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

Διπλωματική Εργασία

Ανάπτυξη διεργασίας εγκλωβισμού του φυσικού προϊόντος ρεσβερατρόλη σε ευτηκτογέλες

Φραγκονικολάκη Ευανθία – Αντωνία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Αναστασία Δέτση, Καθηγήτρια

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2024

Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Αναστασίας Δέτση.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Καταρχάς, θέλω να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κα. Αναστασία Δέτση για την ανάθεση και την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια αυτής της έρευνας. Επίσης, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τη Δρ. Ιωάννα Πιττερού και την υποψήφια Διδάκτορα Στυλιανή Καλαφατέλη για την πολύτιμη βοήθειά τους, την επίβλεψη, τις συμβουλές τους και την άψογη συνεργασία μας. Στη συνέχεια, θέλω να εκφράσω ένα βαθύ ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., συμπεριλαμβανομένων των Διδακτόρων, των υποψηφίων Διδακτόρων και των συμφοιτητών μου. Η παρουσία τους συνέβαλε σημαντικά στη δημιουργία ενός ευχάριστου και δημιουργικού περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Τέλος, εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξή τους και τη συνεισφορά τους στην επίτευξη αυτού του στόχου.

Περίληψη

Οι ευτηκτογέλες έχουν αναδειχθεί ως ένας νέος τύπος γέλης, που σχηματίζεται μέσω της ζελατινοποίησης βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και αποτελούν πολλά υποσχόμενα καινοτόμα οχήματα χορήγησης δυσδιάλυτων βιοδραστικών συστατικών, λόγω της βιοσυμβατότητάς τους και των ρυθμιζόμενων ιδιοτήτων τους.

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDESs) είναι μείγματα δύο ή περισσότερων ενώσεων φυσικής προέλευσης, ενός δότη δεσμών υδρογόνου (HBD) και ενός δέκτη δεσμών υδρογόνου (HBA) σε συγκεκριμένες μοριακές αναλογίες, που παρουσιάζουν σημαντική μείωση του σημείου τήξεως συγκριτικά με εκείνα των αρχικών συστατικών, με αποτέλεσμα να είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι NaDESs διακρίνονται για τη βιοαποικοδομησιμότητα, τη μη πτητικότητα, τη μη αναφλεξιμότητα, τη χαμηλή τοξικότητα και το χαμηλό κόστος τους.

Η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυ-τρανς-στιλβένιο) κατατάσσεται με βάση τη λειτουργία της στην κατηγορία των φυτοαλεξινών και με βάση την δομή της στην ομάδα των στιλβενοειδών πολυφαινολών. Συνηθέστερα συναντάται στη φλούδα και στους σπόρους σταφυλιών, καθώς και στο κόκκινο κρασί. Είναι γνωστή για την αντιοξειδωτική, την αντικαρκινική, την αντιφλεγμονώδη, την καρδιοπροστατευτική, την νευροπροστατευτική και την αντιμικροβιακή δράση της. Ωστόσο, η χρήση της περιορίζεται λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας και κατ' επέκταση της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητάς της.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη σε εργαστηριακή κλίμακα και η βελτιστοποίηση μιας πράσινης διεργασίας σύνθεσης ευτηκτογελών για τον εγκλωβισμό του φυσικού προϊόντος ρεσβερατρόλη, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη ενός καινοτόμου συστήματος χορήγησής της.

Η πράσινη σύνθεση των ευτηκτογελών πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας αλγινικό ως ζελατινοποιητή, έναν πολυσακχαρίτη που εξάγεται από καφέ φύκια, και φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη που αποτελείται από βεταΐνη, γλυκερόλη και νερό σε μοριακή αναλογία 1:3:1 και συντίθεται με τη μέθοδο της θέρμανσης και ανάδευσης. Κύριος στόχος είναι ο πράσινος διαλύτης να λειτουργήσει ταυτόχρονα και ως διαλυτικό μέσο για τη βιοδραστική ένωση, αλλά και να ζελατινοποιείται για τον σχηματισμό της ευτηκτογέλης.

Πρωταρχικά, μελετάται η διαλυτότητα της ρεσβερατρόλης σε υδατικό διάλυμα NaDES και διαπιστώνεται ότι, όταν η συγκέντρωση του NaDES στο διάλυμα είναι 900mM, η διαλυτότητα της βιοδραστικής ουσίας αυξάνεται κατά 8 φορές σε σύγκριση με εκείνη σε νερό. Στη συνέχεια, μελετάται η επίδραση των παραγόντων (Α) περιεκτικότητα σε ρεσβερατρόλη (% κ.β.), (Β) περιεκτικότητα σε νερό (% κ.β.) και (Γ) περιεκτικότητα σε αλγινικό (% κ.β.) στις αποκρίσεις (R1) ικανότητα διόγκωσης των ευτηκτογελών και (R2) απόδοση εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης στις ευτηκτογέλες. Το μοντέλο που επιλέχθηκε για να περιγράψει τόσο την ικανότητα διόγκωσης όσο και την απόδοση εγκλωβισμού είναι το απλοποιημένο τετραγωνικό (Reduced Quadratic model), με την πρώτη απόκριση να απαιτεί μετασχηματισμό με τον φυσικό λογάριθμο. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η αύξηση των τιμών των περιεκτικοτήτων σε αλγινικό και κυρίως σε νερό, επιφέρει αύξηση στο ποσοστό διόγκωσης της ευτηκτογέλης. Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε ρεσβερατρόλη δεν έχει καθοριστική επίδραση στην απόκριση αυτή και την ευνοεί όταν βρίσκεται σε χαμηλές τιμές. Παράλληλα, την απόδοση εγκλωβισμού ευνοεί, κυρίως, η χαμηλή τιμή της περιεκτικότητας σε αλγινικό και, σε δευτερεύοντα βαθμό, από υψηλότερες τιμές νερού και ρεσβερατρόλης.

Η διαδικασία βελτιστοποίησης επιτυγχάνεται μέσω του πειραματικού σχεδιασμού κατά Box-Behnken για τριπλό επίπεδο εξάρτησης σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας, η ευτηκτογέλη με τη βέλτιστη σύσταση για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση και του ποσοστού διόγκωσης και της απόδοσης εγκλωβισμού είναι εκείνη που παρασκευάζεται με 0.696% w/w ρεσβερατρόλη, 15% w/w νερό και 14.695% w/w αλγινικό.

Οι ευτηκτογέλες με τη βέλτιστη σύσταση αξιολογούνται εκ νέου ως προς τις αποκρίσεις τους και εμφανίζουν μέγιστη πρόσληψη νερού (37.8%) μετά από 15 λεπτά και η ικανότητα συγκράτησης νερού είναι επαρκής (>65%) για 20 λεπτά μετά την ισορροπία. Επιπρόσθετα, το ποσοστό διόγκωσής τους (SR) στα πρώτα πέντε λεπτά ξεπερνά το 24% και πετυχαίνουν 49.8% απόδοση εγκλωβισμού (EE) της ρεσβερατρόλης. Οι τιμές αυτές συγκρίνονται με τις προβλεπόμενες από το μοντέλο και αποφαίνεται ότι συμφωνούν σε ικανοποιητικό βαθμό.

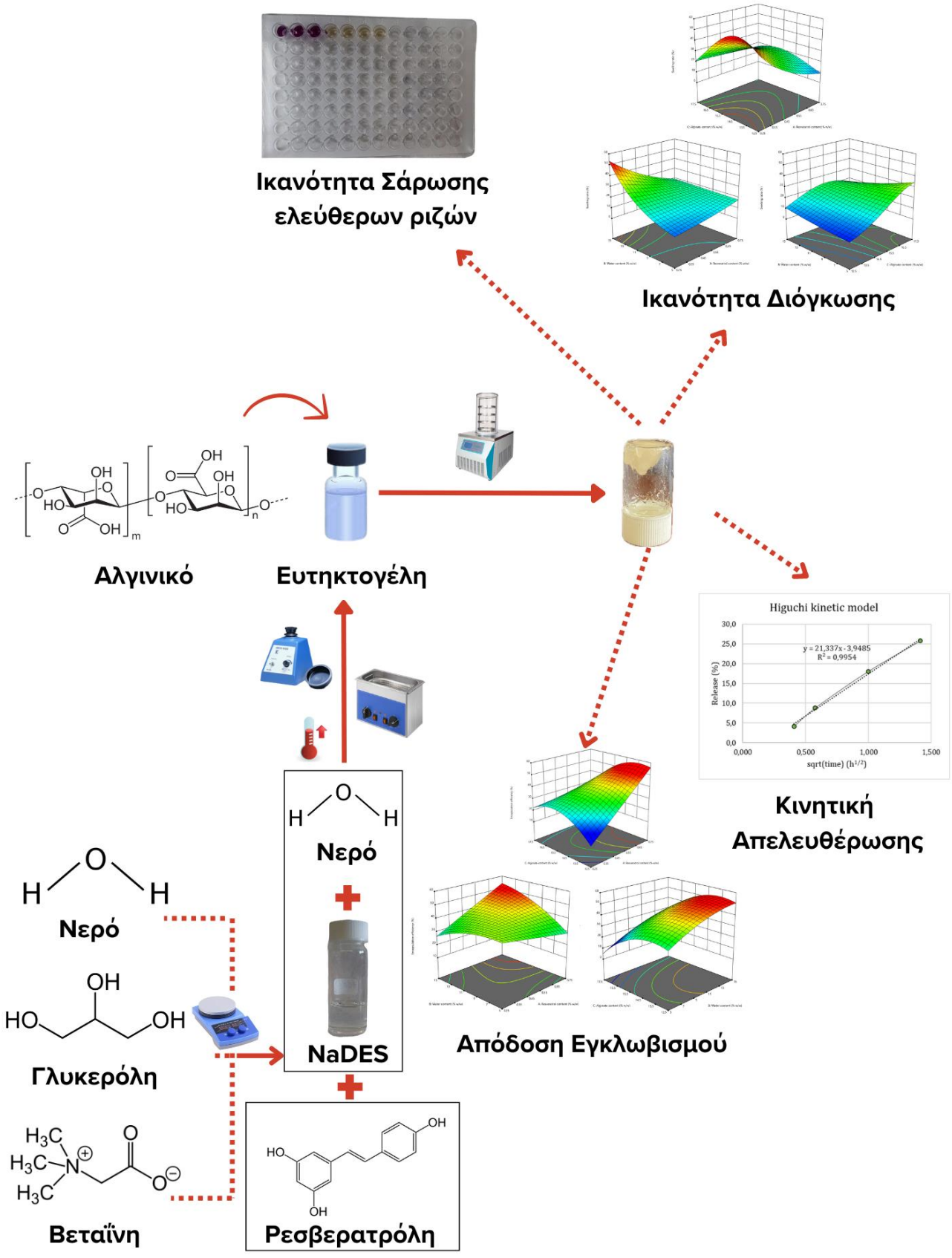
Έπειτα, η βέλτιστη γέλη μελετάται ως προς την ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών μέσω της φασματοφωτομετρικής μεθόδου DPPH και επιβεβαιώνεται η ικανοποιητική αντιοξειδωτική ικανότητά της, καθώς προκάλεσε 74.9±1.3% αναστολή των ριζών DPPH μετά από μισή ώρα επώασης, ενώ η ίδια ποσότητα ελεύθερης ρεσβερατρόλης προκάλεσε 77.0±0.9% αναστολή.

Τέλος, μελετάται ως προς το προφίλ αποδέσμευσης της ρεσβερατρόλης που έχει εγκλωβιστεί επιτυχώς σε αυτή, σε συνθήκες που προσομοιάζουν τη διέλευση από το ανθρώπινο σώμα (37°C, pH: 7.44), και πραγματοποιείται διερεύνηση των μηχανισμών αποδέσμευσης. Το μοντέλο που προβλέπει καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα, τα οποία λήφθηκαν σε χρονική διάρκεια 2 ωρών, είναι το μοντέλο Higuchi με συντελεστή προσαρμογής ίσο με 0.9954, υποδηλώνοντας ότι η αποδέσμευση της ρεσβερατρόλης βασίζεται σε διάχυση Fick.

Επιστημονικό Πεδίο: : Πράσινη Χημεία

Λέξεις – κλειδιά: ρεσβερατρόλη, ευτηκτογέλη, φυσικοί βαθέως ευτηκτηκοί διαλύτες (NaDESs), αλγινικό, ικανότητα διόγκωσης, απόδοση εγκλωβισμού, κινητική απελευθέρωσης, αντιοξειδωτική ικανότητα, πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken (BBD)

Γραφική Περίληψη



Abstract

Eutectogels have emerged as a new type of gel, formed via gelation of Deep Eutectic Solvents and promising as innovative drug delivery vehicles for poorly soluble bioactive ingredients, due to their biocompatibility and tunable properties.

Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) are mixtures of two or more compounds of natural origin, a hydrogen bond donor (HBD) and a hydrogen bond acceptor (HBA) at specific molar ratios, exhibiting a significant reduction in the melting point, compared to those of the initial components and resulting in them being liquid at ambient temperature. NaDESs are distinct for their biodegradability, non-volatility, non-flammability, low toxicity and cost.

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) is classified on the basis of its function as a phytoalexin and on the basis of its structure as a stilbene polyphenol. It is most commonly found in grape skins and seeds and in red wine. It is now known for its antioxidant, anti-cancer, anti-inflammatory, cardioprotective, vascular, neuroprotective and antimicrobial effects. However, its use is restrained because of its low solubility and therefore its low biodegradability.

The purpose of this thesis is to develop and optimize a green eutectogel synthesis process for the encapsulation of the natural product resveratrol in order to develop an innovative delivery system.

The green eutectogel synthesis is carried out with the use of alginate as a gelling agent, which is a polysaccharide extracted from brown algae, and a natural deep eutectic solvent consisting of betaine, glycerol and water in a molar ratio of 1:3:1, which is synthesised using heating and stirring. One of the main goals is the green solvent to act as a solvent for the bioactive compound and to gelate for the formation of the eutectic gel.

First, the solubility of resveratrol in an aqueous NaDES solution is studied and it is found that, when NaDES concentration in the solution is 900mM, the solubility of the bioactive compound is increased by 8 times compared to that in water. Next is the impact of the factors (A) resveratrol content (% w/w), (B) water content (% w/w) and (C) alginate content (% w/w) on the responses (R1) water-uptake capacity of eutectogels and (R2) resveratrol encapsulation efficiency, that are investigated. The model chosen to describe both the swelling capacity and the encapsulation efficiency is the Reduced Quadratic model, with the first response requiring transformation with the natural logarithm.

The synthesis process is optimised with the application of a three-level Box-Behnken experimental design and statistical analysis of the results. Statistical analysis showed that increasing the value of content in alginate and especially in water results in an increase in the eutectogel swelling rate. On the contrary, the content in resveratrol does not have a decisive effect on this response and favours it when it is at low values. At the same time, the encapsulation efficiency is favoured, mainly, by the low value of the content in alginate and, secondly, by higher values of content in water and resveratrol.

According to the results of this process, the eutectogel with the optimal composition for simultaneously maximizing both swelling ratio and encapsulation efficiency is that prepared with 0.696% w/w resveratrol, 15% w/w water, and 14.695% w/w alginate.

The eutectogels with the optimal composition are re-evaluated for their responses and show maximum water uptake (37.8%) after 15 min and water retention capacity is adequate (>65%) for 20 min after equilibrium. In addition, the swelling rate (SR) in the first five minutes exceeds 24% and achieves about 49.8% encapsulation efficiency (EE) of resveratrol. These values are compared with those predicted by the model and found to be in satisfactory agreement.

Then, the optimal eutectogel is studied for its ability to scavenge free radicals through the DPPH spectrophotometric method and its satisfactory antioxidant capacity is confirmed, as it caused

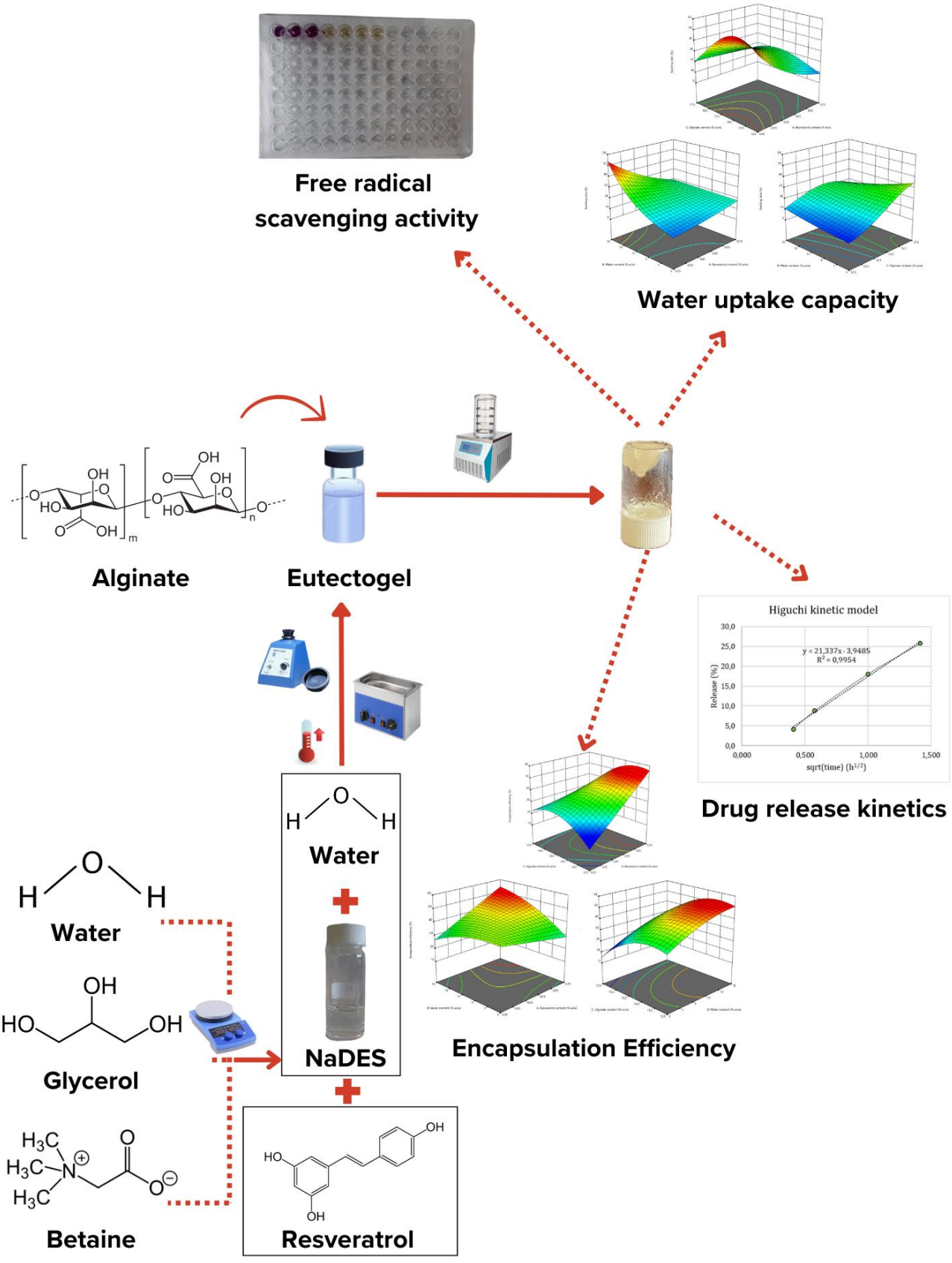
74.9±1.3% inhibition of DPPH radicals after half an hour of incubation, while the same amount of free resveratrol caused 77.0±0.9% inhibition.

Finally, the release profile of successfully encapsulated resveratrol was studied in terms of its release profile under conditions simulating its passage through the human body (37°C, pH: 7.44), and the mechanisms of release were investigated. The model that best predicts the experimental data, which was obtained over a time period of 2 hours, is the Higuchi model with a fit coefficient equal to 0.9954, suggesting that the release of resveratrol is based on Fick diffusion.

Scientific Field: Green Chemistry

Key-words: resveratrol, eutectogel, natural deep eutectic solvent (NaDES), alginate, swelling capacity, encapsulation efficiency, release kinetics, antioxidant capacity, Box-Behnken experimental design (BBD)

Graphical Abstract



Περιεχόμενα

Πρόλογος 2
Περίληψη 3
Γραφική Περίληψη 5
Abstract 6
Graphical Abstract 8
Κατάλογος Εικόνων 12
Κατάλογος Πινάκων 14
1. Θεωρητικό Μέρος 15
1.1 Πράσινη Χημεία 15
1.2 Πράσινοι διαλύτες 16
1.2.1 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες – Deep Eutectic Solvents (DESs) 16
1.2.2 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες – Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) 18
1.2.3 Μέθοδοι παρασκευής των DESs και των NaDESs 18
1.2.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs και των NaDESs 19
1.2.5 Εφαρμογές των DESs και των NaDESs 21
1.2.6 Πλεονεκτήματα των DESs και των NaDESs έναντι άλλων πράσινων διαλυτών 22
1.3 Πολυσακχαρίτες – Αλγινικό 23
1.4 Γέλες 25
1.4.1 Υδρογέλες – Hydrogels 25
1.4.2 Ευτηκτογέλες – Eutectogels 28
1.5 Ρεσβερατρόλη – Resveratrol (RVT) 30
1.5.1 Ορισμός, προέλευση, παρασκευή ρεσβερατρόλης 30
1.5.2 Χημική δομή ρεσβερατρόλης 31
1.5.3 Ιδιότητες ρεσβερατρόλης 31
1.5.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα ρεσβερατρόλης 32
1.5.5 Παρενέργειες ρεσβερατρόλης 33
1.5.6 Εγκλωβισμός βιοδραστικών ενώσεων σε ευτηκτογέλες (Encapsulation) 33
1.6 Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για αξιολόγηση εγκλωβισμένων βιοδραστικών ενώσεων 34
1.6.1 Ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών – Φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH 34
1.6.2 Κινητικό προφίλ απελευθέρωσης βιοδραστικών ουσιών – Drug release kinetics studies 35
1.6.3 Φασματομετρία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis) 36
1.6.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 37
1.7 Πειραματικός Σχεδιασμός – Design of Experiments (DoE) 39
1.7.1 Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης – Response Surface Methodology (RSM) 39
1.7.2 Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken 40

2. Πειραματικό Μέρος 42
2.1 Σκοπός 42
2.2 Όργανα και αντιδραστήρια 42
2.3 Σύνθεση των NaDES: Χλωριούχος Χολίνη – Κιτρικό Οξύ – Νερό (1:1:4) και Βεταΐνη – Γλυκερόλη – Νερό (1:3:1) 43
2.4 Επιλογή Φυσικού Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη (NaDES) για την παρασκευή των ευτηκτογελών 44
2.5 Μελέτη διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης σε υδατικά διαλύματα του DES: Bet-Gly-W (1:3:1) 45
2.6 Πειραματικός Σχεδιασμός – Design of Experiments (DoE) 47
2.7 Χαρακτηρισμός ευτηκτογελών 50
2.7.1 Προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης – Swelling Ratio (SR%) ή water uptake capacity 50
2.7.2 Προσδιορισμός ικανότητας συγκράτησης νερού – Water Retention Capacity 51
2.7.3 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης - Encapsulation Efficiency (EE%) 52
2.8 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων πειραματικού σχεδιασμού και προσδιορισμός μοντέλων πρόβλεψης αποκρίσεων 53
2.8.1 Προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης – Swelling Ratio (SR%) ή water uptake capacity 53
2.8.2 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης - Encapsulation Efficiency (EE%) 53
2.8.3 Επιβεβαίωση μοντέλου – Confirmation 54
2.9 Βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής των ευτηκτογελών 54
2.9.1 Επιλογή βέλτιστης γέλης 54
2.9.2 Προσδιορισμός πραγματικών αποκρίσεων βέλτιστης γέλης: ικανότητα διόγκωσης (SR%) και απόδοση εγκλωβισμού (EE%) 54
2.10 Αξιολόγηση βέλτιστης γέλης ως προς την ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών – Φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH 54
2.11 Αξιολόγηση βέλτιστης ευτηκτογέλης ως προς το κινητικό προφίλ απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης – Drug release kinetics studies 55
3. Αποτελέσματα – Συζήτηση 57
3.1 Προκαταρκτικά πειράματα παρασκευής ευτηκτογελών με βάση τα NaDES: Χλωριούχος Χολίνη – Κιτρικό Οξύ – Νερό (1:1:4) και Βεταΐνη – Γλυκερόλη – Νερό (1:3:1) για τον εγκλωβισμό της ρεσβερατρόλης 57
3.2 Μελέτη διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης σε υδατικά διαλύματα του επιλεγμένου DES: Bet-Gly-W (1:3:1) 57
3.3 Χαρακτηρισμός των ευτηκτογελών 59
3.3.1 Ικανότητα διόγκωσης – Swelling Ratio (SR%) ή water uptake capacity 59
3.3.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού – Water Retention Capacity 60
3.3.3 Απόδοση εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης - Encapsulation Efficiency (EE%) 61

3.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων πειραματικού σχεδιασμού και προσδιορισμός μοντέλων πρόβλεψης αποκρίσεων 62
3.4.1 Προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης – Swelling Ratio (SR%) ή water uptake capacity 62
3.4.2 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης - Encapsulation Efficiency (EE%) 65
3.4.3 Επιβεβαίωση μοντέλου – Confirmation 68
3.5 Βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής των ευτηκτογελών 68
3.5.1 Σύσταση βέλτιστης ευτηκτογέλης και προσδιορισμός προβλεπόμενων τιμών ικανότητας διόγκωσης (SR%) και απόδοσης εγκλωβισμού (EE%) 68
3.5.2 Προσδιορισμός πραγματικών αποκρίσεων βέλτιστης γέλης: ικανότητα διόγκωσης (SR%) και απόδοση εγκλωβισμού (EE%) 72
3.6 Αξιολόγηση βέλτιστης ευτηκτογέλης ως προς την ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών – Φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH 74
3.7 Αξιολόγηση βέλτιστης ευτηκτογέλης ως προς το κινητικό προφίλ απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης – Drug release kinetics studies 75
4. Συμπεράσματα 79
5. Προτάσεις για το μέλλον 82
Βιβλιογραφία 84
Βιβλιογραφία εικόνων 94

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας 15
Εικόνα 2: Σημείο τήξεως ευτηκτικού μίγματος (a) και βαθέως ευτηκτικού μίγματος (b) δύο συστατικών, όπου Mp: σημείο τήξης, ΔTf: ταπείνωση σημείου τήξης, Ep: ευτηκτικό σημείο και Ec: ευτηκτική αναλογία 17
Εικόνα 3: Δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών 17
Εικόνα 4: Σχηματισμός γλυκοσιδικού δεσμού μεταξύ δύο μονοσακχαριτών 23
Εικόνα 5: Χημική δομή αλγινικού οξέος 24
Εικόνα 6: Συντακτικός τύπος trans-ρεσβερατρόλης 30
Εικόνα 7: Αντίδραση αναγωγής ρίζας DPPH από μια αντιοξειδωτική ουσία 34
Εικόνα 8: Η χρωματική διακύμανση που παρατηρείται κατά την αντίδραση αναγωγής του DPPH 34
Εικόνα 9: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου UV-Vis 37
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση οργανολογίας και λειτουργίας της HPLC 38
Εικόνα 11: Παράδειγμα μοντέλου Box-Behnken σε τρεις διαστάσεις 41
Εικόνα 12: Υδατικά διαλύματα DES [Bet-Gly-W (1:3:1)] με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 0, 300, 600, 750 και 900mM (από αριστερά προς τα δεξιά) μαζί με ποσότητα ρεσβερατρόλης πριν την επώαση .. 46
Εικόνα 13: Υδατικά διαλύματα DES: Bet-Gly-W (1:3:1) συγκεντρώσεων 0, 300, 600, 750 και 900mM με ποσότητα ρεσβερατρόλης μετά την επώαση και πριν το φιλτράρισμα 46
Εικόνα 14: Καμπύλη αναφοράς της ρεσβερατρόλης σε αιθανόλη 46
Εικόνα 15: Επιθυμητή σύσταση – ρευστότητα ευτηκτογέλης 48
Εικόνα 16: Παρασκευή ευτηκτογελών πειραματικού σχεδιασμού 49
Εικόνα 17: Συνολική ξηρή μάζα ευτηκτογέλης πριν τη διαδικασία προσδιορισμού του swelling ratio (αριστερά) και συνολική διογκωμένη μάζα ευτηκτογέλης μετά την προσθήκη buffer και την επώαση στους 37 °C για 5 min (δεξιά) 51
Εικόνα 18: Συνολική ξηρή μάζα ευτηκτογέλης πριν την προσθήκη αιθανόλης και μαγνήτη ανάδευσης 52
Εικόνα 19: Προετοιμασία δειγμάτων για προσδιορισμό απόδοσης εγκλωβισμού, σε κάθε φιαλίδιο περιέχονται η συνολική ξηρή μάζα ευτηκτογέλης, η αιθανόλη και ένας μαγνήτης ανάδευσης 53
Εικόνα 20: Τα φιαλίδια μετά το «σπάσιμο» και πριν το φιλτράρισμα 53
Εικόνα 21: Διάγραμμα διαλυτότητας ρεσβερατρόλης σε υδατικά διαλύματα NaDES συγκεντρώσεων 0, 300, 600, 750 και 900mM συναρτήσει των συγκεντρώσεων αυτών 58
Εικόνα 22: Διάγραμμα ποσοστού διόγκωσης ευτηκτογέλης με περιεκτικότητες 0.75% w/w σε ρεσβερατρόλη, 10% w/w σε νερό και 17.5% w/w σε αλγινικό συναρτήσει του χρόνου 59
Εικόνα 23: Διάγραμμα συγκράτησης νερού ευτηκτογέλης με περιεκτικότητες 0.75% w/w σε ρεσβερατρόλη, 10% w/w σε νερό και 17.5% w/w σε αλγινικό συναρτήσει του χρόνου 61
Εικόνα 24: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 1ης απόκρισης (φυσικός λογάριθμος της ικανότητας διόγκωσης των ευτηκτογελών στα 5min) 64
Εικόνα 25: 3D επιφάνεια του swelling ratio συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για δεδομένη – ελάχιστη τιμή A 65
Εικόνα 26: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 2ης απόκρισης (απόδοση εγκλωβισμού) 67
Εικόνα 27: 3D επιφάνεια της απόδοσης εγκλωβισμού συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για δεδομένη – μέγιστη τιμή B 67
Εικόνα 28: 3D επιφάνεια του swelling ratio (5min) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A 69
Εικόνα 29: 3D επιφάνεια του swelling ratio (5min) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B 70
Εικόνα 30: 3D επιφάνεια του swelling ratio (5min) συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C 70

Εικόνα 31: 3D επιφάνεια της απόδοσης εγκλωβισμού συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A 71
Εικόνα 32: 3D επιφάνεια της απόδοσης εγκλωβισμού συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B 71
Εικόνα 33: 3D επιφάνεια της απόδοσης εγκλωβισμού συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C 72
Εικόνα 34: Διάγραμμα ικανότητας διόγκωσης βέλτιστης ευτηκτογέλης σε συνάρτηση με τον χρόνο . 74
Εικόνα 35: Διάγραμμα ικανότητας συγκράτησης βέλτιστης ευτηκτογέλης σε συνάρτηση με τον χρόνο 74
Εικόνα 36: Προφίλ αποδέσμευσης ρεσβερατρόλης μέσα από την βέλτιστη ευτηκτογέλη 76
Εικόνα 37: Προφίλ αποδέσμευσης ρεσβερατρόλης σύμφωνα με κινητική μηδενικής τάξης 76
Εικόνα 38: Προφίλ αποδέσμευσης ρεσβερατρόλης σύμφωνα με κινητική πρώτης τάξης 76
Εικόνα 39: Προφίλ αποδέσμευσης ρεσβερατρόλης σύμφωνα με κινητική Higuchi 77
Εικόνα 40: Προφίλ αποδέσμευσης ρεσβερατρόλης σύμφωνα με κινητική Korsmeyer-Peppas 77

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Σύγκριση ιδιοτήτων ιοντικών υγρών, βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών 23
Πίνακας 2: Μηχανισμοί απελευθέρωσης ανάλογα με τη γεωμετρία και αντίστοιχες τιμές συντελεστή διάχυσης 36
Πίνακας 3: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος 42
Πίνακας 4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος 43
Πίνακας 5: Μοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη των συστατικών του NaDES Χλωριούχος Χολίνη – Κιτρικό Οξύ – Νερό 43
Πίνακας 6: Μοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη των συστατικών του NaDES Βεταΐνη – Γλυκερόλη – Νερό 44
Πίνακας 7: Σύσταση υδατικών διαλυμάτων DES με διαφορετικές συγκεντρώσεις 45
Πίνακας 8: Παράμετροι του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken 48
Πίνακας 9: Τα 14 πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού που προτάθηκαν από το λογισμικό 49
Πίνακας 10: Συνθήκες διαδικασίας μελέτης της κινητικής απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης από την ευτηκτογέλη 56
Πίνακας 11: Αποτελέσματα μελέτης διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης σε υδατικά διαλύματα του DES Bet-Gly-W (1:3:1) 58
Πίνακας 12: Αποτελέσματα πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού για τον προσδιορισμό της ικανότητας διόγκωσης των ευτηκτογελών στα 5min 60
Πίνακας 13: Σύσταση ευτηκτογελών με ελάχιστο και μέγιστο χρονικό διάστημα συγκράτησης νερού > 60% 60
Πίνακας 14: Αποτελέσματα πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης στις ευτηκτογέλες 62
Πίνακας 15: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 1η απόκριση (ποσοστό διόγκωσης των ευτηκτογελών στα 5min) 63
Πίνακας 16: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 2η απόκριση (απόδοση εγκλωβισμού ρεσβερατρόλης στην ευτηκτογέλη) 66
Πίνακας 17: Αποτελέσματα επιβεβαίωσης μοντέλου μέσω του λογισμικού Design – Expert 12 68
Πίνακας 18: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης διεργασίας παρασκευής ευτηκτογέλης 69
Πίνακας 19: Προβλεπόμενες και πραγματικές τιμές αποκρίσεων βέλτιστης ευτηκτογέλης και οι αποκλίσεις τους 73
Πίνακας 20: Αποτελέσματα επιβεβαίωσης μοντέλου μέσω του λογισμικού Design – Expert 12 για τη βέλτιστη ευτηκτογέλη 73
Πίνακας 21: Ποσοστό απελευθερωμένης ρεσβερατρόλης από τη βέλτιστη ευτηκτογέλη με την πάροδο του χρόνου 75
Πίνακας 22: Συντελεστές R^2 στατιστικών μοντέλων που εφαρμόστηκαν για το προφίλ αποδέσμευσης της ρεσβερατρόλης 77

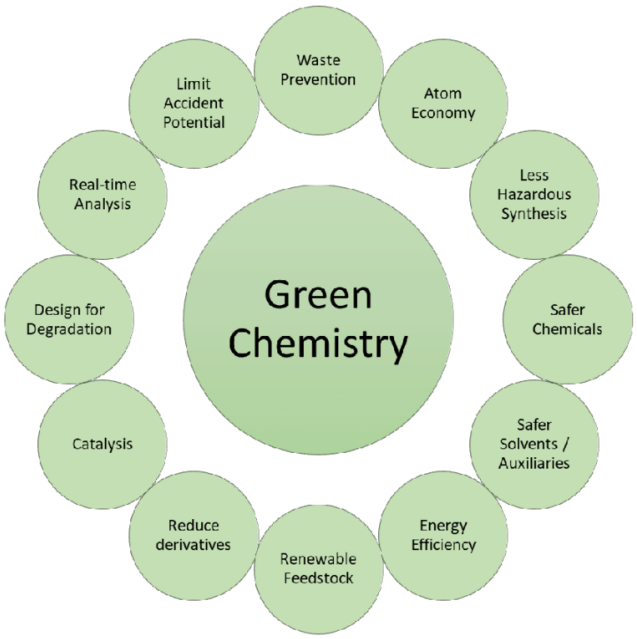
1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Πράσινη Χημεία

Η Πράσινη Χημεία περιγράφεται ως «ο σχεδιασμός χημικών προϊόντων και διαδικασιών για τη μείωση ή την εξάλειψη της χρήσης και της παραγωγής επικίνδυνων ουσιών». Αυτή η έννοια και ο ορισμός της Πράσινης Χημείας διατυπώθηκαν για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Την ανάγκη για επινόηση αυτού του νέου κλάδου της Χημείας δημιούργησε η ραγδαία βιομηχανική ανάπτυξη, οποία επέφερε δραματικές επιπτώσεις τόσο προς το περιβάλλον όσο και προς τον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, η αλόγιστη απελευθέρωση συνθετικών χημικών ουσιών, η ατελείωτη παραγωγή βιομηχανικών αποβλήτων και η υπέρογκη κατανάλωση ενέργειας συντέλεσαν στην όξυνση της περιβαλλοντικής ρύπανσης και την καταστροφή οικοσυστημάτων, ενώ παράλληλα αποτέλεσαν απειλή για την ανθρώπινη υγεία με την τοξικότητα που δημιουργούν. [1-3]

Ως εκ τούτου, κρίθηκε απαραίτητη η στροφή σε εναλλακτικές χημικές πρακτικές, η οποίες αντικαθιστούν τις συμβατικές και που αποσκοπούν, πρωταρχικά, στην πρόληψη μιας επικείμενης μόλυνσης και γενικότερα ενδεχόμενων μελλοντικών προβλημάτων. Έπειτα, κύριος στόχος είναι ο περιορισμός της χρήσης φυσικών πόρων, με σκοπό την ορθολογική διαχείριση και τη διασφάλιση της διατήρησής τους για τις επόμενες γενιές. Συμπληρωματικά, επιδιώκεται η μείωση της ενεργειακής κατανάλωσης από τις βιομηχανίες και γενικότερα από τις διάφορες διεργασίες. Δεύτερον, στοχεύει στο να περιορίσει όχι μόνο τη χρήση, αλλά και την παραγωγή επικίνδυνων ουσιών, προτείνοντας εναλλακτικούς και ασφαλέστερους τρόπους υλοποίησης διεργασιών. Τρίτον, δίνεται έμφαση στην περιορισμένη παραγωγή αποβλήτων και στην ανακύκλωσή τους, όπου αυτό είναι εφικτό. Τέλος, εξετάζεται η τοξικότητα των προϊόντων και των παραπροϊόντων, με στόχο την πρόληψη μελλοντικών ρυπάνσεων και προβλημάτων.[1, 4-6]

Οι δώδεκα (12) αρχές της Πράσινης Χημείας προτάθηκαν για πρώτη φορά από τους Paul Anastas και John Warner το 1998, αποσκοπούν στην επίτευξη των προαναφερθέντων στόχων και περιγράφονται λεπτομερώς στην παρακάτω εικόνα.[1]



Εικόνα 1: Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας

Η αξιολόγηση και η βελτιστοποίηση των χημικών διεργασιών σύμφωνα με τις αρχές της Πράσινης Χημείας μπορούν να γίνουν με κάποια εργαλεία, τους δείκτες (metrics). Αυτοί οι δείκτες βοηθούν

στη ποσοτικοποίηση της αποτελεσματικότητας, της ασφάλειας και της περιβαλλοντικής επίπτωσης των χημικών διεργασιών. Ένας από τους βασικούς δείκτες είναι ο περιβαλλοντικός παράγοντας (E-factor), ο οποίος υπολογίζει την ποσότητα αποβλήτων που παράγονται ανά μονάδα προϊόντος. Ένας χαμηλότερος E-Factor υποδηλώνει πιο πράσινη διαδικασία. Εξίσου σημαντική είναι η οικονομία ατόμου (Atom Efficiency), που αξιολογεί την αποδοτικότητα μιας χημικής αντίδρασης ως προς την ποσότητα των ατόμων των αντιδρώντων που ενσωματώνονται στο τελικό προϊόν.[3]

Η προσέγγιση της Πράσινης Χημείας έχει εφαρμοστεί σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς, όπως την αεροδιαστημική, την αυτοκινητοβιομηχανία, τα καλλυντικά, τα ηλεκτρονικά, την ενέργεια, τα οικιακά προϊόντα, τα φαρμακευτικά σκευάσματα και τη γεωργία. Πιο συγκεκριμένα, τα προηγούμενα χρόνια ανακαλύφθηκαν νέα πράσινα μονοπάτια που συντέλεσαν στην εξάλειψη οργανικών διαλυτών, σχεδιάστηκαν πράσινα φυτοφάρμακα που αντικατέστησαν τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και αναπτύχθηκαν νέες πιο πράσινες συνθετικές οδοί για τη σύνθεση φαρμακευτικών ουσιών με μεγαλύτερη απόδοση και μικρότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα.[3,8]

1.2 Πράσινοι διαλύτες

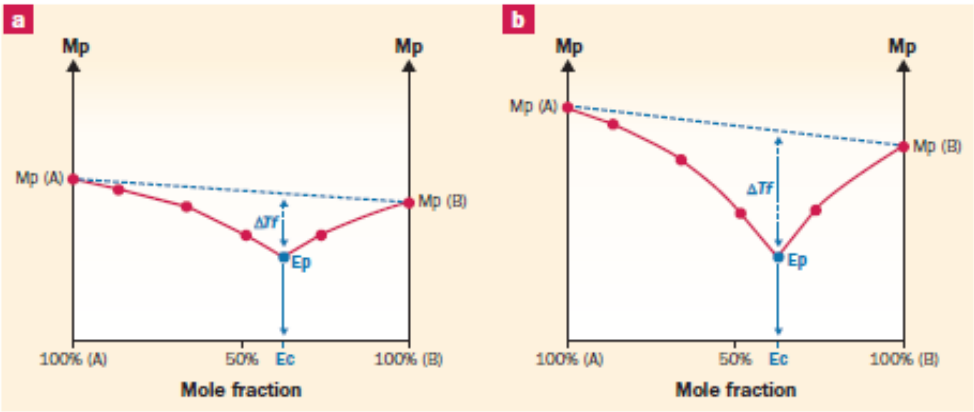
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μια από τις δώδεκα αρχές της πράσινης χημείας είναι η υιοθέτηση ασφαλέστερων διαλυτών για χρήση σε χημικές παρασκευές και καθαρισμούς. Είναι γεγονός, ότι οι διαλύτες είναι ενώσεις με ευρεία εφαρμογή σε όλες τις πτυχές της βιομηχανίας (π.χ. εκχυλίσεις, σύνθεση νέων ενώσεων, ενζυμικές αντιδράσεις, καταλυτικές διαδικασίες) και, κατά συνέπεια, έχουν μεγάλο οικονομικό και περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Επιπλέον, οι συμβατικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο είναι οργανικοί, αλλά οι περισσότεροι από αυτούς είναι πτητικοί και εμφανίζουν ζητήματα ασφαλείας και τοξικότητας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα οργανικών διαλυτών είναι το εξάνιο και η ακετόνη, ενώσεις ιδιαίτερα πτητικές που ρυπαίνουν το περιβάλλον, είναι τοξικές, εύφλεκτες και δεν βιοαποικοδομούνται εύκολα. Οι διαλύτες αυτοί δεν πληρούν τις αρχές της πράσινης χημείας, γεγονός που καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη νέων διαλυτών με πράσινο χαρακτήρα.

Συνεπώς, προέκυψε η ανάγκη για χρήση διαλυτών που να είναι περισσότερο οικολογικοί και λιγότερο τοξικοί, ή και να καταργηθούν οι προηγούμενοι όπου αυτό είναι εφικτό. Για το σκοπό αυτό, έχουν συντεθεί νέοι εναλλακτικοί διαλύτες, όπως τα ιοντικά υγρά, τα υπερκρίσιμα ρευστά και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες. Το νερό αποτελεί έναν από τους προτιμότερους διαλύτες, καθώς είναι άμεσα διαθέσιμο, μη τοξικό και παρέχεται σε μεγάλες ποσότητες.[9-11]

1.2.1 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες – Deep Eutectic Solvents (DESs)

Μια από τις κύριες κατηγορίες πράσινων διαλυτών είναι οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DESs), των οποίων η εφαρμογή ενισχύθηκε προκειμένου να καλύψουν τις αδυναμίες των ιοντικών υγρών. Οι DESs είναι ομοιογενή μείγματα, τουλάχιστον δύο συστατικών, υγρών ή στερεών, τα οποία προκύπτουν από την ανάμειξη δότη (Hydrogen Bond Donor, HBD) και δέκτη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) σε συγκεκριμένες αναλογίες. Το ευτηκτικό αυτό μίγμα προκύπτει κυρίως μέσω δημιουργίας δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών, αλλά και άλλων δυνάμεων, όπως αλληλεπιδράσεων van der Waals. Οι δεσμοί αυτοί προκαλούν ταπείνωση του σημείου τήξεως του νέου μείγματος, συγκριτικά με το σημείο τήξεως του κάθε συστατικού ξεχωριστά.[12-18]

Στην εικόνα που ακολουθεί αποτυπώνεται η διαφορά των σημείων τήξεως ανάμεσα στο DES και στα συστατικά του. Είναι αξιοσημείωτο, πράγματι, ότι παρατηρείται απόκλιση 100-200°C περίπου.

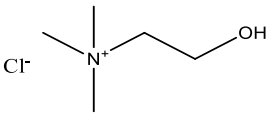


Εικόνα 2: Σημείο τήξεως ευτηκτικού μίγματος (a) και βαθέως ευτηκτικού μίγματος (b) δύο συστατικών, όπου Mp: σημείο τήξης, ΔTf: ταπείνωση σημείου τήξης, Ep: ευτηκτικό σημείο και Ec: ευτηκτική αναλογία

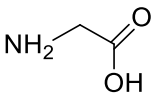
Συνήθως, ως δέκτες δεσμού υδρογόνου χρησιμοποιούνται τα άλατα του τεταρτοταγούς αμμωνίου (π.χ. χλωριούχος χολίνη), η βεταΐνη, αμινοξέα όπως η προλίνη και η αλανίνη, το χλωριούχο τριμεθυλαμμώνιο, ενώ ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως δότες δεσμού υδρογόνου είναι τα καρβοξυλικά οξέα (οξαλικό οξύ, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, φορμικό οξύ, κιτρικό οξύ, ακρυλικό οξύ), τα σάκχαρα (γλυκόζη, σακχαρόζη, ξυλόζη), οι αλκοόλες (αιθυλενογλυκόλη, γλυκερόλη, 1,2-προπανοδιόλη), η ουρία και τα αμίδια (N-μεθυλαιθαναμίδιο, N-ισοπροπυλακριλαμίδιο).[20-25]

Μερικοί από τους πιο διαδεδομένους δέκτες και δότες δεσμών υδρογόνου παρατίθενται στο ακόλουθο σχήμα.

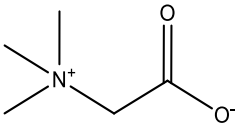
Δέκτες δεσμού υδρογόνου (HBAs)



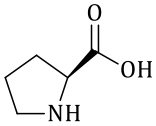
Χλωριούχος χολίνη



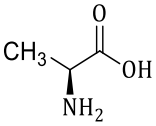
Γλυκίνη



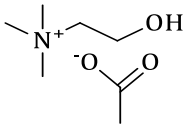
Βεταΐνη



Προλίνη

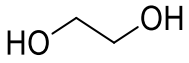


Αλανίνη

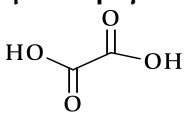


Οξική χολίνη

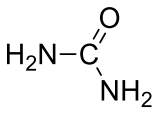
Δότες δεσμού υδρογόνου (HBDs)



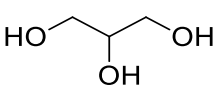
Αιθυλενογλυκόλη



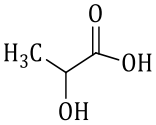
Οξαλικό οξύ



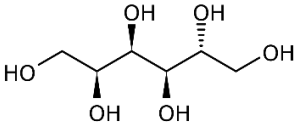
Ουρία



Γλυκερόλη



Γαλακτικό οξύ



Σορβιτόλη

Εικόνα 3: Δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών

Σημειώνεται, ότι τα περισσότερα DESs σε συνθήκες περιβάλλοντος βρίσκονται σε υγρή μορφή και εμφανίζουν μικρή πτητικότητα και η μεγαλύτερη αδυναμία τους είναι, ότι αποδομούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες.[26]

1.2.2 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες – Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs)

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents - NaDESs) αποτελούν ειδική κατηγορία των DESs, με τη βασική διαφορά ότι τα συστατικά τους προέρχονται από φυσικές πηγές. Το γεγονός αυτό, επιδεικνύει μεγαλύτερη συμμόρφωση με τις αρχές της πράσινης χημείας και τους καθιστά περιβαλλοντικά φιλικότερους. Όπως και οι DESs, έτσι και οι NaDESs, παράγονται απ' τα φυτά σε ακραίες συνθήκες, ενώ παράλληλα, βρίσκονται και σε ζωντανούς οργανισμούς και συνυπάρχουν με τις υδατικές και λιπιδικές φάσεις των κυττάρων, παίζοντας ρόλο στη μεταφορά και σύνθεση ουσιών. Στην περίπτωση δε σύνθεσης αυτών, χρησιμοποιούνται πρωτογενείς μεταβολίτες, όπως αμινοξέα (π.χ. προλίνη, αλανίνη), σάκχαρα (π.χ. σακχαρόζη, φρουκτόζη), οργανικά οξέα (π.χ. γαλακτικό οξύ, κιτρικό οξύ), πολυόλες (π.χ. γλυκερόλη, σορβιτόλη) και χολινικά παράγωγα (π.χ. χλωριούχος χολίνη). Σε ορισμένες περιπτώσεις προστίθεται και νερό ως τρίτο συστατικό. Αναμειγνύοντας τουλάχιστον δύο από αυτές τις ενώσεις σε συγκεκριμένη αναλογία (ένα συστατικό ως δότης και ένα ως δέκτης δεσμών υδρογόνου) σχηματίζονται οι NaDESs. Συμπερασματικά, απαρτίζονται από φυσικά συστατικά, τα οποία είναι μη τοξικά, άμεσα διαθέσιμα, βιοαποικοδομήσιμα και συνήθως οικονομικά, ενισχύοντας έτσι τη βιωσιμότητα των εφαρμογών τους.[13, 23, 25, 27-29]

Οι NaDESs ανακαλύφθηκαν το 2011 από τον Choi et al. στην προσπάθειά του να εξηγήσει την διαλυτότητα ενδοκυτταρικών ενώσεων που είναι αδιάλυτες στο νερό και στις λιπιδικές φάσεις. [30]

Οι εφαρμογές των NaDESs προσεγγίζουν εξαιρετικά αυτών των DESs, οι οποίες θα αναλυθούν σε επόμενη ενότητα. Συνοπτικά, παρέχουν προστασία σε ευαίσθητες ενώσεις και βρίσκουν εφαρμογή σε εκχυλίσεις βιοδραστικών ουσιών, όπως φαινολικές ενώσεις από φυτά, στη διαλυτοποίηση κυτταρίνης, αμύλου και DNA, στη σύνθεση οργανικών ενώσεων και στη δέσμευση διοξειδίου του άνθρακα.[23, 29, 31]

Η δυνατότητα επιλογής ανάμεσα σε ποικίλους δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου, καθώς και η προσαρμογή των αναλογιών τους, επιτρέπουν τον εξατομικευμένο σχεδιασμό των NaDESs ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε εφαρμογής. Τα κύρια πλεονεκτήματά τους περιλαμβάνουν τη βιωσιμότητα, την εύκολη και οικονομική παρασκευή χωρίς παραγωγή παραπροϊόντων, την ελάχιστη πτητικότητα και τοξικότητα, το ρυθμιζόμενο ιξώδες καθώς και τη βιοσυμβατότητά τους, καθιστώντας τους κατάλληλους για βιολογικές αντιδράσεις.[23]

Αποτελούν πολύτιμους διαλύτες με φυσικό και φιλικό προς το περιβάλλον χαρακτήρα, προσφέροντας μια εναλλακτική λύση έναντι των οργανικών διαλυτών και των ιοντικών υγρών. Ωστόσο, υπάρχει πολύ περιορισμένη έρευνα αναφορικά με αυτούς σε σχέση με άλλους διαλύτες και, συνεπώς, χαμηλή εμπορική διαθεσιμότητα για χρήση αυτών σε βιομηχανική κλίμακα.[23]

1.2.3 Μέθοδοι παρασκευής των DESs και των NaDESs

Η διαδικασία παρασκευής των DESs, και των NaDESs επακόλουθα, χαρακτηρίζεται γενικά ως μια απλή και οικονομική διεργασία. Αρχικά, απαιτείται η ύπαρξη ενός δότη (HBD) και ενός δέκτη (HBA) δεσμών υδρογόνου, ενώ συνήθως προστίθεται και νερό σε μικρή ποσότητα. Έπειτα, για τη σύνθεση των διαλυτών υπάρχουν ποικίλες μέθοδοι, όπως η θέρμανση, η εξάτμιση υπό κενό, η λυοφιλοποίηση, οι υπέρηχοι και τα μικροκύματα.

Η πιο απλή μεθοδολογία είναι η παρασκευή μέσω θέρμανσης και ανάδευσης. Κατά τη μέθοδο αυτήν, τα συστατικά που συνθέτουν το DES αναμειγνύονται στην επιθυμητή γραμμομοριακή αναλογία και τίθενται υπό συνεχή θέρμανση και ανάδευση έως ότου σχηματισθεί ένα ομοιογενές, διαυγές υγρό, χωρίς στερεά υπολείμματα. Η θερμοκρασία που επιλέγεται να εφαρμοσθεί κυμαίνεται μεταξύ 50°C και 80°C, χωρίς να ξεπεράσει τους 100°C σε καμία περίπτωση, καθώς υπάρχει κίνδυνος αποικοδόμησης των συστατικών του DES. Η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται σταθερή μέχρι τον πλήρη σχηματισμό του DES για 1-2 ώρες που ορίζει ο τυπικός χρόνος για τον σχηματισμό του DES.[23, 28, 32, 33]

Αναφορικά με την εξάτμιση υπό κενό, τα συστατικά για τον σχηματισμό του DES πρέπει να μην εμφανίζουν πτητικότητα και, αρχικά, διαλύονται σε επαρκή ποσότητα νερού. Κατόπιν, το νερό απομακρύνεται από το σύστημα μέσω εξάτμισης σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού σε θερμοκρασία 50°C. Το λαμβανόμενο υγρό DES τοποθετείται σε ξηραντήρα για πλήρη απομάκρυνση του νερού, έως ότου σταθεροποιηθεί το βάρος.[25, 28]

Μια εναλλακτική μέθοδος για την σύνθεση DES αποτελεί η μέθοδος της λυοφιλοποίησης. Συγκεκριμένα, τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση του DES διαλύονται σε νερό. Κατά την λυοφιλοποίηση το νερό απομακρύνεται και ανακτάται το τελικό DES. [25]

Ακόμη, οι υπέρηχοι έχουν εφαρμοστεί για την παρασκευή DES, τοποθετώντας σε λουτρό υπερήχων τα αντίστοιχα συστατικά που έχουν αναμειχθεί σε φιαλίδιο. Καθώς, όμως, η θερμοκρασία στο σύστημα αυξάνεται λόγω της χρήσης υπερήχων, απαιτείται θερμοστάτηση του λουτρού με κυκλοφορία του νερού. Η συσκευή υπερήχων ρυθμίζεται σε ισχύ 250 W και συχνότητα 40 kHz και η κατεργασία σταματάει, όταν σχηματιστεί ομοιογενές και διάφανο υγρό.[34]

Τέλος, έχουν χρησιμοποιηθεί και μικροκύματα για την παρασκευή DES, στα οποία υποβάλλονται τα επιμέρους συστατικά και το τελικό DES λαμβάνεται μέσα σε διάρκεια δευτερολέπτων.

1.2.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs και των NaDESs

Υπάρχουν διάφοροι συνδυασμοί συστατικών για σχηματισμό των DESs και, ως εκ τούτου, τα διάφορα DESs διαθέτουν ποικίλες ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές επηρεάζονται σημαντικά από τη δομή τους και μπορούν να τροποποιηθούν εύκολα αλλάζοντας τη σύνθεσή τους, ανάλογα με τα συστατικά και την μοριακή τους αναλογία, τη θερμοκρασία ή την προσθήκη νερού. Μερικές από τις πιο σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες που περιγράφουν το σύνολο των DESs αναλύονται παρακάτω. [33, 35-37]

- **Πτητικότητα και σημείο τήξεως**

Βασικό χαρακτηριστικό των DESs αποτελεί η πολύ χαμηλή τάση ατμών, η οποία οδηγεί σε χαμηλή πτητικότητα, ενώ το σημείο τήξης τους είναι σημαντικά χαμηλότερο από εκείνο των επιμέρους συστατικών που το απαρτίζουν. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στους διαλύτες να είναι σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (23±2°C) ή ακόμα και σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 0°C. . Η κύρια αιτία για τη μείωση του σημείου τήξης είναι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συστατικών, ενώ άλλοι παράγοντες είναι οι ενέργειες πλέγματος των ιοντικών ειδών των DESs, η φύση και η ασυμμετρία των οργανικών αλάτων και ο απεντοπισμός του φορτίου λόγω των δεσμών υδρογόνου. Αξίζει να αναφερθεί, ότι η προσθήκη νερού σε ορισμένους NaDESs δύναται να προκαλέσει περαιτέρω ταπείνωση στο σημείο τήξης.[16, 25, 37, 38]

- **Πολικότητα**

Η πολικότητα των DESs αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη διαλυτική τους ικανότητα. Οι περισσότεροι NaDESs είναι υδρόφιλοι, με εκείνους που περιέχουν οργανικά οξέα να είναι οι πιο πολικοί. Ακριβώς επόμενοι έρχονται οι NaDESs με αμινοξέα, ενώ αυτοί που έχουν ως βάση σάκχαρα και πολυόλες έχουν τη χαμηλότερη πολικότητα. Ως «χαμηλή» ορίζεται η πολικότητα που

τείνει σε αυτήν του νερού και της μεθανόλης. Έχει παρατηρηθεί, ότι η προσθήκη νερού ενισχύει την πολικότητα, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η διαλυτότητα των ενώσεων-στόχων. [25, 35, 38]

- **Πυκνότητα**

Η πυκνότητα των NaDESs είναι υψηλότερη από εκείνη του νερού και μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας και της προσθήκης νερού. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί, ότι μικρές αλλαγές στη μοριακή αναλογία των συστατικών δεν μεταβάλλουν σημαντικά την πυκνότητα.[25, 37]

- **Ιξώδες και επιφανειακή τάση**

Το ιξώδες των DESs παρουσιάζεται να είναι υψηλότερο από αυτό του νερού και πολλών οργανικών διαλυτών. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται κυρίως στους δεσμούς υδρογόνου, και σε μικρότερο βαθμό, στις δυνάμεις van der Waals και στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Σε γενικές γραμμές το ιξώδες μειώνεται εκθετικά με την αύξηση της θερμοκρασίας (νόμος Arrhenius), αλλά και με την προσθήκη νερού. Επιπλέον, μικρότερες ανθρακικές αλυσίδες συνδέονται με χαμηλότερες τιμές ιξώδους, όπως συμβαίνει, για παράδειγμα, με τους DESs που βασίζονται σε χλωριούχο χολίνη και βεταΐνη. Οι NaDESs έχουν ρυθμιζόμενο ιξώδες. Ωστόσο, οι υψηλές τιμές ιξώδους προσφέρουν μεγαλύτερη σταθερότητα στις ενώσεις που διαλύουν, όπως στις φαινόλες, προστατεύοντάς τις από οξειδωτική διάσπαση.[16, 25, 37, 38]

- **Αγωγιμότητα**

Η αγωγιμότητα επηρεάζεται άμεσα από τη σύσταση των NaDESs και ακολουθεί φθίνουσα τάση σύμφωνα με την παρακάτω σειρά:

$$\textit{βάση}\text{: }\textit{πολυαλκοόλη} > \textit{βάση}\text{: }\textit{οργανικό οξύ} \approx \textit{βάση}\text{: }\textit{σάκχαρο} >$$

$$> \textit{οργανικό οξύ}\text{: }\textit{μη πολικό αμινοξύ} > \textit{οργανικό οξύ}\text{: }\textit{σάκχαρο} > \textit{σάκχαρο}\text{: }\textit{σάκχαρο}$$

Επιπλέον, η αγωγιμότητά τους φαίνεται να αυξάνεται γραμμικά με τη θερμοκρασία.[25]

- **pH**

Το επιθυμητό pH των DESs εξαρτάται κάθε φορά από την εφαρμογή τους και επιλέγεται προκειμένου να προκαλεί την ελάχιστη δυνατή διάβρωση. Για παράδειγμα, στις διεργασίες όξινης υδρόλυσης βιομάζας επιλέγονται όξινοι DESs, όπως αυτοί με γαλακτικό οξύ. Ως γνωστόν, η τιμή του pH μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας (νόμος Arrhenius). [37]

- **Δείκτης διάθλασης**

Ο δείκτης διάθλασης των DESs αξιοποιείται συνήθως για να ελεγχθεί η καθαρότητά τους και μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Για διαφανή υγρά ο δείκτης διάθλασης κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1-2, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στα DESs που περιέχουν γαλακτικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ σε θερμοκρασία δωματίου 23±2°C παρουσιάζει δείκτη διάθλασης μεταξύ των τιμών 1.4397 και 1.4620).[25, 37]

- **Θερμικές ιδιότητες**

Οι DESs εμφανίζουν υψηλή θερμική σταθερότητα, με εξαίρεση αυτούς που περιέχουν σάκχαρα. Είναι γεγονός, μάλιστα, ότι κάποια καθαρά συστατικά των DESs μόνα τους είναι πιο ασταθή σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ μέσα στο DES σταθεροποιούνται λόγω των δεσμών υδρογόνου. Τέλος, οι διαλύτες αυτοί παρουσιάζουν πολύ υψηλή θερμοχωρητικότητα και είναι κατάλληλοι για χρήση σε ένα εύρος 0-100°C. Το γεγονός αυτό, τους δίνει ένα πολύτιμο πλεονέκτημα για πολλές διεργασίες.[10, 25, 37, 38]

1.2.5 Εφαρμογές των DESs και των NaDESs

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, υπάρχουν πολλοί λόγοι οι οποίοι καθιστούν τους DESs εξαιρετικούς εναλλακτικούς διαλύτες για πληθώρα εφαρμογών. Συνοπτικά, ο πράσινος χαρακτήρας τους, τα μοναδικά χαρακτηριστικά τους, όπως η χαμηλή τάση ατμών, η καλή αγωγιμότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα και η μη τοξικότητά τους δίνουν τη δυνατότητα για εκτεταμένη εφαρμογή σε διεργασίες, όπως η κατάλυση, στην ηλεκτροχημεία, στη νανοτεχνολογία, στην επεξεργασία της βιομάζας, στην εκχύλιση, στην βιοτεχνολογία, στην βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών. Ένα επιπλέον δυνατό χαρακτηριστικό τους είναι ότι μπορούν να διαλυτοποιούν επιτυχώς την κυτταρίνη, το DNA και ενώσεις με αυξημένη λιποφιλία.[21, 23, 25]

Στην παρούσα μελέτη η εφαρμογή των DESs που θα εξεταστεί εκτενέστερα έγκειται στην ικανότητά τους να κάνουν τις δραστικές ουσίες φαρμακευτικών σκευασμάτων να είναι πιο σταθερές, να έχουν μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα, με αποτέλεσμα την απαίτηση μικρότερης ποσότητας φαρμάκου για την ίδια φαρμακολογική δράση. Επιπλέον, με την βοήθεια των DESs οι δραστικές ουσίες αφομοιώνονται και κατανέμονται καλύτερα στον οργανισμό, μιας και διευκολύνεται η διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Ωστόσο, επιπλέον εφαρμογή τους στην φαρμακευτική βιομηχανία αποτελεί η χρήση τους ως διαλυτών για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτικές πηγές και ως μέσο διαλυτοποίησης δυσδιάλυτων στο νερό ενώσεων. Τα χαρακτηριστικά που τους καθιστούν τόσο κατάλληλους για αυτές τις διεργασίες είναι η φυσική τους προέλευση, σε συνδυασμό με την μη τοξικότητα, τη σταθερότητα και τη βιοσυμβατότητά τους.[25, 39]

Βέβαια, η πιο διαδεδομένη εφαρμογή των DESs είναι η εκχύλιση ενώσεων. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, εμφανίζουν μεγάλη διαλυτική ικανότητα σε φυσικές ενώσεις, με μεγάλο εύρος πολικότητας, με αποτέλεσμα να εκχυλίζουν πλήθος βιοδραστικών ενώσεων, όπως φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή από φυσικά προϊόντα. Η δομή τους είναι αυτή που τους προσδίδει αυτήν την ικανότητα και, συγκεκριμένα, το δίκτυο δεσμών υδρογόνου που συμβάλλει στη δημιουργία δεσμών ανάμεσα στο DES και την εκχυλιζόμενη ένωση, με αποτέλεσμα την καλύτερη διαλυτοποίηση και την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης. Επιπλέον, έχουν τη δυνατότητα να καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα, απελευθερώνοντας άμεσα τις επιθυμητές ενώσεις. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η εκχυλιστική ικανότητα των DESs υπερτερεί αυτής των οργανικών διαλυτών σε ορισμένες περιπτώσεις.[25]

Ο ρόλος των DESs στην επεξεργασία της βιομάζας είναι, επίσης, πολύ σημαντικός. Συγκεκριμένα, οι DESs χρησιμοποιούνται ως διαλύτες στην προκατεργασία της βιομάζας κατά τον διαχωρισμό της σε λιγνίνη, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Ο τρόπος με τον οποίον επιτυγχάνεται αυτό έγκειται στο γεγονός ότι οι περισσότεροι DESs διαλυτοποιούν σε μεγάλο βαθμό την λιγνίνη, ενώ η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη παραμένουν ελάχιστα ή καθόλου διαλυτές. Η διαλυτότητα σε λιγνίνη μπορεί να ενισχυθεί αφενός με αύξηση της περιεκτικότητας του δότη ηλεκτρονίων του DES, ενισχύοντας το δίκτυο δεσμών υδρογόνου, με αποτέλεσμα η λιγνίνη να «προσκολλάται» πιο ισχυρά στο διαλύτη, και αφετέρου με προσθήκη μικρής ποσότητας νερού. Σε επόμενο στάδιο της ίδιας διεργασίας, ο DES μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης και για την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης προς σχηματισμό σακχάρων, ενώ στο τέλος μπορεί να ανακτηθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί αμετάβλητος για πολλές φορές. Γίνεται φανερό, λοιπόν, ότι οι DESs μπορούν να αντικαταστήσουν πλήρως τους τοξικούς οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην κατεργασία βιομάζας, να μειώσουν το κόστος και να βελτιώσουν το περιβαλλοντικό αντίκτυπο της διεργασίας.[25, 40]

Επιπροσθέτως, στον τομέα των βιοκαταλύσεων, οι διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα για την επίτευξη ενζυμικών αντιδράσεων. Πιο αναλυτικά, ο DES λειτουργεί πάλι ως διαλύτης, αυτή τη φορά για το ένζυμο και το υπόστρωμα, παρουσιάζοντας, μάλιστα, αυξημένη ενζυμική ενεργότητα σε σχέση με τα συμβατικά χρησιμοποιούμενα μέσα αντίδρασης. Παράλληλα, συμβάλλουν στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας των ενζύμων σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και δίνουν τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του ίδιου ενζύμου για εκτενέστερο χρονικό

διάστημα. Ειδικότερα, ο τρόπος με τον οποίον δρα ο συγκεκριμένος διαλύτης είναι δημιουργώντας ρήγματα τις κυτταρικές μεμβράνες. Με τον τρόπο αυτό, το ένζυμο και το υπόστρωμα αλληλεπιδρούν πιο άμεσα, αυξάνοντας την αποδοτικότητα της διεργασίας. Ωστόσο, είναι πολύ σημαντική η σωστή επιλογή του DES ανάλογα με τις ανάγκες της αντίδρασης προκειμένου να επιτευχθούν βέλτιστες συνθήκες.[25, 41]

Μια λιγότερο δημοφιλής εφαρμογή των DESs βρίσκεται στις ηλεκτροχημικές εφαρμογές, γεγονός που στηρίζεται στην καλή αγωγιμότητα που εμφανίζουν. Τέτοιες εφαρμογές είναι η ανίχνευση πολυφαινολών, χρησιμοποιώντας ποσότητα DES ως ηλεκτρολύτη για να ενισχυθεί το ληφθέν σήμα. Επιπλέον εφαρμογή αποτελεί η εναπόθεση ιόντων μετάλλων σε επιφάνειες και γενικότερα η επεξεργασία μετάλλων.[42, 43]

Τέλος, οι DESs χρησιμοποιούνται και ως κινητή φάση σε χρωματογραφικές στήλες, αφού μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να έχουν την επιθυμητή πολικότητα και συγγένεια με τις ενώσεις που πρόκειται να διαχωριστούν, διευκολύνοντας σε εξαιρετικό βαθμό τη συνολική διαδικασία.[44]

1.2.6 Πλεονεκτήματα των DESs και των NaDESs έναντι άλλων πράσινων διαλυτών

Οι DESs παρουσιάζονται να έχουν ποικίλες εφαρμογές σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας, π.χ. φαρμάκων, ενέργειας, κατάλυσης, ηλεκτροχημείας, και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα να συνιστούν μια πολλά υποσχόμενη νέα γενιά διαλυτών. Οι διαλύτες αυτοί εναρμονίζονται με τις σύγχρονες ανάγκες για μείωση του κόστους παραγωγής και την προστασία του περιβάλλοντος και συμμορφώνονται με πολλές από τις αρχές της πράσινης χημείας (βλ. Εικόνα 1). Πιο συγκεκριμένα, ικανοποιούνται η 1η και η 2η αρχή, καθώς συντίθενται χωρίς να δημιουργούν απόβλητα και παραπροϊόντα με μεγάλη οικονομία ατόμων. Επιπλέον, ικανοποιείται η 5η αρχή, καθώς από τη φύση τους είναι αβλαβείς για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, και η 6η αρχή, καθώς όταν εφαρμόζονται σε εκχυλίσεις αυξάνουν την απόδοση και δίνουν την δυνατότητα να πραγματοποιηθούν σε θερμοκρασία και πίεση περιβάλλοντος, προκαλώντας χαμηλότερο ενεργειακό αποτύπωμα. Ακόμη, είναι βιοαποικοδομήσιμα σε βάθος χρόνου, διότι διασπώνται στα επιμέρους συστατικά φυσικής προέλευσης, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την 10η αρχή. Τέλος, εμφανίζουν χαμηλή έως και μηδενική τοξικότητα, δεν είναι εύφλεκτα ή εκρηκτικά, συνεπώς είναι σύμφωνα και με την 12η αρχή της πράσινης χημείας.

Ωστόσο, εγείρεται ένα εύλογο ερώτημα σχετικά με τα πλεονεκτήματα των DESs και NaDESs έναντι άλλων "πράσινων" διαλυτών, όπως τα ιοντικά υγρά. Οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά και των τριών ειδών διαλυτών παρουσιάζονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα. Ωστόσο, μερικές από τις σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των ILs και των DESs είναι ο πράσινος χαρακτήρας, καθώς οι πρώτοι δεν συντίθενται από αμιγώς φυσικές ενώσεις σε αντίθεση με τους δεύτερους. Ακόμη, η διαδικασία παρασκευής τους είναι πιο σύνθετη, υπάρχει μεγάλος περιορισμός σχετικά με την επιλογή συστατικών που θα τους απαρτίζουν και των μεταξύ τους αναλογιών. Επιπλέον, υπάρχουν δυσκολίες στην εφαρμογή τους σε μεγάλη κλίμακα και σε ποικίλα συστήματα. Στον αντίποδα εμφανίζονται οι DESs και NaDESs, οποίοι είναι πολύ πιο φιλικοί προς το περιβάλλον, με μεγαλύτερη ποικιλία και δυνατότητες σχεδιασμού, μεγαλύτερη οικονομική αποδοτικότητα, ενώ δίνουν τη δυνατότητα εφαρμογής σε περισσότερα συστήματα. Συνολικά, αυτές οι τρεις κατηγορίες πράσινων διαλυτών αρχικά παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες σχετικά με τις ιδιότητές τους, αλλά σε βαθύτερη ανάλυση εντοπίζεται μια υπεροχή από την πλευρά των DESs και των NaDESs. [25, 41, 45]

Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται συγκριτικά κάποιες από τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των ILs, DESs και των NaDESs. [13, 46- 51]

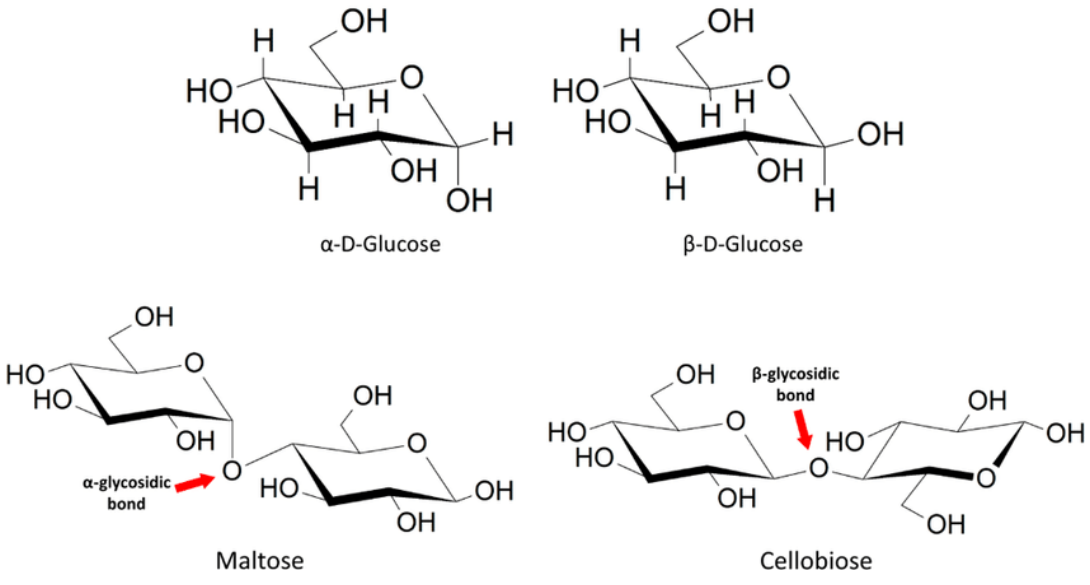
Πίνακας 1: Σύγκριση ιδιοτήτων ιοντικών υγρών, βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών

Ιοντικά Υγρά (ILs)	Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DESs)	Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDESs)
Δύσκολη προετοιμασία	Εύκολη προετοιμασία	Εύκολη προετοιμασία
Βασίζονται σε ιμιδαζόλια, φωσφόνια και πυριδίνια	Εύκολη διαθεσιμότητα πρώτων υλών (διαθεσιμότητα για μεγάλης κλίμακας διεργασίες)	Φυσικές πρώτες ύλες, πρωτογενείς μεταβολίτες
Τοξικοί/Βιοτοξικοί (σε ορισμένες περιπτώσεις)	Μη τοξικές πρώτες ύλες	Μη τοξικοί
Υψηλό κόστος παραγωγής	Χαμηλό κόστος παραγωγής	Χαμηλό κόστος παραγωγής
Δύσκολη εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα	Εύκολη εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα	Εύκολη εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα
Εφαρμογές: Οργανική Χημεία, Ηλεκτροχημεία, Κατάλυση, Αναλυτική Χημεία, Χημική Μηχανική	Εφαρμογές: Τρόφιμα, Φαρμακοβιομηχανία, Ηλεκτροχημεία	

1.3 Πολυσακχαρίτες – Αλγινικό

Οι πολυσακχαρίτες είναι ένα είδος υδατανθράκων, οι οποίοι παράγονται από συνδεδεμένους μονοσακχαρίτες (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη) ή δισακχαρίτες (σακχαρόζη, λακτόζη) με γλυκοσιδικούς δεσμούς. Οι δεσμοί αυτοί είναι ομοιοπολικοί και ενώνουν δύο μονοσακχαρίτες μεταξύ τους αφαιρώντας μια υδροξυλική ομάδα (-OH) ενός άνθρακα από τον έναν μονοσακχαρίτη και ένα υδρογόνο μιας υδροξυλικής ομάδας από τον άλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αφαίρεση ενός μορίου νερού (H_2O) και ως εκ τούτου η αντίδραση ονομάζεται και αντίδραση συμπύκνωσης.[52, 53]

Στην ακόλουθη εικόνα φαίνεται ένα παράδειγμα της αντίδρασης που περιγράφηκε, όταν τα δύο ανωμερή της γλυκόζης, η α- και η β-μορφή, συνδέονται μέσω του (1→4) γλυκοσιδικού δεσμού για σχηματισμό αφενός της μαλτόζης και αφετέρου της κελλοβιόζης.



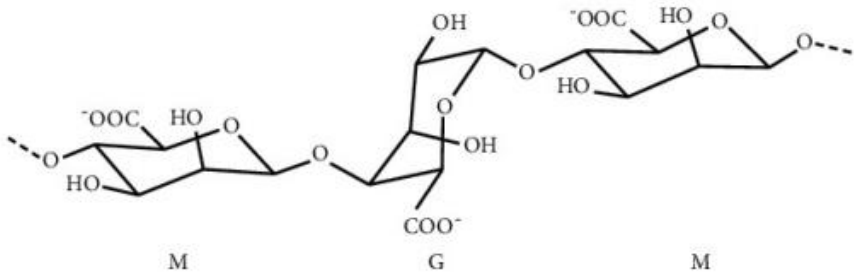
Εικόνα 4: Σχηματισμός γλυκοσιδικού δεσμού μεταξύ δύο μονοσακχαριτών

Οι μεγαλύτερες ποσότητες πολυσακχαριτών προέρχονται από τα φυτά, οι οποίες ξεπερνούν κατά πολύ την παραγωγή των πολυσακχαριτών μέσω συνθετικών διαδικασιών βιομηχανικά. Οι πολυσακχαρίτες συντίθενται από τα φυτά προκειμένου να συμβάλουν στην αποθήκευση ενέργειας (βασική λειτουργία του αμύλου) στην δομική στήριξη των φυτικών κυττάρων, όπως κάνει η κυτταρίνη, καθώς και στον σχηματισμό ενδοκυτταρικής μήτρας αποθηκεύοντας διάφορα ιόντα όπως νατρίου, ασβεστίου και μαγνησίου. Η τελευταία είναι η κυρίαρχη δράση του αλγινικού, το οποίο εντοπίζεται κυρίως στα καφέ φύκια, και είναι ο πολυσακχαρίτης που θα μας απασχολήσει περισσότερο στη συνέχεια της εργασίας αυτής.[55]

Εκτός από τους φυτικούς, οι πολυσακχαρίτες εντοπίζονται και στους ζωικούς οργανισμούς, στους οποίους έχουν κυρίως δομικό ρόλο. Συγκεκριμένα, στα ασπόνδυλα ζώα όπως τα σαλιγκάρια, οι μέδουσες και τα έντομα, οι πολυσακχαρίτες, όπως η χιτίνη, αποτελούν τα βασικά συστατικά των εξωσκελετών τους, προσφέροντας προστασία και στήριξη. Παράλληλα, στους ζωικούς ιστούς, οι πολυσακχαρίτες είναι σημαντικό μέρος των εξωκυττάριων μητρών, συμβάλλοντας στην κυτταρική συνοχή και ανάπτυξη. Το πλέγμα που σχηματίζουν λειτουργεί ως πορώδες διάφραγμα, επιτρέποντας τη διάχυση θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου στα κύτταρα. Ακόμη, οι πολυσακχαρίτες βρίσκονται και στον ανθρώπινο οργανισμό, όπου ανταποκρίνονται σε εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα, ικανότητα η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί για την πρόκληση ενός θεραπευτικού αποτελέσματος σε επιθυμητό χρόνο και στόχο.[56, 57]

Αναφορικά με την κατηγοριοποίηση των πολυσακχαριτών, αυτοί ταξινομούνται σε ομοπολυσακχαρίτες (π.χ. άμυλο, γλυκογόνο, κυτταρίνη, χιτίνη) και ετεροπολυσακχαρίτες (υαλουρονικό οξύ, ηπαρίνη) ανάλογα με το αν προέρχονται από το ίδιο είδος μονοσακχαριτών ή όχι, αντίστοιχα. Άλλος διαχωρισμός γίνεται σύμφωνα με το ηλεκτρικό τους φορτίο σε κατιονικούς, ανιονικούς ή μη ιονικούς πολυσακχαρίτες. Επιπλέον, οι πολυσακχαρίτες διακρίνονται σε φυτικούς ή ζωικούς και σε γραμμικούς ή με διακλαδώσεις.

Τα αλγινικά οξέα είναι γραμμικοί, μη διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες αποτελούμενοι από γραμμικά διατεταγμένες αλυσίδες α-L-γουλουρονικού (G) οξέος και β-D-μανουρονικού οξέος (M) συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω 1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς σε ποικίλες αναλογίες, ανάλογα με την προέλευσή τους. Η δομή τους αποτυπώνεται στην εικόνα που ακολουθεί.[58]



Εικόνα 5: Χημική δομή αλγινικού οξέος

Το οξύ αυτό χαρακτηρίζεται ως φυσικό ανιονικό πολυμερές, το οποίο εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα των καφέ φυκιών που βρίσκονται στη θάλασσα. Εναλλακτικά, δύναται η σύνθεσή του και από βακτήρια. Η εξαγωγή του από τα ακατέργαστα θαλάσσια φύκια γίνεται με ξήρανση αυτών, χημική απομάκρυνση των ακαθαρσιών, εμβάπτιση σε αλκαλικά διαλύματα, συνήθως νατρίου (NaOH), όπου το φυσικό αλγινικό σε διάφορες μορφές αλατιού μετατρέπεται σε υδατοδιαλυτό αλγινικό νάτριο. Έτσι, τα αλγινικά οξέα είναι εμπορικά διαθέσιμα ως «άλας νατρίου του αλγινικού οξέος», ή αλλιώς, «αλγινικό νάτριο».[59- 62]

Ο συγκεκριμένος πολυσακχαρίτης παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, όπως την άμεση διαθεσιμότητά του, τον πράσινο χαρακτήρα του, το χαμηλό κόστος και την μεγάλη διάρκεια ζωής. Επιπλέον, είναι μη τοξικό, γεγονός που το καθιστά ασφαλές υλικό να χρησιμοποιηθεί στο ανθρώπινο σώμα (π.χ. σε πληγές ή κοιλότητες). Αυτά τα χαρακτηριστικά του μαζί με πολλά άλλα πλεονεκτήματά του, όπως η βιοσυμβατότητα, η υδροφιλία και η βιοαποικοδημησιμότητα, έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη πολλαπλών εφαρμογών του στον τομέα της βιοϊατρικής.[59]

Ωστόσο, η ιδιότητα που προκαλεί το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στο πλαίσιο αυτής της μελέτης είναι η ικανότητά του να σχηματίζει γέλη, καθιστώντας το αλγινικό κατάλληλο για εφαρμογές, για παράδειγμα στην επούλωση πληγών. Η πιο χαρακτηριστική ιδιότητα του αλγινικού είναι η ικανότητά του να σχηματίζει γέλη. Ουσιαστικά, λειτουργεί ως μεμβράνη που επιτρέπει την ανταλλαγή ιόντων με το αίμα. Για παράδειγμα, όταν μια αδιάλυτη στο νερό ίνα αλγινικού ασβεστίου έρθει σε επαφή με τις εκκρίσεις μιας πληγής, τα ιόντα ασβεστίου ανταλλάσσονται με ιόντα νατρίου από τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα απελευθερωμένα ιόντα ασβεστίου λειτουργούν ως αιμοστατικός παράγοντας. Επιπλέον, καθώς μια ίνα αλγινικού ασβεστίου μετατρέπεται σταδιακά σε αλγινικό νάτριο, απορροφά μεγάλη ποσότητα εκκρίσεων και μετασχηματίζεται σε γέλη, βοηθώντας στη διατήρηση της υγρασίας, και δια τούτου της θερμοκρασίας, στην επιφάνεια της πληγής. Αυτός, πρακτικά, είναι ο βασικός μηχανισμός για την επούλωση πληγών.[63]

Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί, ότι το αλγινικό σε όξινα pH συρρικνώνεται, ενώ σε αλκαλικά pH διογκώνεται. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται ακριβώς αντίστροφα σε άλλους πολυσακχαρίτες, όπως για παράδειγμα τη χιτοζάνη. Αυτή η ιδιότητα καθιστά το αλγινικό εξαιρετικά χρήσιμο για την ανάπτυξη συστημάτων ελεγχόμενης απελευθέρωσης και προστασίας σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Για παράδειγμα, στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, το αλγινικό συρρικνώνεται, εμποδίζοντας την απελευθέρωση του φαρμάκου. Όταν το σύστημα φτάσει στο πιο αλκαλικό περιβάλλον του εντέρου, το αλγινικό διογκώνεται και απελευθερώνει το φάρμακο, προσφέροντας στοχευμένη και καθυστερημένη δράση.

Τέλος, η ικανότητα των υδατικών διαλυμάτων αλγινικών αλάτων να σχηματίζουν νανοσωματίδια μέσω δισθενών ιόντων, κυρίως ασβεστίου (ιονοτροπική πηκτωματοποίηση), έχει μελετηθεί εκτενώς για την ανάπτυξη συστημάτων παρατεταμένης ή ελεγχόμενης χορήγησης θεραπευτικών ουσιών.[58, 64]

Το αλγινικό ανακαλύφθηκε το 1881, αλλά ανά τα χρόνια αξιοποιήθηκε σε πληθώρα εφαρμογών. Αρχικά, εφαρμόστηκε στην επικάλυψη πληγών χάρη στις εξαιρετικές ιδιότητες που προαναφέρθηκαν και κυκλοφόρησε στην αγορά με το εμπορικό όνομα «Sorbsan». Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε ως σταθεροποιητής, γαλακτωματοποιητής, πηκτικός παράγοντας και παράγοντας σχηματισμού γέλης στις βιομηχανίες υφασμάτων, τροφίμων, ποτών και καλλυντικών και στη φαρμακευτική βιομηχανία για αναγέννηση των σκελετικών μυών, την παρασκευή παρειακών, ρινικών, οφθαλμικών και γαστρεντερικών δοσολογικών σκευασμάτων και ως υπόστρωμα για την απορρόφηση βαρέων μετάλλων.[65, 6766]

1.4 Γέλες

1.4.1 Υδρογέλες – Hydrogels

1.4.1.1 Εισαγωγή στις υδρογέλες

Οι υδρογέλες είναι τρισδιάστατα δίκτυα πολυμερών συνδεδεμένα με σταυροδεσμούς, που διακατέχονται από πορώδη δομή. Το βασικότερο χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητα να απορροφούν και να συγκρατούν μεγάλες ποσότητες νερού. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε μεγάλη αύξηση του όγκου και της μάζας τους, χωρίς, όμως, να τροποποιεί την τρισδιάστατη δομή τους. Επιπλέον, σημαντική είναι και η ιδιότητά τους να παραμένουν αδιάλυτες στο νερό, γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη σταυροδεσμών στη σύνθεσή τους.[67, 68]

Κάποιες υδρογέλες, όπως το κολλαγόνο και η ζελατίνη απαντώνται στη φύση, όμως υπάρχει η δυνατότητα, επίσης, να παρασκευαστούν συνθετικά. Για την παρασκευή τους, χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα υδατοδιαλυτών μονομερών ή πολυμερών με διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες. Η επιλογή του συστατικού καταλαμβάνει καθοριστικό ρόλο για τον χαρακτήρα του πολυμερισμού και τον σχηματισμό υδρογέλης, ορίζοντας την πυκνότητα των δεσμών στο σχηματιζόμενο δίκτυο, την σταθερότητα του τελικού προϊόντος και την ποσότητα νερού που μπορεί να δεσμεύσει ανάλογα με τον αριθμό των υδρόφοβων ομάδων. Συνήθως, επιλέγονται πολυμερή με οικολογικό χαρακτήρα που προέρχονται από πολυσακχαρίτες. Τέτοιοι πολυσακχαρίτες είναι η χιτοζάνη, το άμυλο, η κυτταρίνη, το αλγινικό, η πηκτίνη και η αγαρόζη. Εναλλακτικά, αποτελούνται από πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο και η ζελατίνη.[69-73]

Η σύνδεση των δομικών μονάδων των υδρογελών μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με χημική είτε με φυσική διασταύρωση, δημιουργώντας χημικούς ή φυσικούς σταυροδεσμούς, αντίστοιχα. Από την μια πλευρά, η χημική διασύνδεση δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα οι γέλες να χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα. Οι χημικά διασταυρούμενες υδρογέλες είναι πολύ ισχυρότερες και σταθερότερες σε θερμότητα, και με μεγαλύτερες μηχανικές αντοχές έναντι των φυσικών. Από την άλλη πλευρά, η φυσική διασύνδεση δημιουργεί αναστρέψιμους δεσμούς, οι οποίοι είναι λιγότερο σταθεροί. Ωστόσο, οι φυσικά διασταυρούμενες υδρογέλες, είναι κατάλληλες για εγκλεισμό ασταθών βιοδραστικών ουσιών και ζωντανών κυττάρων. Κατά την παρασκευή υδρογελών με χημικές διασυνδέσεις απαιτεί η ύπαρξη cross-linkers, οι οποίοι αντιδρούν με τις λειτουργικές ομάδες, όπως το υδροξύλιο, το καρβοξύλιο και η αμινομάδα. Αντίθετα, οι υδρογέλες με φυσικές διασυνδέσεις πλεονεκτούν σε αυτόν τον τομέα, καθώς δεν χρειάζονται cross-linkers, οι οποίοι είναι τοξικοί και πρέπει να απομακρύνονται στο τέλος. Σε αυτήν την περίπτωση, χρησιμοποιούνται διαφορετικοί τρόποι παρασκευής, όπως θέρμανση ή ψύξη του διαλύματος πολυμερούς, ιονοτροπική ζελατινοποίηση, κατάψυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες και απόψυξη ή ανάμειξη πολυμερών.[69, 71-75]

Παράλληλα, εμφανίζεται ένας νέος τύπος υδρογέλης, ο οποίος συντίθεται από χημικά και φυσικά διασυνδεδεμένες υδρογέλες και, ως εκ τούτου, εμφανίζει ανώτερες μηχανικές και βιολογικές ιδιότητες. Οι σύνθετες αυτές γέλες χρησιμοποιούνται στην ενθυλάκωση των κυττάρων.[76]

Συνοψίζοντας, οι διάφορες μέθοδοι διασύνδεσης παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, όμως, η επιλογή τους παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση των μηχανικών και βιοχημικών ιδιοτήτων των υδρογελών, καθώς και στη λειτουργία αυτών.

1.4.1.2 Ιδιότητες υδρογελών

Όπως προαναφέρθηκε, η δομή των υδρογελών καθορίζει και τις ιδιότητές τους. Σχεδόν όλες οι υδρογέλες είναι βιοαποικοδομήσιμες, βιοσυμβατές και μη τοξικές, αφού προέρχονται από πολυμερή φυσικής προέλευσης. Ωστόσο, κάποιες συνθετικές υδρογέλες στερούνται αυτών των ιδιοτήτων, αλλά μπορούν να προσαρμοστούν με τροποποίηση της λειτουργικής ομάδας ή την ενσωμάτωση φυσικών πολυμερών.[77]

Συμπληρωματικά, οι υδρογέλες παρουσιάζουν αντιβακτηριδιακές ιδιότητες, ικανοποιητική μηχανική αντοχή και ελαστικότητα, και, συγχρόνως, έχουν την ικανότητα να εγκλείσουν βιοδραστικές ενώσεις. Ωστόσο, εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία σε εξωτερικά ερεθίσματα και μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως το pH και η θερμοκρασία. Βέβαια, η ευαισθησία αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί για εφαρμογές, όπως αποδεσμεύσεις φαρμάκων, βιοαισθητήρες, ικριώματα μηχανικής ιστών, τεχνητά όργανα, επιδέσμους πληγών και φακούς επαφής.[73, 78]

Η ύπαρξη υδρόφιλων ομάδων στη δομή τους, όπως -NH_2 , -COOH, -OH, -$CONH_2$, -CONH, -SO_3H, τους δίνει τη δυνατότητα να απορροφούν μεγάλη ποσότητα νερού, χωρίς να διαλύονται σε αυτό. Η ικανότητα συγκράτησης νερού των γελών περιγράφεται από το ποσοστό διόγκωσης που

αποκαλείται “swelling capacity” και υπολογίζεται από τον λόγο της μάζας του κατακρατούμενου νερού και της μάζας της ξηρής γέλης στην αρχική της μορφή και εκφράζεται σε g νερού ανά g ξηρής υδρογέλης. Το ποσοστό αυτό αποτελεί άμεση συνάρτηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς και της πυκνότητας των σταυροδεσμών. Πιο συγκεκριμένα, για να παρουσιάζει μια υδρογέλη μεγάλο ποσοστό διόγκωσης και μεγάλη σταθερότητα, απαιτείται χαμηλή πυκνότητα διασύνδεσης. [79, 80]

Επιπλέον, η ύπαρξη σταυροδεσμών στη δομή τους, τις καθιστά αδιάλυτες στο νερό. Πιο αναλυτικά, οι σταυροδεσμοί είναι αλυσίδες μακρομορίων πολύ στενά συνδεδεμένων, γεγονός που προσδίδει εξαιρετική σταθερότητα. Το μέγεθος του πλέγματος αυτού και το μοριακό βάρος αυτής της αλυσίδας καθορίζουν εξ ολοκλήρου τις ιδιότητες της γέλης. Αξίζει να σημειωθεί ότι το πορώδες αυτών των δομών παρουσιάζει ομοιότητα με τη δομή των ζωντανών ιστών.[81]

1.4.1.3 Κατηγορίες υδρογελών

Όπως προαναφέρθηκε, οι υδρογέλες ταξινομούνται ανάλογα με τις διασυνδέσεις των μακρομορίων, στις χημικές ή μόνιμες γέλες και τις φυσικές ή αναστρέψιμες. Άλλη ταξινόμηση μπορεί να γίνει με βάση την φυσική τους δομή σε: άμορφες, ημι-κρυσταλλικές και υδρογέλες με δεσμούς υδρογόνου. Επιπλέον, ανάλογα με το φορτίο τους κατατάσσονται σε ουδέτερες, ανιοντικές, κατιοντικές και αμφολυτικές. Τέλος, αναφορικά με τη μέθοδο σύνθεσης διακρίνονται σε υδρογέλες ομοπολυμερών, συμπολυμερών ή πολύ-πολυμερών.[71]

Είναι φανερό ότι οι υδρογέλες που συντίθενται από φυσικά πολυμερή είναι από τη φύση τους ασφαλείς, μη τοξικές, βιοσυμβατές και βιοδιασπώμενες. Συνολικά, παρουσιάζουν έναν πράσινο χαρακτήρα που τις καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες για τη δημιουργία νέων συστημάτων μεταφοράς και απελευθέρωσης φαρμάκων. Σε αντιδιαστολή, οι συνθετικές υδρογέλες αποφαίνονται συχνά να είναι τοξικές, φαινόμενο το οποίο καλείται να αντιμετωπίσει η πράσινη χημεία.

Τα διάφορα ρεολογικά χαρακτηριστικά (από παχύρρευστα υγρά μέχρι άκαμπτα στερεά) των υδρογελών καθορίζονται ανάλογα με την μέθοδο που επιλέγεται και την τεχνική πολυμερισμού. Επιπλέον, ανάλογα με τη μέθοδο παρασκευής επηρεάζεται και ο ρυθμό κατακράτησης, καθώς παρουσιάζουν διαφορετικά σχήματα και δομές, όπως σφαίρες, μήτρες, δισκία, κάψουλες, βελόνες και διασπορές.

1.4.1.4 Εφαρμογές υδρογελών

Οι υδρογέλες ανά τα χρόνια έχουν παρουσιάσει ποικίλες εφαρμογές λόγω των ιδιοτήτων τους. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ικανότητά τους να προσαρμόζονται κατάλληλα ανάλογα με τις μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών. Για παράδειγμα, έχουν λάβει εφαρμογές σε φακούς επαφής[99], έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς φαρμάκων[100], ως επίδεσμοι τραυμάτων.[101] Στον τομέα αυτό της βιοϊατρικής οι υδρογέλες πλεονεκτούν ως φορείς φαρμάκων έναντι της συμβατικής χορήγησης φαρμάκων λόγω της ιδιότητας που προαναφέρθηκε, η οποία συμβάλλει στη βελτιστοποίηση της βιοδραστικότητας, της ελεγχόμενης αποδέσμευσης και της μείωσης των παρενεργειών των φαρμακευτικών ουσιών, για παράδειγμα, κατά του καρκίνου και του διαβήτη, οι οποίοι παρουσιάζουν τοπικές φυσιολογικές αλλαγές ανάλογα με το στάδιο της ασθένειας.[102]

Επιπλέον, τις πρόσφατες δεκαετίες, οι ερευνητές κατάφεραν να αναπτύξουν και να βελτιώσουν τις υδρογέλες, προσδίδοντας τους ευελιξία[103], αυτοθεραπευτική ικανότητα[104], αντιβακτηριδιακή δράση[105], αγωγιμότητα[106], shape-memory[107] και shape-morphing[108], γεγονός που αναμένεται να επεκτείνει τις εφαρμογές τους και σε άλλους κλάδους, όπως τη ρομποτική[109] και την ηλεκτρονική[110].

Συμπληρωματικά, υπάρχουν αναφορές ότι συμμετέχουν αποτελεσματικά στον εγκλεισμό ενζύμων για βιοκαταλυτικές αντιδράσεις και χρησιμοποιούνται σε συστήματα βιοαισθητήρων ως αγωγοί, στην επεξεργασία ρύπων (συγκράτηση μετάλλων) και σε συστήματα αποθήκευσης νερού.[67, 73]

1.4.2 Ευτηκτογέλες – Eutectogels

1.4.2.1 Εισαγωγή στις ευτηκτογέλες

Οι ευτηκτογέλες (eutectogels) είναι συστήματα παραπλήσια με τις υδρογέλες που προαναφέρθηκαν. Ειδικότερα, όμως, αποτελούνται από μια υγρή φάση και ένα στερεό μέσο ακινητοποίησης. Η υγρή φάση στην περίπτωση των ευτηκτογελών είναι οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DESs), σε αντίθεση με τις υδρογέλες, οι οποίες αποτελούνται από νερό. Για περεταίρω ενίσχυση του πράσινου χαρακτήρα των ευτηκτογελών χρησιμοποιούνται φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDESs). Ουσιαστικά, στην περίπτωση αυτή, ο NaDES ζελατινοποιείται με την προσθήκη του gelator, για παράδειγμα του πολυσακχαρίτη, δημιουργώντας το πλέγμα της ευτηκτογέλης, το οποίο είναι πολύ διαφορετικό από αυτό της υδρογέλης. Υπενθυμίζεται, ότι στην περίπτωση των υδρογελών οι χρησιμοποιούνται ως προστατευτικά μέσα ως παράγοντες διασταύρωσης του πολυμερικού πλέγματος.[21, 23, 82]

Καθώς υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία στους διαλύτες αυτούς, υπάρχει η δυνατότητα να συντεθούν ευτηκτογέλες με τις επιθυμητές ιδιότητες και με πολλούς τρόπους, όσον αφορά στον χρησιμοποιούμενο πολυσακχαρίτη ή πολυμερές, καθώς και τον τύπο των σχηματιζόμενων δεσμών (ομοιοπολικοί , μη ομοιοπολικοί, διασταυρούμενη σύνδεση).[21]

Αναφορικά με τους δεσμούς, οι ευτηκτογέλες δύνανται να συντεθούν μέσω δημιουργίας τόσο ομοιοπολικών δεσμών όσο και μη ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των πολυμερών του δικτύου. Ωστόσο, η χρήση μη ομοιοπολικών δεσμών είναι προτιμητέα, καθώς τους προσδίδουν μεγαλύτερη ευελιξία και πιο βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Σε αυτούς τους δεσμούς περιλαμβάνονται και οι δεσμοί υδρογόνου, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι δυνάμεις που οφείλονται σε διαφορά πολικότητας σε σχέση με το διαλύτη και οι δυνάμεις διπόλου-διπόλου. Επιπλέον δεσμοί που μπορούν να σχηματισθούν είναι οι διασταυρούμενοι μη ομοιοπολικοί, οι οποίοι σχηματίζονται από ζελατινοποιητές μικρού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight Gelators - LMWGs) και δημιουργούν κολλοειδείς δομές. Σε αυτήν την περίπτωση, η ευτηκτογέλη μπορεί να τροποποιηθεί χωρίς να χάσει την δομή της, αφού οι δεσμοί στο δίκτυό της είναι αντιστρεπτοί. [21]

Όσον αφορά στα στερεά μέσα ακινητοποίησης που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση των ευτηκτογελών, αυτά μπορεί να είναι πολυμερή, ζελατινοποιητές μικρού μοριακού βάρους (LMWGs) ή, ακόμη, και ο συνδυασμός ενός LMWG και ενός μονομερούς. Τα μέσα αυτά, ουσιαστικά, προκαλούν ζελατινοποίηση στον διαλύτη. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι ο συνδυασμός δύο πολυμερών ενισχύει τις μηχανικές ιδιότητες της ευτηκτογέλης, όπως τον εφελκυσμό και τη θραύση. Σχετικά με τις δύο άλλες κατηγορίες στερεών μέσων, η διαδικασία που ακολουθείται είναι οι διαλυτοποίησή τους στον διαλύτη υπό θέρμανση και με πτώση θερμοκρασίας σχηματίζεται αυτόματα το δίκτυο δεσμών. Στην συνδυαστική περίπτωση με μονομερές απαιτείται και ένα επιπλέον βήμα, το οποίο είναι η εφαρμογή ακτινοβολίας UV. [21]

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία[22], για πολλά είδη ζελατινοποιητών είναι αναγκαία η θέρμανση του συστήματος σε θερμοκρασία ≈80°C για τουλάχιστον 5 min ώστε να σχηματιστεί η ευτηκτογέλη κατά την διάρκεια της ψύξης.

1.4.2.2 Ιδιότητες ευτηκτογελών

Η χρήση των (φυσικών) βαθέως ευτηκτικών διαλυτών [(Na)DESs] προσδίδει σημαντικά πλεονεκτήματα στις ευτηκτογέλες, όπως καλύτερη σταθερότητα και αυξημένη αγωγιμότητα. Ειδικότερα, συγκρίνοντας τις υδρογέλες με τις ευτηκτογέλες, οι τελευταίες παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα και καλύτερες ιξωδοελαστικές ιδιότητες. Αντίθετα, οι υδρογέλες είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν σε πολύ χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες. Έχουν γίνει αναφορές, ότι οι ευτηκτογέλες παρουσιάζουν ρυθμιζόμενες ρεολογικές, θερμικές και μηχανικές ιδιότητες, οι οποίες καθορίζονται από τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του NaDES και του ζελατινοποιητή, ενώ, παράλληλα, ο ρόλος του νερού είναι κρίσιμος στη διαμόρφωσή τους.[21, 23, 82]

Συμπληρωματικά, μπορούν να συντεθούν ευτηκτογέλες με καλύτερη συναρμογή του πολυμερικούς δικτύου και βέλτιστη αλληλεπίδραση του DES με την υπόλοιπη δομή, μειώνοντας την ποσότητα του πολυμερούς ή του πολυσακχαρίτη και προσθέτοντας μικρή ποσότητα νερού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία[82], χρήση νερού σε ποσοστό έως περίπου 10% κατά βάρος δεν επηρεάζει την δομή του χρησιμοποιούμενου DES και ενισχύει την υφή της ευτηκτογέλης, ενώ πολύ μικρή ποσότητα νερού ενίσχυσε την ακαμψία και την προκλητικότητα, και μεγαλύτερες ποσότητες νερού αύξησαν την ευθραυστότητα και μείωσαν την αντοχή στη δομική φθορά.

Τέλος, η βιβλιογραφία[21] ορίζει, ότι για να χαρακτηριστεί μια δομή ως ευτηκτογέλη θα πρέπει να μην εμφανίζει ρευστότητα. Με άλλα λόγια, θα πρέπει να διατηρείται πάνω σε μια επιφάνεια αμετάβλητη και σταθερή και να αποτελείται από υγρά συστατικά σε ποσοστό τουλάχιστον 50% κατά βάρος.

1.4.2.3 Κατηγορίες ευτηκτογελών

Οι ευτηκτογέλες κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: πολυμερικές γέλες όπου τα DES δρουν μόνο ως διαλύτες (Eutectogels-S), πολυμερικές γέλες όπου τα DES δρουν ως διαλύτες και πολυμερησμένα μονομερή (Eutectogels-P) και υπερμοριακές γέλες όπου τα DES δρουν μόνο ως διαλύτες (Supermolecular Eutectogels).[21]

Αναφορικά με τη δεύτερη κατηγορία, απαιτείται κάποιο από τα συστατικά του DES να έχει την ικανότητα να σχηματίζει πολυμερικός δίκτυο. Έτσι, το σχηματιζόμενο DES εμπεριέχει ήδη το μονομερές που θα σχηματίσει την γέλη, γεγονός που αποτελεί μια πιο οικονομικά βιώσιμη πρακτική. Ένα τέτοιο σύστημα αποτελεί το DES χλωριούχος χολίνη/ακρυλικό οξύ, στο οποίο το ακρυλικό οξύ λειτουργεί και ως μονομερές. Καθώς προστίθεται υπεροξείδιο του βενζολίου για την έναρξη του πολυμερισμού, σχηματίζεται πολυακρυλικό οξύ που οδηγεί στον σχηματισμό της ευτηκτογέλης. [21]

1.4.2.4 Εφαρμογές ευτηκτογελών

Οι ιδιότητες που παρουσιάζουν οι ευτηκτογέλες, όπως αναλύθηκε προηγουμένως, είναι πολύ σημαντικές και αξιοποιούνται σε πληθώρα εφαρμογών.[21, 31]

Για παράδειγμα, οι ευτηκτογέλες εμφανίζουν ικανοποιητική βιοσυμβατότητα, γεγονός που μπορεί να αξιοποιηθεί σε ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές, όπως με τη χρήση τους ως φορέων για αποθήκευση και προστασία ευαίσθητων ενώσεων. Ενδεικτικά, μπορούν να εγκλωβίσουν το ασκορβικό οξύ για εκτεταμένες περιόδους, χωρίς να υποβαθμίζεται η ένωση, ιδιότητα που οφείλεται στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που συνθέτει ένα ευσταθές σύστημα.

Επιπλέον, μπορούν να ακινητοποιήσουν στο εσωτερικό τους μια βιοδραστική ένωση που θα χορηγηθεί ως φάρμακο, όπως η δεξαμεθαζόνη, και να την απελευθερώσουν με ελεγχόμενο τρόπο και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στον επιθυμητό στόχο.

Η υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητά τους δίνει τη δυνατότητα να λειτουργήσουν ως υπερπυκνωτές για αποθήκευση ενέργειας, ενώ η μειωμένη ευφλεκτότητα και η καλή ηλεκτροχημική συμπεριφορά ενθαρρύνει την ενσωμάτωση των ευτηκτογελών σε μπαταρίες.

Μια ακόμη ενδιαφέρουσα εφαρμογή είναι η χρήση γελών σε ηλεκτρονικά συστήματα που απαιτούν ευκαμψία, όπως η τοποθέτηση ευτηκτογελών στο ανθρώπινο σώμα για την παρακολούθηση της κίνησής του.

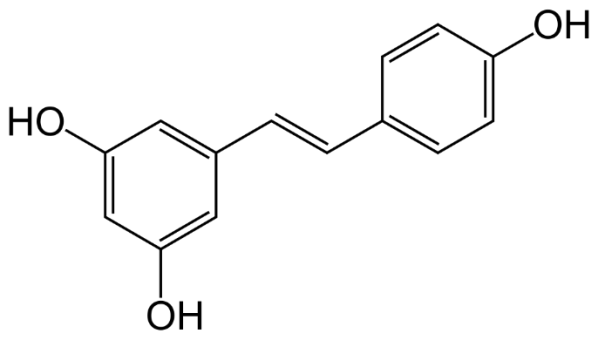
Επιπροσθέτως, έχει γίνει χρήση ευτηκτογελών στον καθαρισμό του νερού με επιτυχία για δέκα επαναλήψεις, διατηρώντας τόσο την απόδοση της διαδικασίας όσο και τη δομή της γέλης.

Τέλος, οι αντιπαγετικές ιδιότητες των ευτηκτογελών είναι σημαντικές, καθώς μπορούν να αποτρέψουν την παγοποίηση στην επιφάνεια των τροφίμων και τον σχηματισμό κρυστάλλων στο εσωτερικό τους, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ποιότητάς τους.

1.5 Ρεσβερατρόλη – Resveratrol (RVT)

1.5.1 Ορισμός, προέλευση, παρασκευή ρεσβερατρόλης

Η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυ-τρανς-στιλβένιο) κατατάσσεται με βάση τη λειτουργία της στην κατηγορία των φυτοαλεξινών και με βάση την δομή της στην ομάδα των στιλβενοειδών πολυφαινολών. Η βασική δομή της είναι το στιλβένιο, δηλαδή αποτελείται από δύο δακτυλίους φαινόλης που συνδέονται μεταξύ τους με μια γέφυρα αιθυλενίου (βλ. Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Συντακτικός τύπος trans-ρεσβερατρόλης

Η ρεσβερατρόλη απαντάται συνήθως σε πολλά είδη φυτών, όπως στη φλούδα και στους σπόρους σταφυλιών, καθώς και στο κόκκινο κρασί. Στα φυτά, η ρεσβερατρόλη δρα ως φυτοαλεξίνη που συντίθεται ως απόκριση σε μηχανικούς τραυματισμούς, στην υπεριώδη ακτινοβολία και σε μυκητιακές επιθέσεις. Το γεγονός ότι κατατάσσεται στις φυτοαλεξίνες την καθιστά να έχει ισχυρή αντιμυκητιασική και αντιβακτηριακή δράση.[84]

Η πρώτη απομόνωση της ρεσβερατρόλης πραγματοποιήθηκε το 1940 από ρίζες λευκού ελλεβόρου (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), κι έπειτα, το 1963 από τις ρίζες *Polygonum cuspidatum,* το οποίο χρησιμοποιείτο στην παραδοσιακή Κινεζική και Ιαπωνική Ιατρική ως αντιφλεγμονώδης και αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας. Σήμερα η ρεσβερατρόλη λαμβάνεται με χημική ή βιοτεχνολογική σύνθεση από ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και αξιοποιείται για βιομηχανικούς σκοπούς. Συχνότερα πωλείται ως συμπλήρωμα διατροφής με ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών

επιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής αμυντικής δράσης έναντι του οξειδωτικού στρες. [85- 92]

1.5.2 Χημική δομή ρεσβερατρόλης

Η χημική δομή της ρεσβερατρόλης απαντάται σε δύο ισομερείς μορφές: *cis* -(*Z*) και *trans* -(*E*), η οποία μπορεί να ισομεριωθεί εύκολα όταν εκτεθεί σε ακτινοβολία UV. Μελέτες έδειξαν ότι η *trans* -ρεσβερατρόλη σε σκόνη είναι πιο σταθερή υπό συνθήκες «επιταχυνόμενης σταθερότητας» 75% υγρασίας και 40 °C παρουσία αέρα. Παρ' όλ' αυτά, οξειδώνεται εξαιρετικά εύκολα και εμφανίζει σημαντική αστάθεια. Εκτός από πρόβλημα σταθερότητας, λοιπόν, η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει και χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, καθώς εμφανίζει λιπόφιλα χαρακτηριστικά και, κατά συνέπεια, πολύ χαμηλή υδατοδιαλυτότητα. Η υδρόφοβη αυτή φύση της ρεσβερατρόλης περιόρισε τη θεραπευτική της εφαρμογή και κατέστησε επιτακτική την ανάγκη για τροποποίηση της δομής της ρεσβερατρόλης. Έτσι, τα τελευταία χρόνια έχουν συντεθεί πολλά παράγωγα ρεσβερατρόλης, όπως μεθοξυλιωμένα, υδροξυλιωμένα και αλογονωμένα παράγωγα, τα οποία παρουσιάζουν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό προφίλ.[93-95]

Σύμφωνα με μελέτες, οι γλυκοζυλιωμένες μορφές της ρεσβερατρόλης αποτρέπουν την ενζυματική οξείδωσή της αυξάνοντας τη σταθερότητά της και ενισχύοντας την αντιοξειδωτική της ικανότητα. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί, ότι τα μεθοξυλιωμένα ανάλογα παρουσιάζουν αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα, με αποτέλεσμα ισχυρότερη αντικαρκινική, αντιδιαβητική και καρδιοπροστατευτική δράση από αυτή της ρεσβερατρόλης. Με τον ίδιο τρόπο, πολλά υποσχόμενος φαίνεται να είναι ο εγκλωβισμός της ρεσβερατρόλης σε νανοφορείς, όπως τα στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια (SLNs) και οι νανοδομημένοι φορείς λιπιδίων (NLCs), ο οποίος αποσκοπεί στην βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας και της απορρόφησής της κατά την χρήση από στόματος για διατροφικούς λόγους.[96, 111-114]

1.5.3 Ιδιότητες ρεσβερατρόλης

Οι ευεργετικές ιδιότητες της ρεσβερατρόλης εκτείνονται σε ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών εφαρμογών, καθιστώντας την ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για περαιτέρω έρευνα. Ενδεικτικά, αξίζουν να αναφερθούν μερικές από τις κυρίαρχες ιδιότητές της, όπως η αντικαρκινική, η καρδιοπροστατευτική, η νευροπροστατευτική, η αντιφλεγμονώδης και η αντιμικροβιακή. Ειδικότερα, η ισχυρή αντιοξειδωτική της ικανότητα αναδείχθηκε ως ιδιαίτερα σημαντική και θα εξεταστεί αναλυτικά στη συνέχεια.[115, 116]

Αναφορικά με την αντικαρκινική της δράση, η ρεσβερατρόλη έχει δείξει σύμφωνα με πολυάριθμες μελέτες ότι μπορεί να αναστείλει όλα τα στάδια της καρκινογένεσης (έναρξη, προώθηση και εξέλιξη) δρώντας τόσο προληπτικά όσο και θεραπευτικά. Οι μηχανισμοί δράσης της περιλαμβάνουν την αναστολή της φλεγμονής, του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την προώθηση της απόπτωσης, επηρεάζοντας τις ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης και τον κυτταρικό κύκλο. Η δράση της έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως τον καρκίνος του τραχήλου, του παγκρέατος, του μαστού και του παχέος εντέρου. Επιπλέον, εμφανίζεται να ενισχύει την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας και να μειώνει την τοξικότητα των θεραπειών.[117-130]

Συμπληρωματικά, έχει αποδειχθεί ότι αυτή η ένωση φαρμακευτικού ενδιαφέροντος βελτιώνει την καρδιαγγειακή λειτουργία σε διαβητικούς αρουραίους, προστατεύοντας τα καρδιακά κύτταρα και μειώνοντας τη φλεγμονή και την αναδιαμόρφωση της διαβητικής καρδιάς. Επίσης, περιορίζει την καρδιακή υπερτροφία, τη συσταλτική δυσλειτουργία, τη διάμεση ίνωση και το οξειδωτικό στρες μέσω της ρύθμισης των μοριακών αυτών οδών. Η ρεσβερατρόλη εμφανίζει, επίσης, ευεργετική

επίδραση στην υπέρταση, την αθηροσκλήρωση, το μεταβολικό σύνδρομο και την καρδιακή ανεπάρκεια, καθιστώντας την υποψήφια για την ανάπτυξη νέων θεραπειών για καρδιαγγειακές παθήσεις.[131-135]

Ως στιλβενοειδές, εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση και αναστέλλει τη δραστηριότητα ενζύμων, όπως της κυκλοοξυγενάση (COX) και της 5-λιποξυγενάση (5-LOX). Κατά αυτόν τον τρόπο, μειώνεται η έκφραση φλεγμονωδών παραγόντων, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής. Μελέτες δείχνουν ότι η ρεσβερατρόλη προλαμβάνει την οξεία φλεγμονή, καταστέλλει την ενεργοποίηση μικρογλοίας και μειώνει την παραγωγή οξειδωτικών ειδών, ενώ ρυθμίζει τη φλεγμονώδη απόκριση σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα. Η δράση της περιλαμβάνει, επίσης, την αναστολή του NF-κB, συμπλόκων πρωτεϊνών που προκαλεί φαρυγγίτιδα στα κουνέλια, και τη ρύθμιση της εντερικής φλεγμονής και καρκινογένεσης. [136-140]

Εκτός από την αντιφλεγμονώδη και την αντιοξειδωτική δράση της, η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει νευροπροστατευτικές ιδιότητες σε διάφορες νευροεκφυλιστικές παθήσεις, όπως το Alzheimer, το Huntington, το Parkinson και άλλες. Επιπρόσθετα, μειώνει την απόπτωση των νευρώνων και τις επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες. Αν και συμβάλλει στη μείωση της κόπωσης, δεν έχει σημαντική επίδραση στη μνήμη και τη γνωστική απόδοση. Μελέτες[146, 147] έδειξαν, ότι η ρεσβερατρόλη είναι ικανή να βελτιώσει τις κινητικές ικανότητες αρουραίων και να απενεργοποιήσει τη νευροφλεγμονώδη απόκριση μετά από ενδοεγκεφαλική αιμορραγία. [141-144]

Ως πολυφαινόλη έχει μελετηθεί για τις αντιμικροβιακές της ιδιότητες έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια και μύκητες. Ωστόσο, ο μηχανισμός της αντιβακτηριακής της δράσης δεν είναι πλήρως κατανοητός. Παρ' όλ' αυτά, επιβεβαιώνεται η αντιική της δράση κατά του ιού της ψευδολύσσας, *Pseudorabies*, ο οποίος είναι πλήρως θανατηφόρος για τους χοίρους χωρίς να έχει βρεθεί θεραπεία. Ουσιαστικά, η δράση της ρεσβερατρόλης έγκειται στην αναστολή της αντιγραφής του ιού αυτού.[148]

Άλλες μελέτες έχουν δείξει επιπλέον δράσεις της ρεσβερατρόλης, με περιορισμένη, όμως, αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς της σε κλινικές μελέτες. Τέτοια δράση, για παράδειγμα, είναι η αντιπολλαπλασιαστική, η οποία μειώνει τα ανδρογόνα συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών. Εκτός από τη γυναικεία αναπαραγωγική υγεία, η ρεσβερατρόλη ενδέχεται να είναι χρήσιμη για την ανδρική υπογονιμότητα και άλλες παθολογίες σχετικές με τη γήρανση, μειώνοντας τους βιοχημικούς δείκτες φλεγμονής. Παρ' όλ' αυτά, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί η ασφαλής και αποτελεσματική χρήση της ρεσβερατρόλης.[141, 149]

1.5.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα ρεσβερατρόλης

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η ρεσβερατρόλη φαίνεται να έχει πολλές βιολογικές ιδιότητες, όμως εκείνη που την περιγράφει καλύτερα από όλες είναι η ικανότητά της να δρα ως ισχυρό αντιοξειδωτικό. Πιο συγκεκριμένα, έχει την ικανότητα να «σαρώνει» και να αναστέλλει δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROSs), ελεύθερες ρίζες και διάφορα άλλα βλαβερά οξειδωτικά, καθώς και την υπεροξείδωση των λιπιδίων. [150]

Μελέτες έδειξαν ότι η ικανότητα αυτή καθορίζεται τόσο από την ομάδα υδροξυλίου στη θέση 4, όσο και από τις ομάδες -OH στις θέσεις 3 και 5. Συμπερασματικά, η διαμόρφωση, η υποκατάσταση και ο αριθμός των συνολικών ομάδων υδροξυλίου επηρεάζουν ουσιαστικά αρκετούς μηχανισμούς αντιοξειδωτικής δράσης, όπως τη δέσμευση ριζών και την ικανότητα χηλίωσης μεταλλικών ιόντων. Άλλη μελέτη αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης έναντι των ριζών υδροξυλίου (•OH) και υδροϋπεροξυλίου (•OOH) σε υδατικά μέσα αποκάλυψε ότι η τρανς-ρεσβερατρόλη μπορεί να δρα ως αποτελεσματικός αναστολέας της ρίζας •OOH, και πιθανώς της •OOR.[151 -153]

Η αντιοξειδωτική αυτή ικανότητα της ρεσβερατρόλης την καθιστά κατάλληλη για χρήση σε φαρμακευτικά σκευάσματα, όπου μπορεί να ελαχιστοποιήσει την οξείδωση των λιπιδίων, να επιβραδύνει τον σχηματισμό τοξικών προϊόντων οξείδωσης, διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο την ποιότητα και παρατείνοντας την διάρκεια ζωής των προϊόντων αυτών. Ένας επιπλέον τρόπος αξιοποίησης αυτής της ικανότητας της ρεσβερατρόλης είναι για την προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου από την έκθεσή τους στην υπεριώδη (UV) ακτινοβολία.[154 - 159]

Ωστόσο, η ευεργετική αυτή δράση της ρεσβερατρόλης παρεμποδίζεται από τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά της. Ως εκ τούτου, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη δημιουργία παραγώγων ρεσβερατρόλης, για παράδειγμα, με διαδικασία εστεροποίησης, με στόχο τη βελτίωση της λιποφιλικότητάς της. Πράγματι, κάποια από τα παράγωγα της διαδικασίας αυτής μπόρεσαν να αναστείλουν αποτελεσματικά την οξείδωση χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) που προκαλείται από ιόντα χαλκού και ανέστειλαν την σχάση του DNA από ρίζα υδροξυλίου.[160]

1.5.5 Παρενέργειες ρεσβερατρόλης

Αναφορικά με τις τοξικές παρενέργειες της ρεσβερατρόλης, αυτές φαίνεται να είναι ελάχιστες, με περιορισμένα συμπτώματα σε δόσεις μέχρι 1 g ημερησίως και ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως ναυτία και ηπατική δυσλειτουργία σε υψηλότερες δόσεις (2,5 g και άνω). Ωστόσο, η ασφάλεια της ρεσβερατρόλης σε μακροχρόνιες κλινικές δοκιμές είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Σε υψηλές δόσεις, η ρεσβερατρόλη έχει αναφερθεί ότι προκαλεί νεφροτοξικότητα και αθηροσκληρωτική ανάπτυξη σε πειραματόζωα, ενώ μπορεί να έχει διφασικές επιδράσεις, με αντικρουόμενα αποτελέσματα σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα. Οι μελέτες[164,165] δείχνουν επίσης ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να ενεργοποιήσει ορισμένες βιοχημικές διαδρομές, ενώ οι μέτριες δόσεις μπορούν να επηρεάσουν τη διάρκεια ζωής, αλλά σε υψηλές δόσεις μπορεί να είναι θανατηφόρα για ποντίκια. Αν και η ρεσβερατρόλη είναι γενικά ανεκτή από υγιή άτομα, η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά της πρέπει να αξιολογηθούν περαιτέρω, ειδικά σε ασθενείς με προϋπάρχουσες παθήσεις.[161-165]

1.5.6 Εγκλωβισμός βιοδραστικών ενώσεων σε ευτηκτογέλες (Encapsulation)

Ο εγκλωβισμός (encapsulation) αποτελεί φυσική τεχνική ακινητοποίησης ενζύμων, κυττάρων και ουσιών με στόχο την ανακύκλωση και την επαναχρησιμοποίηση αυτών, καθώς και την αύξηση κάποιων ιδιοτήτων τους, όπως είναι η σταθερότητα, η διαλυτότητα, η ενεργότητα και η εκλεκτικότητα. Παράλληλα, δίνει τη δυνατότητα για ευκολότερη ανάκτηση προϊόντων έπειτα από ενδεχόμενη αντίδραση.

Γενικά, η μέθοδος του εγκλωβισμού στη φαρμακευτική, περιλαμβάνει την επικάλυψη της δραστικής ουσίας με ένα προστατευτικό υλικό, το οποίο εξασφαλίζει την ελεγχόμενη απελευθέρωση της ουσίας στο πεπτικό σύστημα. Σε μελέτες έχουν αναλυθεί διάφορες τεχνικές εγκλεισμού, όπως η ξήρανση με ψεκασμό, η λυοφιλίωση και η εξώθηση, καθώς και διάφορα υλικά που χρησιμοποιούνται ως επικάλυψη, όπως πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και λιπίδια.

Παρ’ όλ’ αυτά, ο εγκλωβισμός υστερεί σε ορισμένα πράγματα. Για παράδειγμα. παρουσιάζει περιορισμούς λόγω διάχυσης και δημιουργεί κίνδυνο απώλειας της δραστικότητας της ένωσης κατά τον εγκλωβισμό της. Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντική η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής και του υλικού επικάλυψης για τη διασφάλιση της σταθερότητας και τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας της βιοδραστικής ένωσης.[166]

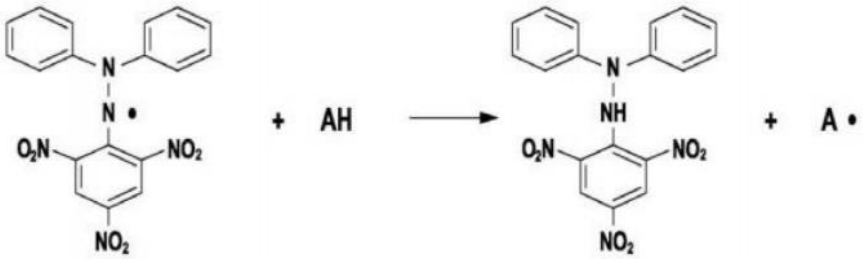
1.6 Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για αξιολόγηση εγκλωβισμένων βιοδραστικών ενώσεων

1.6.1 Ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών – Φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH

Η δοκιμή DPPH αποτελεί την πρότυπη χρωματομετρική μέθοδο που εφαρμόζεται σε εργαστήρια για τον προσδιορισμό της ικανότητας σάρωσης ελευθέρων ριζών (Radical Scavenging Activity, RSA) των καθαρών φαινολικών ενώσεων και των φυτικών εκχυλισμάτων. Πλεονεκτεί έναντι άλλων τεχνικών, επειδή είναι γρήγορη, εύκολη και οικονομική και μετρά την ικανότητα μιας ένωσης να δράσει ως σαρωτής ελευθέρων ριζών ή δότης υδρογόνου. Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου μετέπειτα συγκρίνονται με την ικανότητα σάρωσης ενός γνωστού αντιοξειδωτικού. [10, 167]

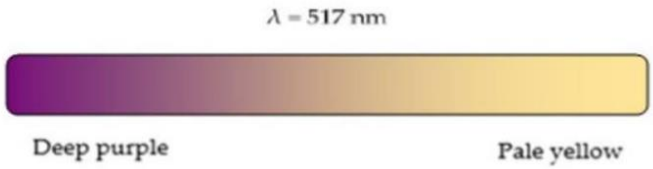
Η ικανότητα αυτή προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά, με τη χρήση του αντιδραστηρίου DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), μίας σταθερής ελεύθερης ρίζας που όταν έρχεται σε επαφή με μια αντιοξειδωτική ουσία (δότης υδρογόνου), αντιδρά ως εξής:

$$DPPH\bullet + AH \rightarrow DPPHH + A\bullet$$



Εικόνα 7: Αντίδραση αναγωγής ρίζας DPPH από μια αντιοξειδωτική ουσία

Η παραπάνω αντίδραση συνοδεύεται από αλλαγή του χρώματος του DPPH από βαθύ ιώδες σε κίτρινο, η οποία δρα ως δείκτης αντιοξειδωτικής δράσης.



Εικόνα 8: Η χρωματική διακύμανση που παρατηρείται κατά την αντίδραση αναγωγής του DPPH

Η % αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH από την αντιοξειδωτική ουσία ορίζεται ως το ποσοστό ελάττωσης της απορρόφησης του DPPH σε αιθανολικό διάλυμα στα 517nm και αντιστοιχεί στο ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH που έχουν ανασταλεί (δεσμευτεί) σε ορισμένο χρόνο από το σύστημα που περιέχει την εγκλωβισμένη βιοδραστική ουσία, ή από το φυτικό εκχύλισμα, ή από την καθαρή ένωση.[167]

1.6.2 Κινητικό προφίλ απελευθέρωσης βιοδραστικών ουσιών – Drug release kinetics studies

Στο πλαίσιο της μελέτης των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, έχει μεγάλη αξία η μελέτη της απελευθέρωσης της βιοδραστικής ουσίας σε ένα μέσο που αναπαριστά τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού.

Η διαδικασία προσδιορισμού του προφίλ απελευθέρωσης της ένωσης περιλαμβάνει τη λήψη δειγμάτων σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα και την επεξεργασία αυτών με σκοπό την ανάλυση συγκέντρωσης του φαρμάκου συναρτήσει του χρόνου. Ως εκ τούτου, δύναται να σχεδιαστεί η καμπύλη, η οποία περιγράφει την ποσότητα ή το ποσοστό του φαρμάκου που απελευθερώνεται με την πάροδο του χρόνου. Σύμφωνα με αυτήν την καμπύλη, λαμβάνονται πολύτιμες πληροφορίες αναφορικά με την κινητική της απελευθέρωσης, την ποσότητα που απελευθερώνεται σε διάφορες φάσεις και ενδείξεις σχετικά με τους μηχανισμούς αποδέσμευσης.

Η πιο συνήθης επιλογή για την περιγραφή συστημάτων φαρμάκων είναι η κινητική μηδενικής τάξης. Ωστόσο, καθώς η αποδέσμευση φαρμακευτικής ένωσης είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο, δηλαδή εξαρτάται από πολλά φαινόμενα, όπως τη διάχυση και τη διόγκωση, απαιτείται η διερεύνηση του μηχανισμού της κινητικής αποδέσμευσης μέσω διάφορων καμπυλών που μπορούν να περιγράψουν διαφορετικές φάσεις.

Έτσι, εκτός από την καμπύλη κινητικής μηδενικής τάξης, η οποία περιγράφει ικανοποιητικά μια σταθερή αποδέσμευση, όταν, δηλαδή, απελευθερώνεται η ίδια ποσότητα φαρμάκου ανά μονάδα χρόνου, υφίσταται και η καμπύλη κινητικής πρώτης τάξης, κατά την οποία η αποδέσμευση εξαρτάται από τη συγκέντρωση φαρμάκου. Εναλλακτικά, υπάρχει το μοντέλο Higuchi, το οποίο χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αποδέσμευση που βασίζεται σε διάχυση Fick. Συγκριτικά με τα κινητικά μοντέλα μηδενικής και πρώτης τάξης, το μοντέλο αυτό αποδεικνύει ότι υπάρχει μηχανισμός ελεγχόμενος από τη διάχυση. Τέλος, το μοντέλο Korsmeyer-Peppas είναι ένα ημι-εμπειρικό μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του πρώτου 60% των δεδομένων απελευθέρωσης μιας δραστικής ένωσης. Η τιμή του εκθέτη διάχυσης ή απελευθέρωσης (n) του κινητικού μοντέλου αυτού χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού απελευθέρωσης.

Μαθηματικά οι παραπάνω εξισώσεις εκφράζονται ως εξής:

- **Εξίσωση κινητικής μηδενικής τάξης:**

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt \qquad (Eξ.1)$$

- **Εξίσωση κινητικής πρώτης τάξης:**

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = kt \qquad (Eξ.2)$$

- **Εξίσωση κινητικής Higuchi:**

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{\frac{1}{2}} \qquad (Eξ.3)$$

- **Εξίσωση κινητικής Korsmeyer-Peppas:**

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \qquad (Eξ.4)$$

όπου M_t είναι η συνολική ποσότητα του φαρμάκου που απελευθερώνεται σε χρόνο t, M_∞ είναι η συνολική ποσότητα που απελευθερώνεται, n είναι ο εκθέτης διάχυσης και k η κινητική σταθερά.[169, 170]

Μέσω της εξίσωσης 4 λαμβάνονται πληροφορίες για τον τύπο του μηχανισμού αποδέσμευσης που πραγματοποιείται. Στην περίπτωση συστημάτων ευτηκτογελών σε κυλινδρικό σχήμα, αν n = 0.45, ο μηχανισμός απελευθέρωσης ακολουθεί κανονικά διάχυση κατά Fick. Αυτό σημαίνει ότι το φάρμακο μπορεί να διαχυθεί μέσα από το πλέγμα ευτηκτογέλης, επειδή είναι πολύ μικρότερο από το μέγεθος του πλέγματος. Αντίθετα, αν το φάρμακο έχει παρόμοιο μέγεθος με το μέγεθος του πλέγματος, η διάχυση είναι πιο αργή. Αν n > 0.89, τότε είναι περίπτωση κινητικής μηδενικής τάξης και η αποδέσμευση υλοποιείται λόγω της διόγκωσης του συστήματος. Αν 0.45<n<0.89, ο μηχανισμός αποδέσμευσης είναι συνδυασμός διάχυσης και διόγκωσης. Στην περίπτωση αποδέσμευσης μέσω διόγκωσης, το μέγεθος του φαρμάκου είναι μεγαλύτερο από το μέγεθος του πλέγματος, επομένως είναι εγκλωβισμένο στην ευτηκτογέλη και μπορεί να αποδεσμευτεί μόνο με παραμόρφωση ή υποβάθμιση του πλέγματος. [171]

Στον πίνακα 2 συγκεντρώνονται οι μηχανισμοί απελευθέρωσης και το αντίστοιχο εύρος του εκθέτη διάχυσης.

Πίνακας 2: Μηχανισμοί απελευθέρωσης ανάλογα με τη γεωμετρία και αντίστοιχες τιμές συντελεστή διάχυσης

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

1.6.3 Φασματομετρία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis)

Η φασματομετρία υπεριώδους – ορατού είναι μια αναλυτική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της απορρόφησης του φωτός από τα μόρια ενός δείγματος στην περιοχή του υπεριώδους (200-400 nm) και του ορατού φάσματος (400-700 nm). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται τόσο για τον ποσοτικό όσο και για τον ποιοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων, ιδιαίτερα εκείνων που περιέχουν χρωμοφόρα (ομάδες που απορροφούν φως), όπως είναι οι αρωματικοί δακτύλιοι και οι ομάδες N=N, C=N, C≡C, C=C, N=O, C=O.

Η βασική αρχή της φασματομετρίας UV-Vis βασίζεται στο φαινόμενο, κατά το οποίο όταν ένα δείγμα εκτεθεί σε φως συγκεκριμένου μήκους κύματος, ορισμένα μόρια απορροφούν ενέργεια και διεγείρονται από τη θεμελιώδη κατάσταση σε μια υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Η ποσότητα του φωτός που απορροφάται ή διαπερνά το δείγμα μπορεί να μετρηθεί και να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τη συγκέντρωση ή τη χημική δομή του δείγματος.

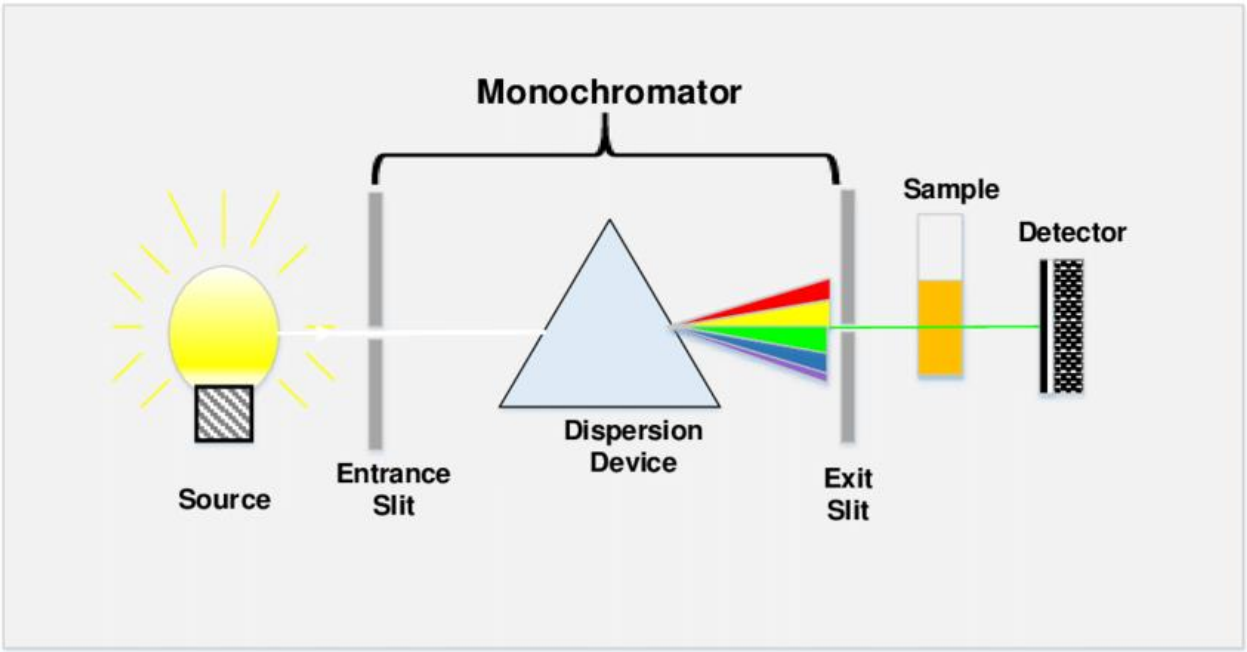
Όπως όλες οι φασματοσκοπικές μέθοδοι, έτσι και αυτή, λειτουργεί εκπέμποντας ηλεκτρομαγνητική (μονοχρωματική) ακτινοβολία προς το δείγμα και καταγράφει το φάσμα απορρόφησής τους. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα φάσματα αυτά δεν χαρακτηρίζουν συνολικά το προς εξέταση μόριο, αλλά παρέχουν πληροφορίες για ορισμένες μόνο ομάδες του που απορροφούν ακτινοβολία.

Η λειτουργία του οργάνου περιγράφεται από το νόμο Lambert-Beer, ο οποίος συνδέει την απορρόφηση του φωτός από ένα διάλυμα με τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας και το μήκος της διαδρομής του φωτός μέσω του διαλύματος. Η εξίσωση του νόμου αυτού είναι η εξής:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \qquad (Εξ.\ 5)$$

όπου A: η απορρόφηση του δείγματος, ε: ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), l: το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας μέσω του δείγματος (cm) και c: η συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται ($mol \cdot L^{-1}$).

Η βασική διάταξη ενός φασματοφωτομέτρου UV-Vis περιλαμβάνει μια πηγή ακτινοβολίας (π.χ. λυχνία δευτερίου για το υπεριώδες, λυχνία βολφραμίου – αλογόνου για το ορατό), ένας μονοχρωμάτορας που διαχωρίζει το φως σε διάφορα μήκη κύματος και επιτρέπει τη διέλευση ενός μόνο μήκους (π.χ. με πρίσματα), κυψελίδα που περιέχει το δείγμα (π.χ. από χαλαζία για το υπεριώδες, γυαλί για το ορατό), ανιχνευτής του φωτός που διέρχεται από το δείγμα και το μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο, έπειτα, καταγράφεται και επεξεργάζεται σε υπολογιστή.[172]



Εικόνα 9: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου UV-Vis

1.6.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης – High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί τεχνική αφενός για ποσοτικές και ποιοτικές μετρήσεις οργανικών ενώσεων και αφετέρου για τον διαχωρισμό αυτών σε κάποιες περιπτώσεις. Η βασική της αρχή και λειτουργία έγκειται στην ύπαρξη δύο φάσεων, μιας στατικής στερεής φάσης (π.χ. silica) σε κατάλληλη κοκκομετρία και μιας κινητής φάσης που τροφοδοτείται

παράλληλα με το υπό εξέταση δείγμα στην χρωματογραφική στήλη. Προκειμένου να πραγματοποιείται διαχωρισμός των ενώσεων του δείγματος μέσα στην στήλη, είναι απαραίτητο να παρουσιάζουν διαφορά πολικότητας. Κατά αυτόν τον τρόπο, η αλληλεπίδρασή της καθεμίας με το σύστημα της κινητής και στατικής φάσης είναι διαφορετική, με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικό και χαρακτηριστικό για κάθε ένωση χρόνο έκλουσης από τη στήλη.

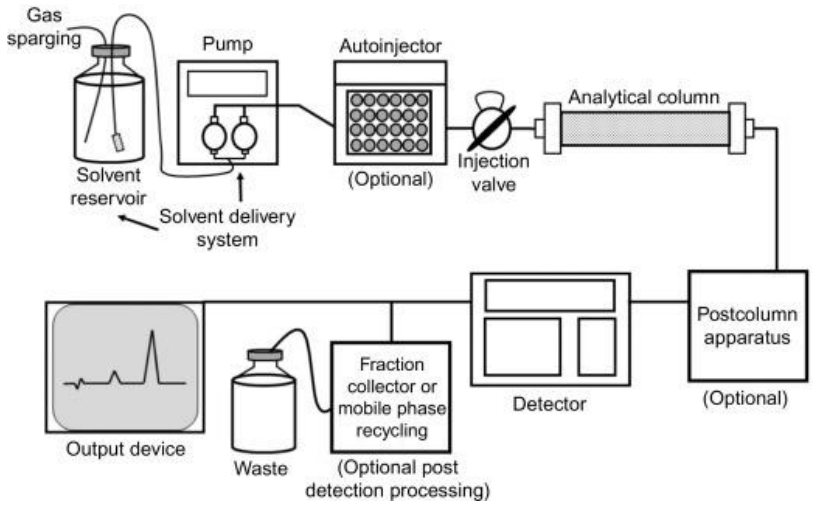
Ο μόνος περιορισμός κατά τη μέτρηση μέσω HPLC είναι ότι απαιτείται πλήρης διαλυτοποίηση των επιθυμητών ενώσεων σε διαλύτες πριν την λήψη του μετρούμενου δείγματος. Έτσι, δύναται να γίνει διαχωρισμός ενώσεων και ταυτοποίησή τους μέσω του χρόνου έκλουσης (retention time). Παρατηρείται ότι ο βέλτιστος διαχωρισμός των ενώσεων προϋποθέτει υψηλή πίεση της κινητής φάσης εντός της στήλης.

Ο λόγος που η HPLC πλεονεκτεί ως μέθοδος είναι, πρωτίστως, η χρήση δειγμάτων μικρού όγκου και η οικονομία διαλυτών για λήψη αξιόπιστων μετρήσεων. Ενδεικτικά, για την πραγματοποίηση μιας μέτρησης λαμβάνεται όγκος δείγματος 10 μL και η ροή της κινητής φάσης τίθεται στο 1 ml/min. Επιπρόσθετα, σημειώνονται υψηλή ευαισθησία και διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου, ακόμη και για μετρήσεις σε κλίμακα ppb.

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι χρωματογραφίας, εκ των οποίων ο ένας ονομάζεται «Χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase)», κατά τον οποίο η στατική φάση είναι πολική (π.χ. silica) και η κινητή φάση μη πολική (π.χ. εξάνιο, βενζόλιο) και ο άλλος ονομάζεται «Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed phase)», κατά τον οποίο η στατική φάση είναι μη πολική και η κινητή φάση πολική (π.χ. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, νερό). Επιπλέον κατηγοριοποίηση μπορεί να γίνει βάσει της αρχής του διαχωρισμού των ενώσεων στις εξής κατηγορίες: χρωματογραφία απορρόφησης, χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής, χρωματογραφία συγγένειας.

Σχετικά με την κινητή φάση, εκείνη μπορεί να ρέει είτε με σταθερή σύσταση των συστατικών της (isocratic elusion), είτε με σταδιακά μεταβαλλόμενη σύσταση (gradient elution) με στόχο την ταχύτερη έκλουση των ενώσεων που πραγματοποιείται σε μεγάλους χρόνους και την βέλτιστη λειτουργία για πολυσυστατικά δείγματα. Παρατηρείται ότι οι ενώσεις που εμφανίζουν συγγένεια με την κινητή φάση συμπαρασύρονται από αυτή και εκλούονται πρώτες. Με άλλα λόγια, όσο μεγαλύτερη η συγγένεια μεταξύ των ενώσεων και της κινητής φάσης, τόσο μικρότερος ο χρόνος παραμονής αυτών εντός της στήλης. Αντίθετα, η μη-συγγένεια των ενώσεων με την κινητή φάση επιβραδύνει την πορεία τους κατά μήκος της στήλης και συνεπώς εκλούονται σε μεγαλύτερους χρόνους. [174]

Η τυπική διάταξη ενός χρωματογράφου HPLC απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση οργανολογίας και λειτουργίας της HPLC

Παρατηρώντας την παραπάνω εικόνα, περιγράφεται συνοπτικά η λειτουργία της HPLC. Πρωτίστως, οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται λαμβάνονται σε κατάλληλη αναλογία με την βοήθεια αντλίας και απαερώνονται, ώστε να εξασφαλιστεί σταθερή ροή της κινητής φάσης. Έπειτα, διέρχονται από την στήλη και ένας δειγματολήπτης τοποθετεί το μετρούμενο δείγμα σε κατάλληλη ποσότητα εντός της κινητής φάσης. Η στήλη θερμοστατείται με χρήση φούρνου προκειμένου να αποκλειστούν εξωτερικές επιρροές από το σύστημα. Οι ενώσεις εξέρχονται σταδιακά από την στήλη και καταγράφονται από τον ανιχνευτή σε πραγματικό χρόνο, ενώ το λαμβανόμενο σήμα μετατρέπεται στο αντίστοιχο χρωματογράφημα. Ο πιο κοινός ανιχνευτής που τοποθετείται σε διατάξεις HPLC είναι το φασματοφωτόμετρο UV-Vis που λαμβάνει συνεχώς το φάσμα των συστατικών που εξέρχονται από την στήλη στο εύρος 190-750nm.[176]

1.7 Πειραματικός Σχεδιασμός – Design of Experiments (DoE)

Ο πειραματικός σχεδιασμός είναι μια συστηματική προσέγγιση που χρησιμοποιείται στην έρευνα για να ελέγξει υποθέσεις και να ανακαλύψει αιτιακές σχέσεις μεταξύ μεταβλητών. Ο βασικός του στόχος είναι να διασφαλίσει ότι τα αποτελέσματα ενός πειράματος είναι αξιόπιστα και ότι μπορούν να αποδοθούν στις μεταβλητές που μελετώνται, αποφεύγοντας την επίδραση εξωτερικών παραγόντων. Ταυτόχρονα, εκφράζει τη συμπεριφορά της απόκρισης ως συνάρτηση των παραγόντων και με στόχο τη βελτιστοποίηση της απόκρισης.[177]

Είναι γεγονός, ότι η χρήση πειραματικού σχεδιασμού για την αξιολόγηση και τη βελτιστοποίηση διεργασιών συμβάλλει στη λήψη χρήσιμων πληροφοριών μέσα από μικρότερο αριθμό πειραμάτων, και κατά συνέπεια, στην ελαχιστοποίηση του κόστους και την επίτευξη των επιθυμητών αποκρίσεων. Συνοψίζοντας, ο πειραματικός σχεδιασμός οδηγεί στο βέλτιστο αποτέλεσμα υλοποιώντας τα λιγότερο δυνατά πειράματα.

Η βελτιστοποίηση των διεργασιών πραγματοποιείται με στόχο την βελτίωση της παρουσίασης του προς μελέτη συστήματος, διαδικασίας ή προϊόντος, έτσι ώστε να υπάρχει το μέγιστο όφελος για αυτό. Συνήθως, μέσω της βελτιστοποίησης, ανακαλύπτονται συνθήκες κατά τις οποίες προκαλείται η καλύτερη δυνατή απόκριση. Για τη βελτιστοποίηση και τη μοντελοποίηση διαδικασιών, όπου το ενδιαφέρον είναι να προσδιοριστεί η σχέση μεταξύ μιας απόκρισης (ή εξαρτημένης μεταβλητής) και πολλών ανεξάρτητων μεταβλητών (ή παραγόντων), χρησιμοποιούνται πολυμεταβλητές στατιστικές τεχνικές. Η πιο ευρέως διαδεδομένη τεχνική είναι η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM), η οποία αναλύεται στη συνέχεια.[178-180]

1.7.1 Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης – Response Surface Methodology (RSM)

Η Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης αποτελεί ένα σύνολο στατιστικών και μαθηματικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τη βελτιστοποίηση και τη μοντελοποίηση διαδικασιών και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν στόχος είναι η βελτιστοποίηση της απόκρισης, δηλαδή η εύρεση των βέλτιστων τιμών των παραγόντων που μεγιστοποιούν ή ελαχιστοποιούν την απόκριση.[181]

Κύριο στοιχείο αυτής της μεθοδολογίας αποτελεί η χρήση γραμμικών και τετραγωνικών μοντέλων. Παράλληλα, προκειμένου να κατασκευαστεί το μοντέλο, χρησιμοποιούνται ειδικοί τύποι πειραματικού σχεδιασμού, όπως ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite Design - CCD) ή ο Box-Behnken σχεδιασμός. Αυτοί επιτρέπουν τη συλλογή δεδομένων με τέτοιο τρόπο ώστε να διευκολύνεται η εκτίμηση των παραμέτρων του πολυωνυμικού μοντέλου. Στη συνέχεια, τα δεδομένα που συλλέγονται αναλύονται μέσω παλινδρόμησης για να προσαρμοστεί το

πολυωνυμικό μοντέλο. Έπειτα, η επιφάνεια απόκρισης δύναται να οπτικοποιηθεί σε γραφική μορφή μέσω γραφημάτων επιφάνειας, επιτρέποντας την αναγνώριση των περιοχών όπου η απόκριση είναι βέλτιστη. Ειδικότερα, τα τρισδιάστατα διαγράμματα της επιφάνειας απόκρισης αναπαριστούν τη σχέση ανάμεσα σε μία απόκριση και δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, όταν οι υπόλοιπες διατηρούνται σε σταθερά επίπεδα.

Σχετικά με της εφαρμογές της RSM, αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης ελαίων, φλαβονοειδών, φαινολικών ενώσεων, ανθοκυανινών, διαλυτών σακχάρων, πρωτεϊνών κ. ά. από διάφορες φυτικές ύλες. Όσον αφορά στην ανάπτυξη προϊόντων, η RSM συμβάλλει στον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών για την παρασκευή ενός νέου προϊόντος.[182, 183]

Ο λόγος που η μεθοδολογία RSM πλεονεκτεί έναντι άλλων έγκειται στο γεγονός ότι είναι μία γρήγορη, αξιόπιστη και αποτελεσματική στατιστική τεχνική για τη διαμόρφωση ενός εμπειρικού μοντέλου που θα ποσοτικοποιεί τη συσχέτιση ανάμεσα στις ανεξάρτητες μεταβλητές της ευτηκτογέλης και τις αποκρίσεις. Επιπρόσθετα, μπορεί να εφαρμοστεί επιτυχώς για μία ή περισσότερες αποκρίσεις οι οποίες επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες. Τέλος, ελαττώνει τον αριθμό των πειραμάτων, εξοικονομεί χρόνο, ενέργεια και πρώτες ύλες και βελτιώνει την ποιότητα των πληροφοριών που λαμβάνονται από τα αποτελέσματα, σε σχέση με τη μελέτη ξεχωριστά κάθε μεταβλητής. [178-180, 184]

Στη συνέχεια, αναλύεται ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken, ο οποίος χρησιμοποιείται στην μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης και είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για την κατασκευή πολυωνυμικών μοντέλων που βοηθούν στην εύρεση της βέλτιστης απόκρισης ενός συστήματος.

1.7.2 Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken

Ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken στηρίζεται σε έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό σε τρία επίπεδα (χαμηλό, ενδιάμεσο, υψηλό) από όπου προκύπτει η επιλογή των σημείων ενός πειράματος k παραγόντων. Τα σημεία αυτά είναι τοποθετημένα στα μέσα των ακμών ενός κύβου συν το κεντρικό σημείο, το οποίο επαναλαμβάνεται (βλ. Εικόνα 11). Πρακτικά, ο σχεδιασμός αυτός δεν περιλαμβάνει σημεία στις κορυφές του κύβου, με αποτέλεσμα να αποτρέπει την υλοποίηση πειραμάτων υπό ακραίες συνθήκες. Ως εκ τούτου, είναι πολύ χρήσιμος σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν φυσικοί περιορισμοί των ανώτατων και κατώτατων τιμών των μεταβλητών, καθιστώντας αδύνατη την παρατήρηση αυτών των σημείων. [178, 179, 181, 185, 186]

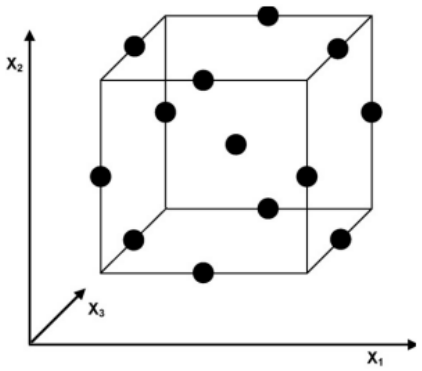
Ο αριθμός των πειραμάτων N που απαιτούνται για την ανάπτυξη του σχεδιασμού αυτού, βρίσκεται από τη σχέση:

$$N = 2 \cdot k \cdot (k - 1) + C_0 \qquad \textit{(Εξ. 6)},$$

όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων και C_0 το πλήθος των επαναλήψεων του κεντρικού σημείου.

Κύριο χαρακτηριστικό του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken είναι ότι όλα τα επίπεδα των παραγόντων πρέπει να προσαρμόζονται μόνο σε τρία συγκεκριμένα επίπεδα (-1, 0, +1) με ίσα διαστήματα μεταξύ αυτών. Έτσι, οι παράγοντες κωδικοποιούνται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\textit{κωδικοποιημένη τιμή} = \frac{\textit{πραγματική τιμή} - 0.5 \cdot (\textit{υψηλή τιμή} + \textit{χαμηλή τιμή})}{0.5 \cdot (\textit{υψηλή τιμή} - \textit{χαμηλή τιμή})}$$



Εικόνα 11: Παράδειγμα μοντέλου Box-Behnken σε τρεις διαστάσεις

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, η RSM και ο πειραματικός σχεδιασμός είναι αλληλοσυμπληρούμενα εργαλεία, καθώς ο πειραματικός σχεδιασμός θέτει τα θεμέλια για τη συλλογή των δεδομένων, ενώ η RSM χρησιμοποιεί αυτά τα δεδομένα για τη μοντελοποίηση, την ανάλυση και τη βελτιστοποίηση της απόκρισης. Είναι υψίστης σημασίας η ύπαρξη ενός καλά σχεδιασμένου πειραματικού σχεδιασμού, έτσι ώστε η RSM να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο αποτελεσματική στην επίτευξη των στόχων της.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Σκοπός

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην ανάπτυξη καινοτόμων ευτηκτογελών με χρήση πράσινου διαλύτη για τον εγκλωβισμό του φυσικού προϊόντος ρεσβερατρόλη. Συγκεκριμένα, στόχος είναι η ανάπτυξη πράσινης διεργασίας παρασκευής ευτηκτογελών αλγινικού με χρήση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES), που αφενός θα λειτουργεί ως μέσο διάλυσης της ρεσβερατρόλης, αφετέρου θα υφίσταται ζελατινοποίηση για το σχηματισμό της ευτηκτογέλης. Στη συνέχεια, η βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής των ευτηκτογελών γίνεται μέσω πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box–Behnken. Πιο αναλυτικά, εξετάζεται η επίδραση τριών παραγόντων (περιεκτικότητα των ευτηκτογελών σε ρεσβερατρόλη, περιεκτικότητα σε νερό και περιεκτικότητα σε αλγινικό) σε δύο αποκρίσεις (ικανότητα διόγκωσης των ευτηκτογελών και απόδοση εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης στις ευτηκτογέλες) και, με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού, προσδιορίζεται η βέλτιστη σύσταση ευτηκτογέλης που εξασφαλίζει την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των δύο αποκρίσεων. Η γέλη με τη βέλτιστη σύσταση αξιολογείται επίσης ως προς την ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών μέσω της φασματοφωτομετρικής μεθόδου DPPH και ως προς το προφίλ απελευθέρωσης (release profile) της ρεσβερατρόλης από αυτή. Η παρούσα εργασία αποτελεί μια προκαταρκτική μελέτη για την ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου καινοτόμου συστήματος χορήγησης της βιοδραστικής ουσίας ρεσβερατρόλης, το οποίο θα αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητά της, θα επιτυγχάνει ελεγχόμενη και παρατεταμένη αποδέσμευσή της και θα λειτουργεί προστατευτικά και αποθηκευτικά για εκείνη.

2.2 Όργανα και αντιδραστήρια

Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε μεγάλη ποικιλία οργάνων και συσκευών, τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος

Εργαστηριακό όργανο/συσκευή	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp	ZX4
Επωαστήρας (Incubator)	Gallenkamp	OTSHTD.EU1.C
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210g)	KERN	ADB 200-4
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2g)	Sartorius	M2P
Λουτρό υπερήχων	Branson	2210 Ultrasonic Bath
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	Witeg	MSH-20A
Πεχάμετρο	Metrohm	744
Φασματόμετρο (UV-VIS)	Jasco	V-770 UV-vis/NIR
Φασματόμετρο (UV-VIS)	Molecular Devices	SpectraMax 250 Microplate UV/Vis Reader
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	Shimadzu	Prominence-i, LC-2030C 3D Plus
Λυοφιλοποιητής (freeze dryer)	Lablyo Mini	Frozen in time Ltd

Κατά την παρασκευή και την αξιολόγηση των ευτηκτογελών χρησιμοποιήθηκαν ποικίλα αντιδραστήρια, τα οποία συγκεντρώνονται στον παρακάτω Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος

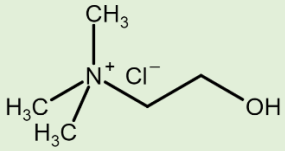
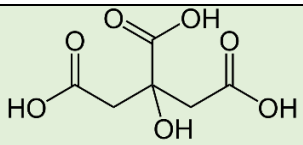
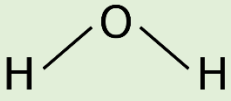
Αντιδραστήριο	Μοριακός τύπος	Προμηθευτής
Υπερκάθαρο νερό	H_2O	-
Ρεσβερατρόλη	$C_{14}H_{12}O_3$	TCI
Γλυκερόλη	$C_3H_8O_3$	Lach-Ner
Άνυδρη βεταΐνη	$C_5H_{11}NO_2$	Glentham Life Sciences
Άνυδρη χλωριούχος χολίνη	$C_5H_{14}ClNO$	Alfa Aesar
Κιτρικό οξύ	$C_6H_8O_7$	Mallinckrodt Chemicals
Αλγινικό νάτριο	$(NaC_6H_7O_6)_n$	Glentham Life Sciences
Αιθανόλη	C_2H_6O	PanReac AppliChem
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο	KH_2PO_4	Penta
Όξινο φωσφορικό κάλιο	K_2HPO_4	Penta
DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	Aldrich

2.3 Σύνθεση των NaDES: Χλωριούχος Χολίνη – Κιτρικό Οξύ – Νερό (1:1:4) και Βεταΐνη – Γλυκερόλη – Νερό (1:3:1)

- **Χλωριούχος Χολίνη – Κιτρικό Οξύ – Νερό (1:1:4)**

Το NaDES χλωριούχος χολίνη – κιτρικό οξύ – νερό, ή αλλιώς, ChCl-CA-W, (1:1:4) παρασκευάζεται ζυγίζοντας αρχικά ποσότητα στερεής άνυδρης χλωριούχου χολίνης (3g, 21mmol) σε ζυγό ακριβείας και τοποθετώντας την σε σφαιρική φιάλη των 50ml. Έπειτα, προστίθεται σε αυτήν η κατάλληλη ποσότητα κιτρικού οξέος (4.035g, 21mmol) και υπερκάθαρου νερού (1.514g, 84mmol, 1.519ml), ώστε η μοριακή αναλογία των τριών συστατικών να είναι 1:1:4. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 60°C, μέχρις ότου σχηματισθεί διαυγές, άχρωμο και ομοιογενές υγρό, το οποίο συλλέγεται σε φιαλίδιο.

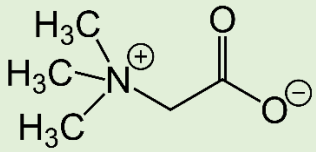
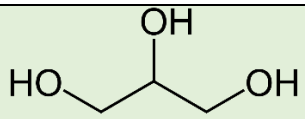
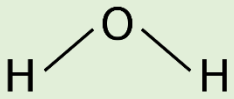
Πίνακας 5: Μοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη των συστατικών του NaDES Χλωριούχος Χολίνη – Κιτρικό Οξύ – Νερό

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3
Χλωριούχος Χολίνη – Κιτρικό Οξύ – Νερό	1:1:4			
(ChCl-CA-W)		Χλωριούχος Χολίνη MW=139.62	Κιτρικό Οξύ MW=192.12	Νερό MW=18.02

- **Βεταΐνη – Γλυκερόλη – Νερό (1:3:1)**

Το NaDES βεταΐνη – γλυκερόλη – νερό, ή αλλιώς, Bet-Gly-H_2O, (1:3:1) παρασκευάζεται ζυγίζοντας αρχικά ποσότητα στερεής άνυδρης βεταΐνης (3g, 26mmol) σε ζυγό ακριβείας και τοποθετώντας την σε σφαιρική φιάλη των 50ml. Έπειτα, προστίθεται σε αυτήν η κατάλληλη ποσότητα γλυκερόλης (7.076g, 77mmol) και υπερκάθαρου νερού (0.461g, 26mmol, 0.462ml), ώστε η μοριακή αναλογία των τριών συστατικών να είναι 1:3:1. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 60°C, μέχρις ότου σχηματισθεί διαυγές, άχρωμο και ομοιογενές υγρό, το οποίο συλλέγεται σε φιαλίδιο.

Πίνακας 6: Μοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη των συστατικών του NaDES Βεταΐνη – Γλυκερόλη – Νερό

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3
Βεταΐνη – Γλυκερόλη – Νερό (Bet-Gly-W)	1:3:1	 Βεταΐνη MW=117.15	 Γλυκερόλη MW=92.09	 Νερό MW=18.02

2.4 Επιλογή Φυσικού Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη (NaDES) για την παρασκευή των ευτηκτογελών

Για την επιλογή του καταλληλότερου διαλύτη για τον σχηματισμό ευτηκτογέλης, κρίθηκε σκόπιμο να γίνει μια προκαταρκτική μελέτη παρασκευής ευτηκτογελών από τη ζελατινοποίηση των επιλεγμένων NaDESs με τη βοήθεια του πολυσακχαρίτη αλγινικού. Τα δύο NaDESs που εξετάζονται είναι το χλωριούχος χολίνη – κιτρικό οξύ – νερό (ChCl-CA-W) σε μοριακή αναλογία 1:1:4 και το βεταΐνη – γλυκερόλη – νερό (Bet-Gly-W) σε μοριακή αναλογία 1:3:1.

Για καθένα από τα δύο DESs ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία για την παρασκευή ευτηκτογέλης:

(α) Σε 1.8g DES προστίθενται, πρώτα, 0.2g υπερκάθαρου νερού και ακολουθεί ανάδευση του μίγματος σε vortex μέχρι ομογενοποίησης.

Σημειώνεται ότι θεωρητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν 2g DES απουσία νερού, αλλά επειδή σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η προσθήκη μικρής ποσότητας νερού ενισχύει τον σχηματισμό γέλης, επιλέγεται η προσθήκη νερού σε 10% w/w περιεκτικότητα στο υδατικό σύστημα NaDES-νερού.

(β) Έπειτα, προστίθενται 10mg ρεσβερατρόλης. Η διαλυτοποίηση της ρεσβερατρόλης υποβοηθείται με ανάδευση του μίγματος σε vortex, κι έπειτα στο λουτρό υπερήχων χωρίς θέρμανση. Με οπτική παρακολούθηση θα πρέπει το διάλυμα της ρεσβερατρόλης στο υδατικό σύστημα DES-νερού να είναι εντελώς διαυγές.

(γ) Στη συνέχεια, προστίθεται σταδιακά ποσότητα αλγινικού στο προκύπτον μίγμα και ταυτόχρονα πραγματοποιείται ανάδευση με σπαθίδα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60°C για να επιτευχθεί η διαλυτοποίηση του πολυσακχαρίτη. Με οπτική παρακολούθηση θα πρέπει το μίγμα να παρουσιάζει ζελατινοποίηση (gelation).

Αφού η γέλη παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου, πωματίζεται με αλουμινόχαρτο με οπές και τοποθετείται στην κατάψυξη έως ότου εισαχθεί στο Freeze Dryer για 48h, για την απομάκρυνση του νερού.

- **Χλωριούχος Χολίνη – Κιτρικό Οξύ – Νερό (1:1:4)**

Η αρχική ποσότητα DES που χρησιμοποιείται είναι 1.8g και συμπληρώνεται με 0.2g υπερκάθαρου νερού. Στην περίπτωση, όμως, που δεν διαλυτοποιείται πλήρως η ποσότητα ρεσβερατρόλης, προβλέπεται η προσθήκη επιπλέον ποσότητας DES (σε g), έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές.

Η αρχική προστιθέμενη ποσότητα του αλγινικού ισούται με 480mg, δηλαδή με περιεκτικότητα του μίγματος σε αλγινικό ίση με 12% w/w. Στην περίπτωση, όμως, που δεν παρατηρείται σχηματισμός ευτηκτογέλης, προστίθεται επιπλέον ποσότητα DES (σε g), έως ότου παρατηρηθεί ζελατινοποίηση.

- **Βεταΐνη – Γλυκερόλη – Νερό (1:3:1)**

Η αρχική ποσότητα DES που χρησιμοποιείται είναι 1.8g και συμπληρώνεται με 0.2g υπερκάθαρου νερού. Στην περίπτωση, όμως, που δεν διαλυτοποιείται πλήρως η ποσότητα ρεσβερατρόλης, προβλέπεται η προσθήκη επιπλέον ποσότητας DES (σε g), έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές.

Η αρχική προστιθέμενη ποσότητα του αλγινικού ισούται με 240mg, που αντιστοιχεί σε δηλαδή με περιεκτικότητα του μίγματος σε αλγινικό ίση με 10% w/w. Στην περίπτωση, όμως, που δεν παρατηρείται σχηματισμός ευτηκτογέλης, προστίθεται επιπλέον ποσότητα DES (σε g), έως ότου παρατηρηθεί ζελατινοποίηση.

2.5 Μελέτη διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης σε υδατικά διαλύματα του DES: Bet-Gly-W (1:3:1)

Εξετάζεται η συμπεριφορά της διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης σε υδατικά συστήματα του NaDES Bet-Gly-W (1:3:1), με την περιεκτικότητα του NaDES να κυμαίνεται εντός του εύρους 300-900mM στα υδατικά διαλύματα.

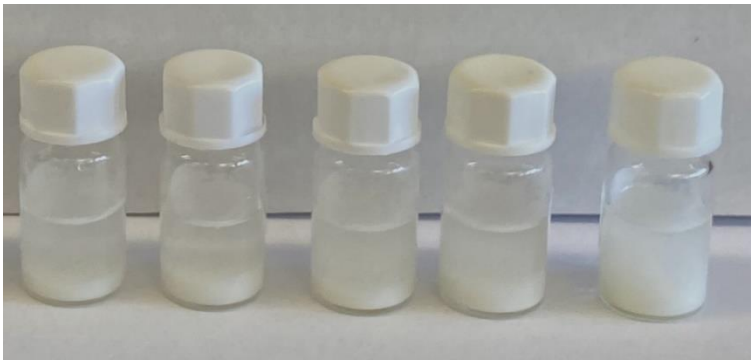
Αρχικά, γίνεται παρασκευή υδατικού διαλύματος DES (stock διάλυμα) συγκέντρωσης 900mM (C_{stock}), ζυγίζοντας 3.7030g DES ($MB_{DES} = 411.44$ g/mol) και προσθέτοντας 10ml υπερκάθαρο νερό. Ακολουθεί ομογενοποίηση σε συσκευή vortex.

Τα υδατικά διαλύματα DES συγκεντρώσεων 0, 300, 600, 750 και 900mM παρασκευάζονται, ώστε ο τελικός τους όγκος να είναι ίσος με 2ml, σύμφωνα με το νόμο αραίωσης όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα. Στη συνέχεια, σε κάθε διάλυμα προστίθεται περίσσεια ποσότητας ρεσβερατρόλης.

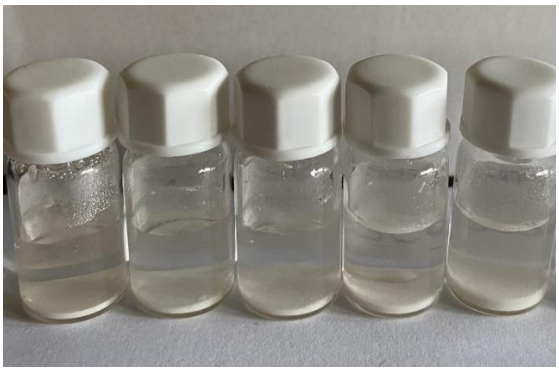
Πίνακας 7: Σύσταση υδατικών διαλυμάτων DES με διαφορετικές συγκεντρώσεις

Συγκέντρωση του DES στο διάλυμα (mM)	Προστιθέμενος όγκος stock δ/τος (ml)	Προστιθέμενος όγκος νερού (ml)	Προστιθέμενη ποσότητα ρεσβερατρόλης (mg)
0	0	2.000	50
300	0.666	1.334	75
600	1.333	0.667	90
750	1.666	0.334	95
900	2.000	0	100

Αφού παρασκευαστούν τα παραπάνω μίγματα, τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37°C με ανάδευση στους 70rpm για 48 ώρες, οπότε επέρχεται ισορροπία. Έπειτα, αντλείται το υπερκείμενο υγρό (κορεσμένο διάλυμα ρεσβερατρόλης) από κάθε μίγμα σε νέο φιαλίδιο (vial) μέσω φίλτρου διήθησης 0.22μm και αποθηκεύεται σε σκοτεινό χώρο μέχρι περαιτέρω χρήση.

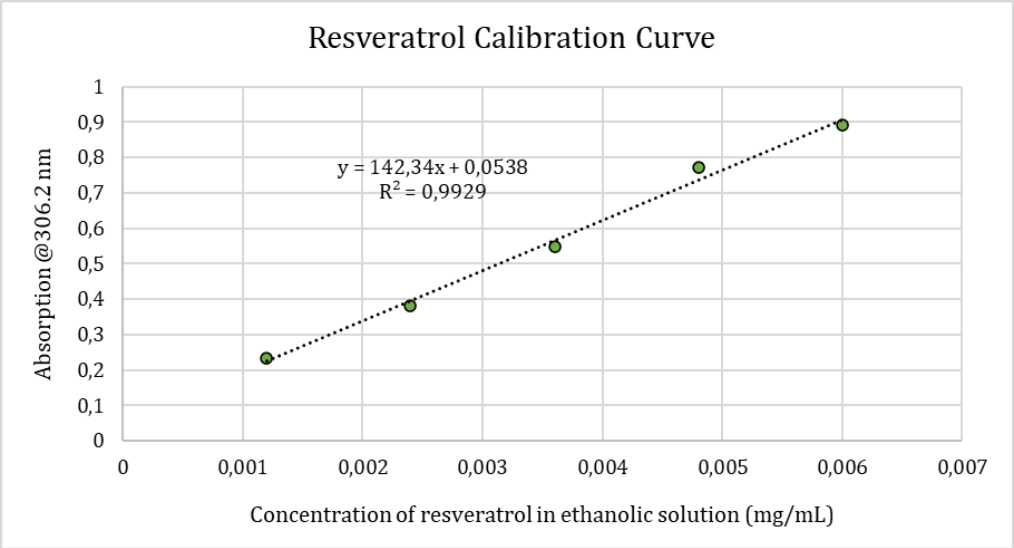


Εικόνα 12: Υδατικά διαλύματα DES [Bet-Gly-W (1:3:1)] με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 0, 300, 600, 750 και 900mM (από αριστερά προς τα δεξιά) μαζί με ποσότητα ρεσβερατρόλης πριν την επώαση



Εικόνα 13: Υδατικά διαλύματα DES: Bet-Gly-W (1:3:1) συγκεντρώσεων 0, 300, 600, 750 και 900mM με ποσότητα ρεσβερατρόλης μετά την επώαση και πριν το φιλτράρισμα

Σημειώνεται ότι έχει γίνει προσδιορισμός της καμπύλης αναφοράς της ρεσβερατρόλης σε αιθανόλη και δίνεται από την εξίσωση y=142.34x+0.0538 (με R^2=0.993) όπου y η απορρόφηση και x η συγκέντρωση του διαλύματος ρεσβερατρόλης σε mg ρεσβερατρόλης/ml αιθανόλης (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Καμπύλη αναφοράς της ρεσβερατρόλης σε αιθανόλη

Η μέτρηση της απορρόφησης της ρεσβερατρόλης πραγματοποιείται σε φασματόμετρο UV-Vis διπλής δέσμης με εύρος μήκους κύματος 190 – 400nm. Σύμφωνα με βιβλιογραφία, η ρεσβερατρόλη απορροφά στα 306.2nm. Προκειμένου η απορρόφηση να είναι αποδεκτή, πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.1 και 1.0. Για το λόγο αυτό, το εκάστοτε δείγμα (κορεσμένο διάλυμα ρεσβερατρόλης) υφίσταται την κατάλληλη αραίωση με αιθανόλη, και αντίστοιχα η γραμμή βάσης (baseline) λαμβάνεται επίσης με αιθανόλη.

2.6 Πειραματικός Σχεδιασμός – Design of Experiments (DoE)

Τρεις βασικές πειραματικές παράμετροι για την παρασκευή ευτηκτογελών με εγκλωβισμένη βιοδραστική ουσία είναι:

(i) η περιεκτικότητα σε βιοδραστική ουσία (εδώ σε ρεσβερατρόλη),

(ii) η περιεκτικότητα σε νερό του συστήματος NaDES-νερού και

(ii) η περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτη (εδώ σε αλγινικό), με τη βοήθεια του οποίου γίνεται η ζελατινοποίηση του NaDES και ο σχηματισμός της ευτηκτογέλης.

Κρίνεται, συνεπώς, σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση των τριών αυτών παραγόντων σε ορισμένα χαρακτηριστικά των ευτηκτογελών, και πιο συγκεκριμένα στην ικανότητα διόγκωσής τους και στην απόδοση εγκλεισμού της ρεσβερατρόλης σε αυτές. Η μελέτη αυτή πραγματοποιείται μέσω πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken 3^3 (δηλαδή 3 πειραματικές παράμετροι – ανεξάρτητες μεταβλητές, με καθεμία να λαμβάνει 3 επίπεδα-τιμές, που συμβολίζονται -1, 0 και +1, από τη μικρότερη στη μεγαλύτερη) και στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων.

Πρώτο βήμα αποτελεί ο καθορισμός των τριών ισαπεχουσών τιμών των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών, δηλαδή των πειραματικών παραμέτρων που προαναφέρθηκαν. Η επιλογή των κατάλληλων ορίων βασίζεται σε πειραματικές δοκιμές που διεξάγονται. Σε προηγούμενες μελέτες, για την διαλυτοποίηση της ρεσβερατρόλης χρησιμοποιείτο ως διαλύτης η αιθανόλη. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, στοχεύεται η αποφυγή χρήσης επιπρόσθετου διαλύτη που να απαιτεί απομάκρυνση. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται το NaDES, το οποίο λειτουργεί ταυτόχρονα ως μέσο διάλυσης της ρεσβερατρόλης και υφίσταται ζελατινοποίηση για το σχηματισμό ευτηκτογέλης.

Για την παρασκευή ευτηκτογελών από αλγινικό, τα όρια των τιμών του αλγινικού επιλέγονται με τέτοιον τρόπο ώστε αυτό καταρχάς να διαλύεται στο υδατικό σύστημα (να μην αφήνει «σβώλους») και φυσικά να είναι επαρκές για τον σχηματισμό γέλης, αλλά να αποφεύγεται η δημιουργία πολύ πηκτής γέλης. Αναφορικά με το νερό, η αναλογία του με το NaDES θα πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να σχηματίζεται γέλη μέτριας ρευστότητας. Επισημαίνεται ότι το νερό δε θα πρέπει να βρίσκεται σε πολύ υψηλή αναλογία στο σύστημα NaDES-νερό, καθώς μπορεί (λόγω των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει με το καθένα από τα συστατικά του NaDES) να αποδυναμώσει και τελικά να διαρρήξει το δίκτυο των αρχικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών του NaDES, οπότε το NaDES χάνει την ταυτότητά του και τις ιδιότητές του. Τέλος, η ποσότητα της ρεσβερατρόλης που προστίθεται στο υδατικό σύστημα NaDES – νερό θα πρέπει να διαλύεται πλήρως σε αυτό.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, πραγματοποιούνται πολλαπλά προκαταρκτικά πειράματα διαφόρων συνδυασμών περιεκτικοτήτων, κι έπειτα μελετώνται και αξιολογούνται οι ευτηκτογέλες που σχηματίζονται ως προς την ρευστότητα, τη ζελατινοποίηση και τη διαύγειά τους. Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτουν τα όρια – ανώτατα και κατώτατα – των περιεκτικοτήτων των τριών παραγόντων που θα ληφθούν υπόψιν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό.

Εικόνα 15: Επιθυμητή σύσταση – ρευστότητα ευτηκτογέλης

Με την ολοκλήρωση αυτών των πειραμάτων τα όρια των παραγόντων διαμορφώνονται όπως φαίνεται στον πίνακα (βλ. Πίνακας 8).

Το επόμενο βήμα είναι ο ορισμός των δύο (2) αποκρίσεων – εξαρτημένων μεταβλητών: ικανότητα διόγκωσης (water uptake capacity ή swelling ratio - %SR) των ευτηκτογελών και απόδοση εγκλωβισμού (encapsulation efficiency – %EE) της ρεσβερατρόλης.

Σε αυτό το πλαίσιο, χρησιμοποιείται το λογισμικό Design – Expert 12 για τον πειραματικό σχεδιασμό της διαδικασίας σχηματισμού ευτηκτογέλης, για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και για την εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών, δηλαδή των περιεκτικοτήτων σε ρεσβερατρόλη, σε νερό και σε αλγινικό.

Πίνακας 8: Παράμετροι του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken

	Παράγοντας – Ανεξάρτητη μεταβλητή	**Κατώτατο όριο**	**Μέση τιμή**	**Ανώτατο όριο**
A	Περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης (% w/w)	0.25	0.50	0.75
B	Περιεκτικότητα νερού (% w/w)	5	10	15
C	Περιεκτικότητα αλγινικού (% w/w)	12.5	15	17.5
Αποκρίσεις				
Swelling ratio % (R1)		Ικανότητα Διόγκωσης (%)		
Encapsulation efficiency % (R2)		Απόδοση Εγκλωβισμού (%)		

Το πρώτο βήμα είναι να εισαχθούν στο πρόγραμμα τα όρια των ανεξάρτητων μεταβλητών, να δοθεί, δηλαδή, η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή για τον κάθε παράγοντα.

Με την ολοκλήρωση της εισαγωγής των παραγόντων, των αποκρίσεων και των ορίων, το πρόγραμμα ορίζει δεκαπέντε (14) πειράματα προς υλοποίηση, τα αποτελέσματα των οποίων θα αναλυθούν στατιστικά και ύστερα θα βελτιστοποιηθεί διαδικασία παρασκευής των ευτηκτογελών για την επίτευξη των καλύτερων δυνατών αποκρίσεων. Σημειώνεται ότι επιλέγεται να γίνει επανάληψη του κεντρικού σημείου (0 0 0) δύο (2) φορές. Τα εν λόγω πειράματα παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 9:

Πίνακας 9: Τα 14 πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού που προτάθηκαν από το λογισμικό

Αριθμός πειράματος	Συμβολισμός κατά Box-Behnken	Περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης (% w/w)	Περιεκτικότητα νερού (% w/w)	Περιεκτικότητα αλγινικού (% w/w)
1	-0-	0.25	10	12.5
2	-+0	0.25	15	15
3	--0	0.25	5	15
4	-0+	0.25	10	17.5
5	0+-	0.50	15	12.5
6	0--	0.50	5	12.5
7	000	0.50	10	15
8	000	0.50	10	15
9	0++	0.50	15	17.5
10	0-+	0.50	5	17.5
11	+0-	0.75	10	12.5
12	++0	0.75	15	15
13	+-0	0.75	5	15
14	+0+	0.75	10	17.5

Προκειμένου να γίνει η παρασκευή των παραπάνω ευτηκτογελών ακολουθείται κάθε φορά η εξής διαδικασία: σε φιαλίδιο των 10ml προστίθεται η κατάλληλη μάζα υπερκάθαρου νερού και συμπληρώνεται με τα απαιτούμενα g του NaDES Bet-Gly-W (1:3:1), έτσι ώστε η τελική ποσότητα του μείγματος να είναι 2g και η περιεκτικότητα του υδατικού αυτού συστήματος σε νερό να είναι αυτή που ορίζεται από τον πειραματικό σχεδιασμό, για καθεμία από τις παραπάνω γέλες. Το υδατικό σύστημα υφίσταται ανάδευση σε vortex μέχρι πλήρους ομογενοποίησης. Στη συνέχεια, προστίθεται σε αυτό η προζυγισμένη κατάλληλη ποσότητα ρεσβερατρόλης και το φιαλίδιο τοποθετείται για ανάδευση στο vortex, έπειτα σε υδατόλουτρο στους 60°C και, τελικά (αν είναι απαραίτητο), σε λουτρό υπερήχων μέχρι το διάλυμα να είναι πλήρως διαυγές. Ακολούθως, ζυγίζεται η απαιτούμενη ποσότητα αλγινικού (σε g) και προστίθεται σταδιακά στο φιαλίδιο με υποβοήθηση υδατόλουτρου και ανάδευση με σπαθίδα, προκειμένου να ελαττωθεί το ιξώδες, να διαλυτοποιηθεί το αλγινικό και να επιτευχθεί η ζελατινοποίηση. Αφού η γέλη παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου, πωματίζεται με αλουμινόχαρτο με οπές και τοποθετείται στην κατάψυξη, έως ότου εισαχθεί στο Freeze Dryer για 48h.

Οι παραπάνω γέλες θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό τόσο της ικανότητας διόγκωσης όσο και της απόδοσης εγκλωβισμού. Επιπρόσθετα, θα επαναληφθούν οι διαδικασίες προσδιορισμού ικανότητας διόγκωσης, συγκράτησης νερού και απόδοσης εγκλωβισμού, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Επομένως, παρασκευάζονται εις τετραπλούν.

Εικόνα 16: Παρασκευή ευτηκτογελών πειραματικού σχεδιασμού

2.7 Χαρακτηρισμός ευτηκτογελών

2.7.1 Προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης – Swelling Ratio (SR%) ή water uptake capacity

Η ικανότητα διόγκωσης μιας ευτηκτογέλης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι η ικανότητά της να απορροφά νερό και να διογκώνεται, και υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση.[186]

$$SR\ (\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \cdot 100 \qquad (Εξ.\ 7)$$

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

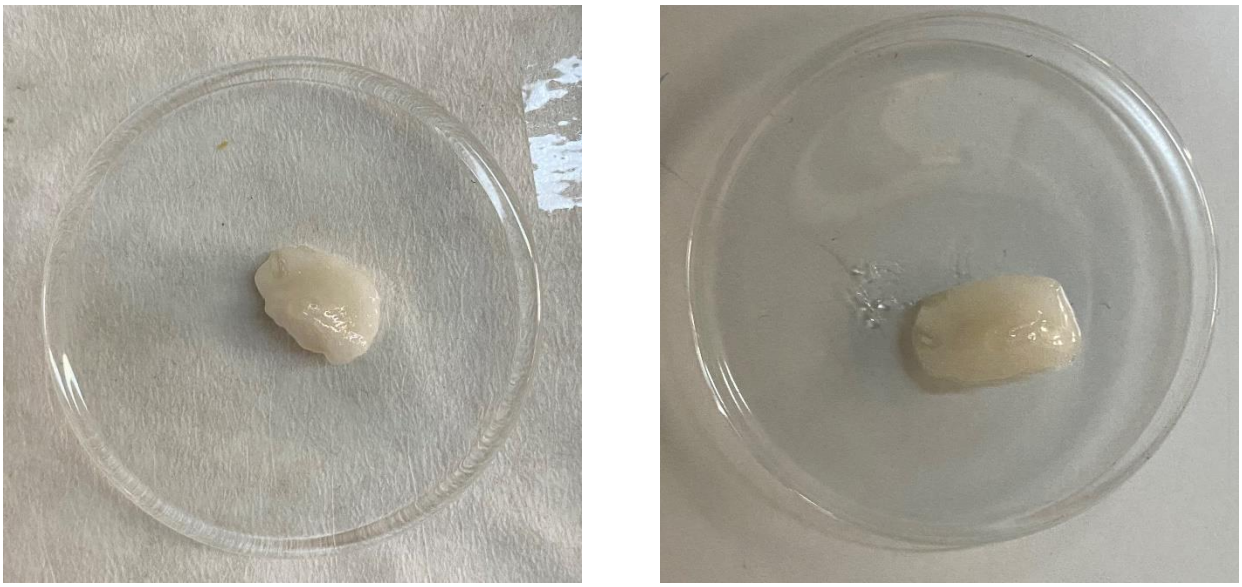
Συνεπώς, το πρώτο βήμα κατά τον προσδιορισμό αυτού του ποσοστού είναι η ζύγιση της ξηρής μάζας (σε mg) ολόκληρης της γέλης μετά τη λυοφιλοποίηση, ώστε να υπάρχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ομοιογένεια. Στο σημείο αυτό, είναι σημαντικό η γέλη να συλλεχθεί ως «σφαιρίδιο», χωρίς να σχηματίζονται «ουρές» στον όγκο της, καθώς αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη αποσάθρωσή της. Αντίθετα, προτιμάται ο έλεγχος να πραγματοποιηθεί σε συμπαγή μάζα.

Στη συνέχεια, η ζυγισμένη ξηρή γέλη εισάγεται σε γυάλινο φιαλίδιο που περιέχει κατάλληλο όγκο (σε ml) ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) με pH ίσο με 7.44, ώστε να εμβαπτίζεται πλήρως σε αυτό. Η αναλογία μάζας ξηρής γέλης προς τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος ορίζεται να είναι πάντα η ίδια για κάθε εξεταζόμενη γέλη (0.275 g ξηρής γέλης ανά ml buffer).

Συγκεκριμένα, το buffer με pH 7.44 παρασκευάζεται με προσθήκη ποσότητας ενός όξινου διαλύματος σε ένα βασικό στάγδην, έως ότου η τιμή pH φτάσει την επιθυμητή. Το όξινο διάλυμα είναι διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) συγκέντρωσης 0.15 M και παρασκευάζεται διαλύοντας 2.07g KH_2PO_4 σε 150ml υπερκάθαρο νερό. Το βασικό διάλυμα είναι διάλυμα όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4) συγκέντρωσης 0.8 M και παρασκευάζεται διαλύοντας 1.74g K_2HPO_4 σε 100ml υπερκάθαρο νερό.

Ακολούθως, το φιαλίδιο με το ρυθμιστικό διάλυμα και τη γέλη τοποθετείται στη συσκευή επώασης (incubator) στους 37°C. Οι συνθήκες αυτές (pH 7.44 και 37°C) εφαρμόζονται στην περίπτωση ενέσιμα χορηγούμενων φαρμάκων και για ευρεία χρήση. Λαμβάνεται η τιμή της μάζας της διογκωμένης ευτηκτογέλης ανά πέντε (5) λεπτά, έως ότου αποκτήσει μάζα ίση ή μικρότερη από την αρχική ξηρή μάζα (αποσάθρωση γέλης). Πριν από κάθε μέτρηση της μάζας, η γέλη εξάγεται από το φιαλίδιο και η περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος αφαιρείται από την επιφάνεια της γέλης με διηθητικό χαρτί. Μετά τη ζύγιση, η γέλη ξανά εισάγεται στο φιαλίδιο και ανανεώνεται το διάλυμα buffer.

Σημειώνεται ότι η πρώτη απόκριση που θα μελετηθεί με τη βοήθεια του πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken είναι η ικανότητα διόγκωσης των ευτηκτογελών (δηλαδή το Swelling ratio) στα πέντε (5) λεπτά. Ωστόσο, οι μετρήσεις συνεχίζονται μέχρι την αποσάθρωση της κάθε γέλης, καθώς είναι απαραίτητες για τον προσδιορισμό της ικανότητας συγκράτησης νερού, που θα συζητηθεί στην επόμενη ενότητα.



Εικόνα 17: Συνολική ξηρή μάζα ευτηκτογέλης πριν τη διαδικασία προσδιορισμού του swelling ratio (αριστερά) και συνολική διογκωμένη μάζα ευτηκτογέλης μετά την προσθήκη buffer και την επώαση στους 37 ℃ για 5 min (δεξιά)

2.7.2 Προσδιορισμός ικανότητας συγκράτησης νερού – Water Retention Capacity

Η ικανότητα μιας ευτηκτογέλης να συγκρατεί νερό πρακτικά προσδιορίζεται με την ίδια διαδικασία, η οποία ακολουθήθηκε και για τον προσδιορισμό της ικανότητας διόγκωσης. Συνεπώς, αυτές οι δύο διαδικασίες συνιστούν ενιαίο πείραμα, με την έννοια ότι χρησιμοποιείται η ίδια διάταξη, το ίδιο γυάλινο φιαλίδιο με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, για τα ίδια χρονικά διαστήματα και το ίδιο δείγμα. Η μόνη διαφοροποίηση έγκειται στην ανάλυση των δεδομένων.

Συγκεκριμένα, οι ευτηκτογέλες διογκώνονται συνεχώς, έως ότου φτάσουν ένα σημείο ισορροπίας στο οποίο παρουσιάζουν τη μέγιστη διόγκωση και δεν μπορούν να απορροφήσουν περισσότερο διάλυμα. Στο σημείο αυτό ισορροπίας θεωρείται ότι η γέλη παρουσιάζει ικανότητα συγκράτησης νερού 100%, κι έπειτα, οι ευτηκτογέλες αρχίζουν πάλι να συρρικνώνονται. Η ικανότητα συγκράτησης νερού, συνεπώς, προσδιορίζεται σε κάθε περίπτωση μετά το σημείο ισορροπίας.

Το ποσοστό συγκράτησης νερού εκφράζεται ως το πηλίκο της διαφοράς μάζας της διογκωμένης ευτηκτογέλης από την αρχική ξηρή γέλη, προς τη διαφορά μάζας της γέλης στο σημείο ισορροπίας από την αρχική ξηρή. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, η ικανότητα μιας ευτηκτογέλης να συγκρατεί νερό υπολογίζεται από την εξίσωση που ακολουθεί:

$$WRR\ (\%) = \frac{W_s - W_d}{W_e - W_d} \cdot 100 \qquad (Εξ.\ 8)$$

όπου: W_s η μάζα της διογκωμένης υδρογέλης, W_d η μάζα της ξηρής υδρογέλης και W_e η μάζα της υδρογέλης στο σημείο ισορροπίας. [186]

2.7.3 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης - Encapsulation Efficiency (EE%)

Στη μελέτη απόδοσης εγκλωβισμού κύριος στόχος είναι η ποσοτικοποίηση της φαρμακευτικής ουσίας που μπόρεσε να αποθηκευτεί στη σχηματιζόμενη ευτηκτογέλη. Για τον υπολογισμό της απόδοσης αυτής, αρχικά ζυγίζεται η ξηρή γέλη και τοποθετείται σε φιαλίδιο, στο οποίο προστίθενται 20ml αιθανόλης και ένας μικρός μαγνήτης.

Εικόνα 18: Συνολική ξηρή μάζα ευτηκτογέλης πριν την προσθήκη αιθανόλης και μαγνήτη ανάδευσης

Στη συνέχεια, το δείγμα αφήνεται να αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα και σκοτεινό χώρο για 6 ημέρες, ώστε να «σπάσει» η ευτηκτογέλη και αποδεσμευτεί η εγκλωβισμένη ρεσβερατρόλη. Αν κρίνεται απαραίτητο, το «σπάσιμο» της γέλης υποβοηθάται από σπαθίδα, τεμαχίζοντάς την σε όσο το δυνατόν μικρότερα κομμάτια. Έπειτα, συλλέγεται όλο το υπερκείμενο διάλυμα με σύριγγα και, αφού περάσει από φίλτρο διήθησης των 0.22μm, μεταφέρεται σε καθαρό φιαλίδιο.

Τα φιλτραρισμένα δείγματα αναλύονται με φασματοσκοπία UV-VIS στο εύρος 190 – 400nm και γίνεται καταγραφή της απορρόφησης της ρεσβερατρόλης στα 306.2nm. Το εκάστοτε δείγμα υφίσταται την κατάλληλη αραίωση με αιθανόλη, και αντίστοιχα η γραμμή βάσης (baseline) λαμβάνεται επίσης με αιθανόλη. Η τιμή της απορρόφησης που λαμβάνεται αντιστοιχίζεται μέσω της γνωστής καμπύλης αναφοράς (Εικόνα 14) με τη συγκέντρωση της αποδεσμευμένης ρεσβερατρόλης στο εξεταζόμενο δείγμα και τελικά υπολογίζεται η ποσότητα της ρεσβερατρόλης που εγκλωβίστηκε επιτυχώς και απελευθερώθηκε σε κάθε περίπτωση.

Η απόδοση εγκλωβισμού τελικά δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$EE(\%) = \frac{Μάζα\ ρεσβερατρόλης\ που\ εγκλωβίστηκε}{Αρχική\ μάζα\ ρεσβερατρόλης\ που\ φορτώθηκε\ στη\ γέλη} \cdot 100 \qquad (Εξ. 9)$$

Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι η επιλογή της αιθανόλης ως διαλύτη για τις παραπάνω μελέτες γίνεται επειδή δύναται να διαλύσει την ρεσβερατρόλη ικανοποιητικά και εύκολα.

Εικόνα 19: Προετοιμασία δειγμάτων για προσδιορισμό απόδοσης εγκλωβισμού, σε κάθε φιαλίδιο περιέχονται η συνολική ξηρή μάζα ευτηκτογέλης, η αιθανόλη και ένας μαγνήτης ανάδευσης

Εικόνα 20: Τα φιαλίδια μετά το «σπάσιμο» και πριν το φιλτράρισμα

2.8 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων πειραματικού σχεδιασμού και προσδιορισμός μοντέλων πρόβλεψης αποκρίσεων

2.8.1 Προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης – Swelling Ratio (SR%) ή water uptake capacity

Λαμβάνοντας τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού για την 1η απόκριση, αρχικά, ελέγχεται εάν υπάρχει ανάγκη για μετασχηματισμό. Ο μετασχηματισμός απαιτείται, συνήθως, όταν η μέγιστη τιμή της απόκρισης απέχει πολύ από την ελάχιστη τιμή και, συγκεκριμένα, προτείνεται όταν η αναλογία τους είναι μεγαλύτερη από 10. Έπειτα, επιλέγεται το μοντέλο που περιγράφει καλύτερα τη σχέση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και της απόκρισης αυτής. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω της στατιστικής ανάλυσης διακύμανσης (analysis of variance – ANOVA) και, συγκεκριμένα, μέσω του F-test. Επιπλέον, το πρόγραμμα Design Expert 12 παρέχει τη δυνατότητα οπτικοποίησης όλων αυτών των αποτελεσμάτων μέσω απεικόνισης με διαγράμματα που συσχετίζουν τις πραγματικές με τις προβλεπόμενες τιμές της απόκρισης και μέσω 3D διαγραμμάτων επιφάνειας.

2.8.2 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης - Encapsulation Efficiency (EE%)

Λαμβάνοντας τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού για την 2η απόκριση, πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού και για την επιλογή μοντέλου με αυτήν που περιεγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα για την 1η απόκριση.

2.8.3 Επιβεβαίωση μοντέλου – Confirmation

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα του μοντέλου και των μετρήσεων, επιλέγεται η πρώτη γέλη που ορίζεται από τον πειραματικό σχεδιασμό και αξιολογείται εκ νέου ως προς τις δύο αποκρίσεις πραγματοποιώντας τρεις επαναλήψεις για την καθεμία. Η επιλεγμένη ευτηκτογέλη αποτελείται από 5mg ρεσβερατρόλης (0.25% w/w), 0.25g αλγινικού (12.5% w/w), 1.8g NaDES και 0.2g υπερκάθαρου νερού (10% w/w).

Το πρόγραμμα Design Expert σύμφωνα με τα δεκατέσσερα (14) πειραματικά αποτελέσματα υπολογίζει τις τιμές που θα λάβουν οι αποκρίσεις που μελετώνται. Από τα πειράματα που προκύπτουν συγκρίνεται η μέση τιμή των πειραματικών αποτελεσμάτων με την προβλεπόμενη και ελέγχεται, εάν η μεταξύ τους απόκλιση είναι εντός ορίων για ποσοστό εμπιστοσύνης 95%.

2.9 Βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής των ευτηκτογελών

2.9.1 Επιλογή βέλτιστης γέλης

Αφού ολοκληρωθούν όλα τα πειράματα που περιεγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες (παρασκευή των 14 γελών που ορίστηκαν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό και υπολογισμός των δύο αποκρίσεων για κάθε γέλη, δηλαδή του swelling ratio στα 5 λεπτά και της απόδοσης εγκλωβισμού), τα αποτελέσματα υφίστανται στατιστική επεξεργασία με τη χρήση του λογισμικού Design – Expert 12, επιλέγοντας πρώτα το κατάλληλο μαθηματικό μοντέλο για κάθε απόκριση. Το λογισμικό παρέχει τη δυνατότητα βελτιστοποίησης της διαδικασίας παρασκευής των γελών, διατηρώντας τις τρεις παραμέτρους, δηλαδή τις περιεκτικότητες σε ρεσβερατρόλη, νερό και αλγινικό, εντός του εύρους (in range) που έχει οριστεί για κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή στην αρχή του πειραματικού σχεδιασμού και μεγιστοποιώντας τις δύο αποκρίσεις, δηλαδή το swelling ratio στα 5 λεπτά και την απόδοση εγκλωβισμού. Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτουν οι τιμές περιεκτικότητας σε ρεσβερατρόλη, νερό και αλγινικό που πρέπει να έχει μια ευτηκτογέλη προκειμένου να παρουσιάζει τις μέγιστες δυνατές αποκρίσεις, ενώ παράλληλα δίνονται και οι προβλεπόμενες από το εκάστοτε μοντέλο τιμές αυτών των αποκρίσεων. Η γέλη αυτή ορίζεται ως η «βέλτιστη γέλη» και παρασκευάζεται εκ νέου εις τετραπλούν προκειμένου αφενός να προσδιορισθούν οι πραγματικές τιμές των αποκρίσεων και αφετέρου να αξιολογηθεί ως προς την αντιοξειδωτική της ικανότητα και ως προς το προφίλ απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης μέσα από το σύστημα αυτό.

2.9.2 Προσδιορισμός πραγματικών αποκρίσεων βέλτιστης γέλης: ικανότητα διόγκωσης (SR%) και απόδοση εγκλωβισμού (ΕΕ%)

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι πραγματικές τιμές των αποκρίσεων της βέλτιστης γέλης που προκύπτει από τον πειραματικό σχεδιασμό, διεξάγονται οι διαδικασίες που περιεγράφηκαν στις ενότητες 2.7.1 και 2.7.3. Στη συνέχεια, συγκρίνονται με τις τιμές των αποκρίσεων που προβλέπονται από το λογισμικό.

2.10 Αξιολόγηση βέλτιστης γέλης ως προς την ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών – Φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας σάρωσης (δέσμευσης) ελευθέρων ριζών DPPH·εφαρμόζεται η φασματοφωτομετρική μέθοδος ελαφρώς τροποποιημένη.[188] Σύμφωνα με αυτήν τη μέθοδο, η ελεύθερη ρίζα DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) αλληλεπιδρά με μια αντιοξειδωτική ουσία

(στην προκειμένη περίπτωση την ρεσβερατρόλη, η οποία μπορεί να λειτουργήσει ως δότης υδρογόνου), και ανάγεται.

Αρχικά, ζυγίζονται με ακρίβεια 1.9716mg της ρίζας DPPH και διαλύονται σε απόλυτη αιθανόλη εντός ογκομετρικής φιάλης, έτσι ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 50ml. Έτσι, προκύπτει διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 10^{-4} M, το οποίο μέχρι να χρησιμοποιηθεί φυλάγεται υπό ψύξη στο σκοτάδι. Ωστόσο, ποτέ δεν αποθηκεύεται για διάστημα πολλών ωρών, για να αποφευχθεί η αυτοαναγωγή της ρίζας.

Ύστερα, λαμβάνονται τρία δείγματα των 100mg από την ίδια γέλη (περιεκτικότητες βέλτιστης γέλης: 0.696% w/w ρεσβερατρόλη, 15% w/w νερό, 14.695% w/w) και συλλέγονται σε τρία φιαλίδια των 10ml. Στη συνέχεια, σε κάθε φιαλίδιο προστίθενται 5ml διαλύματος DPPH, έτσι ώστε η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης στο δείγμα να παραμένει σταθερή και ίση με 0.14 mg ρεσβερατρόλης/ml διαλύματος DPPH, τοποθετείται μικρός μαγνήτης και το κάθε δείγμα τίθεται σε ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για τριάντα λεπτά (30min) σε σκοτεινό χώρο. Η αναλογία μάζας γέλης και όγκου διαλύματος DPPH πρέπει να διατηρείται σταθερή από δείγμα σε δείγμα και ίση με 20mg γέλης/ml διαλύματος DPPH, ενώ παράλληλα η γέλη πρέπει να καλύπτεται εξ ολοκλήρου από το διάλυμα μέσα στο φιαλίδιο.

Μετά από την επώαση των δειγμάτων, αυτά φιλτράρονται με φίλτρο διήθησης 0.22μm και συλλέγονται με πιπέτα 200μl από κάθε φιλτραρισμένο δείγμα, με τα οποία πληρώνεται plate 96 θέσεων. Μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 515nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στους 37°C. Ως τυφλό διάλυμα (blank) χρησιμοποιούνται 200μl από το αιθανολικό διάλυμα DPPH. Συγκεκριμένα, για το τυφλό διάλυμα πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις και λαμβάνεται η μέση τιμή τους (A_{blank}), ενώ παράλληλα, λαμβάνεται και η μέση τιμή των τριών μετρήσεων των δειγμάτων (A_{sample}).

Η % αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH ορίζεται ως:

$$\%\text{Inhibition} = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} * 100 \qquad (Εξ. 10),$$

όπου A_{blank} η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (αιθανολικού διαλύματος DPPH) και A_{sample} η απορρόφηση του φιλτραρισμένου δείγματος. Έτσι, υπολογίζεται το ποσοστό των ελευθέρων ριζών DPPH που έχουν ανασταλεί (δεσμευτεί) σε χρόνο 30min από το σύστημα της ευτηκτογέλης με εγκλωβισμένη ρεσβερατρόλη.

Για λόγους σύγκρισης, προσδιορίζεται και η % αναστολή της ρίζας DPPH από ελεύθερη ρεσβερατρόλη με τον ίδιο τρόπο. Ζυγίζεται 1mg ρεσβερατρόλης, διαλύεται σε 7.143ml του αιθανολικού διαλύματος DPPH (ώστε η συγκέντρωσή της να είναι 0.14mg/ml και στις δύο περιπτώσεις), επωάζεται και μετράται ομοίως στα 30min.

2.11 Αξιολόγηση βέλτιστης ευτηκτογέλης ως προς το κινητικό προφίλ απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης – Drug release kinetics studies

Η μελέτη της κινητικής απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης από την βέλτιστη ευτηκτογέλη πραγματοποιείται με τεμαχισμό αρχικά της ευτηκτογέλης αυτής (περιεκτικότητες βέλτιστης γέλης: 0.696% w/w ρεσβερατρόλη, 15% w/w νερό, 14.695% w/w) σε τέσσερα (4) κομμάτια μάζας ίσης με 0.3g, συλλογή της ποσότητας αυτής σε 4 φιαλίδια των 10ml, κι έπειτα, με πλήρη εμβάπτιση της ευτηκτογέλης σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων με pH 7.44. Το κάθε σύστημα τοποθετείται στον επωαστήρα (incubator) στους 37°C στις 70rpm και το καθένα αντιστοιχεί σε διαφορετικό χρόνο μέτρησης. Στα χρονικά διαστήματα των 10, 20, 60 και 120 λεπτών λαμβάνεται από το αντίστοιχο δείγμα υπερκείμενο υγρό με τη βοήθεια πιπέτας,

φιλτράρεται με φίλτρο διήθησης των 0.22μm και αναλύεται μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με τις ακόλουθες συνθήκες για τον προσδιορισμό της ρεσβερατρόλης που απελευθερώθηκε στο εκάστοτε χρονικό διάστημα.

Πίνακας 10: Συνθήκες διαδικασίας μελέτης της κινητικής απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης από την ευτηκτογέλη

Συνθήκη μεθόδου	**Τιμή παραμέτρου**
Κινητή φάση	60% v/v νερό – 40% v/v ακετονιτρίλιο
Ρυθμός ροής	1ml/min
Όγκος δειγματοληψίας	20μl
Θερμοκρασία	30^{o}C
Τύπος έκλουσης	Ισοκρατική
Χρόνος ολοκλήρωσης	12 min
Χρόνος έκλουσης ρεσβερατρόλης	5.48±0.02 min

3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

3.1 Προκαταρκτικά πειράματα παρασκευής ευτηκτογελών με βάση τα NaDES: Χλωριούχος Χολίνη – Κιτρικό Οξύ – Νερό (1:1:4) και Βεταΐνη – Γλυκερόλη – Νερό (1:3:1) για τον εγκλωβισμό της ρεσβερατρόλης

- **Χλωριούχος Χολίνη – Κιτρικό Οξύ – Νερό (1:1:4)**

Η αρχική ποσότητα DES που χρησιμοποιείται για τη διάλυση 10mg ρεσβερατρόλης είναι 1.8g μαζί με 0.2g υπερκάθαρου νερού, όμως, παρατηρείται οπτικά, ότι στο σύστημα έχει παραμείνει αδιάλυτη ποσότητα ρεσβερατρόλης. Ως εκ τούτου, προστίθενται επιπλέον 2g DES.

Τελικά, η ποσότητα DES που χρησιμοποιείται είναι 3.8g (νερό σε περιεκτικότητα 5% w/w στο σύστημα). Με αυτήν την ποσότητα DES διαλυτοποιείται ικανοποιητικά η ποσότητα της ρεσβερατρόλης (ρεσβερατρόλη σε περιεκτικότητα 0.25% w/w στο σύστημα).

Η αρχική προστιθέμενη ποσότητα του αλγινικού ισούται με 480mg, όμως, με οπτική παρακολούθηση είναι εμφανές πως δεν έχει σχηματιστεί γέλη, καθώς δεν παρατηρείται ζελατινοποίηση. Συνεπώς, προστίθενται ακόμη 150mg αλγινικού (15.8% w/w) και καθώς δεν έχει σχηματιστεί ακόμα γέλη, προστίθενται επιπλέον 150mg (19.5% w/w). Παρόλο που η τιμή της περιεκτικότητας σε αλγινικό είναι αρκετά υψηλή, δεν παρατηρείται σχηματισμός γέλης. Το πείραμα επαναλαμβάνεται για επαλήθευση, όμως δεν δύναται ο σχηματισμός γέλης. Επομένως, αποφαίνεται ότι το DES χλωριούχος χολίνη – κιτρικό οξύ – νερό (ChCl-CA-W) (σε μοριακή αναλογία 1:1:4) δεν είναι κατάλληλο για τον σχηματισμό ευτηκτογέλης αλγινικού.

- **Βεταΐνη – Γλυκερόλη – Νερό (1:3:1)**

Η συνολική ποσότητα DES που χρησιμοποιείται για τη διάλυση 10mg ρεσβερατρόλης είναι 1.8g μαζί με 0.2g υπερκάθαρου νερού (νερό σε περιεκτικότητα 10% w/w στο σύστημα), και παρατηρείται οπτικά, ότι το διάλυμα που προκύπτει είναι εντελώς διαυγές, οπότε συμπεραίνεται ότι η ρεσβερατρόλη έχει διαλυτοποιηθεί πλήρως στο σύστημα σε περιεκτικότητα 0.5% w/w.

Η αρχική προστιθέμενη ποσότητα του αλγινικού ισούται με 240mg (12% w/w), όμως, με οπτική παρακολούθηση είναι εμφανές πως δεν έχει σχηματιστεί γέλη, καθώς δεν παρατηρείται ζελατινοποίηση. Συνεπώς, προστίθενται ακόμη 100mg αλγινικού (17% w/w) και, τελικά, παρατηρείται σχηματισμός γέλης. Το συγκεκριμένο DES, επομένως, είναι αυτό που επιλέγεται για περαιτέρω μελέτη.

3.2 Μελέτη διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης σε υδατικά διαλύματα του επιλεγμένου DES: Bet-Gly-W (1:3:1)

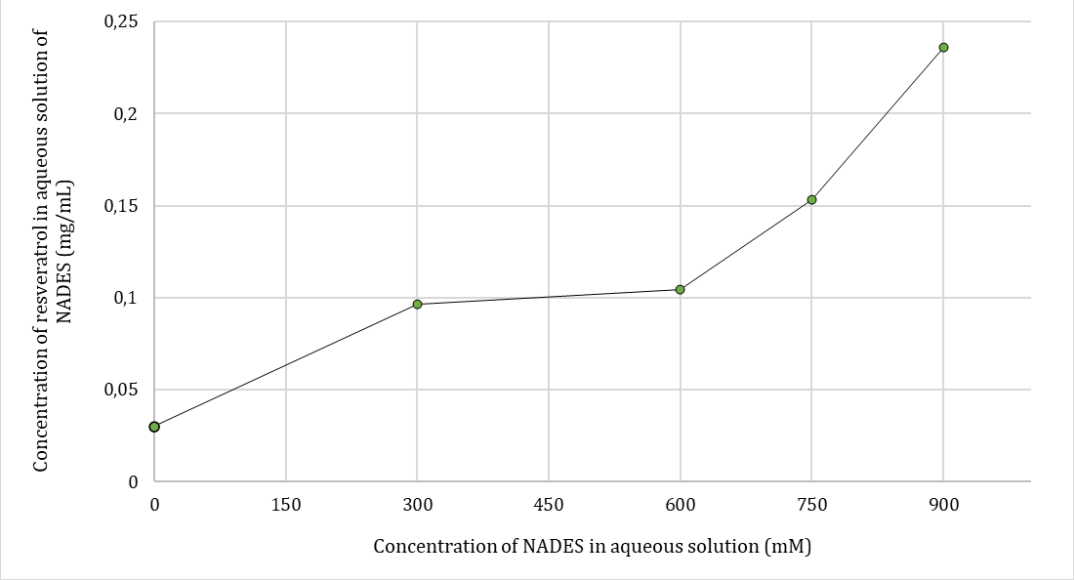
Για επικύρωση της καταλληλόλητας του DES αυτού, διεξήχθη, μετέπειτα, έλεγχος διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης στο DES με φασματομετρία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis), όπως περιεγράφηκε στην Ενότητα 2.5. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τη συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης στα υδατικά διαλύματα του DES με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτού, καθώς και στο καθαρό νερό, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (βλ. Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Αποτελέσματα μελέτης διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης σε υδατικά διαλύματα του DES Bet-Gly-W (1:3:1)

Συγκέντρωση του NaDES στο υδατικό διάλυμα (mM ή mmol NaDES/L νερού)	Συγκέντρωση ρεσβερατρόλης στο υδατικό διάλυμα (mg resv./mL)
0	0.030
300	0.096
600	0.104
750	0.153
900	0.236

Ακολούθως, καταστρώνεται το διάγραμμα των τιμών της διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης σε κάθε υδατικό σύστημα, συναρτήσει των συγκεντρώσεων του NaDES στα διαλύματα αυτά (βλ. Πίνακας 21).

Παρατηρώντας το παρακάτω διάγραμμα, είναι φανερό ότι η τιμή της διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης στο υδατικό σύστημα αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του NaDES σε αυτό. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι στο υδατικό διάλυμα NaDES συγκέντρωσης 900mM, η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης είναι 7.9 φορές μεγαλύτερη από εκείνη στο διάλυμα των 0mM, δηλαδή στο σύστημα που περιείχε μόνο υπερκάθαρο νερό. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι αύξηση της συγκέντρωσης NaDES στο υδατικό διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης στο διάλυμα έως και οκτώ φορές περίπου σε σύγκριση με το νερό, ενισχύοντας δυνητικά τη βιοδιαθεσιμότητά της.



Εικόνα 21: Διάγραμμα διαλυτότητας ρεσβερατρόλης σε υδατικά διαλύματα NaDES συγκεντρώσεων 0, 300, 600, 750 και 900mM συναρτήσει των συγκεντρώσεων αυτών

Επιλέγεται, συνεπώς, το NaDES Bet-Gly-W (1:3:1) για περαιτέρω χρήση στην παρασκευή των ευτηκτογελών που θα αξιολογηθούν στην παρούσα έρευνα, λόγω της ικανότητάς του (i) να διαλύει ικανοποιητικά τη ρεσβερατρόλη σε περιεκτικότητα 0.5% w/w, όταν το νερό βρίσκεται σε περιεκτικότητα 10% w/w στο σύστημα και (ii) να υφίσταται ζελατινοποίηση με τη βοήθεια αλγινικού σε περιεκτικότητα 17% w/w.

3.3 Χαρακτηρισμός των ευτηκτογελών

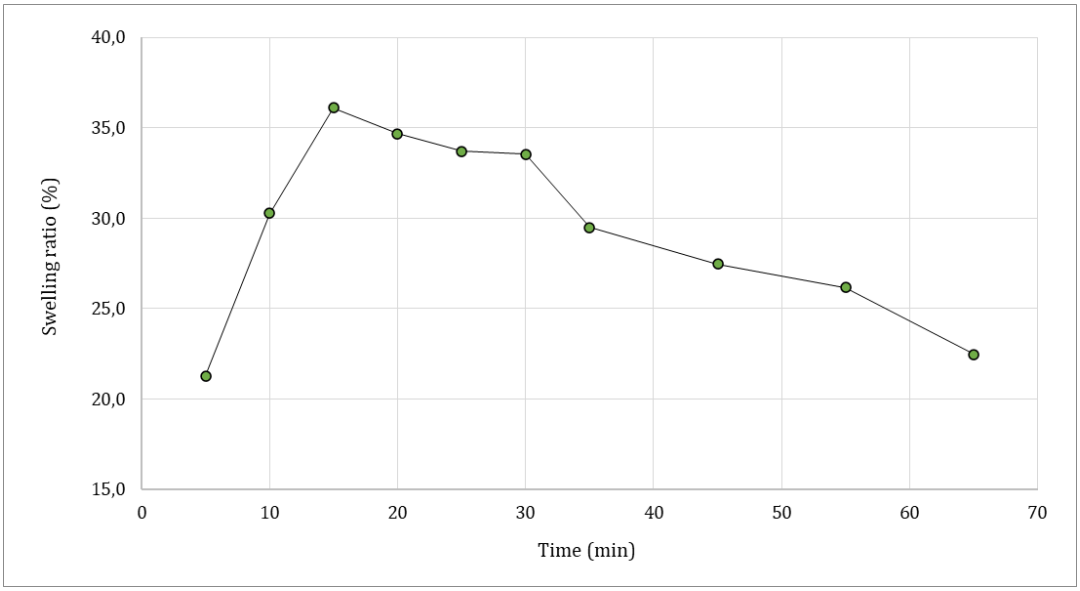
3.3.1 Ικανότητα διόγκωσης – Swelling Ratio (SR%) ή water uptake capacity

Σύμφωνα με τη διαδικασία χαρακτηρισμού για τα 14 δείγματα που όρισε ο πειραματικός σχεδιασμός σχετικά με την ικανότητα διόγκωσης, ανά πέντε (5) λεπτά λαμβάνεται η τιμή της μάζας της διογκωμένης ευτηκτογέλης που έχει εμβαπτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.44 στους 37^{o}C, έως ότου η γέλη αποκτήσει μάζα ίση ή μικρότερη από την αρχική ξηρή μάζα.

Αρχικά, παρατηρήθηκε, ότι ο χρόνος που απαιτήθηκε από τις ευτηκτογέλες για να αποκτήσουν μάζα ίση ή μικρότερη από την αρχική ξηρή μάζα (χρόνος αποσάθρωσης ευτηκτογέλης) έλαβε ελάχιστη τιμή στο 13^{ο} πείραμα (0.75% w/w ρεσβερατρόλη, 5% w/w νερό, 15% w/w αλγινικό) και ίση με 35min. Επιπλέον, έλαβε μέγιστη τιμή στο 14^{ο} πείραμα (0.75% w/w ρεσβερατρόλη, 10% w/w νερό, 17.5% w/w αλγινικό) και ίση με 130min.

Υπενθυμίζεται ότι η σχέση υπολογισμού του ποσοστού διόγκωσης (swelling ratio) είναι:

Ακολούθως, παρατίθεται ενδεικτικά το διάγραμμα της ευτηκτογέλης του 14^{ου} πειράματος, το οποίο απεικονίζει την μεταβολή του ποσοστού διόγκωσης με το πέρασμα του χρόνου. Η συγκεκριμένη γέλη εμφανίζει τη μέγιστη παρατηρούμενη τιμή του swelling ratio από όλες τις γέλες του πειραματικού σχεδιασμού και ως εκ τούτου επιλέγεται να αναλυθεί περαιτέρω.



Εικόνα 22: Διάγραμμα ποσοστού διόγκωσης ευτηκτογέλης με περιεκτικότητες 0.75% w/w σε ρεσβερατρόλη, 10% w/w σε νερό και 17.5% w/w σε αλγινικό συναρτήσει του χρόνου

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, η μέγιστη πρόσληψη νερού (water uptake), ή αλλιώς, το μέγιστο ποσοστό διόγκωσης (swelling ratio), εντοπίζεται στα 15 λεπτά, όπου λαμβάνει την τιμή 36.1%. Συγκρίνοντας τα δεδομένα αυτής της γέλης με των υπολοίπων, αποδείχθηκε ότι η γέλη αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διόγκωση για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επομένως, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα, ότι μέγιστη δυνατή περιεκτικότητα σε ρεσβερατρόλη (0.75% w/w) και αλγινικό (17.5% w/w), και μεσαία περιεκτικότητα σε νερό (10% w/w), ενδέχεται να ευνοούν σημαντικά την ικανότητα διόγκωσης ή πρόσληψης νερού και τη διατήρησή της.

Ως απόκριση στον πειραματικό σχεδιασμό, επιλέχθηκε το ποσοστό διόγκωσης κατά τη χρονική στιγμή των 5min για όλες τις ευτηκτογέλες. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη διαδικασία που περιεγράφηκε συγκεντρώνονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού για τον προσδιορισμό της ικανότητας διόγκωσης των ευτηκτογελών στα 5min

Αριθμός πειράματος	Περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης (% w/w)	Περιεκτικότητα νερού (% w/w)	Περιεκτικότητα αλγινικού (% w/w)	Swelling ratio %
1	0.25	10	12.5	15.4
2	0.25	15	15	50.3
3	0.25	5	15	7.8
4	0.25	10	17.5	13.3
5	0.50	15	12.5	16.4
6	0.50	5	12.5	2.8
7	0.50	10	15	13.9
8	0.50	10	15	18.0
9	0.50	15	17.5	19.0
10	0.50	5	17.5	18.9
11	0.75	10	12.5	6.2
12	0.75	15	15	24.6
13	0.75	5	15	24.8
14	0.75	10	17.5	21.3

Παρατηρείται ότι το ποσοστό διόγκωσης στα 5min κυμαίνεται από 2.8% (γέλη 6) έως 50.3% (γέλη 2).

3.3.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού – Water Retention Capacity

Στη συνέχεια, θα συζητηθούν τα αποτελέσματα για την ικανότητα των ευτηκτογελών να συγκρατούν νερό, μετά το σημείο ισορροπίας που αποκτούν τη μέγιστη διόγκωση (swelling ratio). Σύμφωνα με αυτά, οι ευτηκτογέλες παρουσιάζουν συγκράτηση νερού > 65% για περίπου 20min κατά μέσο όρο.

Επιπλέον, στον ακόλουθο πίνακα (βλ. Πίνακας 13) συγκεντρώνεται η σύσταση των ευτηκτογελών που παρουσιάζουν συγκράτηση νερού > 60% για τα ελάχιστα και τα μέγιστα χρονικά διαστήματα, καθώς και η τιμή των διαστημάτων αυτών.

Πίνακας 13: Σύσταση ευτηκτογελών με ελάχιστο και μέγιστο χρονικό διάστημα συγκράτησης νερού > 60%

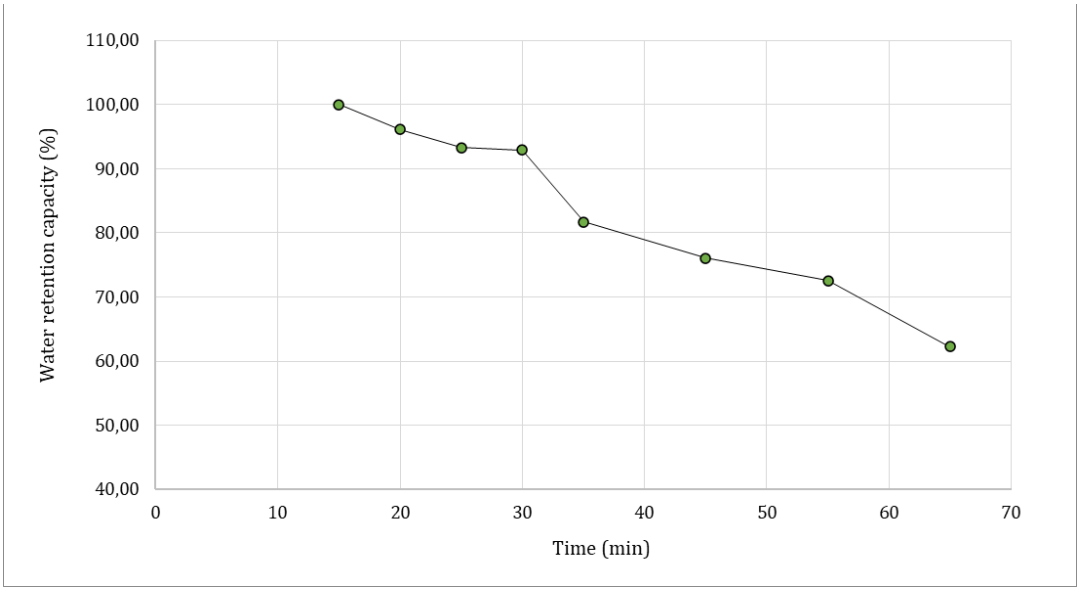
Αριθμός πειράματος	Περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης (% w/w)	Περιεκτικότητα νερού (% w/w)	Περιεκτικότητα αλγινικού (% w/w)	Water Retention (%)	Δt (min)
7	0.50	10	15	60.1	**10**
9	0.50	15	17.5	61.2	**40**
13	0.75	5	15	73.2	**5**
14	0.75	10	17.5	62.2	**50**

Παρατηρείται, ότι οι ευτηκτογέλες που συγκρατούν για περισσότερη ώρα το νερό είναι εκείνες που έχουν τη μέγιστη δυνατή περιεκτικότητα σε αλγινικό (17.5% w/w) και μέτρια προς υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (10-15% w/w). Αντίθετα, οι γέλες που αδυνατούν να συγκρατήσουν το νερό για μεγάλα χρονικά διαστήματα έχουν μεσαία τιμή περιεκτικότητας αλγινικού (15% w/w) και μέτρια προς χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό (5-10% w/w). Αξίζει να αναφερθεί, ότι για την ικανότητα συγκράτησης νερού, όπως και στην ικανότητα διόγκωσης, η περιεκτικότητα σε ρεσβερατρόλη δεν καταλαμβάνει σημαντικό ρόλο.

Συμπερασματικά, είναι πιθανό μια ευτηκτογέλη για να είναι ανθεκτική και να συγκρατεί > 60% νερό για πολλή ώρα, να πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε αλγινικό και νερό.

Ακολούθως, παρατίθεται ενδεικτικά το διάγραμμα της ευτηκτογέλης του 14ου πειράματος, καθώς παρουσιάζει τη διαρκέστερη συγκράτηση νερού, το οποίο απεικονίζει την μεταβολή της ικανότητας συγκράτησης νερού με το πέρασμα του χρόνου, από τη χρονική στιγμή 15min (σημείο ισορροπίας με μέγιστο ποσοστό διόγκωσης, άρα 100% συγκράτηση) και μετά.

Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα, παρατηρούνται δύο σημαντικά σημεία που αξίζει να σχολιαστούν. Το πρώτο αντιστοιχεί σε 92.9% συγκράτηση νερού στα 30min και το δεύτερο σε 72.5% συγκράτηση νερού στα 55min. Με άλλα λόγια, αφού η ισορροπία έχει επέλθει στα 15min, η συγκεκριμένη ευτηκτογέλη έχει συγκρατήσει ποσοστό νερού > 70% για 40min μετά την ισορροπία, ενώ για τα πρώτα 15min μετά το σημείο ισορροπίας, το ποσοστό συγκράτησης ήταν > 90%. Συγκρίνοντας τα δεδομένα αυτής της γέλης με των υπολοίπων, αποδείχθηκε ότι η γέλη αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκράτηση νερού για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, πιθανότατα λόγω της υψηλής της περιεκτικότητας σε αλγινικό και της μεσαίας περιεκτικότητας σε νερό.



Εικόνα 23: Διάγραμμα συγκράτησης νερού ευτηκτογέλης με περιεκτικότητες 0.75% w/w σε ρεσβερατρόλη, 10% w/w σε νερό και 17.5% w/w σε αλγινικό συναρτήσει του χρόνου

3.3.3 Απόδοση εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης - Encapsulation Efficiency (EE%)

Ακολούθως, παρατίθενται τα αποτελέσματα για την απόδοση εγκλωβισμού (encapsulation efficiency %) της ρεσβερατρόλης στις 14 ευτηκτογέλες, που συγκεντρώνονται στον Πίνακα 14.

Παρατηρείται ότι η απόδοση εγκλωβισμού κυμαίνεται εντός του εύρους 17.7%-51.2%. Οι χαμηλότερες τιμές της ΕΕ% παρατηρούνται για τις γέλες 10 και 14, ενώ οι υψηλότερες για τις 11 και 12.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης στις ευτηκτογέλες

Αριθμός πειράματος	Περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης (% w/w)	Περιεκτικότητα νερού (% w/w)	Περιεκτικότητα αλγινικού (% w/w)	Encapsulation efficiency %
1	0.25	10	12.5	21.3
2	0.25	15	15	28.0
3	0.25	5	15	42.8
4	0.25	10	17.5	29.1
5	0.50	15	12.5	30.7
6	0.50	5	12.5	25.6
7	0.50	10	15	40.0
8	0.50	10	15	42.6
9	0.50	15	17.5	29.3
10	0.50	5	17.5	17.7
11	0.75	10	12.5	51.2
12	0.75	15	15	49.8
13	0.75	5	15	26.8
14	0.75	10	17.5	17.8

3.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων πειραματικού σχεδιασμού και προσδιορισμός μοντέλων πρόβλεψης αποκρίσεων

3.4.1 Προσδιορισμός ικανότητας διόγκωσης – Swelling Ratio (SR%) ή water uptake capacity

Υπάρχουν πολλά μοντέλα που μπορούν να εφαρμοστούν για να περιγράψουν τη σχέση ανάμεσα στις ανεξάρτητες μεταβλητές και τη συγκεκριμένη απόκριση. Το πρόγραμμα Design Expert 12 που χρησιμοποιήθηκε για τον πειραματικό σχεδιασμό τύπου Box-Behnken παρέχει τη δυνατότητα στατιστικής μελέτης των αποτελεσμάτων και προσδιορισμού του μαθηματικού μοντέλου με την καλύτερη προσαρμογή. Το μοντέλο που ανταποκρίνεται καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα φαίνεται να είναι το απλοποιημένο τετραγωνικό (Reduced Quadratic model), αφού έχει προηγηθεί μετασχηματισμός των μετρήσεων με τον φυσικό λογάριθμο (δηλαδή y'=lny). Ο μετασχηματισμός απαιτείται, συνήθως, όταν η μέγιστη τιμή της απόκρισης απέχει πολύ από την ελάχιστη τιμή και, συγκεκριμένα, προτείνεται όταν η αναλογία τους είναι μεγαλύτερη από 10.

Η αρχική μορφή της εξίσωσης που διέπει το μοντέλο αυτό περιέχει τους όρους A, B, C, AB, BC, AC, A^2, B^2 και C^2, όπου με A, B, C έχουν συμβολιστεί οι ανεξάρτητες μεταβλητές (έχει οριστεί με A να κωδικοποιείται η % w/w περιεκτικότητα της γέλης σε ρεσβερατρόλη, με B η % w/w περιεκτικότητα της γέλης σε νερό και με C η % w/w περιεκτικότητα της γέλης σε αλγινικό), και από τη μορφή αυτή αφαιρούνται σταδιακά οι όροι που δεν είναι σημαντικοί (έχουν υψηλά p-values) και που επηρεάζουν αρνητικά την προσαρμογή.

Υλοποιώντας τις παραπάνω διαδικασίες προκύπτουν τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA για το ποσοστό διόγκωσης (swelling ratio %) (βλ. Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 1η απόκριση (ποσοστό διόγκωσης των ευτηκτογελών στα 5min)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	5,85	7	0,8359	11,69	0,0040	significant
A-Resveratrol content	8,360E-07	1	8,360E-07	0,0000	0,9974	
B-Water content	1,65	1	1,65	23,02	0,0030	
C-Alginate content	1,24	1	1,24	17,28	0,0060	
AB	0,8761	1	0,8761	12,25	0,0128	
AC	0,4766	1	0,4766	6,67	0,0417	
BC	0,7765	1	0,7765	10,86	0,0165	
C^2	0,8407	1	0,8407	11,76	0,0140	
Residual	0,4291	6	0,0715			
Lack of Fit	0,3957	5	0,0791	2,37	0,4555	not significant
Pure Error	0,0334	1	0,0334			
Cor Total	6,28	13				

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, η τιμή F-value 11.69 του μοντέλου υποδηλώνει ότι ο μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό, ενώ υπάρχει πιθανότητα μόνο 0.40% η υψηλή αυτή τιμή F να οφείλεται σε θόρυβο. Συγχρόνως, στατιστικά σημαντικοί είναι και οι όροι που έχουν τιμή p-value κάτω από 0.0500. Συμπερασματικά, η περιεκτικότητα της ευτηκτογέλης σε ρεσβερατρόλη φαίνεται να μην επηρεάζει την ικανότητα διόγκωσης των γελών (παρόλα αυτά δεν αφαιρείται από την εξίσωση για να παραμείνει το μοντέλο ιεραρχημένο). Αντίθετα, η περιεκτικότητα των γελών σε νερό φαίνεται να επηρεάζει στο μεγαλύτερο βαθμό την ικανότητα διόγκωσης αυτών. Η έλλειψη προσαρμογής (Lack of fit), τέλος, δεν είναι στατιστικά σημαντική, υποδηλώνοντας καλή προσαρμογή του μοντέλου. Επιπρόσθετα, σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την 1η απόκριση, υπάρχουν κάποιοι δείκτες, όπως το Adequate Precision, το οποίο μετρά την αναλογία σήματος προς θόρυβο. Μια αναλογία μεγαλύτερη από 4 είναι επιθυμητή, συνεπώς, η αναλογία 13.375 στην προκειμένη περίπτωση υποδηλώνει επαρκές σήμα. Επιπλέον, η τιμή του R^2 που ισούται με 0.9317 υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Όπως προκύπτει, η ικανότητα διόγκωσης (SR%) στα 5 min περιγράφεται από την κωδικοποιημένη εξίσωση (coded equation) που ακολουθεί:

$$\ln(SR\%) = 2.98 + 0.0003A + 0.4536B + 0.3930C - 0.4680AB + 0.3452AC - 0.4406BC - 0.4952C^2$$

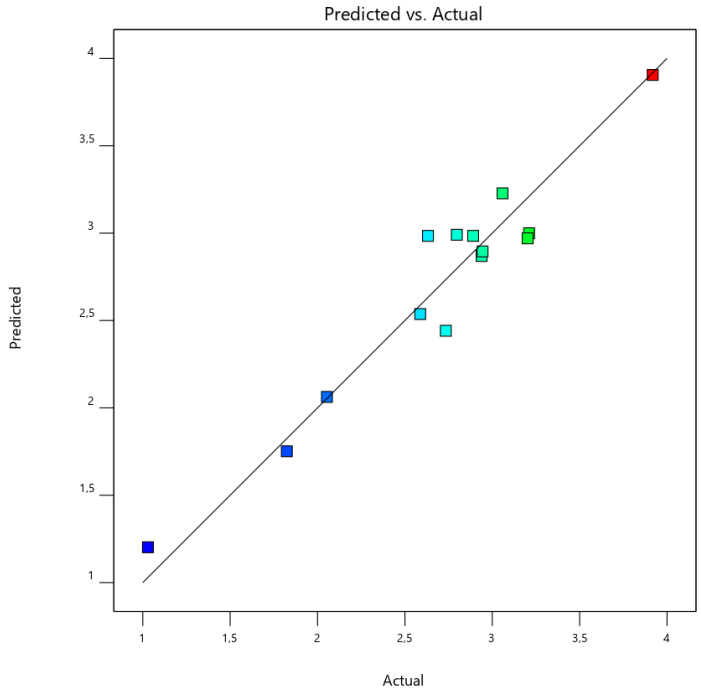
Η εξίσωση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις της απόκρισης για δεδομένες τιμές κάθε παράγοντα A, B, C, με την κωδικοποιημένη τους μορφή κατά Box-Behnken (-1 για τα κατώτατα επίπεδα τιμών και +1 για τα ανώτατα) και είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων συγκρίνοντας τους συντελεστές αυτών.

Επίσης, η ικανότητα διόγκωσης περιγράφεται και από την πραγματική εξίσωση (actual equation) που εκφράζεται ως:

$$\ln(SR\%) = -21.12458 - 4.53932 \times resveratrol\ content + 0.806631 \times water\ content + 2.61039 \times alginate\ content - 0.974396 \times resveratrol \times water\ content + 0.552305 \times resveratrol \times alginate\ content - 0.035248 \times water \times alginate\ content - 0.079228 \times alginate\ content^2$$

Και αυτή η εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις της απόκρισης για δεδομένες πραγματικές τιμές κάθε παράγοντα A, B, C, όμως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων.

Στο παρακάτω διάγραμμα, απεικονίζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών της 1ης απόκρισης με τις πραγματικές που ελήφθησαν.



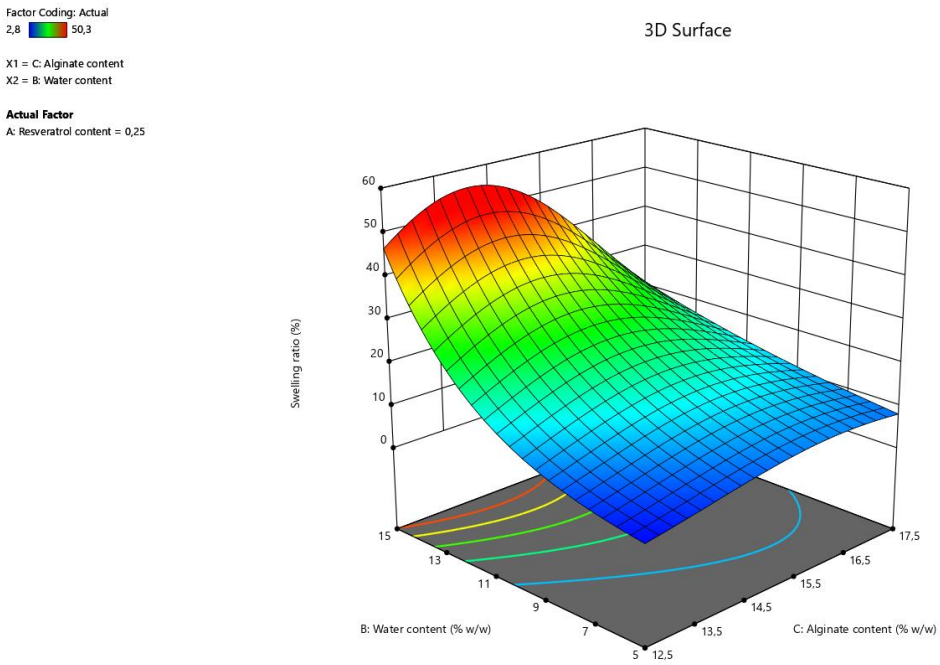
Εικόνα 24: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 1ης απόκρισης (φυσικός λογάριθμος της ικανότητας διόγκωσης των ευτηκτογελών στα 5min)

Το παραπάνω διάγραμμα αποτελείται από μια διαγώνια γραμμή, η οποία αντιστοιχεί στην ευθεία y=x , και από διάφορα σημεία που αντιστοιχούν σε ζεύγη πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών. Τα σημεία που βρίσκονται κοντά στη γραμμή αντιπροσωπεύουν προβλέψεις που είναι πολύ κοντά στις πραγματικές τιμές, ενώ αυτά που απέχουν από τη γραμμή δείχνουν μεγαλύτερα σφάλματα πρόβλεψης.

Παρατηρώντας, λοιπόν, το διάγραμμα αυτό, φαίνεται ότι τα περισσότερα σημεία βρίσκονται κοντά στη διαγώνιο γραμμή, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι προβλεπόμενες τιμές είναι αρκετά κοντά στις πραγματικές τιμές και ότι το μοντέλο προβλέπει με καλή ακρίβεια. Επιπλέον, η κατανομή των σημείων είναι σχετικά ομοιόμορφα κατανεμημένη γύρω από τη γραμμή, χωρίς μεγάλα αποκλίνοντα σφάλματα σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή. Αυτό σημαίνει ότι το μοντέλο δεν κάνει συστηματικά σφάλματα σε κάποια περιοχή τιμών.

Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι το μοντέλο έχει καλή προσαρμογή και ότι οι προβλέψεις του είναι αξιόπιστες.

Παρακάτω απεικονίζεται ενδεικτικά το τρισδιάστατο γράφημα της επιφάνειας του ποσοστού διόγκωσης συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για δεδομένη – ελάχιστη τιμή A (περιεκτικότητας σε ρεσβερατρόλη).



Εικόνα 25: 3D επιφάνεια του swelling ratio συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για δεδομένη – ελάχιστη τιμή A

Το παραπάνω είναι ένα 3D διάγραμμα επιφάνειας, το οποίο απεικονίζει την επίδραση δύο παραγόντων, της περιεκτικότητας σε αλγινικό και της περιεκτικότητας σε νερό, στο ποσοστό διόγκωσης (για δεδομένη σταθερή τιμή περιεκτικότητας σε ρεσβερατρόλη 0.25% w/w). Η επιφάνεια δείχνει πώς μεταβάλλεται το ποσοστό διόγκωσης ανάλογα με τις τιμές των δύο παραγόντων, ενώ τα χρώματα αλλάζουν από μπλε, το οποίο αντιστοιχεί στο χαμηλότερο ποσοστό διόγκωσης, σε κόκκινο, το οποίο αντιστοιχεί στο υψηλότερο ποσοστό διόγκωσης.

Παρατηρώντας την εικόνα, φαίνεται ότι το ποσοστό διόγκωσης λαμβάνει γενικά χαμηλές τιμές όταν η περιεκτικότητα της γέλης σε νερό είναι χαμηλή και δεν επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το αλγινικό, ενώ αυξάνεται θεαματικά με την αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό και την ταυτόχρονη μείωση σε αλγινικό. Συγχρόνως, εμφανίζεται μια καμπύλωση, που υποδεικνύει τη μη γραμμική σχέση μεταξύ των παραγόντων και της απόκρισης, που είναι γνωστή από τη μορφή του μοντέλου (απλοποιημένο τετραγωνικό). Η καθοριστική σημασία της περιεκτικότητας σε νερό για το ποσοστό διόγκωσης είναι εμφανής.

Αυτό το διάγραμμα είναι χρήσιμο για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραγόντων και για τον εντοπισμό των βέλτιστων συνθηκών για την επίτευξη επιθυμητού ποσοστού διόγκωσης.

3.4.2 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης - Encapsulation Efficiency (EE%)

Για τη 2η απόκριση, δηλαδή την απόδοση εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης, επιλέχθηκε πάλι το μοντέλο της μορφής reduced quadratic model (απλοποιημένο τετραγωνικό), χωρίς μετασχηματισμό αυτή τη φορά. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, όταν από το πλήρες τετραγωνικό μοντέλο έχουν αφαιρεθεί οι όροι BC και A^2. Φαίνεται, επίσης, ότι οι όροι A (περιεκτικότητα σε ρεσβερατρόλη) και B^2 δεν είναι σημαντικοί για το μοντέλο, γιατί έχουν p-value υψηλότερο από 0.05. Τις χαμηλότερες p-values έχουν οι όροι AC και C^2, ενώ από τους όρους πρώτης τάξης ο πιο σημαντικός φαίνεται να είναι ο C

(περιεκτικότητα σε αλγινικό). Η F-value του μοντέλου είναι 16.99 και δηλώνει ότι είναι σημαντικό σε σχέση με το θόρυβο (0.15% πιθανότητα η τιμή αυτή να οφείλεται σε θόρυβο). Πάλι η έλλειψη προσαρμογής (lack of fit) δεν είναι στατιστικά σημαντική, δείχνοντας καλή προσαρμογή του μοντέλου.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 2η απόκριση (απόδοση εγκλωβισμού ρεσβερατρόλης στην ευτηκτογέλη)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1522,10	7	217,44	16,99	0,0015	significant
A-Resveratrol content	74,42	1	74,42	5,81	0,0525	
B-Water content	77,50	1	77,50	6,05	0,0491	
C-Alginate content	152,25	1	152,25	11,89	0,0137	
AB	357,21	1	357,21	27,90	0,0019	
AC	424,36	1	424,36	33,15	0,0012	
B^2	58,66	1	58,66	4,58	0,0761	
C^2	417,76	1	417,76	32,63	0,0012	
Residual	76,81	6	12,80			
Lack of Fit	73,43	5	14,69	4,34	0,3483	not significant
Pure Error	3,38	1	3,38			
Cor Total	1598,91	13				

Επιπρόσθετα, σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την 2η απόκριση, η τιμή του Adequate Precision, δηλαδή η αναλογία σήματος προς θόρυβο, ισούται με 12.6753 και υποδηλώνει επαρκές σήμα. Επιπλέον, η τιμή του R^2 που ισούται με 0.9520 υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

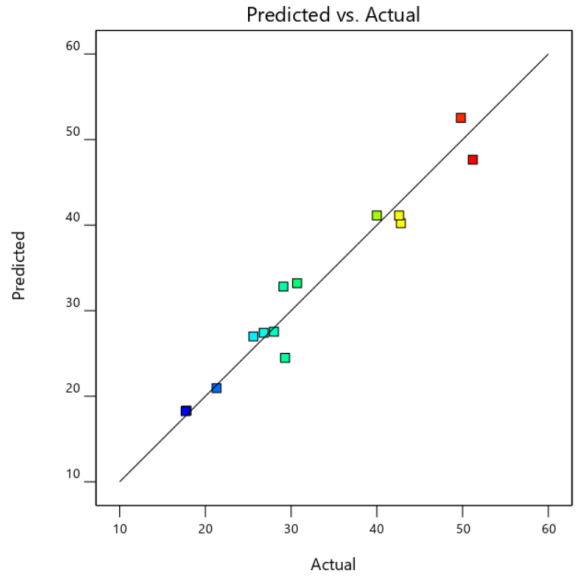
Όπως προκύπτει, η απόδοση εγκλωβισμού (ΕΕ%) περιγράφεται από την κωδικοποιημένη εξίσωση (coded equation) που ακολουθεί:

$$EE\% = 41.13 + 3.05A + 3.11B - 4.36C + 9.45AB - 10.30AC - 4.19B^2 - 11.20C^2,$$

όπου οι όροι A, B, C λαμβάνουν τιμές κωδικοποιημένες κατά Box-Behnken (-1 οι κατώτερες, +1 οι μεγαλύτερες). Επίσης, η απόδοση εγκλωβισμού περιγράφεται και από την πραγματική εξίσωση (actual equation) που εκφράζεται ως:

$$\begin{aligned} EE\% = {} & -450.6200 + 183.8000 \times resveratrol\ content + 0.1985 \times water\ content \\ & + 60.2310 \times alginate\ content + 7.5600 \times resveratrol \times water\ content \\ & - 16.4800 \times resveratrol \times alginate\ content - 0.1678 \times water^2 \\ & - 1.7912 \times alginate^2 \end{aligned}$$

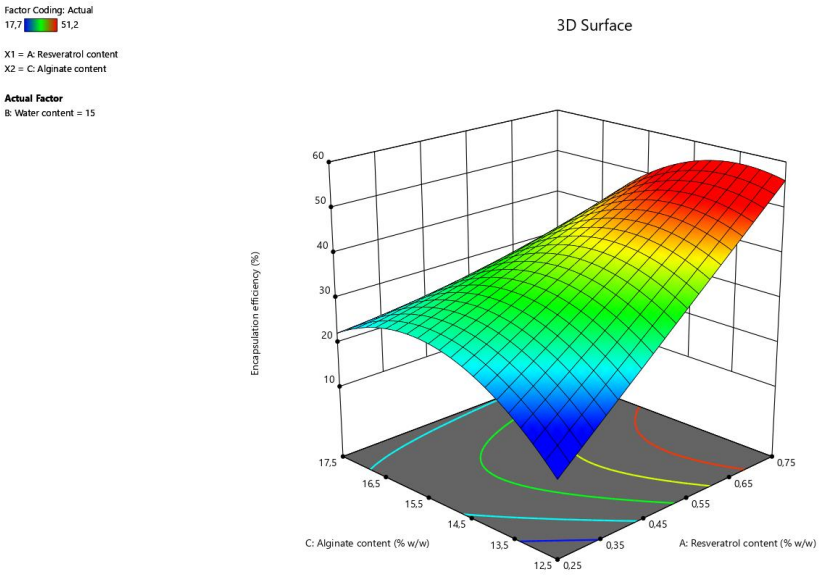
Στο παρακάτω διάγραμμα, απεικονίζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών της 2ης απόκρισης με τις πραγματικές που ελήφθησαν.



Εικόνα 26: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 2ης απόκρισης (απόδοση εγκλωβισμού)

Το παραπάνω διάγραμμα ερμηνεύεται κατά τρόπο ίδιο με αυτόν της προηγούμενης ενότητας. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι τα περισσότερα σημεία βρίσκονται κοντά στη διαγώνιο γραμμή, υποδεικνύοντας ότι οι προβλέψεις του μοντέλου είναι γενικά καλές και βρίσκονται κοντά στις πραγματικές τιμές. Ωστόσο, υπάρχουν μερικά σημεία, κυρίως στις υψηλότερες τιμές ΕΕ%, που βρίσκονται λίγο πιο μακριά από τη διαγώνιο γραμμή, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μοντέλο μπορεί να παρουσιάζει αδυναμίες στην ακριβή πρόβλεψη των τιμών αυτών, δηλαδή στην περιοχή των αποδόσεων εγκλωβισμού κοντά στο 50%.

Παρακάτω απεικονίζεται ενδεικτικά το τρισδιάστατο γράφημα της επιφάνειας της απόδοσης εγκλωβισμού συναρτήσει των μεταβλητών Α και C, για δεδομένη – μέγιστη τιμή Β (περιεκτικότητας σε νερό).



Εικόνα 27: 3D επιφάνεια της απόδοσης εγκλωβισμού συναρτήσει των μεταβλητών Α και C, για δεδομένη – μέγιστη τιμή Β

Το 3D διάγραμμα επιφάνειας που παρατίθεται παραπάνω απεικονίζει την επίδραση δύο παραγόντων, της περιεκτικότητας σε αλγινικό και της περιεκτικότητας σε ρεσβερατρόλη, στην απόδοση εγκλωβισμού (για δεδομένη σταθερή τιμή περιεκτικότητας σε νερό 15% w/w). Η επιφάνεια δείχνει πώς μεταβάλλεται η απόδοση εγκλωβισμού ανάλογα με τις τιμές των δύο παραγόντων, ενώ τα χρώματα αλλάζουν από μπλε, το οποίο αντιστοιχεί στη χαμηλότερη απόδοση εγκλωβισμού, σε κόκκινο, το οποίο αντιστοιχεί στην υψηλότερη απόδοση εγκλωβισμού.

Παρατηρώντας την εικόνα, φαίνεται ότι, για χαμηλές περιεκτικότητες σε ρεσβερατρόλη, οι μεσαίες τιμές αλγινικού αυξάνουν την ΕΕ%, ενώ οι υψηλότερες τιμές απόδοσης εγκλωβισμού επιτυγχάνονται με υψηλές τιμές περιεκτικότητας σε ρεσβερατρόλη και χαμηλότερες αλγινικού. Συγχρόνως, εμφανίζεται μια καμπύλωση στο επίπεδο X2-Z που υποδεικνύει τη μη γραμμική σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας σε αλγινικό και της απόκρισης. Αντίθετα, η σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας σε ρεσβερατρόλη και της απόδοσης εγκλωβισμού φαίνεται να είναι σχεδόν γραμμική για χαμηλές τιμές αλγινικού (αφού ο όρος A^2 έχει αφαιρεθεί από την εξίσωση).

Αυτό το διάγραμμα είναι χρήσιμο για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραγόντων και για τον εντοπισμό των βέλτιστων συνθηκών για την επίτευξη επιθυμητής τιμής απόδοσης εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης στην ευτηκτογέλη.

3.4.3 Επιβεβαίωση μοντέλου – Confirmation

Αφού παρασκευαστεί εκ νέου η ευτηκτογέλη που αποτελείται από 5mg ρεσβερατρόλης (0.25% w/w), 0.25g αλγινικού (12.5% w/w), 1.8g NaDES και 0.2g υπερκάθαρου νερού (10% w/w), όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6 (γέλη 1 του πειραματικού σχεδιασμού), πραγματοποιούνται οι διαδικασίες για τον χαρακτηρισμό της ως προς την ικανότητα διόγκωσης (SR%) (βλ. Ενότητα 2.7.1) και την απόδοση εγκλωβισμού (ΕΕ%) της ρεσβερατρόλης (βλ. Ενότητα 2.7.3), προκειμένου να επιβεβαιωθεί το μοντέλο που προέκυψε από το λογισμικό. Τα αποτελέσματα των διαδικασιών αυτών, καταχωρούνται επίσης στο λογισμικό Design – Expert 12, το οποίο ελέγχει την επαναληψιμότητα του μοντέλου με 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα επιβεβαίωσης μοντέλου μέσω του λογισμικού Design – Expert 12

Response	Predicted Mean	Predicted Median*	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean†	95% PI high
Swelling ratio‡	11,9064	11,4882		3,24171	1	N/A	4,98884	17	26,4549
Encapsulation efficiency	20,9475	20,9475		3,57793	1	4,66505	9,53254	23,9	32,3625

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, για διάστημα εμπιστοσύνης 95%, η μέση τιμή των τριών μετρήσεων του ποσοστού διόγκωσης που είναι ίση με 17.0% και η μέση τιμή της απόδοσης εγκλωβισμού που προέκυψε, επίσης, από τρεις επαναλήψεις και είναι ίση με 23.9% είναι εντός ορίων.

Συνοψίζοντας, συμπεραίνεται, ότι η επαναληψιμότητα του μοντέλου είναι αρκετά ικανοποιητική.

3.5 Βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής των ευτηκτογελών

3.5.1 Σύσταση βέλτιστης ευτηκτογέλης και προσδιορισμός προβλεπόμενων τιμών ικανότητας διόγκωσης (SR%) και απόδοσης εγκλωβισμού (ΕΕ%)

Μέσω του λογισμικού δύναται να γίνει βελτιστοποίηση της διεργασίας, δηλαδή εύρεση της «βέλτιστης» ευτηκτογέλης. Αυτή η γέλη παρουσιάζει τις μέγιστες δυνατές αποκρίσεις, δηλαδή

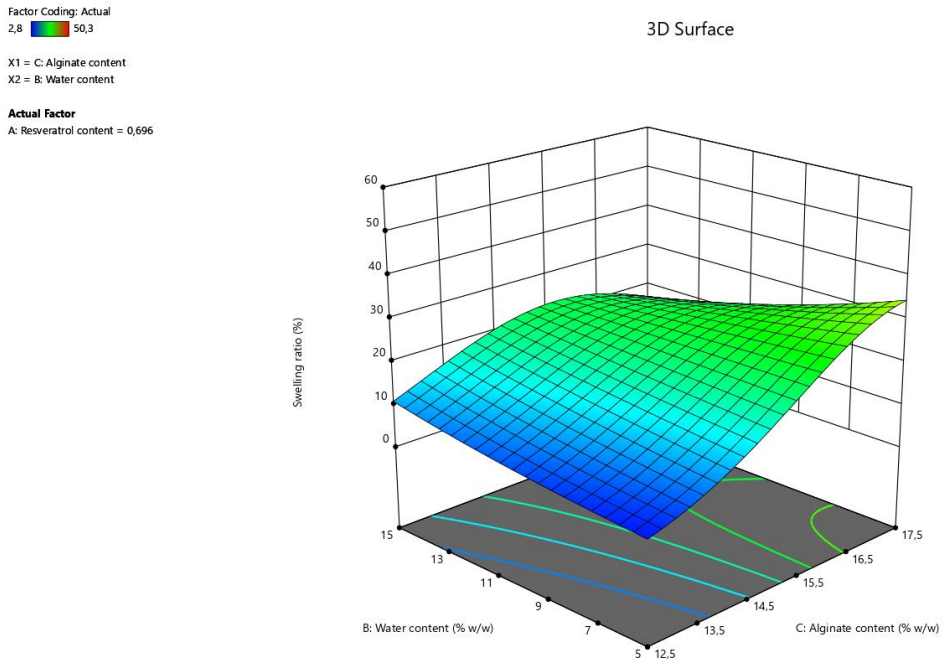
μέγιστη τιμή swelling ratio και απόδοσης εγκλωβισμού, με την προϋπόθεση οι ανεξάρτητες μεταβλητές να λαμβάνουν τιμές εντός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού. Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης από το λογισμικό συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα. Σημειώνεται ότι για να είναι μια λύση ικανοποιητικά κοντά στη βέλτιστη, θα πρέπει η επιθυμητότητα (desirability) να έχει τιμή όσο πλησιέστερη στη μονάδα γίνεται.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης διεργασίας παρασκευής ευτηκτογέλης

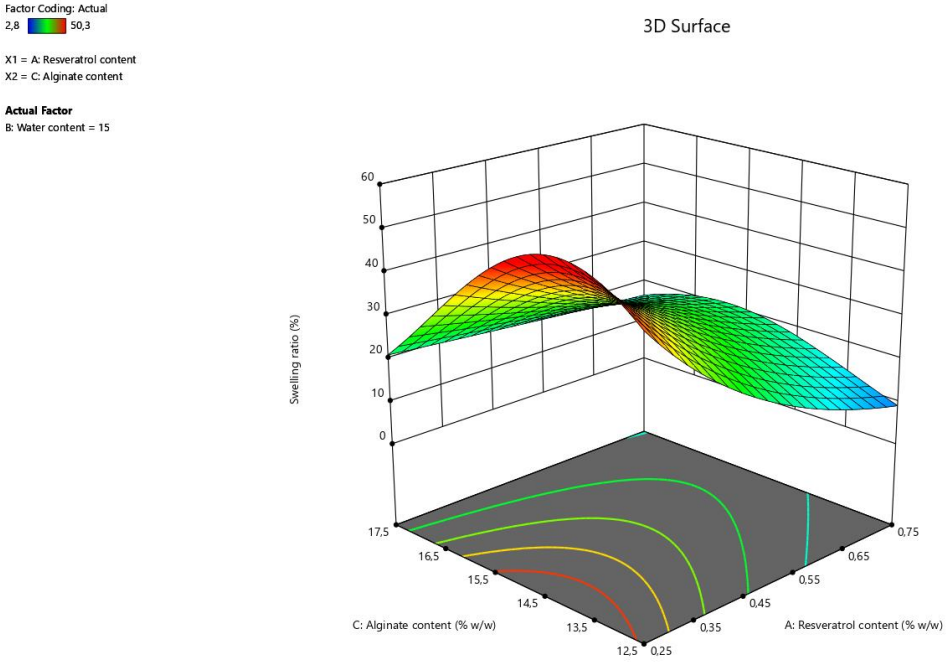
Περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης (% w/w)	Περιεκτικότητα νερού (% w/w)	Περιεκτικότητα αλγινικού (% w/w)	Swelling ratio %	Encapsulation efficiency %	Desirability
0.696	15	14.695	20.8	51.2	0.834

Φαίνεται, λοιπόν, ότι, προκειμένου να μεγιστοποιηθούν ταυτόχρονα το ποσοστό διόγκωσης και η απόδοση εγκλωβισμού, απαιτείται η περιεκτικότητα της γέλης σε ρεσβερατρόλη να είναι περίπου 0.7% w/w (σχετικά υψηλή στο εύρος του πειραματικού σχεδιασμού), η περιεκτικότητα σε νερό να λαμβάνει τη μέγιστη μελετώμενη τιμή της (15% w/w) και σε αλγινικό να έχει τιμή πολύ κοντά στην κεντρική (14.7% w/w). Αυτές οι συνθήκες, σύμφωνα με το μοντέλο, εξασφαλίζουν απόδοση εγκλωβισμού 51.2%, που είναι η μέγιστη πειραματική τιμή της ΕΕ% που ελήφθη κατά την αξιολόγηση των γελών του πειραματικού σχεδιασμού, ενώ η ικανότητα διόγκωσης στα 5 πρώτα λεπτά αγγίζει το 20.8%.

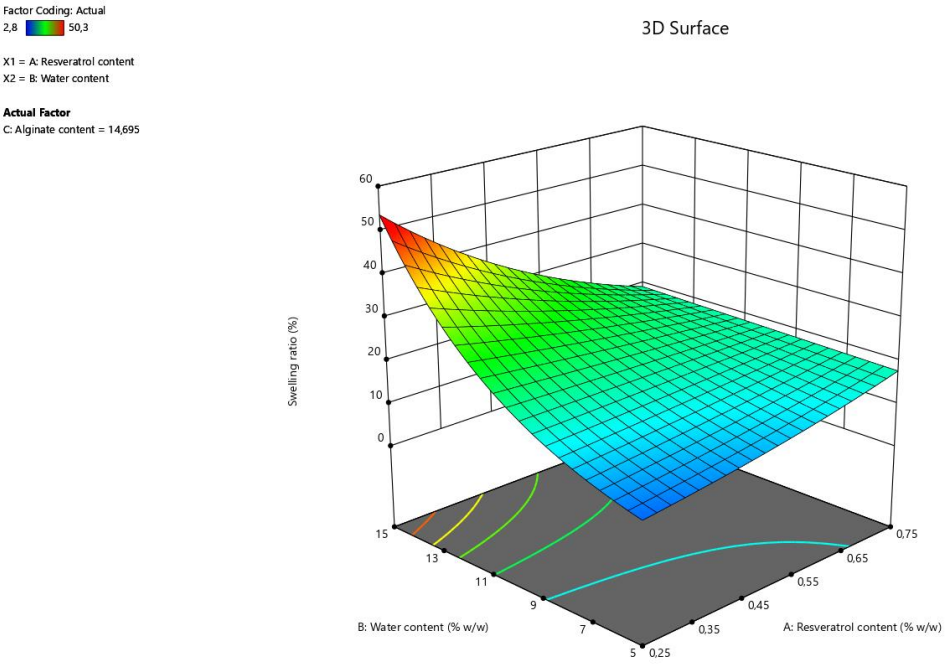
Στη συνέχεια παρατίθενται τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσει δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών κάθε φορά, όπου η τρίτη μεταβλητή λαμβάνει τη βέλτιστη τιμή της.



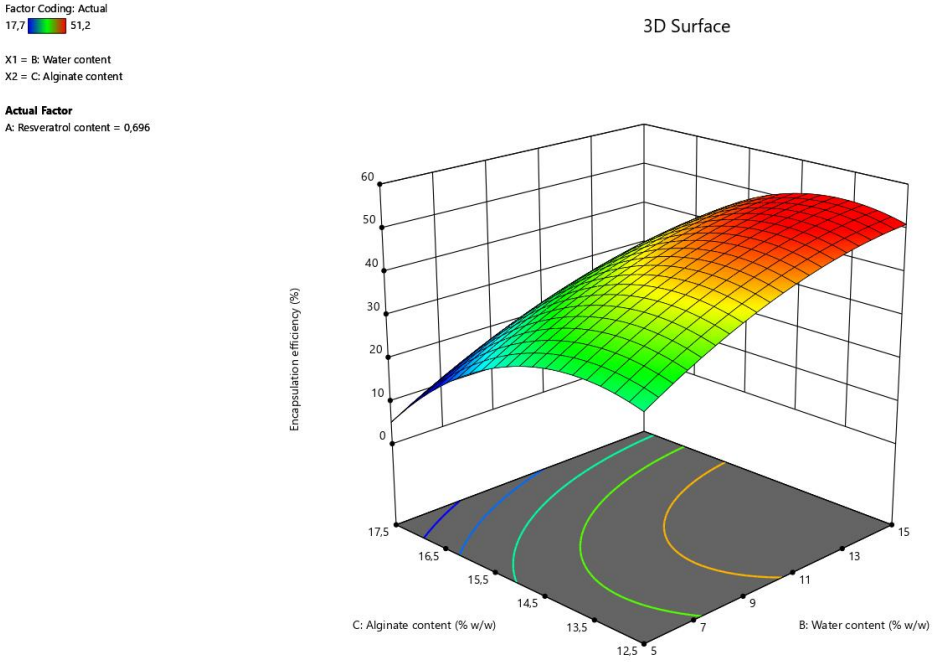
Εικόνα 28: 3D επιφάνεια του swelling ratio (5min) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A



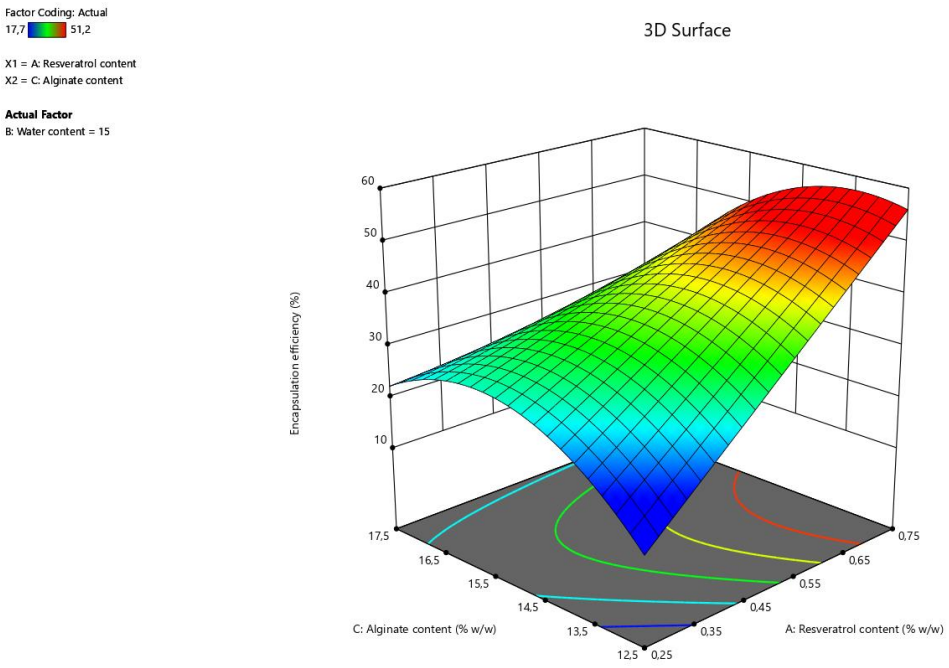
Εικόνα 29: 3D επιφάνεια του swelling ratio (5min) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B



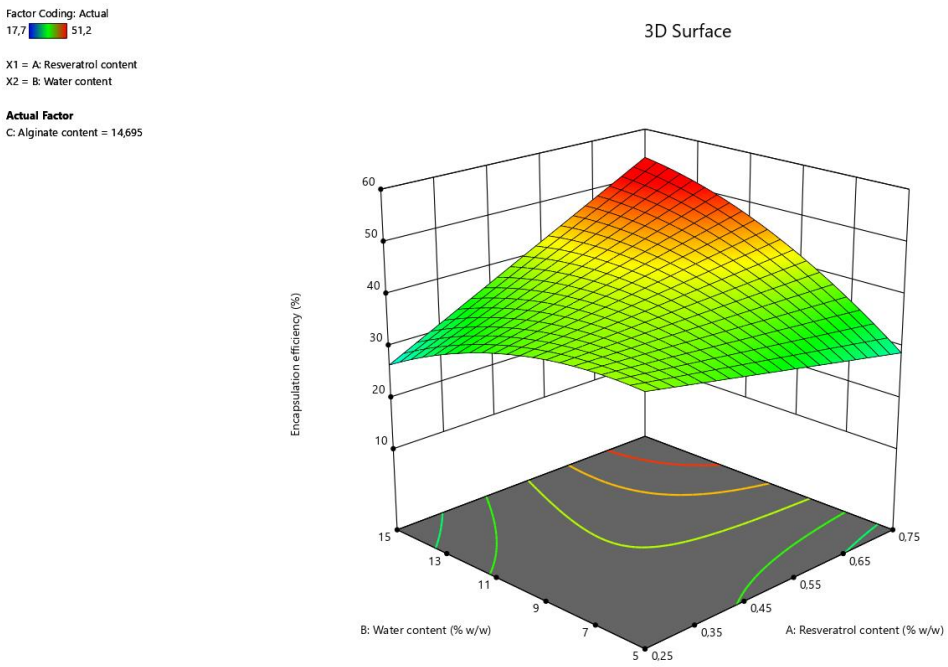
Εικόνα 30: 3D επιφάνεια του swelling ratio (5min) συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C



Εικόνα 31: 3D επιφάνεια της απόδοσης εγκλωβισμού συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A



Εικόνα 32: 3D επιφάνεια της απόδοσης εγκλωβισμού συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B



Εικόνα 33: 3D επιφάνεια της απόδοσης εγκλωβισμού συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης και τα παραπάνω τρισδιάστατα διαγράμματα των επιφανειών απόκρισης, γίνεται αντιληπτό ότι η ικανότητα διόγκωσης των ευτηκτογελών καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από την περιεκτικότητα σε αλγινικό αλλά και σε νερό. Ειδικότερα, ευνοείται από υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, μέτρια περιεκτικότητα σε αλγινικό και χαμηλή σε ρεσβερατρόλη (κόκκινες περιοχές των διαγραμμάτων: βλ. Εικόνα 29 και Εικόνα 30).

Από την άλλη, παρατηρείται αύξηση της απόδοσης εγκλωβισμού με αύξηση των δύο εκ τριών παραμέτρων, δηλαδή με υψηλές περιεκτικότητες σε ρεσβερατρόλη και νερό, ενώ χαμηλές τιμές περιεκτικότητας αλγινικού παρουσιάζουν υψηλές τιμές απόδοσης εγκλωβισμού (κόκκινες περιοχές των διαγραμμάτων: βλ. Εικόνα 31-Εικόνα 33).

Βλέποντας συνδυαστικά τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι φανερό πως για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση της ικανότητας διόγκωσης των ευτηκτογελών και της απόδοσης εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης, απαιτείται και για τις δύο αποκρίσεις μέγιστη περιεκτικότητα σε νερό (15% w/w) και τιμή περιεκτικότητας σε αλγινικό λίγο μικρότερη από την κεντρική τιμή (~15% w/w). Σχετικά με την περιεκτικότητα της ρεσβερατρόλης, η οποία επηρεάζει κυρίως την απόδοση εγκλωβισμού, απαιτείται τιμή περιεκτικότητας κοντά στο ανώτατο όριο (0.75% w/w).

3.5.2 Προσδιορισμός πραγματικών αποκρίσεων βέλτιστης γέλης: ικανότητα διόγκωσης (SR%) και απόδοση εγκλωβισμού (EE%)

Αφού παρασκευαστεί εις διπλούν η βέλτιστη ευτηκτογέλη που αποτελείται από 14mg ρεσβερατρόλης (0.696% w/w), 0.294g αλγινικού (14.695% w/w), 1.7g NaDES και 0.3g υπερκάθαρου νερού (15% w/w), όπως περιεγράφηκε στην Ενότητα 2.6, πραγματοποιούνται οι διαδικασίες για τον χαρακτηρισμό της ως προς την ικανότητα διόγκωσης (SR%) (βλ. Ενότητα 2.7.1) και την απόδοση εγκλωβισμού (EE%) της ρεσβερατρόλης (βλ. Ενότητα 2.7.3).

Τα αποτελέσματα των διαδικασιών αυτών (πειραματικές τιμές) συγκρίνονται με τις αντίστοιχες προβλεπόμενες από το μοντέλο που καταγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα (βλ. Πίνακας 19).

Πίνακας 19: Προβλεπόμενες και πραγματικές τιμές αποκρίσεων βέλτιστης ευτηκτογέλης και οι αποκλίσεις τους

Προβλεπόμενο Swelling ratio %	Πραγματικό Swelling ratio %	Απόκλιση %	Προβλεπόμενο Encapsulation efficiency %	Πραγματικό Encapsulation efficiency %	Απόκλιση %
20.8	24.6	18.3	51.2	49.8	2.7

Οι αποκλίσεις δεν είναι αμελητέες, ειδικά του ποσοστού διόγκωσης, παρ' όλ' αυτά θεωρείται ότι προέρχονται από πειραματικά σφάλματα.

Έπειτα, οι πειραματικές αυτές τιμές καταχωρούνται στο λογισμικό Design – Expert 12, προκειμένου να γίνει ξανά επιβεβαίωση με 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

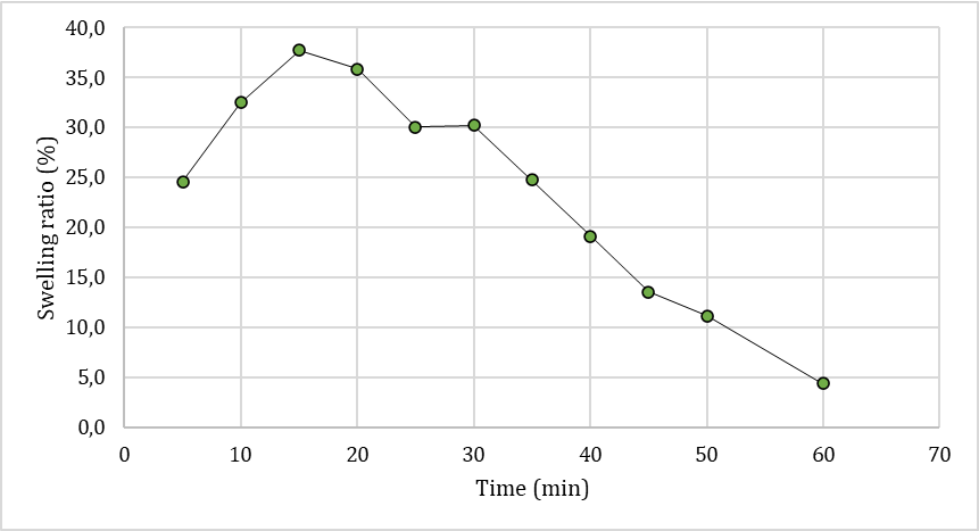
Πίνακας 20: Αποτελέσματα επιβεβαίωσης μοντέλου μέσω του λογισμικού Design – Expert 12 για τη βέλτιστη ευτηκτογέλη

Response	Predicted Mean	Predicted Median*	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean†	95% PI high
Swelling ratio‡	20,2132	19,5033		5,50337	1	N/A	8,37991	24,6	45,3916
Encapsulation efficiency	52,5475	52,5475		3,57793	1	4,66505	41,1325	49,8	63,9625

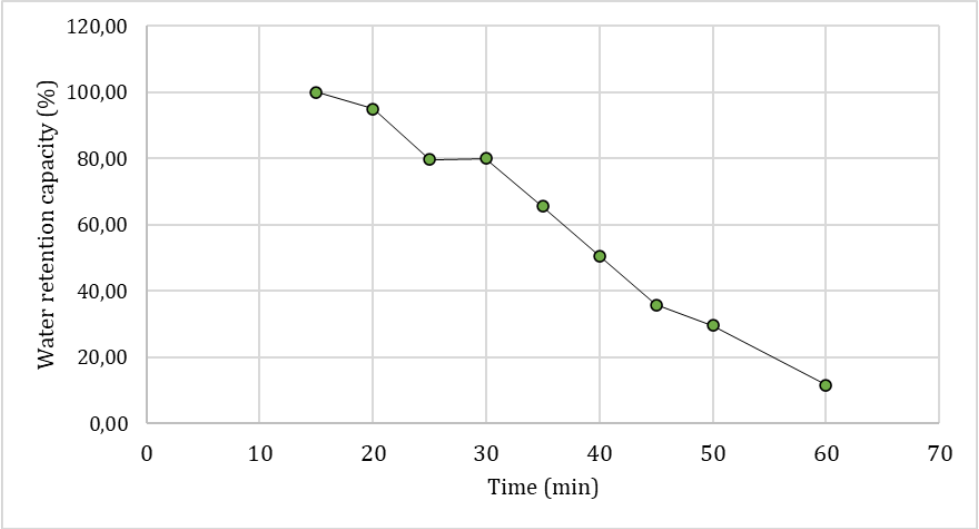
Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, για διάστημα εμπιστοσύνης 95%, οι πραγματικές τιμές του swelling ratio και της απόδοσης εγκλωβισμού είναι εντός ορίων, επομένως το μοντέλο επιβεβαιώνεται ξανά.

Επιπλέον, σχετικά με την ικανότητα διόγκωσης, παρατηρείται ότι η βέλτιστη ευτηκτογέλη παρουσιάζει μέγιστη τιμή ποσοστού διόγκωσης στα 15min (βλ. Εικόνα 34). Ως εκ τούτου, αναφορικά με την ικανότητα συγκράτησης νερού (water retention capacity) της βέλτιστης ευτηκτογέλης, παρατηρείται ότι αυτή παρουσιάζει συγκράτηση νερού πάνω από 65.5% για περίπου 20min (βλ. Εικόνα 35). Σύμφωνα με τα συμπεράσματα από τα αποτελέσματα της Ενότητας 3.3.2, μια ευτηκτογέλη για να είναι ανθεκτική και να συγκρατεί > 60% νερό για πολλή ώρα, θα πρέπει να περιέχει κατά το μέγιστο δυνατό αλγινικό και νερό. Επομένως, ενδέχεται η συγκεκριμένη ευτηκτογέλη να συγκρατούσε νερό για περισσότερο χρονικό διάστημα, εάν περιείχε περισσότερη ποσότητα αλγινικού.

Παρακάτω, παρατίθενται τα διαγράμματα της ικανότητας συγκράτησης και της ικανότητα διόγκωσης βέλτιστης ευτηκτογέλης σε συνάρτηση με τον χρόνο, αντίστοιχα.



Εικόνα 34: Διάγραμμα ικανότητας διόγκωσης βέλτιστης ευτηκτογέλης σε συνάρτηση με τον χρόνο



Εικόνα 35: Διάγραμμα ικανότητας συγκράτησης βέλτιστης ευτηκτογέλης σε συνάρτηση με τον χρόνο

3.6 Αξιολόγηση βέλτιστης ευτηκτογέλης ως προς την ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών – Φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH

Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης των δειγμάτων της βέλτιστης γέλης σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στους 37°C μετά από 30min επώασης έδειξαν ότι η μέση τιμή των απορροφήσεων των δειγμάτων είναι ίση με 0.135 (A_{sample}) και των τυφλών διαλυμάτων ίση με 0.537 (A_{blank}).

Επομένως, σύμφωνα με την Εξίσωση 10, η % αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH ορίζεται ως:

$$\%\text{Inhibition} = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} * 100,$$

όπου A_{blank} η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (αιθανολικού διαλύματος DPPH) και A_{sample} η απορρόφηση του φιλτραρισμένου δείγματος.

Έτσι, προκύπτει, ότι το ποσοστό της αναστολής των ριζών DPPH από εγκλωβισμένη ρεσβερατρόλη σε περιεκτικότητα 0.14mg/ml στο δείγμα ισούται με 74.9±1.3%.

Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα δείγματα που προέκυψαν από τη διάλυση ελεύθερης ρεσβερατρόλης στο αιθανολικό διάλυμα DPPH στην ίδια περιεκτικότητα 0.14mg/ml μετά από επώαση και μέτρηση στα 30min δίνουν μέση τιμή απορροφήσεων ίση με 0.135 (A_{sample}) και των τυφλών διαλυμάτων ίση με 0.586 (A_{blank}).

Επομένως, σύμφωνα με την Εξίσωση 10 προκύπτει, ότι το ποσοστό της αναστολής των ριζών DPPH από ελεύθερη ρεσβερατρόλη ισούται με 77.0±0.9%.

Συνεπώς, παρατηρείται, ότι δείγματα με ίσες συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης προκαλούν παραπλήσια, αλλά ελάχιστα διαφορετική αναστολή στις ρίζες DPPH. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η ελεύθερη ρεσβερατρόλη παρουσιάζει υψηλότερο ποσοστό σάρωσης ριζών από την εγκλωβισμένη σε ευτηκτογέλη ρεσβερατρόλη. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι η εγκλωβισμένη ρεσβερατρόλη δεν έχει αποδεσμευτεί πλήρως από το δίκτυο της ευτηκτογέλης στο αιθανολικό διάλυμα στο χρονικό διάστημα της επώασης των 30min, αλλά χρειάζεται περισσότερο χρόνο προκειμένου να δεσμεύσει τις ελεύθερες ρίζες στον ίδιο βαθμό με την ελεύθερη ρεσβερατρόλη. Παρ' όλα αυτά, επιβεβαιώνεται η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα της βέλτιστης ευτηκτογέλης που προέκυψε από τη βελτιστοποίηση της διεργασίας.

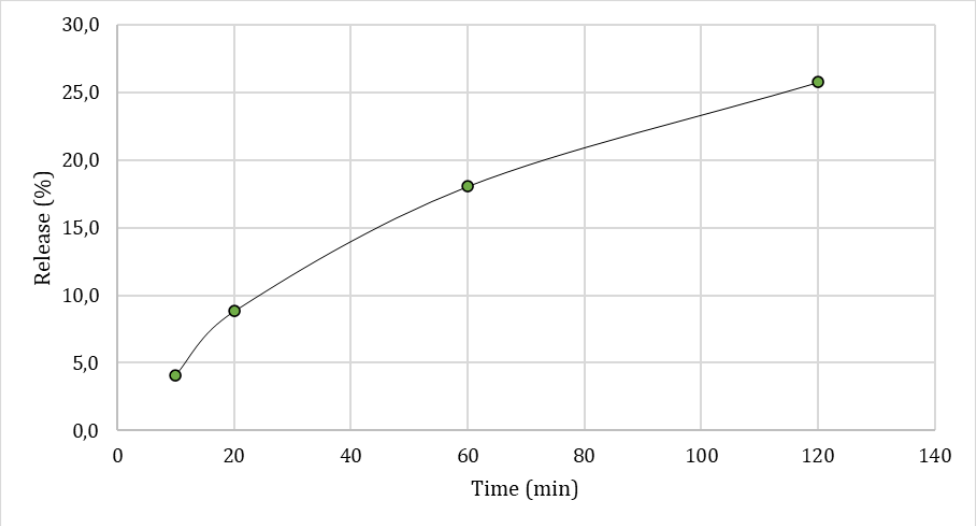
3.7 Αξιολόγηση βέλτιστης ευτηκτογέλης ως προς το κινητικό προφίλ απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης – Drug release kinetics studies

Αναλύοντας τα δεδομένα των πειραματικών διαδικασιών που περιεγράφηκαν στην Ενότητα 2.11 και τις μετρήσεις της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα για το ποσοστό αποδέσμευσης, ή αλλιώς, ποσοστό απελευθέρωσης, της ρεσβερατρόλης από τη βέλτιστη ευτηκτογέλη συναρτήσει του χρόνου (min).

Πίνακας 21: Ποσοστό απελευθερωμένης ρεσβερατρόλης από τη βέλτιστη ευτηκτογέλη με την πάροδο του χρόνου

Χρόνος (min)	Release %
10	4.1
20	8.8
60	18.1
120	25.8

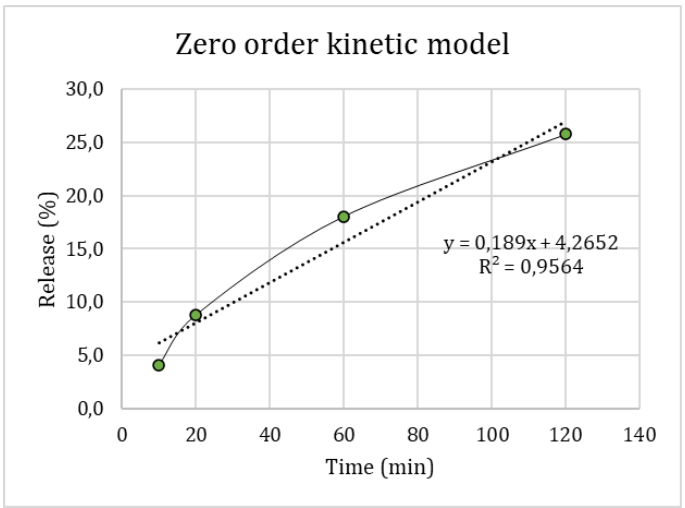
Ακολούθως παρατίθεται το διάγραμμα του ποσοστού αποδέσμευσης της ρεσβερατρόλης από τη βέλτιστη ευτηκτογέλη συναρτήσει του χρόνου.



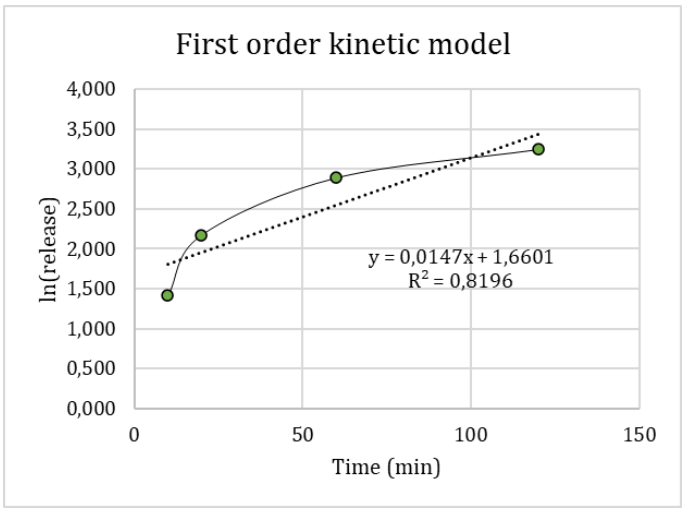
Εικόνα 36: Προφίλ αποδέσμευσης ρεσβερατρόλης μέσα από την βέλτιστη ευτηκτογέλη

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι αρχικά πραγματοποιείται πολύ μικρή αποδέσμευση της ρεσβερατρόλης (στα 10min έχει αποδεσμευτεί μόλις το 4% περίπου της εγκλωβισμένης ρεσβερατρόλης) και μετά το ποσοστό απελευθέρωσης σχεδόν διπλασιάζεται μέχρι τα 20 λεπτά. Έπειτα, όμως, αν και παρατηρείται σαφώς μεγαλύτερη αποδέσμευση, η οποία στις 2 ώρες έχει φτάσει το 25.8%, φαίνεται να υπάρχει ελάττωση στο ρυθμό με τον οποίο αυξάνεται αυτό το ποσοστό. Σε γενικές γραμμές, η ρεσβερατρόλη φαίνεται να αποδεσμεύεται σταδιακά από το δίκτυο της ευτηκτογέλης και να περνά στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.44 στους 37^{o}C.

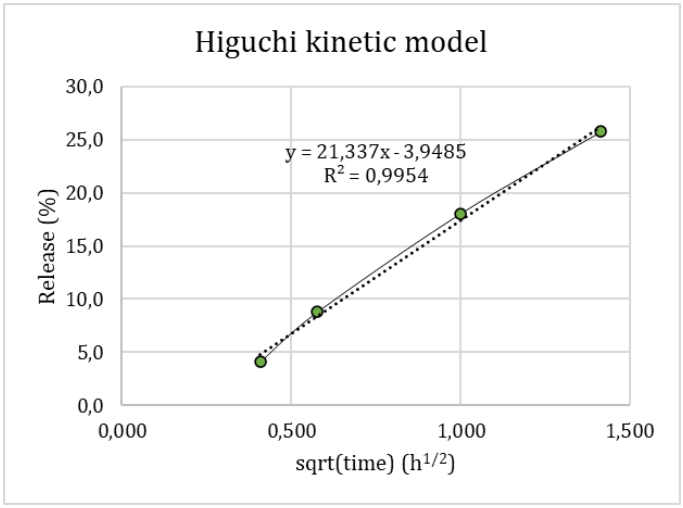
Στη συνέχεια, έγιναν απόπειρες προσαρμογής διάφορων μοντέλων στα δεδομένα απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης για το πρώτο αυτό δίωρο: μηδενικής τάξης, πρώτης τάξης, Higuchi και Korsmeyer–Peppas. Έτσι, ακολουθούν διαγράμματα που απεικονίζουν το προφίλ αποδέσμευσης της ρεσβερατρόλης μέσα από τη βέλτιστη ευτηκτογέλη σύμφωνα με το κάθε μοντέλο.



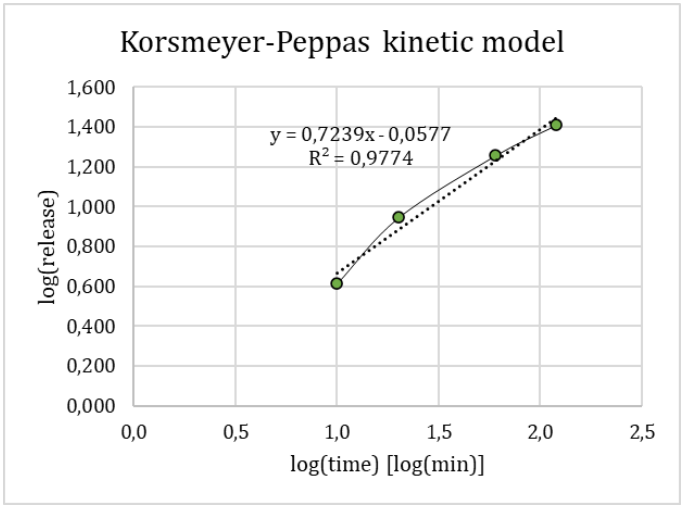
Εικόνα 37: Προφίλ αποδέσμευσης ρεσβερατρόλης σύμφωνα με κινητική μηδενικής τάξης



Εικόνα 38: Προφίλ αποδέσμευσης ρεσβερατρόλης σύμφωνα με κινητική πρώτης τάξης



Εικόνα 39: Προφίλ αποδέσμευσης ρεσβερατρόλης σύμφωνα με κινητική Higuchi



Εικόνα 40: Προφίλ αποδέσμευσης ρεσβερατρόλης σύμφωνα με κινητική Korsmeyer-Peppas

Επιπλέον, στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφεται ο αντίστοιχος συντελεστής προσαρμογής R^2 για κάθε μοντέλο. Ο συντελεστής R^2 κυμαίνεται μεταξύ 0 και 1 και περιγράφει την ποιότητα της προσαρμογής ενός στατιστικού μοντέλου στα δεδομένα. Συνεπώς, όσο ο συντελεστής πλησιάζει τη μονάδα, τόσο πιο κατάλληλο είναι το στατιστικό μοντέλο.

Πίνακας 22: Συντελεστές R^2 στατιστικών μοντέλων που εφαρμόστηκαν για το προφίλ αποδέσμευσης της ρεσβερατρόλης

Μοντέλο αποδέσμευσης	**Συντελεστής R^2**
Μηδενικής τάξης	0.9564
Πρώτης τάξης	0.8196
Higuchi	0.9954
Korsmeyer-Peppas	0.9774

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται, ότι το πιο κατάλληλο μοντέλο για να περιγράψει την αποδέσμευση της ρεσβερατρόλης είναι η κινητική Higuchi, λόγω της υψηλότερης τιμής R^2, που προσεγγίζει ικανοποιητικά τη μονάδα.

Το μοντέλο Higuchi χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αποδέσμευση που βασίζεται σε διάχυση Fick. Συγκριτικά με τα κινητικά μοντέλα μηδενικής και πρώτης τάξης, το μοντέλο αυτό αποδεικνύει ότι υπάρχει μηχανισμός ελεγχόμενος από τη διάχυση. Το μοντέλο αυτό φαίνεται να έχει σχεδόν άριστη προσαρμογή στα δεδομένα. Έτσι, συμπεραίνεται ότι το προφίλ απελευθέρωσης περιγράφεται από την τετραγωνική ρίζα του χρόνου και το ποσοστό απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους γραμμικά.

Συγχρόνως, και η κινητική Korsmeyer-Peppas δύναται να περιγράψει ικανοποιητικά την απελευθέρωση της ρεσβερατρόλης, συσχετίζοντας τον λογάριθμο του χρόνου με τον λογάριθμο του ποσοστού της απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης γραμμικά. Αναφορικά με το μοντέλο Korsmeyer-Peppas παρατηρείται ότι ο συντελεστής (n) ισούται με 0.7239. Σύμφωνα με τον Πίνακα 2 πρόκειται για συνδυασμό διάχυσης και διόγκωσης. Καθώς πρόκειται για ανώμαλη μεταφορά και το μοντέλο είναι ημι-εμπειρικό, δεν επιλέγεται για να περιγράψει το προφίλ της απελευθέρωσης.

Τελικά, επιλέγεται η εξίσωση Higuchi για να περιγράψει το μοντέλο της απελευθέρωσης για το χρονικό διάστημα των δύο ωρών από τη στιγμή της εμβάπτισης στο διάλυμα με pH 7.44 στους 37^{o}C. Συνολικά, όμως, παρατηρείται, ότι η αποδέσμευση της ρεσβερατρόλης είναι πολύ χαμηλή και

πραγματοποιείται σταδιακά. Το γεγονός αυτό, ωστόσο, θα μπορούσε να είναι ωφέλιμο σε περιπτώσεις που απαιτείται ελεγχόμενη ή βραδεία αποδέσμευση της ρεσβερατρόλης στο σύστημα. Η παρατεταμένη αποδέσμευση της βιοδραστικής ουσίας μπορεί να οφείλεται στον προστατευτικό ρόλο που επιτελεί για αυτή το πλέγμα της ευτηκτογέλης. Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι οι συγκεκριμένες ευτηκτογέλες είναι ακατάλληλες για περιπτώσεις που χρειάζεται η βιοδραστική ουσία να αποδεσμευτεί απότομα και να δράσει άμεσα, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε παρενέργειες λόγω υψηλών τοξικών συγκεντρώσεων.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία υλοποιείται η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας πράσινης διεργασίας εγκλωβισμού του φυσικού προϊόντος «ρεσβερατρόλη» σε καινοτόμες ευτηκτογέλες. Ειδικότερα, παρασκευάζονται ευτηκτογέλες με χρήση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES) που υφίσταται ζελατινοποίηση με τη βοήθεια αλγινικού, ενός οικονομικού και βιοσυμβατού ανιονικού βιοπολυμερούς. Οι ευτηκτογέλες αυτές έχουν τη δυνατότητα να εγκλωβίσουν την ρεσβερατρόλη μέσω της διάλυσης της υδρόφοβης ένωσης στο NaDES, προσδίδοντας στο διαλύτη διπλό ρόλο: αφενός λειτουργεί ως διαλυτικό μέσο για τη βιοδραστική ένωση και αφετέρου ζελατινοποιείται για τον σχηματισμό της ευτηκτογέλης.

Το NaDES που επιλέχθηκε απαρτίζεται από βεταΐνη (Bet), γλυκερόλη (Gly) και νερό (W) σε μοριακή αναλογία Bet:Gly:W 1:3:1. Η επιλογή του συγκεκριμένου διαλύτη έγινε για τους εξής λόγους: (i) έχει πράσινο χαρακτήρα και μπορεί να αντικαταστήσει τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, (ii) δύναται να ζελατινοποιηθεί με τη βοήθεια αλγινικού σε κατάλληλες περιεκτικότητες, (iii) διαλυτοποιεί ικανοποιητικά την ρεσβερατρόλη, καθώς αποδείχθηκε ότι αύξηση της συγκέντρωσης του συγκεκριμένου NaDES σε υδατικό διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας της ρεσβερατρόλης στο διάλυμα έως και 8 φορές σε σύγκριση με το νερό, ενισχύοντας δυνητικά τη βιοδιαθεσιμότητά της.

Ο πράσινος χαρακτήρας της διεργασίας έγκειται (i) στη χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών (συστατικά NaDES, βιοπολυμερές) και φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη, αντικαθιστώντας τους συμβατικούς οργανικούς (και συχνά επιβλαβείς ή τοξικούς) διαλύτες που απαντώνται στη βιβλιογραφία για τη διαλυτοποίηση της ρεσβερατρόλης, αποφεύγοντας έτσι και τυχόν ενεργοβόρα στάδια για την απομάκρυνσή τους, (ii) στη σχεδόν αμελητέα παραγωγή αποβλήτων από τη διεργασία και (iii) στην αναμενόμενη βιοσυμβατότητα και μη τοξικότητα των τελικών προϊόντων (ευτηκτογελών), όπως των πρώτων υλών. Οι ευτηκτογέλες επισημαίνεται ότι μπορούν να λειτουργήσουν ως αποθηκευτικά μέσα για την εγκλωβισμένη βιοδραστική ουσία και να την προστατεύουν από ανεπιθύμητες αντιδράσεις οξείδωσης.

Οι ευτηκτογέλες που συντίθενται, αξιολογούνται ως προς την ικανότητα διόγκωσης (Swelling Ratio, SR), την ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Retention Ratio, WRR) και την απόδοση εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης (Encapsulation Efficiency, EE). Από αυτές, η ικανότητα διόγκωσης και η απόδοση εγκλωβισμού, μελετώνται μέσω πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken, ώστε μέσω βελτιστοποίησης της διεργασίας να βρεθεί η σύσταση που τις μεγιστοποιεί ταυτόχρονα. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίζονται η περιεκτικότητα της ρεσβερατρόλης (% w/w), η περιεκτικότητα του νερού (% w/w) και η περιεκτικότητα του αλγινικού (% w/w).

Για την κάθε απόκριση επιλέγεται κατάλληλο μοντέλο ικανό να συσχετίσει τις εξαρτημένες με τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Τα μοντέλα παλινδρόμησης που επιλέχθηκαν για τη συσχέτιση των παραμέτρων σχεδιασμού με τις αποκρίσεις είναι:

- **Ικανότητα διόγκωσης – Swelling Ratio (%) ή water uptake capacity**

Το μοντέλο είναι το απλοποιημένο τετραγωνικό (Reduced Quadratic model), αφού έχει προηγηθεί μετασχηματισμός των μετρήσεων με τον φυσικό λογάριθμο (δηλαδή y'=lny), και περιγράφεται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

Coded Equation:

$$\ln(SR) = 2.98 + 0.0003A + 0.4536B + 0.3930C - 0.4680AB + 0.3452AC - 0.4406BC - 0.4952C^2$$

Actual Equation:

$$\ln(SR) = -21.12458 - 4.53932 \times resveratrol\ content + 0.806631 \times water\ content + 2.61039 \times alginate\ content - 0.974396 \times resveratrol \times water\ content + 0.552305 \times resveratrol \times alginate\ content - 0.035248 \times water \times alginate\ content - 0.079228 \times alginate\ content^2$$

Στην προκειμένη περίπτωση, ο πιο σημαντικός όρος για το μοντέλο είναι ο παράγοντας B, δηλαδή η περιεκτικότητα του νερού, κι αμέσως επόμενα, ο παράγοντας C, δηλαδή η περιεκτικότητα του αλγινικού. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε, ότι η αύξηση των τιμών αυτών των δύο παραγόντων (και κυρίως του νερού) επιφέρει αύξηση στο ποσοστό διόγκωσης της ευτηκτογέλης. Αντίθετα, η περιεκτικότητα της ρεσβερατρόλης (παράγοντας A) δεν έχει καθοριστική επίδραση στην απόκριση αυτή και την ευνοεί όταν βρίσκεται σε χαμηλές τιμές.

- **Απόδοση εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης – Encapsulation Efficiency (EE%)**

Το μοντέλο είναι το απλοποιημένο τετραγωνικό (Reduced Quadratic model) και περιγράφεται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

Coded Equation:

$$EE = 41.13 + 3.05A + 3.11B - 4.36C + 9.45AB - 10.30AC - 4.19B^2 - 11.20C^2$$

Actual Equation:

$$EE = -450.6200 + 183.8000 \times resveratrol\ content + 0.1985 \times water\ content + 60.2310 \times alginate\ content + 7.5600 \times resveratrol \times water\ content - 16.4800 \times resveratrol \times alginate\ content - 0.1678 \times water^2 - 1.7912 \times alginate^2$$

Στην προκειμένη περίπτωση, οι πιο σημαντικοί στατιστικά όροι για το μοντέλο είναι οι AC και C^2, και πράγματι επιβεβαιώνεται η σημασία της περιεκτικότητας σε αλγινικό, που όταν είναι χαμηλή ευνοεί την EE%. Επιπλέον, παρατηρήθηκε, ότι η αύξηση των τιμών των παραγόντων B (νερό) και A (ρεσβερατρόλη) επιφέρει αύξηση στην απόδοση εγκλωβισμού της ρεσβερατρόλης.

Με βάση τη βελτιστοποίηση, η ευτηκτογέλη με τη βέλτιστη σύσταση για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση και του ποσοστού διόγκωσης και της απόδοσης εγκλωβισμού είναι εκείνη που παρασκευάζεται με 0.696% w/w ρεσβερατρόλη, 15% w/w νερό και 14.695% w/w αλγινικό.

Οι ευτηκτογέλες με τη βέλτιστη σύσταση αξιολογούνται εκ νέου ως προς τις αποκρίσεις τους για επιβεβαίωση των τιμών τους. Τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι η βέλτιστη ευτηκτογέλη δείχνει μέγιστη πρόσληψη νερού (37.8%) μετά από 15 λεπτά και η ικανότητα συγκράτησης νερού είναι επαρκής (>65%) για 20 λεπτά μετά την ισορροπία. Αξίζει να σημειωθεί, ότι μόλις 5 λεπτά μετά την ισορροπία, η συγκράτηση νερού φτάνει το 95%, ενώ τα επόμενα 5 λεπτά πέφτει κάτω από 90%. Επιπρόσθετα, στην πραγματικότητα, το ποσοστό διόγκωσής της (SR) στα πρώτα πέντε λεπτά ξεπερνάει το 24% και πετυχαίνει περίπου 49.8% απόδοση εγκλωβισμού (EE) της ρεσβερατρόλης. Οι τιμές αυτές συγκρίνονται με τις προβλεπόμενες από το μοντέλο και αποφαίνεται ότι συμφωνούν σε ικανοποιητικό βαθμό.

Δεύτερον, η βέλτιστη ευτηκτογέλη μελετάται ως προς την ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών μέσω της φασματοφωτομετρικής μεθόδου DPPH και επιβεβαιώνεται η ικανοποιητική

αντιοξειδωτική ικανότητά της, καθώς προκάλεσε 74.9±1.3% αναστολή των ριζών DPPH μετά από μισή ώρα επώασης, ενώ η ίδια ποσότητα ελεύθερης ρεσβερατρόλης προκάλεσε 77.0±0.9% αναστολή.

Τρίτον, η ευτηκτογέλη με τη βέλτιστη σύσταση μελετάται ως προς το προφίλ αποδέσμευσης της ρεσβερατρόλης που έχει εγκλωβιστεί επιτυχώς σε αυτή, σε συνθήκες που προσομοιάζουν τη διέλευση από το ανθρώπινο σώμα (37°C, pH: 7.44), και πραγματοποιείται διερεύνηση των μηχανισμών αποδέσμευσης. Το μοντέλο που προβλέπει καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα, τα οποία λήφθηκαν σε χρονική διάρκεια 2 ωρών, είναι το μοντέλο Higuchi με συντελεστή προσαρμογής ίσο με 0.9954, υποδηλώνοντας ότι η αποδέσμευση της ρεσβερατρόλης βασίζεται σε διάχυση Fick.

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνεται, ότι οι ευτηκτογέλες αλγινικού με βάση το NaDES χρησιμεύουν ως μια πολλά υποσχόμενη μήτρα για την ενσωμάτωση της ρεσβερατρόλης για νέες βιοϊατρικές εφαρμογές, στις οποίες επιδιώκεται παρατεταμένη και ελεγχόμενη αποδέσμευση της βιοδραστικής ουσίας.

5. Προτάσεις για το μέλλον

Η παραπάνω μελέτη έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με την βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας της ρεσβερατρόλης, ώστε να μπορεί κατά τη χορήγησή της στον άνθρωπο να απορροφάται σε ικανοποιητικό βαθμό, παρά τη χαμηλή υδατοδιαλυτότητά της. Συγκεκριμένα, η μελέτη επικεντρώθηκε στον εγκλωβισμό της ρεσβερατρόλης σε ευτηκτογέλες αλγινικού με τη χρήση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη Bet-Gly-W. Ωστόσο, πάντα θα υπάρχουν προοπτικές εξέλιξης της έρευνας, για τις οποίες μπορούν να προταθούν διάφορες ιδέες.

Για παράδειγμα, ο δομικός χαρακτηρισμός των ευτηκτογελών μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), θα μπορούσε να επιβεβαιώσει τόσο την ενσωμάτωση της ρεσβερατρόλης στις ευτηκτογέλες όσο και την καλή σύμπλεξη μεταξύ του NaDES και του αλγινικού απουσία της βιοδραστικής ουσίας. Συμπληρωματικά, συνιστάται η περαιτέρω μορφολογική ανάλυση των ευτηκτογελών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) ή ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM).

Από την άλλη, δεδομένου ότι στη βιβλιογραφία είναι διαθέσιμος ένας μικρός μόνο αριθμός αναφορών που εξετάζουν τον εγκλωβισμό της ρεσβερατρόλης σε ευτηκτογέλες με χρήση του συγκεκριμένου διαλύτη (Bet-Gly-W), είναι σημαντικό να συνεχιστεί η έρευνα πάνω σε αυτό το σύστημα και να πραγματοποιηθεί πειραματισμός με διαφορετικές περιεκτικότητες (π.χ. μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νερό, αφού η βέλτιστη γέλη έλαβε την ανώτατη τιμή) και στατιστική επεξεργασία ακολούθως των αποτελεσμάτων και βελτιστοποίηση της διεργασίας μέσω πειραματικού σχεδιασμού. Ακολούθως, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά NaDES (π.χ. Glucose:ChCl:Water (1:2.5:2.5) ή Malic acid: ChCl (1:1)),[189] διαφορετικές μήτρες όπως νανολιποσώματα,[190] μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίου[191] ή και διαφορετικοί πολυσακχαρίτες (π.χ. άμυλο, ζελατίνη, πηκτίνη, χιτίνη). [192]

Επιπλέον, προτείνεται και ρεολογικός χαρακτηρισμός των βέλτιστων ευτηκτογελών, ώστε να προσδιοριστούν τα ρεολογικά τους χαρακτηριστικά και σημαντικοί ρεολογικοί συντελεστές, οι οποίοι καθορίζουν την τελική σταθερότητα των προϊόντων.

Χρήσιμη είναι, επίσης, η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των ευτηκτογελών μέσω της ικανότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξείδωσης – AAPH.

Συγχρόνως, προτείνεται η μελέτη της κυτταροτοξικότητάς τους για να επιβεβαιωθεί και πειραματικά η πράσινη φύση της παρασκευής τους και η καταλληλότητά τους για βιοϊατρικές εφαρμογές.

Εξίσου σημαντικές είναι οι θερμικές ιδιότητες των ευτηκτογελών. Επομένως, ενδείκνυται ο χαρακτηρισμός τους με θερμοσταθμική ανάλυση (TG) και διαφορική σάρωση θερμιδομετρίας (DSC).

Τέλος, απαιτείται να διεξαχθεί και μελέτη σταθερότητας της ρεσβερατρόλης στην ευτηκτογέλη σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης, ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή υποβάθμισή της ή, αντιθέτως, η διατήρησή της.

Συμμετοχή σε πανελλήνιο συνέδριο

S. Kalafateli, I. Pitterou, E. A. Fragkonikolaki, A. Tzani, A. Detsi “Development and optimization of preparation process for novel NaDES-based alginate eutectogels as carriers for resveratrol”, 14th Panhellenic Scientific Conference of Chemical Engineering, 29-31 May 2024, Thessaloniki, Greece (poster presentation)

Βιβλιογραφία

1. Anastas, P. T., & Warner, J. C. (2000). *Green chemistry: theory and practice*. Oxford university press. https://doi.org/10.1093/oso/9780198506980.001.0001
2. Collins, T. J. (1997). Macmillan encyclopedia of chemistry.
3. Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. Chemical Society Reviews, 39(1), 301-312. doi: 10.1039/b918763b
4. Isac-García, J., Dobado, J. A., Calvo-Flores, F. G., & Martínez-García, H. (2015). *Experimental organic chemistry: laboratory manual*. Academic Press. *Chapter 12 - Green Chemistry.*
5. Patel, N. P., & Haldar, S. (2022). Pollutants in the coral environment and strategies to lower their impact on the functioning of reef ecosystem. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 161-178). Elsevier.
6. Arce, A., & Soto, A. (2007). Solubility issues in environmental pollution. In *Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues* (pp. 411-427). Elsevier.
7. Istasse, T. (2021). Synthesis of furan derivatives from monosaccharides in reaction media based on choline chloride. Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/the-12-principles-of-green-chemistry_fig8_349808977 [accessed 10 Sep 2024]
8. Office of Pollution Prevention and Toxics, *The Presidental Green Chemistry Challenge, Award Recipients* , 1996–2009, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA 744K09002, 2009
9. Rajan M., Prabhavathy A., Ramesh U. (2015). Natural Deep Eutectic Solvent Extraction Media for Zingiber officinale Roscoe: The Study of Chemical Compositions, Antioxidants and Antimicrobial Activities. *The Natural Products Journal*, 5 (1), 3-13.
10. Koutsoukos, S., Tsiaka, T., Tzani, A., Zoumpoulakis, P., & Detsi, A. (2019). Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds. *Journal of Cleaner Production*, *241*, 118384.
11. Panić, M., Radović, M., Maros, I., Tušek, A. J., Bubalo, M. C., & Redovniković, I. R. (2021). Development of environmentally friendly lipase-catalysed kinetic resolution of (R, S)-1-phenylethyl acetate using aqueous natural deep eutectic solvents. *Process Biochemistry*, *102*, 1-9.
12. Yu, D., Xue, Z., & Mu, T. (2022). Deep eutectic solvents as a green toolbox for synthesis. *Cell Reports Physical Science*, *3*(4). doi: 10.1016/j.xcrp.2022.100809.
13. Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical reviews*, *114*(21), 11060-11082. doi: 10.1021/cr300162p.
14. Liu, Y., Wu, Y., Liu, J., Wang, W., Yang, Q., & Yang, G. (2022). Deep eutectic solvents: Recent advances in fabrication approaches and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *622*, 121811. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121811.
15. Cerdá-Bernad, D., Pitterou, I., Tzani, A., Detsi, A., & Frutos, M. J. (2023). Novel chitosan/alginate hydrogels as carriers of phenolic-enriched extracts from saffron floral by-products using natural deep eutectic solvents as green extraction media. Current Research in Food Science, 6, 100469. , doi: 10.1016/j.crfs.2023.100469.
16. Skarpalezos, D., & Detsi, A. (2019). Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources. Applied Sciences, 9(19), 4169. doi: 10.3390/app9194169.
17. Tzani, A., Kalafateli, S., Tatsis, G., Bairaktari, M., Kostopoulou, I., Pontillo, A. R. N., & Detsi, A. (2021). Natural deep eutectic solvents (NaDESs) as alternative green extraction media for ginger (Zingiber officinale Roscoe). *Sustainable Chemistry*, *2*(4), 576-598. https://doi.org/10.3390/suschem2040032
18. Svigelj, R., Dossi, N., Grazioli, C., & Toniolo, R. (2021). Deep eutectic solvents (DESs) and their application in biosensor development. Sensors, 21(13), 4263. doi: 10.3390/s2113426
19. Laguerre M., Lavaud A. (2016). The rise of deep eutectics from nature to cosmetics. *Naturex.*, 45-47.

20. Bubalo C. M., Andreou T., Panić M., Radović M., Radoševića K., Redovnikovića I. (2023). Natural multi-osmolyte cocktails form deep eutectic systems of unprecedented complexity: Discovery, affordances and perspectives. Green Chemistry, 25, 3398.
21. Wang, J., Zhang, S., Ma, Z., & Yan, L. (2021). Deep eutectic solvents eutectogels: progress and challenges. *Green Chemical Engineering*, *2*(4), 359-367.
22. Matthew J. Panzer. (2022). Holding it together: noncovalent cross-linking strategies for ionogels and eutectogels. *Mater. Adv.*, 3, 7709.
23. Zeng, C., Zhao, H., Wan, Z., Xiao, Q., Xia, H., & Guo, S. (2020). Highly biodegradable, thermostable eutectogels prepared by gelation of natural deep eutectic solvents using xanthan gum: preparation and characterization. *RSC advances*, *10*(47), 28376-28382.
24. Elgharbawy A. A., Hayyan A., Hayyan M., Rashid S. N., Nor M. R. M., Zulkifli M. Y., Alias Y., Mirghania M. E. S. (2018). Shedding Light on Lipase Stability in Natural Deep Eutectic Solvents. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 32, (3), 359–370.
25. Yang Z. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 168, 31-59
26. Elgharbawy A. A., Hayyan A., Hayyan M., Rashid S. N., Nor M. R. M., Zulkifli M. Y., Alias Y., Mirghania M. E. S. (2018). Shedding Light on Lipase Stability in Natural Deep Eutectic Solvents. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 32, (3), 359–370.
27. Wei, Z., Qi, X., Li, T., Luo, M., Wang, W., Zu, Y., & Fu, Y. (2015). Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in Cajanus cajan leaves by 77 ultra performance liquid chromatography. Separation and Purification Technology, 149, 237-244.
28. Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in Carthamus tinctorius L. Analytical chemistry, 85(13), 6272-6278.
29. Panic M., Mia Radovic M., Izabela Maros I., Tusek A., Bubalo M, Redovnikovic I. (2021). Development of environmentally friendly lipase-catalysed kinetic resolution of (R, S)-1-phenylethyl acetate using aqueous natural deep eutectic solvents. *Process Biochemistry*, 102, 1–9.
30. Tome, L. I., Baiao, V., da Silva, W., & Brett, C. M. (2018). Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. Applied Materials Today, 10, 30-50.
31. You Tian, Da-Wen Sun, Liang Xu, Tian-Hao Fan, Zhiwei Zhu. (2022). Bio-inspired eutectogels enabled by binary natural deep eutectic solvents (NADESs): Interfacial anti-frosting, freezing-tolerance, and mechanisms. *Food Hydrocolloids*, 128, 107568.
32. Shehata M., Unlu A., Sezerman U., Timucin E. (2020). Lipase and Water in a Deep Eutectic Solvent: Molecular Dynamics and Experimental Studies of the Effects of Water-In-Deep Eutectic Solvents on Lipase Stability. *J. Phys. Chem. B*, 124, 8801−8810.
33. El Achkar T., Greige-Gerges H., Fourmentin S. (2021). Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3397-3408.
34. Wang X., Wu Y., Li J., Wang A., Li G., Ren X., et al. (2020). Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of echinacoside and oleuropein from Syringa pubescens Turcz. *Industrial Crops & Products*, 151, 112442.
35. El Kantar, S., N. Rajha, H., Boussetta, N., Vorobiev, E., G. Maroun, R., & Louka, N. (2019). Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol. Food Chemistry, 295, 165-171.
36. Kou, X., Ke, Y., Wang, X., Rahman, M. R., Xie, Y., Chen, S., et al. (2018). Simultaneous extraction of hydrophobic and hydrophilic bioactive compounds from ginger (Zingiber officinale Roscoe). Food Chemistry, 257, 223-229.
37. Škulcová, A., & Jablonský, M. (n.d.). Properties and Thermal Behavior of Deep Eutectic Solvents Based on Lactic Acid. Journal of Hygienic Engineering and Design, 25, 75-80.
38. Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., Verpoorte, R., et al. (2019). The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1- 29.

39. Vanda H., Verpoorte R., Klinkhamer P. G., Choi Y. H. (2019). Natural deep eutectic solvents: From their discovery to their applications. *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications*, 61-81.
40. Degam G. (2017). Deep Eutectic Solvents Synthesis, Characterization and Applications in Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Theses and Dissertations*, 1156.
41. Vanda H., Dai Y., Wilson E. G., Verpoorte R., Choi Y. H. (2018). Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 21(6), 628-638.
42. Gomez FJV., Espino M., Fernández M., Raba J., Silva MF. (2016) Enhanced electrochemical detection of quercetin by natural deep eutectic solvents. Anal. Chim. Acta, 936, 91–96.
43. Durand E., Lecomte J., Villeneuve P. (2013). Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. European Journal of Lipid Science and Technology, 115(4), 379–385.
44. Liu Y., Friesen J. B., McAlpine J. B., Lankin D. C., Chen S. N., Pauli G. F. (2018). Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *Journal of natural products*, 81(3), 679-690.
45. Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. (2014). Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063–1071.
46. Greer, A. J., Jacquemin, J., & Hardacre, C. (2020). Industrial applications of ionic liquids. Molecules, 25(21), 5207.
47. Mr, M. B. S., Mr, V. S. K., Chaudhary, M., & Singh, P. (2021). A mini review on synthesis, properties and applications of deep eutectic solvents.Journal of the Indian Chemical Society, 98(11), 100210.
48. Al-Risheq, D. I., Nasser, M. S., Qiblawey, H., Hussein, I. A., & Benamor, A. (2021). Choline chloride based natural deep eutectic solvent for destabilization and separation of stable colloidal dispersions. Separation and Purification Technology, 255, 117737.
49. Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., ... & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?. *Plant physiology*, *156*(4), 1701-1705.
50. Dyson, P., & Tilmann, G. (Eds.). (2005). Metal catalysed reactions in ionic liquids. Dordrecht: Springer Netherlands. 27. Wang, J., Teng, C., & Yan, L. (2021). Applications of deep eutectic solvents in the extraction, dissolution, and functional materials of chitin: research progress and prospects. Green Chemistry. 28. Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. Chemical Society Reviews, 41(21), 7108-7146.
51. Tzani, A., Karadendrou, M. A., Kalafateli, S., Kakokefalou, V., & Detsi, A. (2022). Current trends in green solvents: biocompatible ionic liquids. Crystals, 12(12), 1776.
52. Chaudhary, S., Jain, V. P., & Jaiswar, G. (2022). The composition of polysaccharides: monosaccharides and binding, group decorating, polysaccharides chains. In *Innovation in nano-polysaccharides for eco-sustainability* (pp. 83-118). Elsevier.
53. Rahmani, S., Maroufkhani, M., Mohammadzadeh-Komuleh, S., & Khoubi-Arani, Z. (2022). Polymer nanocomposites for biomedical applications. In *Fundamentals of bionanomaterials* (pp. 175-215). Elsevier.
54. Ranzi, Eliseo & Debiagi, Paulo & Frassoldati, Alessio. (2017). Mathematical Modeling of Fast Biomass Pyrolysis and Bio-Oil Formation. Note I: Kinetic Mechanism of Biomass Pyrolysis. ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 5. 10.1021/acssuschemeng.6b03096.
55. Afrin, S., & Karim, Z. (2021). Polysaccharides. *Polysaccharide-Based Nanocomposites for Gene Delivery and Tissue Engineering*.
56. Li, Q., Niu, Y., Xing, P., & Wang, C. (2018). Bioactive polysaccharides from natural resources including Chinese medicinal herbs on tissue repair. *Chinese medicine*, *13*, 1-11.
57. Ngwuluka, N. C. (2018). Responsive polysaccharides and polysaccharides-based nanoparticles for drug delivery. In *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Volume 1*. Woodhead Publishing, 531-554

58. Fernando, I. P. S., Lee, W. W., Han, E. J., & Ahn, G. (2020). Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. Chemical Engineering Journal, 391, 123823. https://doi.org/10.1016/J.CEJ.201 9.123823
59. Batista, P. S. P., de Morais, A. M. M. B., Pintado, M. M. E., & de Morais, R. M. S. C. (2019). Alginate: Pharmaceutical and Medical Applications. In E. Cohen & H. Merzendorfer (Eds.), Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices. Springer International Publishing, 649–691 https://doi.org/10.1007/978-3- 030-12919-4_16
60. Belattmania, Z., Kaidi, S., Atouani, S. El, Katif, C., Bentiss, F., Jama, C., Reani, A., Sabour, B., & Vasconcelos, V. (2020). Isolation and FTIR-ATR and 1H NMR Characterization of Alginates from the Main Alginophyte Species of the Atlantic Coast of Morocco. Molecules (Basel, Switzerland), 25(18). https://doi.org/10.3390/MOLECU LES25184335
61. McDowell, R. H. (1960). Applications of alginates. *Rev. pure appl. Chem*, *10*(1), 1-15.
62. Dos, P., Araújo, S., Belini, G. B., Mambrini, G. P., Yamaji, F. M., & Waldman, W. R. (2019). Thermal degradation of calcium and sodium alginate: A greener synthesis towards calcium oxide micro/nanoparticles. https://doi.org/10.1016/j.ijbioma c.2019.08.103
63. Qin, Yimin. (2008). Alginate fibres: An overview of the production processes and applications in wound management. Polymer International. 57. 171-180. 10.1002/pi.2296.
64. Paredes Juárez, G. A., Spasojevic, M., Faas, M. M., & de Vos, P. (2014). Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2(AUG), 107649. https://doi.org/10.3389/FBIOE.20 14.00026/BIBTEX
65. Cheng, D., Jiang, C., Xu, J., Liu, Z., & Mao, X. (2020). Characteristics and applications of alginate lyases: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 1304-1320.
66. Khalil, H. P. S., Lai, T. K., Tye, Y. Y., Rizal, S., Chong, E. W. N., Yap, S. W., ... & Paridah, M. T. (2018). A review of extractions of seaweed hydrocolloids: Properties and applications. *Express Polymer Letters*, *12*(4).
67. Yavari Maroufi L., Rashidi M., Tabibiazar M., Mohammadi M., Pezeshki A., Ghorbani M. (2021). Recent Advances of Macromolecular Hydrogels for Enzyme Immobilization in the Food Products. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 12(2), 309-318.
68. Shakeri F., Ariaeenejad S., Ghollasi M., Motamedi E. (2022). Synthesis of two novel bio-based hydrogels using sodium alginate and chitosan and their proficiency in physical immobilization of enzymes. Scientific Reports, 12, 2072.
69. Ćorković, I., Pichler, A., Šimunović, J., & Kopjar, M. (2021). Hydrogels: Characteristics and application as delivery systems of phenolic and aroma compounds. *Foods*, *10*(6), 1252.
70. Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. Journal of advanced research, 6(2), 105-121., doi: https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006.
71. Mahinroosta, M., Farsangi, Z. J., Allahverdi, A., & Shakoori, Z. (2018). Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. Materials today chemistry, 8, 42-55. doi: 10.1016/j.mtchem.2018.02.004. 110
72. Ahmadi, F., Oveisi, Z., Samani, S. M., & Amoozgar, Z. (2015). Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. Research in pharmaceutical sciences, 10(1), 1-16
73. Meyer J., Meyer L.E., Kara S. (2021). Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. Engineering in life sciences, 22, 165-177.
74. Hennink, W. E., & van Nostrum, C. F. (2012). Novel crosslinking methods to design hydrogels. Advanced drug delivery reviews, 64, 223-236.
75. Sun, Y., Li, D., Yu, Y., & Zheng, Y. (2022). Insights into the role of natural polysaccharide-based hydrogel wound dressings in biomedical applications. *Gels*, *8*(10), 646.
76. Stojkov, G., Niyazov, Z., Picchioni, F., & Bose, R. K. (2021). Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications. *Gels*, *7*(4), 255. doi: 10.3390/gels7040255.
77. Ho, T. C., Chang, C. C., Chan, H. P., Chung, T. W., Shu, C. W., Chuang, K. P., ... & Tyan, Y. C. (2022). Hydrogels: properties and applications in biomedicine. *Molecules*, *27*(9), 2902.

78. Peppas, N. A., Slaughter, B. V., Kanzelberger, M. A., Matyjaszewski, K., & Möller, M. (2012). 9.20–Hydrogels. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, 385-395.
79. Wang, W., Narain, R., & Zeng, H. (2020). Hydrogels. In *Polymer science and nanotechnology* (203-244). Elsevier.
80. Wolf M., Tambourgib E. B., Paulinoa A.T. (2021). Stability of β-D-galactosidase immobilized in polysaccharide-based hydrogels. Colloids and Surfaces A, 609, 125679.
81. Aswathy, S. H., Narendrakumar, U., & Manjubala, I. (2020). Commercial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon*, *6*(4).
82. Xia, H., Ren, M., Zou, Y., Qin, S., & Zeng, C. (2020). Novel biocompatible polysaccharidebased eutectogels with tunable rheological, thermal, and mechanical properties: The role of water. Molecules, 25(15), 3314.
83. Trollope, Lee & Cruickshank, Dyanne & Noonan, Terence & Bourne, Susan & Sorrenti, Milena & Catenacci, Laura & Caira, Mino. (2014). Inclusion of trans-resveratrol in methylated cyclodextrins: Synthesis and solid-state structures. Beilstein journal of organic chemistry. 10. 3136-51. 10.3762/bjoc.10.331.
84. Kalantari, H., & Das, D. K. (2010). Physiological effects of resveratrol. *Biofactors*, *36*(5), 401-406. doi: 10.1002/biof.100.
85. Nawaz, W., Zhou, Z., Deng, S., Ma, X., Ma, X., Li, C., & Shu, X. (2017). Therapeutic versatility of resveratrol derivatives. *Nutrients*, *9*(11), 1188.
86. Li, M., Kildegaard, K. R., Chen, Y., Rodriguez, A., Borodina, I., & Nielsen, J. (2015). De novo production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered Saccharomyces cerevisiae. *Metabolic Engineering*, *32*, 1-11.
87. Wang, Y., Halls, C., Zhang, J., Matsuno, M., Zhang, Y., & Yu, O. (2011). Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast Saccharomyces cerevisiae by metabolic engineering. *Metabolic engineering*, *13*(5), 455-463.
88. Li, M., Schneider, K., Kristensen, M., Borodina, I., & Nielsen, J. (2016). Engineering yeast for high-level production of stilbenoid antioxidants. *Scientific reports*, *6*(1), 36827.
89. Beekwilder, J., Wolswinkel, R., Jonker, H., Hall, R., de Vos, C. R., & Bovy, A. (2006). Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, *72*(8), 5670-5672.
90. Marques, F. Z., Markus, M. A., & Morris, B. J. (2009). Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *41*(11), 2125-2128.
91. Aschemann-Witzel, J., & Grunert, K. G. (2015). Resveratrol food supplements: a survey on the role of individual consumer characteristics in predicting the attitudes and adoption intentions of US American and Danish respondents. *BMC public health*, *15*, 1-10.
92. Risuleo, G. (2016). Resveratrol: Multiple activities on the biological functionality of the cell. In *Nutraceuticals*. Academic Press, 453-464
93. Keylor, M. H., Matsuura, B. S., & Stephenson, C. R. (2015). Chemistry and biology of resveratrol-derived natural products. *Chemical reviews*, *115*(17), 8976-9027.
94. Park, E. J., & Pezzuto, J. M. (2015). The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1852*(6), 1071-1113.
95. Cichewicz, R. H., & Kouzi, S. A. (2002). Resveratrol oligomers: structure, chemistry, and biological activity. *Studies in natural products chemistry*, *26*, 507-579.
96. Walle, T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the new York Academy of Sciences*, *1215*(1), 9-15.
97. Su, D., Cheng, Y., Liu, M., Liu, D., Cui, H., Zhang, B., ... & Mei, Q. (2013). Comparision of piceid and resveratrol in antioxidation and antiproliferation activities in vitro. *PloS one*, *8*(1), e54505.
98. Fabris, S., Momo, F., Ravagnan, G., & Stevanato, R. (2008). Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophysical chemistry*, *135*(1-3), 76-83.

99. Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European polymer journal*, *65*, 252-267.
100. Sun, Z., Song, C., Wang, C., Hu, Y., & Wu, J. (2020). Hydrogel-based controlled drug delivery for cancer treatment: A review. Molecular Pharmaceutics, 17, 373–391.
101. Liang, Y., He, J., & Guo, B. (2021). Functional hydrogels as wound dressing to enhance wound healing. ACS Nano, 15, 12687–12722.
102. Narayanaswamy, R., & Torchilin, V. P. (2020). Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. *The Road from Nanomedicine to Precision Medicine*, 1117-1150.
103. Hua, J., Ng, P. F., & Fei, B. (2018). High-strength hydrogels: Microstructure design, characterization and applications. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, 56, 1325–1335.
104. Taylor, D. L., & Panhuis, M. I. H. (2016). Self-healing hydrogels. Advanced Materials, 28, 9060–9093.
105. Li, S., Dong, S., Xu, W., Tu, S., Yan, L., Zhao, C., Ding, J., & Chen, X. (2018). Antibacterial hydrogels. Advanced Science, 5, 1700527.
106. Zhu, T., Ni, Y., Biesold, G. M., Cheng, Y., Ge, M., Li, H., … Lai, Y. (2022). Recent advances in conductive hydrogels: Classifications, properties, and applications. Chemical Society Reviews, 52, 473–509.
107. Lowenberg, C., Balk, M., Wischke, C., Behl, M., & Lendlein, A. (2017). Shape-memory hydrogels: Evolution of structural principles to enable shape switching of hydrophilic polymer networks. Accounts of Chemical Research, 50, 723–732.
108. Wu, B., Lu, H., Le, X., Lu, W., Zhang, J., Theato, P., & Chen, T. (2021). Recent progress in the shape deformation of polymeric hydrogels from memory to actuation. Chemical Science, 12, 6472–6487.
109. Lee, Y., Song, W. J., & Sun, J. Y. (2020). Hydrogel soft robotics. Materials Today Physics, 15, Article 100258.
110. Yuk, H., Lu, B., & Zhao, X. (2019). Hydrogel bioelectronics. Chemical Society Reviews, 48, 1642–1667.
111. Lee, P. S., Chiou, Y. S., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2018). Chemoprevention by resveratrol and pterostilbene: Targeting on epigenetic regulation. BioFactors, 44(1), 26-35.
112. De Vries, K., Strydom, M., & Steenkamp, V. (2018). Bioavailability of resveratrol: Possibilities for enhancement. Journal of herbal medicine, 11, 71-77.
113. Rimando, A. M., & Suh, N. (2008). Biological/chemopreventive activity of stilbenes and their effect on colon cancer. Planta medica, 74(13), 1635-1643.
114. Gokce, E. H., Korkmaz, E., Dellera, E., Sandri, G., Bonferoni, M. C., & Ozer, O. (2012). Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. International journal of nanomedicine, 1841-1850.
115. Fan, P., Marston, A., Hay, A. E., & Hostettmann, K. (2009). Rapid separation of three glucosylated resveratrol analogues from the invasive plant Polygonum cuspidatum by high-speed countercurrent chromatography. Journal of separation science, 32(17), 2979-2984.
116. Duarte, A., Martinho, A., Luís, Â., Figueiras, A., Oleastro, M., Domingues, F. C., & Silva, F. (2015). Resveratrol encapsulation with methyl-β-cyclodextrin for antibacterial and antioxidant delivery applications. LWT-Food Science and Technology, 63(2), 1254-1260.
117. Kuršvietienė, L., Stanevičienė, I., Mongirdienė, A., & Bernatonienė, J. (2016). Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina*, *52*(3), 148-155.
118. Bishayee, A. (2009). Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer prevention research*, *2*(5), 409-418.
119. Zykova, T.A.; Zhu, F.; Zhai, X.; Ma, W.Y.; Ermakova, S.P.; Lee, K.W.; Bode, A.M.; Dong, Z. Resveratrol directly targets COX-2 to inhibit carcinogenesis. Mol. Carcinog. 2008, 47, 797–805.
120. Varoni, E. M., Lo Faro, A. F., Sharifi-Rad, J., & Iriti, M. (2016). Anticancer molecular mechanisms of resveratrol. *Frontiers in nutrition*, *3*, 8.

121. Pezzuto, J. M. (2008). Resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis. *Pharmaceutical Biology*, *46*(7-8), 443-573.
122. Kundu, J. K., & Surh, Y. J. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer letters*, *269*(2), 243-261.
123. Li, L., Qiu, R. L., Lin, Y., Cai, Y., Bian, Y., Fan, Y., & Gao, X. J. (2018). Resveratrol suppresses human cervical carcinoma cell proliferation and elevates apoptosis via the mitochondrial and p53 signaling pathways. *Oncology letters*, *15*(6), 9845-9851.
124. Zulueta, A., Caretti, A., Signorelli, P., & Ghidoni, R. (2015). Resveratrol: A potential challenger against gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *21*(37), 10636.
125. Aluyen, J. K., Ton, Q. N., Tran, T., Yang, A. E., Gottlieb, H. B., & Bellanger, R. A. (2012). Resveratrol: potential as anticancer agent. *Journal of dietary supplements*, *9*(1), 45-56.
126. Colin, D., Limagne, E., Jeanningros, S., Jacquel, A., Lizard, G., Athias, A., ... & Delmas, D. (2011). Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells. *Cancer prevention research*, *4*(7), 1095-1106.
127. Fulda, S., & Debatin, K. M. (2006). Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer detection and prevention*, *30*(3), 217-223.
128. Lin, H. Y., Tang, H. Y., Davis, F. B., & Davis, P. J. (2011). Resveratrol and apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1215*(1), 79-88.
129. Whitlock, N. C., & Baek, S. J. (2012). The anticancer effects of resveratrol: modulation of transcription factors. *Nutrition and cancer*, *64*(4), 493-502.
130. Valentovic, M. A. (2018). Evaluation of resveratrol in cancer patients and experimental models. *Advances in cancer research*, *137*, 171-188.
131. Yan, F., Sun, X., & Xu, C. (2018). Protective effects of resveratrol improve cardiovascular function in rats with diabetes. *Experimental and therapeutic medicine*, *15*(2), 1728-1734.
132. Delucchi, F., Berni, R., Frati, C., Cavalli, S., Graiani, G., Sala, R., ... & Stilli, D. (2012). Resveratrol treatment reduces cardiac progenitor cell dysfunction and prevents morpho-functional ventricular remodeling in type-1 diabetic rats. *PloS one*, *7*(6), e39836.
133. Riba, A., Deres, L., Sumegi, B., Toth, K., Szabados, E., & Halmosi, R. (2017). Cardioprotective effect of resveratrol in a postinfarction heart failure model. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2017*(1), 6819281.
134. Hung, L. M., Chen, J. K., Huang, S. S., Lee, R. S., & Su, M. J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular research*, *47*(3), 549-555.
135. Das, S., Santani, D. D., & Dhalla, N. S. (2007). Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine. *Experimental & Clinical Cardiology*, *12*(1), 5.
136. Dvorakova, M., & Landa, P. (2017). Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacological Research*, *124*, 126-145.
137. Zhou, Z. X., Mou, S. F., Chen, X. Q., Gong, L. L., & Ge, W. S. (2018). Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF-κB in animal models of acute pharyngitis. *Molecular medicine reports*, *17*(1), 1269-1274.
138. Zhang, F., Liu, J., & Shi, J. S. (2010). Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: role of resveratrol in microglial activation. *European journal of pharmacology*, *636*(1-3), 1-7.
139. Nunes, S., Danesi, F., Del Rio, D., & Silva, P. (2018). Resveratrol and inflammatory bowel disease: The evidence so far. *Nutrition research reviews*, *31*(1), 85-97.
140. Patel, K. R., Brown, V. A., Jones, D. J., Britton, R. G., Hemingway, D., Miller, A. S., ... & Brown, K. (2010). Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer research*, *70*(19), 7392-7399.
141. Wahab, A., Gao, K., Jia, C., Zhang, F., Tian, G., Murtaza, G., & Chen, J. (2017). Significance of resveratrol in clinical management of chronic diseases. *Molecules*, *22*(8), 1329.
142. Sun, A. Y., Wang, Q., Simonyi, A., & Sun, G. Y. (2010). Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology*, *41*, 375-383.
143. Tellone, E., Galtieri, A., Russo, A., Giardina, B., & Ficarra, S. (2015). Resveratrol: a focus on several neurodegenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2015*(1), 392169.

144. Bastianetto, S., Ménard, C., & Quirion, R. (2015). Neuroprotective action of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1852*(6), 1195-1201.
145. Farzaei, M. H., Rahimi, R., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2018). Effect of resveratrol on cognitive and memory performance and mood: A meta-analysis of 225 patients. *Pharmacological research*, *128*, 338-344.
146. Cai, J. C., Liu, W., Lu, F., Kong, W. B., Zhou, X. X., Miao, P., ... & Wang, Y. (2018). Resveratrol attenuates neurological deficit and neuroinflammation following intracerebral hemorrhage. *Experimental and therapeutic medicine*, *15*(5), 4131-4138.
147. Singh, N., Bansal, Y., Bhandari, R., Marwaha, L., Singh, R., Chopra, K., & Kuhad, A. (2017). Resveratrol protects against ICV collagenase-induced neurobehavioral and biochemical deficits. *Journal of Inflammation*, *14*, 1-15.
148. Zhao, X., Tong, W., Song, X., Jia, R., Li, L., Zou, Y., ... & Yin, Z. (2018). Antiviral effect of resveratrol in piglets infected with virulent pseudorabies virus. *Viruses*, *10*(9), 457.
149. Gliemann, L., Nyberg, M., & Hellsten, Y. (2016). Effects of exercise training and resveratrol on vascular health in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, *98*, 165-176.
150. Malhotra, A., Bath, S., & Elbarbry, F. (2015). An organ system approach to explore the antioxidative, anti-inflammatory, and cytoprotective actions of resveratrol. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2015*(1), 803971.
151. Szekeres, T., Fritzer-Szekeres, M., Saiko, P., & Jäger, W. (2010). Resveratrol and resveratrol analogues—structure—activity relationship. *Pharmaceutical research*, *27*, 1042-1048.
152. Stivala, L. A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., ... & Vannini, V. (2001). Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(25), 22586-22594.
153. Salehi, B., Mishra, A. P., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., ... & Sharifi-Rad, J. (2018). Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. *Biomedicines*, *6*(3), 91.https://doi.org/10.3390/biomedicines6030091
154. Iuga, C., Alvarez-Idaboy, J. R., & Russo, N. (2012). Antioxidant activity of trans-resveratrol toward hydroxyl and hydroperoxyl radicals: a quantum chemical and computational kinetics study. *The Journal of organic chemistry*, *77*(8), 3868-3877.
155. Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative food science & emerging technologies*, *11*(1), 210-218.
156. Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: Classification, structures, sources, and action mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(6), 1243-1268.
157. Bhullar, K. S., & Hubbard, B. P. (2015). Lifespan and healthspan extension by resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1852*(6), 1209-1218.
158. Konyalioglu, S., Armagan, G., Yalcin, A., Atalayin, C., & Dagci, T. (2013). Effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in embryonic neural stem cells. *Neural regeneration research*, *8*(6), 485-495.
159. Means, J. C., Gerdes, B. C., & Koulen, P. (2017). Distinct mechanisms underlying resveratrol-mediated protection from types of cellular stress in C6 glioma cells. *International journal of molecular sciences*, *18*(7), 1521.
160. Yang, T., Wang, L., Zhu, M., Zhang, L., & Yan, L. (2015). Properties and molecular mechanisms of resveratrol: a review. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, *70*(8), 501-506.
161. Brown, V. A., Patel, K. R., Viskaduraki, M., Crowell, J. A., Perloff, M., Booth, T. D., ... & Brenner, D. E. (2010). Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer research*, *70*(22), 9003-9011.
162. Wilson, T., Knight, T. J., Beitz, D. C., Lewis, D. S., & Engen, R. L. (1996). Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sciences*, *59*(1), PL15-PL21.

163. Ferry-Dumazet, H., Garnier, O., Mamani-Matsuda, M., Vercauteren, J., Belloc, F., Billiard, C., ... & Mossalayi, M. D. (2002). Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. *Carcinogenesis*, *23*(8), 1327-1333.
164. Mukherjee, S., Dudley, J. I., & Das, D. K. (2010). Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose-response*, *8*(4), dose-response.
165. Pearson, K. J., Baur, J. A., Lewis, K. N., Peshkin, L., Price, N. L., Labinskyy, N., ... & de Cabo, R. (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell metabolism*, *8*(2), 157-168.
166. Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., & Bucić-Kojić, A. (2020). Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants*, *9*(10), 923.
167. Boly, R., Lamkami, T., Lompo, M., Dubois, J., & Guissou, I. P. (2016). DPPH Free Radical Scavenging Activity of Two Extracts from Agelanthus dodoneifolius (Loranthaceae) Leaves. International Journal of Toxicological and Pharmacological Research, 9 (1), 29-34
168. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. International journal of molecular sciences, 22(7), 3380.
169. Caccavo, D. (2019). An overview on the mathematical modeling of hydrogels' behavior for drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, *560*, 175-190.
170. Joanna Pietrowsk. Experimental study of eutectogels for drug delivery. Tesi Di Laurea Magistrale In Biomedical Engineering Ingegneria Biomedica,2024.
171. Grassi, M., & Grassi, G. (2014). Application of mathematical modeling in sustained release delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*, *11*(8), 1299-1321.
172. Mäntele, W., & Deniz, E. (2017). UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *173*, 965-968.
173. Misto, Misto & Mulyono, Tri & Cahyono, Bowo & Wulandari, Eka. (2019). Measurement of Optical Parameters and Electrical Conductivity for Determining the Quality of Besuki Local Honey Using Spectrophotometer. Food Science and Technology. 7. 57-62. 10.13189/fst.2019.070403.
174. Yogesh Kumar, Sayed Md Mumtaz, Mustaq Ahmad. (2018). HPLC: Principle and Maintenance with Application. International Journal of Trend in Scientific Research and Development, 2 (5), 1618-1626.
175. LaCourse, W. R., & LaCourse, M. E. (2023). General instrumentation in HPLC. In *Liquid Chromatography* (61-73). Elsevier.
176. Hyperlink: What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography): SHIMADZU (Shimadzu Corporation)
177. Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. Agronomy, 7 (3), 47-65.
178. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, *76*(5), 965-977.
179. Silva, E. O., Borges, L. L., Conceição, E. C., & Bara, M. T. (2017). Box–Behnken experimental design for extraction of artemisinin from Artemisia annua and validation of the assay method. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 27 (4), 519-524
180. Yang, B., Zhang, M., Weng, H., Xu, Y., & Zeng, L. (2020). Optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of kinsenoside compound from Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl by response surface methodology (RSM). *Molecules*, *25*(1), 193.
181. Balachandran, M., Stanly, L. P., Mulaleekrishnan, R., & Bhagawan, S. S. (2010). Modeling NBRLayered Silicate Nanocomposites: A DoE Approach. Journal of Applied Polymer Science, 118 (6), 3300–3310.
182. Rambo, D. F., Biegelmeyer, R., Toson, N. S., Dresch, R. R., Moreno, P. R., & Henriques, A. T. (2019). Box–Behnken experimental design for extraction optimization of alkaloids from Erythrina verna Vell. trunk barks and LC Method Validation. Industrial Crops & Products, 133, 250-258

183. Hsieh, Y.-H., Li, Y., Pan, Z., Chen, Z., Lu, J., Yuan, J., et al. (2019). Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger. Ultrasonics Sonochemistry, 63, 104915
184. Aktaş, N. (2005). Optimization of biopolymerization rate by response surface methodology (RSM). *Enzyme and microbial technology*, *37*(4), 441-447.
185. Santos, M. K., Borille, B. T., Cruz, G. N., Coppe, B. C., Comiran, E., Kaiser, S., et al. (2014). Extraction optimization using Box–Behnken design and method validation for ethanol in oral fluid. Analytical Methods, 6 (15), 6095-6104
186. Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., ... & Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, *597*(2), 179-186.
187. Cerdá-Bernad, D., Pitterou, I., Tzani, A., Detsi, A., & Frutos, M. J. (2023). Novel chitosan/alginate hydrogels as carriers of phenolic-enriched extracts from saffron floral by-products using natural deep eutectic solvents as green extraction media. *Current Research in Food Science*, *6*, 100469.
188. Mercadal, P. A., Picchio, M. L., & González, A. (2024). Food-protecting films based on soy protein isolate and natural deep eutectic solvents: Antimicrobial and antioxidant properties. Food Hydrocolloids, 147, 109414.
189. Shamseddin, A., Crauste, C., Durand, E., Villeneuve, P., Dubois, G., Durand, T., Vercauteren, J. and Veas, F. (2017), Resveratrol formulated with a natural deep eutectic solvent inhibits active matrix metalloprotease-9 in hormetic conditions. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 119: 1700171. https://doi.org/10.1002/ejlt.201700171
190. Baek, Y., Jeong, E. W., & Lee, H. G. (2023). Encapsulation of resveratrol within size-controlled nanoliposomes: Impact on solubility, stability, cellular permeability, and oral bioavailability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *224*, 113205.
191. Marinheiro, D., Ferreira, B. J., Oskoei, P., Oliveira, H., & Daniel-da-Silva, A. L. (2021). Encapsulation and enhanced release of resveratrol from mesoporous silica nanoparticles for melanoma therapy. *Materials*, *14*(6), 1382. doi: 10.3390/ma14061382. PMID: 33809119; PMCID: PMC8000002.
192. Hu, Y., Wang, Z., Qiu, Y., Liu, Y., Ding, M., & Zhang, Y. (2019). Anti-miRNA21 and resveratrol-loaded polysaccharide-based mesoporous silica nanoparticle for synergistic activity in gastric carcinoma. *Journal of drug targeting*, *27*(10), 1135-1143. doi: 10.1080/1061186X.2019.1610766. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31017473.

Βιβλιογραφία εικόνων

Εικόνα 1: Istasse, T. (2021). Synthesis of furan derivatives from monosaccharides in reaction media based on choline chloride. Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/the-12-principles-of-green-chemistry_fig8_349808977 [accessed 10 Sep 2024]

Εικόνα 2: Laguerre M., Lavaud A. (2016). The rise of deep eutectics from nature to cosmetics. *Naturex.*, 45-47.

Εικόνα 4: Ranzi, Eliseo & Debiagi, Paulo & Frassoldati, Alessio. (2017). Mathematical Modeling of Fast Biomass Pyrolysis and Bio-Oil Formation. Note I: Kinetic Mechanism of Biomass Pyrolysis. ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 5. 10.1021/acssuschemeng.6b03096.

Εικόνα 6: Trollope, Lee & Cruickshank, Dyanne & Noonan, Terence & Bourne, Susan & Sorrenti, Milena & Catenacci, Laura & Caira, Mino. (2014). Inclusion of trans-resveratrol in methylated cyclodextrins: Synthesis and solid-state structures. Beilstein journal of organic chemistry. 10. 3136-51. 10.3762/bjoc.10.331.

Εικόνα 8: Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. International journal of molecular sciences, 22(7), 3380.

Εικόνα 9: Misto, Misto & Mulyono, Tri & Cahyono, Bowo & Wulandari, Eka. (2019). Measurement of Optical Parameters and Electrical Conductivity for Determining the Quality of Besuki Local Honey Using Spectrophotometer. Food Science and Technology. 7. 57-62. 10.13189/fst.2019.070403.

Εικόνα 10: LaCourse, W. R., & LaCourse, M. E. (2023). General instrumentation in HPLC. In *Liquid Chromatography* (61-73). Elsevier.