



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Υδρογέλες χιτοζάνης με ενσωματωμένα φυσικά προϊόντα: σύνθεση,
μελέτη φυσικοχημικών και μηχανικών ιδιοτήτων και αξιολόγηση
βιοδραστικότητας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Χίνη Σαλώμη

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Δέτση Αναστασία

ΑΘΗΝΑ
Σεπτέμβριος 2023

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε.Μ.Π., Δρ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023.

Με αφορμή την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας που σηματοδοτεί το κλείσιμο του πενταετούς κύκλου σπουδών μου στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όσους με βοήθησαν στην υλοποίηση του εν λόγω ερευνητικού έργου, το οποίο αποτελεί επιστέγασμα των προπτυχιακών μου σπουδών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Αναστασία Δέτση, η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να ενταχθώ στην ομάδα του εργαστηρίου της και να ενασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον και καινοτόμο θέμα, το οποίο με κράτησε το ίδιο ενθουσιασμένη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Οι συμβουλές της και η εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπο μου αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας επιτυχώς.

Στη συνέχεια, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην τριμελή εξεταστική επιτροπή για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την κριτική ανάγνωση της εργασίας.

Επιπλέον, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. για την προθυμία να βοηθήσουν, αλλά και για την φιλική τους διάθεση, και κυρίως στην Υποψήφια Διδάκτορα Ιωάννα Πιττερού για την απεριόριστη υποστήριξη της. Η κατάρτιση, το πάθος, το επιστημονικό υπόβαθρο και η εμπειρογνωμοσύνη της συντέλεσαν στη δημιουργία ενός άψογου κλίματος και αξέχαστων αναμνήσεων κατά τη διάρκεια αυτού του ερευνητικού ταξιδιού. Η καθοδήγηση που παρείχε ήταν πολύτιμη για την εξέλιξη μου, καθώς οι συμβουλές, οι πολύωρες συζητήσεις και η πρακτική της βοήθεια κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων συνέβαλαν σημαντικά στην ομαλή επίτευξη του στόχου μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και την οικογένεια μου, οι οποίοι ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια των ακαδημαϊκών σπουδών μου. Η αγάπη, η πίστη, η κατανόηση, η στήριξη και η ενθάρρυνση τους με ώθησαν να προσπαθώ διαρκώς για το καλύτερο.

Περίληψη

Η πράσινη χημεία και οι πράσινοι διαλύτες επιστρατεύονται για την ανάπτυξη και τον σχεδιασμό χημικών διεργασιών που είναι φιλικές προς το περιβάλλον, οικονομικά βιώσιμες και ασφαλέστερες.

Οι NADESs αποτελούν εναλλακτικά, πράσινα συστήματα με πολλαπλό ρόλο, καθώς δρουν ως διαλύτες, ως παράγοντες διασταύρωσης και ως μέσα ενίσχυσης και σταθεροποίησης της βιοδραστικότητας του τελικού συστήματος. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η πράσινη ανάπτυξη υδρογελών χιτοζάνης με τη χρήση ενός στοχευμένα σχεδιασμένου διαλύτη, ο οποίος δρα αποτελεσματικά ως εκχυλιστικό μέσο φύλλων ελιάς Καλαμών και του οποίου τα συστατικά αλληλεπιδρούν με τη χιτοζάνη μέσω της αντίδρασης Maillard, ενώ ταυτόχρονα λειτουργεί ως παράγοντας διασταύρωσης για τον σχηματισμό των υδρογελών μαζί με τις ανακτημένες βιοδραστικές ενώσεις. Ειδικότερα, χρησιμοποιείται ο πράσινος διαλύτης Γλυκόζη / Γαλακτικό οξύ / Νερό σε γραμμομοριακή αναλογία 1:5:6.2, ο οποίος απομονώνει τις βιοδραστικές ενώσεις, προσδίδει όξινο pH και διαλύει την χιτοζάνη, ενώ γλυκόζη και χιτοζάνη αλληλεπιδρούν προς την παραγωγή προϊόντων της αντίδρασης Maillard. Οι ομάδες αμίνης της χιτοζάνης αντιδρούν με τις καρβονυλομάδες της γλυκόζης του διαλύτη, μέσω της αντίδρασης MR, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται χημικά διασταυρωμένη υδρογέλη.

Οι σχηματιζόμενες υδρογέλες μελετήθηκαν ως προς τις ιδιότητες τους, ενώ αξιολογήθηκε η βιοδραστικότητα τους, καθώς τα φύλλα ελιάς αποτελούν άφθονη πηγή βιοδραστικών ενώσεων και η αντίδραση Maillard εντείνει την αντιοξειδωτική δράση των τελικών προϊόντων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα διόγκωσης των υδρογελών και η ικανότητα συγκράτησης νερού σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες που προσομοιάζουν το δέρμα και το στομάχι, ενώ αξιολογήθηκε η μηχανική και ρεολογική τους συμπεριφορά, η οποία καθορίζει την τελική χρήση των υλικών. Προκειμένου να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική δράση των τελικών προϊόντων εφαρμόστηκαν η μέθοδος αναστολής λιπιδικής υπεροξειδωσης - AAPH και ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Επιπλέον, οι υδρογέλες χαρακτηρίστηκαν δομικά μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), η οποία υπέδειξε την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ του παράγοντα διασταύρωσης (NADES) και της χιτοζάνης, μέσω της αντίδρασης MR. Ακολούθησε η μελέτη θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA) των υδρογελών, με σκοπό την διερεύνηση της θερμικής σταθερότητας των προϊόντων κατά την αύξηση της θερμοκρασίας κατά την οποία επιβεβαιώθηκε ότι η αντίδραση MR ενισχύει τις θερμικές ιδιότητες των προϊόντων. Τέλος, οι υδρογέλες εξετάστηκαν ως προς τα ρεολογικά τους χαρακτηριστικά και αξιολογήθηκαν ως προς την σταθερότητα του πολυμερικού πλέγματος. Από τις μετρήσεις αποδείχθηκε η μόνιμη χημική διασύνδεση των τελικών προϊόντων, επιβεβαιώνοντας την πραγμάτωση της αντίδρασης MR.

Λέξεις κλειδιά: φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, χιτοζάνη, υδρογέλη, αντίδραση Maillard, αντιοξειδωτικότητα

Abstract

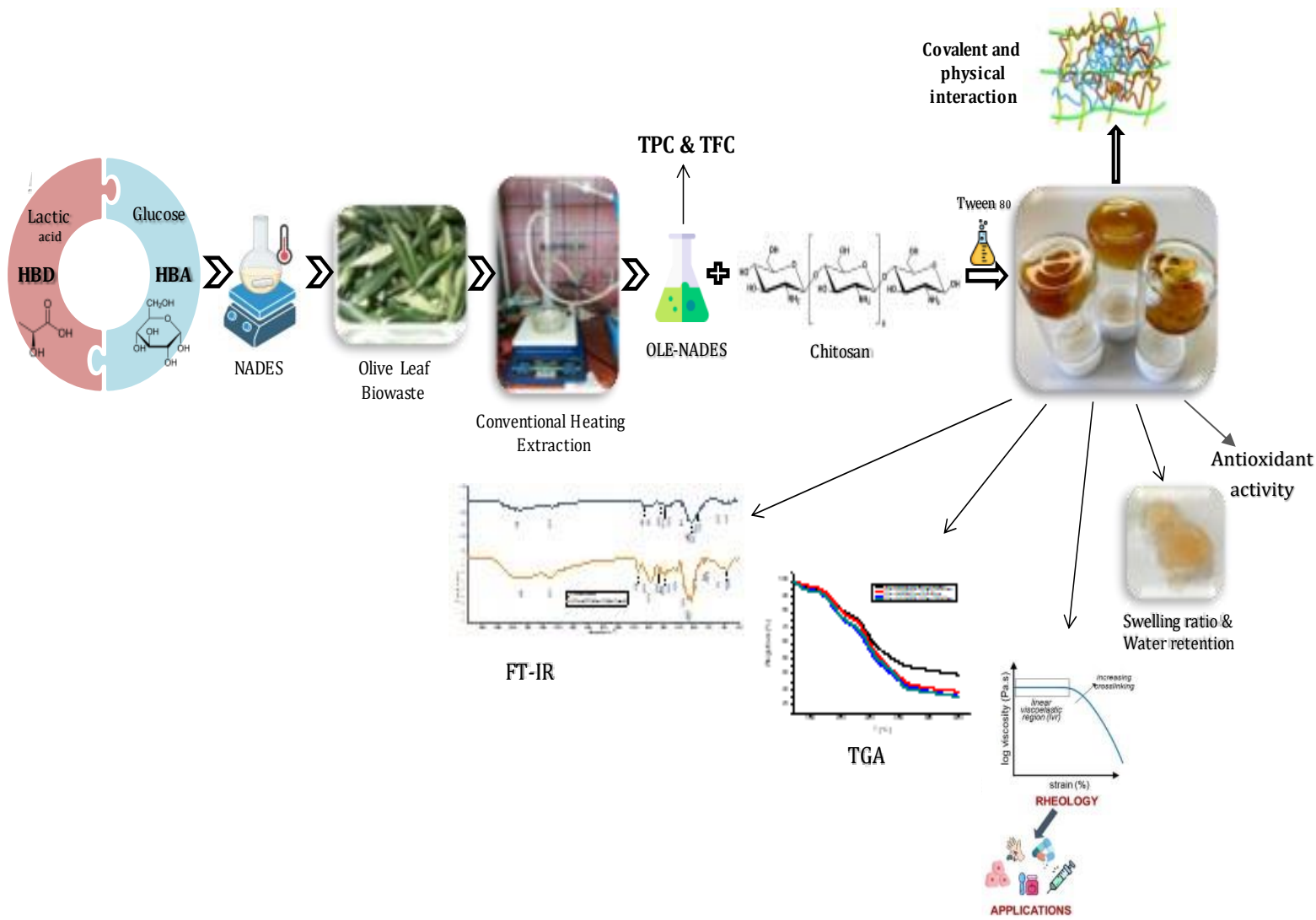
Green chemistry and green solvents are employed in the development and design of chemical processes that are environmentally friendly, economically sustainable, and safer.

Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) serve as alternative green systems with multiple roles, acting as solvents, cross-linking agents, and enhancers and stabilizers of the final system's bioactivity. The purpose of this thesis is to promote the green synthesis of chitosan hydrogels using a specifically designed solvent, which effectively functions as an olive leaf extractant, interacts with chitosan through the Maillard reaction while also serving as a cross-linking agent to form hydrogels along with the recovered bioactive compounds. Specifically, the green solvent used is Glucose / Lactic Acid / Water in a molar ratio of 1:5:6.2. This solvent isolates bioactive compounds, imparts an acidic pH, and dissolves chitosan, while glucose and chitosan interact to produce Maillard reaction products. The amino groups of chitosan react with the carbonyl groups of glucose in the solvent through the MR reaction, leading to the formation of chemically cross-linked hydrogels.

The properties of the formed hydrogels were studied and their bioactivity was evaluated. Olive leaves are an abundant source of bioactive compounds and the Maillard reaction intensifies the antioxidant activity of the final products. Specifically, the swelling and water retention capacities of the hydrogels were studied under physiological conditions and conditions simulating skin and stomach environments. Additionally, their mechanical and rheological behaviors, which determine the final material's use, were evaluated. To determine the antioxidant activity of the final products, the lipid peroxidation inhibition method (AAPH) and the free radical scavenging ability of DPPH were applied. Furthermore, the hydrogels were structurally characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), which revealed interactions between the cross-linking agent (NADES) and chitosan through the MR reaction. Thermal stability of the hydrogels was investigated using thermogravimetric analysis (TGA), confirming that the MR reaction enhances the thermal properties of the products. Finally, the hydrogels were examined for their rheological characteristics and assessed for the stability of the polymeric network. The results confirmed the permanent chemical cross-linking of the final products, validating the MR reaction.

Keywords: Natural deep eutectic solvents, chitosan, hydrogels, Maillard reaction, antioxidant activity

Graphical Abstract



Περιεχόμενα

Υδρογέλες χιτοζάνης με ενσωματωμένα φυσικά προϊόντα: σύνθεση, μελέτη φυσικοχημικών και μηχανικών ιδιοτήτων και αξιολόγηση βιοδραστικότητας.....	1
Ευχαριστίες	2
Περίληψη	3
Abstract	4
Graphical Abstract	5
Περιεχόμενα	6
Κατάλογος Εικόνων	8
Κατάλογος Πινάκων	10
Κατάλογος Διαγραμμάτων	11
Συντομογραφίες	14
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	15
1.1 Πράσινη Χημεία.....	15
1.2 Πράσινοι Διαλύτες.....	16
1.2.1 Ιοντικά Υγρά (Ionic Liquids).....	16
1.2.2 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents - DES).....	17
1.2.3 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents – NADES).....	20
1.2.4 Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Therapeutic Deep Eutectic Solvents–THEDES) 22	
1.3 Φύλλα Ελιάς και Χρήση Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών σε Διεργασίες Εκχύλισης..	24
1.3.1 Φύλλα Ελιάς και Βιοδραστικές Ενώσεις.....	24
1.3.2 Συμβατική Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων με χρήση NADES.....	25
1.3.3 Εκχύλιση με Υπερήχους (UAE) με χρήση NADES.....	27
1.3.4 Συστήματα DES / NADES για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από τα φύλλα ελιάς.....	29
1.4 Υδρογέλες.....	30
1.4.1 Ιδιότητες Υδρογελών.....	33
1.4.2 Χιτοζάνη (Chitosan – CS).....	35
1.4.3 Υδρογέλες χιτοζάνης.....	36
1.4.4 Υδρογέλες χιτοζάνης με φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες.....	36
1.4.5 Υδρογέλες χιτοζάνης με εκχύλισμα φύλλων ελιάς και φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες	37
1.4.6 Προσθήκη επιφανειοδραστικού παράγοντα στις υδρογέλες.....	37
1.5 Αντίδραση Maillard (Maillard Reaction - MR).....	38
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό Μέρος	41
2.1 Σκοπός.....	41

2.2 Οργανολογία - Υλικά.....	41
2.2.1 Αντιδραστήρια - Υλικά.....	41
2.2.2 Όργανα - Συσκευές.....	42
2.3 Παρασκευή φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών – NADES.....	43
2.4 Συμβατική εκχύλιση φύλλων ελιάς.....	44
2.4.1 Προετοιμασία φύλλων ελιάς.....	44
2.4.2 Εκχύλιση με NADES.....	44
2.5 Χαρακτηρισμός εκχυλίσματος.....	45
2.5.1 Χρωματομετρικός προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα – TPC.....	45
2.5.2 Χρωματομετρικός προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας φλαβονοειδών ενώσεων στο εκχύλισμα – TFC.....	46
2.6 Παρασκευή υδρογελών.....	47
2.6.1 Προκαταρκτικά Πειράματα και Συνδυασμός Πειραμάτων.....	47
2.6.2 Χαρακτηρισμός Υδρογελών.....	51
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	58
3.1 Χαρακτηρισμός Εκχυλίσματος.....	58
3.1.1 Χρωματομετρικός προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα – TPC.....	58
3.1.2 Χρωματομετρικός προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας φλαβονοειδών ενώσεων στο εκχύλισμα – TFC.....	58
3.2 Χαρακτηρισμός Διαλύτη.....	59
3.2.1 Δομικός Χαρακτηρισμός Διαλύτη.....	59
3.3 Χαρακτηρισμός Υδρογελών.....	60
3.3.1 Ικανότητα διόγκωσης – Swelling.....	60
3.3.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού – Water Retention.....	74
3.3.3 Δομικός Χαρακτηρισμός υδρογελών.....	87
3.3.4 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης.....	91
3.3.5 Αξιολόγηση θερμικών ιδιοτήτων.....	95
3.3.6 Ρεολογικά.....	97
Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα.....	101
Κεφάλαιο 5: Μελλοντικές Προτάσεις.....	104
Συμμετοχή σε Συνέδρια.....	105
Βιβλιογραφία.....	107

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Δώδεκα αρχές της Πράσινης Χημείας	16
Εικόνα 2: Εφαρμογές Ιοντικών Υγρών	17
Εικόνα 3: Α) Τυπικοί HBDS and HBAs για την παρασκευή DES, Β) Διάγραμμα φάσεων – Ευτηκτικό Σημείο	18
Εικόνα 4: Τρόποι παρασκευής DESs	19
Εικόνα 5: Εφαρμογές NADES	22
Εικόνα 6: : Φαρμακευτικές εφαρμογές των THEDES	23
Εικόνα 7: Φαρμακευτικές εφαρμογές των THEDES	25
Εικόνα 8: Μη συμβατική εκχύλιση βιοαποβλήτων με DES / NADES προς την ανάκτηση ενώσεων προστιθέμενης αξίας	29
Εικόνα 9: Εκχύλιση φύλλων ελιάς με NADES προς την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων	30
Εικόνα 10: Αλληλεπιδράσεις στη διασύνδεση των υδρογελών	31
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση (Α) της επίδρασης της φυσικής και χημικής διασταύρωσης στον τύπο των δεσμών που σχηματίζονται και (Β) παραδείγματα διαφορετικών τεχνικών διασταύρωσης	32
Εικόνα 12: Κατάταξη υδρογελών	33
Εικόνα 13: Υδρογέλη σε διογκωμένη κατάσταση και η υδρόφιλη δομή τους	34
Εικόνα 14: Σχέση δομής και ρεολογικής συμπεριφοράς υδρογελών για διάφορες εφαρμογές	35
Εικόνα 15: Απακετυλίωση της χιτίνης προς τον σχηματισμό χιτοζάνης	36
Εικόνα 16: Φυσική υδρογέλη με cross-linker DES.....	37
Εικόνα 17: Στάδια αντίδρασης Maillard	39
Εικόνα 18: Μεταβολή οργανοληπτικών ιδιοτήτων κατά την αντίδραση Maillard, παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η δράση της και βελτίωση ιδιοτήτων των τελικών προϊόντων	40
Εικόνα 19: Μέθοδος Παρασκευής του NADES (ανάδευση και θέρμανση)	44
Εικόνα 20: Πειραματική διαδικασία ανάκτησης εκχυλίσματος	45
Εικόνα 21: Αποτυχημένες Υδρογέλες	48
Εικόνα 22: Συμπαγείς Υδρογέλες με διαλυμένη χιτοζάνη	49
Εικόνα 23: Ξηρές Υδρογέλες μετά τη λυοφιλοποίηση	50
Εικόνα 24: Πειραματική διαδικασία παρασκευής υδρογέλης	51
Εικόνα 25: Σχηματιζόμενες Υδρογέλες με CS (20-100cps).....	51
Εικόνα 26: Υδρογέλες κατά τη διαδικασία του swelling μέσα σε ρυθμιστικά διαλύματα	52
Εικόνα 27: Υδρογέλη σε ξηρή και διογκωμένη κατάσταση κατά το swelling (10% v/v OLE – NADES & 12.5% w/v CS & 3% w/v Tween 80).....	52
Εικόνα 28: Περιοχές ομάδων σε φάσμα FT – IR	54
Εικόνα 29: Συσκευή uv-vis microplate reader και πλακίδιο 96 φρεατίων	55
Εικόνα 30: Υποβολή υδρογέλης σε ροόμετρο	57

Εικόνα 31: Ικανότητα διόγκωσης Υδρογέλης κεντρικού σημείου και αλλαγή χρώματος – αντίδραση MR	64
Εικόνα 32: Συρρίκνωση Υδρογέλης με ελάχιστη ποσότητα χιτοζάνης κατά τη διαδικασία του Swelling	68
Εικόνα 33: Αποσχηματισμός Υδρογέλης που έχει ξηραθεί σε φούρνο.....	68
Εικόνα 34: Υδρογέλη με μέγιστη ποσότητα εκχυλίσματος και χιτοζάνης κατά το swelling – Παραγωγή μελανοϊδινών από την αντίδραση MR (έντονα μαύρο χρώμα)	69
Εικόνα 35: Διογκωμένη Υδρογέλη με 10% v/v OLE – Extract & 10% w/v CS (20-100cps) & 3% w/v Tween 80	71
Εικόνα 36: Αλλαγή στο χρώμα υδρογέλης από την αντίδραση MR	73
Εικόνα 37: Διογκωμένη κατάσταση υδρογελών με διαφορετική χιτοζάνη.....	74
Εικόνα 38: Διογκωμένη υδρογέλη που υποβλήθηκε σε ρεολογικές μετρήσεις με 10% OLE - NADES, 12.5% w/v CS (20-100 cps) και 3% w/v Tween 80	97

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για τη σύνθεση των υδρογελών	42
Πίνακας 2: Χρησιμοποιούμενα όργανα για την παραγωγή και την αξιολόγηση των υδρογελών ...	42
Πίνακας 3: Αρχικά όρια περιεκτικότητας των συστατικών της υδρογέλης	48
Πίνακας 4: Όρια περιεκτικότητας των συστατικών της υδρογέλης	48
Πίνακας 5: Τελικά όρια περιεκτικότητας των συστατικών της υδρογέλης.....	49
Πίνακας 6: Προτεινόμενα Πειράματα από Design Expert	49
Πίνακας 7: Αποτελέσματα προσδιορισμού συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα	58
Πίνακας 8: Αποτελέσματα προσδιορισμού συνολικής περιεκτικότητας φλαβονοειδών ενώσεων στο εκχύλισμα	58
Πίνακας 9: Χαρακτηριστικές Ζώνες Απορρόφησης Γλυκόζης, Γαλακτικού Οξέος και NADES	59
Πίνακας 10: Περιεκτικότητες εκχυλίσματος και Tween 80 υδρογελών που περιέχουν 10% w/v CS(5-20 cps)	67
Πίνακας 11: Περιεκτικότητες εκχυλίσματος και Tween 80 υδρογελών που περιέχουν 15% w/v CS(5-20 cps)	68
Πίνακας 12: Περιεκτικότητες εκχυλίσματος και Tween 80 υδρογελών που περιέχουν 10% w/v CS(5-20 cps)	81
Πίνακας 13: Σύσταση υδρογελών που περιέχουν 15% w/v CS(5-20 cps)	82
Πίνακας 14: Χαρακτηριστικές δονήσεις παραμόρφωσης χιτοζάνης (CS (5-20cps)) και υδρογελών CS(5-20) σε συνδυασμούς περιεκτικότητας εκχυλίσματος και χιτοζάνης	90
Πίνακας 15: Χαρακτηριστικές δονήσεις παραμόρφωσης χιτοζάνης (CS (20-100cps)) και υδρογελών CS(20-100) σε συνδυασμούς περιεκτικότητας εκχυλίσματος, NADES και χιτοζάνης	91
Πίνακας 16: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικότητας των υδρογελών με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς περιεκτικότητας για το κάθε συστατικό (ποσοστό λιπιδικής υπεροξειδωσης και συγκέντρωση σε ισοδύναμα Trolox).....	94
Πίνακας 17: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικότητας - Ποσοστά δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH και ισοδύναμα Trolox	95
Πίνακας 18: Περιεκτικότητες συστατικών υδρογέλης που υποβλήθηκε σε ρεολογικές μετρήσεις	97

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Φάσμα FT-IR συστατικών του NADES και του ευτηκτικού μείγματος.....	59
Διάγραμμα 2: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλων με 10% v/v OLE – NADES & 12.5, 15 % w/v CS (5-20 cps) & 3, 4% w/v Tween 80.....	60
Διάγραμμα 3: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 2% w/v Tween 80.....	61
Διάγραμμα 4: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80.....	61
Διάγραμμα 5: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 15% v/v OLE – NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80 (κεντρικού σημείου).....	62
Διάγραμμα 6: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλων με 15% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80.....	63
Διάγραμμα 7: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλων με 15% v/v OLE – NADES & 15 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80.....	63
Διάγραμμα 8: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80.....	65
Διάγραμμα 9: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 15 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80.....	65
Διάγραμμα 10: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80.....	66
Διάγραμμα 11: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλων με 10% w/v CS (5-20 cps) και 10 & 20% v/v OLE -NADES σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.....	67
Διάγραμμα 12: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλων με 15% w/v CS (5-20 cps) και 10 & 20% v/v OLE -NADES σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.....	69
Διάγραμμα 13: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80.....	70
Διάγραμμα 14: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 12.5 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80.....	70
Διάγραμμα 15: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v NADES & 10 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80.....	72
Διάγραμμα 16: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v NADES & 12.5 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80.....	72
Διάγραμμα 17: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 10% w/v CS (5-20 / 20-100 cps) & 3% w/v Tween 80.....	73
Διάγραμμα 18: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 12.5% w/v CS (5-20 / 20-100 cps) & 3% w/v Tween 80.....	73
Διάγραμμα 19: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 4% w/v Tween 80.....	75
Διάγραμμα 20: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 2% w/v Tween 80.....	75

Διάγραμμα 21: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80	76
Διάγραμμα 22: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης κεντρικού σημείου με 15% v/v OLE – NADES & 12.5% w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80	77
Διάγραμμα 23: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 15% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80.....	77
Διάγραμμα 24: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 15% v/v OLE – NADES & 15 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80.....	78
Διάγραμμα 25: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80	79
Διάγραμμα 26: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 15 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80	79
Διάγραμμα 27: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80.....	80
Διάγραμμα 28: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% w/v CS (5-20 cps) και 10 & 20% v/v OLE -NADES σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.....	81
Διάγραμμα 29: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 15% w/v CS (5-20 cps) & 20% v/v OLE -NADES σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.....	82
Διάγραμμα 30 : Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80	83
Διάγραμμα 31: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 12.5 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80	84
Διάγραμμα 32: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v NADES & 10 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80.....	85
Διάγραμμα 33: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v NADES & 12.5 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80.....	85
Διάγραμμα 34: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 10% w/v CS (5-20 / 20-100 cps) & 3% w/v Tween 80	86
Διάγραμμα 35: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 12.5% w/v CS (5-20 / 20-100 cps) & 3% w/v Tween 80	86
Διάγραμμα 36: Φάσμα FT-IR CS(5-20cps) και υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 10, 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 3% w/v Tween 80	87
Διάγραμμα 37: Φάσμα FT-IR CS(5-20cps) και υδρογέλης με 15% v/v OLE – NADES & 12.5% w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80	88
Διάγραμμα 38: Φάσμα FT-IR CS(5-20cps) και υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 10, 15% w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80	88
Διάγραμμα 39: Φάσμα FT-IR CS(20-100cps) και υδρογελών με 10% v/v OLE – NADES & 10 / 12.5% w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80	89
Διάγραμμα 40: Φάσμα FT-IR CS(20-100cps), NADES και υδρογελών με 10% v/v NADES & 10 / 12.5% w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80	89
Διάγραμμα 41: Ποσοστά λιπιδικής υπεροξειδωσης των Υδρογελών με CS (5-20cps)	92
Διάγραμμα 42: Ποσοστά λιπιδικής υπεροξειδωσης των Υδρογελών με CS (20-100 cps).....	93

Διάγραμμα 43 : Καμπύλες TGA Υδρογέλων με 10% v/v OLE – NADES / NADES & 10% w/v / 12.5% w/v CS (20-100cps) & 3% w/v Tween 80	96
Διάγραμμα 44: Καμπύλη ροής της υδρογέλης	98
Διάγραμμα 45: Προσδιορισμός γραμμικής ιξωδοελαστικής περιοχής της υδρογέλης κατά την επιβολή δυνάμεων παραμόρφωσης.....	99
Διάγραμμα 46: Ρεολογική συμπεριφορά υδρογέλης κατά την άσκηση παραμόρφωσης	99
Διάγραμμα 47: Ρεολογική συμπεριφορά υδρογέλης σε εύρος συχνοτήτων	100

Συντομογραφίες

LA	Γαλακτικό Οξύ
Glu	Γλυκόζη
Glu / LA / W	Γλυκόζη / Γαλακτικό οξύ / Νερό (NADES)
DES	Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες
NADES	Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες
THEDES	Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες
HBA	Δέκτης Δεσμών Υδρογόνου
HBD	Δότης Δεσμών Υδρογόνου
OLE	Olive Leaf Extract
OLE – NADES	Εκχύλισμα
CS	Χιτοζάνη
MR	Maillard
SR	Ικανότητα διόγκωσης (Swelling Ratio)
WR	Ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Retention)
FT-IR	Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier
UV-VIS	Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού
AAPH	2,2' - αζωδισ - (2 -αμιδινοπροπάνο) - διϋδροχλωρίδιο
DPPH	2,2-διφαινύλ-1-πικρυλυδραζύλιο
TGA	Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση
DSC	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης
¹ H-NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
G'	Συντελεστής Ελαστικότητας
G''	Συντελεστής Ιξώδους

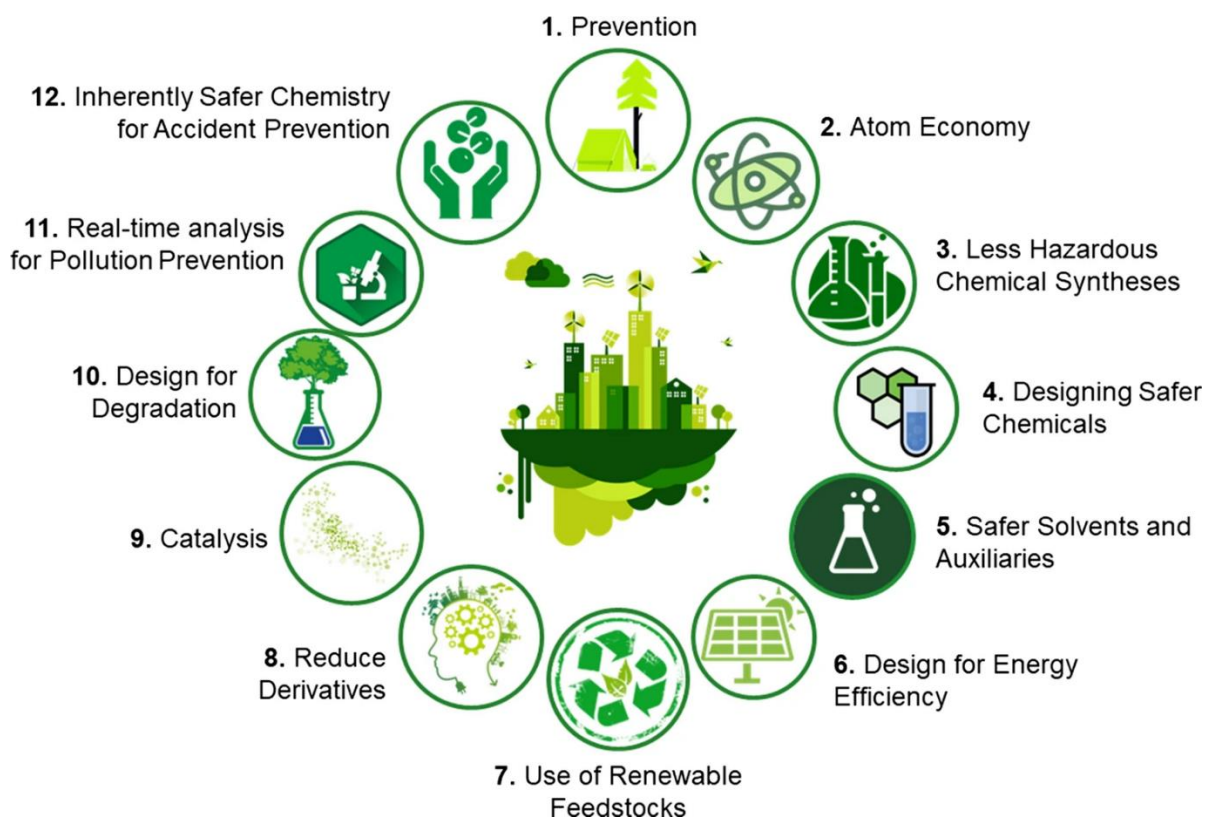
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Πράσινη Χημεία

Η αλόγιστη βιομηχανική ανάπτυξη των τελευταίων δεκαετιών έχει δραματικές επιπτώσεις τόσο προς το περιβάλλον όσο και προς τον άνθρωπο, καθώς οι συνθετικές χημικές ουσίες που απελευθερώνονται έχουν ως αποτέλεσμα την περιβαλλοντική ρύπανση και την καταστροφή οικοσυστημάτων, ενώ η τοξικότητα τους προκαλεί προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία. Για την αντιμετώπιση αυτών των κινδύνων, κρίνεται απαραίτητη η στροφή σε εναλλακτικές πράσινες λύσεις που αποσκοπούν στην πρόληψη της ατμοσφαιρικής ρύπανσης και στη βιώσιμη ανάπτυξη. Η πράσινη χημεία αποτελεί μια καινοτόμα προσέγγιση στην χημική έρευνα, την ανάπτυξη και τον σχεδιασμό χημικών διεργασιών που στοχεύει στην ελαχιστοποίηση των αποβλήτων, στην μείωση ή και εξάλειψη της χρήσης και παραγωγής επικίνδυνων ουσιών, καθώς και στην βέλτιστη αξιοποίηση των ενεργειακών πόρων. Η επέκταση και υιοθέτηση της πράσινης χημείας με εναλλακτικές πρώτες ύλες και μεθοδολογίες και εναλλακτικούς διαλύτες σε βιομηχανική κλίμακα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση κερδοφόρων διεργασιών και την προστασία της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος [1]–[3].

Η πράσινη χημεία απαρτίζεται από δώδεκα αρχές, οι οποίες στοχεύουν στην μειωμένη παραγωγή αποβλήτων, την εξοικονόμηση ενέργειας και συνεπώς την μείωση του κόστους και την ελάττωση του κινδύνου και της τοξικότητας, καθώς τα εμπλεκόμενα υλικά προέρχονται από ανανεώσιμες μη τοξικές πρώτες ύλες [1]–[5]. Οι δώδεκα αρχές παρουσιάζονται αναλυτικά στην *Εικόνα 1*. Καθώς η χημική βιομηχανία συνεχίζει να εξελίσσεται, είναι σημαντικό να δοθεί προτεραιότητα στη βιωσιμότητα και να ενσωματωθούν οι αρχές της πράσινης χημείας σε όλες τις πτυχές του σχεδιασμού και της σύνθεσης χημικών προϊόντων.

Για τον προσδιορισμό του πράσινου χαρακτήρα των χημικών διεργασιών χρησιμοποιούνται πράσινοι δείκτες, οι οποίοι ποσοτικοποιούν την αποτελεσματικότητα των εφαρμογών των πράσινων αρχών. Για την αρχή της πρόληψης παραγωγής αποβλήτων και της αποδοτικής χρήσης των πρώτων υλών χωρίς απώλειες χρησιμοποιείται ο περιβαλλοντικός παράγοντας (E factor), ο οποίος επιτρέπει τη σύγκριση των διεργασιών και παρέχει σφαιρική αξιολόγηση της συνολικής διεργασίας σχετικά με τις περιβαλλοντικές της επιπτώσεις. Μια άλλη σημαντική παράμετρος που χρησιμοποιείται ως δείκτης μέτρησης της περιβαλλοντικής συμπεριφοράς μιας σύνθετης διεργασίας είναι η οικονομία ατόμων, όπου αποτυπώνει κατά πόσο οι συνθετικές μεθοδολογίες ενσωματώνουν όλα τα αντιδρώντα στο τελικό προϊόν, ενώ λαμβάνεται υπόψιν ο σχηματισμός παραπροϊόντων. Για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας των διεργασιών εκτιμάται η αποτελεσματική απόδοση μάζας, όπου συνυπολογίζει τις ποσότητες των επικίνδυνων συστατικών, ενώ για την αξιοποίηση των πρώτων υλών χρησιμοποιείται η αποδοτικότητα μάζας αντίδρασης. Επιπλέον, πρόσφατοι δείκτες ενέργειας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το πόσο ενεργοβόρα είναι η διεργασία. Η μείωση του αριθμού των σταδίων για την παραγωγή χημικών προϊόντων συγκεκριμένης δομής ή λειτουργικότητας εξασφαλίζει υψηλότερη απόδοση για όλους τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για την αποτύπωση του χαρακτήρα των διεργασιών.



Εικόνα 1: Δώδεκα αρχές της Πράσινης Χημείας [5]

1.2 Πράσινοι Διαλύτες

Τα τελευταία χρόνια, στο πλαίσιο της προσπάθειας για βιωσιμότητα και πράσινη ανάπτυξη, έχει γίνει επιτακτική η εύρεση νέων βιώσιμων λύσεων για τα προβλήματα που προκύπτουν από τη χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών κατά τις παραγωγικές διαδικασίες. Τέτοιες λύσεις αποτελούν οι πράσινοι διαλύτες, όπως οι βελτιωμένοι καταλύτες, τα υπερκρίσιμα ρευστά, τα ιοντικά υγρά (Ionic Liquids) και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents), οι οποίοι θεωρούνται αποτελεσματικοί, ανακυκλώσιμοι, βιοαποικοδομήσιμοι, σταθεροί και ασφαλέστεροι διαλύτες, συγκριτικά με τους κοινώς χρησιμοποιούμενους οργανικούς. Η αντικατάσταση των πετροχημικών διαλυτών με τους εναλλακτικούς πράσινους αποτελεί στόχο της χημικής βιομηχανίας για ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικότερων διεργασιών και για εξοικονόμηση πόρων.

1.2.1 Ιοντικά Υγρά (Ionic Liquids)

Τα ιοντικά υγρά αποτελούνται αποκλειστικά από ιόντα, κυρίως από οργανικά κατιόντα και οργανικά ή ανόργανα ανιόντα, ενώ παρουσιάζουν σημείο τήξεως $< 100^{\circ}\text{C}$, το οποίο εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το μέγεθος, η συμμετρία των ιόντων και η δυνατότητα δημιουργίας διαμοριακών δεσμών υδρογόνου. Γενικά, έχουν την ικανότητα να παραμένουν σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή και χαμηλότερη, καθώς η δομή τους συντελεί στην μείωση της ενέργειας πλέγματος. Με κατάλληλη επιλογή ιόντων σχεδιάζονται ιοντικά υγρά που παρουσιάζουν ανάλογες ιδιότητες για συγκεκριμένες διεργασίες [6]–[8]. Επομένως, λόγω της ποικιλομορφίας της δομής τους, εκτός από εναλλακτικοί διαλύτες, δρουν ταυτόχρονα ως διαλύτες και καταλύτες, συμπεριφέρονται ως πολυλειτουργικές ενώσεις, σταθεροποιητικοί παράγοντες για καταλύτες και ενδιάμεσα προϊόντα.

Διακρίνονται ανάλογα των ιόντων από τα οποία αποτελούνται, του σημείου τήξεως και του τρόπου παρασκευής τους.

Δύο ευρείες κατηγορίες αποτελούν τα Πρωτικά και Απρωτικά ΙΥ, τα οποία, εν προκειμένω, διαχωρίζονται βάσει της χημικής τους συμπεριφοράς. Τα Πρωτικά ΙΥ σχηματίζονται μέσω αντίδρασης μεταφοράς πρωτονίου μεταξύ οργανικού οξέος και βάσης κατά Brsted, χωρίς να απαιτείται στάδιο καθαρισμού, ενώ τα Απρωτικά δεν διαθέτουν ευκίνητα πρωτόνια, ενώ για τη σύνθεσή τους απαιτούνται αντιδράσεις πολλαπλών σταδίων και καθαρισμός [8], [9]. Τα περισσότερα Πρωτικά ΙΥ έχουν χαμηλό ιξώδες και υψηλή αγωγιμότητα, ενώ τα Απρωτικά έχουν μικρή αγωγιμότητα και χαρακτηρίζονται συχνά ως τοξικά.

Στην πλειονότητα τους τα Ιοντικά Υγρά χαρακτηρίζονται από χαμηλή τάση ατμών και υψηλά ιξώδη, ενώ δεν είναι εύφλεκτα όπως οι οργανικοί διαλύτες. Επιπλέον, θεωρούνται χημικά και θερμικά σταθερά υγρά και διακρίνονται από υψηλή διαλυτική ικανότητα. Λόγω των ευμετάβλητων ιδιοτήτων τους και της πολυλειτουργικότητάς τους έχουν βρει πολυάριθμες εφαρμογές σε ευρύ φάσμα επιστημονικών πεδίων, όπως η σύνθεση και η κατάλυση, η αναλυτική χημεία, η ηλεκτροχημεία, η φαρμακευτική και βιολογία, ενώ χρησιμοποιούνται σε διεργασίες διαχωρισμού και εκχύλισης. Ωστόσο, παρουσιάζουν προβλήματα τοξικότητας, μη αποτελεσματικής βιοαποικοδομησιμότητας και βιοσυσσώρευσης, με αποτέλεσμα να μην είναι αποδεκτή η χρήση τους και η επέκτασή τους [6], [7]. Επομένως, συντίθενται ΙΥ με ανάλογα δομικά χαρακτηριστικά, τα οποία καθιστούν τους διαλύτες λιγότερο τοξικούς και βιοαποικοδομήσιμους, ώστε να διευρύνουν το φάσμα εφαρμογών τους.



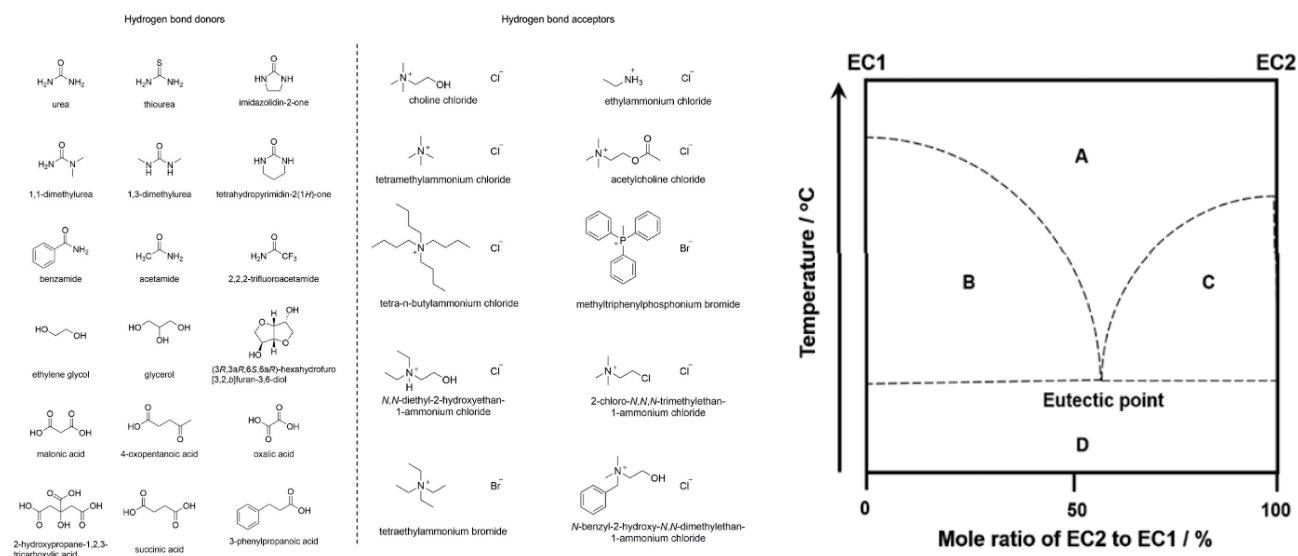
Εικόνα 2: Εφαρμογές Ιοντικών Υγρών [10]

1.2.2 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents - DES)

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούν μια νέα γενιά ΙΥ με υποσχόμενο φάσμα καινοτόμων εφαρμογών που οφείλεται στον πράσινο τους χαρακτήρα, στις βελτιωμένες ιδιότητές τους, συγκριτικά με τις προηγούμενες γενεές και στα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν, σε σχέση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες [6], [11], [12].

Αποτελούν ομοιογενή μείγματα, τουλάχιστον δύο συστατικών, υγρών ή στερεών, τα οποία προκύπτουν από την ανάμειξη δότη (Hydrogen Bond Donor) και δέκτη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor) σε συγκεκριμένες αναλογίες [11]–[17]. Τα DES μπορούν να σχηματιστούν από ένα ευρύ φάσμα συστατικών, συμπεριλαμβανομένων οργανικών οξέων, αμιδίων, αλκοολών και αλάτων, με την χλωριούχο χολίνη να αποτελεί τον συνηθέστερο δέκτη, ενώ οξέα και αλκόολες τους

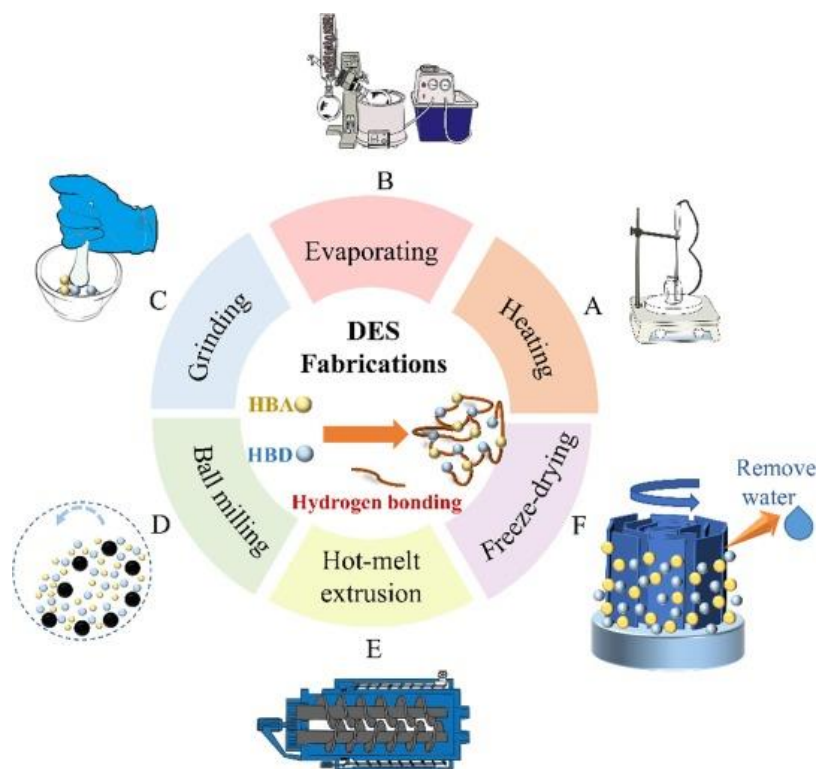
συνθέστερους δότες [13]. Τα συστατικά των DES αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις, κυρίως με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals και δημιουργούν μια νέα ευτηκτική φάση, η οποία χαρακτηρίζεται από σημαντικό μειωμένο σημείο τήξεως. Η διαφορά στα σημεία τήξεως των DES και των επιμέρους συστατικών οφείλεται στο πυκνό δίκτυο δεσμών υδρογόνου του ευτηκτικού μείγματος [13]–[16]



Εικόνα 3: Α) Τυπικοί HBDs and HBAs για την παρασκευή DES, Β) Διάγραμμα φάσεων – Ευτηκτικό Σημείο [17], [18].

Μετά την ανάμειξη, ακολουθείται ήπια θέρμανση (συμβατική / με υπερήχους) ή λυοφιλοποίηση ή και λειοτρίβηση ανάλογα της εφαρμογής [13]. Κατά τη διαδικασία παρασκευής τους, δεν παράγονται παραπροϊόντα και απόβλητα, ούτε απαιτείται κάποιο στάδιο καθαρισμού [11], [13]. Η μεθοδολογία παρασκευής των DES περιγράφεται από χαμηλό ενεργειακό και οικονομικό κόστος, θεωρείται απλή και πράσινη, καθώς χαρακτηρίζεται από μεγάλη οικονομία ατόμου, μηδενικές εκπομπές και πολύ μικρές τιμές E factor.

Η θερμική επεξεργασία αποτελεί την πιο πρακτική και διαδεδομένη προσέγγιση παρασκευής, κυρίως για θερμοσταθερές πρώτες ύλες, η οποία διαρκεί 1-4h και δεν ξεπερνά τους 80°C [13]–[15], [17]. Στην περίπτωση θερμοευαίσθητων συστατικών προτιμάται η μέθοδος της άλεσης, ενώ παρασκευάζονται DES με λυοφιλοποίηση όταν είναι επιθυμητή η απομάκρυνση του νερού από το σύστημα και συνεπώς η τροποποίηση ιδιοτήτων [13].



Εικόνα 4: Τρόποι παρασκευής DESs [13]

Οι ποικίλες ιδιότητες των DES αυξάνουν το πεδίο εφαρμογής τους εργαστηριακά, ενώ τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται και σε ευρείες κλίμακες [11]. Οι DES έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά και φυσικοχημικές ιδιότητες με τα ΙΥ, όπως υψηλή θερμική και χημική σταθερότητα, μη ευφλεκτότητα, ενώ διαλύονται σε αυτούς τόσο πολικές, όσο και μη πολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να κρίνονται κατάλληλοι διαλύτες σε διεργασίες διαχωρισμού [13], [15]–[17]. Ωστόσο, οι DES υπερτερούν ως προς τα ΙΥ, καθώς η σύνθεσή τους είναι ευκολότερη σε μικρές και μεγάλες κλίμακες, χάρη στο χαμηλό τους κόστος. Είναι βιοαποικοδομήσιμοι και βιοσυμβατοί διαλύτες, καθώς και λιγότερο ή και μη τοξικοί, εφόσον παρασκευάζονται από λιγότερο ή και μη τοξικές και ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από χαμηλή τάση ατμών και υψηλό ιξώδες, το οποίο αποδίδεται στο εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών, ενώ η κατάλληλη επιλογή αυτών δίνει τις επιθυμητές ιδιότητες στο σύστημα ανάλογα με την εφαρμογή. Έτσι, χαρακτηρίζονται ως designer solvents, καθώς το σύστημα σχεδιάζεται κατάλληλα σύμφωνα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε διεργασίας [11], [13], [15], [17]. Στην περίπτωση που το νερό είναι μέρος του συστήματος, ενσωματωμένο στη διαμοριακή δομή, μπορεί να ρυθμίσει ανάλογα τις φυσικοχημικές ιδιότητες, καθώς μειώνει το ιξώδες και το σημείο τήξης του συστήματος και μεταβάλλει την πολικότητα, την αγωγιμότητα, την πυκνότητα, καθώς και τη διαλυτική ικανότητα των DES [13], [15]. Σημειώνεται, επίσης, ότι τα DES τείνουν να εμφανίζουν πολύ υψηλές θερμοχωρητικότητες, το οποίο θεωρείται πολύτιμο πλεονέκτημα για πολλές διεργασίες.

Οι DES είναι μια νέα τεχνολογία που υπέστη σημαντική πρόοδο στην οργανική σύνθεση, την επιστήμη υλικών, την νανοτεχνολογία, την ηλεκτροχημεία, την κατάλυση και την φαρμακευτική και αξίζει να επεκταθεί σε πιο πολλούς επιστημονικούς κλάδους και πεδία, αλλά και σε διεργασίες παραγωγής μεγαλύτερης κλίμακας, καθώς παρουσιάζουν θετική προοπτική ως προς το περιβαλλοντικό αποτύπωμα και τον άνθρωπο [11], [13]. Διακρίνονται βάσει των συστατικών που περιέχουν και των ιδιοτήτων που διαθέτουν, ενώ λόγω του τεράστιου συνδυασμού ενώσεων που μπορούν να συνθέσουν DES αποτελούν συνεχώς αναπτυσσόμενο πεδίο μελέτης. Σύγχρονα αναπτυσσόμενα πεδία αποτελούν οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents), οι θεραπευτικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Therapeutic Deep Eutectic Solvents) και οι πολυμεριζόμενοι (Polymerizable Deep Eutectic Solvents).

1.2.3 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents – NADES)

Οι NaDES είναι μια νέα τάξη DES που απαρτίζονται από μη τοξικά, ανανεώσιμα φυσικά συστατικά, όπως οργανικά οξέα, αμινοξέα, σάκχαρα, βάσεις και πολυαλκοόλες, και αποτελούν μια νέα λύση για τη δημιουργία νέων και λειτουργικών ενεργών συστατικών που οδηγεί προς τη βιωσιμότητα [13], [16], [17].

Είναι συστήματα με υψηλές ικανότητες διάλυσης, καθώς διαλύουν δυσδιάλυτα συστατικά και βιοδραστικά μόρια, με αποτέλεσμα να κρίνονται κατάλληλοι διαλύτες για τη διεργασία της εκχύλισης, αυξάνοντας σημαντικά τις αποδόσεις του συστήματος [14], [16], [17]. Εξαιτίας του δικτύου δεσμών υδρογόνου που σχηματίζεται στη δομή τους, δρουν ως μέσα διαλυτοποίησης, σταθεροποίησης, αλλά και διασύνδεσης ευπαθών ενώσεων και φαρμακευτικών μορίων, ενώ παράλληλα λειτουργούν ως προστατευτικά μέσα ως παράγοντες διασταύρωσης σε υδρογέλες [13], [14]. Συνεπώς, επεκτείνεται η χρήση τους στην οργανική σύνθεση, στην ηλεκτροχημεία, στην εκχύλιση φυσικών πρώτων υλών και την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων, σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις, στην νανοτεχνολογία και σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Επιπλέον, η δυνατότητα επιλογής των συστατικών τους, τα οποία είναι ασφαλή και φυσικά, αλλά και προσαρμογής των ιδιοτήτων τους, επιτρέπουν την χρήση τους στα καλλυντικά και στα τρόφιμα.

Όπως και τα ΙΥ, έτσι και οι NADES, χαρακτηρίζονται από χαμηλή τάση ατμών, χημική και θερμική σταθερότητα και μη αναφλεξιμότητα, ενώ οι τελευταίοι αποτελούν βιοαποικοδομήσιμα συστήματα που μπορούν να ανακυκλωθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν. Επιπρόσθετα, εξαιτίας του χαμηλού οικονομικού και ενεργειακού κόστους παραγωγής έχουν τη δυνατότητα ανακλιμάκωσης και διεύρυνσης του φάσματος εφαρμογών τους [13]–[15].

Οι NADES διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες, ανάλογα με τα συστατικά που αποτελούνται:

- NaDES με ένα οξύ ή μια βάση
- NaDES μόνο με σάκχαρα ή σάκχαρα και πολυαλκοόλες
- NADES με οργανικά οξέα και σάκχαρα ή πολυαλκοόλες
- NADES με οργανικές βάσεις και σάκχαρα ή πολυαλκοόλες
- NADES με αμινοξέα και οργανικά οξέα ή σάκχαρα

Η επιλογή των NADES προσφέρει μία μεγάλη ευελιξία, τόσο στην επίτευξη συγκεκριμένων στόχων και επιθυμητών φυσικοχημικών ιδιοτήτων σε μία διεργασία, όσο και στην ανάπτυξη βιομηχανικών εφαρμογών, τροποποιώντας μόνο την σύσταση ή ορισμένα από τα συστατικά του διαλύτη [17].

1.2.3.1 Παραδείγματα χρήσης των DES και NADES

Από την πρώτη αναφορά των DES κατά τις αρχές του 21ου αιώνα μέχρι και σήμερα, έχουν εξεταστεί ποικίλοι τρόποι ένταξης των μειγμάτων αυτών σε παραγωγικές διαδικασίες. Η έρευνα πάνω στα ΙΥ γενικότερα, οδήγησε σε νέες δυνατότητες και προοπτικές καινοτόμων εφαρμογών. Ενδεικτικοί κλάδοι εφαρμογής τους ως πράσινη πρακτική είναι η σύνθεση και κατάλυση, η ηλεκτροχημεία, η αναλυτική χημεία, η μηχανική, ενώ χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικές και βιολογικές εφαρμογές και σε διεργασίες διαχωρισμού και εκχύλισης. Χρησιμοποιούνται, μεταξύ άλλων, τόσο για να κατευθύνουν την αντίδραση, άρα και τον σχεδιασμό μιας βιοκαταλυτικής δράσης, όσο και για τον διαχωρισμό και απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος κατά το downstream processing [19]. Ορισμένες από αυτές τις εφαρμογές παρουσιάζονται παρακάτω.

1.2.3.1.2 Κατεύθυνση Βιομετατροπών προς μεγαλύτερες αποδόσεις - smart cosubstrates

Ορισμένες ενζυμικές αντιδράσεις, καταλύόμενες από λιπάση ή πεπτιδάση προς ποικίλα βιοτεχνολογικά προϊόντα χρησιμοποιούν NADES ως διαλύτες ή συνδιαλύτες με σκοπό την

μεγιστοποίηση της ανάκτησης. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η έρευνα προσανατολίζεται στην ανάπτυξη NADES που παρουσιάζουν διπλό ρόλο και λειτουργούν ως διαλύτες και ταυτόχρονα ως υπόστρωμα της βιοκατάλυσης, χωρίς να υπονομεύουν την δραστικότητα και διαλυτότητα του ενζύμου (λόγω αυξημένων συγκεντρώσεων υποστρώματος) [20]. Ιδιαίτερα υποσχόμενη εφαρμογή είναι η μερική χρήση ως συν-υποστρώματα, όπως για παράδειγμα κατά την καταλυόμενη αναγωγή κετονών και αλδευδών από την αλκοολική αφυδρογονάση [21]. Τέλος, οι NADES μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως απλά πρόσθετα για βελτίωση της σταθερότητας των ενζύμων, όπως κατά την βιομετατροπή της 1-φαινυλαιθανόλης και ενθυλάκωση ενζύμου β-λιπάσης (από τον σακχαρομύκητα *Candida antarctica*) σε μήτρα sol-gel [22].

1.2.3.1.3 Παρασκευή βιοαποικοδομήσιμων και βιοσυμβατών φιλμ χιτοζάνης

Η χιτοζάνη (Chitosan) είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης, στον οποίο εμπεριέχονται ένα μόριο D-γλυκοζαμίνης και ένα N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης, συνδεδεμένα με β-(1-4) γλυκοζιτικό δεσμό. Με τη χρήση μείγματος NADES με χλωριούχο χολίνη (ChCl) και γαλακτικό οξύ (LA) είναι δυνατή η παρασκευή βιοπολυμερούς χιτοζάνης με καθορισμένη κρυσταλλική δομή. Στο επιθυμητό προϊόν, μπορούν να προσαρμοστούν αποτελεσματικά η αγωγιμότητα, ο βαθμός κρυσταλλικότητας (με έλεγχο της διόγκωσης κατά την παραγωγή - μεγάλη αλληλεπίδραση με το NADES οδηγεί σε μικρότερο βαθμό), η διαπερατότητα, η σταθερότητα και γενικά η μορφολογία του πολυμερούς [23].

1.2.3.1.4 Ανάπτυξη προϊόντων με ενισχυμένη βιολογική δράση

Ορισμένα NADES, αποτελούμενα από συγκεκριμένα εκχυλίσματα, έχουν την δυνατότητα να απομονώσουν τους πιο πολύτιμους μεταβολίτες ενός φυτικού κυττάρου, σε αντίθεση με τους συμβατικούς διαλύτες. Μέσω αυτής της βιομημητικής εκχύλισης μπορούν να παρασκευαστούν καλλυντικά σκευάσματα με ενισχυμένο φυτοδραστικό προφίλ και βελτιωμένη απόδοση (παραδείγματος χάριν αντιγηραντικές κρέμες) [24].

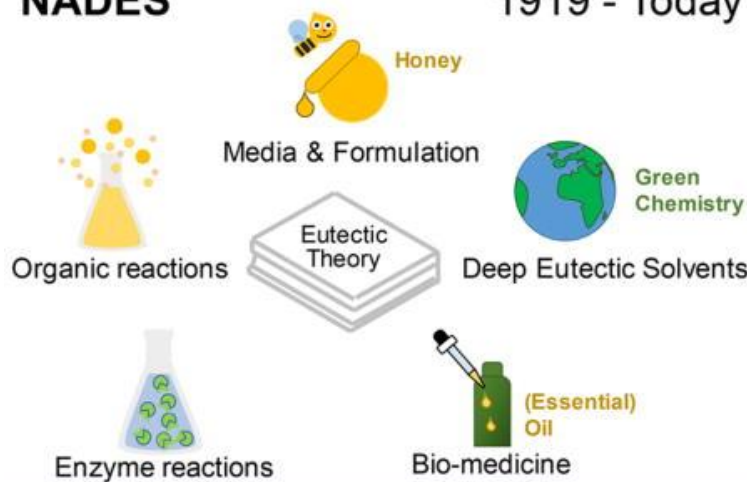
1.2.3.1.5 Το μέλι ως σύγχρονο βιοϋλικό

Το μέλι αποτελεί ίσως τον πιο κλασικό NADES που συναντάται στον κλάδο της ιατρικής και της φαρμακοτεχνίας. Λόγω των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων, παρουσιάζει ακόμα και σήμερα σπουδαίες προοπτικές για την σύγχρονη επιστήμη, όπως στην ενσωμάτωση NADES σε συστήματα απελευθέρωσης/χορήγησης φαρμάκων (drug delivering) [25].

1.2.3.1.6 Δέσμευση Διοξειδίου του Άνθρακα από αέριες εκπομπές

NADES που περιέχουν κυανοπυρρολίδιο ιμιδαζολίου (imidazolium cyanopyrrolide) και αιθυλενογλυκόλη (ethylene glycol) μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε διαχωρισμούς αέριων ρευμάτων που περιέχουν CO_2 , με σκοπό την απομόνωση και περαιτέρω αξιοποίηση του. Πιο συγκεκριμένα, λειτουργούν ως διαλύτες σε διεργασίες χημικής απορρόφησης (reactive absorption) και μελλοντικά μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη συστημάτων άμεσης δέσμευσης αερίων σε πραγματικό χρόνο [26].

Natural Deep Eutectic Solvents NADES 1919 - Today



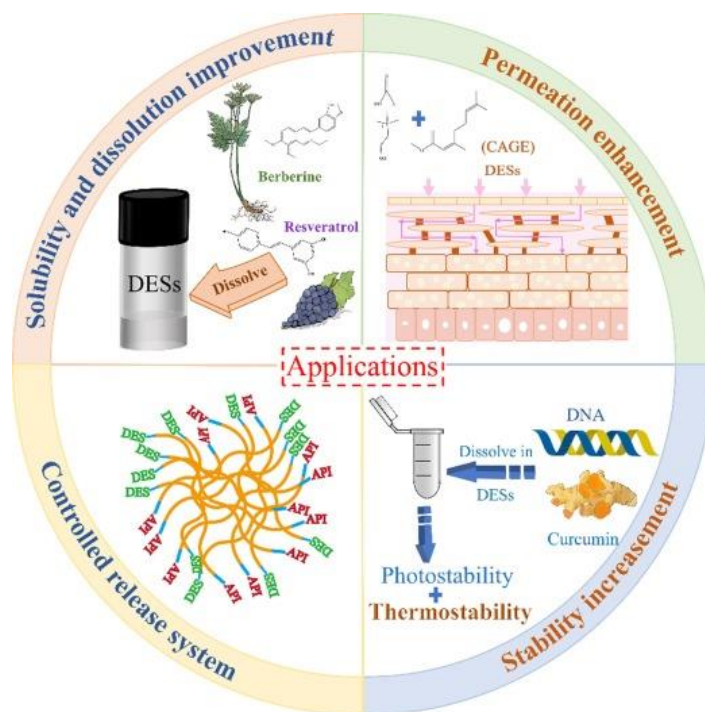
Εικόνα 5: Εφαρμογές NADES [18]

1.2.4 Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Therapeutic Deep Eutectic Solvents–THEDES)

Οι Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες αποτελούν υποσύνολο των DES που έχει αναδειχθεί σε φαρμακευτικές και βιολογικές εφαρμογές ως μια εναλλακτική και μη τοξική λύση για την ανάπτυξη και σύνθεση νέων φαρμακευτικών προϊόντων. Το σύστημα των THEDES απαρτίζεται από ένα ενεργό δραστικό συστατικό ή λειτουργεί ως μέσο / φορέας φαρμακευτικών μορίων που διασπείρονται σε αυτό και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας [13].

Η χλωριούχος χολίνη και η μενθόλη αποτελούν τους συνηθέστερους δέκτες πρωτονίων για τη σύνθεση των THEDES, καθώς μπορούν να συνδυάσουν δραστικές ενώσεις. Για παράδειγμα, μείγμα από μενθόλη και λιπαρά οξέα ανθρακικής αλυσίδας 12 έως 18 ατόμων C εμφανίζει μειωμένη κυτταροτοξικότητα σε δοκιμές κυτταρικών σειρών από ανθρώπινα δερματικά κύτταρα, ενώ τα ευρήματα αναφέρουν αντιμικροβιακή δράση και δυνατότητα επούλωσης πληγών [27].

Παρόλο που ο σχεδιασμός νέων συστημάτων THEDES είναι περίπλοκος, λόγω των αλληλεπιδράσεων και των συσχετισμών των μορίων από τα οποία αποτελούνται, οι δοκιμές, αν και σε πρώιμο στάδιο, αναδεικνύουν μια υποσχόμενη εφαρμογή των διαλυτών [13], [27].



Εικόνα 6: Φαρμακευτικές εφαρμογές των THEDES [13]

Γενικότερα, έχει τονιστεί ο βιοαποικοδομήσιμος και μη τοξικός χαρακτήρας των DES και των επιμέρους συστατικών του μείγματος, ειδικά για τους διαλύτες που αποτελούνται από άλατα χολίνης ή φυσικές ενώσεις (NADES). Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες δεν συνυπολογίζουν την συνεργιστική επίδραση των συστατικών, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις έχει σημαντικό αντίκτυπο στις ιδιότητες των ευτηκτικών μειγμάτων. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η εξακρίβωση της μη τοξικότητας, αλλά και της βιοαποικοδομησιμότητάς τους, ώστε η χρήση τους σε καθορισμένες συγκεντρώσεις να είναι ασφαλής για τα φαρμακευτικά σκευάσματα.

Η δοκιμή κλειστής φιάλης είναι η πιο κοινή μέθοδος για τον προσδιορισμό της δυνατότητας βιοαποικοδόμησης, καθώς είναι κατάλληλη για ενώσεις που είναι ελάχιστα διαλυτές, πτητικές και προσροφητικές. Κατά τη δοκιμή, το DES προστίθεται σε υδατικά διαλύματα στα οποία εμβολιάζονται μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια, μύκητες και άλγη και η βιοαποικοδόμηση παρακολουθείται με τον προσδιορισμό διαλυμένου οργανικού άνθρακα, παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα ή κατανάλωσης του οξυγόνου. Στην περίπτωση που η κατανάλωση οξυγόνου είναι η παράμετρος ελέγχου, επιβεβαιώνει τον βιοαποικοδομήσιμο χαρακτήρα των DES όταν σταθεροποιηθεί στο 60% της θεωρητικής απαίτησης σε οξυγόνο σε διάστημα 14 ημερών. Σε περίπτωση, που η σταθεροποίηση δεν επιτευχθεί μετά από 28 ημέρες, τότε ο διαλύτης κρίνεται μη δυνητικά βιοαποικοδομήσιμος. Τα HBA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα αποικοδόμησης των DES, ενώ η παρουσία ομάδων που υδρολύονται, όπως υδροξυλομάδων στο HBD βελτιώνει σημαντικά τη βιοδιασπασιμότητα του συστήματος. DES με δέκτη την χλωριούχο χολίνη εμφάνισαν μεγάλο ποσοστό βιοαποικοδόμησης [28].

Μελέτες για την τοξικότητα των DES βασίζονται κυρίως σε δοκιμές κυτταροτοξικότητας *in vitro* ή βιωσιμότητας κυττάρων και δοκιμές τοξικότητας ή αντιμικροβιακής δραστηριότητας. Η αξιολόγηση της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας στα DES σχετίζεται με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Μείγματα αποτελούμενα από χλωριούχο χολίνη, συνδεδεμένα με αλκοόλες, σάκχαρα και οργανικά οξέα αποδεικνύουν χαμηλή κυτταροτοξικότητα σε κυτταρική σειρά ψαριών, ενώ η επίδραση της κυτταροτοξικότητας διαφέρει ανάλογα με τις κυτταρικές σειρές και την αναλογία των συστατικών, κυρίως την συγκέντρωση HBD. Επιπλέον, παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ των τιμών κυτταροτοξικότητας και ιξώδους των DES, με τα πιο παχύρρευστα να είναι τα πιο τοξικά. Η προσθήκη ανάλογης ποσότητας νερού, η οποία δεν αποδυναμώνει την ευτηκτικότητα, μειώνει σημαντικά το ιξώδες

και επομένως την τοξικότητα [28], [29]. Σε δοκιμές αναστολής ανάπτυξης αποδεικνύεται ότι τα DES είναι λιγότερο τοξικά από τα αρχικά υλικά τους, τα οποία εξετάζονται χωριστά, καθώς η δομή τους έχει σημαντική επίδραση. Γενικότερα, διαλύτες που αποτελούνται από αλκοόλες είναι λιγότερο τοξικοί, σε σχέση με αυτούς με οργανικά ή ανόργανα οξέα, ενώ οι φυσικής προέλευσης (NADES) έχουν ασφαλέστερα κυτταροτοξικά προφίλ [28], [29]. Σε μελέτες τοξικότητας, η μέτρηση της συγκέντρωσης που προκαλεί 50% αναστολή (IC₅₀) και της συγκέντρωσης που προκαλεί το 50% της μέγιστης απόκρισης αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους προσδιορισμού, ενώ η μοντελοποίηση των αλληλεπιδράσεων των διαλυτών και των κυτταρικών μεμβρανών ενισχύει την κατανόηση του κυτταροτοξικού μηχανισμού των πράσινων διαλυτών.

1.3 Φύλλα Ελιάς και Χρήση Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών σε Διεργασίες Εκχύλισης

1.3.1 Φύλλα Ελιάς και Βιοδραστικές Ενώσεις

Τα φύλλα ελιάς (*Olea europaea* L) παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για την υψηλή τους περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στους τομείς της φαρμακευτικής, των τροφίμων και των καλλυντικών, καθώς παρέχουν πολλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία και την ομαλή λειτουργία του οργανισμού [30]–[34]. Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί σύγχρονες τεχνολογίες που αποσκοπούν στην ανάκτηση των πολυάριθμων βιοδραστικών ενώσεων από φύλλα ελιάς με διεργασίες εκχύλισης. Η χρήση βιοαποβλήτων ως άφθονη πηγή βιοδραστικών ενώσεων μειώνει την αλόγιστη παραγωγή και συσσώρευση αποβλήτων και το συνακόλουθο περιβαλλοντικό πρόβλημα, ενώ κατορθώνεται η μετάβαση προς κυκλική οικονομία [30], [31], [33].

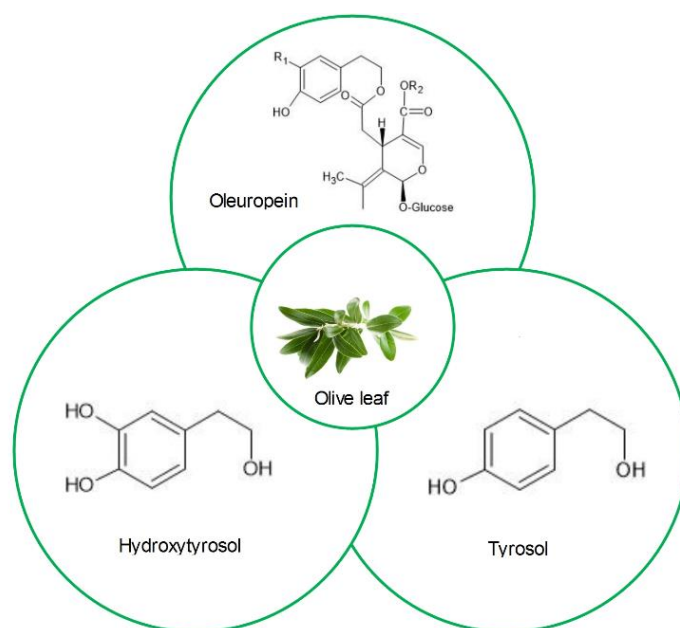
Τα φύλλα της ελιάς προέρχονται από την καλλιέργεια της ελιάς (περίπου 25 κιλά ανά δέντρο ετησίως) και ανακτώνται σε αξιοσημείωτες ποσότητες κατά την βιομηχανική παραγωγή ελαιόλαδου και κατά το κλάδεμα των ελαιόδεντρων [30]–[32]. Ειδικότερα, για την Ελλάδα, η ελαιοκαλλιέργεια αποτελεί σημαντική αγροτική δραστηριότητα, καθώς είναι η τρίτη μεγαλύτερη παραγωγός ελαιόλαδου στον κόσμο, ενώ η καλλιέργεια της ελιάς επεκτείνεται σε ολόκληρη την περιοχή της Μεσογείου [30], [31], [34]. Τα φύλλα ελιάς, αλλά και ο καρπός της θεωρούνται ευεργετικά με σημαντικές λειτουργικές ιδιότητες, καθώς αποτελούν πηγή ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Οι βιοδραστικές φαινολικές ενώσεις στα φύλλα της ελιάς λαμβάνονται συνήθως με εκχύλιση με χρήση οργανικών πολικών διαλυτών, ενώ τα τελευταία χρόνια με την ραγδαία ανάπτυξη της πράσινης χημείας, εφαρμόζονται οι πράσινοι διαλύτες, καθώς κρίνονται αποτελεσματικοί αντικαταστάτες των κοινών οργανικών. Οι φαινολικές ενώσεις ομαδοποιούνται ως σεκοϊριδοειδή (ελευρωπαΐνη), φλαβονοειδή συμπεριλαμβανομένων φλαβονών (απιγενίνη και λουτεολίνη), φλαβονόλες (ρουτίνη και κερκετίνη), φλαβανόλες (κατεχίνη) και απλές φαινόλες (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, βανιλίνη, βανιλικό οξύ, γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και βερμπασκοσίδη). Η περιεκτικότητά τους ποικίλλει στα φύλλα ελιάς ανάλογα με τον χρόνο συγκομιδής, την προέλευση και την ποικιλία της ελιάς [30], [31], [34], [35]. Η ελευρωπαΐνη, μια λιγότερο πολική ένωση, είναι η κύρια φαινολική ένωση που υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες, αντιπροσωπεύοντας μεγάλο μέρος των συνολικών φαινολικών ενώσεων στην κατηγορία των σεκοϊριδοειδών, ενώ είναι υπεύθυνη για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου, όπως η πικρή γεύση και το πικάντικο άρωμα. Η υδροξυτυροσόλη είναι μια ισχυρή πολική φαινολική ένωση στα φύλλα της ελιάς που προκύπτει από την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης [30], [32], [35].

Το εκχύλισμα φύλλων ελιάς περιέχει πολλές διαφορετικές ενώσεις που ονομάζονται συλλογικά βιοφαινόλες ελιάς, οι οποίες δρουν συνεργιστικά και δίνουν στο εκχύλισμα τις διαφορετικές θεραπευτικές του ιδιότητες [34]. Σύμφωνα με μελέτες, τα φαινολικά εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς έχουν σημαντικές *in vitro* και *in vivo* ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της ενισχυμένης αντιοξειδωτικής δράσης, των αντιπολλαπλασιαστικών επιδράσεων στα λευχαιμικά κύτταρα, των κυτταροτοξικών δράσεων κατά των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού, καθώς και αντιικές, αντι-HIV,

αντιμυκητιακές, αντιυπερτασιακές, αντιδιαβητικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες [30], [31], [34], [35]. Συγκεκριμένα, η ελευρωπαΐνη θεωρείται το πιο δραστικό συστατικό των φύλλων ελιάς, καθώς θεραπεύει οξειδωτικές και φλεγμονώδεις ασθένειες, ενώ αναστέλλει την *in vitro* ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και έχει προστατευτική και αντιθρομβωτική δράση [30], [32], [34]. Πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν, επίσης, την αντιική της δράση κατά του SARS-CoV-2 (COVID-19) [30], [32]. Επιπλέον, η υδροξυτυροσόλη, παράγωγο της ελευρωπαΐνης, επέδειξε μείωση των λιπιδίων, βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, αποτροπή της διαβητικής νευροπάθειας και σημαντική επίδραση κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων [30], [32], [34]. Οι μελέτες της ένωσης της υδροξυτυροσόλης σχετικά με τις ευεργετικές της ιδιότητες στον άνθρωπο και τις βιολογικές της δράσεις, όπως η αντιοξειδωτικότητα, οδήγησαν στον σχεδιασμό και σύνθεση νέων φαρμάκων, καθώς αποτελεί ένωση υψηλού ενδιαφέροντος για την φαρμακευτική βιομηχανία [34]. Η τυροσόλη παρουσιάζει νευροπροστατευτική δράση, ενώ αποδεικνύεται ότι αναστέλλει την δράση των βακτηρίων *Listeria monocytogenes* και *Aspergillus flavus* [34].

Η πληθώρα ευεργετικών συστατικών που βρίσκονται στα φύλλα ελιάς οδήγησε την ερευνητική κοινότητα στην εύρεση τρόπων απομόνωσης τους μέσω πράσινων διεργασιών, όπως η εκχύλιση με πράσινους διαλύτες ως εκχυλιστικά μέσα.



Εικόνα 7: Φαρμακευτικές εφαρμογές των THEDES [13]

1.3.2 Συμβατική Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων με χρήση NADES

Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης φυσικών προϊόντων είναι διεργασίες διαχωρισμού ενός ή περισσότερων συστατικών που στηρίζονται κυρίως στην χρήση οργανικών διαλυτών, όπως η ακετόνη, η αιθανόλη, ο οξικός αιθυλεστέρας, το εξάνιο, οι οποίοι είναι επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία, καθώς χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες και εντείνουν το περιβαλλοντικό πρόβλημα με την παραγωγή επικίνδυνων αποβλήτων, με αποτέλεσμα να εμποδίζουν την στροφή προς τη βιωσιμότητα [32], [36]–[38]. Έτσι, για μια πιο φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση επιστρατεύεται η πράσινη χημεία για τον σχεδιασμό κατάλληλων πράσινων και ευρείας πολικότητας διαλυτών εκχύλισης και επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίησή τους. Τέτοια συστήματα αποτελούν οι NaDES, οι οποίοι κρίνονται κατάλληλα εκχυλιστικά μέσα φυσικών πρώτων υλών, χάρη στις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά τους, ενώ η χρήση

τους ενισχύει το ολικό περιεχόμενο τους σε ενώσεις υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως φαινολικά και φλαβονοειδή [33], [36], [37]. Γενικότερα, τα NADES έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε εκχυλίσματα μεγάλης ποικιλίας δευτερογενών μεταβολιτών από φυσικές πηγές, όπως φαινολικές ενώσεις, αλκαλοειδή, σαπωνίνες, ανθρακινόνες, αιθέρια έλαια, τερπενοειδή, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και φωτοσυνθετικές χρωστικές.

Οι ισχυροί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συστατικών των NADES και των εκχυλισμένων ενώσεων αυξάνουν σημαντικά την απόδοση της διεργασίας, σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες. Επιπλέον, λόγω των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, δρουν ως σταθεροποιητικοί παράγοντες κατά της οξειδωτικής αποικοδόμησης και ως μέσα αποθήκευσης των επιθυμητών, αλλά και ευαίσθητων εκχυλισμένων βιοενεργών μορίων, με αποτέλεσμα να αποδίδονται σταθερά εκχυλίσματα ως προς τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά και την αντιοξειδωτική τους δράση [16]. Ως διαλύτες εκχύλισης, τα NADES έχουν δύο μηχανισμούς δράσης, την άμεση δράση, όπου αλληλεπιδρούν με τις ενώσεις – στόχους συνήθως με δεσμούς υδρογόνου, και την έμμεση δράση, όπου καταστρέφεται το κυτταρικό τοίχωμα και απελευθερώνεται η ένωση στόχος από την φυτική μήτρα [39].

Κατά την εκχύλιση, ο διαλύτης που χρησιμοποιείται πρέπει να πληροί τα ακόλουθα κριτήρια [39]:

- υψηλή επιλεκτικότητα – πολικότητα σύμφωνα με την ένωση στόχο
- ασφάλεια (χαμηλή τοξικότητα, μη εύφλεκτοτητα).
- εύκολος διαχωρισμός από τα εκχυλίσματα
- χαμηλή θερμοκρασία βρασμού, ώστε να αποτρέπεται η θερμική αποδόμηση
- χαμηλό ιξώδες, ώστε να διευκολύνεται η μεταφορά μάζας
- ουδέτερος διαλύτης
- οικονομικός

Στην πλειοψηφία τους οι NADES, εκτός από τα πράσινα κριτήρια που πληρούν, διαθέτουν όλα τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για να αντικαταστήσουν τους πετροχημικούς διαλύτες στην εκχύλιση, ενώ με κατάλληλες δοκιμές και ποσοτικές τροποποιήσεις στο σύστημα αποκτούν τις επιθυμητές ιδιότητες και προσαρμόζονται στις απαιτήσεις της διεργασίας. Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη ποικιλία αυτών των διαλυτών, τις πιθανές χρήσεις, την προσαρμογή και την ικανότητα εκχύλισης, η επιλογή του βέλτιστου διαλύτη εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση που χρήζει περαιτέρω μελέτη σε κάθε εφαρμογή. Το υψηλό ιξώδες των NADES μπορεί να αποτρέψει την εφαρμογή τους σε διεργασίες εκχύλισης, καθώς η μεταφορά μάζας μεταξύ του διαλύτη και της πρώτης ύλης είναι περιορισμένη, λόγω εμποδισμού διείσδυσης του διαλύτη στη μήτρα εκχύλισης. Επομένως, σε τέτοιες περιπτώσεις αργής διάχυσης, η διαδικασία της εκχύλισης να απαιτεί περισσότερο χρόνο διεξαγωγής για την αποτελεσματική ανάκτηση των επιθυμητών συστατικών. Ωστόσο, η προσθήκη ανάλογης ποσότητας νερού ή άλλου συνδυαζόμενου στο σύστημα, η οποία δεν αποδυναμώνει την ευτηκτική δομή του διαλύτη και τις διαμοριακές δυνάμεις υδρογόνου, ρυθμίζει το ιξώδες των διαλυτών και ευνοεί την ανάκτηση των εκχυλισμάτων, αυξάνοντας την απόδοση της διεργασίας [15], [32], [33], [36]–[41]. Στην περίπτωση των NADES με αμινοξέα, η προσθήκη νερού αυξάνει την πολικότητα του διαλύτη. Επιπλέον, με αύξηση της θερμοκρασίας της εκχύλισης, μειώνεται το ιξώδες του μείγματος των NADES και αυξάνεται η διαλυτική τους ικανότητα, καθώς οι υψηλότερες θερμοκρασίες, εντός επιτρεπτών ορίων για θερμοευαίσθητα συστατικά, αυξάνουν τη μοριακή κινητικότητα και επιτρέπουν στα εκχυλισμένα μόρια να διαχέονται στον διαλύτη πιο γρήγορα [15], [32], [37]–[39], [41]. Μια άλλη προσέγγιση για να ξεπεραστεί το πρόβλημα του υψηλού ιξώδους είναι η αξιοποίηση του τεράστιου αριθμού πιθανών συνδυασμών φυσικών ενώσεων που μπορούν να παράγουν NADES, προκειμένου να σχεδιαστούν διαλύτες χαμηλού ιξώδους [15].

Η δυνατότητα ρύθμισης των ιδιοτήτων του μείγματος NADES καθιστά τους διαλύτες ιδανικούς για τη διεργασία της εκχύλισης, καθώς με την επιλογή των συστατικών και την κατάλληλη αναλογία δότη και δέκτη δεσμών υδρογόνου, μπορεί να επιτευχθεί υψηλή πολικότητα και κατά συνέπεια υψηλή διαλυτότητα και επιλεκτικότητα, αλλά και υψηλή θερμοκρασία αποδόμησης, η οποία προσδιορίζεται

μέσω θερμοβαρυμετρικών αναλύσεων, ώστε να μην αμφισβητείται η θερμική σταθερότητα του διαλύτη. Σε γενικότερο πλαίσιο, σχετικά με την αναλογία HBA / HBD, αποδεικνύεται ότι μια αύξηση στην περιεκτικότητα δότη δεσμού υδρογόνου οδηγεί σε μείωση του ιξώδους του DES / NADES. Επιπλέον, αύξηση των ομάδων υδροξυλίου σε οποιοδήποτε συστατικό του ομοιογενούς μείγματος θα προωθούσε το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου που αποδίδουν ένα σημαντικά πιο σταθερό σύστημα [15], [37], [40], [41].

Για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων, οι κλασικές τεχνικές εκχύλισης που στηρίζονται σε ανάδευση ή / και θέρμανση, είναι η διαβροχή με τον διαλύτη, η υδροαπόσταξη, η διύλιση και η εκχύλιση Soxhlet. Κατά την διεργασία εκχύλισης, ο διαλύτης αρχικά διεισδύει στη μάζα του φυσικού προϊόντος, στη συνέχεια οι ενώσεις διαλυτοποιούνται στον διαλύτη και οι εκχυλισμένες ουσίες διαχέονται από την μάζα του φυσικού προϊόντος και τελικά συλλέγεται το εκχύλισμα. Είναι ευρέως γνωστό ότι η φύση του διαλύτη, η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης, αλλά και η αναλογία δείγματος – διαλύτη αποτελούν παράγοντες σχεδιασμού του συστήματος, καθώς αποφέρουν σημαντικές επιπτώσεις στις αποδόσεις της διεργασίας [36]–[39].

Για την αύξηση της αποδοτικότητας της διεργασίας, απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι διεξαγωγής, ώστε να μην παραμένουν ποσότητες ουσιών – στόχων στο δείγμα, αυξημένες θερμοκρασίες για επιτάχυνση της διαδικασίας και μεγάλοι όγκοι δειγμάτων και διαλυτών, χωρίς όμως να μειώνεται η επιφάνεια επαφής δείγματος με διαλύτη και να παρεμποδίζεται η διάχυση. Ωστόσο, η απομάκρυνση οργανικών διαλυτών από το σύστημα είναι απαραίτητη, ενώ οι χρονοβόρες και ενεργοβόρες διαδικασίες διατρέχουν τον κίνδυνο πρόκλησης δομικών αλλαγών στις ενώσεις στόχους και τους διαλύτες, έως και αποσύνθεσης τους, όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας ξεπεράσουν κατά πολύ τους 60°C, με αποτέλεσμα η απόδοση της διεργασίας να κρίνεται χαμηλή και να παραμένουν ακαθαρσίες στο εκχύλισμα [15], [36]–[38]. Στην περίπτωση των NADES ως εκχυλιστικά μέσα, δεν απαιτείται στάδιο καθαρισμού και απομάκρυνσης, καθώς οι διαλύτες μετά από δοκιμές τοξικότητας και βιοσυμβατότητας, θεωρούνται ασφαλείς προς περαιτέρω χρήση και ενσωμάτωση στα τελικά προϊόντα, ενώ η συνολική διαδικασία πραγματοποιείται σε πιο σύντομα χρονικά διαστήματα [15], [16], [32], [38], [41].

Για την αντιμετώπιση των περιορισμών της συμβατικής εκχύλισης, αναπτύσσονται και διερευνώνται νέες τεχνολογίες που αναφέρονται ως μη συμβατικές, με αναθεωρήσεις και βελτιώσεις που ανταποκρίνονται στην αγορά. Στην κατηγορία των μη συμβατικών εκχυλίσεων ανήκουν οι εκχυλίσεις με υπερήχους, ένζυμα, μικροκύματα, υπερκρίσιμα ρευστά, κλπ [32], [35], [36]. Οι σύγχρονες τεχνικές επιδιώκουν την υιοθέτηση των αρχών της πράσινης χημείας, καθώς η πρόληψη, η χρήση λιγότερο επικίνδυνων συνθετικών μεθοδολογιών, ο σχεδιασμός ασφαλέστερων προϊόντων με ασφαλέστερους διαλύτες και αντιδραστήρια, η κατάλυση και οι ενεργειακά αποδοτικότερες διεργασίες αποτελούν κανόνες σχεδιασμού για κάθε διεργασία εκχύλισης.

1.3.3 Εκχύλιση με Υπερήχους (UAE) με χρήση NADES

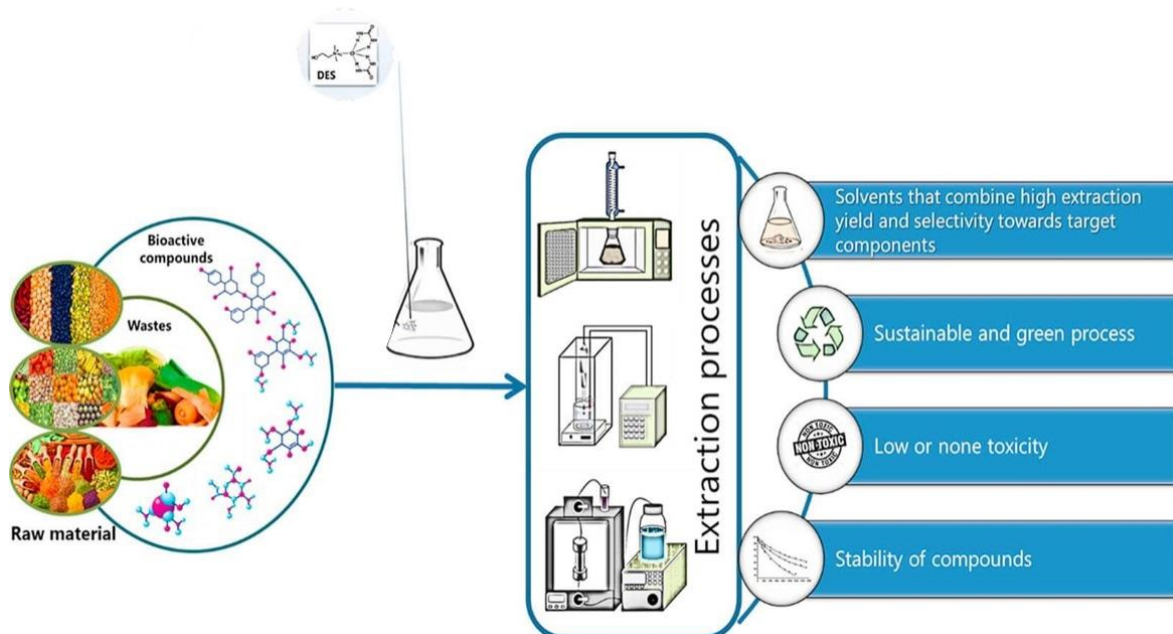
Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους – Ultrasound Assisted Extraction εντάσσεται στις τεχνικές υψηλής ενέργειας. Πρόκειται για μια καινοτόμος πρακτική με πράσινο χαρακτήρα που εντάσσεται στις μη συμβατικές διεργασίες εκχύλισης. Το εκχύλισμα που παραλαμβάνεται, χαρακτηρίζεται για την ποιότητα του, ενώ η απόδοση της διεργασίας αυξάνεται. Η ενέργεια που καταναλώνεται κατά την διαδικασία μειώνεται, καθώς απαιτούνται χαμηλότερες θερμοκρασίες για τον διαχωρισμό, οι οποίες αποτρέπουν την θερμική αποδόμηση θερμοευαίσθητων ουσιών. Ο χρόνος ανάκτησης του επιθυμητού προϊόντος μειώνεται σημαντικά, καθώς ο ρυθμός μεταφοράς μάζας βελτιώνεται, ενώ καταναλώνονται λιγότερες ποσότητες διαλυτών, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιούνται τα απόβλητα. Η εκχύλιση με υπερήχους μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα χάρη στην απλότητα της και στο χαμηλό της κόστος [14], [16], [34], [41]. Ανάλογα με την ισχύ υπερήχων, η εκχύλιση χαρακτηρίζεται ως χαμηλής και υψηλής έντασης, ενώ για την εφαρμογή υπερήχων υψηλής

έντασης χρησιμοποιείται λουτρό υπερήχων ή probe – type εξοπλισμός, όπου διασφαλίζεται ομοιόμορφη διάχυση ισχύος [34].

Η χρήση των NADES ως εκχυλιστικά μέσα τονίζει τον πράσινο χαρακτήρα της μεθόδου, ενώ ο συνδυασμός πράσινων διαλυτών και τεχνικών υψηλής ενέργειας εντείνει την αποτελεσματικότητα του συστήματος και την επιτυχή ανάκτηση των εκχυλισμάτων. Τα τελευταία, εκτός από ποιοτικά, είναι πιο σταθερά με την πάροδο του χρόνου, καθώς αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα και βιοδραστικότητα τους χάρη στις ιδιότητες των NADES να λειτουργούν ως προστατευτικά μέσα στις εκχυλισμένες βιοδραστικές ουσίες [14], [16], [39]. Η χρήση NADES στη θέση ενός συμβατικού διαλύτη, παρά την ύπαρξη του πρόσθετου σταδίου της προετοιμασίας του διαλύτη, εξαλείφει το στάδιο της απομάκρυνσης αυτού μετά τη διεργασία, καθώς αναγνωρίζονται ως βιοσυμβατοί και ασφαλείς διαλύτες. Έτσι, τα τελικά εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε εφαρμογές φαρμακευτικής, καλλυντικών και τροφίμων, χωρίς να απαιτείται στάδιο καθαρισμού ή απομόνωσης του διαλύτη, με αποτέλεσμα το οικονομικό και ενεργειακό κόστος της συνολικής διεργασίας να μειώνονται σημαντικά. Η αποδοτικότητα της εκχύλισης καθορίζεται από την αναλογία διαλύτη προς την πρώτη ύλη, την ισχύ και τον χρόνο εκχύλισης.

Στο πλαίσιο της έρευνας, όπου διερευνώνται εναλλακτικές και πιο αποτελεσματικές διαδικασίες εκχύλισης, συγκρίνονται οι κλασικές συμβατικές τεχνικές με τις τεχνικές υψηλής ενέργειας, ενώ οι τελευταίες αποδεικνύονται πολύ πιο υποσχόμενες. Όπως έχει αναφερθεί, η αποδοτικότητα του συστήματος στην περίπτωση των εκχυλίσεων με υπερήχους είναι σημαντικά υψηλότερη, καθώς η μεταφορά μάζας μέσω ακουστικής σπηλαιώσης κρίνεται πιο αποτελεσματική [32]. Ειδικότερα, η εφαρμογή υπερηχητικής ενέργειας προκαλεί το σχηματισμό και την κατάρρευση φυσαλίδων σπηλαιώσης και τη δημιουργία υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας που επιταχύνει τη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτικών πρώτων υλών, προάγοντας την απελευθέρωση του βιοενεργού περιεχομένου τους και βελτιώνοντας τη μεταφορά μάζας [14], [16]. Επομένως, η αύξηση της ισχύος υπερήχων αυξάνει την δύναμη και την ένταση της σπηλαιώσης, επηρεάζοντας θετικά τον ρυθμό μεταφοράς μάζας και κατά συνέπεια την απόδοση εκχύλισης [32], [42]. Επιπλέον, ο χρόνος που απαιτείται για την ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων στην περίπτωση της εκχύλισης με υπερήχους είναι πολύ πιο σύντομος από της συμβατικής. Συγκεκριμένα, στην εκχύλιση με υπερήχους χρειάζονται μερικά λεπτά, ενώ στην κλασική έως και 24 ώρες [42]. Επιπρόσθετα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους θεωρείται κατάλληλη και ασφαλής και για θερμοευαίσθητα συστατικά [32]. Τελικά, παραλαμβάνεται πιο ποιοτικό εκχύλισμα, καθώς τα επίπεδα φαινολικών ενώσεων αυξάνονται σε σχέση με την συμβατική εκχύλιση, ενώ η χρήση των NADES ενισχύει το περιεχόμενο τους και βελτιώνει τις ιδιότητες τους διευρύνοντας το φάσμα εφαρμογών τους.

Σε κάθε περίπτωση, διερευνώνται και εφαρμόζονται οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες της διεργασίας εκχύλισης με υπερήχους, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ανάκτηση εκχυλισμάτων και να επεκταθεί σε διεργασίες μεγαλύτερης κλίμακας. Συγκεκριμένα για την χρήση των NADES, η ποσότητα νερού που περιέχεται στο σύστημα είναι καθοριστική, όπως και η αναλογία δείγματος – διαλύτη, η θερμοκρασία και ο χρόνος της εκχύλισης [14], [38]. Οι παράγοντες, οι οποίοι θεωρούνται εξέχουσας σημασίας, καθώς συμβάλλουν στην μεγιστοποίηση της αποδοτικότητας και της ανάκτησης πολύτιμων ουσιών με βιοενεργό περιεχόμενο, συχνά βελτιστοποιούνται με χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων, μέσω των οποίων εξοικονομείται χρόνος, ενέργεια, αλλά και πόροι.



Εικόνα 8: Μη συμβατική εκχύλιση βιοαποβλήτων με DES / NADES προς την ανάκτηση ενώσεων προστιθέμενης αξίας [43]

1.3.4 Συστήματα DES / NADES για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από τα φύλλα ελιάς

Τα βιοαπόβλητα φύλλων ελιάς αποτελούν άφθονη πηγή αξιοποίησης βιοδραστικών ενώσεων με πλούσιες ιδιότητες, οι οποίες ανακτώνται μέσω της διεργασίας της εκχύλισης και ενσωματώνονται σε μια κυκλική οικονομία, καθώς χρησιμοποιούνται κυρίως σε φαρμακευτικές εφαρμογές και βιομηχανικές καλλυντικών. Η εκχύλιση των φύλλων ελιάς πραγματοποιείται με NADES συμβατικά ή και με πράσινες διαδικασίες.

Το σύστημα γλυκόζης - φρουκτόζης - νερού σε συνδυασμό με την εκχύλιση υπερήχων, απέδειξε την αποτελεσματικότητα των NADES ως εκχυλιστικά μέσα, καθώς παρουσίασε υψηλότερη επιλεκτικότητα ως προς την ανάκτηση της ελευρωπαΐνης και καφεϊκού οξέος, σε σχέση με την μεθανόλη [32].

Επιπλέον, σύστημα γλυκερόλης και γλυκίνης δοκιμάστηκε για την αποτελεσματικότητά του στην εκχύλιση αντιοξειδωτικών πολυφαινολικών από τα φύλλα ελιάς. Μετά από βελτιστοποίηση παραμέτρων, το DES αποδείχθηκε ότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό με σημαντικά αυξημένη απόδοση, σε σύγκριση με τους συμβατικούς διαλύτες, όπως η υδατική αιθανόλη και το νερό, ενώ η αντιοξειδωτική δράση του τελικού εκχυλίσματος ενισχύθηκε [33].

Για την ανάκτηση φαινολικών ενώσεων από φύλλα ελιάς, προτείνονται, επίσης, NaDES αποτελούμενα από πολυαλκοόλες ως οι καταλληλότεροι διαλύτες εκχύλισης. Ωστόσο, σύστημα DES με χλωριούχο χολίνη και αιθυλενογλυκόλη βρέθηκε ότι είναι ο βέλτιστος συνδυασμός HBA - HBD για την απομόνωση των περισσότερων από τις φαινολικές ουσίες.

Μεταξύ των NADES που αποτελούνται από οργανικά οξέα, NADES με γαλακτικό οξύ δίνει υποσχόμενα αποτελέσματα για την ανάκτηση στοχευμένων φαινολικών ενώσεων, ενώ NADES με χλωριούχο χολίνη και τρυγικό ήταν αποτελεσματικό στην εκχύλιση ελευρωπαΐνης [37].



Εικόνα 9: Εκχύλιση φύλλων ελιάς με NADES προς την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων [32]

1.4 Υδρογέλες

Οι υδρογέλες αποτελούν τρισδιάστατο δίκτυο πολυμερικών αλυσίδων που συχνά αναφέρονται ως υδρόφιλα gels με μεγάλη ικανότητα απορρόφησης νερού, η οποία οφείλεται στην υδρόφιλη δομή τους (ομάδες $-COOH$, $-OH$, $-NH_2$, $-CONH_2$, $-CONH$). Ειδικότερα, είναι κολλοειδή συστήματα που έχουν την ιδιότητα να διογκώνονται σε υδατικό μέσο, συγκρατώντας μεγάλη ποσότητα νερού σε αυτά, ενώ διατηρούν την ελαστική τους δομή και το σχήμα τους και δεν διαλύονται χάρη στις χημικές ή φυσικές αλληλεπιδράσεις με τις οποίες διασυνδέονται οι πολυμερικές μακροαλυσίδες [44]–[48]. Εξαιτίας της ικανότητάς τους να απορροφούν νερό και να διογκώνονται, μπορούν να προσομοιάσουν ιστούς του ανθρώπινου σώματος [47].

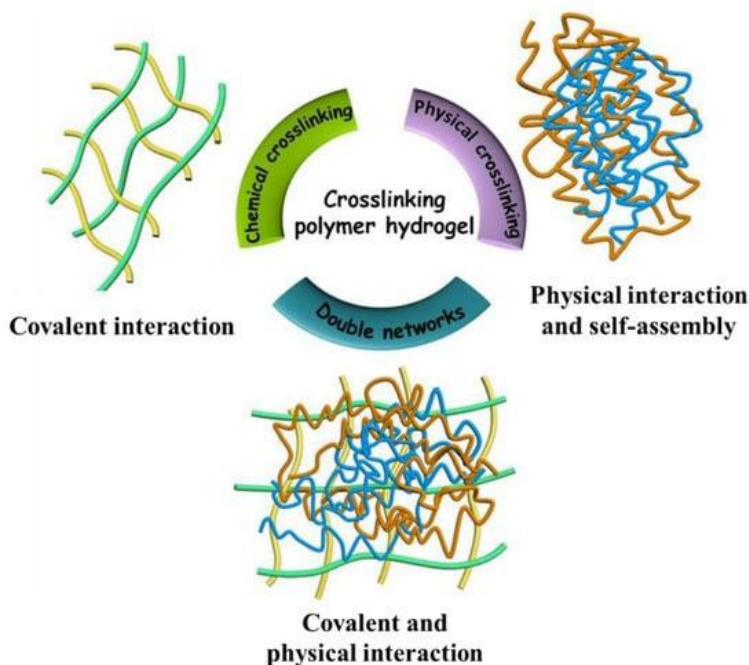
Για την παραγωγή τους, χρησιμοποιείται ευρύ φάσμα κυρίως υδατοδιαλυτών μονομερών με διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες, οι οποίες καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις κατά τον πολυμερισμό και τον σχηματισμό της υδρογέλης, την πυκνότητα των δεσμών στο σχηματιζόμενο δίκτυο, την σταθερότητα του τελικού προϊόντος και την ποσότητα νερού που μπορεί να δεσμεύσει ανάλογα με τις δυνάμεις ελαστικής αποκατάστασης και των υδρόφοβων ομάδων [44]–[47].

Αποτελούν ένα συνεχώς αναπτυσσόμενο και ενεργό πεδίο έρευνας, ενώ χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε προϊόντα υγιεινής, στη γεωργία, σε συστήματα χορήγησης φαρμάκων, στην βιομηχανία τροφίμων, στα καλλυντικά, σε βιοϊατρικές εφαρμογές, στη διάγνωση, στην οπτική, στον διαχωρισμό βιομορίων ή κυττάρων και στην βιοτεχνολογία [45]–[47]. Η κατανόηση των μηχανισμών πολυμερισμού τους συμβάλλει στον σχεδιασμό υδρογελών με βελτιωμένες ιδιότητες και συνεπώς στη διεύρυνση των εφαρμογών τους. Τα τελευταία χρόνια, υπήρξε μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη έξυπνων υδρογελών, στις οποίες ανήκουν οι «self-healing» υδρογέλες που έχουν αξιοσημείωτη μηχανική αντοχή, καθώς αναδομούνται και αποκαθιστούν την αρχική τους λειτουργία μέσω χημικών αντιδράσεων, με αποτέλεσμα να μπορούν να λειτουργήσουν ως μέσα εγκλωβισμού βιοενεργών μορίων [46], [48].

Με γνώμονα την πράσινη χημεία, επιχειρείται η στροφή προς την χρήση φυσικών πηγών και φυσικών πολυμερών, έναντι των συνθετικών, για την παρασκευή υδρογελών. Επομένως, οι υδρογέλες μπορούν να ταξινομηθούν βάσει της προέλευσης των πολυμερών και των αλληλεπιδράσεων στη διασύνδεση τους [44]–[46], [48].

Διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες ανάλογα με τις διασυνδέσεις των μακρομορίων, τις χημικές ή μόνιμες γέλες και τις φυσικές ή αναστρέψιμες. Οι υδρόφοβες δυνάμεις, οι δεσμοί υδρογόνου, οι ηλεκτροστατικές και ιοντικές αλληλεπιδράσεις καθορίζουν τον σχηματισμό αναστρέψιμων ή φυσικών πηκτωμάτων, των οποίων η σταθερότητα, η διόγκωση και η συρρίκνωση τους εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και συγκεκριμένα από την ευαισθησία τους στο pH και την θερμοκρασία.

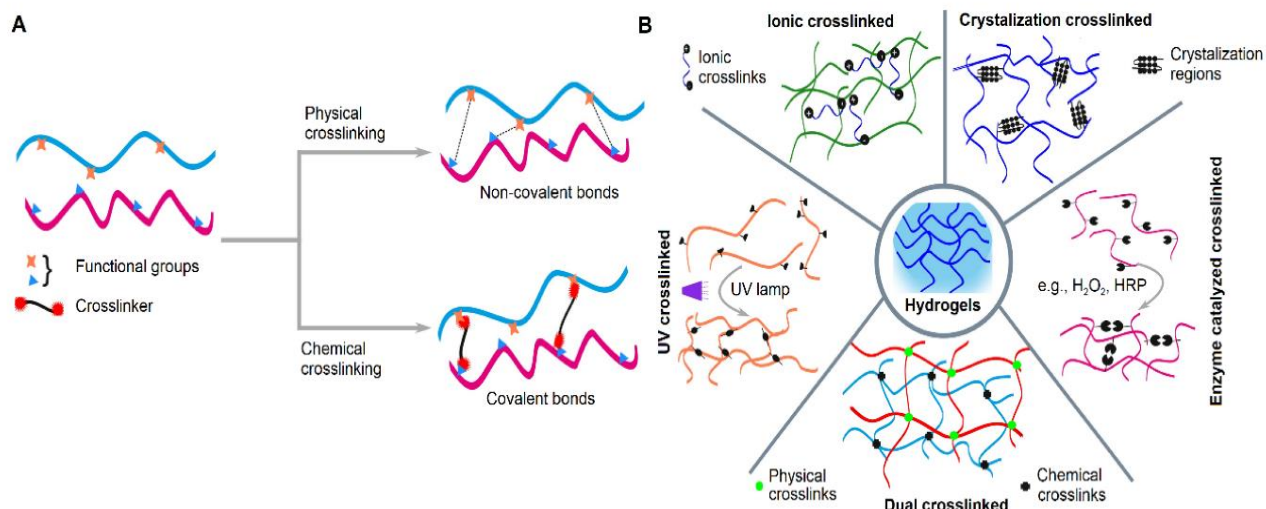
Γενικότερα, οι φυσικές υδρογέλες ανήκουν στις ασθενείς δομές υδρογελών [44]–[46], [48]. Στην περίπτωση των χημικών γελών, οι ομοιοπολικοί δεσμοί καθιστούν το πλέγμα σταθερότερο και ισχυρότερο με άκαμπτη δομή [44], [45], [48]. Σε σύγκριση με τη χημική σταυροσύνδεση, οι υδρογέλες που σχηματίζονται μέσω φυσικών αλληλεπιδράσεων τείνουν να μην έχουν μηχανική αντοχή και ανθεκτικότητα. Οι φυσικώς διασυνδεδεμένες υδρογέλες αναφέρονται ως αναστρέψιμες, καθώς το μεγαλύτερο μέρος του μηχανισμού διασύνδεσης μπορεί να αντιστραφεί, εφόσον δεν λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις στο σχηματισμό υδροπηκτωμάτων. Το πλεονέκτημα της φυσικής διασύνδεσης είναι η απουσία παραγόντων διασύνδεσης («cross-linkers»), ενώ σε υδρογέλες με ομοιοπολική σταυροσύνδεση απαιτούνται κι έπειτα αφαιρούνται, λόγω τοξικότητας [49].



Εικόνα 10: Αλληλεπιδράσεις στη διασύνδεση των υδρογελών [48]

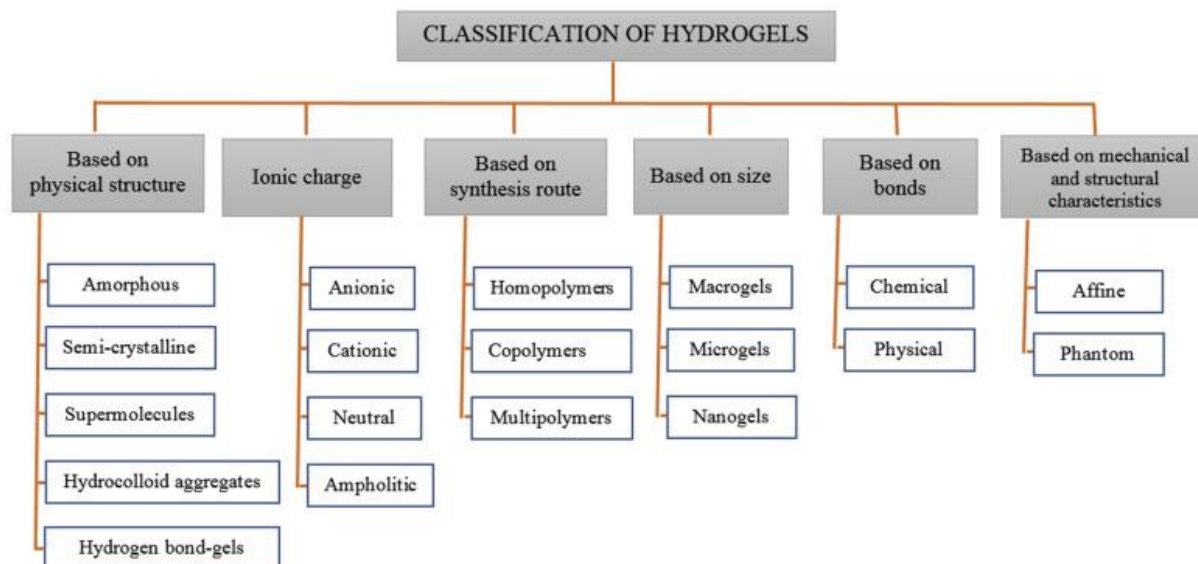
Οι υδρογέλες με φυσικές διασυνδέσεις μπορούν να παρασκευαστούν εύκολα με θέρμανση ή ψύξη του διαλύματος πολυμερούς, με ιονοτροπική ζελατινοποίηση, με κατάψυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες και απόψυξη, καθώς και με ανάμειξη πολυμερών. Στην περίπτωση των υδρογελών με χημικές διασυνδέσεις, απαιτούνται cross-linkers, οι οποίοι αντιδρούν με τις λειτουργικές ομάδες, όπως το υδροξύλιο, το καρβοξύλιο και η αμινομάδα [44], [46]–[48]. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται μέσω εμβολιασμού των μονομερών ή ακτινοβολίας και θέρμανσης, μέσω χημείας «κλικ» με διαφορετικές μεθόδους σύζευξης πολυμερών, ενώ τα τελευταία χρόνια αναδύεται η ενζυμική διασύνδεση, καθώς προσφέρει μια σταθερή και μη τοξική μέθοδο για την παραγωγή υδρογέλης σε ήπιες συνθήκες. Οι υδρογέλες με χημικές διασυνδέσεις μπορούν επίσης να συντεθούν μέσω του σχηματισμού μιας βάσης Schiff που τυπικά σχηματίζεται μεταξύ ομάδων αμίνης και αλδεϋδης. Η αντίδραση μεταξύ αυτών των ομάδων παράγει έναν δεσμό ιμίνης που έχει την ικανότητα να διαλύονται και να ενώνονται, δημιουργώντας χαρακτηριστικά self-healing [49]. Επιπλέον, υπάρχει μια ειδική κατηγορία χημικά συνδεδεμένων υδρογελών, οι οποίες συντίθενται από φυσικά και συνθετικά πολυμερή και αποτελούν αλληλοδιδυμικό δίκτυο δύο ή περισσότερων πολυμερών με καλές ελαστικές ιδιότητες. Σε γενικά πλαίσια, οι χημικές αλληλεπιδράσεις ενισχύουν την ανθεκτικότητα των υδρογελών και την μηχανική τους αντοχή [44], [46]–[48]. Ένας άλλος τύπος υδρογέλης ενσωματώνει δύο διαφορετικούς τύπους υλικών για τον σχηματισμό ενός προϊόντος με ανώτερες μηχανικές και βιολογικές ιδιότητες, ώστε η σύνθετη παραγόμενη υδρογέλη να συνδυάζει συνεργιστικά το όφελος των ξεχωριστών συστατικών. Οι

σύνθετες υδρογέλες μπορούν να συντεθούν από χημικά και φυσικά διασυνδεδεμένες υδρογέλες, ενώ χρησιμοποιούνται στην ενθυλάκωση των κυττάρων [49]. Οι μηχανικές και βιοχημικές ιδιότητες των υδρογελών συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με τις μεθόδους διασύνδεσής τους, και ακόμη και υδρογέλες που αποτελούνται από τα ίδια πολυμερή, αλλά έχουν διαφορετικές δομές σταυροδεσμών μπορούν να παρουσιάζουν διαφορετικές λειτουργίες.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση (A) της επίδρασης της φυσικής και χημικής διασταύρωσης στον τύπο των δεσμών που σχηματίζονται και (B) παραδείγματα διαφορετικών τεχνικών διασταύρωσης [50]

Ανάλογα με την προέλευση των πολυμερών, οι υδρογέλες ταξινομούνται σε φυσικές και συνθετικές. Οι υδρογέλες που βασίζονται σε φυσικά πολυμερή σχηματίζονται εύκολα από φυτικά ή ζωικά μακρομόρια (πολυσακχαρίτες και πολυπεπίδια), τα οποία θεωρούνται ασφαλή, μη τοξικά, αποτελεσματικά, βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα συστήματα, με αποτέλεσμα η παραγωγή να αυξάνεται συνεχώς. Αποτελούν νέο πεδίο μελέτης και ανάπτυξης, λόγω του πράσινου τους χαρακτήρα, ενώ παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη δημιουργία νέων συστημάτων μεταφοράς και απελευθέρωσης φαρμάκων. Τα πιο κοινά φυσικά πολυμερή είναι το κολλαγόνο, οι ίνες, η ζελατίνη, η κυτταρίνη ενώ τα πιο διαδεδομένα φυσικά παράγωγα θεωρούνται η χιτοζάνη, το άμυλο, το αλγινικό, κ.ο.κ. Συνθετικά πολυμερή που σχηματίζουν υδρογέλες παρασκευάζονται με χημικές μεθόδους πολυμερισμού και οι υδρογέλες διακρίνονται σύμφωνα με την πορεία σύνθεσης. Επιπλέον, διαχωρίζονται και με βάση τις φυσικές δομές των δικτύων [44]–[46], [48]. Γενικότερα, δεν θεωρούνται βιοαποικοδομήσιμες, καθώς οι πρώτες ύλες από τις οποίες παρασκευάζονται κρίνονται συχνά ως τοξικές. Για την αντιμετώπιση της τοξικότητάς τους, επιστρατεύεται η πράσινη χημεία και επανασχεδιάζονται, λόγω ακρίβειας στη χημική τους δομή, ώστε τελικά να προκύπτουν μη τοξικές και φιλικές προς το περιβάλλον υδρογέλες.



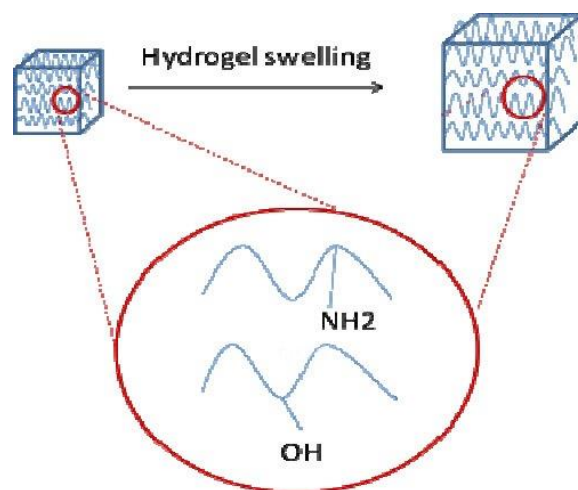
Εικόνα 12: Κατάταξη υδρογελών [46]

Ανάλογα με την μέθοδο που επιλέγεται και την τεχνική πολυμερισμού, οι υδρογέλες που παρασκευάζονται έχουν διαφορετικά ρεολογικά χαρακτηριστικά (από παχύρρευστα υγρά μέχρι άκαμπτα στερεά) και διαφορετικούς ρυθμούς κατακράτησης, καθώς παρουσιάζουν διαφορετικά σχήματα και δομές, όπως σφαίρες, μήτρες, δισκία, κάψουλες, βελόνες και διασπορές. Σημειώνεται ότι όλες αυτές οι μέθοδοι παρασκευής μπορούν να εφαρμοστούν από εργαστηριακή σε μεγαλύτερης κλίμακας παραγωγή, καθώς είναι ασφαλείς και μη τοξικές για ένα ευρύ φάσμα προϊόντων και εφαρμογών.

1.4.1 Ιδιότητες Υδρογελών

Τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες των υδρογελών είναι αποτέλεσμα των ιδιοτήτων των πολυμερών του πλέγματος και της μεθόδου παρασκευής τους. Πιο σημαντικά από αυτά, τα οποία καθορίζουν και την τελική τους χρήση, είναι η ικανότητα διόγκωσης τους - swelling, οι μηχανικές τους ιδιότητες, τα ρεολογικά τους χαρακτηριστικά, το πορώδες και η διαπερατότητα, ο βαθμός διασύνδεσης, η βιοσυμβατότητα και η ενθυλάκωση βιοδραστικών συστατικών.

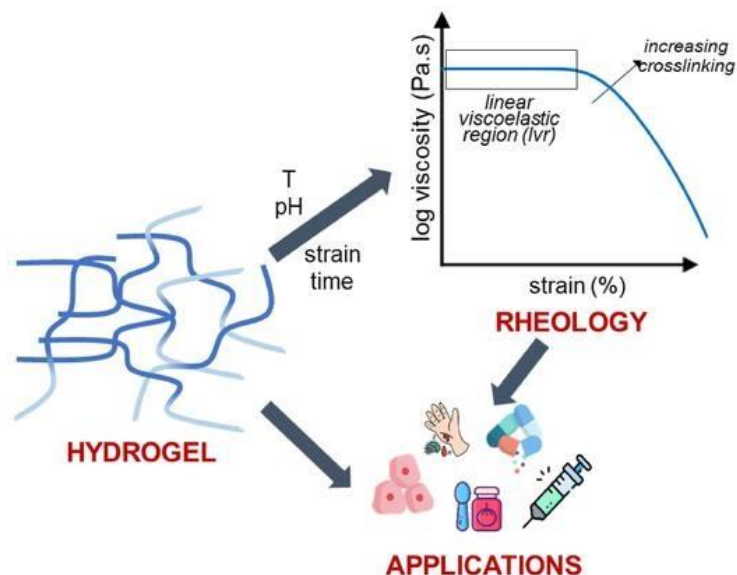
Η διόγκωση θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των υδρογελών, καθώς ο προσδιορισμός της ιδιότητας αυτής καθορίζει τον βαθμό διασύνδεσης και τον βαθμό υποβάθμισης. Το πολυμερικό δίκτυο υδρογέλης μπορεί να απορροφήσει 10 έως 1000 φορές το ξηρό βάρος τους σε νερό. Σε επαφή με το νερό, οι πολικές ομάδες ενυδατώνονται και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πρωτογενούς δεσμευμένου νερού. Σε επόμενο στάδιο σχηματίζεται δευτερογενές δεσμευμένο νερό όταν οι υδρόφοβες ομάδες αλληλεπιδρούν με το νερό, έτσι αναφέρεται ως υδροφοβικά δεσμευμένο νερό. Το πρωτογενές και το δευτερεύον δεσμευμένο νερό προστίθενται στο συνολικό δεσμευμένο νερό, το οποίο είναι στενά συνδεδεμένο με το πολυμερές. Η ωσμωτική δύναμη οδηγεί στην απορρόφηση του υπόλοιπου νερού που ονομάζεται ελεύθερο νερό, το οποίο γεμίζει τον κενό χώρο μεταξύ των δικτύων. Η διόγκωση προσδιορίζεται με μέτρηση του ξηρού βάρους και του βάρους της υδρογέλης σε διογκωμένη κατάσταση ανά τακτά χρονικά διαστήματα [44], [47].



Εικόνα 13: Υδρογέλη σε διογκωμένη κατάσταση και η υδρόφιλη δομή τους [47]

Η ευελιξία στη σύνθεση των υδρογελών και η φύση των πρόδρομων αντιδραστηρίων κατευθύνουν τις μηχανικές και ρεολογικές ιδιότητες των τελικών προϊόντων. Ο βαθμός διασταύρωσης επηρεάζει τις μηχανικές ιδιότητες και συγκεκριμένα την ακαμψία των υδρογελών, ενώ οι ρεολογικές μετρήσεις αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό και την τελική αξιοποίηση του υλικού. Τα δεδομένα για τις μηχανικές και ρεολογικές ιδιότητες (Young Modulus, συντελεστής αποθήκευσης και απώλειας) λαμβάνονται με την χρήση ροόμετρου και δυναμικής μηχανικής ανάλυσης. Με βάση τη φυσική δομή ενός δικτύου βιοπολυμερών, οι υδρογέλες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ισχυρές, αδύναμες ή ψευδο-gels, καθώς οι διαφορετικές υφές προκύπτουν λόγω των διαφορετικών υδροκολλοειδών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τους [44], [49].

Η κατανόηση της ρεολογικής συμπεριφοράς και της σχέσης μεταξύ της χημικής δομής και των ιδιοτήτων που προκύπτουν είναι ζωτικής σημασίας, καθώς τα ρεολογικά χαρακτηριστικά καθορίζουν την τελική εφαρμογή των υδρογελών. Λόγω της πολυμερικής διασταύρωσης τους, οι υδρογέλες μπορούν να συμπεριφέρονται σαν στερεά και να έχουν ιξωδοελαστικές ιδιότητες. Σε χαμηλή περιεκτικότητα σε στερεά, οι υδρογέλες είναι διαλύματα πολυμερών με αυξημένο ιξώδες και εάν ασκηθεί διατμητική τάση τότε παρατηρείται ροή. Οι καμπύλες ροής περιγράφουν τη ρεολογική συμπεριφορά ενός υλικού, δηλαδή την εξάρτηση του ιξώδους από την επίδραση του ρυθμού διατμητικής τάσης και προσδιορίζουν την ικανότητα που έχει το υλικό να παραμορφώνεται συνεχώς και να ρέει. Η ρεολογία των υδρογελών εξαρτάται από την ένταση των αλληλεπιδράσεων στο πολυμερικό δίκτυο και τη δομή που προκύπτει, ενώ σε επιβολή θέρμανσης ή σε αλλαγές στη διάταξη (π.χ. βαθμός διασταύρωσης, μέγεθος σωματιδίων, κατανομή μεγέθους, σχήμα σωματιδίου) παρατηρούνται μεταβολές στη ρεολογική τους συμπεριφορά και κατ'επέκταση την σταθερότητα τους. Γενικά οι υδρογέλες θεωρούνται μη Νευτωνικά ρευστά, καθώς η εξάρτηση ιξώδους τάσης από τον ρυθμό παραμόρφωσης δεν είναι γραμμική. Με την εφαρμογή ρεολογικών δοκιμών και τη μέτρηση ρεολογικών μονάδων προσδιορίζεται η γραμμική ιξωδοελαστική περιοχή των υδρογελών, αξιολογείται η σταθερότητα τους ως υλικά και μελετάται η συνολική διαδικασία ζελατινοποίησης. Ειδικότερα, οι συντελεστής ελαστικότητας (G') και ιξώδους (G'') αποτελούν κρίσιμες ρεολογικές παραμέτρους, καθώς παρέχουν πληροφορίες για την Νευτωνική συμπεριφορά των υδρογελών, τον χρόνο ζελατινοποίησης και την δομική σταθερότητα της υδρογέλης σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Από τις συσχετίσεις των συντελεστών χαρακτηρίζονται οι υδρογέλες ως ψευδο - gels ή ρευστά πηκτώματα και ως ισχυρά ή αδύναμα, καθώς ο συντελεστής ελαστικότητας (G') χαρακτηρίζει την στερεομόρφη (ελαστική) απόκριση του δείγματος, ενώ ο συντελεστής ιξώδους (G'') καθορίζει την απόκριση που μοιάζει με υγρό [44], [49], [51].



Εικόνα 14: Σχέση δομής και ρεολογικής συμπεριφοράς υδρογελών για διάφορες εφαρμογές [49]

1.4.2 Χιτοζάνη (Chitosan – CS)

Η χιτοζάνη είναι φυσικός κατιοντικός πολυσακχαρίτης που προκύπτει από την απακετυλίωση της χιτίνης, η οποία απαντάται ευρέως στη φύση στα εξωσκελετικά μέρη των εντόμων, καθώς και ως δομικό συστατικό των μυκήτων και της ζύμης. Η απακετυλίωση της χιτίνης προς παραγωγή της χιτοζάνης πραγματοποιείται χημικά με αλκαλική επεξεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ τα τελευταία χρόνια προτιμάται η βιοτεχνολογική οδός με χρήση ενζύμων. Ειδικότερα, η χιτοζάνη είναι ένα γραμμικό συμπολυμερές επαναλαμβανόμενων μονάδων N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης και αποακετυλιωμένης D-γλυκοζαμίνης που συνδέονται με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Σε κάθε επαναλαμβανόμενη μονάδα, το μόριο χιτοζάνης έχει τρεις λειτουργικές ομάδες, τις πρωτοταγείς και δευτεροταγείς ομάδες υδροξυλίου και τις ομάδες αμίνης [14], [44], [47], [52], [53].

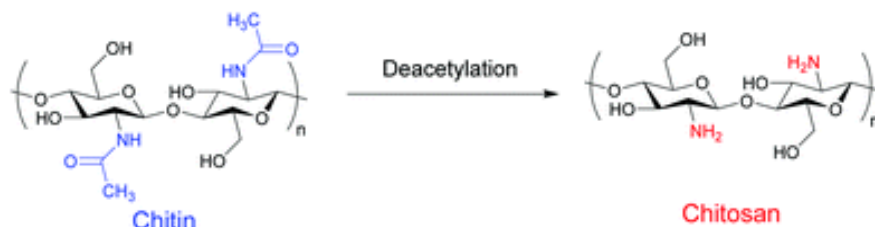
Αποτελεί πράσινο αντικείμενο σύγχρονων ερευνητικών μελετών, λόγω της χαμηλής τοξικότητας και βιοσυμβατότητας της και των αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων της και της δυνατότητας αποικοδόμησης από ένζυμα, ενώ χρησιμοποιείται στα τρόφιμα, καθώς αναγνωρίστηκε ως GRAS, στην φαρμακευτική βιομηχανία, την ιατρική, τα καλλυντικά και την βιοτεχνολογία. Ειδικότερα, η χιτοζάνη τροποποιείται σε διάφορα σχήματα και χρησιμοποιείται κυρίως ως υλικό για την παρασκευή υδρογελών, ως αραιωτικό στην παρασκευή δισκίων, ως λιπαντική ουσία, ως αποσθρωτικός παράγοντας, ως φορέας εγκλεισμού βιοδραστικών ενώσεων, ως υλικό για την τοπική χορήγηση φαρμάκων στη στοματική κοιλότητα χάρη στις βλεννοκολλητικές της ιδιότητες, αλλά και ως φορέας εγκλεισμού βιοδραστικών ενώσεων [14], [44], [47], [52], [53]. Η κατιονική φύση της χιτοζάνης οδηγεί, υπό όξινες συνθήκες, στην ανάπτυξη διαφόρων μορφών, όπως νανο/μικροσωματίδια, γαλακτώματα, ίνες, υδρογέλες, σκόνες και μεμβράνες [14], [52], [53].

Η χιτοζάνη, χάρη στις αντιφλεγμονώδεις και επουλωτικές της ιδιότητες, έχει επίσης πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία καλλυντικών, ιδιαίτερα σε προϊόντα περιποίησης δέρματος. Έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες συνθέσεις καλλυντικών, όπως κρέμες και ορούς, καθώς βοηθάει στην προστασία του δέρματος και ενισχύει την αποτελεσματικότητά τους. Συνολικά, η χιτοζάνη έχει μεγάλες δυνατότητες ως συστατικό σε καλλυντικά προϊόντα που στοχεύουν στη βελτίωση της υγείας και της εμφάνισης του δέρματος [54].

Κατά την απακετυλίωση της χιτίνης και τη μετατροπή σε χιτοζάνη, οι αμινομάδες και η διαλυτότητα αυξάνονται, ενώ όσο πιο μεγάλος ο βαθμός απακετυλίωσης, τόσο πιο βιοσυμβατή και βιοαποικοδομήσιμη είναι η χιτοζάνη. Θεωρείται ασθενής βάση με $pK_a=6.5$ που διαλύεται σε όξινα

διαλύματα λόγω πρωτονίωσης των αμινομάδων της, σε αντίθεση με την χιτίνη που είναι αδιάλυτη σε πολλούς οργανικούς και ανόργανους διαλύτες, ενώ σε υψηλότερες τιμές pH καθιζάνει. Οι ομάδες αμίνης και υδροξυλίου στη δομή της χιτοζάνης σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου που οδηγούν στην κρυσταλλική δομή του βιοπολυμερούς [47].

Ο βαθμός αποακετυλίωσης (Deacetylation Degree), δηλαδή η περιεκτικότητα των ελεύθερων αμινομάδων, η μέση μοριακή μάζα, η διαλυτότητα, η κρυσταλλικότητα, το ιξώδες και η περιεκτικότητα σε νερό είναι οι πιο συχνά αξιολογούμενες ιδιότητες της χιτοζάνης [52], [53].



Εικόνα 15: Απακετυλίωση της χιτίνης προς τον σχηματισμό χιτοζάνης [55]

1.4.3 Υδρογέλες χιτοζάνης

Στις υδρογέλες χιτοζάνης, η χιτοζάνη αποτελεί το υδρόφιλο πολυμερές στο δίκτυο που διασυνδέεται είτε φυσικά, δηλαδή με δεσμούς υδρογόνου και ηλεκτροστατικές δυνάμεις, είτε χημικά με ομοιοπολικούς. Οι λειτουργικές ιδιότητες των υδρογελών χιτοζάνης εξαρτώνται από το μοριακό βάρος του βιοπολυμερούς, τον βαθμό αποακετυλίωσης, την μέθοδο σχηματισμού και τις συνθήκες που επικρατούν κατά την παρασκευή. Αύξηση του βαθμού αποακετυλίωσης υποδηλώνει μεταβολές στην ρεολογική συμπεριφορά των υδρογελών και συγκεκριμένα το ιξώδες αυτών μειώνεται [56], [57]. Επιπλέον, θερμοβαρυμετρικές αναλύσεις αποδεικνύουν ότι με την αύξηση του βαθμού αποακετυλίωσης, οι υδρογέλες χιτοζάνης είναι θερμικά σταθερότερες με μικρότερη θερμοκρασία ζελατινοποίησης, ενώ οι μηχανικές ιδιότητες συχνά ενισχύονται, καθώς το δίκτυο των πολυμερικών μακροαλυσίδων που σχηματίζεται είναι ισχυρότερο και πυκνότερο. Επομένως, αυξάνεται η αντίσταση, η μηχανική αντοχή, η ανθεκτικότητα και η θερμική σταθερότητα της υδρογέλης [57]. Ωστόσο, με την αύξηση του μοριακού βάρους της χιτοζάνης, το ιξώδες αυξάνεται και οι μηχανικές ιδιότητες της υδρογέλης φαίνεται να βελτιώνονται [58], [59].

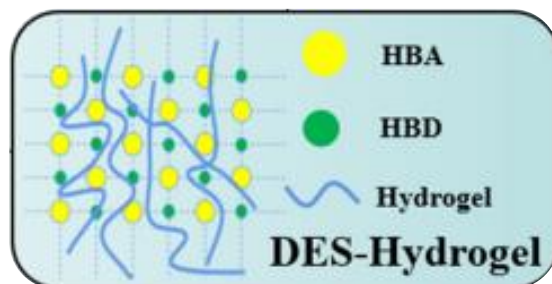
Τα τελευταία χρόνια, οι υδρογέλες χιτοζάνης, εκτός από αποτελεσματικά υλικά επούλωσης τραυμάτων, έχουν διακριθεί ως εξαιρετικά και ευέλικτα διασυνδεδετικά συστήματα ελεγχόμενης και στοχευμένης αποδέσμευσης φαρμάκων, καθώς οι βιοχημικές και βιοδραστικές ιδιότητες της χιτοζάνης, αλλά και η εξαρτώμενη από pH διαλυτότητα της επιτρέπουν την ασφαλή εφαρμογή της στον τομέα της φαρμακευτικής. Το όξινο περιβάλλον στο στομάχι, για παράδειγμα, μπορεί να αξιοποιηθεί για την παροχή φαρμάκων ενθυλακωμένων σε υδρογέλες χιτοζάνης στο λεπτό έντερο, όπου το pH είναι ουδέτερο, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του φαρμάκου [53], [57].

1.4.4 Υδρογέλες χιτοζάνης με φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες

Η ενσωμάτωση DES στις υδρογέλες χιτοζάνης οδηγεί στον σχηματισμό υδρογελών με φυσικές διασυνδέσεις, καθώς οι διαλύτες λειτουργούν ως παράγοντες διασταύρωσης στο πολυμερικό πλέγμα. Αποτελούν ασφαλή συστήματα χαμηλού κόστους, καθώς τα συστατικά των πράσινων διαλυτών θεωρούνται μη τοξικά και βιοσυμβατά, όπως και η χιτοζάνη. Ωστόσο, η μελέτη κυτταροτοξικότητας είναι απαραίτητη για την εξακρίβωση της ασφάλειας του τελικού προϊόντος. Η επιλογή του διαλύτη παίζει καθοριστικό ρόλο στις ιδιότητες των υδρογελών, ενώ ο ίδιος ο διαλύτης λειτουργεί ως σταθεροποιητικός, προστατευτικός και ενισχυτικός παράγοντας στο τελικό προϊόν [42], [60]. Για τον

σχηματισμό υδρογελών χιτοζάνης επιλέγεται DES που δρα ταυτόχρονα ως παράγοντας διάλυσης της χιτοζάνης και ως παράγοντας ζελατινοποίησης.

Συγκεκριμένα, οι τελικές υδρογέλες με cross-linkers τους DES έχουν ενισχυμένες μηχανικές και ιξωδοελαστικές ιδιότητες, καθώς τα συστατικά τους (HBD & HBA) αλληλεπιδρούν με ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις υδρογόνου [61].



Εικόνα 16: Φυσική υδρογέλη με cross-linker DES [61]

1.4.5 Υδρογέλες χιτοζάνης με εκχύλισμα φύλλων ελιάς και φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες

Η σύνθεση υδρογελών με ενσωματωμένα φυσικά προϊόντα είναι ένα σύγχρονο αναδυόμενο πεδίο έρευνας, όπου μελετώνται φυσικοχημικές και μηχανικές ιδιότητες του συστήματος, ενώ αξιολογείται και η βιοδραστικότητα του. Τα φυσικά προϊόντα προκύπτουν μετά από διεργασίες εκχύλισης με διαλύτες DES και NADES ως εκχυλιστικά μέσα. Στις υδρογέλες χιτοζάνης μπορούν να προστεθούν φυσικά αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά εκχυλίσματα, όπως εκχύλισμα φύλλων ελιάς, πρόπολης, άγριου τριαντάφυλλου, και τελικά να σχηματιστούν υδρογέλες με φυσικές διασυνδέσεις που φέρουν βελτιωμένες ιδιότητες, καθώς τα φυσικά εκχυλίσματα αποτελούν πηγή ανάκτησης βιοδραστικών ενώσεων. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση ενώσεων με βιοενεργό περιεχόμενο, η μέθοδος εκχύλισης και το φυσικό προϊόν καθορίζουν τις ιδιότητες των τελικών φυσικών υδρογελών και το φάσμα εφαρμογών τους. Ειδικότερα, για την εκχύλιση της πρόπολης επιλέχθηκε ως πιο κατάλληλος διαλύτης ο L-Proline/D,L-Lactic acid/Water (Pro/LA/W) σε αναλογία 1:2:2.5, ενώ για την εκχύλιση φύλλων ελιάς ο D-(+)-Glucose/D,L-Lactic acid/Water (Glu/LA/W) 1:5:6.2, καθώς παρουσιάζουν υποσχόμενα αποτελέσματα σε φαινολικές ενώσεις και αντιοξειδωτική δράση [42]. Η ποσότητα νερού επιφέρει μείωση στο ιξώδες των τελικών προϊόντων.

Παρόλο που οι NADES δεν μπορούν να διαχωριστούν εύκολα από τις εκχυλισμένες βιοδραστικές ενώσεις, ώστε να ληφθούν ξηρά εκχυλίσματα, επιλέγονται ειδικά σχεδιασμένοι διαλύτες με τις κατάλληλες επιθυμητές ιδιότητες ανάλογα της εφαρμογής (designer solvents), οι οποίοι κατά την ενσωμάτωσή τους, προσθέτουν αξία στο τελικό προϊόν, με αποτέλεσμα να μην απαιτείται στάδιο καθαρισμού και απομάκρυνσης του διαλύτη. Επιπλέον, οι υδρογέλες με ενσωματωμένα εκχυλίσματα και NADES θεωρούνται πιο σταθερές με την πάροδο του χρόνου, καθώς οι διαλύτες λειτουργούν ως προστατευτικά και σταθεροποιητικά μέσα για τις εκχυλισμένες βιοδραστικές ενώσεις, λόγω των διαμοριακών δεσμών υδρογόνου [42].

Τα εκχυλίσματα - NADES οδηγούν σε παρατεταμένη αντιοξειδωτική δράση, λόγω της σταδιακής απελευθέρωσης εκχυλισμένων βιοδραστικών ενώσεων στην τελική υδρογέλη.

1.4.6 Προσθήκη επιφανειοδραστικού παράγοντα στις υδρογέλες

Το Tween 80, γνωστό ως Polysorbate 80, παράγεται από πολυαιθοξυλιωμένη σορβιτάνη και ελαϊκό οξύ και αποτελεί ένα μη ιονικό επιφανειοδραστικό και γαλακτωματοποιητή που επιτρέπεται η χρήση του

στον τομέα της φαρμακευτικής, καθώς θεωρείται βιοσυμβατό, μη τοξικό και βιοαποικοδομήσιμο φαρμακευτικό έκδοχο, ενώ χρησιμοποιείται ευρύτατα σε τρόφιμα και καλλυντικά σκευάσματα, ώστε να αναμειχθούν διαφορετικές φάσεις μεταξύ τους [62], [63]. Πρόκειται για μία συνθετική ένωση με τη μορφή ενός κίτρινου παχύρρευστου υδατοδιαλυτού υγρού, το οποίο έχει καλή διαλυτότητα σε νερό, καθώς και σε ανόργανους διαλύτες.

Η προσθήκη του στις υδρογέλες κρίνεται απαραίτητη, καθώς ομοιογενοποιεί το πολυμερικό δίκτυο των υδρογελών που σχηματίζονται με φυσικές διασυνδέσεις [63].

1.5 Αντίδραση Maillard (Maillard Reaction - MR)

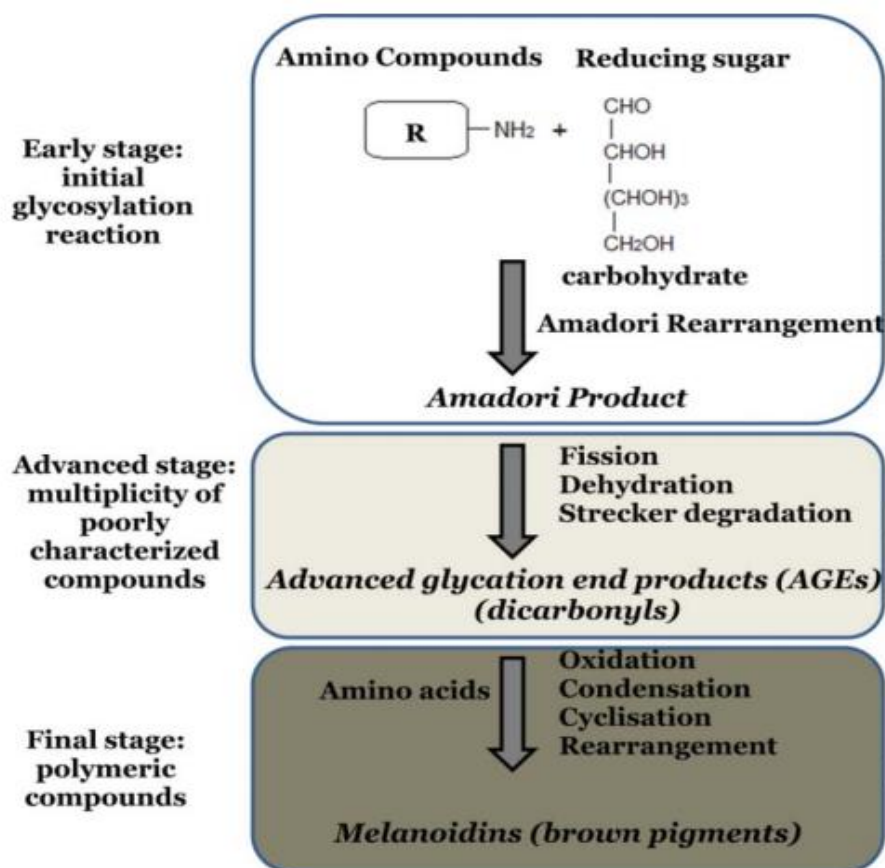
Η αντίδραση Maillard είναι αυθόρμητη χημική αντίδραση μεταξύ αμινοξέων και αναγωγικών σακχάρων που πραγματοποιείται αυθόρμητα κυρίως στα τρόφιμα, αλλά και στα φάρμακα. Ο Γάλλος χημικός Louis Camille Maillard πρωτοάνεφερε, το 1912, ότι η αντίδραση μεταξύ γλυκόζης και γλυκίνης προκάλεσε τον σχηματισμό καφέ – μαύρων χρωστικών (μελανοϊδίων) κατά την επιβολή θέρμανσης. Πρόκειται για έναν πολύπλοκο μηχανισμό διαδοχικών αντιδράσεων αμαύρωσης που συμβαίνει στα τρόφιμα φυσικά, χωρίς την προσθήκη χημικών, και παράγει μείγμα σύνθετων ενώσεων κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου, pH και υγρασίας, με αποτέλεσμα την εμφάνιση επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων, όπως καστανό χρώμα, επιθυμητή γεύση και άρωμα, σταθερότητα και θρεπτική αξία, ενώ σε συγκεκριμένες συνθήκες και προχωρημένα στάδια παράγονται επιβλαβή παράγωγα, όπως ακρυλαμίδιο, ετεροκυκλική αμίνη και προϊόντα με δυσμενείς επιπτώσεις, καθώς μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο και χρόνιες ασθένειες, όπως ο διαβήτης [64]–[70]. Στην περίπτωση φαρμάκων, η αντίδραση προκαλεί αλλαγές στο χρώμα, στην βιοδιαθεσιμότητα φαρμάκων, ενώ κατά την παραγωγή τοξικών παραπροϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση δραστικών ουσιών. Η MR σχετίζεται στενά με την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων και των φαρμάκων [68].

Ειδικότερα, είναι αντίδραση μεταξύ καρβονυλοενώσεων και ελεύθερων αμινομάδων που συχνά αναφέρεται και ως μία από τις αντιδράσεις μη ενζυμικού μαυρίσματος, ενώ η αντίδραση οδηγεί προς τον σχηματισμό αντιοξειδωτικών ενώσεων [65], [67]. Οι μη ενζυμικές αντιδράσεις αμαύρωσης περιλαμβάνουν αποδόμηση ασκορβικού οξέος, υπεροξειδωση λιπιδίων, αντίδραση καραμέλας και αντίδραση Maillard (MR). Η MR είναι γνωστή και ως γλυκοζυλίωση [68], [69].

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε τρία κύρια στάδια (πρώιμο, προχωρημένο και τελικό) και η δράση της εξαρτάται από παράγοντες, όπως το pH, την θερμοκρασία, τον χρόνο αντίδρασης - θέρμανσης, τη συγκέντρωση και τον τύπο των αντιδρώντων, την ενεργότητα του νερού και την παρουσία μεταλλικών ιόντων [65]–[67], [69], [70]. Για παράδειγμα, οι αμίνες και οι μονοσακχαρίτες αποδεικνύεται ότι έχουν εντονότερη δράση από τα αμινοξέα και τους πολυσακχαρίτες, αντίστοιχα, καθώς η αύξηση του μοριακού βάρους προκαλεί μεγαλύτερης έκτασης στερική παρεμπόδιση [67], [68], [70]. Οι συνθήκες της αντίδρασης αποτελούν κρίσιμο παράγοντα κατά την πραγματοποίησή της, καθώς σχηματίζονται επιβλαβή και αντιθρεπτικά παράγωγα υπό ανεξέλεγκτες συνθήκες. Η σταδιακή αύξηση του pH προς ελαφρώς αλκαλικό αυξάνει τον ρυθμό της αντίδρασης και τιμές μικρότερες του συγκεκριμένου εύρους μειώνουν την ταχύτητα της, ενώ θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 180°C, επιταχύνουν την αντίδραση με κίνδυνο τον σχηματισμό τοξικών παραπροϊόντων. Οι αλλαγές διαμόρφωσης που προκαλούνται από τη θερμότητα μπορεί είτε να οδηγήσουν σε υψηλότερη είτε σε περιορισμένη αντιδραστικότητα, λόγω της αφθονίας της ανοιχτής μορφής των αναγωγικών μορίων των σακχάρων ή μετουσίωσης και συσσωμάτωσης πρωτεϊνών που προκαλούν τις αμινομάδες λιγότερο προσιτές αντίστοιχα. Ωστόσο, σε πολύ χαμηλότερες θερμοκρασίες αποτρέπονται επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Σημειώνεται ότι τα διαφορετικά στάδια της αντίδρασης λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Επιπλέον, μεγαλύτεροι χρόνοι θέρμανσης οδηγούν σε μεγαλύτερες αποδόσεις, ενώ η διάχυση και η μοριακή κινητικότητα μπορούν να αυξηθούν αυξάνοντας την ενεργότητα του νερού, η

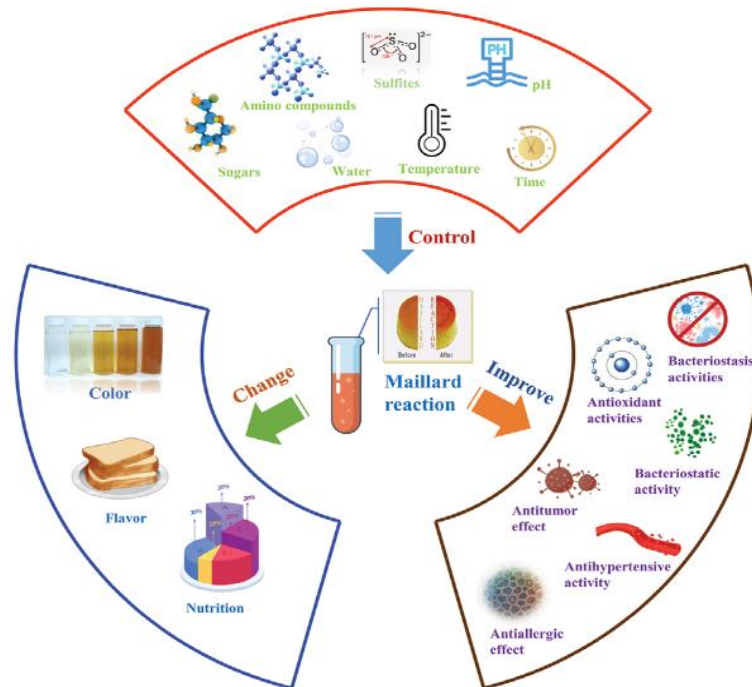
οποία εντείνει τον ρυθμό και την έκταση της αντίδρασης [67], [70]. Μεγάλες τιμές ενεργότητας επιβραδύνουν την αντίδραση Maillard λόγω της αραίωσης των αντιδρώντων.

Όπως έχει αναφερθεί, ο μηχανισμός της MR είναι ιδιαίτερα σύνθετος με σειρά χημικών αντιδράσεων, ενώ χωρίζεται σε τρία απλουστευμένα στάδια, το αρχικό, το ενδιάμεσο και το προχωρημένο, τα οποία είναι αλληλένδετα και μπορούν να συμβούν ταυτόχρονα, καθώς επηρεάζονται από τις συνθήκες αντίδρασης. Αρχικά, περιλαμβάνει αντίδραση συμπύκνωσης, η οποία είναι αναστρέψιμη, μεταξύ της καρβονυλομάδας του σακχάρου και της αμινομάδας του αμινοξέος και παράγεται N-υποκατεστημένη γλυκοζυλαμίνη, με γενική δομή $R^1R^2C=NR^3$, γνωστή και ως Schiff base, και νερό. Ακολούθως, η γλυκοζαμίνη υφίσταται μια μη αναστρέψιμη αναδιάταξη δημιουργώντας το προϊόν Amadori (ARP) - 1-αμινο-1-δεοξυκετόζη, το οποίο αναφέρεται και ως προϊόν Heyns. Το προχωρημένο στάδιο ξεκινά με την αποικοδόμηση του ARP, το οποίο μπορεί να αλλοιωθεί με οξείδωση, ενολίωση, αφυδάτωση, όξινη υδρόλυση και αντιδράσεις ελεύθερων ριζών, με αποτέλεσμα πολλαπλές ενώσεις που δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένες. Η μετατροπή του ARP εξαρτάται από τις συνθήκες του συστήματος, όπως το pH, ο χρόνος και η θερμοκρασία. Το ARP υφίσταται κυρίως 1,2 ενολίωση με το σχηματισμό φουρφοουράλης (όταν εμπλέκονται πεντόζες) ή υδροξυμεθυλοφουρφοουράλη (όταν εμπλέκονται εξόζες) όταν το pH είναι ίσο ή χαμηλότερο από 7. Σε τιμές $pH > 7$, παράγεται ποικιλία προϊόντων σχάσης, τα οποία είναι εξαιρετικά αντιδραστικά και συμμετέχουν σε νέες αντιδράσεις. Στο προχωρημένο στάδιο, πραγματοποιούνται πολλαπλές αντιδράσεις, όπως κυκλοποίησης, αφυδάτωσης, αναδιάταξης και ισομερισμού και σχηματίζονται αζωτούχα πολυμερή και μελανοΐδινες, στις οποίες οφείλεται το καφέ χρώμα των προϊόντων [67]–[70]. Σε αντίθεση με τα αρχικά στάδια, τα προχωρημένα και τελικά στάδια της αντίδρασης Maillard περιέχουν υψηλό βαθμό πολυπλοκότητας.



Εικόνα 17: Στάδια αντίδρασης Maillard [69]

Με βάση τους παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση, συνοψίζονται τρόποι που μπορεί να ανασταλεί η μη ελεγχόμενη δράση της. Η μείωση της θερμοκρασίας και η ρύθμιση του pH σε ελαφρώς όξινες τιμές αποτρέπουν τον σχηματισμό ανεπιθύμητων και επιβλαβών προϊόντων, ενώ η διατήρηση χαμηλής περιεκτικότητας σε υγρασία στο τρόφιμο και η προσθήκη θειώδους ουσίας σε αρχικό στάδιο της αντίδρασης προστατεύουν βιοδραστικές ενώσεις των τροφίμων και βελτιώνουν την βιοδιαθεσιμότητα τους, καθώς ενισχύουν τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Επιπλέον, η αφαίρεση αντιδραστήριου και προσθήκη αντίστοιχου ενζύμου, το οποίο παράγει αδιάλυτες ενώσεις, παρεμποδίζει την ανεξέλεγκτη δράση της MR [67].



Εικόνα 18: Μεταβολή οργανοληπτικών ιδιοτήτων κατά την αντίδραση Maillard, παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η δράση της και βελτίωση ιδιοτήτων των τελικών προϊόντων [67]

Κεφάλαιο 2: Πειραματικό Μέρος

2.1 Σκοπός

Η χιτοζάνη είναι συμπολυμερές της Ν-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης και της D-γλυκοζαμίνης που προκύπτει από την αποακετυλίωση της χιτίνης, η οποία προέρχεται από τους εξωσκελετούς των οστρακοειδών. Πρόκειται για μη τοξικό, βιοδιασπώμενο και βιοσυμβατό με το ανθρώπινο πεπτικό σύστημα πολυμερές. Η αντίδραση Maillard αναφέρεται συνήθως ως αυθόρμητη και μη ενζυμική αντίδραση αμαύρωσης μεταξύ αμινοξέος (ομάδες αμίνης) και αναγωγικών σακχάρων (ομάδες καρβονυλίου), ενώ κατά τον μηχανισμό της αντίδρασης παράγονται αντιοξειδωτικά προϊόντα, τα οποία κρίνεται απαραίτητο να μελετηθούν ως προς την τοξικότητά τους.

Οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES) είναι ομοιογενή μείγματα δύο ή περισσότερων συστατικών, ενός δέκτη και ενός δότη δεσμού υδρογόνου σε καθορισμένες αναλογίες. Όταν τα συστατικά του DES είναι φυσικές ενώσεις, οι διαλύτες χαρακτηρίζονται ως Φυσικοί Βαθύς Ευτηκτικοί Διαλύτες (NADES).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η πράσινη ανάπτυξη υδρογελών χιτοζάνης με τη χρήση ενός στοχευμένα σχεδιασμένου διαλύτη, ο οποίος δρα αποτελεσματικά ως εκχυλιστικό μέσο φύλλων ελιάς Καλαμών και του οποίου τα συστατικά αλληλεπιδρούν με τη χιτοζάνη μέσω της αντίδρασης Maillard, ενώ ταυτόχρονα λειτουργεί ως παράγοντας διασταύρωσης για τον σχηματισμό των υδρογελών μαζί με τις ανακτημένες βιοδραστικές ενώσεις. Ειδικότερα, χρησιμοποιείται ο πράσινος διαλύτης Γλυκόζη / Γαλακτικό οξύ / Νερό σε γραμμομοριακή αναλογία 1:5:6.2 (D-(+)-Glucose/D,L-Lactic acid/Water (Glu/LA/W)), ο οποίος απομονώνει και προστατεύει τις βιοδραστικές ενώσεις, προσδίδει όξινο pH και διαλύει την χιτοζάνη, ενώ γλυκόζη και χιτοζάνη αλληλεπιδρούν προς την παραγωγή προϊόντων αντίδρασης Maillard.

Οι σχηματιζόμενες υδρογέλες θα μελετηθούν ως προς τις φυσικοχημικές και μηχανικές ιδιότητες, ενώ θα αξιολογηθεί η βιοδραστικότητά τους, καθώς τα φύλλα ελιάς αποτελούν άφθονη πηγή ενώσεων με βιοενεργό περιεχόμενο και η αντίδραση Maillard εντείνει την αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, θα μελετηθεί η ικανότητα διόγκωσης των υδρογελών και η ικανότητα συγκράτησης νερού, ενώ θα αξιολογηθεί η μηχανική και ρεολογική τους συμπεριφορά, η οποία καθορίζει την τελική χρήση των υλικών. Επιπλέον, θα εφαρμοστεί η μέθοδος αναστολής λιπιδικής υπεροξειδωσης και προσδιορίζεται η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, ώστε να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική δράση των τελικών προϊόντων, των οποίων θα εξεταστεί η δομή και η θερμική σταθερότητα μέσω φασματομετρίας υπέρυθρου FT-IR και θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης TGA.

Κατά την εκτέλεση, θα εφαρμοστούν διαφορετικές περιεκτικότητες των συστατικών του εκχυλίσματος, ενώ προστίθεται επιφανειοδραστικό Tween 80 για την επίτευξη ομοιογενούς πηκτώματος. Τα πειραματικά αποτελέσματα συγκρίνονται μεταξύ τους για την κατανόηση της επίδρασης της αντίδρασης Maillard και των διαφορετικών παραμέτρων στις τελικές ιδιότητες.

2.2 Οργανολογία - Υλικά

2.2.1 Αντιδραστήρια - Υλικά

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της παρασκευής και του χαρακτηρισμού των υδρογελών χιτοζάνης με ενσωματωμένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς και NADES παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για τη σύνθεση των υδρογελών

Αντιδραστήριο	Χημικός τύπος	Προμηθευτής
Φύλλα ελιάς	-	-
Γαλακτικό οξύ, 80% w/w	C ₃ H ₆ O ₃	Labkem
Γλυκόζη	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma-Aldrich
Υπερκάθαρο νερό	H ₂ O	Fischer Scientific
Χιτοζάνη (5-20 & 20-100 cps)	(C ₆ H ₁₁ NO ₄) _n	TCI - Tokyo Chemical Industry
Polysorbate 80 (Tween 80)	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	Alfa Aesar
2,2' - αζωδισ - (2 - αμιδινοπροπάνο) - διϋδροχλωρίδιο (AAPH)	C ₈ H ₂₀ Cl ₂ N ₆	Fluorochem
Λινελαϊκό οξύ	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Thermo Scientific
Polysorbate 20 (Tween 20)	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Thermo Scientific
Όξινο φωσφορικό κάλιο	K ₂ HPO ₄	Penta
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο	KH ₂ PO ₄	Penta
Καυστικό νάτριο	NaOH	Penta
Υδροχλωρικό οξύ 35%	HCl	Penta
Βορικό οξύ	H ₃ BO ₃	Riedel-deHaën
Νιτρώδες Νάτριο	NaNO ₂	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteu		Merck
Χλωριούχο Αργίλιο	AlCl ₃	Alfa Aesar
2,2-διφαινύλ-1-πικρυλιδραζύλιο (DPPH)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Aldrich
Αιθανόλη	C ₂ H ₅ OH	PanReac AppliChem

2.2.2 Όργανα - Συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της παρασκευής και του χαρακτηρισμού των υδρογελών χιτοζάνης παρατίθενται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Χρησιμοποιούμενα όργανα για την παραγωγή και την αξιολόγηση των υδρογελών

Όργανα-Συσκευές	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Ζυγός ακριβείας (έως 110 g)	OHAUS CORPORATION	E01140
Ζυγός ακριβείας (έως 210 g)	Kern	ADJ 200-4
Ζυγός φωτοευαισθησίας (έως 2 g)	Sartorius	M2P
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Lbx Instruments	V05
Λουτρό υπερήχων	Laboratory Instruments	Wisd
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη εστία	Windaus Phoenix	MSH-20A RSM-10HP
Πεχάμετρο	Metrohm	744
Αντλία κενού διήθησης	KNF NEUBERGER LABOPORT	-

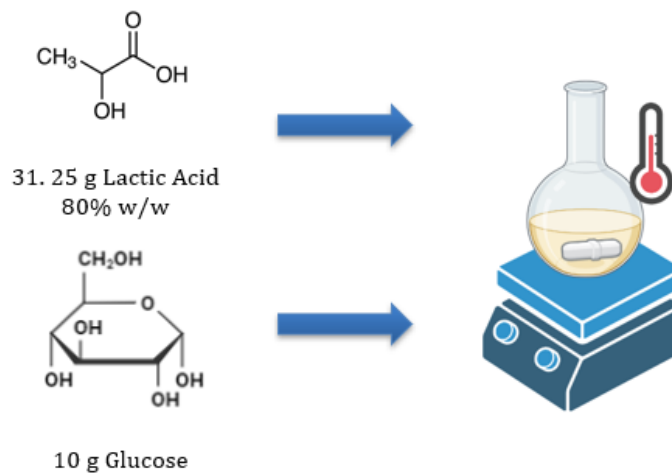
Συσκευή λυοφιλοποίησης	Frozen in time	Lablyo Mini
Συσκευή υπερκάρθρου νερού	ELGA	VEOLIA
Incubator shaker	Gallenkamp	-
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (microplate reader)	Biotek	EPOCH ²
Φασματόμετρο FT-IR	FT / IR 4000	Jasco
Φούρνος	Gallenkamp	Hotbox Oven Size 2
Ρεόμετρο	HAAKE MARS iQ Air Modular Advanced Rheometry System	Thermo Scientific

2.3 Παρασκευή φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών – NADES

Κατά την σύνθεση υδρογελών χιτοζάνης με ενσωματωμένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς και πράσινο διαλύτη, επιλέχθηκε σύστημα NADES με δότη δεσμών υδρογόνου (HBD) το υδατικό διάλυμα γαλακτικού οξέος 80% w/w και δέκτη (HBA) την γλυκόζη. Ο διαλύτης δρα ως εκχυλιστικό μέσο στη συμβατική διεργασία της εκχύλισης, λειτουργεί ως παράγοντας αποθήκευσης των εκχυλισμένων βιοδραστικών ουσιών και ενσωματώνεται στις υδρογέλες ως παράγοντας διαλυτοποίησης της χιτοζάνης και διασύνδεσης του πλέγματος, ενώ ταυτόχρονα η γλυκόζη αντιδρά αυθόρμητα με την χιτοζάνη μέσω της αντίδρασης Maillard.

Η σύνθεση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη Γλυκόζη / Γαλακτικό οξύ / Νερό (Glu/LA/W) σε γραμμομοριακή αναλογία 1:5:6.2 πραγματοποιείται με την απλή μέθοδο της θέρμανσης και ανάδευσης των δύο συστατικών, γλυκόζης και υδατικού διαλύματος γαλακτικού οξέος. Πιο αναλυτικά, η μέθοδος παρασκευής ακολουθεί την εξής πορεία:

- i. Αρχικά ζυγίζονται 10 g γλυκόζης (Glu) και 31.25 g υδατικού διαλύματος γαλακτικού οξέος (LA) 80% w/w, ώστε να τηρείται η παραπάνω αναλογία του διαλύτη.
- ii. Τα δύο αντιδραστήρια μεταφέρονται σε σφαιρική φιάλη των 100 ml, η οποία τοποθετείται σε αναδευτήρα με μαγνητική ανάδευση και θερμαινόμενη εστία, ενώ στην πειραματική διάταξη εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας.
- iii. Το διάλυμα αφήνεται υπό ήπια ανάδευση και θερμαίνεται στους 80°C για 3h, ώστε να σχηματιστεί ομοιογενές διαυγές υγρό.



Εικόνα 19: Μέθοδος Παρασκευής του NADES (ανάδευση και θέρμανση)

Κατά την πειραματική διαδικασία, λήφθηκε φάσμα FT-IR του διαλύτη και των συστατικών του για τη δομική μελέτη του ευτηκτικού μείγματος.

2.4 Συμβατική εκχύλιση φύλλων ελιάς

2.4.1 Προετοιμασία φύλλων ελιάς

Η πρώτη ύλη του πειράματος είναι τα φύλλα ελιάς Καλαμών, τα οποία πρόκειται να εκχυλιστούν, ώστε να απομονωθούν οι ενώσεις υψηλής προστιθέμενης αξίας, από τις οποίες αποτελούνται και να ενσωματωθούν τα φυσικά εκχυλίσματα στις σχηματιζόμενες υδρογέλες. Τα φύλλα ελιάς αποτελούν σημαντικά παραπροϊόντα γεωργικής παραγωγής και βιοαποβλήτων που μπορούν να αξιοποιηθούν προς την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων. Η προσέγγιση αυτή δίνει την δυνατότητα για την μετάβαση από τη γραμμική σε μια κυκλική οικονομία, η οποία θα οδηγήσει σε μια πιο βιώσιμη βιομηχανία.

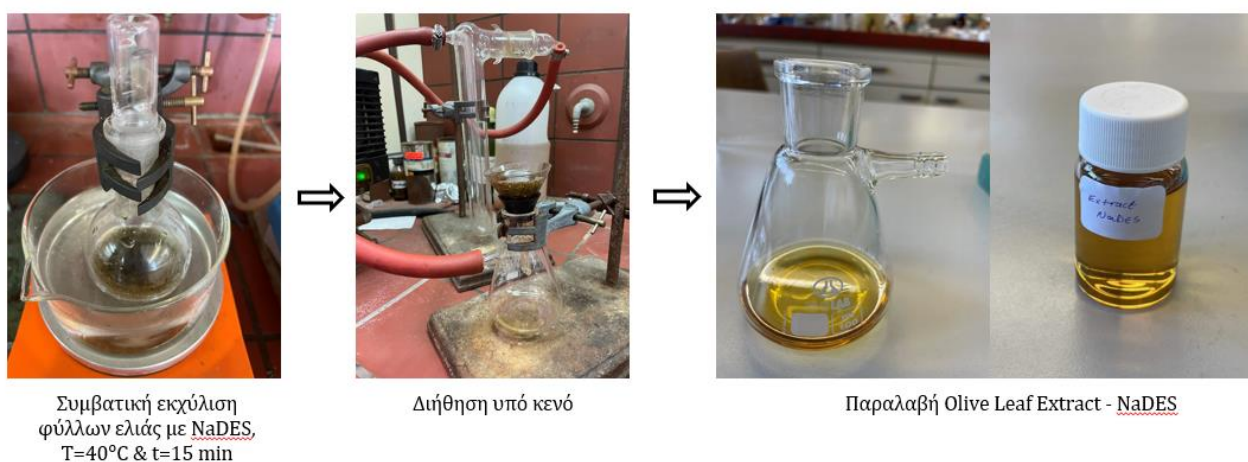
Αρχικά, συλλέγονται τα φύλλα ελιάς και πλένονται, ώστε να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες. Στη συνέχεια, αφήνονται για φυσική ξήρανση σε σκιερό μέρος και σε συνθήκες ατμόσφαιρας για περίπου 1 εβδομάδα. Ακολούθως, τεμαχίζονται με πολυκόφτη και τρίβονται με γουδί, ώστε να αποκτήσουν την μορφή σκόνης και να βελτιωθεί η μεταφορά μάζας των βιοενεργών ενώσεων από την στερεή πρώτη ύλη στον υγρό διαλύτη κατά την διεργασία της εκχύλισης, λόγω αυξημένης επιφάνειας επαφής. Τέλος, αποθηκεύονται σε σκουρόχρωμους περιέκτες, όπου αποφεύγονται τυχόν φωτοχημικές αλληλεπιδράσεις, και σε δροσερό περιβάλλον για την διατήρηση των ιδιοτήτων τους, έως ότου χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση ή άλλη εφαρμογή.

2.4.2 Εκχύλιση με NADES

Ο πράσινος διαλύτης που έχει επιλεγεί, Glu/LA/W, πληροί τα απαραίτητα κριτήρια διαλυτών για την διεργασία της εκχύλισης, ενώ αποτελείται από φυσικά μη τοξικά συστατικά και μπορεί να ανακυκλωθεί. Η επιλογή του διαλύτη είναι καθοριστική όχι μόνο για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης αλλά και για τη σύνθεση και την ποιότητα του τελικού εκχυλίσματος. Ο διαλύτης Glu/LA/W σε γραμμομοριακή αναλογία 1:5:6.2 εκχυλίζει αποτελεσματικά τις ενώσεις με βιοενεργό περιεχόμενο από τα φύλλα ελιάς, για τις οποίες λειτουργεί ως αποθηκευτικό, σταθεροποιητικό και προστατευτικό μέσο.

Κατά την διεξαγωγή της συμβατικής εκχύλισης, προστίθενται 30 g NADES και 1 g φύλλα ελιάς, υπό μορφή σκόνης, σε σφαιρική φιάλη των 100 ml. Η φιάλη τοποθετείται σε ελαιόλουτρο, το οποίο έχει ήδη προθερμανθεί και η θερμοκρασία του έχει σταθεροποιηθεί στην επιθυμητή τιμή των 40°C, όπου παραμένει για 15 min υπό ανάδευση και θέρμανση. Η διάταξη περιλαμβάνει και κάθετο ψυκτήρα, ώστε να αποφεύγονται τυχόν απώλειες του διαλύτη (κυρίως για οργανικούς διαλύτες που εξατμίζονται). Το εκχύλισμα χρησιμοποιείται όπως έχει ληφθεί, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία με ενεργοβόρες και χρονοβόρες διαδικασίες, καθώς η χρήση πράσινων διαλυτών δεν απαιτεί την απομάκρυνση τους από το σύστημα και δεν παράγει τοξικά παραπροϊόντα.

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό, ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις του τελικού εκχυλίσματος και να ανακτηθεί το υγρό διάλυμα χωρίς την παρουσία στερεών. Το τελικό μείγμα που παραλαμβάνεται (NADES με φυσικό εκχύλισμα) χαρακτηρίζεται με αναλυτικές μεθόδους, ενώ ενσωματώνεται στις υδρογέλες χιτοζάνης.



Εικόνα 20: Πειραματική διαδικασία ανάκτησης εκχυλίσματος

2.5 Χαρακτηρισμός εκχυλίσματος

2.5.1 Χρωματομετρικός προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα – TPC

Το εκχύλισμα που παραλαμβάνεται τελικά χαρακτηρίζεται ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων που περιέχεται σε αυτό. Η μέτρηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteu και όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (BioTek Epoch 2). Το γαλλικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την κατασκευή του διαγράμματος βαθμονόμησης και την επεξεργασία των μετρήσεων, ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά g ξηρών φύλλων ελιάς [71], [72].

Κατά την πειραματική διεξαγωγή, δεν αραιώθηκε το εκχύλισμα, καθώς περιέχει σημαντική ποσότητα νερού ο επιλεγμένος διαλύτης NADES. Για τον χαρακτηρισμό ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά, σε δοχεία Eppendorf προστίθενται 1 mL H₂O και 20 μL εκχυλίσματος, ενώ παράλληλα παρασκευάζονται και τυφλά δείγματα, στα οποία αντί για 20 μL εκχυλίσματος, προστίθενται 20 μL υπερκάθαρου νερού. Συνολικά, παρασκευάζονται 6 διαλύματα για σκοπούς

επαναληψιμότητας και μείωσης σφαλμάτων, εκ των οποίων τα 3 περιέχουν ποσότητα εκχυλίσματος, ενώ τα υπόλοιπα αποτελούν τα blank των μετρήσεων.

- ii. Ακολουθεί ανάδευση των διαλυμάτων σε Vortex για πλήρης ομογενοποίηση και στη συνέχεια προστίθενται 100 μL από το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu, το οποίο είναι φωτοευαίσθητο.
- iii. Τα διαλύματα αφήνονται σε ηρεμία και σε σκοτεινό μέρος για 5 min.
- iv. Μετά το πέρας των 5 min, προστίθενται 300 μL κορεσμένου υδατικού διαλύματος Na_2CO_3 για έλεγχο του pH.
- v. Στη συνέχεια, προστίθενται 580 μL υπερκίθρου νερού και τα διαλύματα αναδεύονται.
- vi. Τα διαλύματα επωάζονται για 1h σε σκοτεινό μέρος και θερμοκρασία δωματίου.
- vii. Ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων σε φασματοφωτόμετρο και μήκος κύματος ίσο με 755 nm.

Η απορρόφηση των δειγμάτων που περιέχουν εκχύλισμα προκύπτει μετά από αφαίρεση της απορρόφησης των τυφλών δειγμάτων και κατά την επεξεργασία των μετρήσεων, λαμβάνεται η μέση απορρόφηση για το κάθε δείγμα.

Το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις προκύπτει μέσω της ισοδύναμης συγκέντρωσης σε γαλλικό οξύ, η οποία προσδιορίζεται από τις απορροφήσεις των διαλυμάτων στα 755 nm [14], [16], [42], [71].

$$\text{TPC} \left(\frac{\text{mg}_{\text{eq GA}}}{\text{g}} \right) = \frac{C_{\text{gallic acid}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \cdot V_{\text{extr}} (\text{L}) \cdot D}{m (\text{g})} \quad (1), \text{ όπου:}$$

- $C_{\text{gallic acid}}$: η συγκέντρωση εκχυλίσματος εκφρασμένη σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, η οποία προσδιορίζεται από την καμπύλη αναφοράς $C_{\text{gallic acid}} = 1.125 \cdot A_{755} - 0.0521$, όπου A_{755} : η απορρόφηση των δειγμάτων στα 755 nm
- V_{extr} : ο όγκος του εκχυλίσματος
- D : ο συντελεστής αραίωσης
- m : η μάζα της πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκχύλιση

2.5.2 Χρωματομετρικός προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας φλαβονοειδών ενώσεων στο εκχύλισμα – TFC

Η μέτρηση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων στο εκχύλισμα πραγματοποιείται με τη χρωματογραφική μέθοδο συμπλοκοποίησης χλωριούχου αργιλίου - AlCl_3 που στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκου των φλαβονοειδών με το Al^{3+} [73]–[75]. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και το διάγραμμα βαθμονόμησης κατασκευάστηκε με πρότυπα διαλύματα κατεχίνης και τα αποτελέσματα για τη συγκέντρωση των διαλυμάτων σε φλαβονοειδή εκφράστηκαν ως mg ισοδυνάμων κατεχίνης ανά g ξηρών φύλλων ελιάς [71]. Κατά την πειραματική διεξαγωγή, δεν αραιώθηκε το εκχύλισμα, καθώς περιέχει σημαντική ποσότητα νερού ο επιλεγμένος διαλύτης. Για τον χαρακτηρισμό ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

- i. Αρχικά, παρασκευάζονται τα διαλύματα που αποτελούνται από εκχυλίσματα και τα αντίστοιχα τυφλά. Σε 3 δοχεία Eppendorf προστίθενται 50 μL εκχυλίσματος και στα υπόλοιπα 50 μL υπερκίθρου νερό.
- ii. Στη συνέχεια, προστίθενται 30 μL NaNO_2 5% σε όλα τα δείγματα, ενώ αναδεύονται σε vortex και αφήνονται σε ηρεμία για 6 min.
- iii. Ακολουθεί προσθήκη 60 μL AlCl_3 και ανάδευση.
- iv. Τα διαλύματα αφήνονται σε ηρεμία για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- v. Προστίθενται 300 μL NaOH , 580 μL H_2O και ακολουθεί ανάδευση.
- vi. Τα δείγματα αφήνονται για 15 min σε ηρεμία και θερμοκρασία δωματίου.

- vii. Τέλος, μετρώνται οι απορροφήσεις τους στο φασματοφωτόμετρο uv-vis reader στα 500 και 510 nm.

Η απορρόφηση των δειγμάτων που περιέχουν εκχύλισμα προκύπτει μετά από αφαίρεση της απορρόφησης των τυφλών δειγμάτων και κατά την επεξεργασία των μετρήσεων, λαμβάνεται η μέση απορρόφηση για το κάθε δείγμα.

Το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδείς ενώσεις προκύπτει μέσω της ισοδύναμης συγκέντρωσης σε κατεχίνη, η οποία προσδιορίζεται από τις απορροφήσεις των διαλυμάτων στα 500 και 510 nm [14], [71], [73]–[75].

$$\text{TFC} \left(\frac{\text{mg}_{\text{eq cat}}}{\text{g}} \right) = \frac{C_{\text{catechin}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \cdot V_{\text{extr}}(\text{L}) \cdot D}{m (\text{g})} \quad (2), \text{ όπου:}$$

- C_{catechin} : η συγκέντρωση εκχυλίσματος εκφρασμένη σε ισοδύναμα κατεχίνης, η οποία προσδιορίζεται από τις καμπύλες αναφοράς $C_{\text{catechin}} = 0.734 \cdot A_{500} - 0.0227$ και $C_{\text{catechin}} = 0.7436 \cdot A_{510} - 0.023$, όπου $A_{500/510}$: η απορρόφηση των δειγμάτων στα 500 και 510 nm.
- V_{extr} : ο όγκος του εκχυλίσματος
- D : ο συντελεστής αραίωσης
- m : η μάζα της πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκχύλιση

2.6 Παρασκευή υδρογελών

Το τελικό εκχύλισμα που παραλαμβάνεται από την συμβατική εκχύλιση με χρήση του NADES ως εκχυλιστικό μέσο, ενσωματώνεται σε διαφορετικές περιεκτικότητες στις υδρογέλες χιτοζάνης, όπου ο διαλύτης δρα ως φυσικός παράγοντας διασύνδεσης του πλέγματος, διαλυτοποιεί την χιτοζάνη και η γλυκόζη (HBA) του μείγματος NADES αντιδρά με την χιτοζάνη προς τον σχηματισμό προϊόντων της αντίδρασης Maillard, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια σύνθετη παραγόμενη υδρογέλη.

Για την σύνθεση υδρογελών χιτοζάνης καθορίζονται διαφορετικές περιεκτικότητες εκχυλίσματος και χιτοζάνης, ενώ προστίθεται ποσότητα επιφανειοδραστικού παράγοντα Tween 80 για την επίτευξη ομοιογενούς υδρογέλης. Η χιτοζάνη αποτελεί το υδρόφιλο πολυμερές στο δίκτυο και για την παρασκευή των υδρογελών χρησιμοποιείται χιτοζάνη με ιξώδες 5-20 cps, ενώ στα τελικά πειράματα εξετάζεται η χιτοζάνη με μεγαλύτερο ιξώδες και ίσο με 20-100 cps, ώστε να συγκριθούν οι ιδιότητες των δύο διαφορετικών συστημάτων.

Οι τελικές περιεκτικότητες των συστατικών έχουν διερευνηθεί στα προκαταρκτικά πειράματα, ενώ διερευνάται η εφαρμογή των υδρογελών χιτοζάνης ως καλλυντικά για τις τελικές τιμές που επιλέχθηκαν.

2.6.1 Προκαταρκτικά Πειράματα και Συνδυασμός Πειραμάτων

Αρχικά, τίθενται και δοκιμάζονται διαφορετικά όρια περιεκτικότητας για το κάθε συστατικό των υδρογελών και με την χρήση του προγράμματος πειραματικού σχεδιασμού Design Expert προκύπτουν συνδυασμοί πειραμάτων προς εκτέλεση. Κατά τα αρχικά πειράματα, διερευνώνται πρώτα οι ακραίες συνθήκες για τις κύριες παραμέτρους, δηλαδή της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος με NADES και της περιεκτικότητας της χιτοζάνης, ώστε να περιοριστεί το εύρος τους σε αυτές που σχηματίζουν αποτελεσματικά στερεά πηκτώματα. Έπειτα, εξετάζεται η επίδραση των διαφορετικών περιεκτικότητας του διαλύματος εκχυλίσματος με NADES, της περιεχόμενης χιτοζάνης και του Tween 80 και αξιολογούνται οι ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Τα αρχικά όρια που δοκιμάστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Αρχικά όρια περιεκτικότητας των συστατικών της υδρογέλης

[OLE - NADES]	[CS (5-20 cps)]	[Tween 80]
% v/v	% w/v	% w/v
10	5	0.5
30	15	2

Για την κάθε υδρογέλη παραλαμβάνονται 3 ml διαλύματος OL Extract - NADES της κάθε περιεκτικότητας, όπου προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα χιτοζάνης. Το Tween 80 ομοιογενοποιεί το προκύπτον μείγμα. Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων διαφορετικών περιεκτικότητας του διαλύματος OLE- NADES, πραγματοποιείται μέτρηση του pH, ώστε να αναμένεται η συμπεριφορά της χιτοζάνης. Σε όλες τις περιπτώσεις, το pH των διαλυμάτων κυμαίνεται σε πολύ όξινες τιμές (pH≈2), επομένως η διαλυτοποίηση της χιτοζάνης είναι εφικτή.

Αρχικά, μελετήθηκαν οι περιεκτικότητες της χιτοζάνης και του επιφανειοδραστικού παράγοντα με 10% v/v OLE- NADES. Η κατώτατη τιμή περιεκτικότητας της χιτοζάνης είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ρευστού μείγματος κι όχι συμπαγούς υδρογέλης, ενώ με 10% w/v CS και με 0.5 - 1.25 % w/v Tween 80 σχηματίζεται στερεό πήκτωμα, χωρίς να έχει διαλυθεί πλήρως η χιτοζάνη. Επομένως, απορρίφθηκαν οι ελάχιστες τιμές περιεκτικότητας των δύο συστατικών, ενώ υδρογέλη με 1.25% w/v Tween 80 ήταν οριακή ως προς την διαλυτότητα.

Έτσι, έγινε αλλαγή των ορίων τους προς αυξημένες τιμές, καθώς δεν επέφεραν στο επιθυμητό αποτέλεσμα. Τα επόμενα όρια που διερευνήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Όρια περιεκτικότητας των συστατικών της υδρογέλης

[OLE - NADES]	[CS (5-20 cps)]	[Tween 80]
% v/v	% w/v	% w/v
10	10	2
30	20	4

Για την διερεύνηση ορίων της χιτοζάνης και του Tween 80, εξετάστηκαν οι περιεκτικότητες 15 & 20% w/v και 3 & 4 % w/v, αντίστοιχα, ώστε να πραγματοποιηθεί η τελική επιλογή των ευρών. Στην ενδιάμεση τιμή της CS, ο σχηματισμός της υδρογέλης ήταν επιτυχής, καθώς διαλυτοποιήθηκε και απέκτησε συμπαγής μορφή. Ωστόσο, υδρογέλη με 20% w/v CS απορρίφθηκε, καθώς το μείγμα ήταν πολύ πυκνό με αδιάλυτη ποσότητα χιτοζάνης. Στις περιπτώσεις αυτές, η περιεκτικότητα εκχυλίσματος - NADES παρέμενε σταθερή και ίση με 10% v/v. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, μειώθηκε το εύρος περιεκτικότητας της χιτοζάνης.

Όσον αφορά τις περιεκτικότητες του εκχυλίσματος - NADES διερευνήθηκαν οι ακραίες τιμές, με την ελάχιστη να σχηματίζει στερεές και διαυγείς υδρογέλες. Στην περίπτωση που έλαβε την μέγιστη τιμή, 30% v/v, σχηματίστηκε πολύ θολό πήκτωμα, με αποτέλεσμα να απορριφθεί.



Εικόνα 21: Αποτυχημένες Υδρογέλες

Έτσι, εξετάστηκε η ενδιάμεση τιμή περιεκτικότητας του εκχυλίσματος, 20% v/v, η οποία μελετήθηκε υπό διαφορετικές περιεκτικότητες χιτοζάνης και είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό στερεών (που δεν έρεαν) και συμπαγών υδρογελών.

Τα τελικά πειραματικά όρια που προέκυψαν για το κάθε συστατικό, με βάση τα προκαταρκτικά πειράματα, εφαρμόστηκαν στο πρόγραμμα Design Expert, το οποίο αποτελεί εργαλείο πειραματικού σχεδιασμού και προτείνει συνδυασμούς πειραμάτων με διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Τα όρια που επιλέχθηκαν για τα τρία συστατικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 5, ενώ τα πειράματα που προτάθηκαν από το λογισμικό παρατίθενται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 5: Τελικά όρια περιεκτικότητας των συστατικών της υδρογέλης

[OLE - NADES]	[CS (5-20 cps)]	[Tween 80]
% v/v	% w/v	% w/v
10	10	2
20	15	4



Εικόνα 22: Συμπαγείς Υδρογέλες με διαλυμένη χιτοζάνη

Πίνακας 6: Προτεινόμενα Πειράματα από Design Expert

[OLE - NADES]	[CS (5-20 cps)]	[Tween 80]
% v/v	% w/v	% w/v
10	12.5	2
10	12.5	4
10	10	3
10	15	3
15	12.5	3
15	10	4
15	12.5	3
15	12.5	3
15	15	4
15	15	2

15	10	2
20	12.5	2
20	10	3
20	12.5	4
20	15	3

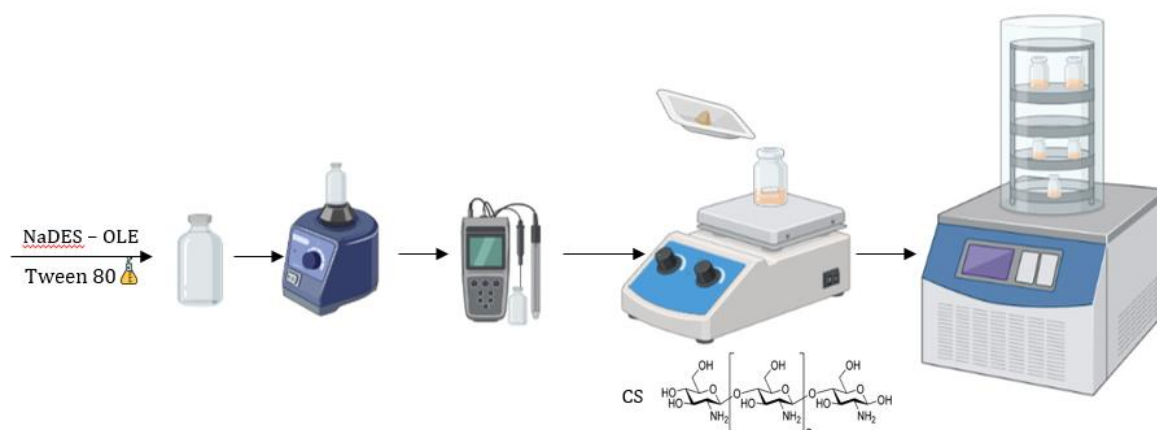
Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων που προτάθηκαν, όλες οι σχηματιζόμενες υδρογέλες με τους διαφορετικούς συνδυασμούς περιεκτικότητας που προέκυψαν για το κάθε συστατικό του συστήματος, ξηράθηκαν υπό κατάψυξη (freeze drying) για 2 ημέρες, ώστε να απομακρυνθεί η περιεχόμενη υγρασία. Ακολούθως μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα διόγκωσης και συγκράτησης νερού, ενώ ορισμένες αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση.



Εικόνα 23: Ξηρές Υδρογέλες μετά τη λυοφιλοποίηση

Ειδικότερα, ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία:

- i. Σε γυάλινο vial των 30 ml προστίθεται η ανάλογη ποσότητα Tween 80, με βάση την επιθυμητή περιεκτικότητα.
- ii. Στη συνέχεια, προστίθενται 3 ml OLE - NADES της αντίστοιχης περιεκτικότητας και επιβεβαιώνεται η οξύτητα του pH του διαλύματος, στο οποίο προστίθεται μαγνητικός αναδευτήρας.
- iii. Ακολούθως, το vial μεταφέρεται σε θερμαινόμενο μάτι, όπου προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα χιτοζάνης, υπό ήπια ανάδευση, ώστε να ενισχυθεί η διαλυτότητα της. Κατά τον σχηματισμό της υδρογέλης, δεν επιθυμείται θέρμανση.
Το μείγμα που σχηματίζεται, κατά τη ζελατινοποίηση, ονομάζεται "sol" και αποτελείται από συνδεδεμένες μακρομοριακές αλυσίδες μεταξύ τους. Η περαιτέρω σύνδεση οδηγεί σε ένα μείγμα που ονομάζεται gel.
- iv. Το vial αφήνεται υπό ανάδευση, μέχρι τον σχηματισμό διαγούς και συμπαγούς υδρογέλης. Η διάρκεια για την κάθε περιεκτικότητα διαφέρει.
- v. Μετά το πέρας του απαιτούμενου διαστήματος, αφαιρείται ο μαγνητικός αναδευτήρας και η υδρογέλη οδηγείται σε ξήρανση με κατάψυξη, ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία.



Εικόνα 24: Πειραματική διαδικασία παρασκευής υδρογέλης

Τα 15 πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού εκτελέστηκαν εις διπλούν με CS (5-20cps), ώστε να συγκριθούν τα τελικά αποτελέσματα που φέρουν, ενώ μερικές υδρογέλες που επιλέχθηκαν παρασκευάστηκαν με CS (20-100cps) για την μελέτη της επίδρασης του βιοπολυμερούς στις ιδιότητες του τελικού προϊόντος και στην αντίδραση Maillard.



Εικόνα 25: Σχηματιζόμενες Υδρογέλες με CS (20-100cps)

2.6.2 Χαρακτηρισμός Υδρογελών

2.6.2.1 Ικανότητα διόγκωσης - Swelling

Μετά τη διεργασία της λυοφιλοποίησης, οι υδρογέλες εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να απορροφούν νερό και να διογκώνονται.

Κατά την διεξαγωγή, το δείγμα βυθίζεται σε επαρκές διάλυμα για να αποκτήσει διαφορετικές αναλογίες διόγκωσης (SR) σε διαφορετικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένου του pH, της θερμοκρασίας και του χρόνου. Έτσι, παρασκευάζονται ρυθμιστικά διαλύματα, τα οποία προσομοιάζουν τις συνθήκες της εκάστοτε εφαρμογής και οι υδρογέλες εισάγονται σε vials που περιέχουν τα αντίστοιχα buffers και παραμένουν για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα στον incubator με την επιθυμητή θερμοκρασία προσομοίωσης. Η μελέτη της ικανότητας διόγκωσης πραγματοποιείται με την λήψη μετρήσεων μάζας ανά χρονικά διαστήματα και τη σύγκριση τους με την αντίστοιχη ξηρή μάζα της υδρογέλης αρχικά.

Ειδικότερα, στην περίπτωση που οι υδρογέλες προορίζονται για καλλυντικά και διαδερμική χρήση παρασκευάζεται Phosphate buffer με pH = 5.5 και η διαδικασία του swelling πραγματοποιείται σε T = 32°C, ώστε να προσομοιαστούν οι συνθήκες δέρματος. Για χορήγηση δια του στόματος, με ενσωματωμένη δραστική ουσία, που πρόκειται να απορροφηθεί στο στομάχι, παρασκευάζεται διάλυμα υδροχλωρικού οξέος HCl 0.1 N με pH = 1.2 και ο incubator ρυθμίζεται στη θερμοκρασία στομάχου,

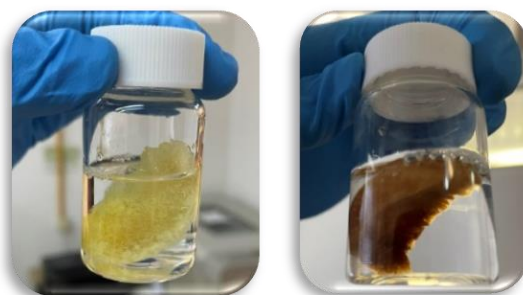
δηλαδή στους $T = 37^{\circ}\text{C}$, ενώ για φάρμακα που χορηγούνται ενέσιμα και για ευρεία χρήση, εξετάζεται η ικανότητα διόγκωσης σε Phosphate buffer με $\text{pH} = 7.4$ και $T = 37^{\circ}\text{C}$.

Η ικανότητα διόγκωσης προσδιορίζεται από μετρήσεις μάζας ξηρής υδρογέλης σε χρόνο 0 min και διογκωμένων ανά 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min και 180 min. Η μάζα των διογκωμένων υδρογελών μετράται μετά από αφαίρεση τους από τα vials και την απομάκρυνση της επιφανειακής περίσσειας του ρυθμιστικού διαλύματος με χρήση διηθητικού χαρτιού, ώστε οι μετρήσεις που λαμβάνονται να αφορούν την προσροφούμενη ποσότητα στην υδρογέλη κατά την διογκωμένη κατάσταση [44], [76].

Η διόγκωση – Swelling Ratio υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (3):

$$\text{SR} (\%) = \frac{W_t - W_d}{W_d} \cdot 100 \quad (3),$$

όπου W_t η μάζα της υδρογέλης σε διογκωμένη κατάσταση σε κάθε χρονική στιγμή t και W_d το ξηρό βάρος αρχικά.



Εικόνα 26: Υδρογέλες κατά τη διαδικασία του swelling μέσα σε ρυθμιστικά διαλύματα



Εικόνα 27: Υδρογέλη σε ξηρή και διογκωμένη κατάσταση κατά το swelling (10% v/v OLE – NADES & 12.5% w/v CS & 3% w/v Tween 80)

2.6.2.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού – Water Retention

Η ικανότητα συγκράτησης του νερού προσδιορίζεται κατά τη διαδικασία του Swelling και συγκεκριμένα βρίσκεται από τη χρονική στιγμή, στην οποία η υδρογέλη έχει φτάσει στο σημείο μέγιστης πρόσληψης νερού και κατά συνέπεια μέγιστης διόγκωσης, δηλαδή στο σημείο ισορροπίας. Με την πάροδο του χρόνου οι μετρήσεις της μάζας της υδρογέλης υποδηλώνουν ελάχιστες απώλειες, καθώς διατηρείται πρακτικά σταθερή, συγκρατώντας ποσότητα νερού στο πολυμερικό δίκτυο [14], [77]. Η ικανότητα συγκράτησης υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (4):

$$\text{WR} (\%) = \frac{W_t - W_d}{W_{t_{\max}} - W_d} \cdot 100 \quad (4),$$

όπου W_t η μάζα της υδρογέλης σε διογκωμένη κατάσταση σε κάθε χρονική στιγμή t , W_d το αρχικό ξηρό βάρος και $W_{t_{max}}$ η μέγιστη μάζα διογκωμένης υδρογέλης.

2.6.2.3 Δομικός Χαρακτηρισμός υδρογελών και διαλύτη

Για τη δομική μελέτη των υδρογελών πραγματοποιείται η λήψη φασμάτων με τη μέθοδο φασματοσκοπίας υπέρυθρων μετασχηματισμού Fourier (FT - IR), η οποία αποτελεί την πιο κοινή ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική υπέρυθρης φασματοσκοπίας στην οργανική σύνθεση, την επιστήμη πολυμερών, την πετροχημική μηχανική, τη φαρμακευτική βιομηχανία, την ιατρική και την ανάλυση τροφίμων. Η μέθοδος έχει βρει πολυάριθμες εφαρμογές, καθώς είναι εύκολη, απλή, ευέλικτη, ακριβής, γρήγορη, κατάλληλη, μη καταστροφική για τα δείγματα και οικονομικά αποδοτική. Μέσω των φασμάτων, παρακολουθούνται και ταυτοποιούνται ενώσεις, ενώ προσδιορίζονται λειτουργικές ομάδες και δεσμοί που υπάρχουν στο δείγμα από τις κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο τρόπο δόνησης του μορίου.

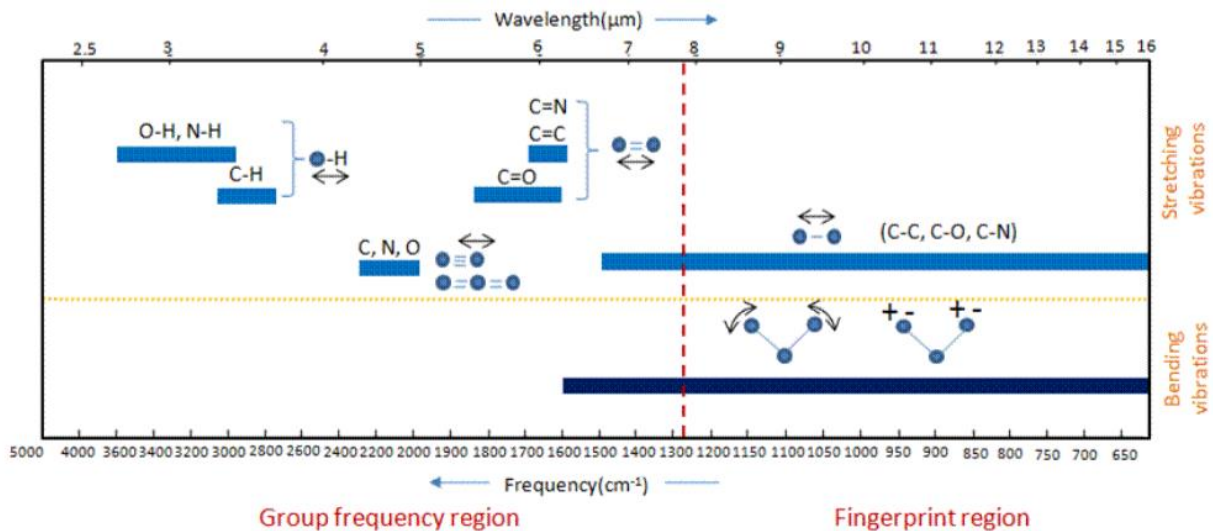
Τα προς εξέταση χημικά δείγματα υποβάλλονται σε δέσμη υπέρυθρης ακτινοβολίας, μέρος της οποίας απορροφάται ή μεταδίδεται από το δείγμα και μετατρέπεται σε δονητική (έκταση ή κάμψη) ή περιστροφική ενέργεια, ενώ η υπόλοιπη διέρχεται χωρίς καμία μεταβολή. Το προκύπτον φάσμα απεικονίζει ένα γράφημα με τον κυματαριθμό (cm^{-1}) και την διαπερατότητα και παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο δόνησης των μορίων, τη χημική δομή και τις λειτουργικές ομάδες.

Κάθε δείγμα, στερεό, υγρό ή αέριο, λόγω διαφορετικής δομής, παράγει μοναδικό φάσμα, λόγω απορρόφησης σε διαφορετικές συχνότητες, επομένως η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων με βάση τα φασματικά χαρακτηριστικά και τη διάκριση μεταξύ των μορίων, ενώ επιβεβαιώνει την καθαρότητα και την ποιότητα των δειγμάτων.

Ο μετασχηματισμός Fourier είναι μια μαθηματική συνάρτηση που διαχωρίζει τα κύματα και επιστρέφει τη συχνότητα του κύματος με βάση τον χρόνο (μετατροπή συμβολογράμματος). Το σήμα που τελικά καταλήγει στον ανιχνευτή αντιπροσωπεύει το μοριακό αποτύπωμα του δείγματος, ενώ κάθε μόριο έχει μοναδικό δακτυλικό αποτύπωμα καθιστώντας το FT-IR χρήσιμο για χημική ταυτοποίηση [78], [79].

Τα φάσματα χωρίζονται στην περιοχή λειτουργικών ομάδων και στο δακτυλικό αποτύπωμα [80]. Ειδικότερα, διακρίνονται σε τέσσερις περιοχές:

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



Εικόνα 28: Περιοχές ομάδων σε φάσμα FT - IR [80]

Κατά την πειραματική διαδικασία, εξετάζεται η δομή των υδρογελών χιτοζάνης και οι μεταβολές που προκύπτουν από την αντίδραση Maillard, ενώ χαρακτηρίζεται ο διαλύτης του συστήματος, ο οποίος δρα ως εκχυλιστικό μέσο, παράγοντας αποθήκευσης βιοδραστικών ενώσεων, παράγοντας διασύνδεσης και διαλυτοποίησης, ενώ η γλυκόζη αντιδρά με τις αμινομάδες της χιτοζάνης προς την παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης Maillard.

2.6.2.4 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης

2.6.2.4.1 Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης - AAPH

Η αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης αποτελεί γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης των χημικών μορίων. Στην αναλυτική τεχνική χρησιμοποιείται η ένωση AAPH (2,2'- azobis(2-amidinopropane)), η οποία λειτουργεί ως εκκινητής της οξειδωσης του λινελαϊκού οξέος μέσω της επαγωγής υπεροξειδίων διενίων κατά τη θερμική του αποσύνθεση και εξετάζεται η ικανότητα παρεμπόδισης της οξειδωσης από τις ενώσεις που μελετώνται. Οι μετρήσεις που πραγματοποιούνται λαμβάνονται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου UV στα 234 nm, όπου απορροφούν τα υπεροξειδία [42], [81].

Κατά την πειραματική διαδικασία, 14 μL του διαλύματος λινελαϊκού 16 mM προστέθηκαν στην κυψελίδα UV που περιείχε 1.3 mL ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate 0.05 M με pH 7.4. Η αντίδραση οξειδωσης ξεκίνησε στους 37 °C με την προσθήκη 70 μL διαλύματος AAPH 40 mM, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εκκινητής ελεύθερων ριζών. Οι σχηματιζόμενες υδρογέλες με ενσωματωμένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς και NADES διαλύονται σε 10% v/v γαλακτικό οξύ - LA εξετάζονται ως προς την ικανότητα τους να αποτρέπουν την οξειδωση των λιπιδίων στο φασματοφωτόμετρο uv-vis, των οποίων οι απορροφήσεις που λαμβάνονται υποδεικνύουν την αντιοξειδωτική τους δράση. Η οξειδωση των λιπιδίων διεξάγεται παρουσία των διαλυμένων υδρογελών, προσθέτοντας 14 μL στην κυψελίδα και αξιολογείται η αποτελεσματικότητά τους ως αντιοξειδωτικά μέσα μέσω της επιβράδυνσης της αλυσιδωτής αντίδρασης.

2.6.2.4.2 Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH

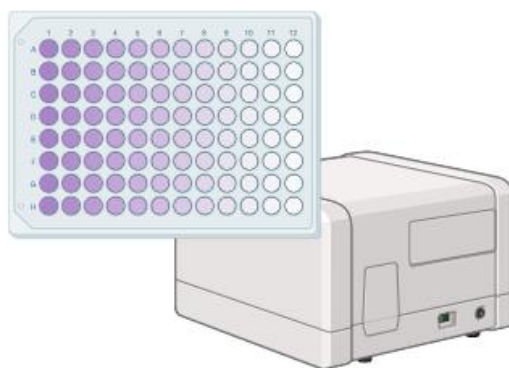
Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρογελών, εφαρμόστηκε και η φασματοφωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο). Πρόκειται για μία σταθερή και εμπορικά διαθέσιμη ρίζα αζώτου που απορροφά στο ορατό και υπεριώδες μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Το αρχικό χρώμα είναι μωβ, ενώ όταν αντιδρά με αντιοξειδωτικά, δηλαδή άλλες ρίζες, ηλεκτρόνια ή άτομα υδρογόνου, η υδραζίνη που προκύπτει είναι αποχρωματισμένη. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, η σταθερή ρίζα DPPH αντιδρά με τα αντιοξειδωτικά μόρια των δειγμάτων και μειώνεται μέχρι να αδρανοποιηθεί.

Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH, ζυγίζονται 5 mg DPPH και διαλύονται σε καθαρή αιθανόλη (διαλύεται σε οργανικούς διαλύτες), ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 50 mL. Το διάλυμα DPPH αφήνεται υπό ανάδευση για 30 min απουσία φωτός, καθώς πρόκειται για φωτοευαίσθητη ένωση. Σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων, προστίθενται 100 μL DPPH, ενώ για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υδρογελών προστίθεται ποσότητα διαλύματος υδρογέλης (διαλυμένη σε LA), η οποία αραιώνεται με τον διαλύτη. Ειδικότερα, παρασκευάζονται τα control, τα οποία περιέχουν 100 μL δ/τος DPPH και 100 μL LA αντί για τη δραστική ουσία και αντίστοιχα τα διαλύματα που πρόκειται να εξεταστούν (stocks), τα οποία περιέχουν 100 μL διάλυμα DPPH και 100 μL διαλύματος υδρογέλης, τα οποία μειώνονται και συμπληρώνονται με διαλύτη έως 100 μL, ώστε το κάθε πηγάδι να αποτελείται από 200 μL συνολικά. Τελικά υπάρχουν διαλύματα συγκεντρώσεων C, 0.8C, 0.6C, 0.4C και 0.2C. Για παράδειγμα, σε πηγάδι που περιέχει διάλυμα συγκέντρωσης 0.6C τοποθετούνται 60 μL του υπερκείμενου διαλύματος υδρογέλης, 40 μL γαλακτικού οξέος και 100 μL δ/τος DPPH.

Το plate αναδεύεται ελαφρώς και επωάζεται σε σκοτεινό μέρος. Με τη χρήση της συσκευής Epoch 2 Microplate Reader της εταιρείας Bio Tek Instruments, λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης (A_{sample}) στα 515 nm στα 15, 30, 45 και 60 min και εξετάζεται ως προς την απορρόφηση του control (A_{control}). Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν [14], [16], [42], [73], [82].

Η % δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH υπολογίζεται από την εξίσωση (5):

$$\% \text{ Δέσμευση} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \cdot 100 \quad (5)$$



Εικόνα 29: Συσκευή uv-vis microplate reader και πλακίδιο 96 φρεατίων

2.6.2.5 Μέθοδος αξιολόγησης θερμικών ιδιοτήτων

2.6.2.5.1 Θερμοβαρυμετρική ανάλυση TGA

Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση TGA εφαρμόζεται για τη μελέτη της συμπεριφοράς των υλικών υπό συνθήκες θέρμανσης και την αξιολόγηση θερμικών φαινομένων, θερμικής σταθερότητας και τελικής

αποσύνθεσης τους κατά τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις και κυρίως κατά την αύξηση της θερμοκρασίας. Η αναλυτική τεχνική βασίζεται στη μέτρηση της απώλειας ή της αύξησης του βάρους που υφίσταται το δείγμα κατά τη μεταβολή της θερμοκρασίας σε σχέση με την θερμοκρασία και τον χρόνο και χρησιμοποιείται ευρέως στην επιστήμη υλικών και πολυμερικών υλικών, ενώ έχει βρει πολυάριθμες εφαρμογές στην κατάλυση [83]–[85].

Στην παρούσα διπλωματική, οι υδρογέλες χιτοζάνης υποβάλλονται σε θερμοβαρυμετρική ανάλυση, ώστε να μελετηθούν οι θερμικές ιδιότητες και η θερμική σταθερότητα των πράσινων συστημάτων, καθώς είναι κρίσιμη για την επεξεργασία και τις τελικές εφαρμογές.

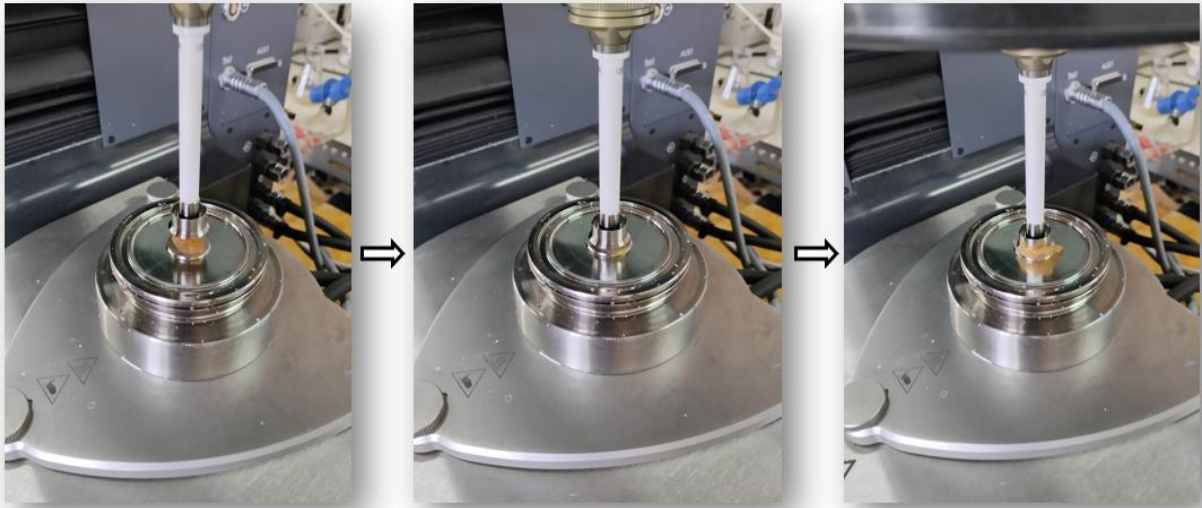
2.6.2.6 Ρεολογικά

Τα ρεολογικά χαρακτηριστικά καθορίζουν την τελική χρήση των υδρογελών, καθώς αποτυπώνουν κατά πόσο ισχυρό ή αδύναμο είναι το πλέγμα του συστήματος. Κατά την πειραματική διεξαγωγή, οι υδρογέλες υποβλήθηκαν σε δοκιμές που εφαρμόζονται σε ροόμετρο, ώστε να μελετηθεί η ρεολογική τους συμπεριφορά.

Για τον προσδιορισμό της τάσης των υδρογελών να ρέουν πραγματοποιήθηκε δοκιμή σταθερής διατμητικής ροής (steady shear flow). Οι μετρήσεις που λαμβάνονται και οι καμπύλες ροής περιγράφουν την ρεολογική συμπεριφορά των προϊόντων και συγκεκριμένα την εξάρτηση του ιξώδους τους από τον ρυθμό διατμητικής τάσης που εφαρμόζεται κατά τη δοκιμή στο υλικό. Στην πλειοψηφία, το ιξώδες των υδρογελών μειώνεται με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης και η μείωση του αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα στη μηχανική ιστών και την χορήγηση φαρμάκων. Επιπλέον, οι καμπύλες ροής χρησιμοποιούνται για να συγκριθούν τα ιξώδη υδρογελών με διαφορετικές διασυνδέσεις στο πολυμερικό δίκτυο και διαφορετικά πολυμερή.

Η δοκιμή σάρωσης παραμόρφωσης (amplitude sweep) είναι μια κοινή μέθοδος ρεολογικής δοκιμής που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό υδρογέλης εφαρμόζοντας αυξανόμενη ταλαντωτική τάση σε σταθερή συχνότητα. Τα αποτελέσματα μιας δοκιμής σάρωσης παραμόρφωσης εκφράζονται μέσω των μονάδων ελαστικότητας (G') και ιξώδους (G'') της υδρογέλης σε ένα αυξανόμενο εύρος τάσεων, το οποίο παρέχει επιπλέον πληροφορίες για τη Νευτωνική συμπεριφορά ή τη γραμμική ιξωδοελαστική περιοχή των υλικών. Η δοκιμή σάρωσης παραμόρφωσης εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της γραμμικής ιξωδοελαστικής περιοχής των υδρογελών, η οποία εμφανίζεται σε χαμηλές τάσεις διάτμησης, ενώ καθώς αυξάνεται η τάση, οι συντελεστές ταυτίζονται στο σημείο διασταύρωσης, όπου συμβαίνει ο μετασχηματισμός γέλης - διαλύματος και το υλικό αρχίζει να συμπεριφέρεται σαν ρευστό.

Η δοκιμή σάρωσης συχνότητας αποτελεί ρεολογική μέτρηση που καθορίζει τη σχέση μεταξύ της συχνότητας δοκιμής και των συντελεστών ελαστικότητας (G') και ιξώδους (G'') ενός υλικού. Επιπλέον, παρέχει πληροφορίες για τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες, την κατάσταση, τη σταθερότητα και τη δομή του πολυμερικού δικτύου συγκρίνοντας τις δύο τιμές G' και G'' στο εύρος συχνοτήτων. Σημειώνεται ότι οι συντελεστές υποδηλώνουν την κατάσταση του υλικού και οι συσχετίσεις τους περιγράφουν τη συμπεριφορά του. Ειδικότερα, ο συντελεστής ελαστικότητας (G') καθορίζει την απόκριση, όπου η υδρογέλη συμπεριφέρεται ως στερεό και αντίστοιχα ο συντελεστής ιξώδους (G'') την περιοχή, όπου η υδρογέλη έχει ιδιότητες υγρού [44], [49], [51].



Εικόνα 30: Υποβολή υδρογέλης σε ρεόμετρο

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Χαρακτηρισμός Εκχυλίσματος

3.1.1 Χρωματομετρικός προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα – TPC

Η μέτρηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα πραγματοποιούνταν σε κάθε διεργασία συμβατικής εκχύλισης για σκοπούς επαναληψιμότητας, ενώ οι συνθήκες παρέμεναν σταθερές. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία έφτανε στους 40°C και η συνολική διαδικασία είχε διάρκεια 15 min. Για την ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης Glu/LA/W σε αναλογία 1:5:6.2, ως εκχυλιστικό μέσο, καθώς πληροί τα απαραίτητα κριτήρια, ενώ για τις εκχυλισμένες ουσίες δρα ως παράγοντας σταθεροποίησης και αποθήκευσης. Σημειώνεται ότι το εκχύλισμα δεν αραιώθηκε κατά τον πειραματικό προσδιορισμό. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα προσδιορισμού συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα

Extraction time (min)	m _{olive leaves} (g)	m _{DES} (g)	TPC ($\frac{\text{mg}_{\text{eq GA}}}{\text{g}_{\text{OL}}}$)
15	1	30	14.10 ± 2.30
15	1	30	12.22 ± 0.76
15	1	30	10.27 ± 0.49

Σε κάθε batch εκχυλίσματος, οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται, κυμαίνονται στις ίδιες τιμές, γεγονός που επιβεβαιώνει την σταθερότητα του εκχυλίσματος ως προς τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά, χάριν στην αποθηκευτική λειτουργία του διαλύτη. Ωστόσο, τα εκχύλιματα φύλλων ελιάς αναμένονται πιο ποιοτικά και τα επίπεδα φαινολικών ενώσεων σε αυτά υψηλότερα. Οι μειωμένες τιμές συγκριτικά με τις αναμενόμενες οφείλονται στη διεργασία της εκχύλισης, καθώς πραγματοποιήθηκε συμβατικά.

3.1.2 Χρωματομετρικός προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας φλαβονοειδών ενώσεων στο εκχύλισμα – TFC

Αντίστοιχα, ο προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε κάθε εκχύλισμα. Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα προσδιορισμού συνολικής περιεκτικότητας φλαβονοειδών ενώσεων στο εκχύλισμα

Extraction time (min)	m _{olive leaves} (g)	m _{DES} (g)	TFC ($\frac{\text{mg}_{\text{eq cat}}}{\text{g}_{\text{OL}}}$)
15	1	30	1.08 ± 0.16
15	1	30	1.01 ± 0.07
15	1	30	0.96 ± 0.02

Η συμβατική εκχύλιση υποβαθμίζει τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του εκχυλίσματος, ενώ τα επίπεδα φλαβονοειδών ενώσεων θεωρούνται πολύ χαμηλά έως αμελητέα για εκχύλιματα φύλλων ελιάς. Επιπλέον, τα χαρακτηριστικά του επιλεγμένου διαλύτη, όπως το pH και το ιξώδες, ενδεχομένως να αποτρέπουν την ανάκτηση φλαβονοειδών.

3.2 Χαρακτηρισμός Διαλύτη

3.2.1 Δομικός Χαρακτηρισμός Διαλύτη

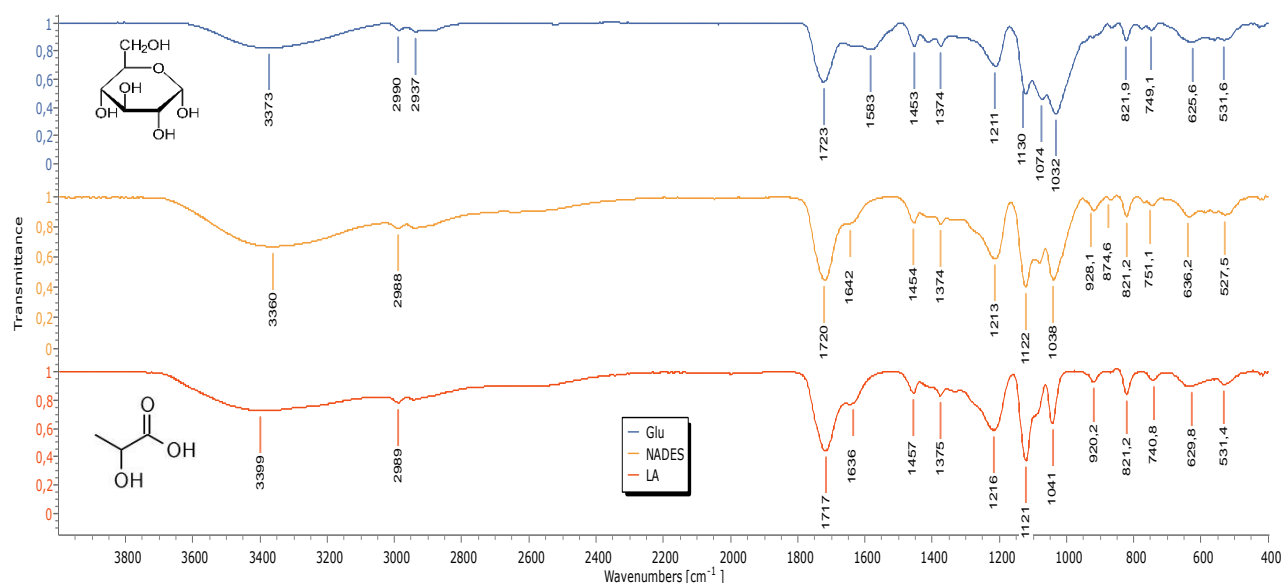
Για τη δομική μελέτη του διαλύτη, Glu/LA/W, πραγματοποιήθηκε η λήψη του φάσματος με τη μέθοδο FT – IR.

Αρχικά, επιβεβαιώνεται η αλληλεπίδραση των συστατικών του συστήματος με ισχυρές δυνάμεις δεσμών υδρογόνου από την ευρεία κορυφή στα 3360 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης των ομάδων O – H στα μόρια του γαλακτικού οξέος και της γλυκόζης, ενώ εμφανίζεται αντίστοιχα σε κάθε συστατικό, επιβεβαιώνοντας τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, εμφανίζεται μια στενή και έντονη κορυφή στα 1717 cm^{-1} που οφείλεται στην ομάδα καρβονυλίου C = O του δότη και δέκτη του ευθηκτικού μείγματος, η οποία παρατηρείται και στα φάσματα των συστατικών ξεχωριστά.

Σημειώνεται ότι οι μεγαλύτερες σε ένταση ζώνες απορρόφησης αντιστοιχούν σε ισχυρότερες διαμοριακές δυνάμεις υδρογόνου.

Επιπλέον, παρατηρείται ενδιάμεση κορυφή στα 1122 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις των ομάδων C – O του γαλακτικού οξέος, ενώ οι πρώτες ζώνες απορροφήσεις οφείλονται στις παραμορφώσεις ομάδων C – H και C – C των μορίων του διαλύτη [16], [38], [86]–[90].

Στον Πίνακα 9 συνοψίζονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις του διαλύτη.



Διάγραμμα 1: Φάσμα FT-IR συστατικών του NADES και του ευθηκτικού μείγματος

Πίνακας 9: Χαρακτηριστικές Ζώνες Απορρόφησης Γλυκόζης, Γαλακτικού Οξέος και NADES

Δονήσεις Παραμόρφωσης	$\tilde{\nu}(\text{OH})$	$\tilde{\nu}(\text{CH})$, α -ανωμερές	$\tilde{\nu}(\text{CH})$, συμμετρική	$\tilde{\nu}(\text{C}=\text{O})$	$\delta(\text{CH})$	$\tilde{\nu}(\text{C}-\text{O})$	$\delta(\text{CC})$
Glu	3373	2990	2937	1723	1453	1130	1032
LA	3399	2988	2950	1720	1454	1122	1041
Glu / LA / W	3360	2989	2950	1717	1457	1121	1038

Με βάση τις δομικές πληροφορίες που λαμβάνονται από το παραπάνω διάγραμμα επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου προς σχηματισμό του NADES, το φάσμα του οποίου διατηρεί τις χαρακτηριστικές ζώνες των συστατικών που αποτελούν τις λειτουργικές ομάδες που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις τους.

3.3 Χαρακτηρισμός Υδρογελών

3.3.1 Ικανότητα διόγκωσης – Swelling

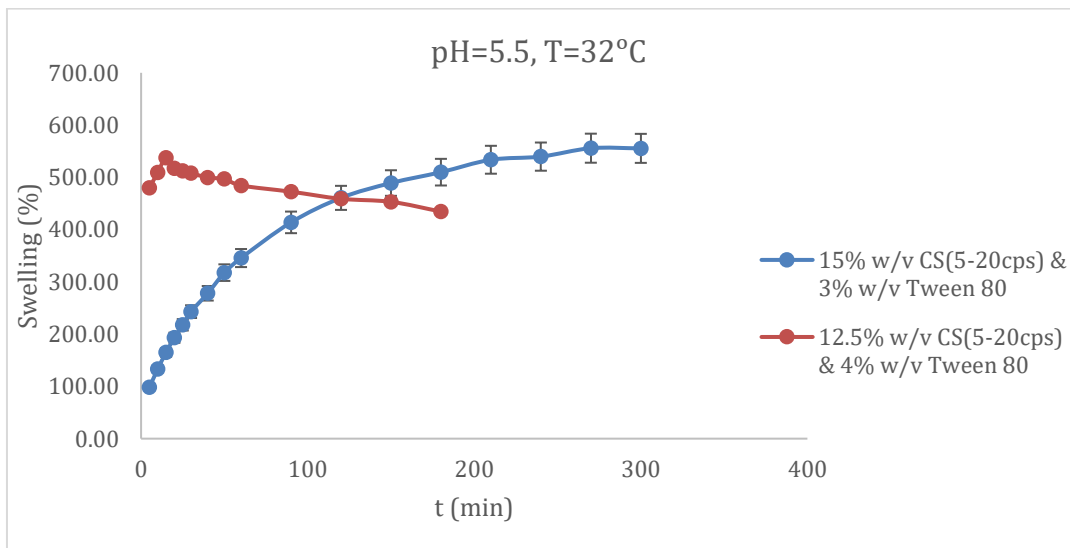
Οι 15 συνδυασμοί πειραμάτων που προτάθηκαν από το πρόγραμμα Design Expert εκτελέστηκαν και κατηγοριοποιήθηκαν ως προς ένα σταθερό συστατικό, ώστε να συγκριθούν τα προκύπτοντα αποτελέσματα μεταξύ τους, ενώ όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Για την παρασκευή των διαγραμμάτων που απεικονίζουν την ικανότητα διόγκωσης των υδρογελών προσδιορίστηκε ο μέσος όρος των ποσοστών διόγκωσης του κάθε πειράματος. Η διαδικασία του swelling είχε διάρκεια 3h και εφαρμόζοταν σε διαφορετικές συνθήκες προσομοίωσης pH και T ανάλογα της επιθυμητής εφαρμογής.

Για τη μελέτη των ιδιοτήτων των υδρογελών, ξηραίνονται υπό κατάψυξη (λυοφιλοποίηση – freeze drying), ενώ ορισμένες υδρογέλες διαφορετικών περιεκτικότητας εκχυλίσματος και χιτοζάνης ξηράθηκαν σε φούρνο σε $T = 48^{\circ}\text{C}$ για 2 days. Η τελική μορφή των συγκεκριμένων υδρογελών σε ξηρή μορφή πλησίαζε τα films, ενώ απέκτησαν έντονα σκούρο χρώμα, καθώς η αντίδραση Maillard σε αυξημένες θερμοκρασίες επιταχύνεται και παράγονται οι μελανοΐδινες, στις οποίες οφείλεται το χρώμα που παρατηρήθηκε.

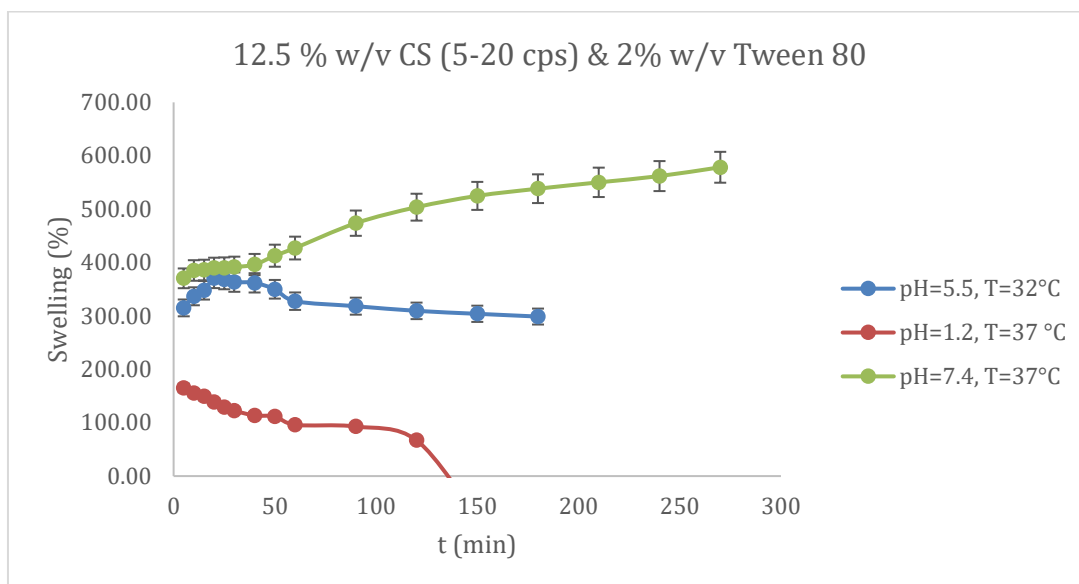
Οι λυοφιλοποιημένες υδρογέλες βυθίζονται σε ρυθμιστικά διαλύματα στον incubator, ο οποίος ρυθμίζεται στην επιθυμητή θερμοκρασία. Κατά την πειραματική διεξαγωγή, μετράται η μάζα των υδρογελών σε ξηρή και σε διογκωμένη κατάσταση, ώστε να προσδιοριστεί το ποσοστό διόγκωσης, σύμφωνα με την εξίσωση (3).

Ακολουθεί διαγραμματική απεικόνιση των πειραματικών αποκρίσεων και ανάλυση της επίδρασης της περιεκτικότητας της CS (5-20 cps) για κάθε περιεκτικότητα μείγματος εκχυλίσματος – DES.

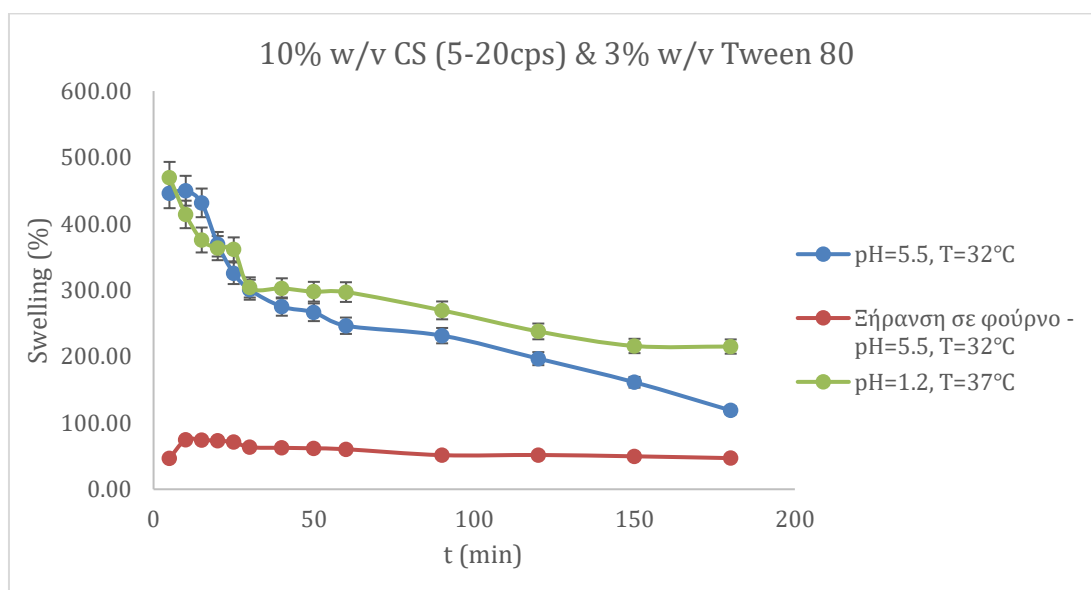
- **10% v/v OLE – NADES**



Διάγραμμα 2: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογελών με 10% v/v OLE – NADES & 12.5, 15 % w/v CS (5-20 cps) & 3, 4% w/v Tween 80



Διάγραμμα 3: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 2% w/v Tween 80



Διάγραμμα 4: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80

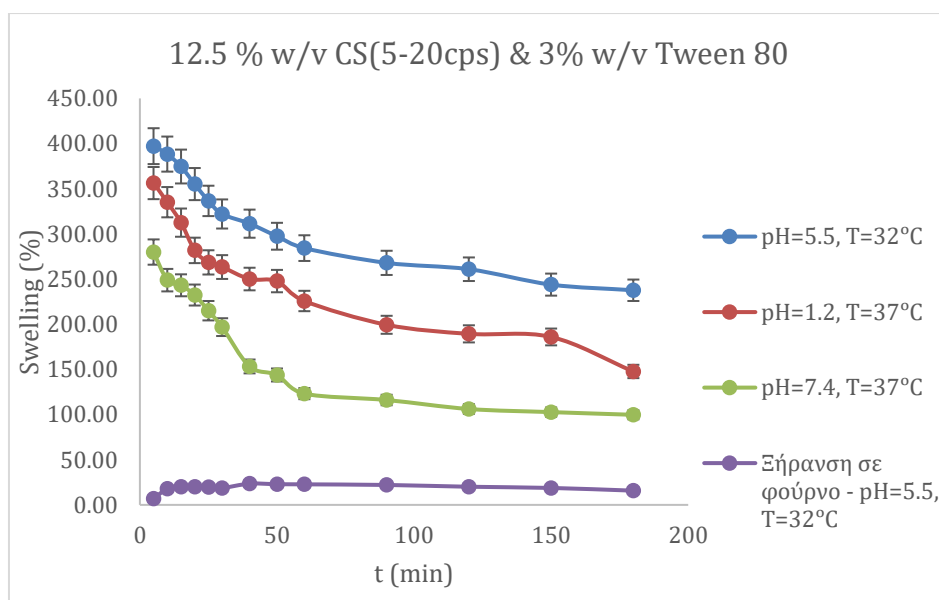
Στην περίπτωση της υδρογέλης με την μέγιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης - 15% w/v (Διάγραμμα 2), η διαδικασία του swelling διήρκησε 5h, καθώς η μάζα της διογκωμένης κατάστασης αυξανόταν συνεχώς, με αποτέλεσμα η ικανότητα διόγκωσης να φτάνει μέχρι ~600% κατά μέσο όρο, χωρίς να αποδομείται. Στο ίδιο διάγραμμα, η υδρογέλη με ενδιάμεση περιεκτικότητα χιτοζάνης διογκώνεται κατά 537% σε σχέση με αρχική ξηρή μορφή σε $t=15\text{min}$, ενώ το πείραμα διαρκεί 3h και η διογκωμένη υδρογέλη δεν θρυμματίζεται. Οι πειραματικές συνθήκες που προσομοιάζουν τις συνθήκες δέρματος και οι συνδυασμοί περιεκτικότητας επιταχύνουν τον ρυθμό της αντίδρασης Maillard σε επιθυμητά όρια, καθώς ενισχύει τις ιδιότητες της υδρογέλης και γίνεται πιο ανθεκτική.

Όταν η υδρογέλη περιέχει ενδιάμεση ποσότητα χιτοζάνης (12.5% w/v CS), σε όξινες συνθήκες pH και αυξημένη θερμοκρασία διαλύεται, ενώ σε $\text{pH}=5.5$ και $T=32^\circ\text{C}$ διογκώνεται κατά τα πρώτα λεπτά του πειράματος και στη συνέχεια αποδιογκώνεται. Σε $\text{pH}=7.4$ και $T=37^\circ\text{C}$, παρατηρείται ανοδικότητα στη μάζα της διογκωμένης κατάστασης με το ποσοστό διόγκωσης να φτάνει μέχρι 580% στις 4.5h, καθώς σε τιμές $\text{pH} > 7$ ο μηχανισμός της αντίδρασης MR γίνεται πολύ πιο περίπλοκος, με αποτέλεσμα να

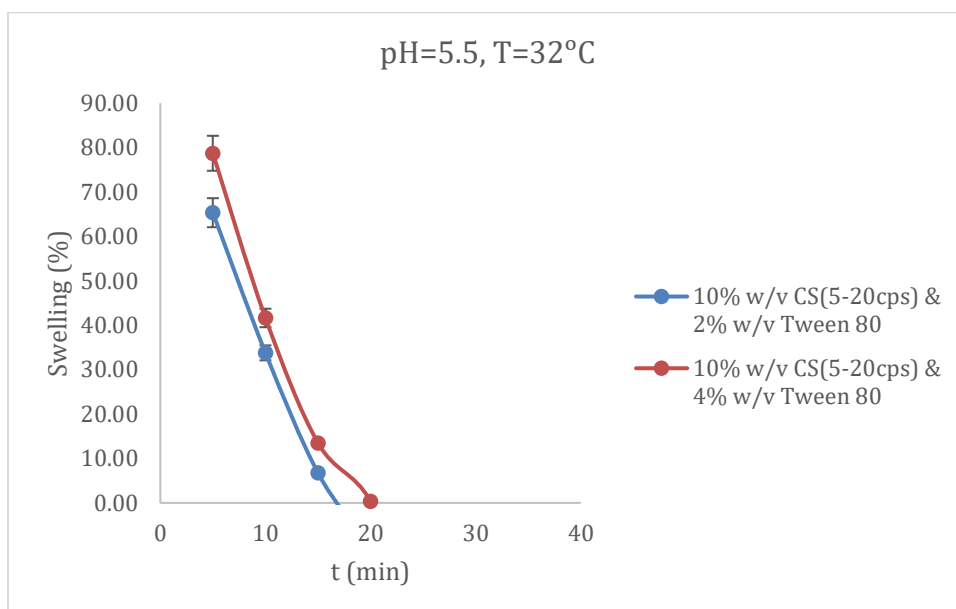
επιβραδύνεται η παραγωγή μελανοϊδινών που μετατρέπουν το υλικό σε εύθρυπτο. Ωστόσο, αυξάνεται η πιθανότητα παραγωγής ανεπιθύμητων προϊόντων. Στις συνθήκες δέρματος, οι υδρογέλες με ενδιάμεση περιεκτικότητα χιτοζάνης και διαφορετική επιφανειοδραστικού παράγοντα έχουν παρόμοια συμπεριφορά διόγκωσης.

Αντίθετα, όταν το πολυμερικό πλέγμα δημιουργείται με την ελάχιστη ποσότητα χιτοζάνης (Διάγραμμα 4), η υδρογέλη, ενώ αρχικά είναι ρευστή και η λυοφιλοποιημένη μορφή φέρει υποβαθμισμένες ιδιότητες, η αντίδραση MR ενισχύει και βελτιώνει τις τελικές ιδιότητες του προϊόντος κατά την πειραματική διεξαγωγή. Η διαδικασία του swelling διήρκησε μέχρι 3h, ενώ το ποσοστό διόγκωσης σε pH=5.5 και T=32°C έφτασε μέχρι 450% κατά μέσο όρο σε t = 10 min, ενώ σε pH=1.2 και T=37°C η υδρογέλη διογκώνεται κατά 470% στα πρώτα 5 min του πειράματος και στη συνέχεια η υδρογέλη αποδιογκώνεται, καθώς η χιτοζάνη διαλύεται σε όξινες συνθήκες. Επιπλέον, στις τελευταίες συνθήκες, που προσομοιάζουν το περιβάλλον στομάχου, το pH επιβραδύνει τον ρυθμό της αντίδρασης MR, ενώ η θερμοκρασία τον αυξάνει. Στην περίπτωση της υδρογέλης με την ίδια σύσταση, η οποία όμως ξηράθηκε σε φούρνο, κατά το swelling διαλύθηκε, καθώς η αντίδραση MR βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο, όπου ενδέχεται να σχηματίστηκαν παραπροϊόντα.

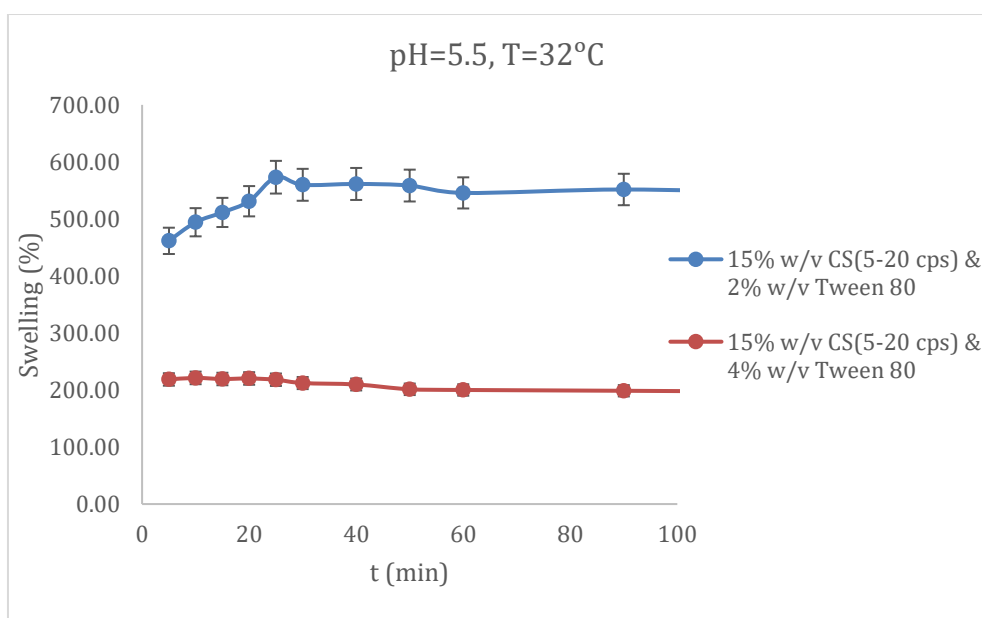
- **15% v/v OLE - NADES**



Διάγραμμα 5: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 15% v/v OLE - NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80 (κεντρικού σημείου)



Διάγραμμα 6: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογελών με 15% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80



Διάγραμμα 7: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογελών με 15% v/v OLE – NADES & 15 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80

Οι υδρογέλες του κεντρικού σημείου, με 15% v/v OLE – NADES, 12.5% w/v CS και 3% w/v Tween 80, επαναλήφθηκαν εις τριπλούν, ενώ κάθε πείραμα διεξήχθη δύο φορές. Σε όλα τα πειράματα, το ποσοστό διόγκωσης σε συνθήκες pH = 5.5 και T = 32°C κυμαίνεται από ~400-430% στα πρώτα λεπτά της πειραματικής διαδικασίας, γεγονός που υποδεικνύει ένα σταθερό πολυμερικό δίκτυο με ισχυρό βαθμό διασύνδεσης, καθώς δεν παρατηρείται συρρίκνωση της υδρογέλης και κατά συνέπεια μείωση του ποσοστού διόγκωσης. Οι μικρές διαφορές στην ικανότητα διόγκωσης των τελικών προϊόντων ίδιας σύστασης οφείλονται στην αντίδραση Maillard, καθώς ενδέχεται να βρίσκεται σε διαφορετικό στάδιο σε κάθε υδρογέλη, εφόσον η περίοδος αναμονής των ξηρών υδρογελών μπορεί να διαφέρει και η αντίδραση να προχωρά από την στιγμή που εξέρχεται από το freeze μέχρι την πειραματική διεξαγωγή του swelling. Στις υπόλοιπες συνθήκες που εξετάστηκε η ικανότητα διόγκωσης των υδρογελών του

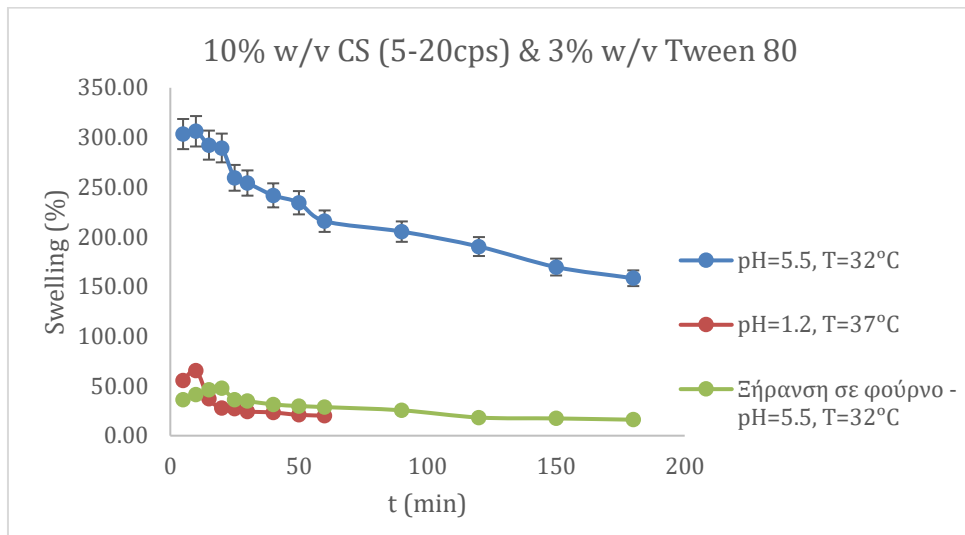
κεντρικού σημείου, παρατηρήθηκε παρόμοια συμπεριφορά, ενώ στην περίπτωση ξήρανσης σε φούρνο η υδρογέλη διογκώνεται ελάχιστα στα πρώτα λεπτά μέχρι πλήρης διάλυσης του υλικού. Οι συνθήκες δέρματος φέρουν υποσχόμενα αποτελέσματα ως προς την ικανότητα διόγκωσης των υδρογελών του κεντρικού σημείου, σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες, καθώς ο ρυθμός της αντίδρασης MR ευνοείται. Στην περίπτωση ελάχιστης ποσότητας χιτοζάνης στο πολυμερικό σύστημα (10% w/v CS), η υδρογέλη χάνει τις ιδιότητες της και το πλέγμα χαρακτηρίζεται πολύ αδύναμο, καθώς δεν απορροφά ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος και δεν διογκώνεται, με αποτέλεσμα να προκύπτουν αρνητικές τιμές ποσοστών διόγκωσης, οι οποίες εξ'ορισμού κρίνονται απαγορευτικές. Κατά την πειραματική διαδικασία, οι υδρογέλες συρρικνώνονται και τελικά διαλύονται.

Αντίθετα, όταν η υδρογέλη αποτελείται από την μέγιστη ποσότητα χιτοζάνης (15% w/v CS), το πολυμερικό δίκτυο κρίνεται ισχυρό, εφόσον και κατά την παρασκευή των υδρογελών σχηματίστηκε στερεό, αλλά και το ποσοστό διόγκωσης έφτασε σε ικανοποιητικές τιμές. Στην περίπτωση περιεκτικότητας 2% w/v Tween 80, η υδρογέλη διογκώνεται έως και 570% σε χρόνο $t = 25 \text{ min}$, σε σχέση με την αρχική ξηρή μορφή, τιμή που υποδεικνύει μεγάλο βαθμό διασύνδεσης του πλέγματος, ο οποίος κατά την αντίδραση Maillard ενισχύεται, ενώ μεγαλύτερη ποσότητα επιφανειοδραστικού παράγοντα αποδυναμώνει τις αλληλεπιδράσεις του πλέγματος. Συνεπώς, η παράμετρος ομοιογένειας της υδρογέλης στις συγκεκριμένες αναλογίες καθορίζει τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος ως προς τον βαθμό διασύνδεσης και την ικανότητα διόγκωσης που έχει τελικά.

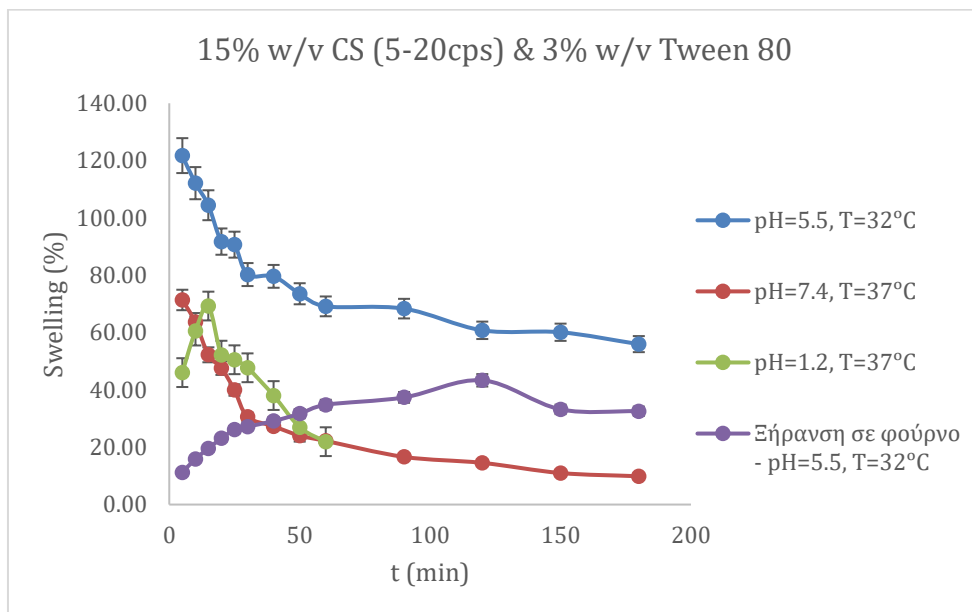


Εικόνα 31: Ικανότητα διόγκωσης Υδρογέλης κεντρικού σημείου και αλλαγή χρώματος – αντίδραση MR

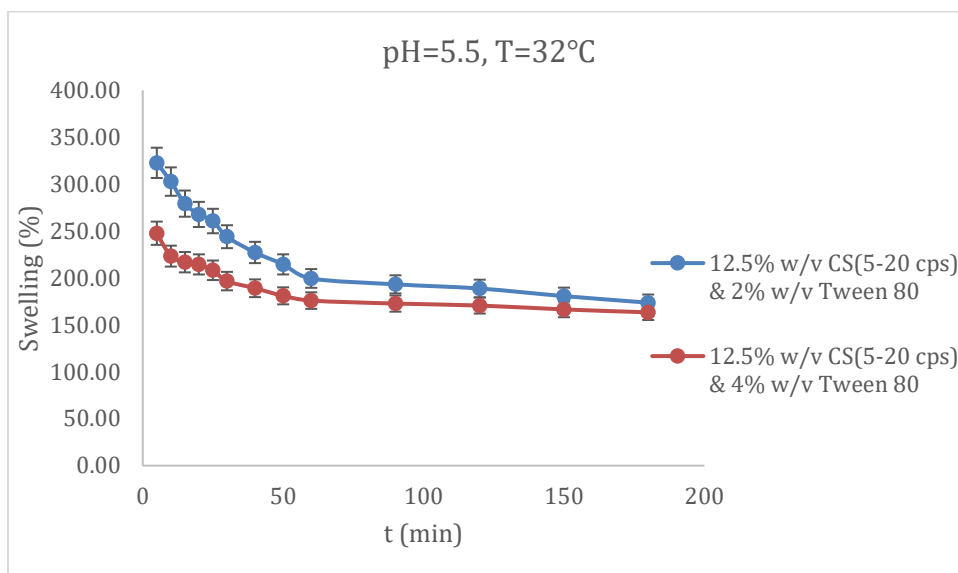
▪ **20% v/v OLE - NADES**



Διάγραμμα 8: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE - NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80



Διάγραμμα 9: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE - NADES & 15 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80



Διάγραμμα 10: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE - NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80

Στην περίπτωση, όπου η υδρογέλη περιέχει την κατώτατη ποσότητα χιτοζάνης (10% w/v) σε συνδυασμό με την μέγιστη ποσότητα εκχυλίσματος, ενώ βελτιώνονται οι ιδιότητες του πολυμερούς κατά την διαδικασία του swelling, καθώς ευνοείται η αντίδραση MR από τις συνθήκες δέρματος, τελικά συρρικνώνεται και δεν απορροφά το υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, αφού ο βαθμός διασύνδεσης κρίνεται χαμηλός. Σε όξινες συνθήκες pH, η υδρογέλη συρρικνώνεται και διαλύεται, ενώ το πλέγμα θεωρείται πολύ αδύναμο και έτσι το πείραμα διακόπτεται. Η ικανότητα διόγκωσης της υδρογέλης που υπέστη ξήρανση σε φούρνο κρίνεται πολύ χαμηλή, καθώς η αντίδραση Maillard βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο, καθώς η θερμοκρασία των 48°C αποδίδει έντονα μαύρο χρώμα, το οποίο οφείλεται στις μελανοΐδινες που παράγονται και καθιστούν τις υδρογέλες πολύ εύθρυπτες.

Σε αντίθετη περίπτωση, η υδρογέλη που σχηματίζεται με την μέγιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης (15% w/v CS) αποτελεί στερεό διαυγές πήκτωμα, το οποίο κατά το swelling γίνεται έντονα μαύρο, καθώς η αντίδραση MR προχωράει προς την παραγωγή μελανοΐδινών. Σημειώνεται ότι όσο πιο μαύρο χρώμα αποκτήσει, τόσο πιο εύθρυπτο γίνεται το τελικό προϊόν. Από το *Διάγραμμα 9* παρατηρείται ότι η υδρογέλη δεν απορροφά ποσότητα υδατικού διαλύματος και δεν διογκώνεται στις εξεταζόμενες συνθήκες, ωστόσο στις συνθήκες προσομοίωσης της επιφάνειας του δέρματος, αποδεικνύεται πιο ισχυρή διασύνδεση, ενώ στις όξινες συνθήκες το τελικό προϊόν διαλύεται. Επιπλέον, οι υδρογέλες που ξηράθηκαν στον φούρνο, έχουν μια ανοδικότητα στη μάζα τους με πολύ χαμηλά ποσοστά διόγκωσης, ενώ αποκτούν ιδιότητες φιλμ.

Όταν η υδρογέλη περιέχει ενδιάμεση ποσότητα χιτοζάνης (12.5% w/v CS) σε συνδυασμό με μέγιστη εκχυλίσματος, με την πάροδο του χρόνου η ικανότητα διόγκωσης του πολυμερούς μειώνεται, ενώ με ελάχιστη ποσότητα επιφανειοδραστικού παράγοντα (2% w/v Tween 80) το ποσοστό φτάνει έως ~320% στα πρώτα 5 min της πειραματικής διαδικασίας.

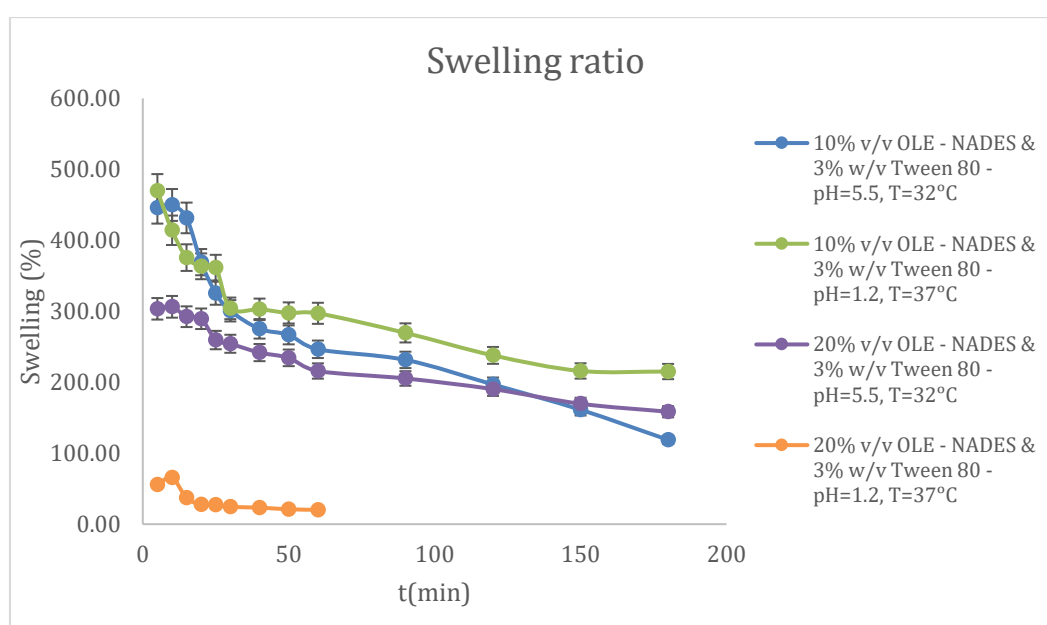
Στη συνέχεια, γίνεται συγκριτική μελέτη υδρογελών με διαφορετική περιεκτικότητα εκχυλίσματος και ίδια περιεκτικότητα χιτοζάνης.

- **10% w/v CS (5-20 cps)**

Για την μελέτη επίδρασης της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος σε υδρογέλες με την ελάχιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης, συγκρίνονται τα αποτελέσματα των συστημάτων που περιέχουν τη σύσταση του Πίνακα 10, ενώ παρατίθενται τα αποτελέσματα τους σε κοινό διάγραμμα.

Πίνακας 10: Περιεκτικότητες εκχυλίσματος και Tween 80 υδρογελών που περιέχουν 10% w/v CS(5-20 cps)

[OLE - NADES]	[Tween 80]
% v/v	% w/v
10	3
20	3



Διάγραμμα 11: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογελών με 10% w/v CS (5-20 cps) και 10 & 20% v/v OLE -NADES σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες

Αρχικά, οι υδρογέλες που περιέχουν την ελάχιστη ποσότητα χιτοζάνης (10% w/v CS(5-20 cps)) αποτελούν ρευστά υλικά σε κάθε περιεκτικότητα εκχυλίσματος, ενώ τα τελικά προϊόντα κατά το swelling δεν διογκώνονται. Από το γράφημα παρατηρείται ότι σε όλες τις διαφορετικές συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η διαδικασία του swelling, η μάζα της διογκωμένης κατάστασης και επομένως το ποσοστό διόγκωσης μειώνεται συνεχώς, καθώς οι υδρογέλες συρρικνώνονταν κατά το πείραμα.

Στην περίπτωση της ελάχιστης περιεκτικότητας εκχυλίσματος (10% v/v OLE - NADES), οι υδρογέλες σε συνθήκες δέρματος και στομάχου διογκώνονται στα πρώτα 5 min του πειράματος και στη συνέχεια αποδιογκώνονται και δεν απορροφούν ρυθμιστικό διάλυμα. Αντίθετα, σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα εκχυλίσματος (20% v/v OLE - NADES), το πολυμερικό δίκτυο κρίνεται ασθενέστερο, καθώς τα ποσοστά διόγκωσης είναι μικρότερα και στις δύο εξεταζόμενες συνθήκες. Οι συνθήκες διεξαγωγής έχουν καθοριστική σημασία για την ικανότητα διόγκωσης των τελικών προϊόντων, καθώς η αντίδραση MR αποκτά διαφορετικό ρυθμό σε κάθε περίπτωση. Στις συνθήκες στομάχου, ο βαθμός διασύνδεσης του πλέγματος κρίνεται πολύ ασθενής, καθώς αδυνατεί η υδρογέλη να διογκωθεί, ενώ η αντίδραση MR σε όξινο pH και σε συνδυασμό με αυξημένη ποσότητα εκχυλίσματος ενδέχεται να παράγει παραπροϊόντα, τα οποία υποβαθμίζουν τις τελικές ιδιότητες του υλικού.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα των υδρογελών που έχουν ξηραθεί σε φούρνο δεν παρατίθενται στο διάγραμμα, καθώς και με τους δύο συνδυασμούς περιεκτικότητας αποδομούνται και δεν φέρουν τις επιθυμητές ιδιότητες.



Εικόνα 32: Συρρίκνωση Υδρογέλης με ελάχιστη ποσότητα χιτοζάνης κατά τη διαδικασία του Swelling



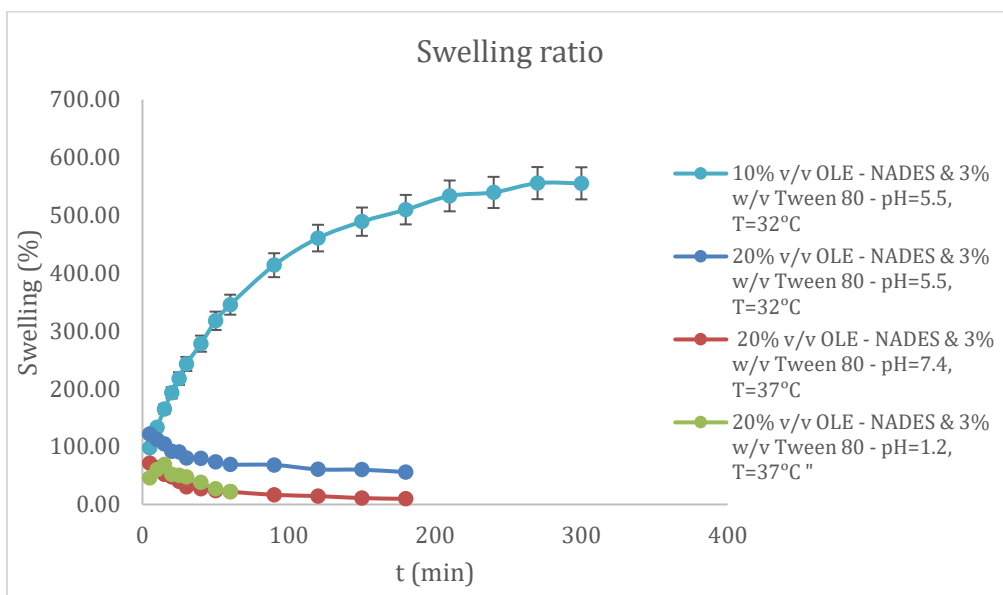
Εικόνα 33: Αποσχηματισμός Υδρογέλης που έχει ξηραθεί σε φούρνο

- **15% w/v CS (5-20 cps)**

Για την μελέτη επίδρασης της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος υδρογελών με μέγιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης, συγκρίνονται οι αποκρίσεις των προϊόντων που περιέχουν τη σύσταση του Πίνακα 11 ως προς την ικανότητα τους να διογκώνονται και τα αποτελέσματά τους παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 12.

Πίνακας 11: Περιεκτικότητες εκχυλίσματος και Tween 80 υδρογελών που περιέχουν 15% w/v CS(5-20 cps)

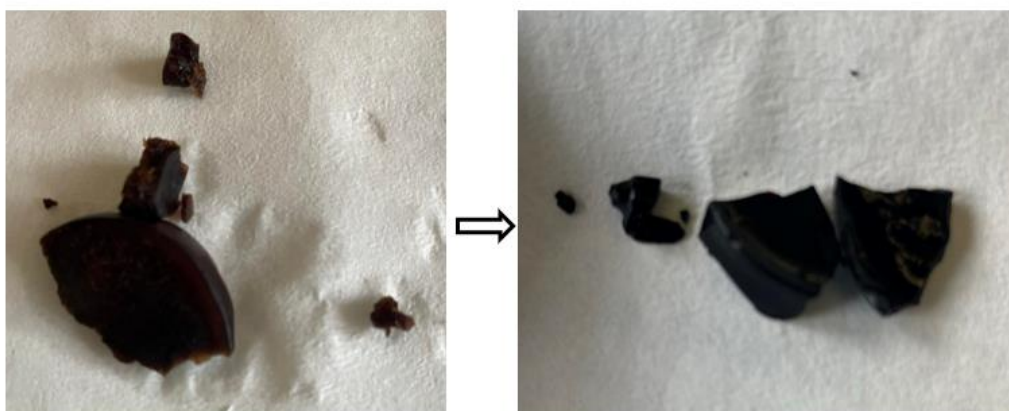
[OLE - NADES]	[Tween 80]
% v/v	% w/v
10	3
20	3



Διάγραμμα 12: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογελών με 15% w/v CS (5-20 cps) και 10 & 20% v/v OLE -NADES σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες

Αρχικά, και στις δύο περιπτώσεις σχηματίζονται στερεά διαυγή πηκτώματα, τα οποία εκ πρώτης όψευς φέρουν τις επιθυμητές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τις υδρογέλες. Στην περίπτωση υδρογέλης με ελάχιστη περιεκτικότητα εκχυλίσματος (10% v/v OLE - NADES), παρατηρείται αυξημένη ικανότητα διόγκωσης, καθώς η μάζα του προϊόντος κατά τη διογκωμένη κατάσταση αυξάνεται συνεχώς. Η αντίδραση MR στις συνθήκες που προσομοιάζουν το δέρμα σε συνδυασμό με τις ποσότητες των αντιδρώντων ευνοείται και το προϊόν ενισχύεται ως προς τις τελικές του ιδιότητες. Επιπλέον, ο βαθμός διασύνδεσης και το πλέγμα κρίνονται ισχυρά, καθώς η υδρογέλη είναι πολύ ανθεκτική στις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες. Το ποσοστό διόγκωσης φτάνει κατά μέσο όρο μέχρι ~560%, ενώ το πείραμα είχε διάρκεια 5h.

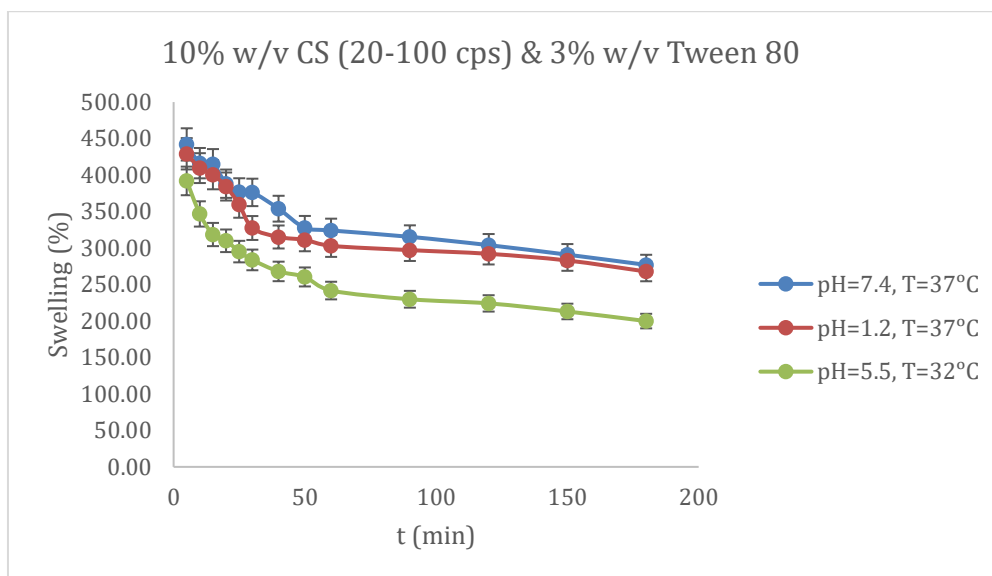
Αντίθετα, όταν η υδρογέλη αποτελείται από τη μέγιστη ποσότητα εκχυλίσματος (20% v/v OLE - NADES), η υδρογέλη δεν διογκώνεται, αλλά αποδομείται σε όλες τις συνθήκες, καθώς παράγονται μελανοϊδίνες, οι οποίες καθιστούν την υδρογέλη πιο εύθρυπτη. Το πολυμερικό πλέγμα κρίνεται πολύ αδύναμο ως προς τις αλληλεπιδράσεις που συγκροτούν το δίκτυο, ενώ η αντίδραση MR υποβαθμίζει τις ιδιότητες του υλικού όταν βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Το μέγιστο ποσοστό διόγκωσης, ~110%, κατορθώνεται στα πρώτα 5 min του πειράματος.



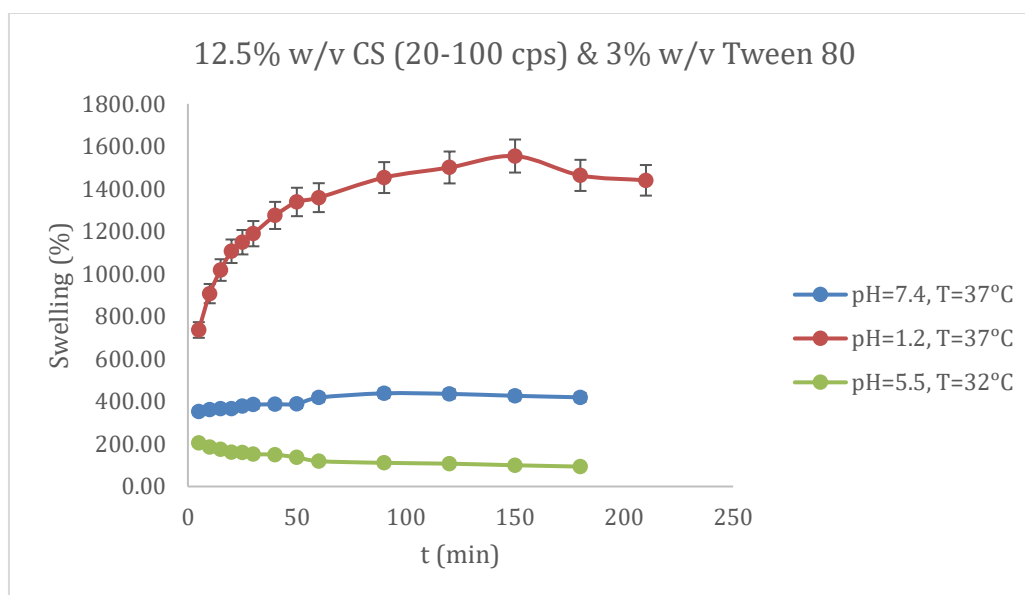
Εικόνα 34: Υδρογέλη με μέγιστη ποσότητα εκχυλίσματος και χιτοζάνης κατά το swelling - Παραγωγή μελανοϊδινών από την αντίδραση MR (έντονα μαύρο χρώμα)

Κατά την πειραματική διεξαγωγή, σχηματίστηκαν υδρογέλες χιτοζάνης με ενσωματωμένες βιοδραστικές ουσίες φύλλων ελιάς και χιτοζάνη διαφορετικών ιδιοτήτων, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της στις ιδιότητες του τελικού προϊόντος και στην αντίδραση Maillard. Η χιτοζάνη που επιλέχθηκε έχει εύρος ιξώδους 20-100 cps. Αντίστοιχα, συγκρίνονται οι πειραματικές αποκρίσεις των υδρογελών και η επίδραση της περιεκτικότητας της χιτοζάνης στο πολυμερικό πλέγμα όταν η περιεκτικότητα εκχυλίσματος διατηρείται σταθερή.

- **10% v/v OLE - NADES**



Διάγραμμα 13: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 10 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80



Διάγραμμα 14: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 12.5 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80

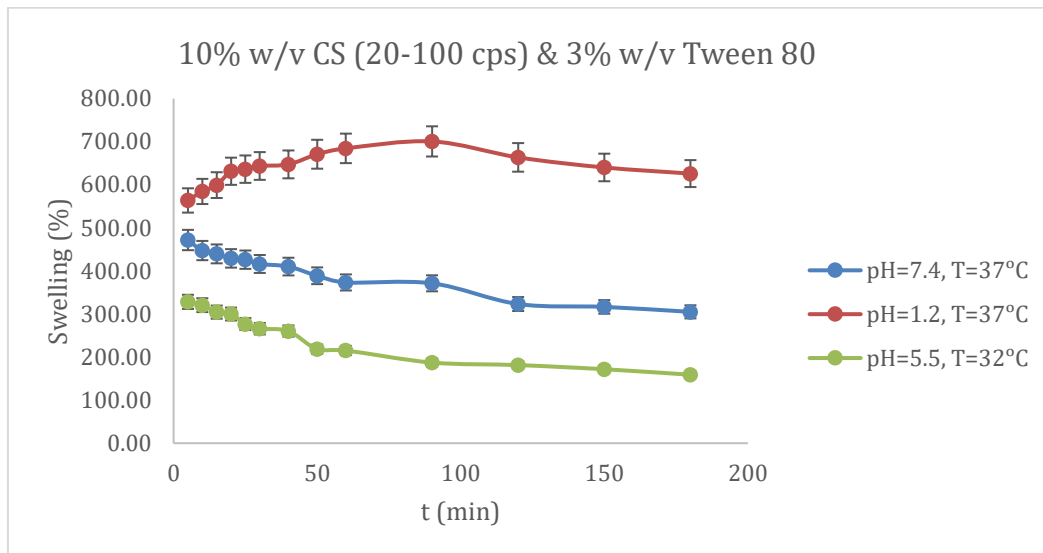
Αρχικά, η ελάχιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης σχηματίζει στερεά διαυγή πηκτώματα, σε αντίθεση με την χιτοζάνη εύρους ιξώδους 5-20 cps, η οποία σε συνδυασμό με όποια περιεκτικότητα εκχυλίσματος σχημάτιζε ρευστά προϊόντα. Και στις δύο περιπτώσεις, κατορθώνονται υψηλά ποσοστά διόγκωσης σε όλες τις πειραματικές συνθήκες, καθώς ο χημικός βαθμός διασύνδεσης του πλέγματος γίνεται πιο ισχυρός με την CS (20-100cps), ενώ η αντίδραση MR βελτιώνει τις ιδιότητες των υδρογελών, με αποτέλεσμα να απορροφούν μεγαλύτερες ποσότητες ρυθμιστικών διαλυμάτων. Σε όξινες συνθήκες pH και αυξημένης T, η υδρογέλη με μέγιστη ποσότητα χιτοζάνης στο σύστημα, 12.5% w/v CS(20-100 cps) και σε συνδυασμό με 10% v/v εκχύλισμα αποδεικνύεται πολύ υποσχόμενη με τα ποσοστά διόγκωσης να φτάνουν μέχρι 1555%. Η μεγάλη ικανότητα διόγκωσης υποδεικνύει πολύ σταθερό και ισχυρό πλέγμα, ενώ η υδρογέλη κατά τη διαδικασία του swelling απορρόφησε όλη την ποσότητα νερού χωρίς να αποσχηματιστεί. Επιπλέον, παρατηρείται ότι οι φυσιολογικές συνθήκες αποδίδουν ικανοποιητικά ποσοστά, ενώ σε συνθήκες δέρματος τα ποσοστά διόγκωσης κρίνονται χαμηλά σε όλες τις διαφορετικές περιεκτικότητες, ενώ για τις υδρογέλες με χιτοζάνη εύρους ιξώδους 5-20 cps είναι τα πιο υψηλά.



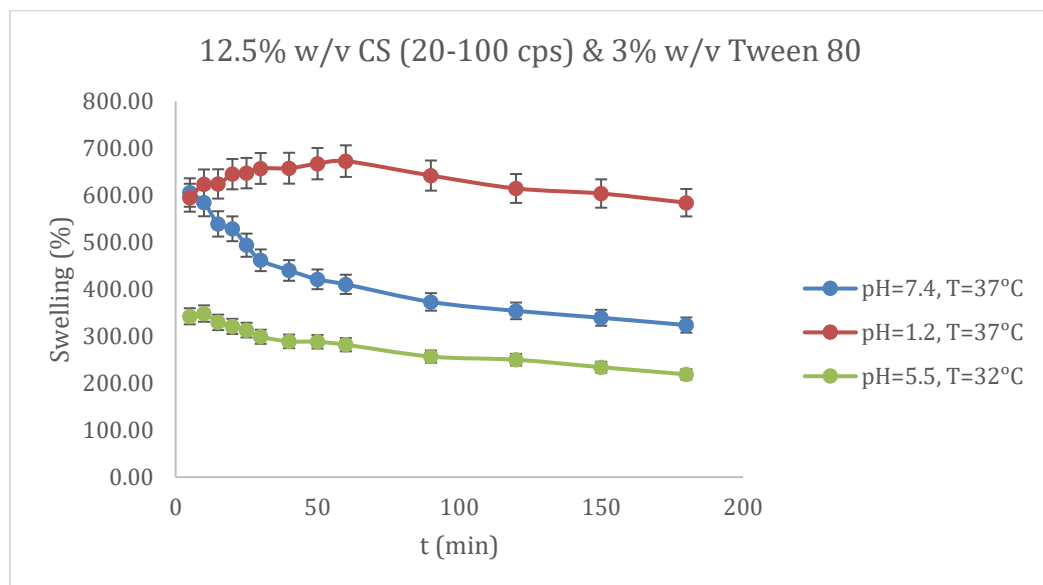
Εικόνα 35: Διογκωμένη Υδρογέλη με 10% v/v OLE - Extract & 10% w/v CS (20-100cps) & 3% w/v Tween 80

Οι παραπάνω συνδυασμοί των πειραματικών παραμέτρων με χιτοζάνη 20-100 cps εκτελέστηκαν εις διπλούν με τον διαλύτη να αποτελεί το τρίτο συστατικό του πολυμερικού συστήματος. Ο διαλύτης επιλέχθηκε στοχευμένα, καθώς η γλυκόζη αντιδρά με την χιτοζάνη μέσω της αντίδρασης Maillard και επιδρά στις ιδιότητες του υλικού. Οι σχηματιζόμενες υδρογέλες εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να απορροφούν υδατικά διαλύματα και να διογκώνονται σε όλες τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

- **10% v/v NADES**



Διάγραμμα 15: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v NADES & 10 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80



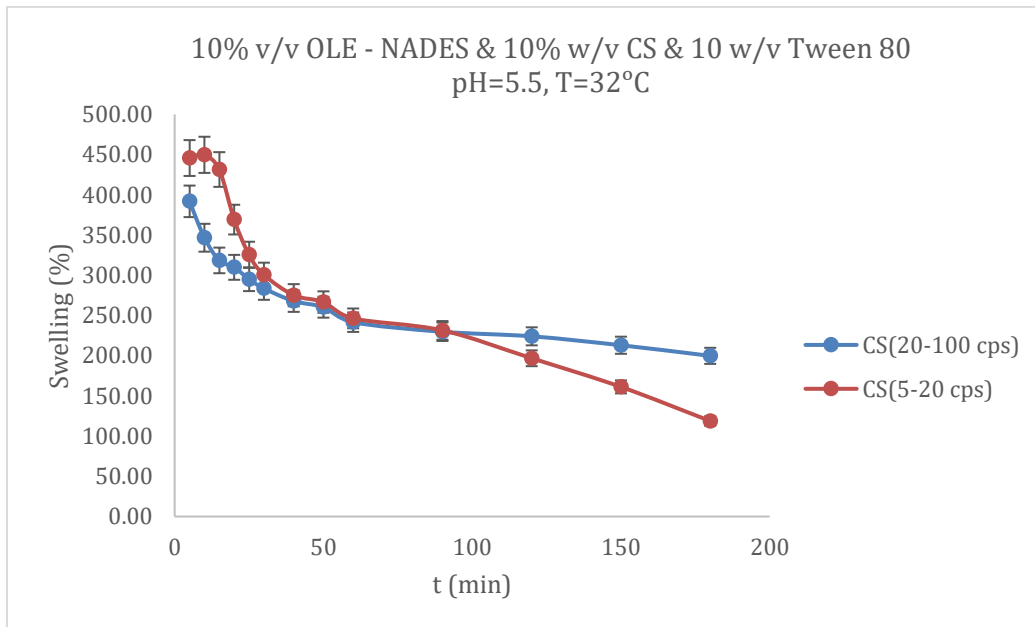
Διάγραμμα 16: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v NADES & 12.5 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80

Οι σχηματιζόμενες υδρογέλες με τρίτο συστατικό τον διαλύτη έχουν παρόμοια συμπεριφορά ως προς τη διόγκωση, ενώ το πολυμερικό δίκτυο κρίνεται ισχυρό και ανθεκτικό σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες. Ωστόσο, διακρίνονται οι συνθήκες στομάχου για τα υψηλά ποσοστά διόγκωσης, καθώς οι χαμηλές τιμές pH δεν επιταχύνουν την αντίδραση MR προς την παραγωγή μελανοιδινών που καθιστούν το πλέγμα πιο εύθρυπτο. Σε υψηλότερα pH και υψηλότερες θερμοκρασίες, ο ρυθμός της αντίδρασης αυξάνεται, με αποτέλεσμα να υποβαθμίζονται οι ιδιότητες του πολυμερούς, ο χημικός βαθμός διασύνδεσης να είναι ασθενέστερος και να μην διογκώνονται τα τελικά προϊόντα, αλλά να αποδομούνται.

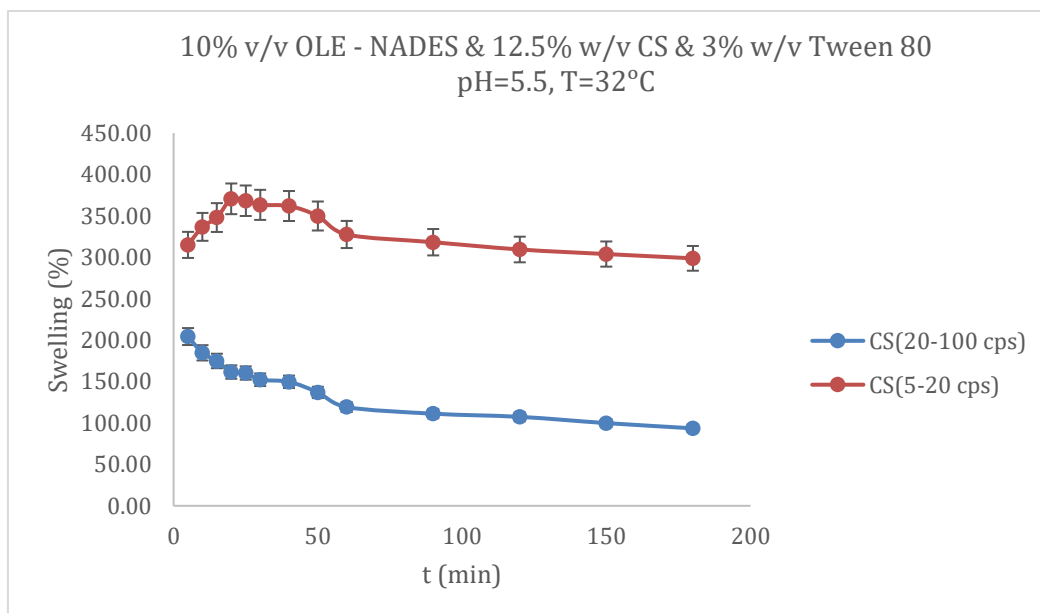


Εικόνα 36: Αλλαγή στο χρώμα υδρογέλης από την αντίδραση MR

Τέλος, συγκρίνονται τα αποτελέσματα υδρογελών που περιέχουν χιτοζάνη διαφορετικών ιδιοτήτων με περιεκτικότητα εκχυλίσματος 10% v/v στις πειραματικές συνθήκες που προσομοιάζουν το δέρμα.



Διάγραμμα 17: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 10% w/v CS (5-20 / 20-100 cps) & 3% w/v Tween 80



Διάγραμμα 18: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 12.5% w/v CS (5-20 / 20-100 cps) & 3% w/v Tween 80

Από τα παραπάνω γραφήματα, διαπιστώνεται ότι όταν περιέχεται ελάχιστη ποσότητα χιτοζάνης στο πολυμερικό δίκτυο, η συμπεριφορά των υδρογελών ως προς τη διόγκωση τους στις συνθήκες δέρματος είναι παρόμοια και για τα δύο διαφορετικά βιοπολυμερή, ενώ κατά τον σχηματισμό τους η υδρογέλη με χιτοζάνη χαμηλότερου ιξώδους σχηματίζει ρευστά, αντί για στερεό πήκτωμα.

Σχετικά με την ικανότητα διόγκωσης, στην περίπτωση υδρογέλης με ελάχιστη ποσότητα χιτοζάνης μειωμένου ιξώδους (10% w/v CS(5-20cps)) παρατηρείται αυξημένη διόγκωση αρχικά, καθώς ενισχύεται ο βαθμός διασύνδεσης από την αντίδραση MR, ενώ κατά την πειραματική διαδικασία οι αλληλεπιδράσεις εξασθενούν και τα τελικά προϊόντα συρρικνώνονται. Αντίθετα, όταν περιέχεται ελάχιστη ποσότητα χιτοζάνης αυξημένου ιξώδους (10% w/v CS(20-100cps)), η υδρογέλη φέρει εξαρχής τις επιθυμητές ιδιότητες, ενώ θεωρείται πιο σταθερή και δεν αποδομείται έως το τέλος του πειράματος. Από την άλλη πλευρά, η μέγιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης μειωμένου ιξώδους (12.5% w/v CS(5-20cps)) ευνοεί την διόγκωση κατά τα πρώτα πειραματικά λεπτά σε συνδυασμό με ελάχιστη εκχυλίσματος, ενώ η υδρογέλη με μέγιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης αυξημένου ιξώδους (12.5% w/v CS(20-100cps)) κρίνεται ασθενέστερη, εφόσον κατά την απορρόφηση υδατικού διαλύματος, δεν διογκώνεται στις συνθήκες δέρματος.



Διογκωμένη υδρογέλη με CS 5-20 cps



Διογκωμένη υδρογέλη με CS 20-100 cps

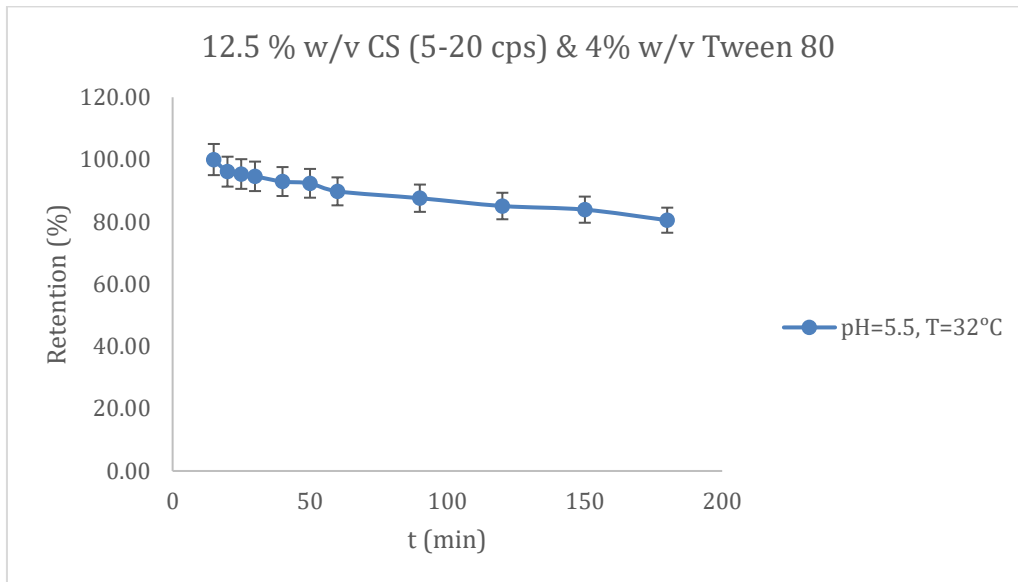
Εικόνα 37: Διογκωμένη κατάσταση υδρογελών με διαφορετική χιτοζάνη

Η σύγκριση εκχυλίσματος – NADES και NADES αποκλειστικά ως το τρίτο συστατικό του πολυμερικού συστήματος χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, καθώς οι πειραματικές αποκρίσεις δεν είναι ξεκάθαρες ως προς την συμπεριφορά διόγκωσης τους λόγω ασταθών παραμέτρων και πολυπλοκότητας του μηχανισμού της αντίδρασης MR.

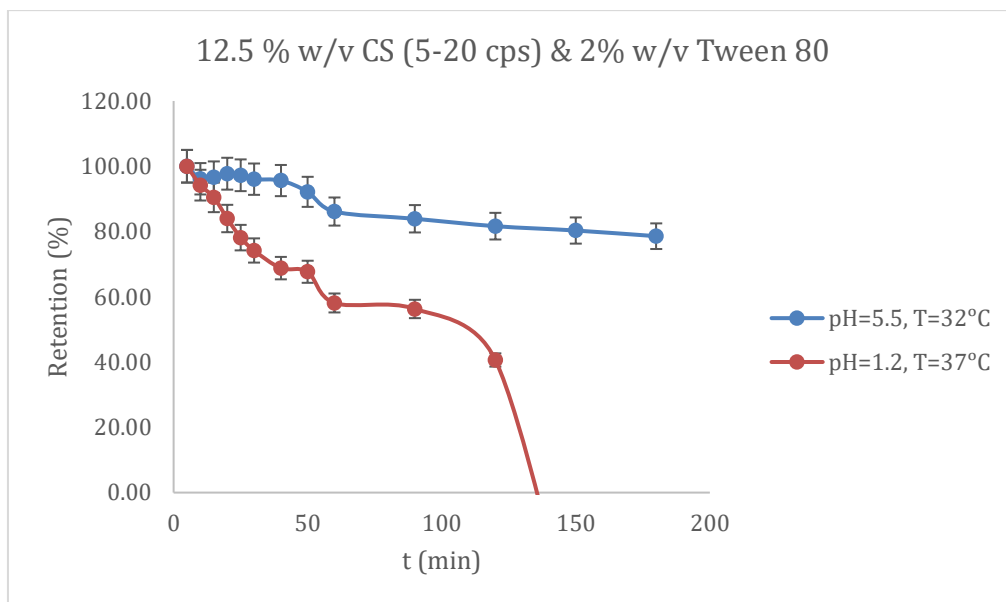
3.3.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού – Water Retention

Κατά τη διαδικασία του swelling αξιολογείται η ικανότητα της υδρογέλης να συγκρατεί τη μέγιστη ποσότητα υδατικού διαλύματος που μπορεί να απορροφήσει, ενώ προσδιορίζεται η συγκεκριμένη χρονική στιγμή – σημείο ισορροπίας. Αντίστοιχα, παρατίθενται τα διαγράμματα που απεικονίζουν την ικανότητα συγκράτησης νερού σε σχέση με τον χρόνο για τους προτεινόμενους συνδυασμούς πειραμάτων.

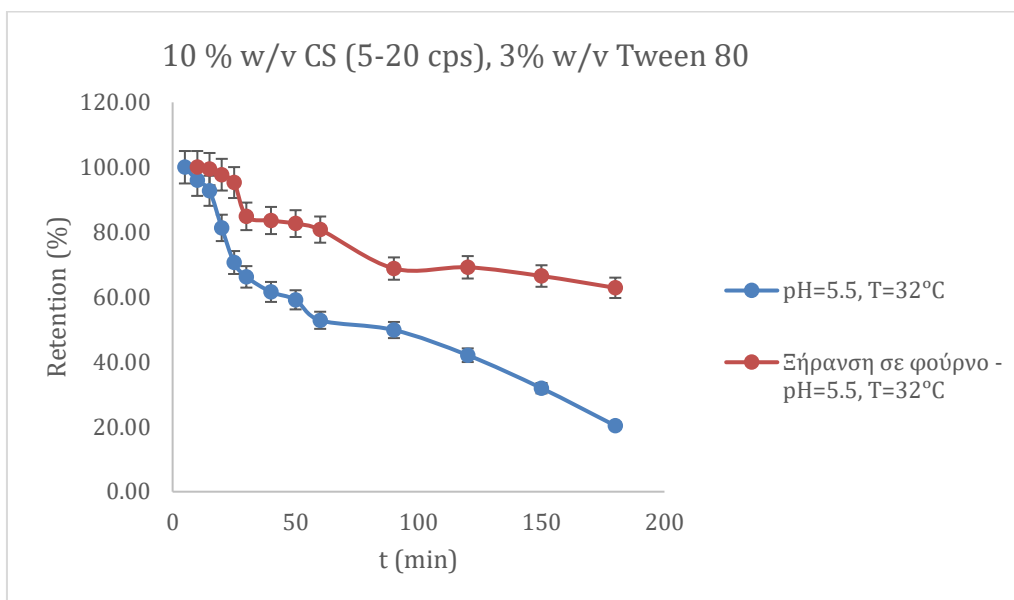
- **10% v/v OLE - NADES**



Διάγραμμα 19: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 4% w/v Tween 80



Διάγραμμα 20: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 2% w/v Tween 80

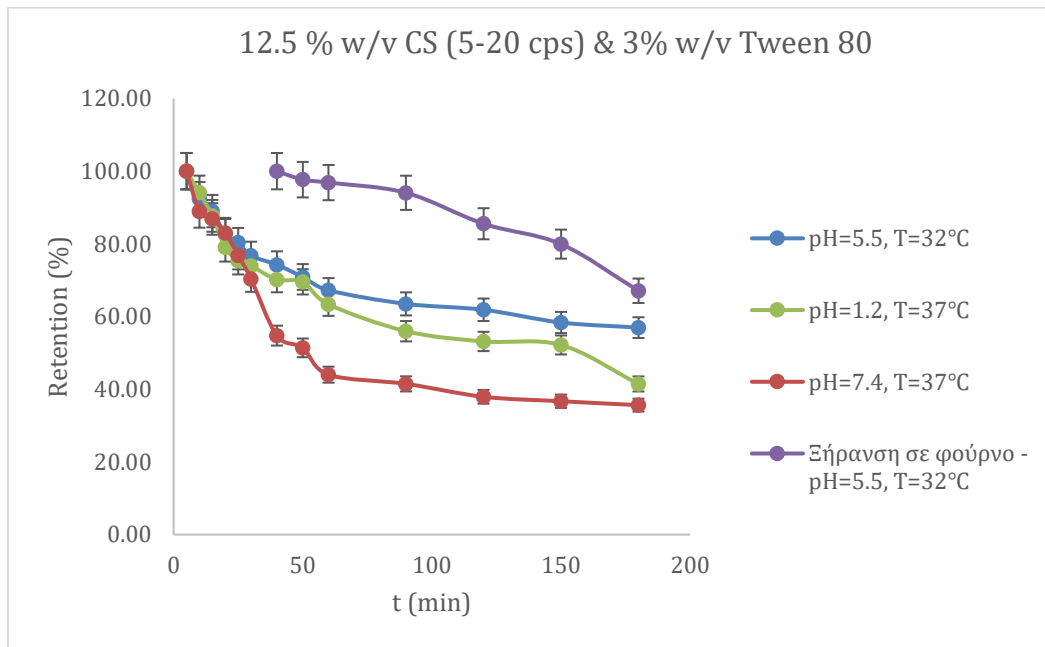


Διάγραμμα 21: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80

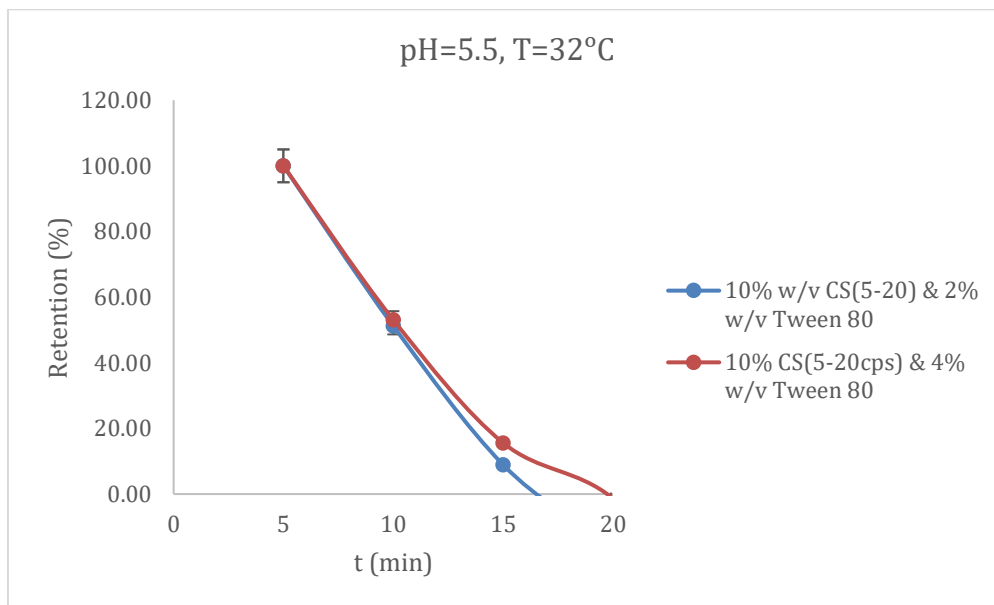
Στην περίπτωση όπου η υδρογέλη αποτελείται από τη μέγιστη ποσότητα χιτοζάνης με ελάχιστη περιεκτικότητα εκχυλίσματος (15% w/v CS(5-20cps) & 10% v/v OLE-NADES), κατά το swelling, παρατηρήθηκε αυξανόμενη διόγκωση, ενώ η πειραματική διαδικασία διήρκησε μέχρι 5h, καθώς στις 4.5h διαπιστώθηκε ελάχιστη μείωση στη μάζα του πολυμερούς και στις δύο φορές που πραγματοποιήθηκε το πείραμα. Επομένως, δεν αξιολογείται ως προς την ικανότητα συγκράτησης της μέγιστης ποσότητας υδατικού διαλύματος που μπορεί να προσλάβει στο πλέγμα, καθώς δεν αποδιογκώνεται. Το πλέγμα ενισχύεται όσο διεξάγεται το πείραμα και λαμβάνει χώρα η αντίδραση MR, η οποία καθιστά την υδρογέλη πολύ ανθεκτική σε αυτή την περίπτωση.

Όταν στο σύστημα περιέχεται ενδιάμεση ποσότητα χιτοζάνης (12.5% w/v CS), η υδρογέλη σε συνθήκες δέρματος με 2 & 4% w/v Tween 80 ακολουθεί μια σταδιακή και σταθερή πτώση ως προς την ικανότητα συγκράτησης της μέγιστης ποσότητας νερού, καθώς στις 3h συγκρατεί μέχρι και το 80%, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο επιφανειοδραστικός παράγοντας δεν αποτελεί καθοριστική παράμετρο των ιδιοτήτων. Ωστόσο, σε όξινες συνθήκες προσομοίωσης, η υδρογέλη με ενδιάμεση περιεκτικότητα χιτοζάνης αποδεικνύεται ότι αδυνατεί να διατηρήσει σταθερή τη μάζα της με την πάροδο του χρόνου, λόγω διάλυσης της χιτοζάνης, ενώ η απότομη πτώση φανερώνει αδύναμο βαθμό διασταύρωσης στο πολυμερικό πλέγμα. Σε ελάχιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης (10% w/v CS), τα ποσοστά συγκράτησης της μέγιστης ποσότητας νερού θεωρούνται χαμηλά στις 3h, με αποτέλεσμα το πλέγμα να κρίνεται αδύναμο, ενώ στην περίπτωση, όπου η υδρογέλη ξηράθηκε σε φούρνο, κατορθώνονται υψηλότερες, μη ικανοποιητικές τιμές, καθώς η σχηματιζόμενη υδρογέλη δεν πληροί τις απαραίτητες προϋποθέσεις.

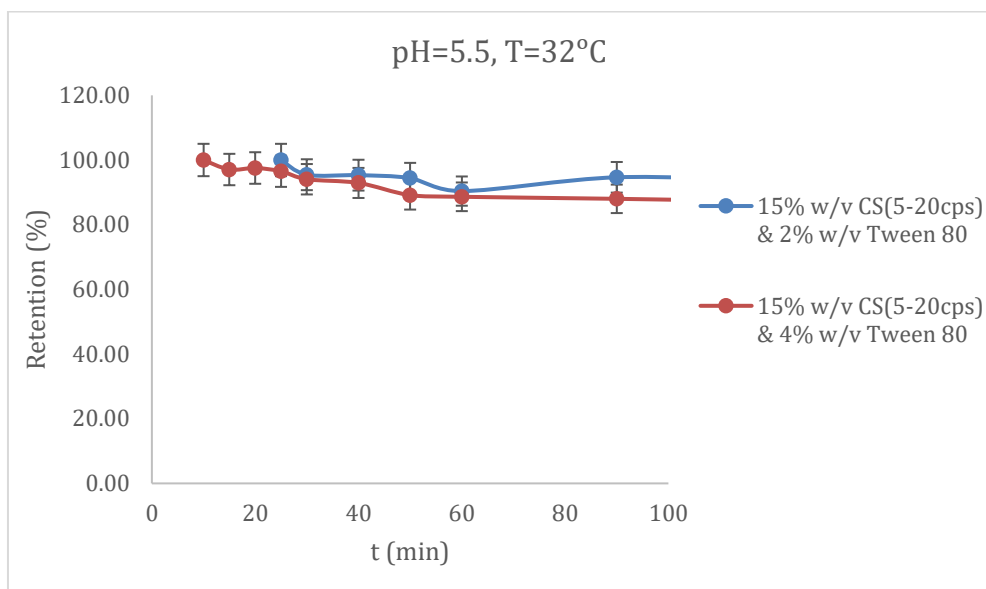
▪ **15% v/v OLE - NADES**



Διάγραμμα 22: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης κεντρικού σημείου με 15% v/v OLE - NADES & 12.5% w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80



Διάγραμμα 23: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 15% v/v OLE - NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80



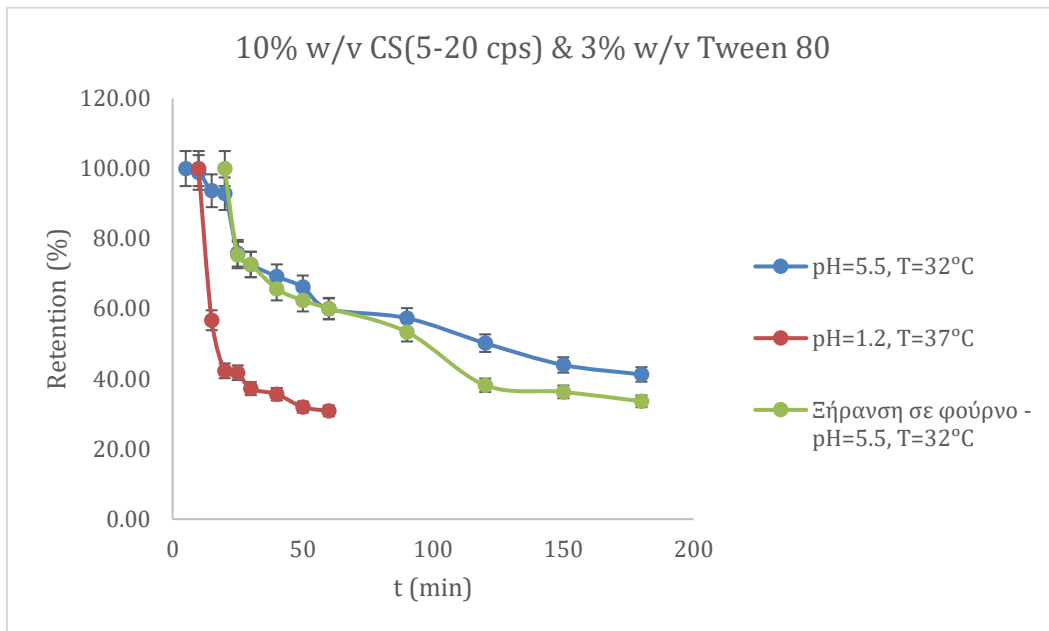
Διάγραμμα 24: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 15% v/v OLE - NADES & 15 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80

Σε όλες τις περιπτώσεις αναπαράστασης της συμπεριφοράς των υδρογελών του κεντρικού σημείου (15% v/v OLE-NADES & 12.5% w/v CS & 3% w/v Tween 80), στις συνθήκες δέρματος έχουν την ικανότητα να συγκρατούν τη μέγιστη ποσότητα νερού κατά ~60%, τη χρονική στιγμή των 3h, ποσοστό υψηλότερο σε σχέση με τις υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες, όπου το πλέγμα αδυνατεί να συγκρατήσει όσο νερό έχει προσλάβει στο σημείο ισορροπίας και η υδρογέλη αποδιογκώνεται. Η υδρογέλη που υπέστη ξήρανση σε φούρνο, κατορθώνει μεγαλύτερα ποσοστά, αλλά αποδομείται και δεν πληροί τις ιδιότητες των υδρογελών κατά τη διαδικασία του swelling.

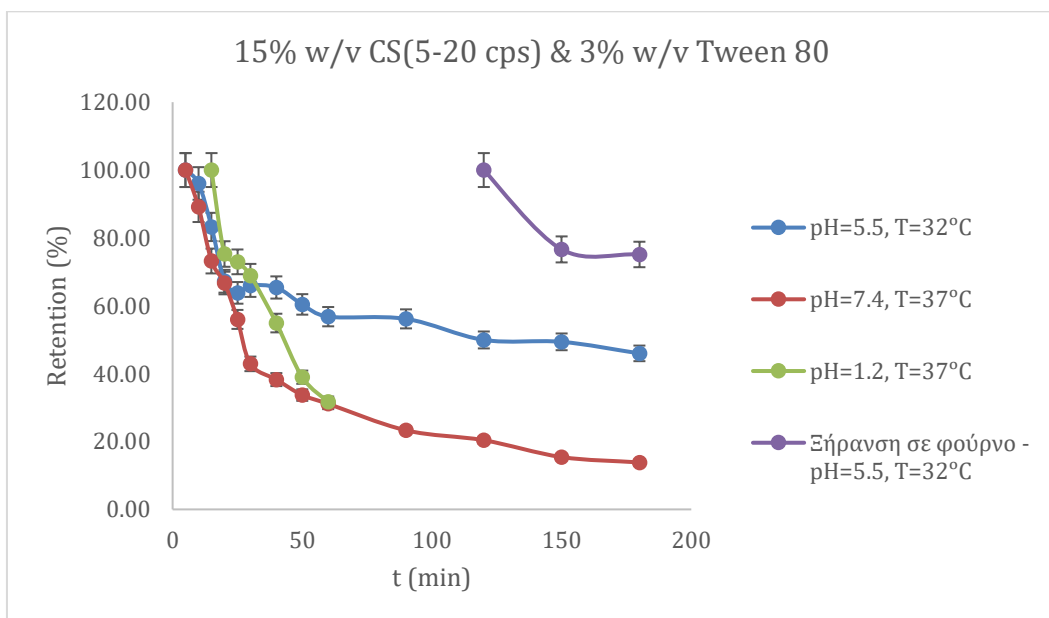
Όταν στο σύστημα περιέχεται η ελάχιστη ποσότητα χιτοζάνης (10% w/v CS), η υδρογέλη συρρικνώνεται κατά τη πειραματική διαδικασία, ενώ το πολυμερικό δίκτυο αποδεικνύεται πολύ ασθενές από τα πρώτα πειραματικά λεπτά. Τα αρνητικά ποσοστά που προκύπτουν κρίνονται απαγορευτικά, επομένως η πειραματική διαδικασία διακόπτεται.

Αντίθετα, στην περίπτωση μέγιστης ποσότητας χιτοζάνης (15% w/v CS), διαπιστώνεται ότι το πλέγμα και οι αλληλεπιδράσεις που το συγκροτούν είναι ισχυρά, καθώς η αντίδραση MR ενισχύει τις ιδιότητες των υδρογελών στις συνθήκες δέρματος στις συγκεκριμένες ποσότητες των αντιδρώντων, με αποτέλεσμα να έχουν την ικανότητα να συγκρατούν τη μέγιστη ποσότητα νερού κατά ~85% τη χρονική στιγμή των 3h. Η περιεκτικότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν επιδρά σημαντικά στην ικανότητα συγκράτησης του νερού που προσλαμβάνει το δίκτυο.

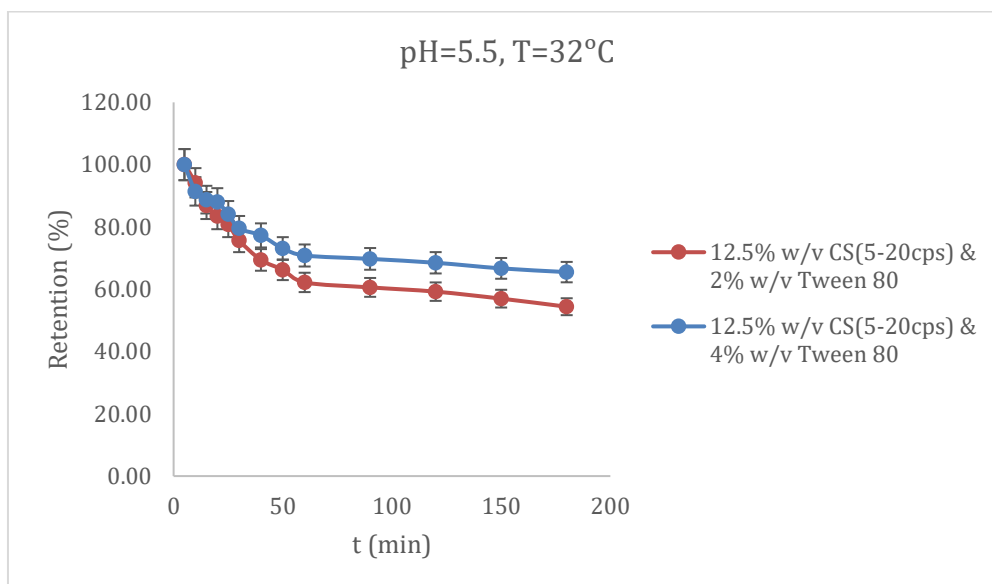
▪ **20% v/v OLE – NADES**



Διάγραμμα 25: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 10 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80



Διάγραμμα 26: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 15 % w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80



Διάγραμμα 27: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 4% w/v Tween 80

Όταν στο σύστημα περιέχεται 20% v/v OLE – NADES, η ενδιάμεση περιεκτικότητα χιτοζάνης (12.5% w/v CS) αποδεικνύεται πιο αποτελεσματική ως προς τις ιδιότητες της υδρογέλης, καθώς διαθέτει την μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης νερού έως τις 3h, συγκριτικά με τους υπόλοιπους συνδυασμούς περιεκτικότητας. Το ποσοστό συγκράτησης φτάνει μέχρι ~65%, τιμή που υποδηλώνει πιο ισχυρό πλέγμα.

Αντίθετα, το πλέγμα υδρογελών με ελάχιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης (10% w/v CS) κρίνεται πολύ ασθενές από την αρχή της πειραματικής διαδικασίας, εφόσον οι υδρογέλες που σχηματίζονται είναι ρευστά υλικά, με αποτέλεσμα να μην έχουν την ικανότητα να συγκρατήσουν ποσότητα νερού στο πολυμερικό δίκτυο. Η αδυναμία του πλέγματος διαπιστώνεται σε όλες τις πειραματικές συνθήκες προσομοίωσης, ενώ στις όξινες η υδρογέλη διαλύεται και το πείραμα διακόπτεται.

Τέλος, υδρογέλες με μέγιστη ποσότητα χιτοζάνης (15% w/v CS), ενώ η αρχική τους μορφή είναι στερεή, τελικά αποδομούνται και δεν συγκρατούν την μέγιστη ποσότητα νερού που προσλαμβάνουν. Στις συνθήκες δέρματος, η υδρογέλη φέρει το πιο υψηλό ποσοστό συγκράτησης, το οποίο φτάνει έως 46% στο διάστημα των 3h, ενώ κατά την πειραματική διαδικασία αποσχηματίζεται. Στην περίπτωση αυτή, η αντίδραση MR υποβαθμίζει τις ιδιότητες του πολυμερούς, καθώς το τελευταίο αποκτά έντονο μαύρο χρώμα όταν περιέχεται μέγιστη περιεκτικότητα εκχυλίσματος και χιτοζάνης, ενώ κατά τις πειραματικές συνθήκες σκουραίνει από την παραγωγή μελανοϊδινών, με αποτέλεσμα η υδρογέλη να γίνεται εύθρυπτη και να χάνει τις ιδιότητες της.

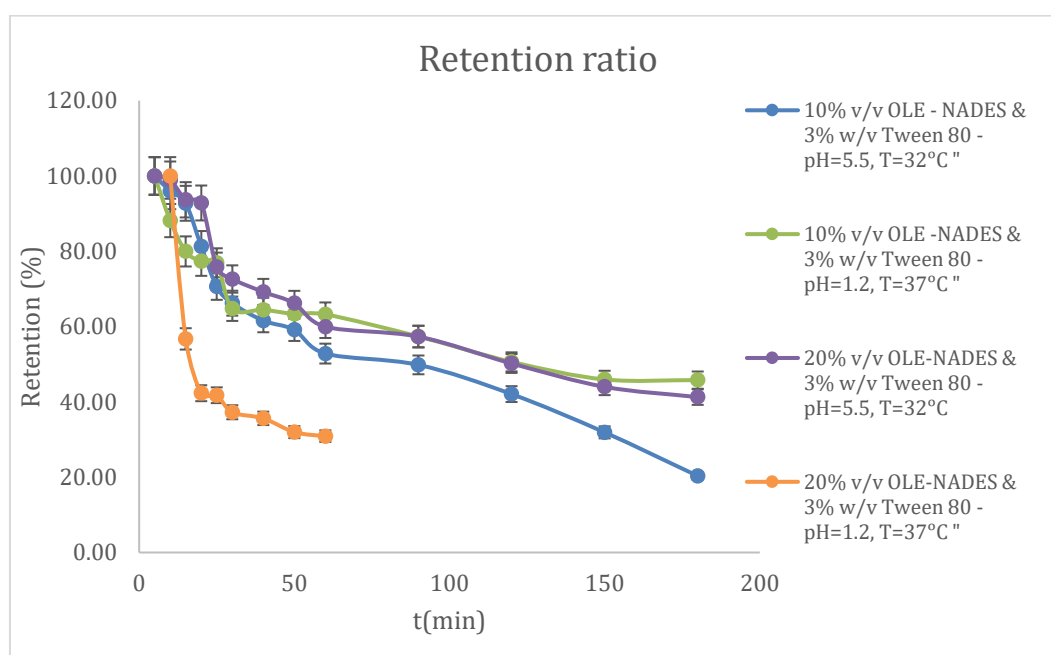
Στη συνέχεια, συγκρίνονται υδρογέλες διαφορετικής περιεκτικότητας εκχυλίσματος και ίδιας περιεκτικότητας χιτοζάνης ως προς την ικανότητα τους να συγκρατούν τη μέγιστη ποσότητα νερού που προσλαμβάνουν στο πολυμερικό δίκτυο. Επιλέγονται υδρογέλες που περιέχουν την ελάχιστη και μέγιστη περιεκτικότητα εκχυλίσματος στο σύστημα.

- **10% w/v CS (5-20 cps)**

Για την μελέτη επίδρασης της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος σε υδρογέλες με την ελάχιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης ως προς την ικανότητα συγκράτησης νερού, συγκρίνονται τα αποτελέσματα των συστημάτων που περιέχουν τη σύσταση του Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Περιεκτικότητες εκχυλίσματος και Tween 80 υδρογελών που περιέχουν 10% w/v CS(5-20 cps)

[OLE - NADES]	[Tween 80]
% v/v	% w/v
10	3
20	3



Διάγραμμα 28: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% w/v CS (5-20 cps) και 10 & 20% v/v OLE -NADES σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες

Αρχικά, οι υδρογέλες που περιέχουν ελάχιστη ποσότητα χιτοζάνης αποτελούν ρευστά υλικά σε κάθε περιεκτικότητα εκχυλίσματος, ενώ τα τελικά προϊόντα κατά το swelling δεν διογκώνονται, αλλά συρρικνώνονται. Από το Διάγραμμα 28, παρατηρείται ότι η συμπεριφορά των υδρογελών είναι παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις εκχυλισμάτων, καθώς το πλέγμα και οι δυνάμεις που το συγκροτούν είναι ασθενείς, με αποτέλεσμα να αδυνατούν να συγκρατήσουν ποσότητα υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος κατά την πειραματική διαδικασία. Η συμβολή της αντίδρασης MR σε όλες τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες παρατείνει την διάρκεια ζωής των υλικών, ωστόσο δεν ενισχύει σημαντικά τις ιδιότητες τους, ώστε να συγκρατούν επαρκή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.

Στην περίπτωση μικρότερης περιεκτικότητας εκχυλίσματος (10% v/v OLE-NADES), οι υδρογέλες ευνοούνται σε όξινες συνθήκες, καθώς η αντίδραση MR σε όξινα pH πραγματοποιείται με αργούς ρυθμούς προς την παραγωγή μελανοιδινών, ενώ σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα εκχυλίσματος (20% v/v OLE - NADES), οι συνθήκες δέρματος εντείνουν την ικανότητα τους να συγκρατούν νερό. Τα αποτελέσματα και των δύο περιπτώσεων δεν είναι ικανοποιητικά, καθώς οι υδρογέλες χάνουν τις

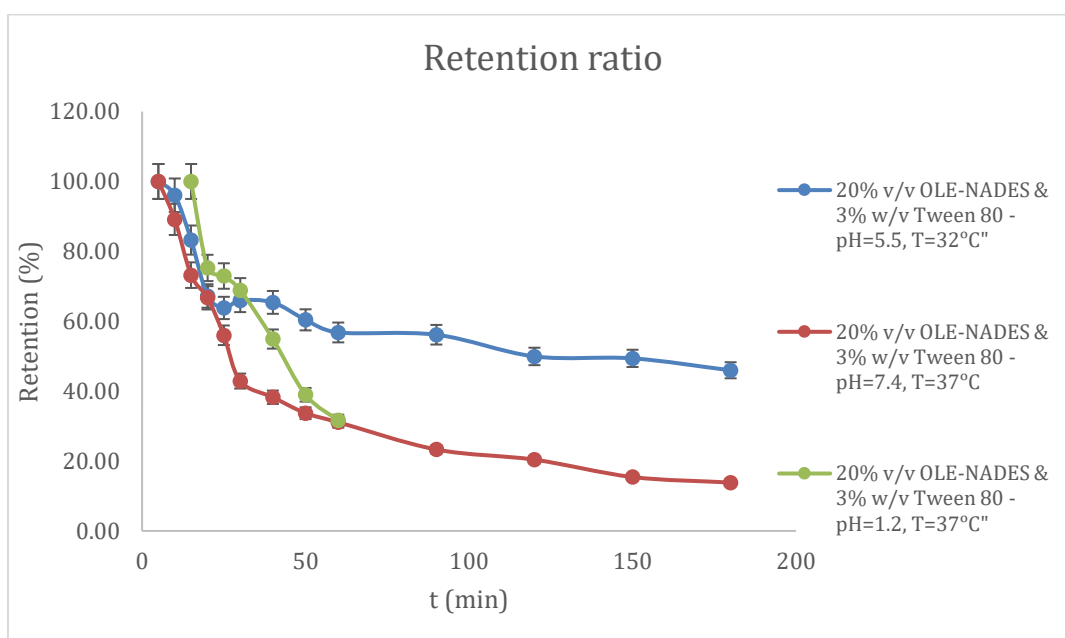
ιδιότητες τους και με την πάροδο του χρόνου αποδομούνται. Επιπλέον, και για τους δύο προτεινόμενους συνδυασμούς, οι υδρογέλες ξηράθηκαν σε φούρνο δεν παρατίθενται στο διάγραμμα, καθώς η επιτάχυνση της αντίδρασης MR, λόγω αυξημένης θερμοκρασίας, έχει ως αποτέλεσμα τα υλικά να μην φέρουν τις επιθυμητές ιδιότητες και τελικά να αποδομούνται κατά την μελέτη των ιδιοτήτων τους.

- **15% w/v CS (5-20 cps)**

Για την μελέτη επίδρασης της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος υδρογελών με μέγιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης, συγκρίνονται τα αποτελέσματα των υλικών που περιέχουν τη σύσταση του Πίνακα 13, τα οποία παρουσιάζονται σε κοινό διάγραμμα.

Πίνακας 13: Σύσταση υδρογελών που περιέχουν 15% w/v CS(5-20 cps)

[OLE - NADES]	[Tween 80]
% v/v	% w/v
10	3
20	3



Διάγραμμα 29: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 15% w/v CS (5-20 cps) & 20% v/v OLE - NADES σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες

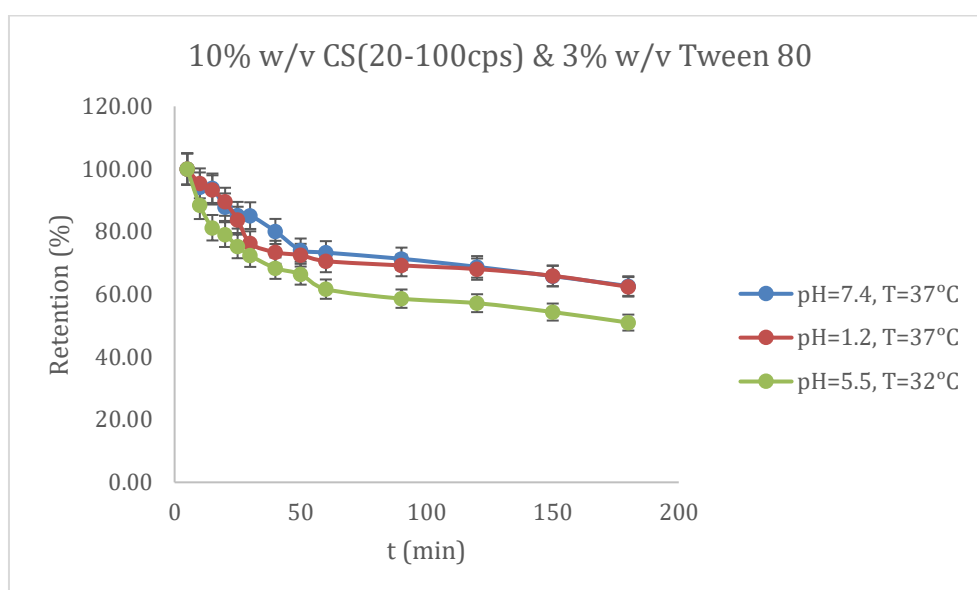
Αρχικά, και στις δύο περιπτώσεις κατά τον σχηματισμό τους, οι υδρογέλες φέρουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, καθώς αποτελούν στερεά τρισδιάστατα πολυμερικά πηκτώματα που δεν ρέουν. Στην περίπτωση υδρογέλης με ελάχιστη περιεκτικότητα εκχυλίσματος, 10% v/v OLE-NADES, κατά την πειραματική διαδικασία παρατηρείται αυξανόμενη διόγκωση, ενώ η μάζα της υδρογέλης μειώνεται ελάχιστα τη χρονική στιγμή των 4.5h, με αποτέλεσμα να μην εξετάζεται ως προς την ικανότητα συγκράτησης ποσότητας νερού που προσλαμβάνει. Η αντίδραση MR στις συνθήκες δέρματος, όπου

πραγματοποιείται το πείραμα, ευνοείται, με αποτέλεσμα το προϊόν να είναι πιο ανθεκτικό και ενισχυμένο ως προς τις τελικές του ιδιότητες, ενώ ο βαθμός διασύνδεσης γίνεται πολύ ισχυρός.

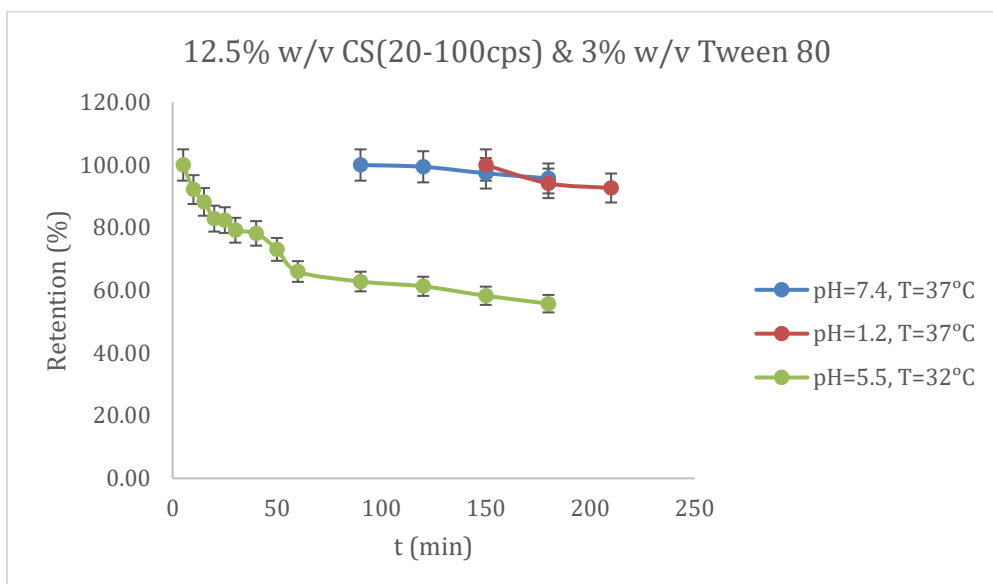
Στην περίπτωση υδρογέλης που αποτελείται από μέγιστη ποσότητα εκχυλίσματος σε συνδυασμό με μέγιστη ποσότητα χιτοζάνης, η υδρογέλη δεν συγκρατεί το νερό που απορροφά και αποδομείται σε όλες τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες. Το πολυμερικό πλέγμα κρίνεται πολύ αδύναμο ως προς τις αλληλεπιδράσεις που συγκροτούν το δίκτυο, ενώ η αντίδραση MR στη συγκεκριμένη περίπτωση υποβαθμίζει τις ιδιότητες του υλικού, λόγω της παραγωγής μελανοϊδινών, με αποτέλεσμα η υδρογέλη να αδυνατεί να συγκρατήσει ποσότητα υδατικού διαλύματος στο πλέγμα, καθώς γίνεται εύθρυπτη.

Στη συνέχεια, συγκρίνονται οι πειραματικές αποκρίσεις των υδρογελών που αποτελούνται από χιτοζάνη 20-100 cps ως προς την ικανότητα τους να συγκρατούν το νερό που απορροφούν, ενώ μελετάται η επίδραση της περιεκτικότητας της χιτοζάνης στο πολυμερικό πλέγμα όταν η περιεκτικότητα εκχυλίσματος διατηρείται σταθερή.

- **10% v/v OLE - NADES**



Διάγραμμα 30 : Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 10 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80



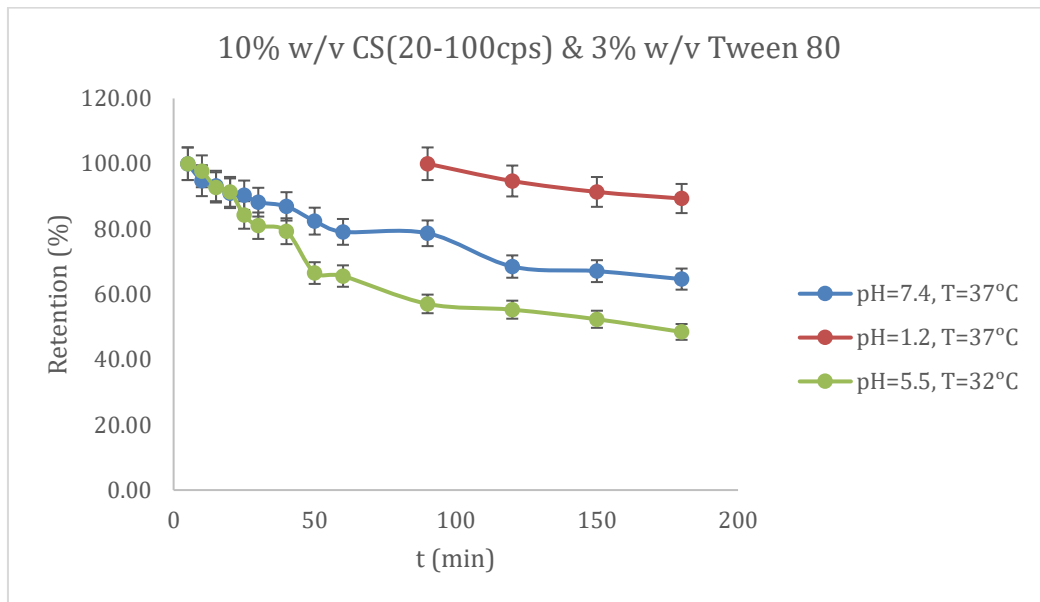
Διάγραμμα 31: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 12.5 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80

Από τα παραπάνω διαγράμματα, παρατηρείται ότι η υδρογέλη η οποία περιέχει 12.5% w/v CS(20-100 cps) πλεονεκτεί έναντι της ελάχιστης περιεκτικότητας, καθώς σε όλες τις πειραματικές συνθήκες κατορθώνονται υψηλότερα ποσοστά ικανότητας συγκράτησης νερού, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο χημικός βαθμός διασύνδεσης είναι πιο ισχυρός στη συγκεκριμένη περίπτωση. Αρχικά, και στις δύο περιεκτικότητες κατά τις συνθήκες δέρματος, οι υδρογέλες συγκρατούν την ποσότητα νερού που απορροφούν έως ~55% στις 3h, ενώ οι υπόλοιπες συνθήκες που εξετάζονται φέρουν πιο υποσχόμενα αποτελέσματα, καθώς κατορθώνονται υψηλότερα ποσοστά συγκράτησης νερού στις 3h.

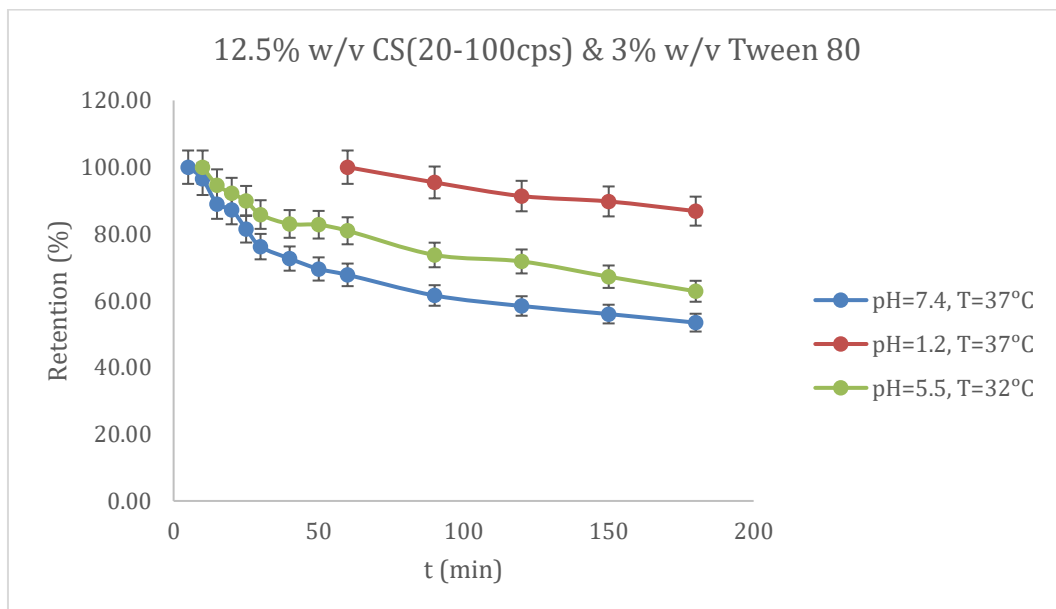
Η μέγιστη ποσότητα χιτοζάνης στο σύστημα με 10% v/v OLE αποδεικνύεται κατάλληλη για τις εξεταζόμενες εφαρμογές που αφορούν φάρμακα (φυσιολογικές και όξινης συνθήκες), καθώς η σχηματιζόμενη υδρογέλη διατηρεί τη μάζα της μετά το πέρας του σημείου ισορροπίας, συγκρατώντας τη μέγιστη ποσότητα νερού που απορροφά. Ειδικότερα, σε όξινης συνθήκες, το σημείο ισορροπίας εντοπίζεται στις 2.5h και η υδρογέλη συγκρατεί την απορροφούμενη ποσότητα νερού κατά 93% τη χρονική στιγμή των 3.5h, ενώ σε pH=7.4 και T=37°C το σημείο ισορροπίας της υδρογέλης εντοπίζεται τη χρονική στιγμή της 1.5h και συγκρατεί το νερό κατά 96% στις 3h. Η μεγάλη ικανότητα συγκράτησης νερού υποδεικνύει πολύ σταθερό και ισχυρό πλέγμα, ενώ η υδρογέλη δεν αποσχηματίζεται κατά την πειραματική διαδικασία.

Ακολούθως, συγκρίνονται οι πειραματικές αποκρίσεις ως προς την ικανότητα συγκράτησης νερού των υδρογελών, των οποίων ως τρίτο συστατικό του πολυμερικού συστήματος επιλέγεται ο διαλύτης Glu/LA/W, ενώ χρησιμοποιείται η χιτοζάνη με αυξημένο ιξώδες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

- **10% v/v NADES**



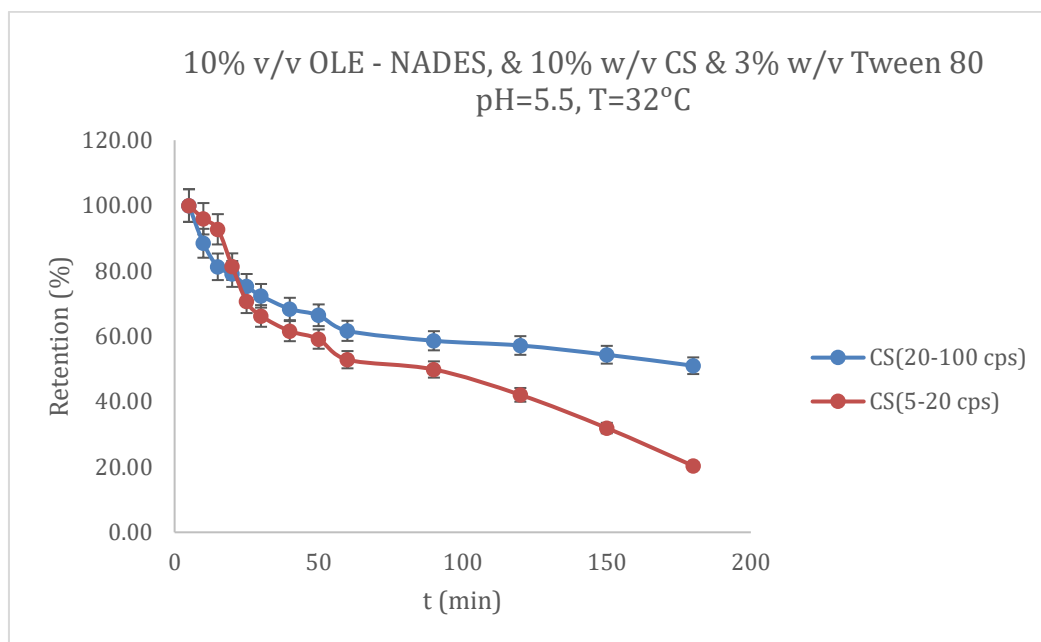
Διάγραμμα 32: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v NADES & 10 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80



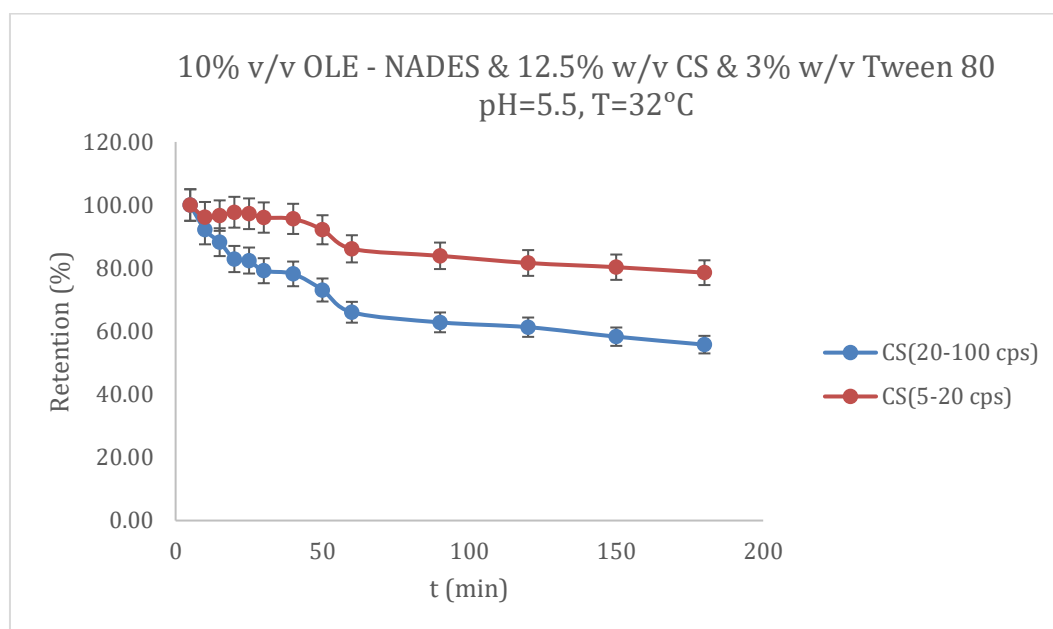
Διάγραμμα 33: Ικανότητα συγκράτησης νερού ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v NADES & 12.5 % w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80

Οι σχηματιζόμενες υδρογέλες με τρίτο συστατικό τον διαλύτη έχουν παρόμοια συμπεριφορά ως προς την συγκράτηση νερού στις διαφορετικές περιεκτικότητες, ενώ το πολυμερικό δίκτυο αποδεικνύεται ισχυρό και ανθεκτικό σε όλες τις συνθήκες, καθώς παρατηρούνται ελάχιστες απώλειες ως προς τη μάζα των υδρογελών μετά το σημείο ισορροπίας, όπου απορροφάται η μέγιστη ποσότητα νερού στο πλέγμα. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις περιεκτικότητας χιτοζάνης, διακρίνονται οι συνθήκες προσομοίωσης στομάχου για τα υψηλά ποσοστά συγκράτησης, καθώς οι χαμηλές τιμές pH δεν επιταχύνουν την αντίδραση MR, σε συνδυασμό με τις εμπλεκόμενες ποσότητες, προς την παραγωγή μελανοιδινών που καθιστούν το πλέγμα πιο εύθρυπτο. Σε υψηλότερα pH και υψηλότερες θερμοκρασίες, ο ρυθμός της αντίδρασης αυξάνεται, με αποτέλεσμα να υποβαθμίζονται οι ιδιότητες του πολυμερούς και τα τελικά προϊόντα να κρίνονται ακατάλληλα για τις εξεταζόμενες εφαρμογές.

Τέλος, συγκρίνονται και σχολιάζονται οι πειραματικές αποκρίσεις υδρογελών που περιέχουν χιτοζάνη διαφορετικών ιδιοτήτων με περιεκτικότητα εκχυλίσματος 10% v/v στις πειραματικές συνθήκες που προσομοιάζουν το δέρμα.



Διάγραμμα 34: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 10% w/v CS (5-20 / 20-100 cps) & 3% w/v Tween 80



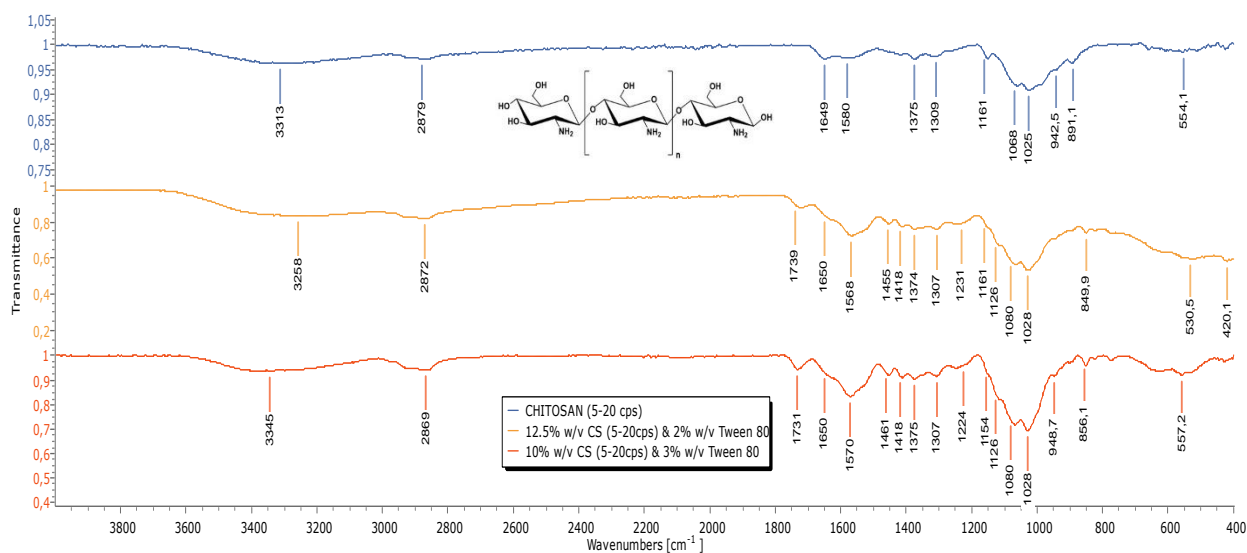
Διάγραμμα 35: Ικανότητα διόγκωσης ως προς τον χρόνο Υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 12.5% w/v CS (5-20 / 20-100 cps) & 3% w/v Tween 80

Από τα παραπάνω γραφήματα, αποδεικνύεται ότι η υδρογέλη που περιέχει ελάχιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης με αυξημένο εύρος ιξώδους στο πολυμερικό πλέγμα (10% w/v CS(20-100 cps)), σε περιεκτικότητα εκχυλίσματος 10% v/v, κατορθώνει σε μεγαλύτερο βαθμό να διατηρήσει την μέγιστη ποσότητα νερού που απορροφά, σε αντίθεση με την χιτοζάνη 5-20cps, η οποία αδυνατεί να συγκρατήσει

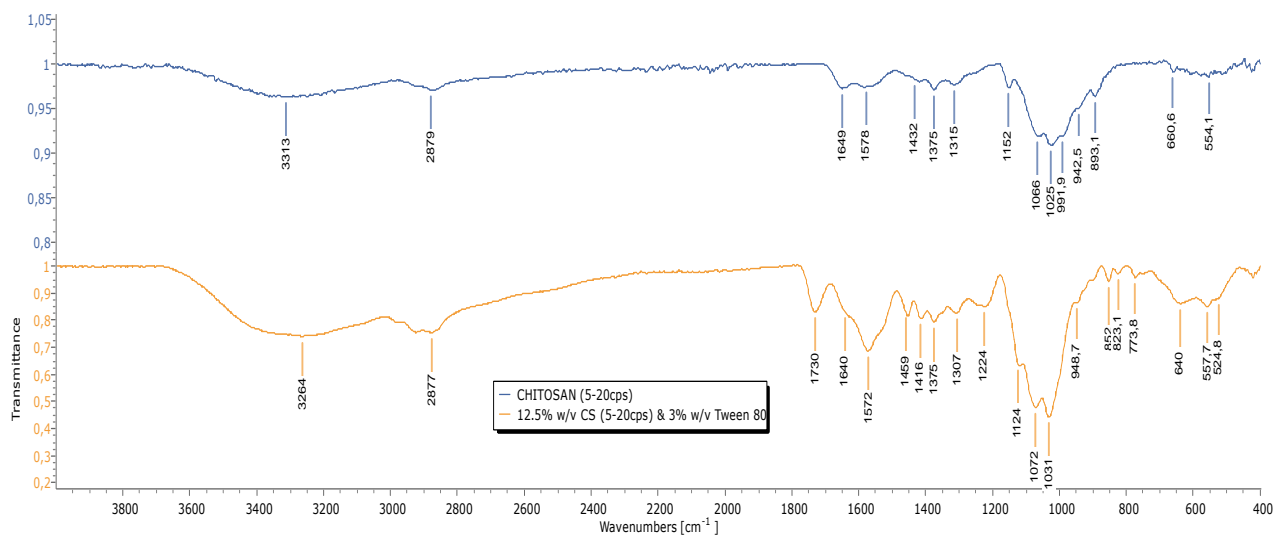
ποσότητα νερού έως το τέλος της πειραματικής διαδικασίας, καθώς ο βαθμός διασύνδεσης της υδρογέλης κρίνεται ασθενής. Όταν περιέχεται 12.5% w/v CS στο πολυμερικό δίκτυο, η συμπεριφορά των υδρογελών ως προς την ικανότητα τους να συγκρατούν τη μέγιστη ποσότητα νερού που προσλαμβάνουν, είναι ικανοποιητική, καθώς τα ποσοστά συγκράτησης είναι υψηλότερα, γεγονός που υποδεικνύει ενισχυμένα πλέγματα με βελτιωμένες ιδιότητες και για τα δύο βιοπολυμερή. Τέλος, στην ίδια περίπτωση η χιτοζάνη χαμηλότερου εύρους ξώδους σχηματίζει πιο σταθερό υλικό συγκριτικά με την χιτοζάνη υψηλότερου ξώδους, ενώ η αντίδραση MR συμβάλλει στην ισχυροποίηση του τελικού προϊόντος.

3.3.3 Δομικός Χαρακτηρισμός υδρογελών

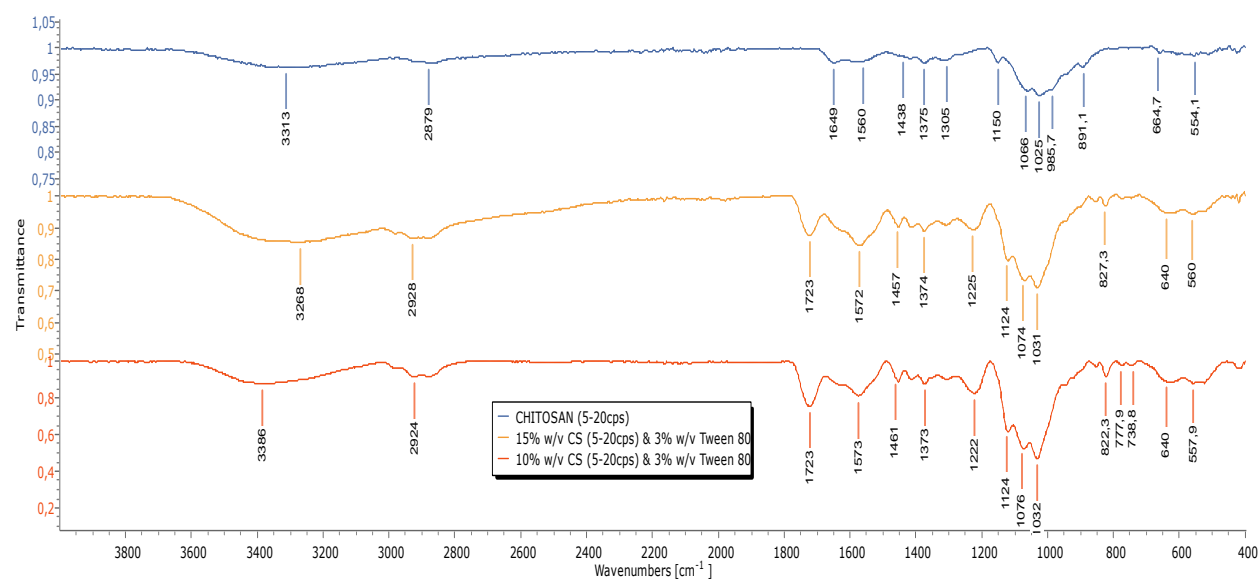
Για τη δομική μελέτη των υδρογελών πραγματοποιήθηκε η λήψη φασμάτων με τη μέθοδο FT - IR. Εξετάστηκαν οι υδρογέλες κάθε χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία, ενώ μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών περιεκτικοτήτων των συστατικών του συστήματος, ώστε να επιβεβαιωθεί η πραγμάτωση της αντίδρασης MR σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των τελικών προϊόντων. Τα φάσματα που λήφθηκαν αφορούν υδρογέλες CS(5-20cps) με περιεκτικότητα εκχυλίσματος 10, 15 και 20% v/v OLE-NADES σε συνδυασμό με διαφορετικές περιεκτικότητες χιτοζάνης, ενώ εξετάστηκαν και υδρογέλες CS(20-100cps) με περιεκτικότητα 10% v/v εκχυλίσματος και NADES σε διαφορετικές περιεκτικότητες χιτοζάνης.



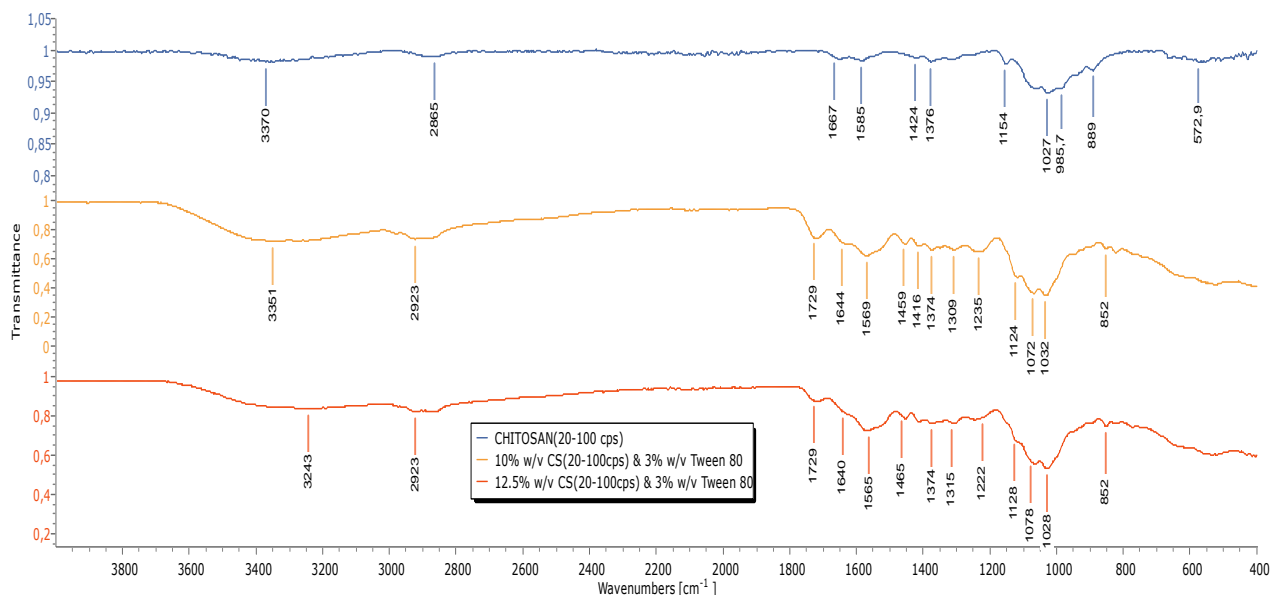
Διάγραμμα 36: Φάσμα FT-IR CS(5-20cps) και υδρογέλης με 10% v/v OLE - NADES & 10, 12.5 % w/v CS (5-20 cps) & 2, 3% w/v Tween 80



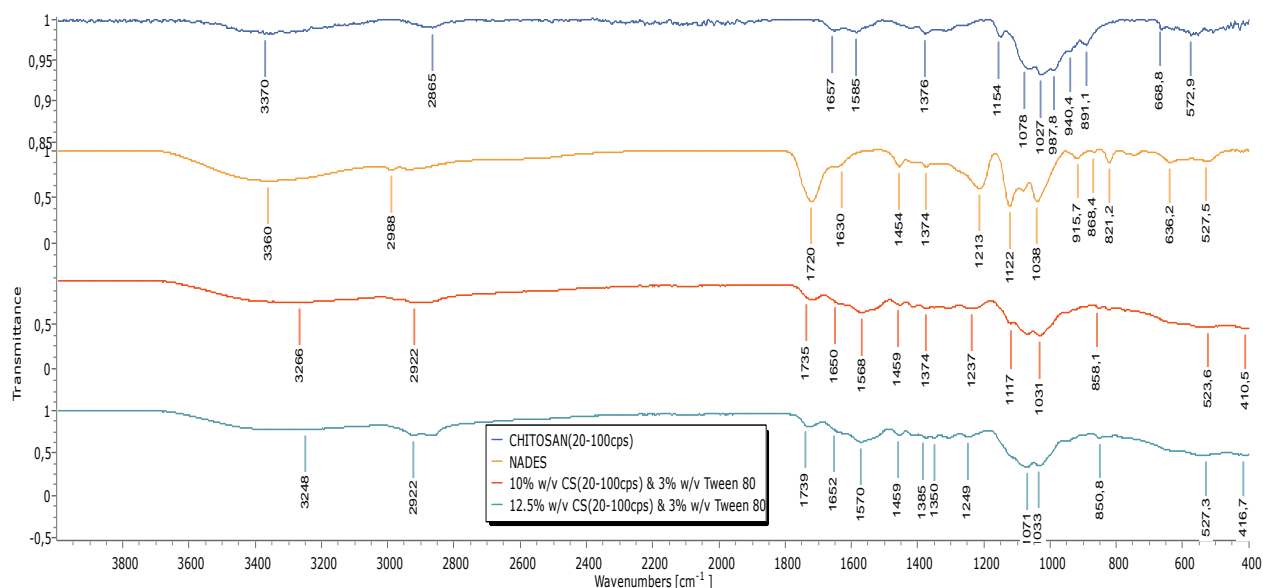
Διάγραμμα 37: Φάσμα FT-IR CS(5-20cps) και υδρογέλης με 15% v/v OLE – NADES & 12.5% w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80



Διάγραμμα 38: Φάσμα FT-IR CS(5-20cps) και υδρογέλης με 20% v/v OLE – NADES & 10, 15% w/v CS (5-20 cps) & 3% w/v Tween 80



Διάγραμμα 39: Φάσμα FT-IR CS(20-100cps) και υδρογελών με 10% v/v OLE – NADES & 10 / 12.5% w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80



Διάγραμμα 40: Φάσμα FT-IR CS(20-100cps), NADES και υδρογελών με 10% v/v NADES & 10 / 12.5% w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80

Στα φάσματα που αφορούν τη χιτοζάνη (CS 5-20 / 20- 100 cps), παρατηρούνται χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης γύρω στα 3310 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δονήσεις τάσεις των ομάδων -O-H, ενώ η κορυφή που εμφανίζεται στα $2885 - 2890\text{ cm}^{-1}$ οφείλεται σε δονήσεις τάσεις των ομάδων -C-H. Οι ζώνες απορρόφησης στα $1649 - 1651\text{ cm}^{-1}$, $1580-1585\text{ cm}^{-1}$ και 1375 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις παραμόρφωσης πρωτοταγών αμιδίων (C = O stretching), αμινομάδων (N – H bending) και τριτοταγών αμιδίων (C – N stretching) αντίστοιχα, ενώ η ευρεία κορυφή που εμφανίζεται γύρω στα 1025 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δονήσεις τάσης του δεσμού C-O. Επιπλέον, η ζώνη απορρόφησης γύρω στα $1155-1160\text{ cm}^{-1}$ οφείλεται σε δονήσεις τάσεις του δεσμού -C-O-C του δακτυλίου πυρανόζης [65], [66], [91]-[94]. Κατά την εξέταση των δειγμάτων των υδρογελών, παρατηρείται ότι οι προαναφερόμενες ζώνες απορρόφησης της χιτοζάνης μετατοπίζονται και συγκεκριμένα η κορυφή πρωτοταγών αμιδίων στα 1649 cm^{-1} μειώνεται και εμφανίζεται γύρω στα 1570 cm^{-1} , επιβεβαιώνοντας ότι λαμβάνει χώρα η αντίδραση MR μεταξύ των μορίων του συστήματος. Ειδικότερα, η κορυφή είναι χαρακτηριστική των

μορίων με γενική δομή της βάσης Schiff ($R^1R^2C=NR^3$ double bond) που σχηματίζεται σε προϊόντα της αντίδρασης MR κατά το αρχικό στάδιο, ενώ με την πάροδο του χρόνου οι ζώνες απορρόφησης μειώνονται, καθώς η αντίδραση προχωρά σε επόμενα στάδια. Συγκεκριμένα, το προϊόν Schiff base αναδιατάσσεται και προκύπτουν τα προϊόντα Amadori, τα οποία αποικοδομούνται προς τον σχηματισμό φουρφουραλών, τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή πολύπλοκων δομών και μελανοϊδινών [65], [66], [91], [92]. Για παράγωγα χιτοζάνης – γλυκόζης μέσω της αντίδρασης MR αναφέρθηκαν επίσης αυξημένες εντάσεις δονήσεων των δεσμών, λόγω διαμορφωτικών μετασχηματισμών των προϊόντων. Επιπρόσθετα, η ελάχιστη μείωση στην ένταση της ζώνης των αμινομάδων που παρατηρείται, αποδεικνύει την αλληλεπίδραση μεταξύ της καρβονυλικής ομάδας του αναγωγικού σακχάρου και της αμινομάδας της χιτοζάνης, ενώ ορισμένες στενές και μικρές κορυφές εξαφανίζονται με την εισαγωγή της γλυκόζης στο μόριο της χιτοζάνης [65], [66], [95]. Επιπλέον, η ζώνη απορρόφησης των δονήσεων τάσης της ομάδας -C-O της χιτοζάνης μετατοπίζεται ελάχιστα κατά την αλληλεπίδραση των μορίων στα φάσματα των υδρογελών σε σχέση με της χιτοζάνης, ενώ η κορυφή που εμφανίζεται γύρω στα 1430 cm^{-1} έχει διαφορετική ένταση από την αντίστοιχη της χιτοζάνης και της γλυκόζης που αντιστοιχεί σε δονήσεις έκτασης της ομάδας $-CH_2$, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των μεθυλομάδων κατά την ενσωμάτωση των αλυσίδων χιτοζάνης στη γλυκόζη [65], [66], [91]. Σημειώνεται ότι κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στην ομάδα υδροξυλίου -O-H, εμφανίζεται με διαφορετική ένταση σε κάθε φάσμα υδρογέλης, υποδεικνύοντας την ισχύροτητα του πλέγματος σε σχέση με τις δυνάμεις που το συγκροτούν, δηλαδή τους δεσμούς υδρογόνου.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η γλυκόζη έχει προσκολληθεί στη χιτοζάνη μέσω ομοιοπολικών δεσμών με τη δημιουργία αιθερικού δεσμού (από τη συμπύκνωση O-H), με αποτέλεσμα οι υδρογέλες να διασυνδέονται χημικά και οι ομοιοπολικοί δεσμοί συγκρότησης να καθιστούν το πλέγμα σταθερότερο και ισχυρότερο [92].

Στους Πίνακες 14 & 15 συνοψίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της χιτοζάνης (5-20 / 20-100 cps) και των υδρογελών χιτοζάνης που εξετάστηκαν.

Πίνακας 14: Χαρακτηριστικές δονήσεις παραμόρφωσης χιτοζάνης (CS (5-20cps)) και υδρογελών CS(5-20) σε συνδυασμούς περιεκτικότητας εκχυλίσματος και χιτοζάνης

Δείγμα	$\tilde{\nu}(\text{OH})$	$\tilde{\nu}(\text{CH})$	$\tilde{\nu}(\text{C}=\text{O})$	$\delta(\text{NH})+\delta(\text{CN})$	$\delta(\text{CH}_2)$	$\tilde{\nu}(\text{CN})$	$\tilde{\nu}(\text{C-O-C})$	$\tilde{\nu}(\text{C-O})$
CS (5-20cps)	3313	2879	1649	1580	1430	1375	1161	1025
10% v/v OLE-NADES & 10% w/v CS & 3% w/v Tween 80	3258	2872	1570	1455	1418	1375	1161	1028
10% v/v OLE-NADES & 12.5% w/v CS & 2% w/v Tween 80	3386	2869	1568	1461	1418	1374	1154	1028
15% v/v OLE-NADES & 12.5% w/v CS & 3% w/v Tween 80	3264	2877	1572	1459	1416	1375	1124	1031

20% v/v OLE-NADES & 10% w/v CS & 3% w/v Tween 80	3386	2924	1573	1461	1420	1373	1124	1032
20% v/v OLE-NADES & 15% w/v CS & 3% w/v Tween 80	3268	2928	1572	1457	1420	1374	1124	1031

Πίνακας 15: Χαρακτηριστικές δονήσεις παραμόρφωσης χιτοζάνης (CS (20-100cps)) και υδρογελών CS(20-100) σε συνδυασμούς περιεκτικότητας εκχυλίσματος, NADES και χιτοζάνης

Δείγμα	$\tilde{\nu}(\text{OH})$	$\tilde{\nu}(\text{CH})$	$\tilde{\nu}(\text{C}=\text{O})$	$\delta(\text{NH})+\delta(\text{CN})$	$\delta(\text{CH}_2)$	$\tilde{\nu}(\text{CN})$	$\tilde{\nu}(\text{C-O-C})$	$\tilde{\nu}(\text{C-O})$
CS (20-100cps)	3370	2865	1667	1585	1424	1376	1154	1027
10% v/v OLE-NADES & 10% w/v CS & 3% w/v Tween 80	3351	2923	1569	1459	1416	1375	1124	1032
10% v/v OLE-NADES & 12.5% w/v CS & 3% w/v Tween 80	3243	2923	1565	1465	1420	1374	1128	1028
10% v/v NADES & 10% w/v CS & 3% w/v Tween 80	3266	2922	1568	1459	1416	1374	1117	1031
10% v/v NADES & 12.5% w/v CS & 3% w/v Tween 80	3248	2922	1570	1459	1420	1385	1120	1033

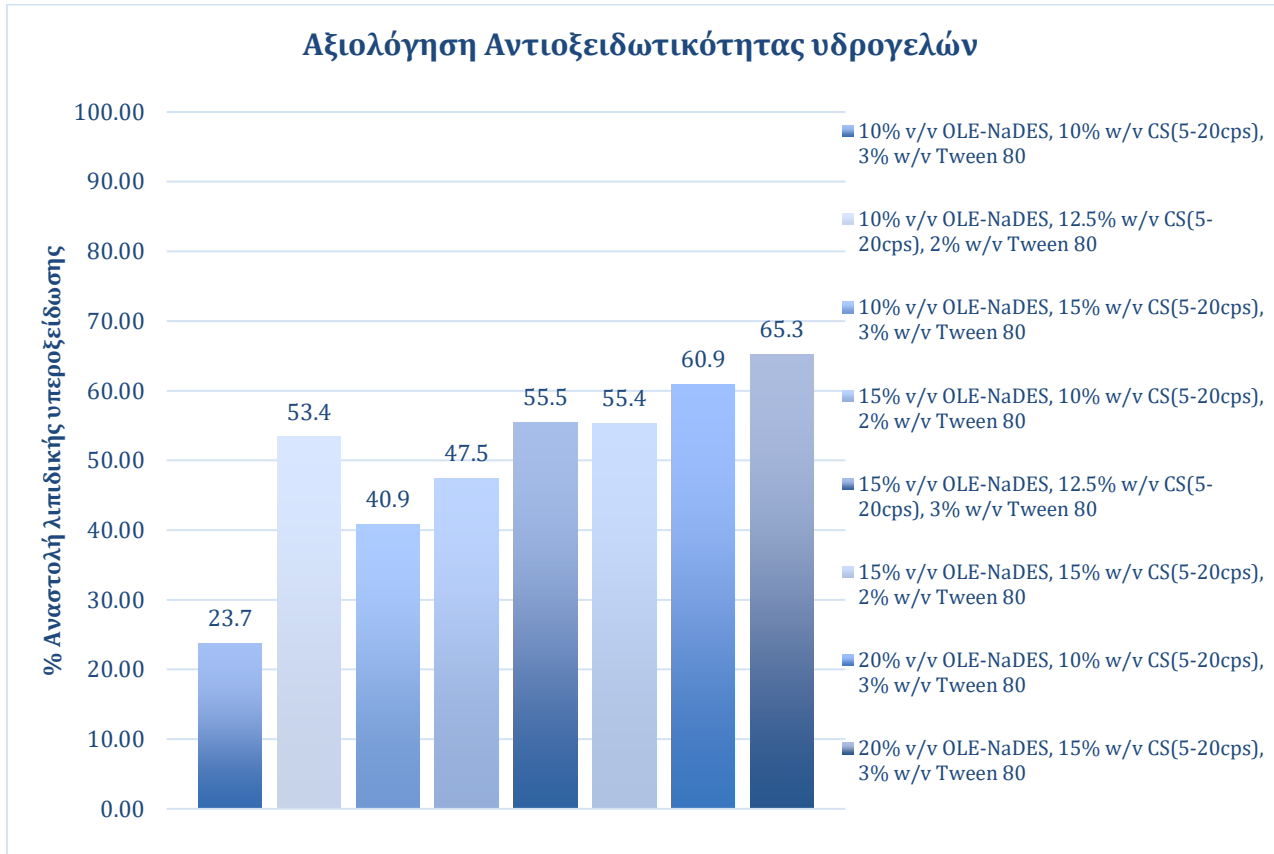
3.3.4 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης

3.3.4.1 Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης – AAPH

Διασπορά των υδρογελών διαλύεται σε 10 ml διαλύματος 10% v/v γαλακτικό οξύ – LA, ώστε να μελετηθεί η ικανότητα των προϊόντων να αποτρέπουν την οξειδωση των λιπιδίων. Οι μετρήσεις που πραγματοποιούνται λαμβάνονται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου UV στα 234 nm, όπου απορροφούν τα υπεροξείδια και οι μετρήσεις αξιολογούνται ως προς την ικανότητα τους να επιβραδύνουν την αλυσιδωτή αντίδραση.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τον έλεγχο της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH.

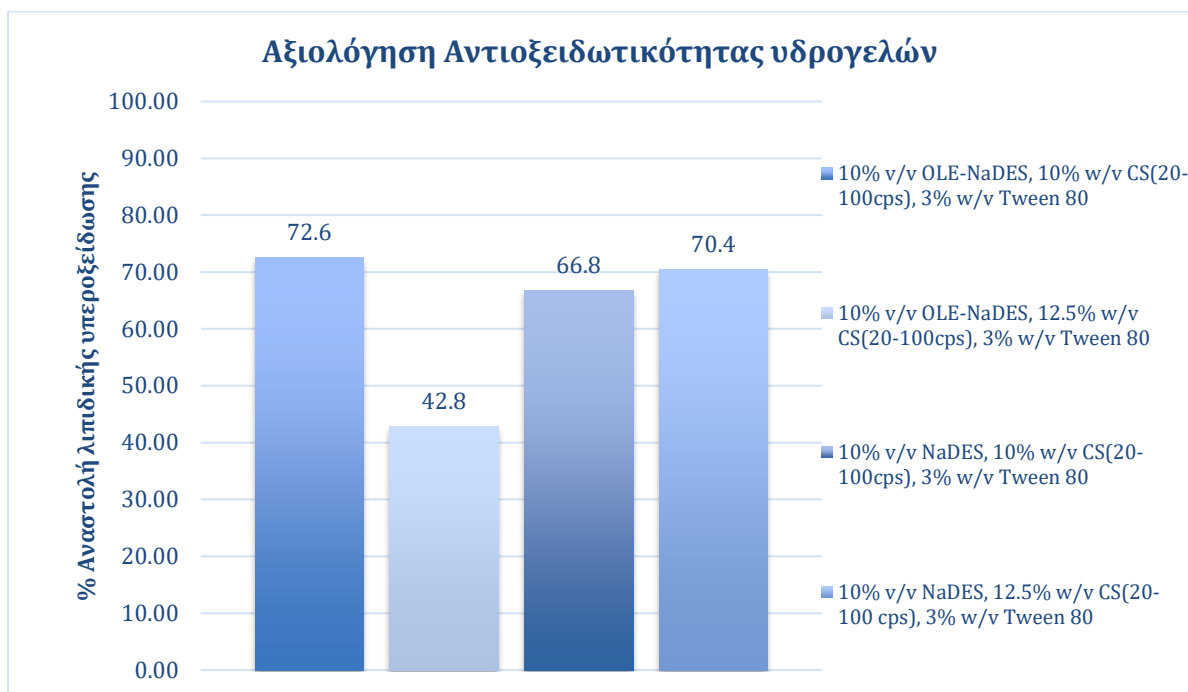
Αξιολόγηση Αντιοξειδωτικότητας υδρογελών



Διάγραμμα 41: Ποσοστά λιπιδικής υπεροξειδωσης των Υδρογελών με CS (5-20cps)

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι όσο περισσότερη ποσότητα εκχυλίσματος ενσωματώνεται στο πολυμερικό δίκτυο και συνεπώς αυξημένη ποσότητα βιοενεργών ουσιών, τόσο πιο έντονη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει το προϊόν, με το ποσοστό αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης να φτάνει το 65.3% στη μέγιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης, σε συνδυασμό με τη μέγιστη περιεκτικότητα εκχυλίσματος. Η αντίδραση MR ενισχύει την αντιοξειδωτικότητα των υπό εξέταση δειγμάτων, καθώς παράγονται μελανοΐδινες και αντιοξειδωτικά προϊόντα κατά τον μηχανισμό της. Κατά την πειραματική διαδικασία, οι υδρογέλες διαφέρουν χρωματικά λόγω παραγωγής μελανοΐδινών, με τις σκουρόχρωμες να αποδεικνύονται πιο αντιοξειδωτικές από τις πιο ανοιχτόχρωμες, καθώς η αντίδραση MR βρίσκεται σε διαφορετικό στάδιο, εφόσον εξαρτάται από τις συνθήκες και την ποσότητα των αντιδρώντων. Επιπλέον, όσο πιο χαμηλή η περιεκτικότητα εκχυλίσματος που περιέχεται στις υδρογέλες, τόσο πιο ασθενής η ικανότητα των δειγμάτων να αποτρέπουν την λιπιδική υπεροξειδωση, ενώ κατά την αύξηση των ποσοτήτων εκχυλίσματος και χιτοζάνης αποδεικνύεται πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική δράση. Η υδρογέλη που περιέχει 10% v/v OLE – NADES & 12.5% w/v CS(5-20 cps) & 3% w/v Tween 80 αποτελεί εξαίρεση ως προς την ενισχυμένη αποτελεσματικότητά της, καθώς η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε μεταγενέστερο στάδιο, όπου εντείνεται η αντιοξειδωτικότητα από την αντίδραση MR, εφόσον το υλικό έχει αποκτήσει έντονα μαύρο χρώμα από τις μελανοΐδινες που παράγονται σε προχωρημένη φάση του μηχανισμού.

Αντίστοιχα, εξετάστηκαν και αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και οι υδρογέλες που σχηματίστηκαν με χιτοζάνη 20-100 cps. Οι μετρήσεις των απορροφήσεων των δειγμάτων φανερώνουν υποσχόμενα αποτελέσματα, καθώς αποδεικνύεται επιβράδυνση της λιπιδικής υπεροξειδωσης.



Διάγραμμα 42: Ποσοστά λιπιδικής υπεροξειδωσης των Υδρογελών με CS (20-100 cps)

Στην περίπτωση όπου ο διαλύτης αποτελεί το τρίτο συστατικό του πολυμερικού συστήματος, παρατηρείται ότι με την αύξηση της περιεκτικότητας της χιτοζάνης κατορθώνονται υψηλότερα ποσοστά λιπιδικής υπεροξειδωσης, ενώ και τα δύο ποσοστά κρίνονται ικανοποιητικά. Ωστόσο, όταν ενσωματώνεται φυσικό εκχύλισμα με NADES στην υδρογέλη, η αντιοξειδωτική ικανότητα των υδρογελών αυξάνεται, καθώς τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς αποτελούνται από βιοδραστικές αντιοξειδωτικές ενώσεις. Επιπλέον, η αντίδραση MR ενισχύει την αντιοξειδωτικότητα όταν βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο, ενώ όταν τα τελικά προϊόντα αποκτήσουν πιο σκούρο χρώμα εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Στην περίπτωση υδρογέλης που αποτελείται από 10% v/v OLE-NADES & 12.5% w/v CS(20-100 cps) & 3% w/v Tween 80, ενώ αναμένεται να παρουσιάζει ενισχυμένη ικανότητα αναστολής λιπιδικής υπεροξειδωσης, φέρει το αντίθετο αποτέλεσμα, γεγονός που οφείλεται ενδεχομένως σε πρώιμο στάδιο της αντίδρασης MR.

Στον Πίνακα 16 συνοψίζονται τα αποτελέσματα των Διαγραμμάτων 41 & 42, ενώ τα ποσοστά αναστολής λιπιδικής υπεροξειδωσης εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox που αποτελεί πρότυπη αντιοξειδωτική ένωση. Σημειώνεται ότι $89.73 \pm 0.90\%$ αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση $25.02 \frac{\mu g}{ml}$ διαλύματος Trolox [42].

Πίνακας 16: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικότητας των υδρογελών με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς περιεκτικότητας για το κάθε συστατικό (ποσοστό λιπιδικής υπεροξειδωσης και συγκέντρωση σε ισοδύναμα Trolox)

Sample	Inhibition of Linoleic Acid Peroxidation (%)	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity/AAPH Assay ($\mu\text{g/mL}$)
10% v/v OLE - NADES & 10% w/v CS (5-20cps) & 3% w/v Tween 80	23.72 \pm 8.00	6.07 \pm 0.77
10% v/v OLE - NADES & 12.5% w/v CS (5-20cps) & 2% w/v Tween 80	53.38 \pm 5.00	13.23 \pm 2.34
10% v/v OLE - NADES & 15% w/v CS (5-20cps) & 3% w/v Tween 80	40.86 \pm 5.69	10.66 \pm 1.03
15% v/v OLE - NADES & 12.5% w/v CS (5-20cps) & 3% w/v Tween 80	55.47 \pm 4.95	14.76 \pm 1.08
15% v/v OLE - NADES & 15% w/v CS (5-20cps) & 2% w/v Tween 80	55.37 \pm 6.96	14.46 \pm 1.39
20% v/v OLE - NADES & 10% w/v CS (5-20cps) & 3% w/v Tween 80	60.93 \pm 7.56	15.43 \pm 2.21
20% v/v OLE - NADES & 15% w/v CS (5-20cps) & 3% w/v Tween 80	65.25 \pm 8.60	16.50 \pm 2.39
10% v/v OLE - NADES & 10% w/v CS (20-100cps) & 3% w/v Tween 80	72.61 \pm 5.64	19.14 \pm 1.58
10% v/v OLE - NADES & 12.5% w/v CS (20-100cps) & 3% w/v Tween 80	42.85 \pm 3.24	11.31 \pm 0.91
10% v/v NADES & 10% w/v CS (20-100cps) & 3% w/v Tween 80	66.84 \pm 5.42	17.57 \pm 1.51
10% v/v NADES & 12.5% w/v CS (20-100cps) & 3% w/v Tween 80	70.41 \pm 5.00	19.19 \pm 0.62

3.3.4.2 Δέσμευση ελεύθερης ρίζας DPPH

Η αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων αξιολογείται και με την μέθοδο DPPH, όπου προσδιορίζεται η ικανότητα των υδρογελών να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η υδρογέλη με 10% w/v CS(20-100 cps) και 10% v/v OLE – NADES, η οποία παρουσιάζει αυξημένη αντιοξειδωτικότητα σύμφωνα με τη μέθοδο αναστολής λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η απορρόφηση του υπερκείμενου διαλύματος της υδρογέλης και των διαλυμάτων ελέγχου μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο uv-reader στα 515 nm, ενώ η επεξεργασία των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε στα διαλύματα που επωάστηκαν για 1h. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν ως % της αναστολής των ριζών DPPH και ως ισοδύναμα Trolox. Σημειώνεται ότι $88.5 \pm 0.74\%$ ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH αντιστοιχεί σε συγκέντρωση $14.47 \frac{\mu g}{ml}$ διαλύματος Trolox [42].

Πίνακας 17: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικότητας - Ποσοστά δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH και ισοδύναμα Trolox

10% v/v OLE - NADES & 10% w/v CS (20-100 cps) & 3% w/v Tween 80				
$V_{stock}(\mu L)$	$V_{lactic\ acid}(\mu L)$	$V_{DPPH}(\mu L)$	Δέσμευση ρίζας για 1h (%)	Ισοδύναμα Trolox ($\mu g/mL$)
100	0	100	30.7 ± 3.72	5.01 ± 0.61
80	20	100	24.7 ± 0.62	4.05 ± 0.11
60	40	100	22.8 ± 1.55	3.72 ± 0.24
40	60	100	16.8 ± 0.31	2.75 ± 0.05
20	80	100	9.1 ± 0.31	1.50 ± 0.06

Αρχικά, οι μετρήσεις των δειγμάτων που επωάστηκαν για 1h σε σκοτεινό μέρος, παρουσιάζουν ενισχυμένη αντιοξειδωτικότητα, σε σχέση με τις αρχικές. Παρατηρείται ότι όσο περισσότερος είναι ο όγκος του υπερκείμενου διαλύματος υδρογέλης (V_{stock}) τόσο μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH παρουσιάζει (πιο αισθητός αποχρωματισμός), ενώ όσο αραιώνεται, η δέσμευση γίνεται πιο ασθενής.

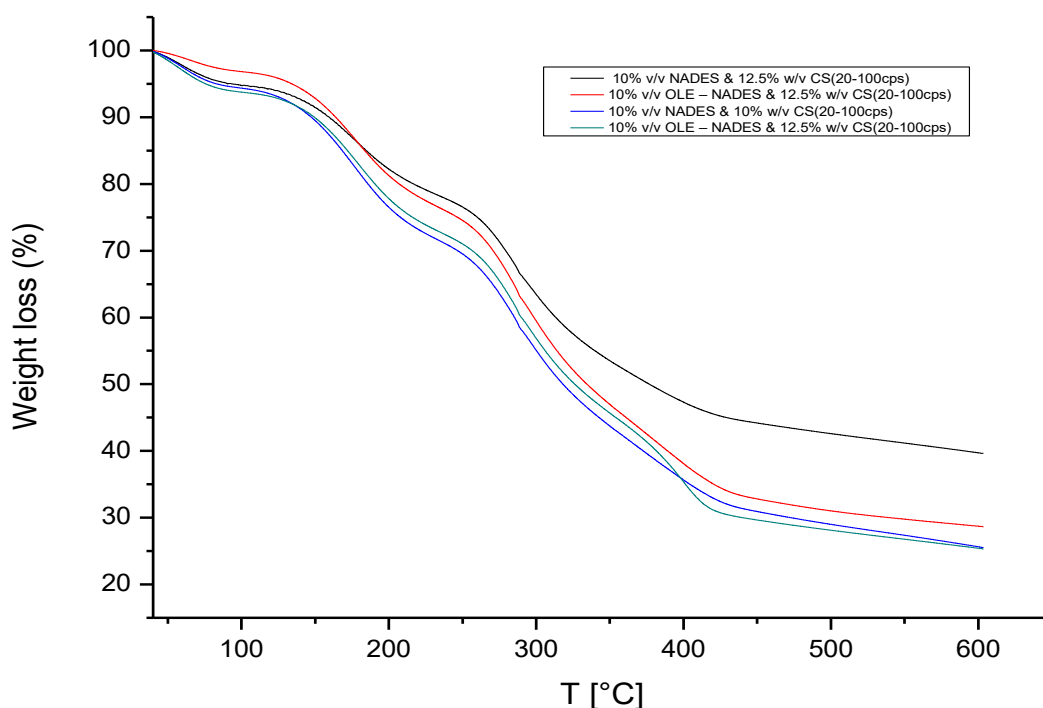
Γενικότερα, τα αντιοξειδωτικά προϊόντα που παράγονται κατά τον μηχανισμό της αντίδρασης Maillard αναστέλλουν την λιπιδική υπεροξειδωση και η δράση τους δεν αποδεικνύεται με την μέθοδο DPPH.

3.3.5 Αξιολόγηση θερμικών ιδιοτήτων

3.3.5.1 Θερμοβαρυμετρική ανάλυση TGA

Για την μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων και της θερμικής σταθερότητας των υδρογελών πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με την μέθοδο της θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA). Για λόγους σύγκρισης των θερμικών ιδιοτήτων των προϊόντων και μελέτης των αλλαγών που προκύπτουν, εξετάστηκαν οι υδρογέλες με CS (20-100 cps) σε θερμοκρασιακό εύρος $T = 0 - 600^\circ C$.

Από τα γραφήματα που παραλαμβάνονται για κάθε υδρογέλη προσδιορίζονται η απώλεια μάζας που παρατηρείται σε κάθε στάδιο, το αντίστοιχο θερμοκρασιακό εύρος που πραγματοποιείται η απώλεια μάζας και η θερμοκρασία αποσύνθεσης, όπου εντοπίζεται ο μέγιστος ρυθμός απώλειας, ενώ αναγράφεται η μάζα του δείγματος που απομένει τελικά. Στο *Διάγραμμα 43* παρουσιάζεται η απώλεια μάζας σε σχέση με την αύξηση της θερμοκρασίας για τα δείγματα που εξετάστηκαν.



Διάγραμμα 43 : Καμπύλες TGA Υδρογέλων με 10% v/v OLE - NADES / NADES & 10% w/v / 12.5% w/v CS (20-100cps) & 3% w/v Tween 80

Στις καμπύλες TGA των υδρογέλων με ενσωματωμένο φυσικό εκχύλισμα ελιάς παρατηρούνται τέσσερα στάδια μετασχηματισμών που αντιστοιχούν στα κύρια στάδια της απώλειας βάρους, ενώ στις υδρογέλες με NADES ως τρίτο συστατικό διακρίνονται τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο απώλειας μάζας για όλα τα δείγματα παρατηρείται από τη θερμοκρασία των 50°C έως 225°C περίπου, ενώ κορυφώνεται στους 60°C με τη μέγιστη απώλεια, η οποία σχετίζεται με την απομάκρυνση ελεύθερου και δεσμευμένου νερού από το πλέγμα των υδρογέλων. Η μείωση αυτή συνεχίζεται σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες και επεκτείνεται και στο δεύτερο στάδιο, καθώς απομακρύνεται το δεσμευμένο νερό από το σύστημα, το οποίο συγκρατείται με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου και επομένως παρουσιάζει μεγαλύτερη αντίσταση. Σε όλα τα γραφήματα το τρίτο στάδιο αντιστοιχεί στην αποδόμηση του βιοπολυμερούς, δηλαδή της χιτοζάνης, κατά την οποία αποσυντίθενται οι πολυμερικές αλυσίδες με μέγιστο ρυθμό απώλειας μάζας στους $T \approx 285^\circ\text{C}$, όπου γίνεται ο αποπολυμερισμός. Το στάδιο αυτό διαρκεί έως $T = 350^\circ\text{C}$ και το πολυμερικό δίκτυο υποβαθμίζεται σημαντικά. Στην περίπτωση υδρογέλων με μέγιστη ποσότητα χιτοζάνης (12.5% w/v), η ποσότητα που απομένει τελικά είναι μεγαλύτερη από τις υδρογέλες που περιέχουν ελάχιστη περιεκτικότητα (10% w/v), καθιστώντας το προϊόν θερμικά σταθερότερο. Στα τελευταία στάδια ενδέχεται να απομακρύνονται αρχικά προϊόντα της αντίδρασης MR, ενώ η απώλεια μάζας αποδίδεται και σε υπολείμματα χιτοζάνης.

Γενικά, οι θερμοκρασίες αποσύνθεσης προκύπτουν ελαφρώς μεγαλύτερες από τις αναμενόμενες από τη βιβλιογραφία, γεγονός που αποδεικνύει ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της γλυκόζης και χιτοζάνης μέσω της αντίδρασης MR, κατά την οποία αυξάνεται η θερμική σταθερότητα των τελικών προϊόντων και επιβεβαιώνεται ότι ενισχύονται οι λειτουργικές τους ιδιότητες [92], [93], [95]. Επιπλέον, το εκχύλισμα τροποποιεί τις τελικές ιδιότητες των υδρογέλων, καθώς εκχύλισμα και διαλύτης αλληλεπιδρούν με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα να εντείνεται η σταθερότητα των προϊόντων θερμικά.

3.3.6 Ρεολογικά

Η μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς και της σχέσης μεταξύ της χημικής δομής και των ιδιοτήτων των τελικών προϊόντων παρέχει καθοριστικές πληροφορίες για την επιλογή της πιθανής εφαρμογής των υδρογελών. Συγκεκριμένα, εκτελέστηκαν ρεολογικές δοκιμές, όπως η σάρωση χρόνου, παραμόρφωσης και συχνότητας, ώστε να προσδιοριστούν ρεολογικές ιδιότητες των υδρογελών που συμβάλλουν στην αξιολόγησή τους. Στον Πίνακα 18 παρουσιάζεται η σύσταση της υδρογέλης που υποβλήθηκε σε ρεομετρικές μετρήσεις, αφού προηγήθηκε η διαδικασία του swelling. Η διόγκωση της υπό εξέταση υδρογέλης πραγματοποιήθηκε σε όξινες συνθήκες, επομένως αξιολογούνται οι ιδιότητες της ως φορέας φαρμάκου. Τα αποτελέσματα των δοκιμών που εφαρμόστηκαν στο δείγμα παρατίθενται στα παρακάτω διαγράμματα, ενώ όλες οι ρεολογικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε $T=23^{\circ}\text{C}$, η οποία ρυθμίζεται στο ρεόμετρο.

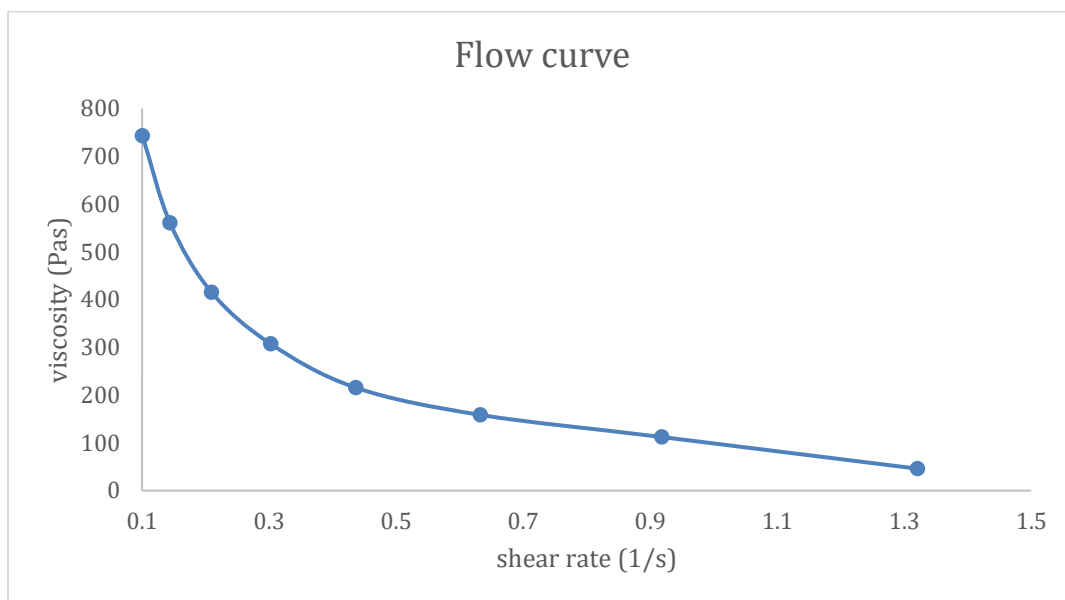
Πίνακας 18: Περιεκτικότητες συστατικών υδρογέλης που υποβλήθηκε σε ρεολογικές μετρήσεις

[OLE - NADES]	[CS (20 - 100 cps)]	[Tween 80]
% v/v	% w/v	% w/v
10	12.5	3



Εικόνα 38: Διογκωμένη υδρογέλη που υποβλήθηκε σε ρεολογικές μετρήσεις με 10% OLE - NADES, 12.5% w/v CS (20-100 cps) και 3% w/v Tween 80

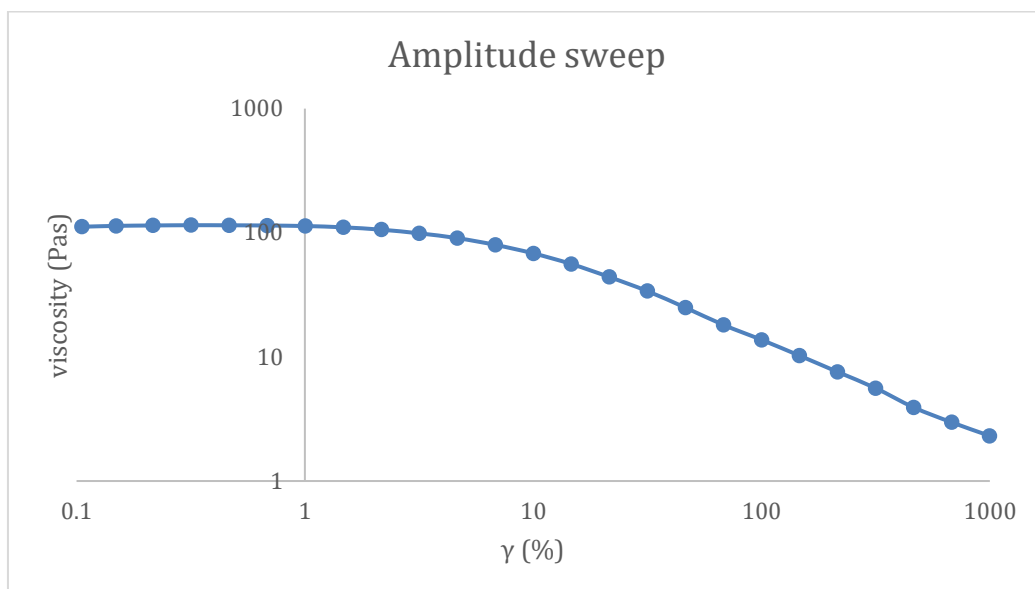
Κατά τη δοκιμή σταθερής διατμητικής τάσης, εξετάστηκε η ικανότητα της υδρογέλης να παραμορφώνεται και να ρέει συνεχώς υπό την επίδραση ρυθμού διάτμησης (ή παραμόρφωσης), ενώ με την μέτρηση και λήψη ρεολογικών χαρακτηριστικών παρασκευάστηκε η καμπύλη ροής, όπου απεικονίζει την ρεολογική συμπεριφορά της υδρογέλης και την εξάρτηση του ιξώδους από την εφαρμογή ιξώδης διατμητικής τάσης στο υλικό.



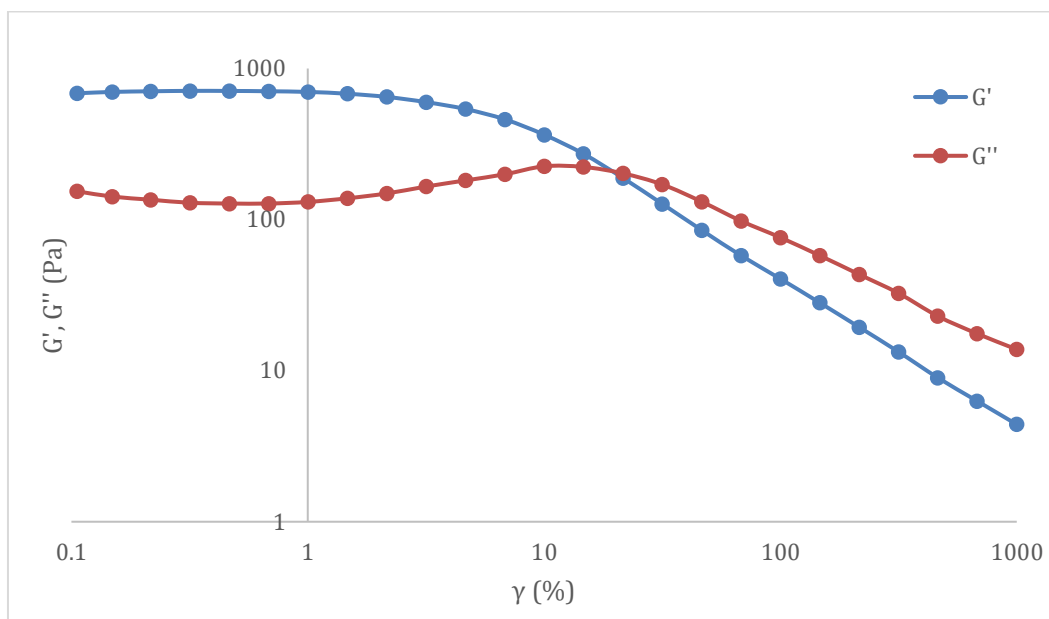
Διάγραμμα 44: Καμπύλη ροής της υδρογέλης

Σημειώνεται ότι οι υδρογέλες ανήκουν στην κατηγορία των μη Νευτωνικών ρευστών, καθώς η εξάρτηση του ιξώδους από τον ρυθμό διατμητικής τάσης δεν είναι γραμμική. Από την καμπύλη ροής παρατηρείται ότι με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης, το ιξώδες της υδρογέλης μειώνεται σταδιακά, επιβεβαιώνοντας τη μη Νευτωνική συμπεριφορά των υδρογελών. Επιπλέον, η διογκωμένη κατάσταση της υδρογέλης περιέχει μικρότερο κενό χώρο, λόγω της απορρόφησης ποσότητας νερού στο πολυμερικό δίκτυο, με αποτέλεσμα η υδρογέλη αρχικά να έχει αυξημένο ιξώδες, το οποίο υποδεικνύει ισχυρό βαθμό διασύνδεσης, ενώ στη συνέχεια υφίσταται σταδιακή πτώση κατά την επιβολή ρυθμού παραμόρφωσης, καθώς χαλαρώνουν οι εμπλοκές της πολυμερικής αλυσίδας [49], [96]–[99]. Η μείωση του ιξώδους του τελικού προϊόντος κατά την αύξηση του ρυθμού διάτμησης αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα στην χορήγηση φαρμάκων, ενώ οι υψηλές δυνατότητες διόγκωσης προσφέρουν βέλτιστα επίπεδα υγρασίας, καθιστώντας τις ιδανικές για εφαρμογές επίδεσης τραυμάτων [49].

Στη συνέχεια, εκτελέστηκε η δοκιμή σάρωσης παραμόρφωσης, όπου προσδιορίζεται η γραμμική ιξωδοελαστική περιοχή των υδρογελών, η οποία εμφανίζεται σε χαμηλές τάσεις, ενώ κατά την αύξηση της τάσης διάτμησης, η υδρογέλη συμπεριφέρεται ως ρευστό, καθώς ο συντελεστής απώλειας γίνεται μεγαλύτερος από τον συντελεστή αποθήκευσης. Κατά την πειραματική διαδικασία, εφαρμόζεται αυξανόμενη ταλαντωτική τάση στην υδρογέλη με σταθερή συχνότητα. Με βάση τις μετρήσεις που λήφθηκαν από τη δοκιμή αυτή, παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 45: Προσδιορισμός γραμμικής ιξωδοελαστικής περιοχής της υδρογέλης κατά την επιβολή δυνάμεων παραμόρφωσης



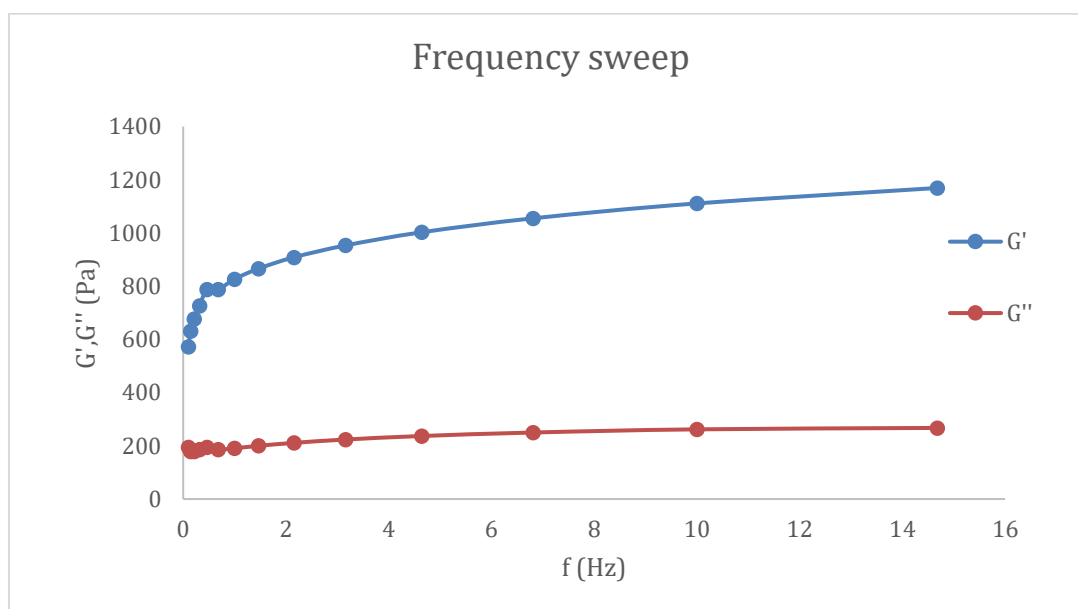
Διάγραμμα 46: Ρεολογική συμπεριφορά υδρογέλης κατά την άσκηση παραμόρφωσης

Σε πολύ μικρές τιμές παραμόρφωσης, η δομή του δείγματος δεν έχει διαταραχθεί, καθώς το ιξώδες διατηρείται σταθερό (γραμμική ιξωδοελαστική περιοχή – Linear viscoelastic region), ενώ κατά την αύξηση της δύναμης παραμόρφωσης, το ιξώδες της υδρογέλης μειώνεται. Γενικότερα, αυξάνοντας τον βαθμό διασύνδεσης αυξάνεται η περιοχή γραμμικότητας, ενώ οι υδρογέλες χαρακτηρίζονται από υψηλότερα ιξώδη.

Σχετικά με την συμπεριφορά του προϊόντος, αρχικά οι συντελεστές είναι σταθεροί στην γραμμική ιξωδοελαστική περιοχή, ενώ η υδρογέλη συμπεριφέρεται ως στερεό ($G' > G''$) σε χαμηλές τάσεις, η οποία μεταβάλλεται κατά την επιβολή αυξανόμενης ταλαντωτικής τάσης στο δείγμα και τελικά η υδρογέλη αποκτά ιδιότητες ρευστού ($G'' > G'$) για την προκαθορισμένη συχνότητα και θερμοκρασία. Το σημείο τομής των δύο συντελεστών αποτελεί το σημείο ζελατινοποίησης της υδρογέλης. Κατά τη δοκιμή, αξιολογείται η σταθερότητα του υλικού και η ρεολογική του συμπεριφορά υπό δυνάμεις παραμόρφωσης, καθώς αξιολογείται το πλέγμα και οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης που συγκροτούν τη

δομή του, εφόσον μεγαλύτερες τιμές της κρίσιμης παραμόρφωσης, όπου τερματίζεται η ιξωδοελαστική περιοχή, τα μόρια αποπροσανατολίζονται, παρατηρούνται αλλαγές στη διάταξη και η υδρογέλη αποδομείται [49], [99]–[101].

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν ρεολογικές μετρήσεις που καθορίζουν τη σχέση μεταξύ της συχνότητας δοκιμής και των συντελεστών ελαστικότητας (G') και ιξώδους (G'') ενός υλικού, ενώ παρέχονται πληροφορίες για τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες, την κατάσταση, τη σταθερότητα και τη δομή του πολυμερικού δικτύου συγκρίνοντας τις δύο τιμές G' και G'' στο εύρος συχνοτήτων. Σημειώνεται ότι οι συντελεστές υποδεικνύουν την κατάσταση του υλικού και οι συσχετίσεις τους περιγράφουν τη συμπεριφορά του. Ειδικότερα, ο συντελεστής ελαστικότητας (G') καθορίζει την απόκριση, όπου η υδρογέλη συμπεριφέρεται ως στερεό και αντίστοιχα ο συντελεστής ιξώδους (G'') την περιοχή, όπου η υδρογέλη αποκτά συμπεριφορά υγρού, ενώ συγκρίνονται μεταξύ τους.



Διάγραμμα 47: Ρεολογική συμπεριφορά υδρογέλης σε εύρος συχνοτήτων

Από τις μετρήσεις των συντελεστών αποδεικνύεται ότι το πολυμερικό δίκτυο της υδρογέλης είναι πολύ ισχυρό και άκαμπτο, καθώς ο συντελεστής αποθήκευσης είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από τον συντελεστή απώλειας, ενώ με την αύξηση της συχνότητας αυξάνονται και οι δύο δείκτες. Επιπλέον, η απουσία της συχνότητας διασταύρωσης των δύο μεγεθών (σημείο τομής) υποδηλώνει μόνιμη χημική διασύνδεση του πλέγματος της εξεταζόμενης υδρογέλης, επιβεβαιώνοντας την πραγμάτωση της αντίδρασης MR στο δείγμα [49], [98], [102].

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη παρασκευάστηκαν υδρογέλες χιτοζάνης με ενσωματωμένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς και NADES, των οποίων μελετήθηκαν οι φυσικοχημικές και μηχανικές ιδιότητες, ενώ αξιολογήθηκε η βιοδραστικότητα τους. Ειδικότερα, επιλέχθηκε στοχευμένα ο πράσινος διαλύτης Γλυκόζη / Γαλακτικό οξύ / Νερό σε γραμμομοριακή αναλογία 1:5:6.2, ο οποίος δρα αποτελεσματικά ως εκχυλιστικό μέσο φύλλων ελιάς Καλαμών και παράλληλα τα συστατικά του αλληλεπιδρούν με την χιτοζάνη, μέσω της αντίδρασης Maillard, σχηματίζοντας υδρογέλες, οι οποίες διασυνδέονται φυσικά, αλλά και χημικά.

Πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της ικανότητας διόγκωσης και συγκράτησης νερού των σχηματιζόμενων υδρογελών, από την οποία συμπεραίνεται ότι σε όλες τις διαφορετικές περιεκτικότητες NADES - εκχυλίσματος, οι υδρογέλες με την ελάχιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης με εύρος ιξώδους 5-20 cps (10% w/v CS) δεν διογκώνονται κατά τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, ενώ αδυνατούν να συγκρατήσουν ποσότητα νερού και συρρικνώνονται, καθώς ο βαθμός διασύνδεσης τους και οι δυνάμεις που συγκροτούν το πολυμερικό πλέγμα κρίνονται πολύ ασθενείς. Αντίστοιχα, η μέγιστη ποσότητα χιτοζάνης, 15% w/v CS(5-20cps), σε συνδυασμό με την μέγιστη ποσότητα εκχυλίσματος στο πλέγμα, 20% v/v OLE-NADES, δεν φέρουν τα επιθυμητά αποτελέσματα, καθώς κατά την πειραματική διαδικασία, η υδρογέλη δεν απορροφά ρυθμιστικό διάλυμα, αποδιογκώνεται και αποδομείται, καθώς αποκτά έντονα μαύρο χρώμα, το οποίο οφείλεται στην παραγωγή μελανοϊδινών από την αντίδραση MR, οι οποίες καθιστούν το υλικό πολύ εύθρυπτο. Αντίθετα, η υδρογέλη που αποτελείται από τη μέγιστη ποσότητα χιτοζάνης, σε συνδυασμό με την ελάχιστη περιεκτικότητα εκχυλίσματος (15% w/v CS(5-20cps) & 10% v/v OLE-NADES), διογκώνεται συνεχώς στις συνθήκες που επικρατούν στην επιφάνεια του δέρματος και κρίνεται πολύ ανθεκτική. Συμπερασματικά, οι υδρογέλες που δεν αποτελούν ακραίες περιπτώσεις, δηλαδή αυτές που αποτελούνται από ενδιάμεση ποσότητα χιτοζάνης (12.5 w/v CS (5-20cps)) έχουν ικανοποιητική ικανότητα διόγκωσης και συγκράτησης νερού στο πολυμερικό δίκτυο, ενώ οι συνθήκες δέρματος (pH = 5.5 και T = 32°C) σε συνδυασμό με τις ποσότητες των αντιδρώντων, ενισχύουν και βελτιώνουν τις τελικές ιδιότητες των προϊόντων, καθώς και τον βαθμό χημικής διασύνδεσης τους, μέσω της συμβολής της αντίδρασης Maillard. Σημειώνεται ότι ο ρυθμός και τα παραγόμενα προϊόντα της αντίδρασης MR καθορίζονται από τις πειραματικές συνθήκες που επικρατούν (ποσότητες αντιδρώντων, pH, T), καθώς αυξημένες θερμοκρασίες επιταχύνουν τον μηχανισμό προς την παραγωγή μελανοϊδινών (έντονα μαύρο χρώμα προϊόντων), ενώ όξινες τιμές pH αποτρέπουν τον σχηματισμό ανεπιθύμητων και επιβλαβών ουσιών. Επομένως, οι ιδιότητες των τελικών προϊόντων καθορίζονται κυρίως από τις συνθήκες διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας και τις περιεκτικότητες των συστατικών της υδρογέλης.

Επιπλέον, μελετώνται οι υδρογέλες που σχηματίζονται με χιτοζάνη εύρους ιξώδους 20-100 cps, οι οποίες φέρουν βελτιωμένες ιδιότητες, καθώς ο βαθμός διασύνδεσης του πλέγματος κρίνεται πιο ισχυρός. Όσον αφορά την ικανότητα διόγκωσης τους, οι υδρογέλες με ενσωματωμένο εκχύλισμα απορροφούν και συγκρατούν νερό σε συνθήκες pH = 1.2 & 7.4 και T = 32 & 37 °C, ενώ στις συνθήκες δέρματος δεν κατορθώνονται υψηλά ποσοστά διόγκωσης και συγκράτησης της μέγιστης ποσότητας νερού που προσλαμβάνουν. Ειδικότερα, υδρογέλες με ελάχιστη περιεκτικότητα χιτοζάνης 20-100 cps (10% w/v CS) αποτέλεσαν στερεά και ισχυρά πηκτώματα με βελτιωμένες ικανότητες διόγκωσης και συγκράτησης νερού, σε σχέση με τις υδρογέλες που σχηματίστηκαν με CS 5-20 cps, ενώ οι υδρογέλες την τελευταία CS περιεκτικότητας (12.5% w/v CS(5-20 cps)) κρίθηκαν πιο ισχυρές ως προς τον βαθμό διασύνδεσης τους σε συνδυασμό με 10% v/v OLE-NADES.

Αντίστοιχα, οι υδρογέλες με παράγοντα διασταύρωσης τον διαλύτη, θεωρούνται πολύ σταθερές, καθώς η συμπεριφορά τους σε όλες τις πειραματικές συνθήκες και σε όλους τους συνδυασμούς περιεκτικότητας χιτοζάνης είναι ίδια, ενώ σε συνθήκες που προσομοιάζουν το στομάχι φτάνουν σε πολύ υψηλά ποσοστά διόγκωσης κατά τα πρώτα πειραματικά λεπτά.

Κατά την μελέτη, οι υδρογέλες χαρακτηρίστηκαν δομικά μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), η οποία υπέδειξε την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ του παράγοντα

διασταύρωσης (NADES) και της χιτοζάνης, μέσω της αντίδρασης MR, καθώς χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης της CS (5-20 / 20-100 cps) μετατοπίζονται κατά τον μηχανισμό, υποδηλώνοντας ότι η γλυκόζη του διαλύτη έχει προσκολληθεί στη χιτοζάνη μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Ειδικότερα, η ζώνη απορρόφησης της χιτοζάνης που αντιστοιχεί σε δονήσεις τάσης πρωτοταγών αμιδίων (C = O) μετατοπίζεται από τα 1649 cm^{-1} (CS (20-100 cps)) / 1667 cm^{-1} (CS (20-100 cps)) στα 1570 cm^{-1} στις υδρογέλες, κορυφή που αντιστοιχεί σε προϊόντα βάσης Schiff, τα οποία παράγονται κατά τα πρώιμα στάδια της αντίδρασης Maillard. Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι οι υδρογέλες διασυνδέονται χημικά και οι ομοιοπολικοί δεσμοί συγκρότησης καθιστούν το πλέγμα σταθερότερο και ισχυρότερο.

Ακόμη, έγινε αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υδρογελών μέσω της ικανότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσίας - AAPH και αποδεικνύεται ότι μεγαλύτερες περιεκτικότητες εκχυλίσματος και χιτοζάνης ενισχύουν την αντιοξειδωτικότητα των τελικών προϊόντων, τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη αντιοξειδωτική δράση όσο λαμβάνει χώρα η αντίδραση MR και παράγονται αντιοξειδωτικά προϊόντα. Επιπλέον, οι υδρογέλες που παρασκευάστηκαν με χιτοζάνη εύρους ιξώδους 20-100 cps, παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσίας, συγκριτικά με τις υδρογέλες CS(5-20cps). Από τις υδρογέλες που παρασκευάστηκαν με την τελευταία χιτοζάνη, αυτή που παρουσίασε ενισχυμένη αντιοξειδωτικότητα αποτελείται από 20% v/v OLE-NADES & 15% CS(5-20cps) & 3% w/v Tween 80, ενώ από τις υδρογέλες με την χιτοζάνη αυξημένου ιξώδους, αποδεικνύεται πιο αντιοξειδωτική η υδρογέλη με 10% v/v OLE-NADES & 10% w/v CS(20-100cps) & 3% w/v Tween 80. Τα ποσοστά αναστολής για τις δύο περιπτώσεις βρέθηκαν $65.25 \pm 8.60\%$ και $72.61 \pm 5.64\%$ αντίστοιχα, ενώ εκφράστηκαν σε ισοδύναμα συγκέντρωσης πρότυπου Trolox. Συγκεκριμένα, διασπορά 62.4 mg υδρογέλης CS(5-20 cps), διαλυμένη σε 10 ml διαλύματος γαλακτικού οξέος 10% v/v αντιστοιχεί σε $16.50 \pm 2.39\text{ }\mu\text{g/ml}$ Trolox, ενώ διασπορά 46.9 mg υδρογέλης CS(20-100cps) αντιστοιχεί σε $19.14 \pm 1.58\text{ }\mu\text{g/ml}$. Η υδρογέλη με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση υποβλήθηκε σε μέτρηση αντιοξειδωτικότητας μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, ωστόσο λόγω διαφορετικού μηχανισμού της μεθόδου δεν επέδειξε τόσο αυξημένη δράση, καθώς τα προϊόντα της αντίδρασης MR αναστέλλουν κυρίως την λιπιδική υπεροξειδωσία. Επιπλέον, η διαφορά στα αποτελέσματα οφείλεται σε διαφορετικό στάδιο της αντίδρασης MR και επομένως διαφορετικά προϊόντα στο πολυμερικό πλέγμα.

Ακολούθησε η μελέτη θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA) των υδρογελών, με σκοπό την διερεύνηση της θερμικής σταθερότητας των προϊόντων κατά την αύξηση της θερμοκρασίας, η οποία υπέδειξε τέσσερα στάδια απώλειας μάζας για τις υδρογέλες που έχουν ενσωματωμένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς στα γραφήματα, ενώ στις υδρογέλες με NADES ως τρίτο συστατικό παρατηρήθηκαν τρία στάδια. Η πρώτη και η δεύτερη απώλεια μάζας οφείλεται στην απομάκρυνση μορίων νερού (ελεύθερου και δεσμευμένου) και εμφανίζεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ενώ η τρίτη και η τέταρτη αποδίδεται στην αποικοδόμηση της πολυμερικής μήτρας. Ειδικότερα, ο αποπολυμερισμός της χιτοζάνης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία αποσύνθεσης $T = 285^\circ\text{C}$, όπου ο ρυθμός απώλειας γίνεται μέγιστος και το πολυμερικό πλέγμα υποβαθμίζεται σημαντικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης, οι σχηματιζόμενες υδρογέλες με χιτοζάνη 20-100 cps παρουσίασαν υψηλή θερμική σταθερότητα, καθώς η αντίδραση MR ενισχύει τις θερμικές ιδιότητες των προϊόντων, ενώ εκχύλισμα και διαλύτης αλληλεπιδρούν με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα να εντείνεται η σταθερότητα των προϊόντων σε αυξημένες θερμοκρασίες.

Τέλος, οι υδρογέλες υποβλήθηκαν σε ρεολογικές δοκιμές, ώστε να προσδιοριστούν τα ρεολογικά τους χαρακτηριστικά και σημαντικοί ρεολογικοί συντελεστές, οι οποίοι καθορίζουν την τελική χρήση των προϊόντων. Ειδικότερα, εξετάστηκε η ρεολογική συμπεριφορά της υδρογέλης με 10% v/v OLE-NADES & 12.5% w/v CS(20-100cps) & 3% w/v Tween 80 και μελετήθηκε η εξάρτηση του ιξώδους της από την εφαρμογή διατμητικής τάσης στο υλικό, αξιολογήθηκε η σταθερότητα και η συμπεριφορά του υπό δυνάμεις παραμόρφωσης, ενώ κατά τις ρεολογικές δοκιμές, προσδιορίστηκε η κατάσταση του προϊόντος, μέσω συσχετίσεων των συντελεστών ελαστικότητας (G') και ιξώδους (G''). Από τις μετρήσεις αποδείχθηκε ότι το πολυμερικό δίκτυο της εξεταζόμενης υδρογέλης είναι πολύ ισχυρό και άκαμπτο,

καθώς ο συντελεστής αποθήκευσης είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από τον συντελεστή απώλειας, ενώ η απουσία της συχνότητας διασταύρωσης των δύο μεγεθών υποδηλώνει μόνιμη χημική διασύνδεση του πλέγματος, επιβεβαιώνοντας την πραγμάτωση της αντίδρασης MR.

Κεφάλαιο 5: Μελλοντικές Προτάσεις


Η παρασκευή υδρογελών χιτοζάνης με παράγοντα διασταύρωσης τον διαλύτη Γλυκόζη / Γαλακτικό οξύ / Νερό, όπως συμπεραίνεται από το σύνολο της παρούσας εργασίας, αποτελεί μία μελέτη με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς η αντίδραση MR αποτελεί πολύπλοκο μηχανισμό αντιδράσεων, ενώ ο διαλύτης λειτουργεί ταυτόχρονα ως εκχυλιστικό και αποθηκευτικό μέσο βιοενεργών ενώσεων, ως αντιδρών, παράγοντας διαλυτοποίησης της χιτοζάνης, αλλά διασταύρωσης των υδρογελών.

Επομένως, κρίνεται αναγκαίο να διερευνηθούν εκτενέστερα οι ιδιότητες των χημικά διασταυρωμένων υδρογελών και προτείνονται οι εξής μελλοντικοί στόχοι:

- Αξιολόγηση των θερμικών ιδιοτήτων των υδρογελών μέσω της θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης – DSC κατά την επιβολή θέρμανσης στις υδρογέλες
- Μελέτη κυτταροτοξικότητας των τελικών προϊόντων, καθώς κατά τον μηχανισμό της αντίδρασης Maillard παράγονται τοξικά και επιβλαβή προϊόντα
- Ρεολογικές δοκιμές για τον προσδιορισμό δομικών αλλαγών της υδρογέλης, όπως εξάτμιση του διαλύτη, ζελατινοποίηση, αποικοδόμηση του πολυμερούς
- Ρεολογικές δοκιμές για την παρακολούθηση της θερμικής σταθερότητας των υδρογελών σε συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών
- Δομικός χαρακτηρισμός $^1\text{H-NMR}$ για την ταυτοποίηση ενώσεων που παράγονται κατά την αντίδραση MR

Συμμετοχή σε Συνέδρια

Σ1. I. Pitterou, S. Chinni, V. A. Georgiou, A. Tzani, A. Detsi, Valorization of olive leaves extract in Natural Deep Eutectic Solvents for the development of bioactive chitosan films and hydrogels, 10th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, June 21-24, 2023.




Valorization of olive leaves extract in Natural Deep Eutectic Solvents for the development of bioactive chitosan films and hydrogels

I. Pitterou¹, S. Chinni¹, V. A. Georgiou¹, A. Tzani¹, A. Detsi¹ *

¹Laboratory of Organic Chemistry, School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, Zografou Campus, 15780, Athens, Greece

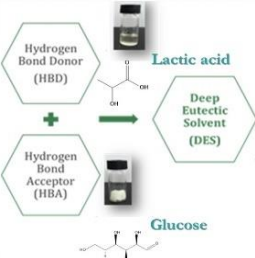
* E-mail: adetsi@chemeng.ntua.gr




Introduction

Chitosan is a copolymer of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine, a partially deacetylated derivative of chitin from the exoskeletons of crustacean shellfish, such as shrimps and crabs. It is non-toxic, biodegradable, and biocompatible with the human digestive system. **Maillard reaction** is usually known as a spontaneous and non-enzymatic browning reaction between the amino acid (amine groups) and reducing sugars (carbonyl groups). **Deep Eutectic Solvents (DES)** are mixtures of two or more components, a hydrogen bond acceptor and a hydrogen bond donor, with a low-temperature eutectic point. When the components of the DES are naturally occurring compounds, the solvents are characterized as **Natural Deep Eutectic Solvents (NADES)**. In the present work, a greener approach towards the formation of **novel films and hydrogels** based on chitosan and Maillard reaction products using **Glucose/Lactic Acid/Water NADES-olive leaf extract**. In an effort to investigate the ability of olive leaf extract (OLE), obtained using NADES as the extraction and storage medium, to act as dissolution and gelating agent.

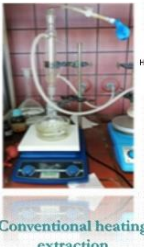
Material & Methods



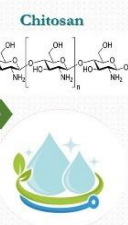
Hydrogen Bond Donor (HBD)
Hydrogen Bond Acceptor (HBA)
Lactic acid
Glucose




Olive leaf (OLE) biowaste



Conventional heating extraction



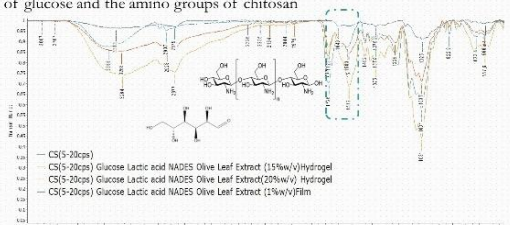
Chitosan



Results & Discussion

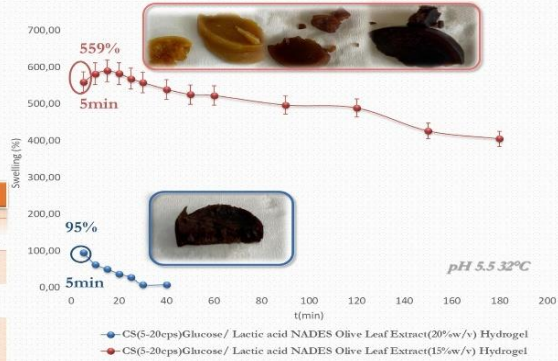
Structural characterization

- Characteristic absorption bands of chitosan observed at around 1649 and 1584 cm⁻¹ were assigned to amide I and primary amino groups, respectively
- After the reaction, it can be observed that these absorption bands of chitosan showed changes
- The absorption peak at 1649 cm⁻¹ decreased and shifted to 1572 cm⁻¹ suggesting that **Schiff base (C=N double bond)** was formed between the reducing termination of glucose and the amino groups of chitosan



Swelling studies of chitosan hydrogels

- Swelling ratio of the chitosan-based Hydrogels-NADES-OLE in aqueous solution increased rapidly in the first 5 min reaching 559%
- The water retention ratio remained over 70%, after keeping the swollen sample in phosphate buffer solution at pH=5.5 for 3 hours



In Vitro Evaluation of Antioxidant Activity

Sample	Inhibition of Linoleic Acid Peroxidation (%)	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity/AAPH Assay (µg/mL)
CS(5-20cps) Glucose Lactic acid NADES Olive Leaf Extract (15%w/v) Hydrogel	55.47±4.90	15.46
CS(5-20cps) Glucose Lactic acid NADES Olive Leaf Extract (20%w/v) Hydrogel	53.08±7.10	14.80
CS(5-20cps) Glucose Lactic acid NADES Olive Leaf Extract (1%w/v) Film	59.78±5.10	16.67


Note: % lipid peroxidation inhibition: 89.73 ± 0.90 (concentration of Trolox solution 25.02 µg/mL)

Conclusions

- Olive leaf (OLE) biowaste was extracted using the Glucose/Lactic Acid/Water NADES
- The NADES and the NADES-OLE acted as efficient cross-linking agents and plasticizers for the production of the chitosan films and hydrogels
- FT-IR confirmed the introduction of the glucose into the chitosan molecule
- Chitosan-Maillard reaction products improve antioxidant activity of chitosan
- The obtained films and hydrogels have different biological and mechanical properties to later be used in different applications, especially in those concerning the food industry.


Acknowledgements

I.P. gratefully acknowledges State Scholarships Foundation (IKY). This research is co-financed by Greece and the European Union (ESF) through the Operational Programme (Human Resources Development, Education and Lifelong Learning) in the context of the project "Strengthening Human Resources Research Potential via Doctorate Research" (MIS-5113934), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY).



Operational Programme
Human Resources Development,
Education and Lifelong Learning

Co-financed by Greece and the European Union



Σ2. I. Pitterou, D. A. Nanou, S. Chinni, A. Tzani, A. Detsi, “A green approach for the development of chitosan hydrogels using olive leaf extract as dissolution and gelating agent”, 2nd Greenering International Conference, March 21-23, 2023, Valladolid, Spain.

Βιβλιογραφία

- [1] P. T. Anastas and J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, 2000.
- [2] Us Epa, 'Basics of green chemistry', May 09, 2023. <https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry> (accessed Jul. 19, 2023).
- [3] P. Anastas and N. Eghbali, 'Green Chemistry: Principles and Practice', *Chem Soc Rev*, vol. 39, no. 1, pp. 301–312, Dec. 2010, doi: 10.1039/b918763b.
- [4] G. T. Whiteker, 'Applications of the 12 Principles of Green Chemistry in the Crop Protection Industry', *Organic Process Research and Development*, vol. 23, no. 10. American Chemical Society, pp. 2109–2121, Oct. 18, 2019. doi: 10.1021/acs.oprd.9b00305.
- [5] V. Duvauchelle, P. Meffre, and Z. Benfodda, 'Green methodologies for the synthesis of 2-aminothiophene', *Environmental Chemistry Letters*, vol. 21, no. 1. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 597–621, Feb. 01, 2023. doi: 10.1007/s10311-022-01482-1.
- [6] A. Tzani, M. A. Karadendrou, S. Kalafateli, V. Kakokefalou, and A. Detsi, 'Current Trends in Green Solvents: Biocompatible Ionic Liquids', *Crystals*, vol. 12, no. 12. MDPI, Dec. 01, 2022. doi: 10.3390/cryst12121776.
- [7] A. R. F. Carreira *et al.*, 'Synthesis of purine-based ionic liquids and their applications', *Molecules*, vol. 26, no. 22, Nov. 2021, doi: 10.3390/molecules26226958.
- [8] S. P. Neofotistos, A. Tzani, and A. Detsi, 'Ionic Liquids: Advances and Applications in Phase Transfer Catalysis', *Catalysts*, vol. 13, no. 3. MDPI, Mar. 01, 2023. doi: 10.3390/catal13030474.
- [9] A. Tzani *et al.*, 'Synthesis of novel non-toxic naphthenic and benzoic acid ionic liquids. Structure-properties relationship and evaluation of their biodegradability potential', *J Mol Liq*, vol. 296, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2019.111927.
- [10] PNGkey.com, 'The Application Of Ionic Liquids - Graphic Design'. https://www.pngkey.com/detail/u2y3q8q8q8a9w7i1_the-application-of-ionic-liquids-graphic-design/ (accessed Jul. 19, 2023).
- [11] D. Yu, Z. Xue, and T. Mu, 'Deep eutectic solvents as a green toolbox for synthesis', *Cell Reports Physical Science*, vol. 3, no. 4. Cell Press, Apr. 20, 2022. doi: 10.1016/j.xcrp.2022.100809.
- [12] E. L. Smith, A. P. Abbott, and K. S. Ryder, 'Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications', *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 21. American Chemical Society, pp. 11060–11082, Nov. 12, 2014. doi: 10.1021/cr300162p.
- [13] Y. Liu, Y. Wu, J. Liu, W. Wang, Q. Yang, and G. Yang, 'Deep eutectic solvents: Recent advances in fabrication approaches and pharmaceutical applications', *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 622. Elsevier B.V., Jun. 25, 2022. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121811.
- [14] D. Cerdá-Bernad, I. Pitterou, A. Tzani, A. Detsi, and M. J. Frutos, "Novel chitosan/alginate hydrogels as carriers of phenolic-enriched extracts from saffron floral by-products using natural deep eutectic solvents as green extraction media", *Curr Res Food Sci*, vol. 6, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.crfs.2023.100469.
- [15] D. Skarpalezos and A. Detsi, 'Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources', *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 9, no. 19. MDPI AG, Oct. 01, 2019. doi: 10.3390/app9194169.
- [16] A. Tzani *et al.*, 'Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)', *Sustainable Chemistry*, vol. 2, no. 4, pp. 576–599, Oct. 2021, doi: 10.3390/suschem2040032.

- [17] R. Svigelj, N. Dossi, C. Grazioli, and R. Toniolo, 'Deep eutectic solvents (Dess) and their application in biosensor development', *Sensors*, vol. 21, no. 13. MDPI AG, Jul. 01, 2021. doi: 10.3390/s21134263.
- [18] Y. Liu, J. B. Friesen, J. B. McAlpine, D. C. Lankin, S. N. Chen, and G. F. Pauli, 'Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives', *Journal of Natural Products*, vol. 81, no. 3. American Chemical Society, pp. 679–690, Mar. 23, 2018. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00945.
- [19] M. Panić, M. Cvjetko Bubalo, and I. Radojčić Redovniković, 'Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 96, no. 1. John Wiley and Sons Ltd, pp. 14–30, Jan. 01, 2021. doi: 10.1002/jctb.6545.
- [20] M. Pätzold, S. Siebenhaller, S. Kara, A. Liese, C. Syldatk, and D. Holtmann, 'Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis', *Trends in Biotechnology*, vol. 37, no. 9. Elsevier Ltd, pp. 943–959, Sep. 01, 2019. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.03.007.
- [21] S. N. Chanquia, L. Huang, G. G. Liñares, P. D. de María, and S. Kara, 'Deep eutectic solvents as smart cosubstrate in alcohol dehydrogenase-catalyzed reductions', *Catalysts*, vol. 10, no. 9, pp. 1–8, Sep. 2020, doi: 10.3390/catal10091013.
- [22] A. I. Dudu, L. C. Bencze, C. Paizs, and M. I. Toşa, 'Deep eutectic solvents-a new additive in the encapsulation of lipase B from: *Candida antarctica*: Biocatalytic applications', *React Chem Eng*, vol. 7, no. 2, pp. 442–449, Feb. 2022, doi: 10.1039/d1re00469g.
- [23] M. A. Smirnov *et al.*, 'Ionic conductivity and structure of chitosan films modified with lactic acid-choline chloride NADES', *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.3390/polym12020350.
- [24] Naturex, 'Naturex launches the first-ever NaDES-Based botanical collection and expands the science of Deep Eutectic Solvents', Dec. 17, 2015. <https://www.naturex.com/Media2/Press-releases/Naturex-launches-the-first-ever-NaDES-based-botanical-collection-and-expands-the-science-of-deep-eutectic-solvents> (accessed Jul. 19, 2023).
- [25] Y. Dai, Y. H. Choi, and R. Verpoorte, 'Honey in traditional Chinese medicine: A guide to future applications of NADES to medicines', in *Advances in Botanical Research*, Academic Press Inc., 2021, pp. 361–384. doi: 10.1016/bs.abr.2020.09.011.
- [26] Y. Y. Lee, D. Penley, A. Klemm, W. Dean, and B. Gurkan, 'Deep Eutectic Solvent Formed by Imidazolium Cyanopyrrolide and Ethylene Glycol for Reactive CO₂ Separations', *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 9, no. 3, pp. 1090–1098, Jan. 2021, doi: 10.1021/acssuschemeng.0c07217.
- [27] J. M. Silva *et al.*, 'Therapeutic Role of Deep Eutectic Solvents Based on Menthol and Saturated Fatty Acids on Wound Healing', *ACS Appl Bio Mater*, vol. 2, no. 10, pp. 4346–4355, Oct. 2019, doi: 10.1021/acsabm.9b00598.
- [28] G. M. Martínez, G. G. Townley, and R. M. Martínez-Espinosa, 'Controversy on the toxic nature of deep eutectic solvents and their potential contribution to environmental pollution', *Heliyon*, vol. 8, no. 12. Elsevier Ltd, Dec. 01, 2022. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12567.
- [29] M. Hayyan *et al.*, 'Natural deep eutectic solvents: cytotoxic profile', *Springerplus*, vol. 5, no. 1, Dec. 2016, doi: 10.1186/s40064-016-2575-9.
- [30] P. Siamandoura and C. Tzia, 'Comparative Study of Novel Methods for Olive Leaf Phenolic Compound Extraction Using NADES as Solvents', *Molecules*, vol. 28, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.3390/molecules28010353.
- [31] A. Palos-Hernández, M. Y. Gutiérrez Fernández, J. Escuadra Burrieza, J. L. Pérez-Iglesias, and A. M. González-Paramás, 'Obtaining green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic solvents. Opportunities and challenges', *Sustain Chem Pharm*, vol. 29, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.scp.2022.100773.
- [32] A. E. Ünlü, 'Green and Non-conventional Extraction of Bioactive Compounds from Olive Leaves: Screening of Novel Natural Deep Eutectic Solvents and Investigation of Process

- Parameters', *Waste Biomass Valorization*, vol. 12, no. 10, pp. 5329–5346, Oct. 2021, doi: 10.1007/s12649-021-01411-3.
- [33] V. Athanasiadis, S. Grigorakis, S. Lalas, and D. P. Makris, 'Highly Efficient Extraction of Antioxidant Polyphenols from *Olea europaea* Leaves Using an Eco-friendly Glycerol/Glycine Deep Eutectic Solvent', *Waste Biomass Valorization*, vol. 9, no. 11, pp. 1985–1992, Nov. 2018, doi: 10.1007/s12649-017-9997-7.
- [34] D. Borjan, M. Leitgeb, Ž. Knez, and M. K. Hrnčič, 'Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract', *Molecules*, vol. 25, no. 24. MDPI, Dec. 01, 2020. doi: 10.3390/MOLECULES25245946.
- [35] I. Mourtzinou, E. Anastasopoulou, A. Petrou, S. Grigorakis, D. Makris, and C. G. Biliaderis, 'Optimization of a green extraction method for the recovery of polyphenols from olive leaf using cyclodextrins and glycerin as co-solvents', *J Food Sci Technol*, vol. 53, no. 11, pp. 3939–3947, Nov. 2016, doi: 10.1007/s13197-016-2381-y.
- [36] M. Martinović, N. Krgović, I. Nešić, A. Žugić, and V. M. Tadić, 'Conventional vs. Green Extraction Using Natural Deep Eutectic Solvents—Differences in the Composition of Soluble Unbound Phenolic Compounds and Antioxidant Activity', *Antioxidants*, vol. 11, no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/antiox11112295.
- [37] A. Ali Redha, 'Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents', *J Agric Food Chem*, vol. 69, no. 3, pp. 878–912, Jan. 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.0c06641.
- [38] A. Maimulyanti, I. Nurhidayati, B. Mellisani, F. Amelia Rachmawati Putri, F. Puspita, and A. Restu Prihadi, 'Development of natural deep eutectic solvent (NADES) based on choline chloride as a green solvent to extract phenolic compound from coffee husk waste', *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 16, no. 4, p. 104634, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104634>.
- [39] N. P. E. Hikmawanti, D. Ramadon, I. Jantan, and A. Mun'im, 'Natural deep eutectic solvents (Nades): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development', *Plants*, vol. 10, no. 10. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/plants10102091.
- [40] Q. Cui *et al.*, 'Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves', *J Clean Prod*, vol. 184, pp. 826–835, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.295>.
- [41] B. Socas-Rodríguez, M. V. Torres-Cornejo, G. Álvarez-Rivera, and J. A. Mendiola, 'Deep eutectic solvents for the extraction of bioactive compounds from natural sources and agricultural by-products', *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 11, no. 11. MDPI AG, Jun. 01, 2021. doi: 10.3390/app11114897.
- [42] A. Tzani *et al.*, 'Green Extraction of Greek Propolis Using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and Incorporation of the NADES-Extracts in Cosmetic Formulation', *Sustainable Chemistry*, vol. 4, no. 1, pp. 8–25, Dec. 2022, doi: 10.3390/suschem4010002.
- [43] L. Benvenuti, A. A. F. Zielinski, and S. R. S. Ferreira, 'Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES?', *Trends in Food Science and Technology*, vol. 90. Elsevier Ltd, pp. 133–146, Aug. 01, 2019. doi: 10.1016/j.tifs.2019.06.003.
- [44] I. Ćorković, A. Pichler, J. Šimunović, and M. Kopjar, 'Hydrogels: Characteristics and application as delivery systems of Phenolic and aroma compounds', *Foods*, vol. 10, no. 6. MDPI AG, Jun. 01, 2021. doi: 10.3390/foods10061252.
- [45] E. M. Ahmed, 'Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review', *J Adv Res*, vol. 6, no. 2, pp. 105–121, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [46] M. Mahinroosta, Z. Jomeh Farsangi, A. Allahverdi, and Z. Shakoobi, 'Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications', *Materials Today Chemistry*, vol. 8. Elsevier Ltd, pp. 42–55, Jun. 01, 2018. doi: 10.1016/j.mtchem.2018.02.004.

- [47] S. M. Samani, F. Ahmadi, Z. Oveisi, and Z. Amoozgar, 'Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications', 2015.
- [48] Y. Sun, D. Li, Y. Yu, and Y. Zheng, 'Insights into the Role of Natural Polysaccharide-Based Hydrogel Wound Dressings in Biomedical Applications', *Gels*, vol. 8, no. 10. MDPI, Oct. 01, 2022. doi: 10.3390/gels8100646.
- [49] G. Stojkov, Z. Niyazov, F. Picchioni, and R. K. Bose, 'Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications', *Gels*, vol. 7, no. 4. MDPI, Dec. 01, 2021. doi: 10.3390/gels7040255.
- [50] P. Bhattacharjee and M. Ahearne, 'Significance of crosslinking approaches in the development of next generation hydrogels for corneal tissue engineering', *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 3. MDPI, pp. 1–24, 2021. doi: 10.3390/pharmaceutics13030319.
- [51] H. Zhang, F. Zhang, and R. Yuan, 'Applications of natural polymer-based hydrogels in the food industry', in *Hydrogels Based on Natural Polymers*, Elsevier, 2019, pp. 357–410. doi: 10.1016/B978-0-12-816421-1.00015-X.
- [52] A. Detsi *et al.*, 'Nanosystems for the encapsulation of natural products: The case of chitosan biopolymer as a matrix', *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 7. MDPI AG, pp. 1–68, Jul. 01, 2020. doi: 10.3390/pharmaceutics12070669.
- [53] B. E. Teixeira-Costa and C. T. Andrade, 'Chitosan as a valuable biomolecule from seafood industry waste in the design of green food packaging', *Biomolecules*, vol. 11, no. 11. MDPI, Nov. 01, 2021. doi: 10.3390/biom11111599.
- [54] M. A. Mohammed, J. T. M. Syeda, K. M. Wasan, and E. K. Wasan, 'An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery', *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 4. MDPI AG, Dec. 01, 2017. doi: 10.3390/pharmaceutics9040053.
- [55] T. Jin, T. Liu, E. Lam, and A. Moores, 'Chitin and chitosan on the nanoscale', *Nanoscale Horizons*, vol. 6, no. 7. Royal Society of Chemistry, pp. 505–542, Jul. 01, 2021. doi: 10.1039/d0nh00696c.
- [56] M. Hamdi, R. Nasri, S. Hajji, M. Nigen, S. Li, and M. Nasri, 'Acetylation degree, a key parameter modulating chitosan rheological, thermal and film-forming properties', *Food Hydrocoll*, vol. 87, pp. 48–60, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.07.027.
- [57] L. Tavares, E. E. Esparza Flores, R. C. Rodrigues, P. F. Hertz, and C. P. Z. Noreña, 'Effect of deacetylation degree of chitosan on rheological properties and physical chemical characteristics of genipin-crosslinked chitosan beads', *Food Hydrocoll*, vol. 106, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105876.
- [58] P. Sacco, M. Cok, F. Asaro, S. Paoletti, and I. Donati, 'The role played by the molecular weight and acetylation degree in modulating the stiffness and elasticity of chitosan gels', *Carbohydr Polym*, vol. 196, pp. 405–413, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.060.
- [59] H. Y. Zhou, X. G. Chen, M. Kong, C. S. Liu, D. S. Cha, and J. F. Kennedy, 'Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system', *Carbohydr Polym*, vol. 73, no. 2, pp. 265–273, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.carbpol.2007.11.026.
- [60] A. R. N. Pontillo, S. Koutsoukos, T. Welton, and A. Detsi, 'Investigation of the influence of natural deep eutectic solvents (NaDES) in the properties of chitosan-stabilised films', *Mater Adv*, vol. 2, no. 12, pp. 3954–3964, Jun. 2021, doi: 10.1039/d0ma01008a.
- [61] J. Wang *et al.*, 'Deep Eutectic Systems as Novel Vehicles for Assisting Drug Transdermal Delivery', *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 11, p. 2265, Oct. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14112265.
- [62] B. Tang, X. Yang, A. Zhang, Q. Wang, L. Fan, and G. Fang, 'Polypseudorotaxane hydrogel based on Tween 80 and α -cyclodextrin for sustained delivery of low molecular weight heparin', *Carbohydr Polym*, vol. 297, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2022.120002.

- [63] L. Chen, W. Hu, M. Du, Y. Song, Z. Wu, and Q. Zheng, 'Bioinspired, Recyclable, Stretchable Hydrogel with Boundary Ultralubrication', *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, no. 35, pp. 42240–42249, Sep. 2021, doi: 10.1021/acsami.1c12631.
- [64] S. Yan *et al.*, 'Chaste honey in long term-storage: Occurrence and accumulation of Maillard reaction products, and safety assessment', *Food Chem*, vol. 424, p. 136457, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136457>.
- [65] S. L. Kosaraju, R. Weerakkody, and M. A. Augustin, 'Chitosan-glucose conjugates: Influence of extent of maillard reaction on antioxidant properties', *J Agric Food Chem*, vol. 58, no. 23, pp. 12449–12455, Dec. 2010, doi: 10.1021/jf103484z.
- [66] B. Gullón, M. I. Montenegro, A. I. Ruiz-Matute, A. Cardelle-Cobas, N. Corzo, and M. E. Pintado, 'Synthesis, optimization and structural characterization of a chitosan–glucose derivative obtained by the Maillard reaction', *Carbohydr Polym*, vol. 137, pp. 382–389, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.075>.
- [67] X. Liu, B. Xia, L. T. Hu, Z. J. Ni, K. Thakur, and Z. J. Wei, 'Maillard conjugates and their potential in food and nutritional industries: A review', *Food Frontiers*, vol. 1, no. 4. John Wiley and Sons Inc, pp. 382–397, Dec. 01, 2020. doi: 10.1002/fft2.43.
- [68] J. Xiang, F. Liu, B. Wang, L. Chen, W. Liu, and S. Tan, 'A literature review on maillard reaction based on milk proteins and carbohydrates in food and pharmaceutical products: Advantages, disadvantages, and avoidance strategies', *Foods*, vol. 10, no. 9. MDPI AG, Sep. 01, 2021. doi: 10.3390/foods10091998.
- [69] F. C. de Oliveira, J. S. dos R. Coimbra, E. B. de Oliveira, A. D. G. Zuñiga, and E. E. G. Rojas, 'Food Protein-polysaccharide Conjugates Obtained via the Maillard Reaction: A Review', *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 56, no. 7, pp. 1108–1125, May 2016, doi: 10.1080/10408398.2012.755669.
- [70] I. Kutzli, J. Weiss, and M. Gibis, 'Glycation of plant proteins via maillard reaction: Reaction chemistry, technofunctional properties, and potential food application', *Foods*, vol. 10, no. 2. MDPI AG, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/foods10020376.
- [71] A. Tzani, T. Lympelopoulou, I. Pitterou, I. Karetta, F. Belfquih, and A. Detsi, 'Development and optimization of green extraction process of spent coffee grounds using natural deep eutectic solvents', *Sustain Chem Pharm*, vol. 34, p. 101144, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.scp.2023.101144.
- [72] M. Jablonsky, V. Majova, P. Strizincova, J. Sima, and J. Jablonsky, 'Investigation of total phenolic content and antioxidant activities of spruce bark extracts isolated by deep eutectic solvents', *Crystals (Basel)*, vol. 10, no. 5, May 2020, doi: 10.3390/cryst10050402.
- [73] S. Koutsoukos, T. Tsiaka, A. Tzani, P. Zoumpoulakis, and A. Detsi, 'Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds', *J Clean Prod*, vol. 241, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.jclepro.2019.118384.
- [74] P. Matić, M. Sabljčić, and L. Jakobek, 'Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content', *J AOAC Int*, vol. 100, no. 6, pp. 1795–1803, Nov. 2017, doi: 10.5740/jaoacint.17-0066.
- [75] A. M. Shraim, T. A. Ahmed, M. M. Rahman, and Y. M. Hijji, 'Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation', *LWT*, vol. 150, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111932.
- [76] Q. Lv, M. Wu, and Y. Shen, 'Enhanced swelling ratio and water retention capacity for novel super-absorbent hydrogel', *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 583, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.123972.
- [77] X. F. Cui *et al.*, 'Water-retaining, tough and self-healing hydrogels and their uses as fire-resistant materials', *Polym Chem*, vol. 10, no. 37, pp. 5151–5158, Oct. 2019, doi: 10.1039/c9py01015g.

- [78] S. C. Edington, S. Liu, and C. R. Baiz, 'Infrared spectroscopy probes ion binding geometries', in *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., 2021, pp. 157–191. doi: 10.1016/bs.mie.2020.12.028.
- [79] S. Veerasingam *et al.*, 'Contributions of Fourier transform infrared spectroscopy in microplastic pollution research: A review', *Crit Rev Environ Sci Technol*, vol. 51, no. 22, pp. 2681–2743, 2021, doi: 10.1080/10643389.2020.1807450.
- [80] '1.5: INFRARED SPECTRA OF SOME COMMON FUNCTIONAL GROUPS COMMON GROUP FREQUENCIES SUMMARY'. [Online]. Available: <https://chem.libretexts.org/@go/page/45261>
- [81] A. Katopodi *et al.*, 'Synthesis, bioactivity, pharmacokinetic and biomimetic properties of multi-substituted coumarin derivatives', *Molecules*, vol. 26, no. 19, Oct. 2021, doi: 10.3390/molecules26195999.
- [82] I. G. Munteanu and C. Apetrei, 'Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review', *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 7. MDPI AG, Apr. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms22073380.
- [83] W. M. Wu and C. S. Criddle, 'Characterization of biodegradation of plastics in insect larvae', in *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., 2021, pp. 95–120. doi: 10.1016/bs.mie.2020.12.029.
- [84] C. Leyva-Porras *et al.*, 'Application of differential scanning calorimetry (DSC) and modulated differential scanning calorimetry (MDSC) in food and drug industries', *Polymers*, vol. 12, no. 1. MDPI AG, Jan. 01, 2020. doi: 10.3390/polym12010005.
- [85] N. Saadatkhah *et al.*, 'Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA', *Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 98, no. 1. Wiley-Liss Inc., pp. 34–43, Jan. 01, 2020. doi: 10.1002/cjce.23673.
- [86] J. Osamede Airouyuwa, H. Mostafa, A. Riaz, and S. Maqsood, 'Utilization of natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction as green extraction technique for the recovery of bioactive compounds from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds: An investigation into optimization of process parameters', *Ultrason Sonochem*, vol. 91, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.ultsonch.2022.106233.
- [87] Jacquie, 'Chapter 17: IR Spectroscopy'.
- [88] L. Nybacka, 'FTIR spectroscopy of glucose'. [Online]. Available: <http://www.teknat.uu.se/student>
- [89] H. Huisuo, I. U. Grün, M. Eilersieck, 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*, vol. 1, no. 2, pp. 42–48, Jun. 2018, doi: 10.30881/jnfrt.00010.
- [90] P. N. Devi, J. Sathiyabama, and S. 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*, vol. 6, no. 1, pp. 18–31, 2017, doi: 10.17675/2305-6894-2017-6-1-2.
- [91] S. Viturat, M. Thongngam, N. Lumdubwong, W. Zhou, and U. Klinkesorn, 'Ultrasound-assisted formation of chitosan-glucose Maillard reaction products to fabricate nanoparticles with enhanced antioxidant activity', *Ultrason Sonochem*, vol. 97, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.ultsonch.2023.106466.
- [92] S. Affes *et al.*, 'Effect of glucose-induced Maillard reaction on physical, structural and antioxidant properties of chitosan derivatives-based films', *Carbohydr Polym*, vol. 255, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117341.
- [93] A. Kraskouski *et al.*, 'Chitosan-based Maillard self-reaction products: Formation, characterization, antioxidant and antimicrobial potential', *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, vol. 4, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.carpta.2022.100257.

- [94] C. A. Caro, G. Cabello, E. Landaeta, J. Pérez, J. H. Zagal, and L. Lillo, 'Synthesis and spectroscopic and electrochemical studies of chitosan Schiff base derivatives', *Russian Journal of Applied Chemistry*, vol. 86, no. 11, pp. 1791–1797, Nov. 2013, doi: 10.1134/S1070427213110268.
- [95] H. Zhang, J. Yang, and Y. Zhao, 'High intensity ultrasound assisted heating to improve solubility, antioxidant and antibacterial properties of chitosan-fructose Maillard reaction products', *LWT*, vol. 60, no. 1, pp. 253–262, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.lwt.2014.07.050.
- [96] S. Sayyar, S. Gambhir, J. Chung, D. L. Officer, and G. G. Wallace, '3D printable conducting hydrogels containing chemically converted graphene', *Nanoscale*, vol. 9, no. 5, pp. 2038–2050, Feb. 2017, doi: 10.1039/c6nr07516a.
- [97] S. Murali *et al.*, 'Bio-based chitosan/gelatin/Ag@ZnO bionanocomposites: synthesis and mechanical and antibacterial properties', *Cellulose*, vol. 26, no. 9, pp. 5347–5361, Jun. 2019, doi: 10.1007/s10570-019-02457-2.
- [98] S. Afzal, M. Maswal, and A. A. Dar, 'Rheological behavior of pH responsive composite hydrogels of chitosan and alginate: Characterization and its use in encapsulation of citral', *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 169, pp. 99–106, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.05.002.
- [99] Dr. J. E. A. E. Prof. Dr. B.A. Wolf, 'WEE-Solve GmbH'. <http://www.wee-solve.de/en/rheology.html> (accessed Aug. 25, 2023).
- [100] Å. Öhrlund, 'Evaluation of Rheometry Amplitude Sweep Cross-Over Point as an Index of Flexibility for HA Fillers', *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, vol. 08, no. 02, pp. 47–54, 2018, doi: 10.4236/jcdsa.2018.82008.
- [101] S. E. S. Michel, F. Dutertre, M. L. Denbow, M. C. Galan, and W. H. Briscoe, 'Facile Synthesis of Chitosan-Based Hydrogels and Microgels through Thiol-Ene Photoclick Cross-Linking', *ACS Appl Bio Mater*, vol. 2, no. 8, pp. 3257–3268, Aug. 2019, doi: 10.1021/acsabm.9b00218.
- [102] O. Guaresti, S. Basasoro, K. González, A. Eceiza, and N. Gabilondo, 'In situ cross-linked chitosan hydrogels via Michael addition reaction based on water-soluble thiol-maleimide precursors', *Eur Polym J*, vol. 119, pp. 376–384, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.08.009.