό φαρμάκου απελευθερώνεται ανά μονάδα χρόνου, το μοντέλο Hixson-crowell που χρησιμοποιείται για να περιγράψει αποδέσμευση φαρμάκου από δομές που εμφανίζουν αλλαγές στην επιφάνεια και στη διάμετρό τους και το μοντέλο Rappas που είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σε συστήματα υδρογελών [73]. Το μοντέλο Korsmeyer-Perppas είναι ένα ημι-εμπειρικό μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του πρώτου 60% των δεδομένων απελευθέρωσης μιας δραστικής ένωσης. Η τιμή του εκθέτη διάχυσης ή απελευθέρωσης (n) του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Perppas χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού απελευθέρωσης.

Μαθηματικά οι παραπάνω εξισώσεις εκφράζονται ως εξής: Η εξίσωση κινητικής μηδενικής τάξης:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (6.1)$$

Η εξίσωση κινητικής πρώτης τάξης:

$$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (6.2)$$

Η εξίσωση κινητικής Peppas ή Korsmeyer-Peppas:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (6.3)$$

Η εξίσωση κινητικής Higuchi:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2} \quad (6.4)$$

Η εξίσωση κινητικής Hixon-Crowell:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = kt \quad (6.5)$$

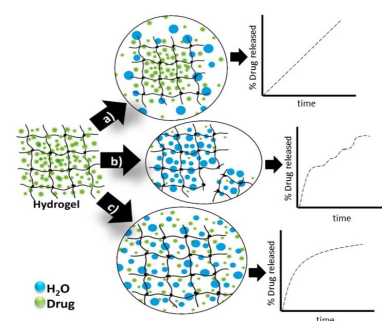
όπου M_t είναι η συνολική ποσότητα του φαρμάκου που απελευθερώνεται σε χρόνο t , M_∞ είναι η συνολική ποσότητα που απελευθερώνεται, n είναι ο εκθέτης διάχυσης, W_0 η αρχική ποσότητα φαρμάκου στο σύστημα, W_t η εναπομείνουσα ποσότητα φαρμάκου στο σύστημα σε χρόνο t και k η κινητική σταθερά. [74]

Μέσω της εξίσωσης 6.3 παίρνουμε πολλές πληροφορίες για τον τύπο του μηχανισμού αποδέσμευσης που πραγματοποιείται. Στην περίπτωση συστημάτων υδρογελών σε κυλινδρικό σχήμα, αν n , ο μηχανισμός απελευθέρωσης ακολουθεί μια σχεδόν φικιανή διάχυση ενώ αν $n = 0.45$ ακολουθεί φικιανή διάχυση. Αυτό σημαίνει ότι το φάρμακο μπορεί να διαχυθεί μέσα από το πλέγμα υδρογέλης επειδή είναι πολύ μικρότερο από το μέγεθος του πλέγματος. Εναλλακτικά, αν το φάρμακο έχει παρόμοιο μέγεθος με το μέγεθος του πλέγματος, η διάχυση είναι πιο αργή. Αν $n > 0.89$, τότε είναι περίπτωση κινητικής μηδενικής τάξης και η αποδέσμευση υλοποιείται λόγω της διόγκωσης του συστήματος. Αν $0.45 < n < 0.89$, ο μηχανισμός αποδέσμευσης είναι συνδυασμός διάχυσης και διόγκωσης. Στην περίπτωση αποδέσμευσης μέσω διόγκωσης, το μέγεθος του φαρμάκου είναι μεγαλύτερο από το μέγεθος του πλέγματος. Επομένως είναι εγκλωβισμένο στην υδρογέλη και μπορεί να αποδεσμευτεί μόνο με παραμόρφωση ή υποβάθμιση του πλέγματος [75].

Στον πίνακα 6.1 συγκεντρώνονται οι μηχανισμοί απελευθέρωσης και το αντίστοιχο εύρος του συντελεστή διάχυσης.

Μηχανισμός απελευθέρωσης	Γεωμετρία	Εκθέτης διάχυσης
Διάχυση Fick	Φίλμ	0.5
	Κύλινδρος	0.45
	Σφαίρα	0.43
Ανώμαλη μεταφορά	Φίλμ	$0.5 < n < 1$
	Κύλινδρος	$0.45 < n < 0.89$
	Σφαίρα	$0.43 < n < 0.85$
Case II-Διάχυση μη Fick	Φίλμ	1
	Κύλινδρος	0.89
	Σφαίρα	0.85
Super Case II	Φίλμ	$n > 1$
	Κύλινδρος	$n > 0.89$
	Σφαίρα	$n > 0.85$

Πίνακας 6.1: Μηχανισμοί απελευθέρωσης ανάλογα τη γεωμετρία και το συντελεστή διάχυσης



Σχήμα 6.1: Αποδέσμευση φαρμάκου σε υδρογέλες

Πειραματικός σχεδιασμός-Design of experiments(DoE)

Με τον όρο πειραματικό σχεδιασμό εννοούμε μια συστηματική, αποτελεσματική μέθοδο που δίνει τη δυνατότητα στους επιστήμονες να μελετούν τη σχέση ανάμεσα σε πολλαπλές μεταβλητές εισόδου, που ονομάζονται παράγοντες, και σε βασικές μεταβλητές εξόδου που ονομάζονται αποκρίσεις. Συνιστά μια δομημένη προσέγγιση συλλογής δεδομένων και εξαγωγής συμπερασμάτων.

Ο πειραματικός σχεδιασμός αξιοποιείται για να καθορίζει αν ένας παράγοντας ή ένα σύνολο παραγόντων έχει επίδραση στο αποτέλεσμα, να εξετάζει αν οι παράγοντες αλληλεπιδρούν, να εκφράζει τη συμπεριφορά της απόκρισης ως συνάρτηση των παραγόντων και να βελτιστοποιεί την απόκριση.

Ένα βασικό πλεονέκτημα του πειραματικού σχεδιασμού είναι ότι υπάρχει η δυνατότητα ταυτόχρονης μεταβολής όλων των παραγόντων και η σύνδεσή μεταξύ τους ώστε να δίνονται κατευθύνσεις προς το βέλτιστο αποτέλεσμα. Εναλλακτικά θα χρειαζόταν να εφαρμοστούν προσεγγίσεις που να μετέβαλαν έναν παράγοντα τη φορά (COST-Change One Separate factor at a Time), γεγονός χρονοβόρο, κοστοβόρο δεδομένων των περισσότερων δοκιμών και κατ' επέκταση πρώτων υλών που θα χρειαζόταν αλλά και επισφαλές διότι θα έπρεπε να υλοποιηθούν επίσης όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί ανάμεσα στα ζεύγη των 3 παραγόντων για να εξεταστεί η αλληλεπίδρασή τους και πως αυτή επηρεάζει το αποτέλεσμα. Συμπερασματικά, ο πειραματικός σχεδιασμός οδηγεί στο βέλτιστο αποτέλεσμα υλοποιώντας τα λιγότερο δυνατά πειράματα.

Από ιστορική σκοπιά, πολλές από τις στατιστικές προσεγγίσεις για το σχεδιασμό πειραμάτων προέρχονται από το έργο του Ronald Fischer ο οποίος εισήγαγε πρώτος τις βασικές αρχές του πειραματικού σχεδιασμού. Απέδειξε πως το να αφιερώνεται χρόνος στον προσεχτικό σχεδιασμό της εκτέλεσης ενός πειράματος πριν την υλοποίησή του, βοηθούσε στην αποφυγή συχνών σφαλμάτων στην ανάλυση. Οι βασικές αρχές/εργαλεία που αξιοποίησε ήταν ο αποκλεισμός παραγόντων ο οποίος περιόριζε την τυχαιότητα και επέτρεπε την υλοποίηση κύκλων δοκιμών με κάθε κύκλο να έχει διαφορετική ρύθμιση, η τυχαιοποίηση η οποία αναφερόταν στη σειρά υλοποίηση των πειραματικών δοκιμών και η αναπαραγωγή η οποία περιλάμβανε την επανάληψη όλων των πειραμάτων συμπεριλαμβανόμενης και της επανεγκατάστασης των οργάνων. Στις μέρες μας, οι παραπάνω έννοιες εκφράζονται μέσω μαθηματικών μοντέλων και στατιστικών προγραμμάτων [76] [77].

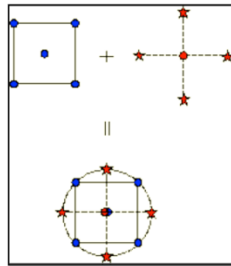
Από μαθηματική σκοπιά, αφότου καθοριστεί ο αριθμός των ανεξάρτητων μεταβλητών, μπορούν να εφαρμοστούν πολλά μοντέλα πειραματικού σχεδιασμού για να αποκτηθεί μια επιφάνεια απόκρισης (response surface). Αυτά τα μοντέλα περιγράφονται σύμφωνα με τα κύρια χαρακτηριστικά τους (αριθμός πειραμάτων, απόκλιση κλπ). Τα ολοκληρωμένα μοντέλα παραγόντων παράγουν πολλές πειραματικές δοκιμές και δια τούτου συνήθως προτιμούνται μοντέλα με λιγότερες. Τέτοιου είδους μοντέλα είναι τα κεντρικά σχεδιασμένα. Πρόκειται για μοντέλα ολοκληρωμένα¹, παραγοντικά² ή κλασματικά³. Τα σημεία στο κέντρο της πειραματικής περιοχής και τα *αστεράκια* εκτός της πειραματικής περιοχής καθιστούν εφικτή την εκτίμηση της

¹ ολοκληρωμένα σημαίνει ότι ο πειραματικός σχεδιασμός απαρτίζεται απ' όλους τους πιθανούς συνδυασμούς παραγόντων

² παραγοντικά σημαίνει ότι όλα τα επίπεδα των παραγόντων είναι κωδικοποιημένα

³ κλασματικά σημαίνει ότι ο πειραματικός σχεδιασμός απαρτίζεται αποκλειστικά από κάποιους πιθανούς συνδυασμούς

καμπύλοτητας της επιφάνειας απόκρισης. Υπάρχουν ποικίλα τέτοια μοντέλα από τα οποία στην παρούσα εργασία θα αναλυθεί μόνο το μοντέλο Box-Behnken το οποίο χρησιμοποιήθηκε.



Σχήμα 7.1: Αναπαραγωγή σημείων σε μοντέλο κεντρικά σχεδιασμένα

7.1 Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken

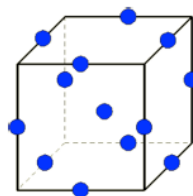
Ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken (BBD) δεν περιέχει μοντέλα ολοκληρωμένα ή κλασματικά. Τα σημεία σχεδιασμού ενός πειράματος k παραγόντων/διαστάσεων είναι τοποθετημένα στη μέση κάθε υποπεριοχής διάστασης $k-1$. Στην περίπτωση 3 μεταβλητών για παράδειγμα, τα σημεία είναι τοποθετημένα στο κέντρο και στη μέση των ακμών ενός κύβου.

Ο αριθμός πειραμάτων (N) που απαιτείται για τον BBD ορίζεται ως:

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (7.1)$$

όπου C_0 ο αριθμός των κεντρικών σημείων.

Ο BBD έχει το πλεονέκτημα να μην περιέχει συνδυασμούς για τους οποίους όλοι οι παράγοντες να έχουν ταυτόχρονα μέγιστες ή ελάχιστες τιμές με αποτέλεσμα να αποτρέπει την υλοποίηση πειραμάτων υπό ακραίες συνθήκες, πειράματα που πιθανότατα θα έδιναν μη επιθυμητά αποτελέσματα. Πρακτικά, δεν περιλαμβάνει σημεία που να αντιστοιχούν στις κορυφές του κύβου [78].



Σχήμα 7.2: Παράδειγμα μοντέλου Box-Behnken σε τρεις διαστάσεις

Μέρος ΙΙ
Πειραματικό μέρος

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη καινοτόμων υδρογελών με χρήση πράσινου διαλύτη για τον εγκλωβισμό και την τροποποίηση αποδέσμευσης του φυσικού φλαβονοειδούς ναρινγίνης. Πιο συγκεκριμένα, στόχος είναι η ανάπτυξη πράσινης διεργασίας παρασκευής υδρογελών αλγινικού με χρήση NADES ως παράγοντα διασταύρωσης, η βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής τους ως προς τις σημαντικότερες παραμέτρους μέσω του προγράμματος Box-Behnken και ο εγκλωβισμός του φυσικού φλαβονοειδούς ναρινγίνης.

Αναλυτικά, χρησιμοποιείται NADES, το οποίο αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτικό οξύ, το οποίο δύναται να διαλύσει τη ναρινγίνη. Σημειώνεται ότι η αρχική σύνθεση των υδρογελών στηρίζεται σε περιεκτικότητες και ποσότητες που ορίζει ο πειραματικός σχεδιασμός. Οι σχηματιζόμενες υδρογέλες αξιολογούνται ως προς την ικανότητα διόγκωσης (Swelling Ratio, SR %), την ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Retention Ratio, WRR %) και την απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης (Encapsulation Efficiency, EE %), τρεις παράμετροι που συνιστούν και τις επιλεγμένες αποκρίσεις του πειραματικού σχεδιασμού. Τα αποτελέσματα των αξιολογήσεων εκχωρούνται τελικά στον πειραματικό σχεδιασμό και αναλύονται ώστε να εξαχθεί η σύσταση -αναφορικά με την περιεκτικότητα του αλγινικού (% w/v), την περιεκτικότητα του NADES (% v/v) και το ποσοστό φόρτωσης της ναρινγίνης (%)- που μεγιστοποιεί ταυτόχρονα και τις 3 αποκρίσεις (SR, WRR, EE).

Οι υδρογέλες με τη βέλτιστη σύνθεση αξιολογούνται εκ νέου ως προς τις τρεις αποκρίσεις με σκοπό την επιβεβαίωση των αξιολογήσεων τους και την εξέταση της επαναληψιμότητάς τους. Επιπλέον, γίνεται μελέτη της κινητικής αποδέσμευσής τους σε δυο διαφορετικά περιβάλλοντα, ένα που αναπαριστά τις συνθήκες σε περίπτωση κατάποσης και ένα που αναπαριστά τις επιδερμικές συνθήκες. Τέλος, ακολουθεί δομικός χαρακτηρισμός των υδρογελών με τη βέλτιστη σύσταση.

Κεφάλαιο 9

Όργανα και συσκευές

Κατά την παρασκευή των υδρογελών χρησιμοποιήθηκαν ογκομετρικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, γυάλινα φιαλίδια, χωνιά και σπαθίδες. Όλα τα σκεύη πριν τη χρήση υποβάλλονταν σε πλύση και καθαρισμό αρχικά με νερό και σαπούνι, στη συνέχεια με απιονισμένο νερό και τέλος με υπερκάρθρο νερό.

Κατά την υλοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ποικίλα όργανα και συσκευές τα οποία συγκεντρώνονται στον πίνακα 9.1.

Όργανο-Συσκευή	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp	ZX4
Επωαστήρας (Incubator)	Gallenkamp	OTSHTD.EU1.C
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210g)	KERN	ADB 200-4
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2g)	Sartorius	M2P
Λουτρό υπερήχων	Branson	2210 Ultrasonic Bath
Λυοφιλιποιητής (freeze-dryer)	Frozen in time L.td	Lablyo Mini
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	Witeg	MSH-20A
Πεχάμετρο	Metrohm	744
Φασματόμετρο (ATR/FT-IR)	Jasco	FT-IR-4X+ATR PRO 4X
Φασματόμετρο (UV-VIS)	Jasco	V-770 UV-vis/NIR

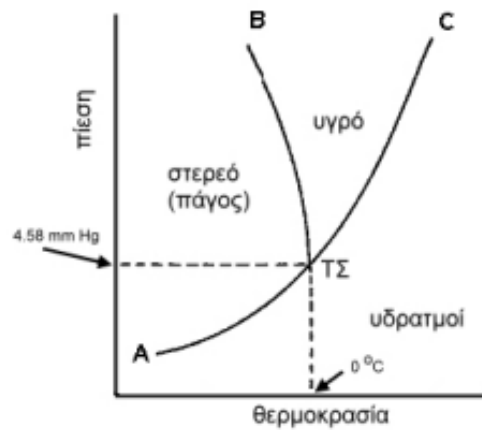
Πίνακας 9.1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν

9.1 Λυοφιλίωση - freeze drying

Η λυοφιλίωση, ή αλλιώς και κρυσθήρανση, είναι η διαδικασία αφαίρεσης του νερού από ένα προϊόν με διαδοχική ψύξη και εξάχνωση. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αξιοποιεί το τριπλό σημείο (T, P) μιας ουσίας (εικόνα 9.1). Αρχικά το προς ξήρανση προϊόν ψύχεται ώστε να μετατραπεί το νερό σε πάγο και στη συνέχεια τοποθετείται σε αεροστεγή χώρο στον οποίο μειώνεται η πίεση κάτω από το τριπλό σημείο του νερού. Στη χαμηλή αυτή πίεση, το νερό εξαχνώνεται, μετατρέπεται δηλαδή από υγρό σε αέριο χωρίς να περάσει από την υγρή του φάση. Οι σχηματιζόμενοι υδρατμοί απομακρύνονται με κατάλληλο συμπυκνωτή [79].

Ο ρυθμός ψύξης του προϊόντος επηρεάζει το μέγεθος των κρυστάλλων που σχηματίζονται. Πιο αναλυτικά, ταχεία ψύξη οδηγεί σε μικρούς κρυστάλλους ενώ αργή ψύξη οδηγεί σε μεγαλύτερους κρυστάλλους. Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό διότι το μέγεθος των κρυστάλλων πάγου επηρεάζει άμεσα τη δομή του τελικού προϊόντος, αν δηλαδή θα έχει μικρούς ή μεγάλους πόρους.

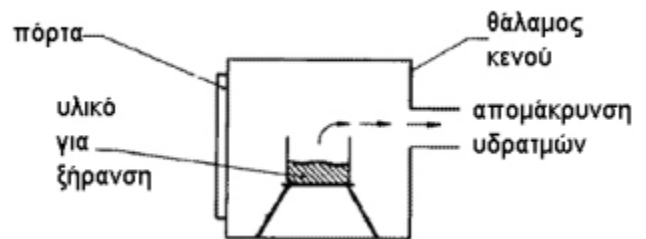
Η συγκεκριμένη τεχνική βρίσκει ευρεία εφαρμογή και στον τομέα των τροφίμων, διότι προστατεύει τα υλικά από την απώλεια σημαντικών συστατικών και από πιθανές χημικές αντιδράσεις που σχετίζονται με την εξάτμιση του υγρού νερού. Επιπλέον εξυπηρετεί και σκοπούς αποθήκευσης και μεταφοράς. Στην εικόνα 14.6 βλέπουμε πως είναι μια συσκευή λυοφιλίωσης εξωτερικά καθώς και ένα απλοποιημένο σχεδιάγραμμα της διάταξης.



Σχήμα 9.1: Τριπλό σημείο νερού



(α') Συσκευή λυοφιλίωσης



(β') Διάταξη λυοφιλίωσης

9.2 Επωαστήρας - incubator

Ο επωαστήρας είναι ένας θερμαινόμενος, μονωμένος κλίβανος που χρησιμοποιείται για τη ανάπτυξη και τη συντήρηση μικροβιολογικών και κυτταρικών καλλιεργειών. Έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζεται σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και σύστασης αερίων στο εσωτερικό του. Ορισμένοι διαθέτουν και προγράμματα που μπορούν να ρυθμιστούν σε συναρτήσει του χρόνου. Υπάρχουν πολλών ειδών επωαστήρες ανάλογως το σκοπό που προορίζονται. Υπάρχουν επωαστήρες παροχής οξυγόνου, ειδικοί για μελέτες εντόμων και φυτών, υπάρχουν ανακίνησης, φούρνοι υβριδισμού, βιοαντιδραστήρες κ.α.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε επωαστήρας ανακίνησης στον οποίο ρυθμιζόταν αφενός η θερμοκρασία στους 37°C και αφετέρου ο αριθμός στροφών σε μια απαλή ανακίνηση προς μίμηση των συνθηκών του ανθρώπινου σώματος. Παρακάτω φαίνεται η διάταξη του επωαστήρα του εργαστηρίου (εικόνα ;;).



(α') Συσκευή επωαστήρα



(β') Εσωτερικό συσκευής επωαστήρα

9.3 Φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού - UV-VIS

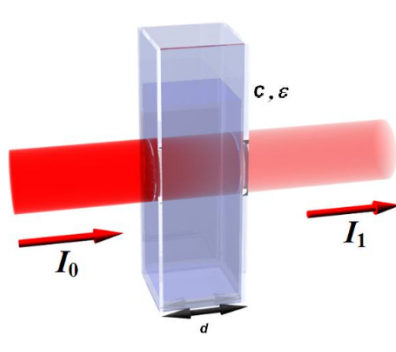
Η φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού στηρίζει τη λειτουργία της όπως κάθε άλλη φασματοσκοπική μέθοδος στην εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, την κατεύθυνσή της προς ένα δείγμα-στόχο και την καταγραφή του φάσματος απορρόφησής της. Η φασματοσκοπία UV-VIS εκπέμπει μονοχρωματική ακτινοβολία στην περιοχή του υπεριώδους (UV) 190-400 nm και στην περιοχή του ορατού (VIS) 400-780 nm. Τα φάσματά της δεν χαρακτηρίζουν συνολικά το προς εξέταση μόριο αλλά παρέχουν πληροφορίες για ορισμένες ομάδες του που απορροφούν ακτινοβολία.

Η λειτουργία του οργάνου περιγράφεται από το νόμο Lambert-Beer (εξ. 9.1).

$$A = -\log T = \alpha \cdot b(\text{cm}) \cdot c(\text{g/l}) \quad (9.1)$$

όπου A η απορρόφηση, T η διαπερατότητα, α η απορροφητικότητα, b το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας στο διάλυμα και c η συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται.

Επισημαίνεται ότι ο νόμος του Beer δεν ισχύει για πυκνά διαλύματα (C0.01M).



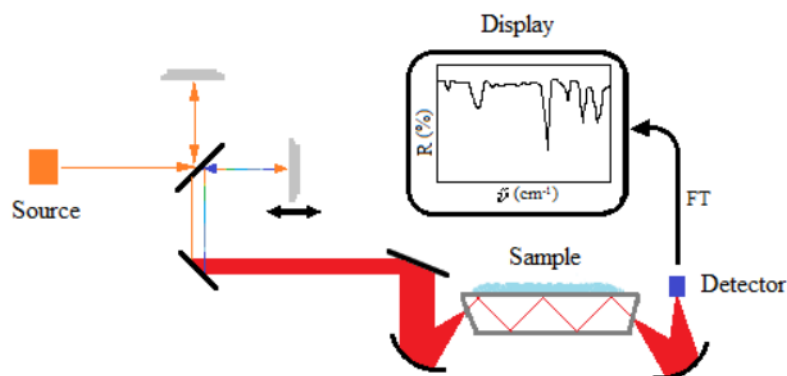
Σχήμα 9.4: Σχηματική αναπαράσταση του νόμου Lambert Beer

9.4 Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier - FTIR

Η φασματοσκοπία υπερύθρου συνιστά μια γρήγορη, οικονομική και μη καταστρεπτική φασματοσκοπική μέθοδο δομικού χαρακτηρισμού. Στην πραγματικότητα απαιτεί την ελάχιστη ποσότητα δείγματος στο λιγότερο χρονικό διάστημα. Χρησιμοποιείται στην οργανική σύνθεση, στην επιστήμη πολυμερών, στη φαρμακευτική και τροφική βιομηχανία για να ταυτοποιήσει τα συστατικά ενός μείγματος.

Η λειτουργία της ξεκινάει με την εκπομπή υπεριώδους ακτινοβολίας προς ένα δείγμα, ορισμένη ποσότητα ακτινοβολίας απορροφάται από το δείγμα και καταγράφεται η απορρόφηση της ακτινοβολίας που καταφέρει να διαπεράσει. Συγκεκριμένα, διαφορετικά μόρια και διαφορετικές δομές παράγουν διαφορετικά και μοναδικά φάσματα, γεγονός που επιτρέπει την ταυτοποίηση των διαφορετικών μορίων. Συχνά η μοναδικότητα των μοριακών φασμάτων παρομοιάζεται με τα δακτυλικά αποτυπώματα των ανθρώπων. Το όνομά της οφείλεται στο γεγονός πως το τελικό φάσμα απορρόφησης συναρτηθεί του μήκους κύματος που λαμβάνει ο χρήστης έχει προκύψει από την επεξεργασία του λαμβανόμενου σήματος μέσω μετασχηματισμού Fourier¹.

¹Ο μετασχηματισμός Fourier είναι ένα μαθηματικό εργαλείο που μετατρέπει το πεδίο του χρόνου σε πεδίο συχνοτήτων



Σχήμα 9.5: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης FTIR

9.5 Αντιδραστήρια

Κατά τις διαδικασίες παρασκευής και αξιολόγησης των υδρογελών χρησιμοποιήθηκαν ποικίλα υλικά τα οποία συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα. Να σημειωθεί ότι μόνο τα 4 πρώτα αποτελούν μέρος της σύστασης των υδρογελών. Τα υπόλοιπα, όπως θα περιγραφεί και παρακάτω, χρησιμοποιήθηκαν για ρύθμιση του pH και αναπαράσταση συνθηκών του ανθρώπινου οργανισμού.

Αντιδραστήριο	Χημικός Τύπος	Προμηθευτής
Αλγινικό νάτριο	-	Glentham Life Sciences
Γαλακτικό Οξύ(80%	$C_3H_6O_3$	labkem
Γλυκόζη	$C_27H_{12}O_6$	Sigma Aldrich
Ναρινγίνη	$C_6H_{32}O_{14}$	TCI
Υδροχλώριο	HCl	Alfa Aesar
Αιθανόλη	C_2H_6O	Sigma Aldrich
Φωσφορικό Κάλιο	K_2HPO_4	Penta
Διόξινο φωσφορικό κάλιο	$K_2H_2PO_4$	Penta

Πίνακας 9.2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

Πειραματικός σχεδιασμός της παρούσας μελέτης

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken μέσω του προγράμματος Design Expert (Version 12)¹. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο ο προσεχτικός πειραματικός σχεδιασμός είναι ωφέλιμος ως επιτακτικός για τη βελτιστοποίηση του αποτελέσματος.

Αρχικά επιλέχθηκε σχεδιασμός τριών επιπέδων (3x3). Ως ανεξάρτητες μεταβλητές εισήχθησαν στο πρόγραμμα η περιεκτικότητα του αλγινικού (% w/v), η περιεκτικότητα NADES (% v/v) και το ποσοστό φόρτωσης ναρινγίνης (DL %). Ως παράγοντες απόκρισης επιλέχθηκαν το ποσοστό διόγκωσης (%), το ποσοστό κατακράτησης νερού (%) και η απόδοση εγκλωβισμού (encapsulation efficiency-EE %). Τα συγκεντρωτικά δεδομένα που εισήχθησαν στο πρόγραμμα παρουσιάζονται στον πίνακα 10.1.

Παράγοντες	Αποκρίσεις
Περιεκτικότητα αλγινικού (% w/v)	Ποσοστό διόγκωσης (%) Swelling ratio-SR (%)
Περιεκτικότητα NADES (% v/v)	Ποσοστό κατακράτησης νερού (%) Water retention-WRR (%)
Ποσοστό φόρτωσης ναρινγίνης (DL %)	Απόδοση εγκλωβισμού (%) Encapsulation Efficiency-EE (%)

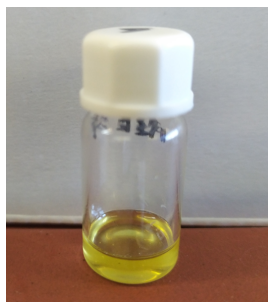
Πίνακας 10.1: Παράγοντες και αποκρίσεις που επιλέχθηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό

10.1 Προκαταρκτικά πειράματα

Η επιλογή των κατάλληλων ορίων πραγματοποιήθηκε με βάση βιβλιογραφικά και πειραματικά δεδομένα. Αναφορικά με τον εγκλωβισμό της ναρινγίνης, προηγούμενες μελέτες αξιοποιούν το διαλύτη της αιθανόλης για τη διάλυση της ναρινγίνης. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μην χρησιμοποιηθεί επιπρόσθετος διαλύτης ο οποίος απαιτείται να απομακρυνθεί, αλλά το NADES να καταφέρει να λειτουργήσει ταυτόχρονα και ως μέσο διάλυσης της ναρινγίνης αλλά και ως παράγοντας διασταύρωσης για το σχηματισμό υδρογέλης. Πρωταρχικός σκοπός είναι να διερευνηθεί η διαλυτότητα της ναρινγίνης στο NADES. Από τα πειράματα προέκυψε ότι η διαλυτότητα της ναρινγίνης στο NADES Glu:LA:W είναι 108 mg/ml. Η διάλυση υποβοηθήθηκε με ανάδευση vortex, χρήση υπερήχων και εμβάπτιση σε θερμαινόμενο λουτρό 10.1.

Στην παρασκευή υδρογελών από αλγινικό, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο για το σχηματισμό υδρογέλης απαιτείται αλγινικό συγκέντρωσης 2-4% και NADES ως παράγοντας διασταύρωσης συγκέντρωσης 3-5%, ενώ διερευνάται το ποσοστό φόρτωσης της ναρινγίνης σε ποσοστό σε 5-15%.

¹της εταιρείας StatEase



Σχήμα 10.1: Ναρινγίνη διαλυμένη σε NADES

Το επόμενο βήμα ήταν να εισαχθούν στο πρόγραμμα τα όρια των ανεξάρτητων μεταβλητών, να δοθεί, δηλαδή, μια μέγιστη και μια ελάχιστη τιμή για τον κάθε παράγοντα. Η επιλογή αυτών των ορίων προέκυψε από τα προκαταρκτικά πειράματα που προαναφέρθηκαν. Με την ολοκλήρωση αυτών των πειραμάτων τα όρια των παραγόντων διαμορφώθηκαν όπως φαίνεται στον πίνακα 10.2

Παράγοντας	Κατώτατο όριο	Ανώτατο όριο
Περιεκτικότητα αλγινικού (% w/v)	2	4
Περιεκτικότητα NADES (% v/v)	3	5
Ποσοστό φόρτωσης ναρινγίνης (%)	5	15

Πίνακας 10.2: Όρια των ανεξάρτητων μεταβλητών

Με την ολοκλήρωση της εισαγωγής των παραγόντων, των αποκρίσεων και των ορίων, το πρόγραμμα όρισε 15 πειράματα προς υλοποίηση με τα αποτελέσματα των οποίων θα μπορούσε να βελτιστοποιήσει τη διαδικασία παρασκευής των υδρογελών. Τα εν λόγω πειράματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Αριθμός πειράματος	Αλγινικό % w/v	NADES % v/v	DL %
1	2	4	15
2	3	4	10
3	3	3	5
4	3	5	5
5	2	5	10
6	3	3	15
7	4	5	10
8	2	3	10
9	3	4	10
10	3	4	10
11	4	4	15
12	4	4	5
13	4	3	10
14	2	4	5
15	3	5	15

Πίνακας 10.3: Πειράματα που όρισε ο πειραματικός σχεδιασμός

Μέθοδοι

11.1 Παρασκευή διαλύματος αλγινικού

Η διαδικασία παρασκευής διαλύματος αλγινικού ξεκινάει με την επιλογή της περιεκτικότητας που χρειάζεται να παρασκευαστεί. Στα προκαταρκτικά πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν περιεκτικότητες 2%, 3% και 4%. Υπολογίζεται αρχικά, λοιπόν, η ποσότητα αλγινικού που απαιτείται η οποία ζυγίζεται και διαλύεται στον αντίστοιχο όγκο υπερκάθαρου νερού σε μια ογκομετρική φιάλη. Στη συνέχεια προστίθεται στη φιάλη ένα μικρό μαγνητάκι και τοποθετείται για θέρμανση σε έναν μαγνητικό αναδευτήρα υπό θέρμανση. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 70° C. Για λόγους ακρίβειας και ασφάλειας, τοποθετείται στο λουτρό ένα θερμόμετρο για καλύτερο έλεγχο της θερμοκρασίας. Τέλος, το μείγμα αναδεύεται τακτικά με μια ράβδο λειτουργώντας επικουρικά στη διάλυση.



Σχήμα 11.1: Ογκομετρική φιάλη με αλγινικό και ογκομετρικός κύλινδρος με υπερκάθαρο νερό

11.2 Παρασκευή NADES

Το NADES που επιλέχτηκε να χρησιμοποιηθεί στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκε από τους μονοσακχαρίτες γλυκόζη (Glu) και γαλακτικό οξύ (LA) που αναλύονται παρακάτω. Πιο αναλυτικά, το γαλακτικό οξύ που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο περιέχει επίσης νερό (W). Επομένως η αναλογία της τελικής σύστασης είναι Glu:LA:W=1:5:6.2

Η διαδικασία παρασκευής είναι παρόμοια με εκείνη του διαλύματος αλγινικού. Αρχικά υλοποιούνται υπολογισμοί για τις ποσότητες των συστατικών που θα χρειαστούν. Αφού ζυγιστούν, μεταφέρονται μαζί με

ένα μαγνητάκι σε μία ογκομετρική φιάλη η οποία τοποθετείται σε έναν μαγνητικό αναδευτήρα υπό θέρμανση. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 70° C. Απαιτούνται περίπου 3-4 με ώρες για την πλήρη ομογενοποίηση του μείγματος.

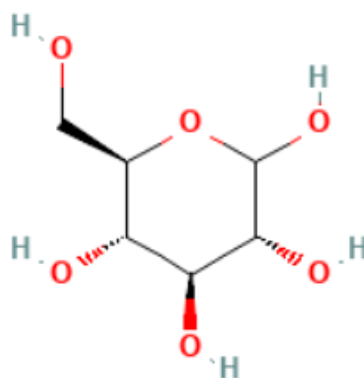


Σχήμα 11.2: Ογκομετρική φιάλη με γλυκόζη και γαλακτικό οξύ τοποθετημένη σε μαγνητικό αναδευτήρα υπό θέρμανση.

11.2.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη ($C_6H_{12}O_6$) (Glu) απαντάται και με το όνομα δεξτρόζη, είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μονοσακχαρίτες που συνθέτεται κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης και λειτουργεί ως "καύσιμο" και αποθήκη ενέργειας για τα κύτταρα. Το άμυλο και η κυτταρίνη είναι δύο υδατάνθρακες που απαρτίζονται από μονάδες γλυκόζης. Η συμβολή της είναι υψίστης σημασίας για τη ρύθμιση του μεταβολισμού σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου. [80]

Ως υλικό μπορεί να βρεθεί σε στερεή ή υγρή μορφή, έχει γλυκιά γεύση, είναι διάφανο και διαλυτό στο νερό.

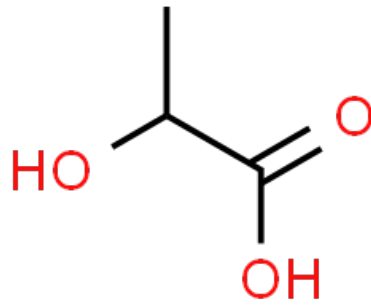


Σχήμα 11.3: Χημική δομή γλυκόζης

11.2.2 Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ (Lactic-LA) είναι μία οργανική χημική ένωση ευρέως διαδεδομένη στη φύση. Σε κανονικές συνθήκες περιβάλλοντος είναι λευκό στερεό ενώ δύναται να διαλυθεί τέλεια στο νερό. Παρουσιάζει ενυδατικές, αντιμικροβιακές και αναζωογονητικές δράσεις στο δέρμα. Παράγωγα του γαλακτικού οξέος όπως οι γαλακτικοί εστέρες χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω των υγροσκοπικών και γαλακτωματοποιητικών τους ιδιοτήτων.

Το γαλακτικό οξύ βρίσκεται ανάμεσα στα χημικά που παράγεται σε μεγαλύτερους όγκους από μικρόβια, με παγκόσμιο όγκο παραγωγής τους 370000 τόνους. Η ζύμωση με γαλακτικό οξύ είναι από τις παλαιότερες βιομηχανικές ζυμώσεις η οποία χρονολογείται πίσω στο 1880. Ιστορικά, η πρώτη χρήση του γαλακτικού οξέος ήταν στην τροφική βιομηχανία για οξίνιση τροφίμων και συντήρηση και έχει εγγυηθεί ως ασφαλές από την FDA¹. Το γαλακτικό οξύ στις μέρες μας χρησιμοποιείται στην βαφή δερμάτων, στα καλλυντικά, σε φαρμακευτικές εφαρμογές καθώς και σε άλλους τομείς. Την τελευταία δεκαετία, η παραγωγή του έχει αυξηθεί κατακόρυφα εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης πράσινων προϊόντων. [81]



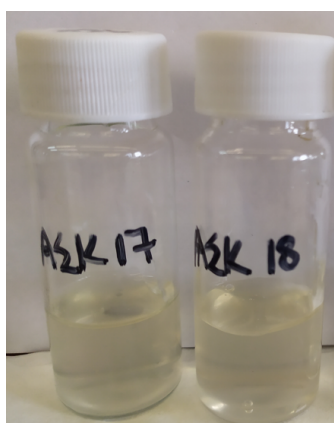
Σχήμα 11.4: Χημική δομή γαλακτικού οξέος

¹Food and Drug Administration(FDA)

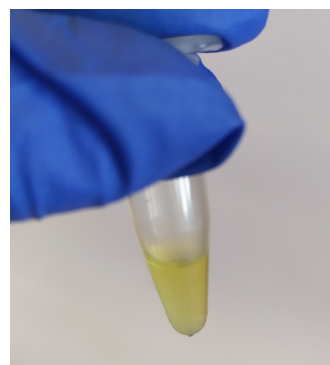
Χρήση πράσινου διαλύτη για την ανάπτυξη υδρογελών αλγινικού και τον εγκλωβισμό ναρινγίνης

12.1 Πράσινη σύνθεση υδρογελών αλγινικού για εγκλωβισμό ναρινγίνης

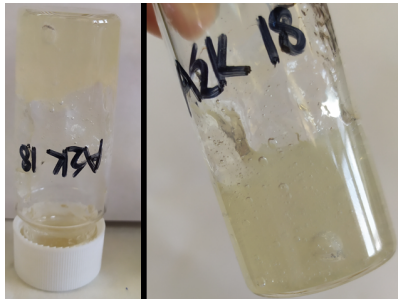
Για το σχηματισμό των υδρογελών, αρχικά υπολογίζονται από τον πίνακα 10.3 οι ποσότητες αλγινικού, NADES και ναρινγίνης που απαιτούνται για κάθε δείγμα που όρισε ο πειραματικός σχεδιασμός. Στη συνέχεια καθαρίζεται ο απαραίτητος αριθμός φιαλιδίων και σε καθένα ζυγίζεται η προβλεπόμενη ποσότητα αλγινικού. Σε ξεχωριστά φιαλίδια, ζυγίζεται η αντίστοιχη ποσότητα ναρινγίνης για κάθε δείγμα και προστίθεται με τη βοήθεια πιπέτας η αντίστοιχη ποσότητα NADES. Η διάλυση στα τελευταία φιαλίδια υποβοηθάται από διαδικασίες ανακίνησης μέσω vortex, αύξηση της θερμοκρασίας μέσω βήθησης σε θερμαινόμενο λουτρό και μέσω βήθησης σε λουτρό υπερήχων. Μόλις η ναρινγίνη και το NADES σχηματίσουν ένα ομοιογενές μείγμα, προσθέτονται στο αντίστοιχο φιαλίδιο αλγινικού και αναδεύονται με τη βοήθεια ράβδου. Τέλος οι υδρογέλες που έχουν σχηματιστεί υποβάλλονται σε διαδικασία λυοφιλίωσης. Στις παρακάτω φωτογραφίες φαίνεται ο σχηματισμός των υδρογελών στα διάφορα στάδια.



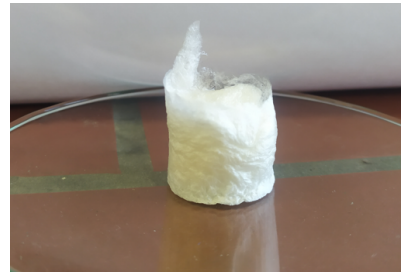
(α') Φιαλίδια με αλγινικό



(β') Ναρινγίνη διαλυμένη σε NADES



(α) Σχηματισμένη υδρογέλη



(β) Υδρογέλη μετά τη λυοφιλίωση

Σχήμα 12.2: Σχηματισμός υδρογελών αλγινικού, NADES και ναρινγίνης

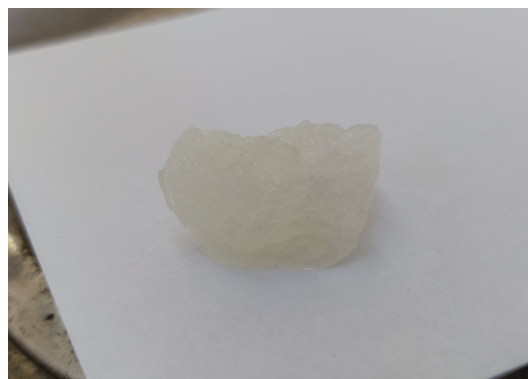
12.2 Χαρακτηρισμός υδρογελών

12.2.1 Προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης-Swelling Ratio

Από τις λυοφιλοποιημένες γέλες, αποσπάται ένα κομμάτι από το κάθε δείγμα και ζυγίζεται η μάζα του. Στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε φιαλίδιο που περιέχει 10 ml διαλύματος υδροχλωρικού οξέος HCl με ρυθμισμένο pH=1.2 προς αναπαράσταση της τιμής pH του στομαχιού. Για ακόμη πιο πιστή αναπαράσταση, το φιαλίδιο τοποθετείται σε επωαστήρα ρυθμισμένο στους 37° C. Στα χρονικά διαστήματα 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120 λεπτών και 2 και 3 ωρών, η εμβαπτισμένη υδρογέλη αφαιρείται από το φιαλίδιο με τη βοήθεια ενός μικρού σουρωτηριού για την απομάκρυνση του HCl, έρχεται σε επαφή με διηθητικό χαρτί για απομάκρυνση περίσσειας ποσότητας HCl και γίνεται μέτρηση της μάζας της. Στη συνέχεια, το κομμάτι υδρογέλης επιστρέφεται στο φιαλίδιο στο προστίθονται ξανά 10 ml HCl. Το ποσοστό διόγκωσης υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$SR(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \cdot 100 \quad (12.1)$$

όπου: W_s η μάζα της διογκωμένης υδρογέλης και W_d η μάζα της ξηρής υδρογέλης¹



Σχήμα 12.3: Διογκωμένη υδρογέλη που έχει αφαιρεθεί από διάλυμα HCl προς μέτρησης της μάζας της

12.2.2 Προσδιορισμός ικανότητας συγκράτησης νερού -Water Retention Ratio

Κατά την παραμονή στο διάλυμα HCl, η υδρογέλη διογκώνεται συνεχώς έως ότου φτάσει ένα σημείο ισοροπίας στο οποίο έχει τη μέγιστη διόγκωσή της, δεν μπορεί να απορροφήσει δηλαδή περισσότερο διάλυμα. Από το σημείο αυτό και έπειτα, η υδρογέλη αρχίζει πάλι να συρρικνώνεται. Το ποσοστό συγκράτησης νερού

¹πριν την εμβάπτιση

εκφράζεται ως το ποσοστό της ποσότητας νερού που συγκρατεί η γέλη συγκριτικά με το σημείο ισορροπίας. Μαθηματικά υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$WRR(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_e - W_d} \cdot 100 \quad (12.2)$$

όπου: W_s η μάζα της διογκωμένης υδρογέλης, W_d η μάζα της ξηρής υδρογέλης και W_e η μάζα της υδρογέλης στο σημείο ισορροπίας.

Πρακτικά οι δύο διαδικασίες που περιγράφησαν παραπάνω για τον προσδιορισμό ικανότητας διόγκωσης και κατακράτησης νερού, συνιστούν ενιαίο πείραμα με την έννοια ότι χρησιμοποιείται ακριβώς η ίδια διάταξη και το ίδιο δείγμα. Η διαφοροποίηση έγγειται στην ανάλυση των δεδομένων.

12.2.3 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού- encapsulation efficiency

Για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλωβισμού, αρχικά ζυγίζονται οι μάζες των λυοφιλοποιημένων υδρογελών. Δεύτερον, οι λυοφιλοποιημένες υδρογέλες τοποθετούνται σε φιαλίδια στα οποία προσθέτονται 20ml αιθανόλης και ένα μικρό μαγνητάκι ανάδευσης. Η επιλογή της αιθανόλης είναι επειδή δύναται να διαλύσει την ένωση της ναρινγίνης. Στη μελέτη απόδοσης εγκλωβισμού κύριος στόχος είναι η ποσοτικοποίηση της βιουσίας που μπόρεσε να αποθηκευτεί στη σχηματιζόμενη υδρογέλη. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια τοποθετούνται σε μάτι ανάδευσης και αφήνονται να περιστρέφονται για τουλάχιστον 3 μέρες ώστε να αποδεσμευτεί η ναρινγίνη.

Μετά τις 3 μέρες, μεταφέρεται το περιεχόμενο από τα φιαλίδια σε καθαρά φιαλίδια με τη χρήση σύριγγας και φίλτρου 0.45mm ώστε να διασφαλιστεί η υγρή φύση των δειγμάτων². Τα φιλτραρισμένα δείγματα αναλύονται με φασματοσκοπία UV-VIS και γίνεται καταγραφή της απορρόφησής τους σε ναρινγίνη η οποία απορροφά γύρω στα 280nm. Η ένταση απορρόφησης τις περισσότερες φορές ξεπερνάει τη μονάδα και απαιτείται αραίωση του δείγματος με περαιτέρω αιθανόλη (βλ ενότητα 9.3).

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων απαιτείται η εφαρμογή αφενός του νόμου αραίωσης (εξ.12.3) και αφετέρου της καμπύλη αναφοράς της ναρινγίνης σε αιθανόλη(εξ.12.4).

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (12.3)$$

$$y = 46.205x + 0.0624 \quad (12.4)$$

όπου y είναι η απορρόφηση της ναρινγίνης και x η συγκέντρωση (mg/ml). Η απόδοση εγκλωβισμού τελικά δίνεται από τη σχέση:

$$EE\% = \frac{\text{ναρινγίνη που εγκλωβίστηκε}}{\text{θεωρητική ναρινγίνη}} \cdot 100 \quad (12.5)$$

12.2.4 Μελέτη κινητικής απελευθέρωσης ναρινγίνης-Kinetics Release

Η μελέτη της κινητικής απελευθέρωσης πραγματοποιείται με βύθιση της υδρογέλης αρχικά σε 20ml ρυθμιστικού διαλύματος HCl, το οποίο έχει ρυθμισμένη τιμή pH 1.2 προς αναπαράσταση της τιμής pH του γαστρικού περιβάλλοντος, για 3 ώρες. Στα χρονικά διαστήματα των 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180 λεπτών λαμβάνεται δείγμα του 1ml με τη βοήθεια πιπέτας και γίνεται καταγραφή της απορρόφησης της ναρινγίνης μέσω φασματοσκοπίας UV-VIS. Το διάλυμα συμπληρώνεται με 1ml HCl για διατήρηση σταθερού όγκου.

Μετά το πέρας των 3 ωρών, η υδρογέλη μεταφέρεται σε μια δεύτερη σφαιρική φιάλη που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (K_2HPO_4 και $K_2H_2PO_4$) με ρυθμισμένο pH στο 6.8 προς αναπαράσταση της τιμής pH του λεπτού και του παχέος εντέρου. Αφήνεται στο διάλυμα για 5 ώρες και η δειγματοληψία υλοποιείται ανά μία ώρα με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως.

²απομάκρυνση τυχόν μικρών σωματιδίων

Επισημαίνεται ότι και τα δύο παραπάνω διαλύματα βρίσκονται στους 37° C προς μίμηση της θερμοκρασίας του σώματος. Οι διάρκειες παραμονής στα διαλύματα επιλέχθηκαν με βάση το χρόνο παραμονής μιας ουσίας στο κάθε όργανο (στομάχι και έντερο αντίστοιχα). Επίσης, το παραπάνω πείραμα υλοποιήθηκε ενιαία με μετάβαση της υδρογέλης σε διαφορετικά pH προς μίμηση της πορείας των ουσιών μετά από κατάποση.

Επιπρόσθετα, υλοποιήθηκε και ένα ξεχωριστό πείραμα όπου η υδρογέλη βυθίστηκε πάλι σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, αυτή τη φορά με ρυθμισμένο pH στο 7.8 προς αναπαράσταση του φυσιολογικού pH του σώματος και μελετήθηκε σε διάρκεια 7 ωρών με τη δειγματοληψία να γίνεται την πρώτη ώρα ανά δέκα λεπτά και στη συνέχεια ανά ώρα.

12.2.5 Μελέτη δομικού χαρακτηρισμού υδρογελών FTIR

Υλοποιήθηκε επιπρόσθετα δομικός χαρακτηρισμός των υδρογελών μέσω φασματοσκοπίας FTIR. Συγκεκριμένα, αναλύθηκε μία υδρογέλη που έχει προκύψει από τη βελτιστοποίηση της κατάλληλης περιεκτικότητας αλγινικού, NADES και ναρινγίνης και μία αντίστοιχη υδρογέλη απουσία ναρινγίνης. Πρακτικά, αποσπάστηκε και από τις δύο υδρογέλες ένα πολύ μικρό κομμάτι και χωρίς περαιτέρω επεξεργασία τοποθετήθηκε στην περιοχή δειγματοληψίας της διάταξης η οποία είναι κατασκευασμένη από διαμάντι. Στη συνέχεια υπέρυθρη ακτινοβολία διαπερνάει το δείγμα και μέρος της απορροφάται από τα χημικά του συστατικά. Το υπόλοιπο μέρος της ακτινοβολίας μεταδίδεται μέσω του διαμαντιού και το όργανο παράγει άμεσα φάσμα που έχει ήδη υποστεί μετασχηματισμό Fourier. Το φάσμα αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του υπέρυθρου φωτός από το δείγμα σε διαφορετικά μήκη κύματος μέσω των οποίων μπορούν να εντοπιστούν και να ποσοτικοποιηθούν τα χημικά συστατικά που υπάρχουν στο δείγμα.

Κεφάλαιο 13

Βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής των υδρογελών

Υλοποιώντας τις παραπάνω διαδικασίες χαρακτηρισμού για τα 15 δείγματα που όρισε ο πειραματικός σχεδιασμός προκύπτουν τα αποτελέσματα που συγκεντρώνονται στον πίνακα 13.1.

Αριθμός πειράματος	Αλγινικό % w/v	NADES % v/v	DL %	SR %	WR %	EE %
1	2	4	15	404	93	12
2	3	4	10	542	85	6
3	3	3	5	715	59	1
4	3	5	5	532	68	23
5	2	5	10	935	97	24
6	3	3	15	547	94	13
7	4	5	10	597	70	11
8	2	3	10	1846	60	11
9	3	4	10	807	86	11
10	3	4	10	922	91	9
11	4	4	15	683	74	14
12	4	4	5	720	92	10
13	4	3	10	922	91	9
14	2	4	5	1643	72	37
15	3	5	15	541	93	11

Πίνακας 13.1: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων

Υπάρχουν πολλά μοντέλα που μπορούν να εφαρμοστούν για να περιγράψουν τη σχέση ανάμεσα στις ανεξάρτητες μεταβλητές και τις αποκρίσεις. Το πρόγραμμα του πειραματικού σχεδιασμού παρέχει τη δυνατότητα στατιστικής μελέτης των αποτελεσμάτων και των διάφορων σφαλμάτων. Εφαρμόζοντας το μοντέλο που ανταποκρίνεται καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα μας (13.1), ως βέλτιστη σύσταση για την υδρογέλη προκύπτει εκείνη που περιέχει αλγινικό περιεκτικότητας 2%, NADES περιεκτικότητας 4.98% και DL 6.91%. Η σύσταση παρουσιάζεται συγκεντρωμένα στον πίνακα 13.2.

Αλγινικό % w/v	NADES % v/v	DL %
2.00	4.98	6.91

Πίνακας 13.2: Βέλτιστη σύσταση υδρογέλης

Με βάση τη βέλτιστη σύσταση που υπέδειξε ο πειραματικός σχεδιασμός παρασκευάστηκαν 9 ακόμη πανομοιότυπες υδρογέλες. Οι 6 αξιοποιήθηκαν για πειράματα επιβεβαίωσης και συγκεκριμένα οι 3 από αυτές χαρακτηρίστηκαν εκ νέου ως προς την ικανότητα διόγκωσης και την ικανότητα συγκράτησης νερού και οι άλλες 3 χαρακτηρίστηκαν εκ νέου ως προς την απόδοση εγκλωβισμού. Οι 3 τελευταίες υδρογέλες αξιοποιήθηκαν για μελέτη αποδέσμευσης και χαρακτηρισμού. Τέλος, παρασκευάστηκε μία υδρογέλη με ασβέστιο και χαρακτηρίστηκε ως προς την ικανότητα διόγκωσης και συγκράτησης νερού ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα.

13.1 Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων

Για την εξαγωγή της βέλτιστης σύστασης της υδρογέλης, απαιτείται στατιστική μελέτη. Μία από τις πρώτες αναλύσεις που υλοποιεί ο πειραματικός σχεδιασμός είναι το πώς επιδρά η κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή σε κάθε απόκριση χωριστά (πίνακας 10.1). Στόχος είναι να εξάγει το στατιστικό μοντέλο που μεγιστοποιεί όσο το δυνατόν περισσότερο και τις τρεις αποκρίσεις ταυτόχρονα.

Επισημαίνεται ότι στα στατιστικά μοντέλα που θα περιγραφούν, οι ανεξάρτητες μεταβλητές κωδικοποιούνται ως εξής:

Συμβολισμός	Ανεξάρτητη μεταβλητή
A	Περιεκτικότητα αλγινικού (% w/v)
B	Περιεκτικότητα NADES (% v/v)
C	Ποσοστό φόρτωσης ναρινγίνης (%)

Πίνακας 13.3: Αντιστοίχιση ανεξάρτητων μεταβλητών πειραματικού σχεδιασμού σε σύμβολα στατιστικών μοντέλων

13.1.1 Ποσοστό διόγκωσης

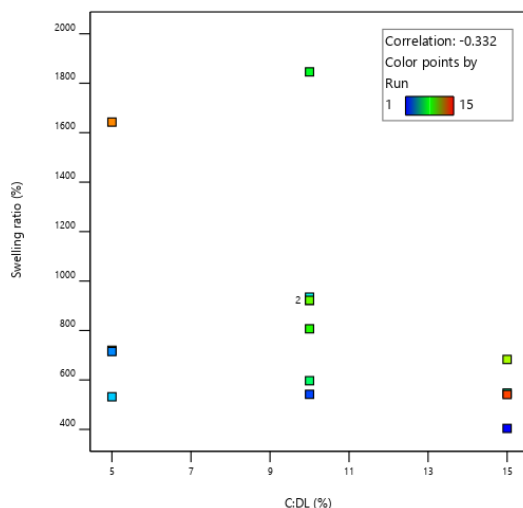
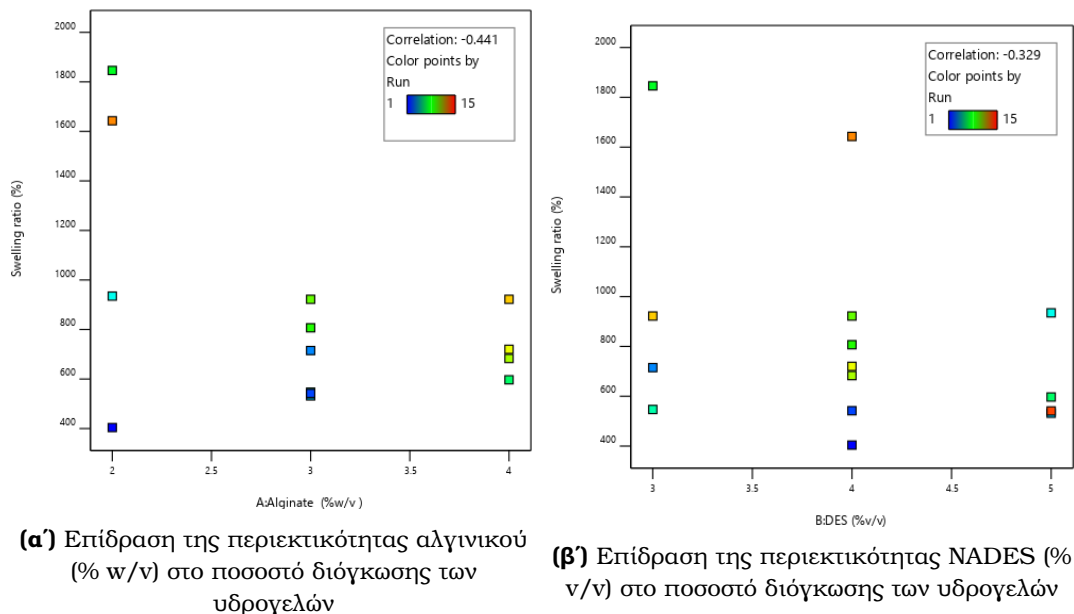
Για την 1η απόκριση που είναι το ποσοστό διόγκωσης των υδρογελών (%) προκύπτουν τα διαγράμματα 13.1.

Μελετώντας αυτά τα διαγράμματα, παρατηρείται ότι αναφορικά με την περιεκτικότητα του αλγινικού, εκείνη που δίνει τα υψηλότερα ποσοστά διόγκωσης είναι η περιεκτικότητα 2 % w/v. Συγκεκριμένα, επιτυγχάνονται σχεδόν διπλάσια ποσοστά συγκριτικά με τις υπόλοιπες περιεκτικότητες. Αναφορικά με την περιεκτικότητα του NADES παρατηρείται ότι και οι 3 περιεκτικότητες μπορούν να επιτύχουν ποσοστό διόγκωσης γύρω στο 950 %. Υπάρχουν δύο υδρογέλες με περιεκτικότητες 3 και 4 % v/v οι οποίες φτάνουν ποσοστό διόγκωσης 1850 και 1650 % αντίστοιχα, οι οποίες πιθανώς να είναι στο όριο του σφάλματος. Τέλος, αναφορικά με την περιεκτικότητα του ποσοστού φόρτωσης ναρινγίνης, παρατηρείται ότι με ένα μέσο ποσοστό φόρτωσης γύρω στο 10% επιτυγχάνονται μεγαλύτερα ποσοστά διόγκωσης. Τα αμέσως μεγαλύτερα επιτυγχάνονται με το ακόμα μικρότερο ποσοστό φόρτωσης 5%. Όταν η οι υδρογέλες φορτώνονται με 15% ναρινγίνη, παρατηρείται ότι δεν παρουσιάζουν μεγάλη διόγκωση.

Συμπερασματικά, μέσω ποιοτικής ανάλυσης το μεγαλύτερο ποσοστό διόγκωσης φαίνεται να επιτυγχάνεται με 2 % w/v αλγινικό, με μία μέση τιμή περιεκτικότητας NADES και με ποσοστό φόρτωσης ναρινγίνης γύρω στα 5-10%.

Για να εφαρμοστεί κατάλληλο στατιστικό μοντέλο, επιλέγεται απλοποιημένο κυβικό μοντέλο (reduced cubic model). Η εξίσωση του κυβικού μοντέλου περιέχει τους όρους A,B,C,AB,BC,AC, A^2 , B^2 , C^2 όπου τα A,B,C περιγράφονται στον πίνακα 13.3. Παρατηρείται ότι το μοντέλο έχει τη δυνατότητα να συνυπολογίζει και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων (AB,BC,AC) αλλά και την αυτοσυσχέτιση του κάθε παράγοντα (A^2 , B^2 , C^2). Από όλους τους όρους που αναφέρθηκαν, διατηρούνται ως σημαντικοί εκείνοι οι οποίοι έχουν p-value < 0.05.

Στην παρούσα ανάλυση οι όροι B^2 και BC έχουν υψηλές τιμές p-value και δια τούτου αφαιρούνται από την εξίσωση του κυβικού μοντέλου, απλοποιώντας το. Ο λόγος αφαίρεσης ασήμαντων όρων είναι η αύξηση επιτυχίας του μοντέλου. Οι ασήμαντοι όροι συνιστούν παράλληλα και ποιοτική παρατήρηση καθώς



Σχήμα 13.1: Επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο ποσοστό διόγκωσης των υδρογελών (%)

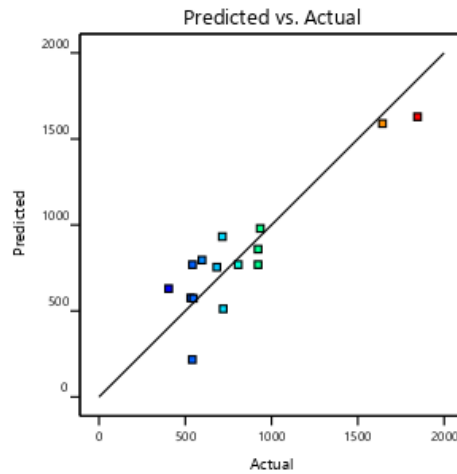
φανερώνουν ότι η αλληλεπίδραση περιεκτικότητας DES και ποσοστού φόρτωσης ναρινγίνης είναι ασήμαντη ως προς το ποσοστό διόγκωσης των υδρογελών. Αντίστοιχα σημαντικοί όροι για το μοντέλο είναι οι A και AC φανερώνοντας ότι η περιεκτικότητα αλγινικού καθώς και η αλληλεπίδραση του με το ποσοστό φόρτωσης παίζουν σημαντικό ρόλο στο ποσοστό διόγκωσης.

Το απλοποιημένο μοντέλο με εξίσωση:

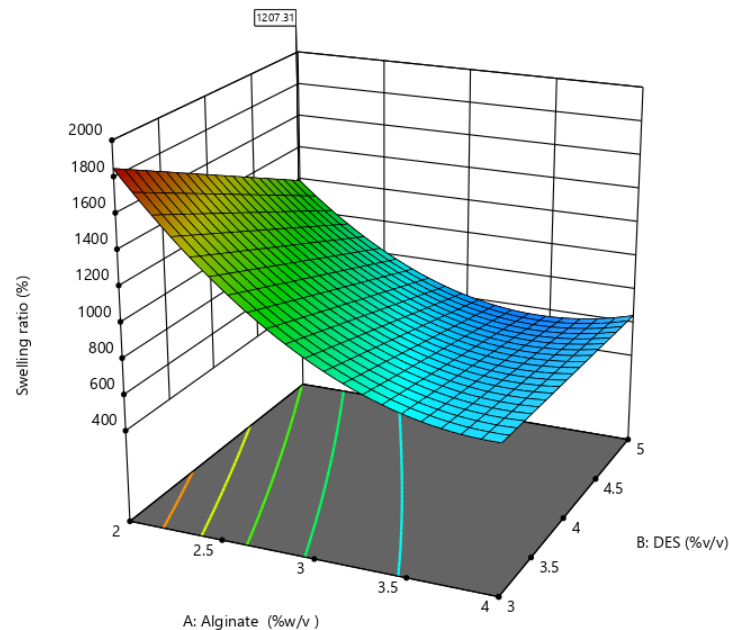
$$SR = 769.08 - 238.25A - 178.13B - 179.38C + 146.50AB + 300.50AC + 296.87A^2 - 194.38C^2$$

έχει τιμή F-value ίση με 4.49 που το καθιστά σημαντικό. Υπάρχει μόνο 3.28% πιθανότητα μια τέτοια τιμή F-value να οφείλεται σε θόρυβο. Η παράμετρος R^2 είναι ίση με 0.8179 ενώ ο λόγος σήματος προς το θόρυβο είναι 7.8361 το οποίο αποδεικνύει ότι υπάρχει ικανοποιητικό σήμα¹. Στο διάγραμμα 13.2α¹ παρουσιάζεται η εφαρμογή του στατιστικού μοντέλου στα πραγματικά δεδομένα ενώ στο διάγραμμα 13.2β¹ παρατηρείται η τρισδιάστατη απεικόνιση του ποσοστού διόγκωσης συναρτήσει της περιεκτικότητας αλγινικού και του NADES.

¹τιμές άνω του 4 θεωρούνται ικανοποιητικές



(α) Συσχέτιση πραγματικών τιμών και στατιστικού μοντέλου για το ποσοστό διόγκωσης



(β) Τρισδιάστατη απεικόνιση του ποσοστού διόγκωσης συναρτήσει της περιεκτικότητας αλγινικού και του NADES

13.1.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού

Για την 2η απόκριση που είναι το ποσοστό συγκράτησης νερού των υδρογελών (%) προκύπτουν τα διαγράμματα 13.3.

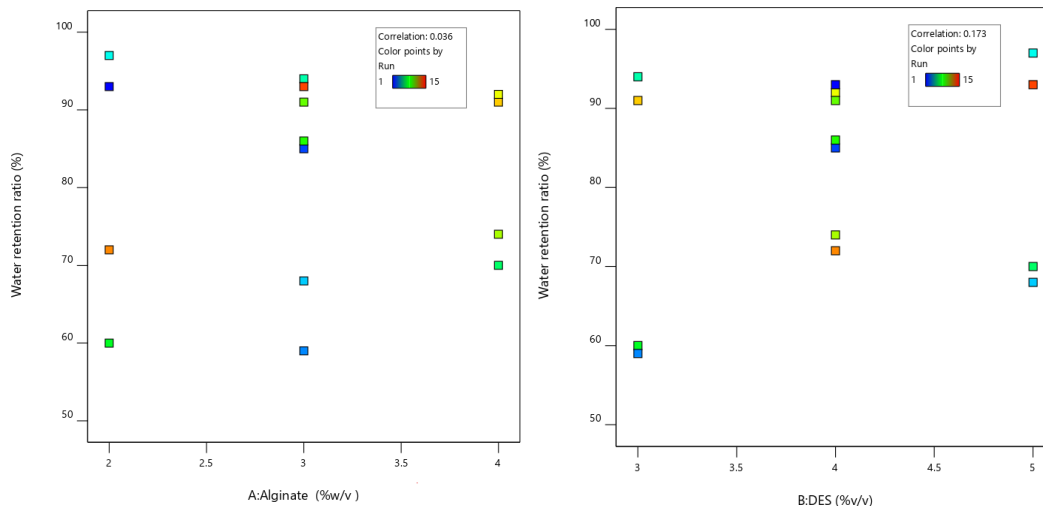
Παρατηρείται ότι για τη συγκράτηση νερού, οι διαφορετικές περιεκτικότητες αλγινικού δίνουν σχετικά παρόμοιες τιμές με την τιμή του 2% να έχει ένα ελαφρύ προβάδισμα. Το ίδιο ισχύει και για τις διαφορετικές περιεκτικότητες NADES. Όλες καταφέρνουν να πετύχουν περίπου 93% συγκράτηση νερού με την περιεκτικότητα του 5% να φτάνει το 97%. Αναφορικά με τα ποσοστά φόρτωσης ναρινγίνης, με όλα επιτυγχάνεται ποσοστό συγκράτησης > 90%, αλλά το μεγαλύτερο επιτυγχάνεται με ποσοστό φόρτωσης 10%.

Συμπερασματικά, μέσω ποιοτικής ανάλυσης το μεγαλύτερο ποσοστό συγκράτησης νερού φαίνεται να επιτυγχάνεται με 2 % w/v αλγινικό, με 5% v/v NADES και με ποσοστό φόρτωσης ναρινγίνης 10%.

Όπως και στην προηγούμενη μελέτη στατιστικής ανάλυσης, αφετηρία είναι το απλό κυβικό μοντέλο το οποίο απλοποιείται με την αφαίρεση των παραγόντων A^2 και C^2 ως μη σημαντικούς παράγοντες. Το απλοποιημένο μοντέλο με εξίσωση:

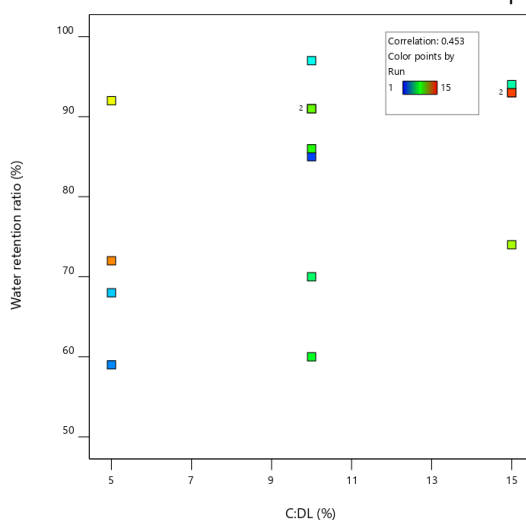
$$WRR = 84.71 + 0.6250A + 3.00B + 7.88C - 14.50AB - 9.75AC - 2.5BC - 5.71B^2$$

είναι σημαντικό έχοντας τιμή F-value ίση με 4.09 και 4.14% πιθανότητα να οφείλεται σε θόρυβο. Η



(α') Επίδραση της περιεκτικότητας αλγινικού (% w/v) στο ποσοστό συγκράτησης νερού των υδρογελών

(β') Επίδραση της περιεκτικότητας NADES (% w/v) στο ποσοστό συγκράτησης νερού των υδρογελών



(γ') Επίδραση του ποσοστού φόρτωσης ναρινγίνης (%) στο ποσοστό συγκράτησης νερού των υδρογελών

Σχήμα 13.3: Επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο ποσοστό συγκράτησης νερού των υδρογελών (%)

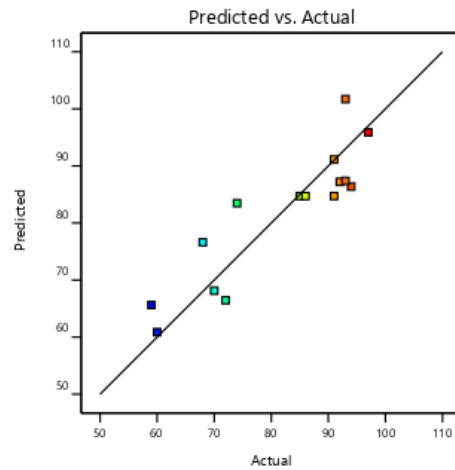
παράμετρος R^2 είναι ίση με 0.8036 ενώ ο λόγος σήματος προς το θόρυβο είναι 6.7963 το οποίο αποδεικνύει ότι υπάρχει ικανοποιητικό σήμα.

Στο διάγραμμα 13.4α' παρουσιάζεται η εφαρμογή του στατιστικού μοντέλου στα πραγματικά δεδομένα ενώ στο διάγραμμα 13.4β' παρατηρείται η τρισδιάστατη απεικόνιση του ποσοστού συγκράτησης νερού συναρτήσει της περιεκτικότητας αλγινικού και του NADES.

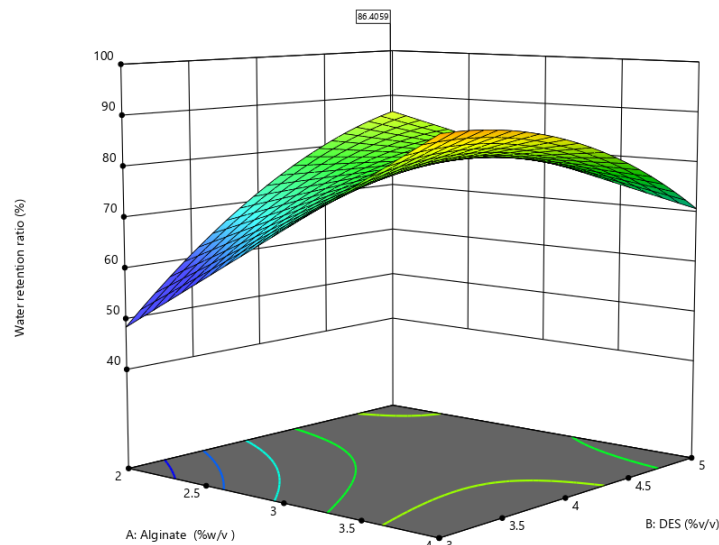
13.1.3 Ποσοστό φόρτωσης ναρινγίνης

Για την 3η απόκριση που είναι η απόδοση εγκλωβισμού των υδρογελών προκύπτουν τα διαγράμματα 13.5.

Παρατηρείται ότι η μέγιστη απόδοση επιτυγχάνεται με περιεκτικότητα αλγινικού 2% και φτάνει μέχρι 37%. Συγκρίνοντας τις περιεκτικότητες DES παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη απόδοση επιτυγχάνεται με περιεκτικότητα 4%, αλλά οι αμέσως μεγαλύτερες επιτυγχάνονται με περιεκτικότητα 5%. Αναφορικά με το ποσοστό φόρτωσης, παρατηρείται ότι οι μεγαλύτερες αποδόσεις επιτυγχάνονται με 5% και αμέσως μετά με 10%. Παρατηρείται δηλαδή ότι όσο λιγότερη ποσότητα βιοουσίας φορτώνεται στην υδρογέλη, τόσο καλύτερα εγκλωβίζεται ή και αντίστροφα, μεγάλες ποσότητες βιοουσίας δυσκολεύονται να εγκλωβιστούν



(α') Συσχέτιση πραγματικών τιμών και στατιστικού μοντέλου για το ποσοστό συγκράτησης νερού



(β') Τρισδιάστατη απεικόνιση του ποσοστού συγκράτησης νερού συναρτήσει της περιεκτικότητας αλγινικού και του NADES

στην υδρογέλη.

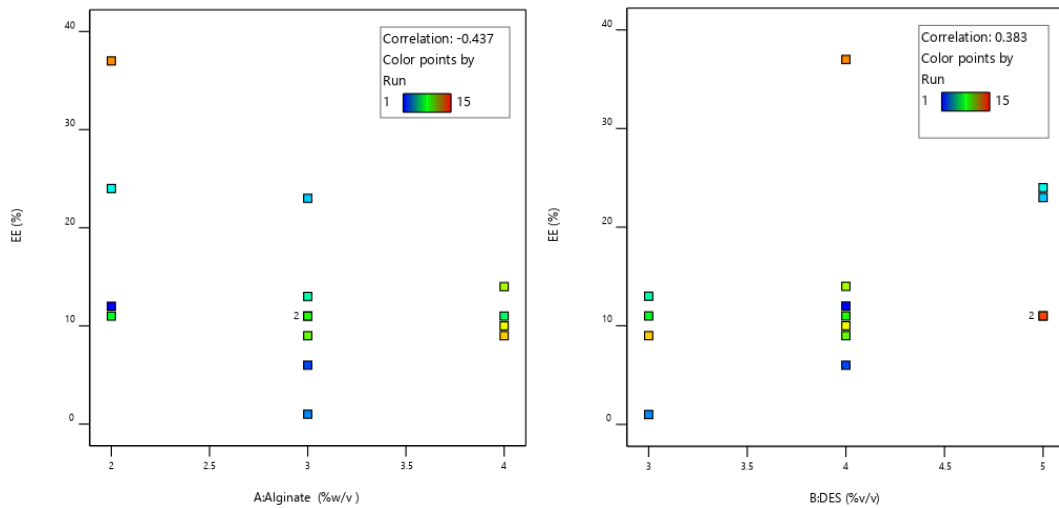
Συμπερασματικά, μέσω ποιοτικής ανάλυσης η μεγαλύτερη απόδοση εγκλωβισμού φαίνεται να επιτυγχάνεται με 2 % w/v αλγινικό, με 4% v/v NADES και με ποσοστό φόρτωσης ναρινγίνης 5%. Συγκρίνοντας με τις ποιοτικές μελέτες των δύο προηγούμενων αποκρίσεων, παρατηρείται ένα κοινό εύρος βέλτιστων αποτελεσμάτων.

Αναζητώντας το κατάλληλο στατιστικό μοντέλο και γι' αυτή την απόκριση, εξετάζονται οι όροι του απλού κυβικού μοντέλου. Αυτή τη φορά δεν υπάρχει μη σημαντικός όρος. Αυτό συνιστά πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση καθώς φανερώνει πως ο εγκλωβισμός της ναρινγίνης στις υδρογέλες επηρεάζεται άμεσα από όλους τους παράγοντες και τις αλληλεπιδράσεις τους, γεγονός που προσδίδει πολυπλοκότητα στην πειραματική του διαχείριση. Με άλλα λόγια, το σύστημα χαρακτηρίζεται από αστάθεια, μια μικρή μεταβολή σε κάποια από τις ανεξάρτητες μεταβλητές πιθανώς να επηρέαζε σημαντικά την απόδοση.

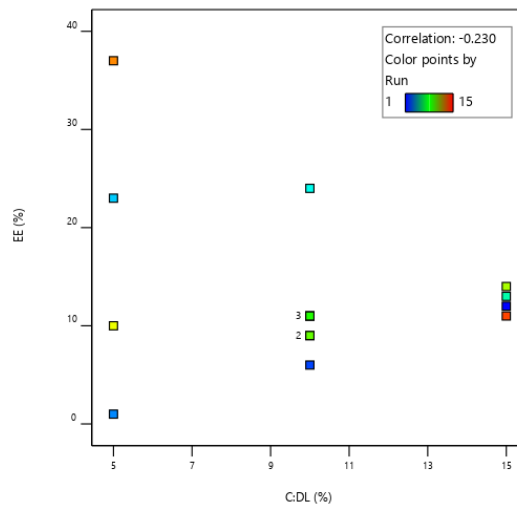
Η τιμή F-value αυτού του μοντέλου με εξίσωση:

$$EE = 8.67 - 5.00A + 4.37B - 2.63C - 2.75AB + 7.25AC - 6.00BC + 5.67A^2 - 0.5833B^2 + 3.92C^2$$

είναι ίση με 6.41 και πιθανότητα να οφείλεται σε θόρυβο 2.73%. Η παράμετρος R^2 είναι ίση με 0.9202 και ο λόγος σήματος προς το θόρυβο είναι 8.6582 που επιβεβαιώνει επαρκές σήμα. Στο διάγραμμα 13.6α' παρουσιάζεται η εφαρμογή του μοντέλου στα πραγματικά πειραματικά δεδομένα ενώ στο διάγραμμα 13.6β'



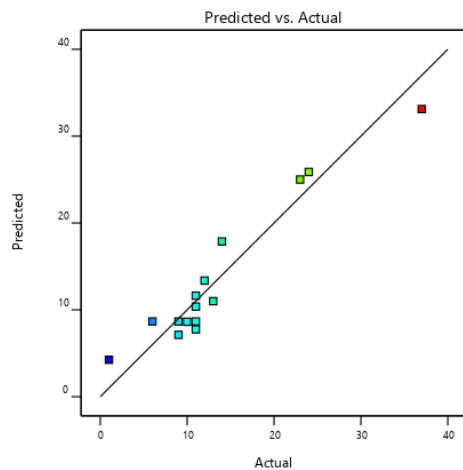
(α) Επίδραση της περιεκτικότητας αλγινικού (% w/v) στην απόδοση εγκλωβισμού των υδρογελών (β) Επίδραση της περιεκτικότητας NADES (% v/v) στην απόδοση εγκλωβισμού των υδρογελών



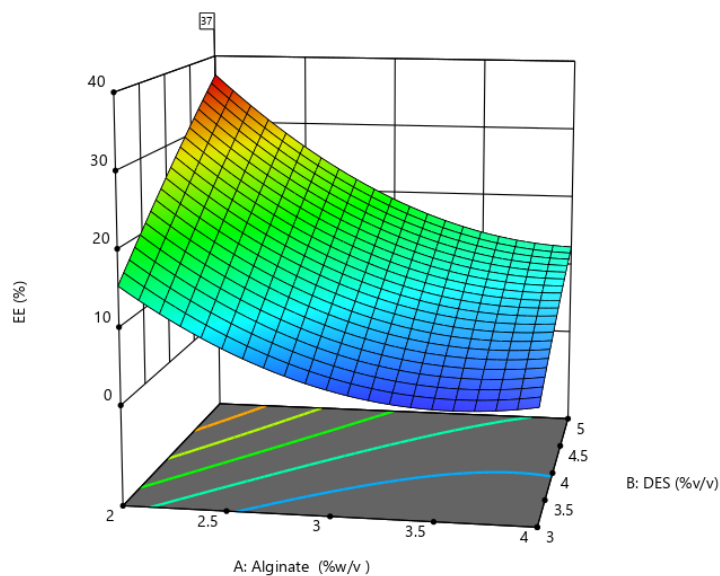
(γ) Επίδραση του ποσοστού φόρτωσης ναρινγίνης (%) στην απόδοση εγκλωβισμού των υδρογελών

Σχήμα 13.5: Επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στην απόδοση εγκλωβισμού των υδρογελών (%)

παρατηρείται η τρισδιάστατη απεικόνιση της απόδοσης εγκλωβισμού της ναρινγίνης συναρτήσει της περιεκτικότητας αλγινικού και του NADES.



(α) Εφαρμογή στατιστικού μοντέλου για την απόκριση απόδοσης εγκλωβισμού σε σύγκριση με πραγματικές τιμές



(β) Τρισδιάστατη απεικόνιση της απόδοσης εγκλωβισμού συναρτήσει της περιεκτικότητας αλγινικού και του NADES

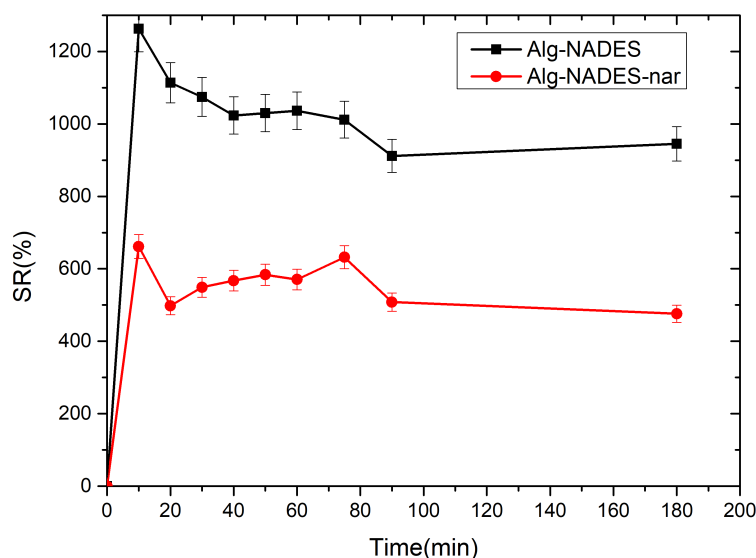
Μέρος ΙΙΙ

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Αξιολόγηση των αποκρίσεων της υδρογέλης με τη βέλτιστη σύσταση

14.1 Αποτελέσματα της μελέτης διόγκωσης και συγκράτησης νερού

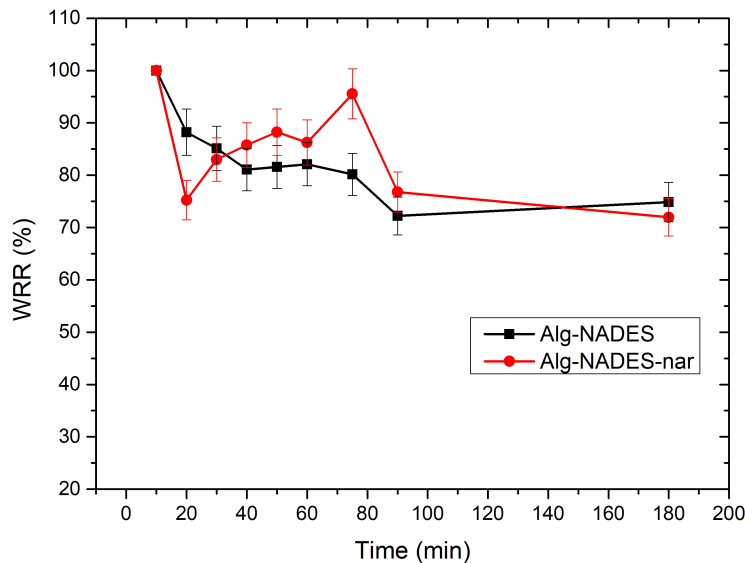
Με τα δεδομένα των πειραματικών διαδικασιών που περιγράφησαν στην ενότητα 13.1 και 13.3 σχεδιάζονται τα διάγραμμα ποσοστού διόγκωσης και συγκράτησης νερού της υδρογέλης με τη βέλτιστη σύσταση αλγινικού, NADES και ναρινγίνης τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω (Γράφημα 14.1 και 14.2 αντίστοιχα). Στα γραφήματα παρουσιάζονται επίσης τα αντίστοιχα ποσοστά για την ίδια σύσταση υδρογέλης χωρίς την προσθήκη ναρινγίνης.



Σχήμα 14.1: Ποσοστό διόγκωσης της υδρογέλης αλγινικού και NADES (μαύρο) απουσία βιουσίας, (κόκκινο) με εγκλωβισμένη ναρινγίνη σε συνάρτηση με το χρόνο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι δύο αυτές ιδιότητες των υδρογελών είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την αξιολόγησή τους ως πιθανά επιθέματα πληγών καθώς είναι απαραίτητο να μπορούν να απορροφούν εξιδρώματα και να διατηρούν την τοπική υγρασία των πληγών (ενότητα 4.4.2.4).

Στο διάγραμμα 14.1 παρατηρείται ότι η υδρογέλη με εγκλωβισμένη ναρινγίνη παρουσιάζει μικρότερα ποσοστά διόγκωσης σε σχέση με την υδρογέλη που δεν περιέχει ναρινγίνη. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς από τη στιγμή που η ναρινγίνη εγκλωβίζεται στην υδρογέλη καταλαμβάνει χώρο με αποτέλεσμα



Σχήμα 14.2: Ποσοστό συγκράτησης νερού της υδρογέλης αλγινικού και NADES (μαύρο) απουσία βιουσίας, (κόκκινο) με εγκλωβισμένη ναρινγίνη σε συνάρτηση με το χρόνο.

να υπάρχει λιγότερος χώρος για την αποθήκευση νερού. Γενικά η ικανότητα αποθήκευσης νερού σε μια υδρογέλη συνδέεται άμεσα με την πυκνότητα των σταυροδεσμών της. Αυτό σημαίνει ότι υδρογέλες με μεγάλο μέγεθος πόρων αναμένεται να έχουν μεγαλύτερη ικανότητα διόγκωσης και το αντίστροφο. Επομένως το πιο πιθανό είναι να σχηματίζεται πλέγμα με μικρότερους πόρους στις υδρογέλες που εγκλωβίζουν ναρινγίνη.

Δεύτερον, παρατηρείται ότι και οι δύο υδρογέλες φτάνουν το μέγιστο ποσοστό διόγκωσης στα πρώτα 10 λεπτά. Οι μέγιστες τιμές διόγκωσης που επιτυγχάνονται είναι συγκρίσιμες με άλλες μελέτες υδρογελών αλγινικού που μελετώνται για επιθέματα πληγών. Συγκεκριμένα η υδρογέλη που περιέχει εγκλωβισμένη ναρινγίνη παρουσιάζει μέγιστο ποσοστό διόγκωσης 632%, τιμή μεγαλύτερη συγκριτικά με άλλες υδρογέλες αλγινικού φορτωμένες με βιοδραστική ουσία. Για παράδειγμα η ομάδα του Arjan Ehterami από το ισλαμικό πανεπιστήμιο Azad παρασκεύασε υδρογέλες αλγινικού χρησιμοποιώντας ανθρακικό ασβέστιο και d-γλυκονο-δ-λακτόνη ενθυλακώνοντας βιταμίνη D3 με μέγιστο ποσοστό διόγκωσης 336% σε 240 λεπτά [82]. Παρόμοιες μελέτες έχουν πετύχει μέγιστα ποσοστά διόγκωσης μεταξύ 75-450% [83], [84].

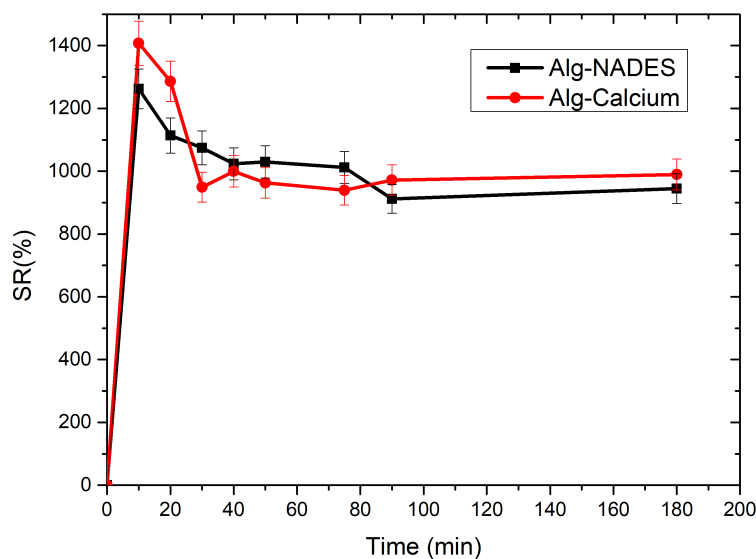
Τρίτον, το ποσοστό διόγκωσης αμέσως μετά τα 10 λεπτά, μειώνεται, παρουσιάζει μια σχετική σταθεροποίηση για την πρώτη ώρα, στη συνέχεια μειώνεται απότομα και τελικά αυξάνεται ξανά και σταθεροποιείται. Στην περίπτωση της υδρογέλης με εγκλωβισμένη ναρινγίνη η απότομη μείωση που λαμβάνει χώρα γύρω στα 80 λεπτά πιθανώς να οφείλεται στην αποδέσμευση φαρμάκου η οποία σταδιακά εξομαλύνεται με την πρόσληψη νερού και δια τούτου η καμπύλη ανεβαίνει ξανά.

Αναφορικά με τη συγκράτηση νερού, στο διάγραμμα 14.2 παρατηρείται ότι η υδρογέλη με εγκλωβισμένη ναρινγίνη χάνει περίπου το 25% του νερού της στα πρώτα 20 λεπτά ενώ στο πέρασμα 3 h έχει χάσει περίπου 35%. Παρατηρείται επίσης ότι ανεξάρτητα της ύπαρξης ναρινγίνης και οι δύο υδρογέλες τελικά έχασαν περίπου την ίδια ποσότητα νερού στο διάστημα 3 h καταφέροντας να διατηρήσουν περίπου το 65%.

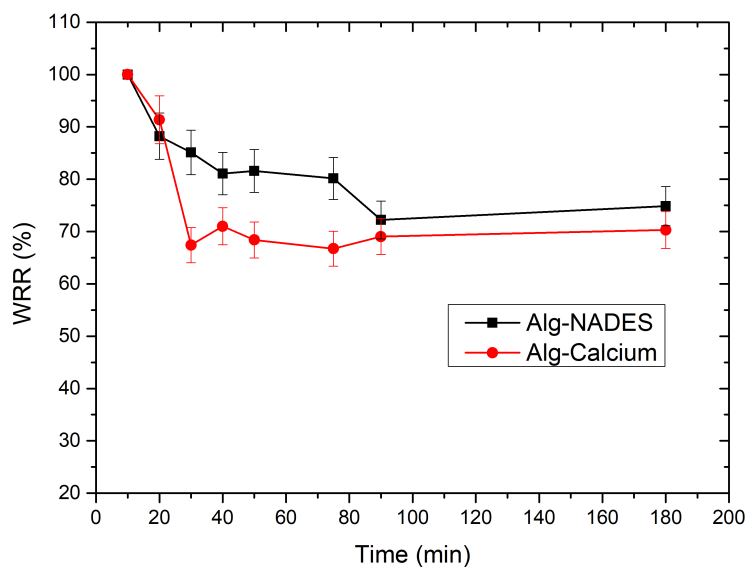
14.1.1 Σύγκριση υδρογέλης αλγινικού με NADES και με ασβέστιο

Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος παρασκευής υδρογελών αλγινικού είναι με τη χρήση ασβεστίου ως φορέα διασύνδεσης. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποσοστού διόγκωσης και συγκράτησης νερού για υδρογέλη που παρασκευάζεται με αλγινικό και ασβέστιο (κόκκινο) συγκριτικά με την αντίστοιχη που παρασκευάζεται με αλγινικό και NADES. Κύριος στόχος είναι να συγκριθεί η καινοτόμος πράσινη μέθοδος παρασκευής υδρογέλης-αλγινικού έναντι μιας συμβατικής μεθόδου.

Μελετώντας το γράφημα 14.3, παρατηρείται πως οι δύο υδρογέλες έχουν της ίδιας τάξης μεγέθους ικανότητα διόγκωσης με την υδρογέλη του NADES να έχει μέγιστη ικανότητα διόγκωσης γύρω στα 1250%



Σχήμα 14.3: Ποσοστό διόγκωσης της υδρογέλης αλγινικού και NADES (μαύρο), αλγινικού και ασβεστίου (κόκκινο) σε συνάρτηση με το χρόνο.



Σχήμα 14.4: Ποσοστό συγκράτησης νερού της υδρογέλης αλγινικού και NADES (μαύρο), αλγινικού και ασβεστίου (κόκκινο) σε συνάρτηση με το χρόνο.

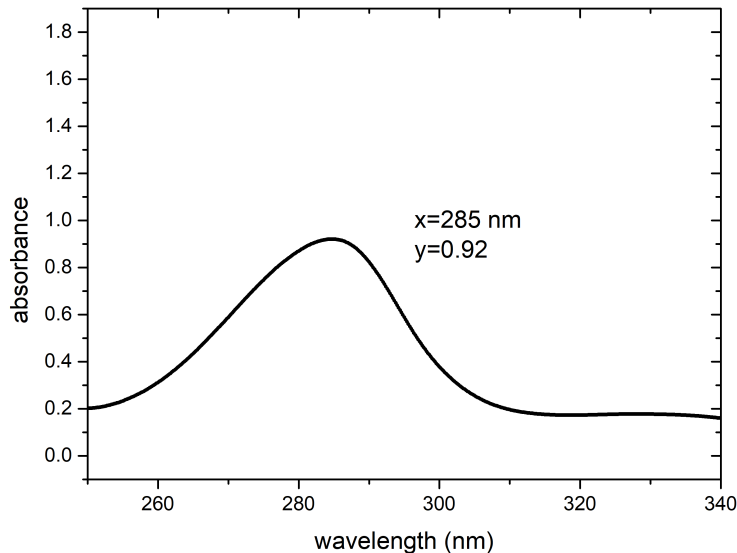
και την υδρογέλη του ασβεστίου περίπου στα 1400%. Παρατηρείται επίσης πως η υδρογέλη με το NADES αποδιογκώνεται πιο σταδιακά. Τελικά και οι δύο υδρογέλες καταλήγουν περίπου στην ίδια τιμή ποσοστού διόγκωσης στο πέρας 3 h.

Μελετώντας το γράφημα 14.4, παρατηρείται πως η υδρογέλη με NADES παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές συγκράτησης νερού από την υδρογέλη ασβεστίου. Η υδρογέλη ασβεστίου χάνει περίπου το 35% του νερού της στο πρώτο μισάωρο ενώ η υδρογέλη του NADES δεν καταφέρνει να χάσει αυτή την ποσότητα ούτε σε διάρκεια 3 h. Αντίθετα χάνει την πρώτη ώρα περίπου 20% του νερού της και σε τρεις ώρες χάνει λιγότερο από 30%.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα χρήσης του NADES ως φορέα διασύνδεσης για σύμπλεξη υδρογελών.

14.2 Αποτελέσματα μελέτης απόδοσης εγκλωβισμού

Σημαντική πληροφορία αποτελεί επίσης να επιβεβαιωθεί ότι η σχηματιζόμενη υδρογέλη δύναται πράγματι να εγκλωβίσει την ποσότητα ναρινγίνης που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεσή της. Με τις πειραματικές διαδικασίες που αναφέρθηκαν στην ενότητα 13.5 παίρνουμε τα παρακάτω αποτελέσματα για την απορρόφηση της ναρινγίνης.



Σχήμα 14.5: Διάγραμμα απορρόφησης ναρινγίνης από δείγμα βέλτιστης υδρογέλης που έχει αφεθεί προς διάλυση για 3 μέρες.

Παρατηρείται από το διάγραμμα ότι η μέγιστη απορρόφηση της ναρινγίνης (γύρω στα 285 nm) είναι $0.91998 \approx 0.92$. Επισημαίνεται επίσης ότι το δείγμα χρειάστηκε να αραιωθεί για να επιτευχθεί απορρόφηση μικρότερη της μονάδας.

Εφαρμόζοντας διαδοχικά τις εξισώσεις για την καμπύλη απορρόφησης της ναρινγίνης και το νόμο αραίωσης, εξισώσεις 12.4 και 12.3 αντίστοιχα, υπολογίζεται η συνολική μάζα της ναρινγίνης στο φιαλίδιο αφότου η υδρογέλη είχε διαλυθεί. Συγκρίνοντας με τη μάζα της ναρινγίνης που προστέθηκε αρχικά στην παρασκευή, υπολογίζεται η απόδοση εγκλωβισμού να είναι $EE\% = 28.35\%$.

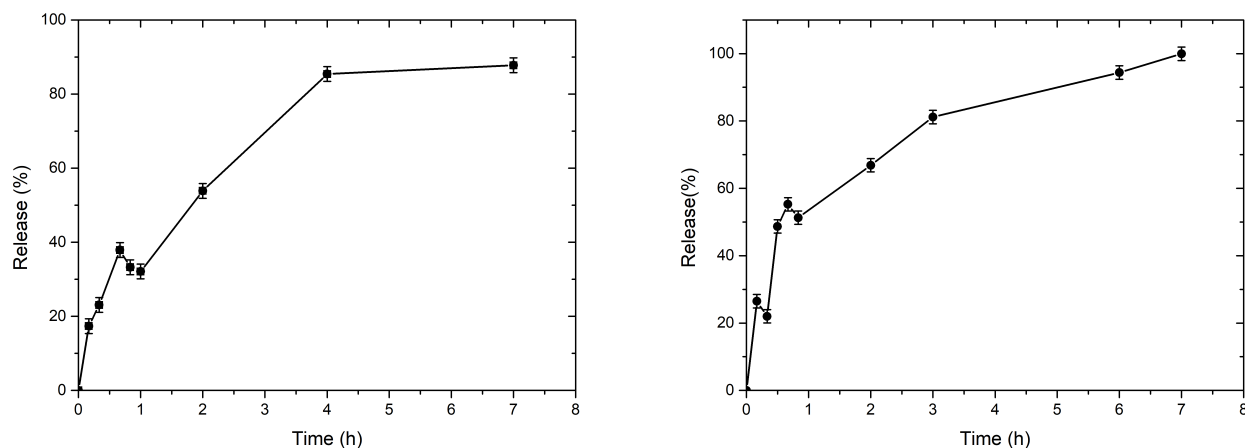
Η τιμή αυτή είναι συγκρίσιμη με άλλες βιβλιογραφικές τιμές για υδρογέλες αλγινικού που επιχειρούν να εγκλωβίσουν βιοδραστική ουσία [85], [86]. Η ομάδα της Samira Najafi-Soulari, για παράδειγμα, παρασκεύασε υδρογέλες αλγινικού-ασβεστίου στις οποίες ενθυλάκωσε αντιοξειδωτική ουσία από βάλαμο λεμονιού με ποσοστό εγκλωβισμού 39.5% [87].

14.3 Αποτελέσματα μελέτης κινητικής αποδέσμευσης ναρινγίνης

Αναλύοντας τα δεδομένα των πειραματικών διαδικασιών που περιγράφησαν στην ενότητα ;; προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα για το ποσοστό αποδέσμευσης της ναρινγίνης συναρτήσει του χρόνου (h).

Από το διάγραμμα 14.6α', παρατηρείται ότι στις πρώτες 3 ώρες έχει αποδεσμευτεί περίπου το 70% της ναρινγίνης σε όξινο pH. Την πρώτη ώρα παραμονής της υδρογέλης σε $pH=6.8$, η αποδέσμευση φτάνει περίπου το 85% όπου και αρχίζει να σταθεροποιείται. Με το πέρας των 8 ωρών έχει αποδεσμευθεί περίπου το 87% της ναρινγίνης.

Από το διάγραμμα 14.6β', παρατηρείται ότι σε $pH=7.4$, στο διάστημα 7 ωρών έχει επιτευχθεί ποσοστό αποδέσμευσης περίπου 99.8%. Φαίνεται η αποδέσμευση να μη σταθεροποιείται σε κανένα σημείο της καμπύλης, αλλά συνεχώς να αυξάνεται.



(α') pH = 1.2 για τις πρώτες 3 ώρες και pH = 6.8 για τις υπόλοιπες 5 ώρες

(β') pH = 7.4

Σχήμα 14.6: Προφίλ αποδέσμευσης ναρινγίνης μέσα από υδρογέλη αλγινικού και NADES

Αυτό αποδεικνύει ότι οι υδρογέλες είναι κατάλληλες για περιπτώσεις που χρειάζεται η βιοδραστική ουσία να αποδεσμευτεί και να δράσει άμεσα.

14.3.1 Επιλογή βέλτιστου κινητικού μοντέλου

Όπως περιγράφηκε στην ενότητα 6, για να εξαχθούν συμπεράσματα για τους μηχανισμούς αποδέσμευσης χρειάζεται να γίνει η επιλογή του βέλτιστου κινητικού μοντέλου. Για το λόγο αυτό, εφαρμόζονται και στις δύο μελέτες τα μοντέλα μηδενικής τάξης, πρώτης τάξης, Higuchi και Korsmeyer-Peppas και καταγράφεται ο αντίστοιχος συντελεστής R^2 . Ο συντελεστής R^2 είναι ένας αριθμός ανάμεσα στο 0 και 1 που μετράει την ικανότητα ενός στατιστικού μοντέλου να προβλέψει το αποτέλεσμα. Συνεπώς, όσο ο συντελεστής πλησιάζει τη μονάδα, τόσο πιο κατάλληλο είναι το στατιστικό μοντέλο.

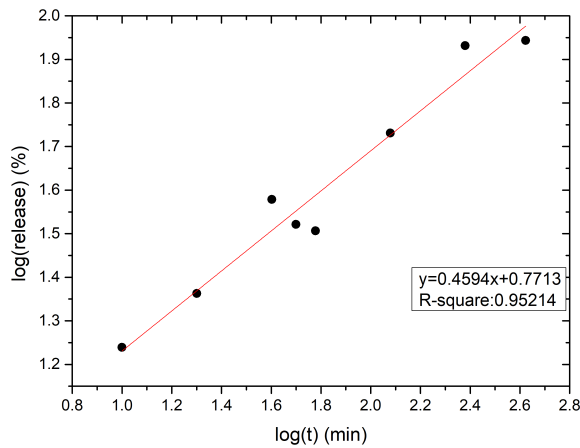
Μοντέλο αποδέσμευσης	Συντελεστής R^2 (pH=1.2 & 6.8)	Συντελεστής R^2 (pH=7.4)
Μηδενικής τάξης	0.807	0.728
Πρώτης τάξης	0.719	0.590
Higuchi	0.934	0.904
Korsmeyer-Peppas	0.952	0.847

Πίνακας 14.1: Συντελεστές R^2 στατιστικών μοντέλων που εφαρμόστηκαν στις δύο μελέτες

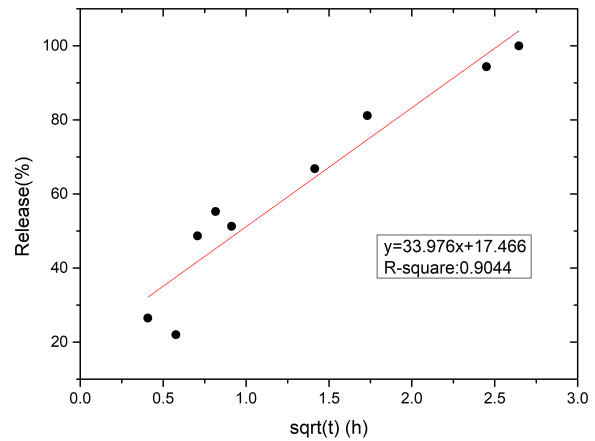
Από τον πίνακα 14.1 παρατηρείται ότι το πιο κατάλληλο μοντέλο για να περιγράψει την αποδέσμευση στην πρώτη μελέτη είναι το μοντέλο Korsmeyer-Peppas και στη δεύτερη μελέτη το μοντέλο Higuchi. Οι εφαρμογές των δύο μοντέλων απεικονίζονται στα διαγράμματα 14.7α' και 14.7β' αντίστοιχα.

Το μοντέλο Higuchi χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αποδέσμευση που βασίζεται σε διάχυση Fick. Συγκριτικά με τα κινητικά μοντέλα μηδενικής και πρώτης τάξης, το μοντέλο αυτό αποδεικνύει ότι υπάρχει μηχανισμός ελεγχόμενος από τη διάχυση. Αναφορικά με το μοντέλο Korsmeyer-Peppas παρατηρείται ότι ο συντελεστής (n) στην περίπτωση μας ισούται με 0.4594. Σύμφωνα με τον πίνακα 6.1 πρόκειται για συνδυασμό μηχανισμών αποδέσμευσης όπως Fickian διάχυση και ανώμαλη μεταφορά. Στην ανώμαλη μεταφορά θα μπορούσε να συμπεριληφθεί η διόγκωση των πολυμερών και το πορώδες πλέγμα [88].

Αξίζει να σημειωθεί ότι τελικά και για τις δύο μελέτες θα επιλεγεί το μοντέλο Higuchi για την περιγραφή της αποδέσμευσης διότι αφενός έχει υψηλή τιμή R^2 και αφετέρου το μοντέλο Korsmeyer-Peppas όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα ;; έχει μόνο ημι-εμπειρικό χαρακτήρα.



(α) Εφαρμογή μοντέλου Korsmeyer-Peppas για pH=1.2 & 6.8

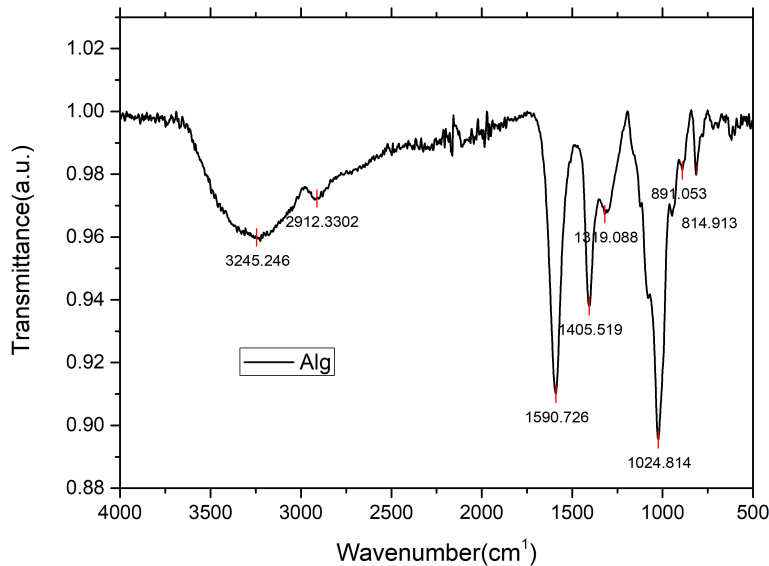


(β) Εφαρμογή μοντέλου Higuchi για pH=7.4

Σχήμα 14.7: Βέλτιστα στατιστικά μοντέλα

14.4 Αποτελέσματα της μελέτης δομικού χαρακτηρισμού

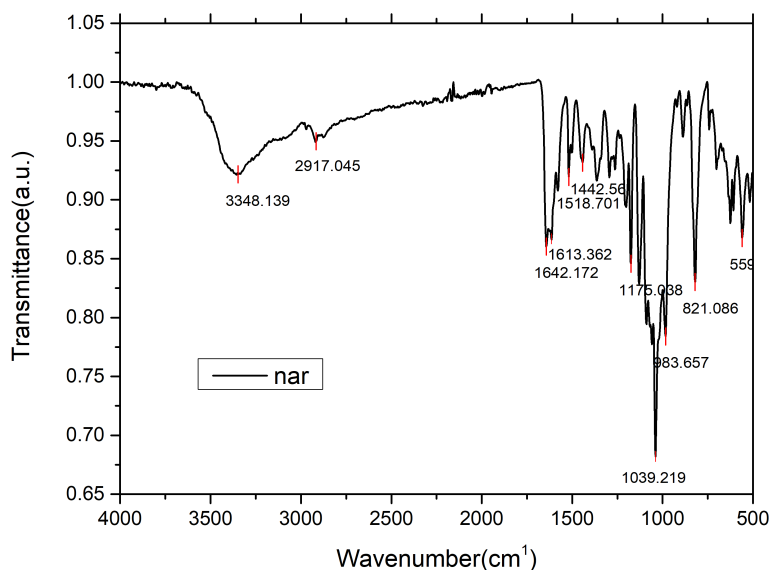
Αρχικά, μελετάται ξεχωριστά η δομή του αλγινικού και της ναρινγίνης μέσω φασματοσκοπίας FTIR όπως περιγράφηκε στην ενότητα 12.2.5. Τα φάσματά τους παρουσιάζονται στα διαγράμματα 14.8 και 14.9 αντίστοιχα.



Σχήμα 14.8: Φάσμα FTIR αλγινικού

Για το φάσμα του αλγινικού παρατηρείται μία κορυφή γύρω στα 3245 cm^{-1} η οποία αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης O-H. Η κορυφή γύρω στα 2912 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δονήσεις του αλειφατικού δεσμού C-H, η κορυφή στα 1590 cm^{-1} αντιστοιχεί σε ασυμμετρικές δονήσεις COO, η κορυφή στα 1405 cm^{-1} αντιστοιχεί σε συμμετρικές δονήσεις COO, η κορυφή γύρω στα 1024 cm^{-1} αντιπροσωπεύει τις δονήσεις τάσης C-O και τέλος οι κορυφές στα 891 και 814 cm^{-1} αντιστοιχούν σε δονήσεις των υπολειμμάτων μαννουρονικού οξέος [89] [90].

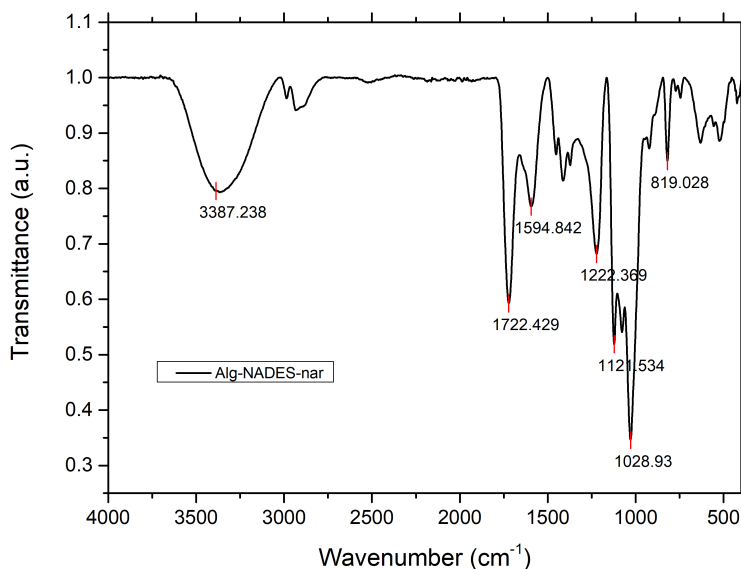
Για το φάσμα της ναρινγίνης παρατηρείται μια κορυφή γύρω στα 3348 cm^{-1} η οποία αντιστοιχεί στις υδροξυλικές ομάδες OH του μορίου της ναρινγίνης. Οι κορυφές γύρω από τα 1630 cm^{-1} αντιστοιχούν σε



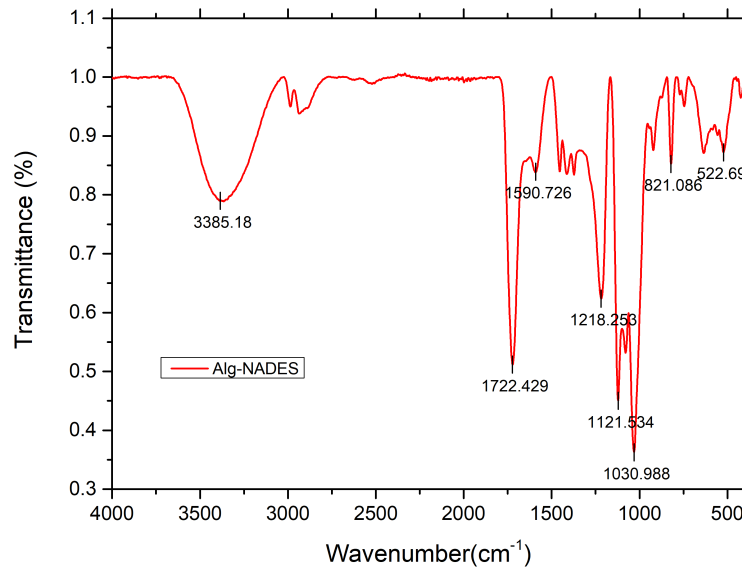
Σχήμα 14.9: Φάσμα FTIR ναρινγίνης

δονήσεις τάσης C=O, οι κορυφές στο εύρος $1450-1600\text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχούν σε δονήσεις κάμψεως και τάσης των αρωματικών δακτύλων, οι κορυφές στο εύρος $1200-1400\text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχούν σε δονήσεις κάμψεως των φαινόλων OH ενώ η κορυφή γύρω στα 1039 cm^{-1} αντιστοιχεί σε απορρόφηση ομάδων -C-O [91],[92], [93].

Τα αντίστοιχα φάσματα για υδρογέλη που αποτελείται από αλγινικό, NADES και ναρινγίνη παρασκευασμένη όπως προέκυψε από τη βελτιστοποίηση και για παρόμοια υδρογέλη απουσία ναρινγίνης παρουσιάζονται στα διαγράμματα 14.10 και 14.11 αντίστοιχα.



Σχήμα 14.10: Φάσμα FTIR για υδρογέλες βέλτιστης σύστασης αλγινικού, NADES και ναρινγίνης



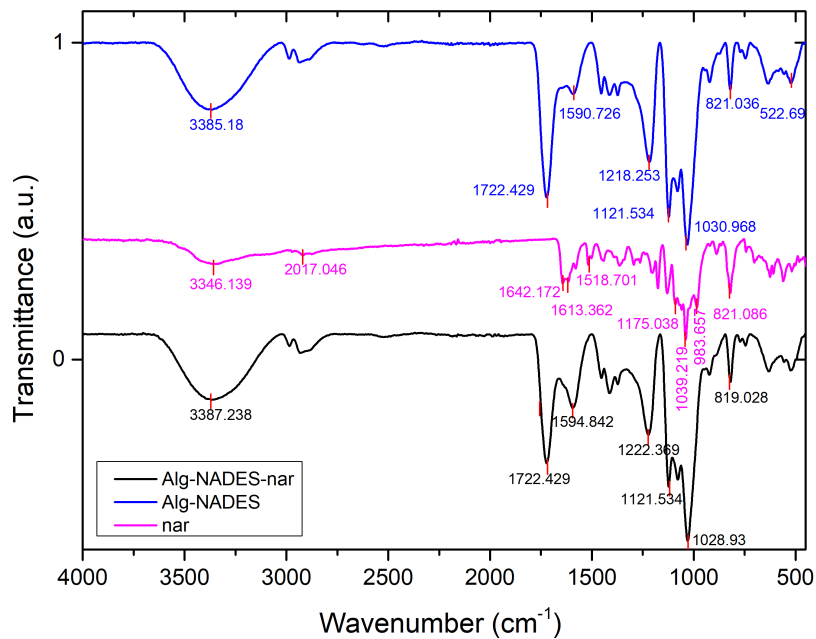
Σχήμα 14.11: Φάσμα FTIR για υδρογέλες βέλτιστης σύστασης αλγινικού και NADES

Για καλύτερη κατανόηση των δύο φασμάτων, παρατίθεται ο πίνακας 14.2 στον οποίο είναι συγκεντρωμένες οι βασικές συχνότητες που το κάθε συστατικό της υδρογέλης ξεχωριστά εμφανίζει κορυφή στο φάσμα FTIR καθώς και η αντιστοίχισή τους στους δεσμούς που αντιπροσωπεύουν. Για καλύτερη οπτικοποίηση των μεταβαλλόμενων κορυφών ανάμεσα στα δύο δείγματα, παρατίθεται το αντίστοιχο διάγραμμα στο οποίο περιλαμβάνονται οι τρεις καμπύλες - υδρογέλης αλγινικού και NADES (μπλε), ναρινγίνης (μωβ) και υδρογέλης αλγινικού, NADES και ναρινγίνης (μαύρο)- με την κάθε μία να είναι ελαφρώς μετατοπισμένη σε σχέση με την άλλη (διάγραμμα 14.12). Υπενθυμίζεται ότι η σύσταση των υδρογελών είναι εκείνη που εξήχθη από τη βελτιστοποίηση.

Η έντονη κορυφή και των δύο διαγραμμάτων των υδρογελών γύρω στα 1722 cm^{-1} οφείλεται στις δονήσεις τάσης C=O του γαλακτικού οξέος [81], [94], ενώ η κορυφή γύρω στα 1030 cm^{-1} οφείλεται στην ύπαρξη δονήσεων CO και νCC^9 του μορίου της γλυκόζης [80]. Συγκρίνοντας τα δύο φάσματα, παρατηρείται ότι εμφανίζουν σχεδόν ίδιες κορυφές και γις τις δύο υδρογέλες. Με την προσθήκη ναρινγίνης παρατηρείται μια ελαφριά μετατόπιση από τη συχνότητα 1590 cm^{-1} , γύρω στο 1594 cm^{-1} . Παρατηρείται επιπλέον η κορυφή γύρω στα 1218 cm^{-1} να μετατοπίζεται γύρω στα 1222 cm^{-1} . Οι μετατοπίσεις ορισμένων βασικών κορυφών σε συνδυασμό με το γεγονός πως οι χαρακτηριστικές κορυφές της ναρινγίνης δεν είναι διακριτές, υποδεικνύει τον επιτυχή εγκλωβισμό της ένωσης στις υδρογέλες. Οι αλληλεπιδράσεις της ένωσης με τις υδρογέλες φαίνονται επίσης από την αλληλεπικάλυψη χαρακτηριστικών κορυφών της ναρινγίνης με κορυφές της υδρογέλης προς τη δημιουργία πιο έντονων κορυφών. Αυτό, για παράδειγμα, συμβαίνει στο εύρος $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ όπου οι δονήσεις κάμψης της ναρινγίνης συγχωνεύονται με τις κορυφές της υδρογέλης.

	Δόνηση τάσης OH	Δόνηση τάσης CH	Δόνηση τάσης C=O	Δόνηση ασυμμετρίας	Δόνηση συμμετρίας	Δονήσεις αρωματικών δακτύλων	Δόνηση κάμψης OH	Δόνηση τάσης C-O-C	Δονήσεις CO και νCC^9
Αλγινικό	3245	2912	-	(COO) 1590	(COO) 1405	-	-	1024	-
Ναρινγίνη	3348	2917	1630	-	-	1518, 1442	1200-1400	1039	-
Γλυκόζη	3350	2920	-	-	(CH ⁸) 2850	-	-	-	1035
Γαλακτικό οξύ	3312	2983, 2935	1733	(CH ³) 2997	(CH ³) 2945	-	-	1200	-

Πίνακας 14.2: Βασικοί κυματαριθμοί cm^{-1} κορυφών των μορίων αλγινικού, ναρινγίνης και των συστατικών του NADES και οι αντίστοιχες αναθέσεις τους.



Σχήμα 14.12: Φάσμα FTIR υδρογέλης αλγινικού και NADES (μπλε), ναρινγίνης (μωβ) και υδρογέλης αλγινικού, NADES και ναρινγίνης (μαύρο)

Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία υλοποιείται η ανάπτυξη πράσινης διεργασίας παρασκευής υδρογελών αλγινικού με χρήση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NADES) ως παράγοντα διασταύρωσης οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να εγκλωβίσουν φυσικό φλαβονοειδές ναρινγίνη. Αυτό επιτυγχάνεται με τη διάλυση της ένωσης στο NADES προσδίδοντας στο διαλύτη το διπλό ρόλο ως διαλυτικό μέσο και ως παράγοντα διασταύρωσης για το σχηματισμό της υδρογέλης. Το χρησιμοποιούμενο NADES απαρτίζεται από γλυκόζη (Glu), γαλακτικό οξύ (LA) και νερό (W) σε αναλογία Glu:LA:W=1:5:6.2.

Οι υδρογέλες που συνθέτονται, αξιολογούνται ως προς την ικανότητα διόγκωσης (Swelling Ratio, SR), την ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Retention Ratio, WRR) και την απόδοση εγκλωβισμού της ναρινγίνης (Encapsulation Efficiency, EE). Οι τρεις αυτές παράμετροι, εισάγονται στο πρόγραμμα πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken ώστε να βρεθεί η σύσταση που τις μεγιστοποιεί ταυτόχρονα. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίζονται η περιεκτικότητα του αλγινικού (% w/v), η περιεκτικότητα του NADES (% v/v) και το ποσοστό φόρτωσης της ναρινγίνης (%). Για την κάθε απόκριση επιλέγεται κατάλληλο μοντέλο ικανό να συσχετίσει τις εξαρτημένες με τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Οι εν λόγω σχέσεις παλινδρόμησης είναι οι εξής:

$$SR = 769.08 - 238.25A - 178.13B - 179.38C + 146.50AB + 300.50AC + 296.87A^2 - 194.38C^2$$

$$WRR = 84.71 + 0.6250A + 3.00B + 7.88C - 14.50AB - 9.75AC - 2.5BC - 5.71B^2$$

$$EE = 8.67 - 5.00A + 4.37B - 2.63C - 2.75AB + 7.25AC - 6.00BC + 5.67A^2 - 0.5833B^2 + 3.92C^2$$

Με βάση τη βελτιστοποίηση, η υδρογέλη με τη βέλτιστη σύσταση είναι εκείνη που παρασκευάζεται με 2% w/v αλγινικό, 4.98 % v/v NADES και 6.91 % ποσοστό φόρτωσης.

Στη συνέχεια, παρασκευάζονται υδρογέλες με τη βέλτιστη σύσταση και αξιολογούνται εκ νέου ως προς τις αποκρίσεις τους για επιβεβαίωση των τιμών τους. Τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι: το ποσοστό διόγκωσης τους (SR) ξεπερνάει το 600%, καταφέρνουν να συγκρατήσουν περίπου το 65% του νερού τους σε διάστημα 3 h (WRR) και πετυχαίνουν περίπου 28% απόδοση εγκλωβισμού (EE).

Δεύτερον, μελετούνται ως προς τα προφίλ αποδέσμευσης τους σε συνθήκες που προσομοιάζουν τη διέλευση από το γαστρεντερικό σωλήνα και σε συνθήκες που προσομοιάζουν επιδερμική εφαρμογή και πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των μηχανισμών αποδέσμευσης. Τα μοντέλα που προβλέπουν καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα είναι το μοντέλο Korsmeyer-Peppas για το πρώτο σύστημα και το μοντέλο Higuchi για το δεύτερο.

Τρίτον, υλοποιείται σύγκριση μεταξύ υδρογελών με τη βέλτιστη σύσταση απουσία ναρινγίνης και αντίστοιχων υδρογελών αλγινικού με ασβέστιο ως προς την ικανότητα διόγκωσης και συγκράτησης νερού. Αποδुकνύεται ότι η ικανότητα διόγκωσής τους είναι συγκρίσιμη ενώ η ικανότητα συγκράτησης νερού είναι μεγαλύτερη για τις υδρογέλες με NADES στην περίοδο των πρώτων 80 λεπτών.

Τέλος, πραγματοποιείται χαρακτηρισμός της δομής τους μέσω φασματοσκοπίας FTIR ο οποίος επιβεβαιώνει τόσο την ενσωμάτωση της ναρινγίνης στις υδρογέλες όσο και την καλή σύμπλεξη των υδρογελών απουσία της βιοδραστικής ουσίας.

Προτάσεις για το μέλλον

Ο επιτυχημένος εγκλωβισμός φλαβονοειδούς σε υδρογέλες αλγινικού με χρήση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη ανοίγει αδιαμφισβήτητα νέους οριζόντες διερεύνησης.

- Αρχικά αναφορικά με τις υδρογέλες που παρασκευάζονται στην παρούσα εργασία προτείνεται η βιολογική τους αξιολόγηση.
- Προτείνεται επίσης μελέτη της κυτταροτοξικότητάς τους για να επιβεβαιωθεί και πειραματικά η πράσινη φύση της παρασκευής τους.
- Συνιστάται η περαιτέρω μορφολογική ανάλυση των υδρογελών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) ή ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)
- Εξίσου σημαντικές είναι οι θερμικές ιδιότητες των υδρογελών. Επομένως ενδείκνυται ο χαρακτηρισμός των υδρογελών με θερμοσταθμική ανάλυση (TG) και διαφορική σάρωση θερμιδομετρίας (DSC).
- Ενθαρρύνεται, τέλος, η δοκιμή εγκλωβισμού σε υδρογέλες διαφορετικών βιοδραστικών ουσιών με διαφορετικούς φυσικούς ευτηκτικούς διαλύτες και η μελέτη τους με αντίστοιχο τρόπο με την παρούσα εργασία.

Κεφάλαιο 17

Συμμετοχή σε διεθνή συνέδρια

ΔΣ1. I.Pitterou, A. Tzavara , A.Malliaraki , **A.Sklapani** , A. Tzani , K. Tsiantas , A. Batrinou , C. Fountzoula , A. Kriebardis, P. Zoumpoulakis , A. Detsi, "Development and Optimization of a Green In Situ Synthesis of Silver Nanoparticles in Alginate Hydrogels", 3rd International Meeting on Deep Eutectic Systems, June 19-22, 2023, Lisbon, Portugal.

Βιβλιογραφία

- [1] J. Isac-García, J.A. Dobado, F.G. Calvo-Flores, and Henar Martínez-García. *Chapter 12 - Green Chemistry*. Academic Press, 2016.
- [2] Κωνσταντίνος Πούλος. Green and Sustainable Chemistry. *Περιβάλλον 21*, 2021.
- [3] Neha P. Patel and Soumya Haldar. Chapter 8 - pollutants in the coral environment and strategies to lower their impact on the functioning of reef ecosystem. In Surajit Das and Hirak Ranjan Dash, editors, *Microbial Biodegradation and Bioremediation (Second Edition)*, pages 161–178. Elsevier, second edition edition, 2022.
- [4] Alberto Arce and Ana Soto. Chapter 23 - solubility issues in environmental pollution. In Trevor M. Letcher, editor, *Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues*, pages 411–427. Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [5] Rajagopalan Srinivasan and Sathish Natarajan. Developments in inherent safety: A review of the progress during 2001(2011 and opportunities ahead. *Process Safety and Environmental Protection*, 90(5):389–403, 2012. Special Issue Celebrating Trevor Kletz's 90th Birthday.
- [6] John Charles Warner Paul T. Anastas. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford university press, 1998.
- [7] J.A. Linthorst. An overview: origins and development of green chemistry. *Found Chem*, 2010.
- [8] Merriam-webster dictionary. 2022.
- [9] Mousumi Kar, Yashu Chourasiya, Rahul Maheshwari, and Rakesh K. Tekade. Chapter 2 - current developments in excipient science: Implication of quantitative selection of each excipient in product development. In Rakesh K. Tekade, editor, *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, pages 29–83. Academic Press, 2019.
- [10] J.A. Bonventre. Solvents. In Philip Wexler, editor, *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, pages 356–357. Academic Press, Oxford, third edition edition, 2014.
- [11] Dimitri Kopeliovich. Classification of solvents. 2012.
- [12] Στ.Μπογιατζής. Η διαλυτότητα των οργανικών ενώσεων. ΤΕΙ Αθήνας.
- [13] F D Dick. Solvent neurotoxicity. *Occupation and Environmental Medicine*, pages 221–226, 2006.
- [14] Roberta F White and Susan P Proctor. Solvents and neurotoxicity. *The Lancet*, 349(9060):1239–1243, 1997.
- [15] Robert Snyder. Leukemia and benzene. *Environmental Research and Public Health*, pages 2875–2893, 2012.

- [16] J.A. Bonventre. Solvents. In Philip Wexler, editor, *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, pages 356–357. Academic Press, Oxford, third edition edition, 2014.
- [17] Jacek Namieśnik Marek Tobiszewski and Francisco Pena-Pereira. Environmental risk-based ranking of solvents using the combination of a multimedia model and multi-criteria decision analysis† . *Green Chemistry*, pages 1034–1042, 2016.
- [18] Federica Matteucci, Claudia Ercole, and Maddalena del Gallo. A study of chlorinated solvent contamination of the aquifers of an industrial area in central italy: a possibility of bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 6, 2015.
- [19] Introduction: Ionic liquids. *Chemical Reviews*, 117(10):6633–6635, 2017. PMID: 28535681.
- [20] Q. Zhao and J.L. Anderson. 2.11 - ionic liquids. In Janusz Pawliszyn, editor, *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, pages 213–242. Academic Press, Oxford, 2012.
- [21] Jolanta Flieger and Michał Flieger. Ionic liquids toxicity | benefits and threats. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 2020.
- [22] Sonia Arriaga and Aitor Aizpuru. Chapter nine - innovative non-aqueous phases and partitioning bioreactor configurations. In Sergio Huerta-Ochoa, Carlos O. Castillo-Araiza, and Guillermo Quijano, editors, *Advances and Applications of Partitioning Bioreactors*, volume 54 of *Advances in Chemical Engineering*, pages 299–348. Academic Press, 2019.
- [23] Emma L. Smith, Andrew P. Abbott, and Karl S. Ryder. Deep eutectic solvents (dess) and their applications. *Chemical Reviews*, 114(21).
- [24] Benworth B. Hansen, Stephanie Spittle, Brian Chen, Derrick Poe, Yong Zhang, Jeffrey M. Klein, Alexandre Horton, Laxmi Adhikari, Tamar Zelovich, Brian W. Doherty, Burcu Gurkan, Edward J. Maginn, Arthur Ragauskas, Mark Dadmun, Thomas A. Zawodzinski, Gary A. Baker, Mark E. Tuckerman, Robert F. Savinell, and Joshua R. Sangoro. Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chemical Reviews*, 121(3):1232–1285, 2021. PMID: 33315380.
- [25] Alberto Mannu, Marco Blangetti, Salvatore Baldino, and Prandi Cristina. Promising technological and industrial applications of deep eutectic systems. *Materials*, 14:2494, 05 2021.
- [26] Ana Gertrudes, Rita Craveiro, Zahara Eltayari, Rui L. Reis, Alexandre Paiva, and Ana Rita C. Duarte. How do animals survive extreme temperature amplitudes? the role of natural deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(11):9542–9553, 2017.
- [27] Farouq Mjalli, Ghulam Murshid, Suaad Al-Zakwani, and Adeeb Hayyan. Monoethanolamine-based deep eutectic solvents, their synthesis and characterization. *Fluid Phase Equilibria*, 448, 03 2017.
- [28] Shivani Chaudhary, Vijay Prakash Jain, and Gautam Jaiswar. Chapter 4 - the composition of polysaccharides: monosaccharides and binding, group decorating, polysaccharides chains. In Preeti Singh, Kaiser Manzoor, Saiqa Ikram, and Pratheep Kumar Annamalai, editors, *Innovation in Nano-Polysaccharides for Eco-sustainability*, pages 83–118. Elsevier, 2022.
- [29] Shahrzad Rahmani, Mahshid Maroufkhani, Sanaz Mohammadzadeh-Komuleh, and Zahra Khoubi-Arani. Chapter 7 - polymer nanocomposites for biomedical applications. In Ahmed Barhoum, Jaison Jeevanandam, and Michael K. Danquah, editors, *Fundamentals of Bionanomaterials*, Micro and Nano Technologies, pages 175–215. Elsevier, 2022.
- [30] C. Stylianopoulos. Carbohydrates: Chemistry and classification. In Benjamin Caballero, editor, *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*, pages 265–271. Academic Press, Waltham, third edition edition, 2013.

- [31] Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities). 2021.
- [32] Sadaf Afrin and Zoheb Karim. 1 - polysaccharides. In Showkat Ahmad Bhawani, Zoheb Karim, and Mohammad Jawaid, editors, *Polysaccharide-Based Nanocomposites for Gene Delivery and Tissue Engineering*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, pages 1–14. Woodhead Publishing, 2021.
- [33] Bioactive polysaccharides from natural resources including chinese medicinal herbs on tissue repair. 2018.
- [34] Ndidi C. Ngwuluka. 19 - responsive polysaccharides and polysaccharides-based nanoparticles for drug delivery. In Abdel Salam Hamdy Makhlouf and Nedal Y. Abu-Thabit, editors, *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Volume 1*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, pages 531–554. Woodhead Publishing, 2018.
- [35] RH McDowell. Applications of alginates. *Rev. pure appl. Chem*, 10(1):1–15, 1960.
- [36] F. Alihosseini. 10 - plant-based compounds for antimicrobial textiles. In Gang Sun, editor, *Antimicrobial Textiles*, Woodhead Publishing Series in Textiles, pages 155–195. Woodhead Publishing, 2016.
- [37] Danyang Cheng, Chengcheng Jiang, Jiachao Xu, Zhen Liu, and Xiangzhao Mao. Characteristics and applications of alginate lyases: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164:1304–1320, 2020.
- [38] Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. 57:171–180, 2019.
- [39] HPS Khalil, TK Lai, YY Tye, S Rizal, EWN Chong, SW Yap, AA Hamzah, MR Fazita, and MT Paridah. A review of extractions of seaweed hydrocolloids: Properties and applications. *Express Polymer Letters*, 12(4), 2018.
- [40] Wenda Wang, Ravin Narain, and Hongbo Zeng. Chapter 10 - hydrogels. In Ravin Narain, editor, *Polymer Science and Nanotechnology*, pages 203–244. Elsevier, 2020.
- [41] S.H. Aswathy, U. Narendrakumar, and I. Manjubala. Commercial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon*, 6(4):e03719, 2020.
- [42] Tzu-Chuan Ho, Chin-Chuan Chang, Hung-Pin Chan, Tze-Wen Chung, Chih-Wen Shu, Kuo-Pin Chuang, Tsai-Hui Duh, Ming-Hui Yang, and Yu-Chang Tyan. Hydrogels: Properties and applications in biomedicine. *Molecules*, 27(9), 2022.
- [43] N.A. Peppas, B.V. Slaughter, and M.A. Kanelberger. 9.20 - hydrogels. In Krzysztof Matyjaszewski and Martin Möller, editors, *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, pages 385–395. Elsevier, Amsterdam, 2012.
- [44] Radhika Narayanaswamy and Vladimir P Torchilin. Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. *Molecules*, 24(3):603, 2019.
- [45] Willi Paul and Chandra P Sharma. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs*, 18(1):18–23, 2004.
- [46] Madasamy Parani, Giriraj Lokhande, Ankur Singh, and Akhilesh K Gaharwar. Engineered nanomaterials for infection control and healing acute and chronic wounds. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(16):10049–10069, 2016. PMID: 27043006.

- [47] Kokkarachedu Varaprasad, Tippabattini Jayaramudu, Vimala Kanikireddy, Claudio Toro, and Emmanuel Rotimi Sadiku. Alginate-based composite materials for wound dressing application: a mini review. *Carbohydrate Polymers*, 236:116025, 2020.
- [48] G Frykberg Robert et al. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Advances in wound care*, 2015.
- [49] Kevin Chung. *Grabb and Smith's plastic surgery*. Lippincott Williams & Wilkins, 2019.
- [50] Carla Daunton, Sherry Kothari, Louise Smith, and David Steele. A history of materials and practices for wound management. *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, 20(4), 2012.
- [51] Blessing Atim Aderibigbe and Buhle Buyana. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics*, 10(2), 2018.
- [52] Vanessa Jones, Joseph E Grey, and Keith G Harding. Wound dressings. *Bmj*, 332(7544):777-780, 2006.
- [53] Kokkarachedu Varaprasad, Tippabattini Jayaramudu, Vimala Kanikireddy, Claudio Toro, and Emmanuel Rotimi Sadiku. Alginate-based composite materials for wound dressing application: a mini review. *Carbohydrate Polymers*, 236:116025, 2020.
- [54] Amarjargal Saarai, V Kasparkova, T Sedlacek, and Petr Sába. A comparative study of crosslinked sodium alginate/gelatin hydrogels for wound dressing. In *Proceeding of the 4th WSEAS International Conference on Engineering Mechanics, Structures, Engineering Geology*. WSEAS Press, Greece, pages 384-389, 2011.
- [55] Nan Xing, Feng Tian, Jian Yang, and Yu Kun Li. Ii. chalginate chitosanaracterizations of alginate-chitosan hydrogel for wound dressing application. In *Advanced Materials Research*, volume 490, pages 3124-3128. Trans Tech Publ, 2012.
- [56] Djony Izak Rudyardjo and Setiawan Wijayanto. The synthesis and characterization of hydrogel chitosan-alginate with the addition of plasticizer lauric acid for wound dressing application. In *Journal of Physics: Conference Series*, volume 853, page 012042. IOP Publishing, 2017.
- [57] M Pandima Devi, M Sekar, M Chamundeswari, A Moorthy, G Krithiga, N Selva Murugan, and TP Sastry. A novel wound dressing material | fibrin-chitosan-sodium alginate composite sheet. *Bulletin of Materials Science*, 35:1157-1163, 2012.
- [58] Zhihua Zhou, Jiahui Chen, Cheng Peng, Tianlong Huang, Hu Zhou, Baoli Ou, Jian Chen, Qingquan Liu, Siliang He, Dafu Cao, et al. Fabrication and physical properties of gelatin/sodium alginate/hyaluronic acid composite wound dressing hydrogel. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 51(4):318-325, 2014.
- [59] Annapoorna Mohandas, Sudheesh Kumar PT, Biswas Raja, Vinoth-Kumar Lakshmanan, and Rangasamy Jayakumar. Exploration of alginate hydrogel/nano zinc oxide composite bandages for infected wounds. *International journal of nanomedicine*, 10(sup2):53-66, 2015.
- [60] Rita Singh and Durgeshwer Singh. Radiation synthesis of pvp/alginate hydrogel containing nanosilver as wound dressing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(11):2649-2658, 2012.
- [61] Saeed Nazeri, Esmat Mirabzadeh Ardakani, Hamid Babavalian, and Ali Mohammad Latifi. Evaluation of effectiveness of honey-based alginate hydrogel on wound healing in rat model. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 2(3):293-297, 2015.

- [62] Blessing Atim Aderibigbe and Buhle Buyana. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics*, 10(2), 2018.
- [63] Maryam Ghanbari-Movahed, Gloria Jackson, Mohammad Hosein Farzaei, and Anupam Bishayee. A systematic review of the preventive and therapeutic effects of naringin against human malignancies. *Frontiers in pharmacology*, 12:639840, 2021.
- [64] Rui Chen, Qiao-Ling Qi, Meng-Ting Wang, and Qi-Yan Li. Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharmaceutical biology*, 54(12):3203–3210, 2016.
- [65] Regina MS Pereira, Norma ED Andrades, Niraldo Paulino, Alexandra CHF Sawaya, Marcos N Eberlin, Maria C Marcucci, Giovani Marino Favero, Estela Maria Novak, and Sérgio Paulo Bydlowski. Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity. *Molecules*, 12(7):1352–1366, 2007.
- [66] Merve Bacanlı, A. Ahmet Başaran, and Nurşen Başaran. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and Chemical Toxicology*, 81:160–170, 2015.
- [67] Soledad Ravetti, Ariel G Garro, Agustina Gaitán, Mariano Murature, Mariela Galiano, Sofia G Brignone, and Santiago D Palma. Naringin: Nanotechnological strategies for potential pharmaceutical applications. *Pharmaceutics*, 15(3):863, 2023.
- [68] Elham Abdelmonem Mohamed, Irhan Ibrahim Abu Hashim, Rehab Mohammad Yusif, Ahmed Abdel Aziz Shaaban, Ahmed Ramadan El-Sheakh, Mohammed Fawzy Hamed, and Farid Abd Elreheem Badria. Polymeric micelles for potentiated antiulcer and anticancer activities of naringin. *International journal of nanomedicine*, 13:1009, 2018.
- [69] S Malathy, PR Iyer, et al. Naringin loaded chitosan nanoparticle for bone regeneration: a preliminary in vitro study. *J. Nanomed. Nanotechnol*, 9(4.10):4172, 2018.
- [70] Kashif Hussain, Imdad Ali, Shafi Ullah, Muhammad Imran, Samina Parveen, Tasmina Kanwal, Shafiq Ali Shah, Salim Saifullah, and Muhammad Raza Shah. Enhanced antibacterial potential of naringin loaded β cyclodextrin nanoparticles. *Journal of Cluster Science*, pages 1–10, 2021.
- [71] Sangeeta Mohanty, V Badireenath Konkimalla, Abhisek Pal, Tripti Sharma, and Sudam Chandra Si. Naringin as sustained delivery nanoparticles ameliorates the anti-inflammatory activity in a freund's complete adjuvant-induced arthritis model. *ACS omega*, 6(43):28630–28641, 2021.
- [72] Margaux Vigata, Christoph Meinert, Dietmar W Hutmacher, and Nathalie Bock. Hydrogels as drug delivery systems: A review of current characterization and evaluation techniques. *Pharmaceutics*, 12(12):1188, 2020.
- [73] Diego Caccavo. An overview on the mathematical modeling of hydrogels' behavior for drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, 560:175–190, 2019.
- [74] Diego Caccavo. An overview on the mathematical modeling of hydrogels' behavior for drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, 560:175–190, 2019.
- [75] Mario Grassi and Gabriele Grassi. Application of mathematical modeling in sustained release delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*, 11(8):1299–1321, 2014.
- [76] A. Sethuramiah and Rajesh Kumar. Chapter 6 - statistics and experimental design in perspective. In A. Sethuramiah and Rajesh Kumar, editors, *Modeling of Chemical Wear*, pages 129–159. Elsevier, Oxford, 2016.

- [77] John R. Wagner, Eldridge M. Mount, and Harold F. Giles. 25 - design of experiments. In John R. Wagner, Eldridge M. Mount, and Harold F. Giles, editors, *Extrusion (Second Edition)*, Plastics Design Library, pages 291–308. William Andrew Publishing, Oxford, second edition edition, 2014.
- [78] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandão, E.G.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. dos Reis, A.S. Souza, and W.N.L. dos Santos. Box-behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2):179–186, 2007.
- [79] J.D. Mellor and G.A. Bell. Freeze-drying the basic process. In Benjamin Caballero, editor, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, pages 2697–2701. Academic Press, Oxford, second edition edition, 2003.
- [80] Louise Nybacka. Ftir spectroscopy of glucose. *Uppsala Universitet*, 2016.
- [81] P.N. Devi, J. Sathiyabama, and Susai Rajendran. Study of surface morphology and inhibition efficiency of mild steel in simulated concrete pore solution by lactic acid-zn²⁺ system. *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition*, 6:18–31, 02 2017.
- [82] Salehi M. Farzamfar S. Samadian H. Vaez A. Sahrpeyma H. Ghorbani S. Ehterami, A. A promising wound dressing based on alginate hydrogels containing vitamin d3 cross-linked by calcium carbonate/d-glucono- δ -lactone. *Biomedical engineering letters*, pages 309–319, 2020.
- [83] Giovanna Gomez Straccia, Maria Cristina Ayala, Ida Romano, Adriana Oliva, and Paola Laurienzo. Alginate hydrogels coated with chitosan for wound dressing. *Marine Drugs*, 13(5):2890–2908, 2015.
- [84] Bushra Ishfaq, Ikram Ullah Khan, Syed Haroon Khalid, and Sajid Asghar. Design and evaluation of sodium alginate-based hydrogel dressings containing betula utilis extract for cutaneous wound healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 2023.
- [85] Jing Guo, Jianguo Jiang, Xiaolong Gu, Xia Li, and Tianqing Liu. Encapsulation of β -carotene in calcium alginate hydrogels templated by oil-in-water-in-oil (o/w/o) double emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 608:125548, 2021.
- [86] Yingzhe Liu and Takasi Nisisako. Microfluidic encapsulation of hydrophobic antifouling biocides in calcium alginate hydrogels for controllable release. *ACS Omega*, 5(40):25695–25703, 2020. PMID: 33073095.
- [87] Samira et al. Najafi-Soulari. Encapsulation optimization of lemon balm antioxidants in calcium alginate hydrogels. *Journal of biomaterials science*, 27,16:1631–1644, 2016.
- [88] Pinar Ilgin, Hava Ozay, and Ozgur Ozay. A new dual stimuli responsive hydrogel: Modeling approaches for the prediction of drug loading and release profile. *European Polymer Journal*, 113:244–253, 2019.
- [89] Hamed Daemi, Mehdi Barikani, and Mohammad Barmar. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, 04 2012.
- [90] Sergios K. Papageorgiou, Evangelos P. Kouvelos, Evangelos P. Favvas, Andreas A. Sapididis, George E. Romanos, and Fotios K. Katsaros. Metal{carboxylate interactions in metal{alginate complexes studied with ftir spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 345(4):469–473, 2010.
- [91] Shuo Wang, Tianren Xue, Baolong Niu, Liqiao Wei, and Huifang Wang. Preparation, characterization and antibacterial property of naringin loaded plga nanospheres. *Progress in Natural Science: Materials International*, 32(4):498–503, 2022.

- [92] Kulkarni Yogesh A Wairkar Sarika Joshi Ruthvika, Laddha Ankit P. Improved performance of naringenin herbosomes over naringenin in streptozotocin-induced diabetic rats: In vitro and in vivo evaluation. *Asian Pacific of Tropical Biomedicine*, 11:385–393, 2021.
- [93] Kashif Hussain, Imdad Ali, Shafi Ullah, Muhammad Imran, Samina Parveen, Tasmina Kanwal, Shafiq Ali Shah, Salim Saifullah, and Muhammad Raza Shah. Enhanced antibacterial potential of naringin loaded β cyclodextrin nanoparticles. *Journal of Cluster Science*, pages 1–10, 2021.
- [94] Huisuo Huang, Ingolf Grün, Mark Ellersieck, and A.D. Clarke. Use of hplc and ftir as a tool for analysis of lactic acid in restructured fish products. *Journal of Nutrition, Food Research and Technology*, 1:42–48, 06 2018.