



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ  
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΜΕ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

**ΓΕΩΡΓΙΑ ΤΣΑΠΑΡΑ**

A.M. 284

**ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ Δ.Π.Μ.Σ. «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**



**Επιβλέπων :** Σταμάτης Χαράλαμπος Καθηγητής τμήματος Β.Ε.Τ.

**Μέλη:** Πέτρος Καταπόδης Επίκουρος Καθηγητής τμήματος Β.Ε.Τ.,  
Δημήτριος Χατζηνικολάου Αναπληρωτής Καθηγητής τμήματος  
Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α.

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2022

## **Πρόλογος**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2022.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Σταμάτη Χαράλαμπο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας αλλά και για την στήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Τον ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη, το ενδιαφέρον, τη καθοδήγηση του, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του που με βοήθησαν να φέρω σε πέρας την διπλωματική μου εργασία και να καταλάβω σε βάθος το αντικείμενο μελέτης της εργασίας μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της κριτικής επιτροπής κ. Καταπόδη Πέτρο και κ. Δημήτριο Χατζηνικολάου για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αρχοντούλα Γιαννακοπούλου για την βοήθεια και τη στήριξη της τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τον χρόνο που μου αφιέρωσε και τις γνώσεις που μου μετέφερε ώστε να μπορώ να ανταπεξέλθω στις απαιτήσεις της διπλωματικής εργασίας. Πάντα διαθέσιμη για ότι χρειαζόμουν, με καθοδηγούσε κάθε στιγμή και με βοηθούσε σε κάθε δυσκολία. Νιώθω τυχερή που την είχα δίπλα μου και σε αυτή την απαιτητική χρονιά και της εύχομαι μόνο επιτυχίες και καλή σταδιοδρομία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μιχαέλα Πατήλα Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου, Έλενα Γκάντζου, Ρένια Φωτιάδου, Πάνος Αθανασίου, Μυρτώ Μπέλλου, Άγγελο Παπανικολάου, Ματίνα Σπύρου, Χριστίνα Αλατζογλου για τη πολύτιμη βοήθεια τους και την πολύ καλή συνεργασία. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους συμφοιτητές μου και τους προπτυχιακούς φοιτητές για το ευχάριστο κλίμα καθ' όλη την διάρκεια της χρονιάς.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που είναι συνέχεια δίπλα μου και με στηρίζει σε κάθε επιλογή μου, καθώς και τους φίλους μου που είναι πάντα στο πλευρό μου.



## Πίνακας Περιεχομένων

Θεωρητικό Μέρος .....	10
1 Βιοπολυμερή .....	10
1.1 Αξιοποίηση βιοπολυμερών σε βιοϊατρικές εφαρμογές .....	10
1.2 Ένζυμική τροποποίηση βιοπολυμερών με φαινολικές ενώσεις .....	12
1.2.1 Οξειδοαναγωγικά ένζυμα .....	13
1.2.1.1 Λακκάση.....	14
1.2.1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά .....	14
1.2.1.1.2 Μηχανισμός κατάλυσης .....	14
1.3 Βιοπολυμερή με βιοϊατρικό ενδιαφέρον .....	16
1.3.1 Χιτοζάνη.....	16
1.3.1.1 Ενζυμική τροποποίηση χιτοζάνης .....	18
1.3.1.2 Εφαρμογές της χιτοζάνης και των παραγώγων της.....	22
1.3.2 Ζελατίνη .....	24
1.3.2.1 Ενζυμική τροποποίηση ζελατίνης .....	26
1.3.2.2 Εφαρμογές ζελατίνης και των παραγώγων της .....	26
1.3.3 Κυτταρίνη.....	28
1.3.3.1 Ενζυμική τροποποίηση κυτταρίνης .....	29
1.3.3.2 Εφαρμογές κυτταρίνης και των παραγώγων της.....	30
2. Βιοδραστικές ενώσεις.....	32
2.1 Αξιοποίηση βιοδραστικών ενώσεων στη Βιοϊατρική.....	32
2.2 Φαινολικές ενώσεις .....	33
2.2.1 Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων .....	34
2.2.1.1 Φερουλικό οξύ.....	35
2.2.1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά .....	35
2.2.1.1.2 Βιοδραστική λειτουργία .....	36
2.2.1.2 Υδροξυτυροσόλη.....	37
2.2.1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά .....	37

2.2.1.2.2 Βιοδραστική λειτουργία .....	38
2.2.1.3 Λουτεολίνη .....	40
2.2.1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά .....	40
2.2.1.3.2 Βιοδραστική λειτουργία .....	41
2.2.1.4 Ελλαγικό οξύ .....	43
2.2.1.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά .....	43
2.2.1.4.2 Βιοδραστική λειτουργία .....	44
2.4 Εκχυλίσματα από φυσικές πηγές.....	46
2.4.1 Εκχυλίσματα φύλλων ελιάς.....	46
2.4.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά .....	46
2.4.1.2 Βιοδραστική λειτουργία .....	47
3 Βιολογικές δράσεις τροποποιημένων πολυμερών.....	49
3.1 Αντιοξειδωτική δράση.....	49
3.2 Αντιμικροβιακή δράση.....	51
3.2.1 Βακτήρια .....	51
3.2.2 Τυπική καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης.....	53
3.2.3 Αντιμικροβιακή δράση βιοπολυμερών.....	54
<b>Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>55</b>
4. Υλικά.....	55
4.1 Ένζυμα-Πρωτεΐνες .....	55
4.2 Βακτηριακό στέλεχος .....	55
4.3 Υπόστρωμα .....	55
4.4 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων.....	55
4.5 Διαλύματα .....	55
4.6 Αντιδραστήρια.....	56
5. Μέθοδοι.....	57
5.1 Παρασκευή διαλυμάτων βιοπολυμερών.....	57
5.1.1 Διάλυμα χιτοζάνης .....	57
5.1.2 Διάλυμα ζελατίνης/χιτοζάνης .....	57
5.1.3 Διάλυμα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης.....	57

5.2 Ενζυμική τροποποίηση βιοπολυμερών με τις ενώσεις φερουλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη και ελλαγικό οξύ.....	58
5.2.1 Ενζυμική τροποποίηση της χιτοζάνης με τις φαινολικές ενώσεις.....	58
5.2.2 Ενζυμική τροποποίηση ζελατίνης/χιτοζάνης με τις φαινολικές ενώσεις .....	58
5.2.3 Ενζυμική τροποποίηση κυτταρίνης με τις φαινολικές ενώσεις.....	59
5.2.4 Παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων τροποποίησης βιοπολυμερών με τις φαινολικές ενώσεις.....	59
5.3 Παρασκευή ενζυμικά τροποποιημένου εκχυλίσματος φύλλων ελιάς .....	59
5.3.1 Παρασκευή υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς.....	60
5.3.2 Ενζυμική τροποποίηση υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς .....	60
5.3.3 Ανάλυση γρήρης χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC).....	60
5.4 Ενζυμική τροποποίηση βιοπολυμερών με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς .....	61
5.5 Προσδιορισμός ποσοστού σύνδεσης φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.....	62
5.6 Έλεγχος βιολογικών δράσεων των τροποποιημένων φιλμ.....	63
5.6.1 Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης των τροποποιημένων φιλμ.....	63
5.6.1.1 Μέθοδος οξειδωμένου ABTS.....	63
5.6.1.2 Μέθοδος DPPH .....	63
5.6.2 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης των τροποποιημένων φιλμ .....	64
5.7 Χαρακτηρισμός των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ.....	65
5.7.1 Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis).....	65
5.7.2 Φασματοσκοπία υπερώθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR/ATR) .....	65
<b>Αποτελέσματα.....</b>	<b>66</b>
6. Ενζυμική τροποποίηση πολυμερών με φαινολικές ενώσεις.....	66
6.1 Παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης της ενζυμικής τροποποίησης βιοπολυμερών με φαινολικές ενώσεις.....	66
6.2 Προσδιορισμός του ποσοστού σύνδεσης των φαινολικών ενώσεων στα ενζυμικά τροποποιημένα πολυμερή.....	69
6.3 Χαρακτηρισμός των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ χιτοζάνης.....	70

6.3.1 Χαρακτηρισμός ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis).....	70
6.3.2 Χαρακτηρισμός ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ με φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR/ATR).....	72
6.4 Μελέτη της βιολογικής δράσης των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ .....	76
6.4.1 Αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων φιλμ με τη μέθοδο του οξειδωμένου ABTS .....	76
6.4.2 Αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων φιλμ με τη μέθοδο DPPH .....	80
6.4.3 Αντιμικροβιακή δράση των τροποποιημένων φιλμ με φαινολικές ενώσεις.....	82
<b>7. Ενζυμική τροποποίηση των βιοπολυμερών με εκχύλισμα φύλλων ελιάς .....</b>	<b>84</b>
7.1 Παρακολούθηση της πορείας της ενζυμικής αντίδρασης τροποποίησης του υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς με το δι-ενζυμικό σύστημα β-γλυκοσιδάση/λιπάση .....	84
7.2 Χαρακτηρισμός των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis).....	87
7.3 Μελέτη της βιολογικής δράσης των τροποποιημένων φιλμ με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς.....	88
7.3.1 Αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων φιλμ με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς.....	88
7.3.1.1 Μέθοδος οξειδωμένου ABTS.....	88
7.3.1.2 Μέθοδος DPPH .....	90
7.3.2 Αντιμικροβιακή δράση των τροποποιημένων φιλμ με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς.....	91
<b>Συμπεράσματα .....</b>	<b>93</b>
<b>Παράρτημα.....</b>	<b>97</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>106</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών για την τροποποίηση διαφόρων βιοπολυμερών με βιοδραστικές ενώσεις και τη δημιουργία καινοτόμων υλικών με βελτιωμένες ιδιότητες που μπορούν να αξιοποιηθούν σε βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως η μηχανική ιστών, η επούλωση πληγών και η μεταφορά βιοδραστικών ενώσεων. Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η δυνατότητα ενζυμικής τροποποίησης των βιοπολυμερών χιτοζάνη, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη και ενός υβριδικού πολυμερούς ζελατίνης/χιτοζάνης. Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν για την τροποποίηση αυτών των βιοπολυμερών ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων και περιλαμβάνουν το φερουλικό οξύ, την υδροξυτυροσόλη, το ελλαγικό οξύ και τη λουτεολίνη. Επίσης, διερευνήθηκε η δυνατότητα τροποποίησης των βιοπολυμερών με εκχυλίσματα φυσικής προέλευσης, όπως το εκχύλισμα φύλλων ελιάς το οποίο χαρακτηρίζεται από πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων για την ανθρώπινη υγεία. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα επίσης τροποποιήθηκε ενζυμικά για τον εμπλουτισμό του σε υδροξυτυροσόλη, ένα από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά φυσικής προέλευσης. Η τροποποίηση των βιοπολυμερών πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της λακάσης από τον μικροοργανισμό *Agaricus bisporous*. Κατά την ενζυμική τροποποίηση, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται και τα παραγόμενα προϊόντα αναδιατάσσονται σε υψηλής δραστηριότητας κινόνες, οι οποίες σε ένα μετέπειτα μη ενζυμικό βήμα μπορούν να συνδεθούν με τις χαρακτηριστικές ομάδες των βιοπολυμερών, όπως οι υδροξυλομάδες και αμινομάδες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα βιοπολυμερή μπορούν να τροποποιηθούν επιτυχώς με όλες τις βιοδραστικές ενώσεις και το τροποποιημένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς, με υψηλό ποσοστό σύνδεσης στις περισσότερες περιπτώσεις, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων Folin-Ciocalteu. Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων τροποποίησης των βιοπολυμερών παρακολουθήθηκε μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν δομικές μελέτες φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-vis) και υπερύθρου (ATR) στα φιλμ, όπου επιβεβαιώθηκε η σύνδεση των βιοδραστικών ενώσεων στα πολυμερή. Σε ένα επόμενο βήμα, μελετήθηκαν οι βιολογικές ιδιότητες των τροποποιημένων βιοπολυμερών έναντι των μη τροποποιημένων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα τροποποιημένα με τις βιοδραστικές ενώσεις βιοπολυμερή εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των μη τροποποιημένων, η οποία προσδιορίστηκε με το πρωτόκολλο του οξειδωμένου ABTS και τη μέθοδο DPPH. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση όλων των βιοπολυμερών έναντι του κατά Cram<sup>-</sup> βακτηρίου, *Escherichia*



*coli*, όπου όλα τα τροποποιημένα βιοπολυμερή έδειξαν σημαντική αντιβακτηριακή δράση έναντι του στελέχους.

Συμπερασματικά, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά συγκριτική μελέτη της ενζυμικής τροποποίησης διαφορετικών βιοπολυμερών με ποικίλες φαινολικές ενώσεις υψηλού βιοϊατρικού ενδιαφέροντος. Η ανάπτυξη τροποποιημένων βιοπολυμερών με εξαιρετικές βιολογικές δράσεις, αποτελεί έναυσμα για πλήθος εφαρμογών στο τομέα της Βιοϊατρικής.

## ABSTRACT

The aim of the present diploma thesis is associated with the development of biocatalytic processes for the modification of biopolymers with bioactive compounds and the development of innovative materials with improved properties that can be used in biomedical applications, such as tissue engineering, wound healing and drug delivery. In the present study, the possibility of enzymatic modification of the biopolymers chitosan, carboxymethyl cellulose and a hybrid gelatin/chitosan polymer was investigated. The chosen compounds for the modification of the biopolymers belong to the category of phenolic compounds, such as ferulic acid, hydroxytyrosol, ellagic acid and luteolin, which are characterized by strong bioactivity. Also, the possibility of the enzymatic modification of the above-mentioned biopolymers with plant-derived natural extracts that possess significant benefits for human health, such as olive leaf extract, was also investigated. Furthermore, the above-mentioned extract was enzymatically modified for its enrichment in hydroxytyrosol, one of the most powerful naturally derived antioxidants. The modification of the biopolymers was enzymatically mediated through laccase from *Agaricus bisporous*, that oxidizes the phenolic compounds to form reactive quinone methides that are subsequently grafted onto the free groups present in biopolymers.

The results showed that all the biopolymers can be successfully modified with the bioactive compounds and the modified olive leaf extract, with high grafting efficiency in most cases, which was quantified by the Folin-Ciocalteu method. The reaction progress was monitored by UV-visible (Uv-vis) spectroscopy. Also, Uv-vis and attenuated total reflectance (ATR) spectroscopy was applied for the structural characterization of the obtained films. In addition, the biological properties of the modified biopolymers were investigated and compared with the non-modified ones. The results showed that the functionalized biopolymers presented significantly higher antioxidant activity than the non-modified ones, which was determined according to the well-established ABTS and DPPH protocols. In addition, the antimicrobial activity of the prepared films (modified and non-modified) was studied, and the results showed that the modified polymers exhibited strong antimicrobial activity against bacterial populations of *Escherichia coli* BL21DE3 strain.

In conclusion, a comparative study associated with the different biopolymers enzymatically modified with various phenolic compounds of biomedical interest was carried out for the first time. The development of modified biopolymers with excellent biological activities could promote their numerous applications in Biomedicine and in various fields.

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Βιοπολυμερή

Τα πολυμερή είναι φυσικά ή τεχνητά παρασκευασμένα που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα μόρια μικρότερου μοριακού βάρους, τα μονομερή. Τα μονομερή ενώνονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό ώστε να σχηματίσουν τη μακρομοριακή αλυσίδα (Pattanashetti, N. A., et. al., 2017). Τα φυσικά πολυμερή απαντώνται στη φύση ενώ τα συνθετικά παράγονται από τον άνθρωπο. Οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν τα φυσικά πολυμερή για πολλούς αιώνες χωρίς να γνωρίζουν ότι ήταν μακρομόρια. Η επιστημονική διερεύνηση της δομής των πολυμερών αλλά και η συνθετική παραγωγή τους αποτελούν επιτεύγματα του 20ου αιώνα.

Τα πολυμερή ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την προέλευση και τη χημική σύσταση τους: στα φυσικά πολυμερή, τα οποία λαμβάνονται απευθείας από τη φύση (μαλλί, μετάξι), στα ημισυνθετικά πολυμερή τα οποία προκύπτουν από το χημικό μετασχηματισμό φυσικών προϊόντων, όπως πρωτεΐνες (καζεΐνη γάλακτος, ζεΐνη αραβοσίτου, πρωτεΐνη σόγιας), παράγωγα σακχάρων, φυτικές ρητίνες, και στα συνθετικά πολυμερή, των οποίων τα μονομερή δεν υπάρχουν στη φύση (μακρομόρια με ανθρακική αλυσίδα, μακρομόρια με ετεροάτομα στην αλυσίδα τους). Τα φυσικά πολυμερή αποτελούν τις δομικές μονάδες των ζωντανών οργανισμών και σε αυτά ανήκουν οι υδατάνθρακες, τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. Στα πολυμερή που συναντάμε στη φύση σε αφθονία ανήκουν το άμυλο, η κυτταρίνη, η χιτίνη και άλλοι πολυσακχαρίτες, οι πρωτεΐνες, όπως το μαλλί, το δέρμα και οι τένοντες από όπου παράγεται η ζελατίνη (οστεόκολλα), το φυσικό καουτσούκ, όπως το ισοπρένιο κ.α.

#### 1.1. Αξιοποίηση βιοπολυμερών σε βιοϊατρικές εφαρμογές

Στη βιβλιογραφία υπάρχει ένα μεγάλος αριθμός μελετών που επικεντρώνονται στην αξιοποίηση των βιοπολυμερών σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Τα βιοπολυμερή εφαρμόζονται ευρύτατα στον κλάδο της Ιατρικής καθώς είναι βιοσυμβατά, μη τοξικά, βιοαποικοδομήσιμα, έχουν σημαντική βιολογική δράση και χαρακτηρίζονται από χαμηλό κόστος. Επίσης, διαθέτουν τις απαραίτητες λειτουργικές ομάδες για αλληλεπιδράσεις με άλλα βιομόρια και μπορούν να τροποποιηθούν εύκολα ώστε να παραχθούν χρήσιμα προϊόντα. Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές των βιοπολυμερών στη Βιοϊατρική είναι η μεταφορά φαρμάκων και άλλων βιοδραστικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, τα βιοπολυμερή χρησιμοποιούνται ως περίβλημα για την ελεγχόμενη διάχυση του φαρμάκου σε συγκεκριμένους χρόνους και με αυτό το τρόπο

επιτυγχάνεται σταθερή και συνεχής χορήγηση του φαρμάκου αποφεύγοντας τις τοξικές παρενέργειες που μπορεί να έχει η συμβατική χορήγηση στους φυσιολογικούς ιστούς. Τα συστήματα αυτά δίνουν τη δυνατότητα εγκλεισμού της δραστικής ουσίας των φαρμάκων σε προστατευτικά νανοσωματίδια πολυμερών όπως λιποσώματα και λιπιδικά νανοσωματίδια, μικκύλια, νανοσφαίρες, νανοκάψουλες, νανοεναιωρήματα, νανοίνες και νανοσωλήνες (Jacob, J., 2018). Βιοπολυμερή, όπως η χιτοζάνη και ζελατίνη, έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς για την επούλωση πληγών, καθώς επιτρέπουν τη προσκόλληση ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων στην επιφάνεια τους και έτσι προάγουν τη πήξη του αίματος και τη γρήγορη διακοπή της αιμορραγίας. Επίσης, εάν τροποποιηθούν με αντιμικροβιακές ενώσεις μπορούν να προστατεύσουν το τραύμα από τυχόν μόλυνση. Μία μελέτη που αφορά την αξιοποίηση της ζελατίνης στην επούλωση τραυμάτων έδειξε ότι το πολυμερές αυτό παρεμποδίζει την αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας καθώς αποτελεί υπόστρωμα για τις πρωτεάσες στη περιοχή του τραύματος (Rocasalbas, G, et. al., 2013). Μία άλλη εφαρμογή των πολυμερών έγκειται στη μηχανική ιστών, δηλαδή στη χρήση ζωντανών κυττάρων για την ανάπτυξη βιολογικών ικριωμάτων με σκοπό την επισκευή, την αντικατάσταση ή τη διατήρηση της λειτουργίας ενός συγκεκριμένου ιστού ή οργάνου μέσω εμφύτευσης στο σώμα. Τα βιοπολυμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ικρίωμα αναγέννησης ιστού αποτρέποντας ανοσολογικές αντιδράσεις και φλεγμονές καθώς είναι βιοσυμβατά και μπορούν να αποδομηθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό. Ορισμένα βιοπολυμερή, όπως η κυτταρίνη και η χιτοζάνη προάγουν τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυττάρων καθώς επιτρέπουν τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα και χαρακτηρίζονται από αντοχή και ανθεκτικότητα. Μέχρι στιγμής έχει αναφερθεί η μηχανική ιστών δέρματος, χόνδρων, κερατοειδούς, αιμοφόρων αγγείων και ήπατος (Jayakumar, R., et. al., 2010). Επίσης, μία άλλη εφαρμογή των βιοπολυμερών απαντάται στη βιομηχανία των τροφίμων και ειδικότερα στην ανάπτυξη κατάλληλων συσκευασιών με ελεγχόμενη αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Τα βιοπολυμερή υπό μορφή φιλμ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για συσκευασίες τροφίμων μειώνοντας έτσι τις απαιτήσεις για συνθετική συσκευασία και προστατεύοντας το περιβάλλον. Τα βιοπολυμερή αυξάνουν τη διάρκεια ζωής και τη βελτίωση της ποιότητας των τροφίμων, ιδιαίτερα όταν τροποποιούνται με αντιοξειδωτικές ή αντιμικροβιακές ενώσεις. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως πρόσθετα τροφίμων για την ενίσχυση της συντήρησής τους (Carla Vilela, et. al., 2017).

## 1.2. Ενζυμική τροποποίηση βιοπολυμερών με φαινολικές ενώσεις

Οι ερευνητές εστιάζουν όλο και περισσότερο τη προσοχή τους στη τροποποίηση βιοπολυμερών με βιοδραστικές ενώσεις που ανακτώνται από φυσικές πηγές, όπως είναι τα φυτά και τα φρούτα καθώς είναι πιο ασφαλή συγκριτικά με ενώσεις που παράγονται με μεθόδους κλασσικής χημικής σύνθεσης. Οι βιοδραστικές ενώσεις είναι μεταβολίτες που συντίθενται από τα φυτά και συμβάλουν στην άμυνά αυτών ενάντια σε παράγοντες που απειλούν την ανάπτυξη τους, ενώ παράλληλα μπορεί να είναι πολύ ευεργετικοί για την ανθρώπινη υγεία (Puri et al., 2012). Μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες μεταβολιτών είναι οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση.

Τα βιοπολυμερή μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν με τις φαινολικές ενώσεις ώστε να παραχθούν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας με βελτιωμένη βιοδραστική λειτουργία. Η τροποποίηση μπορεί να γίνει με χημικές ή ενζυμικές μεθόδους. Κατά τη χημική τροποποίηση συχνά χρησιμοποιούνται επικίνδυνα αντιδραστήρια που έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, το οποίο είναι σημαντικό εμπόδιο ιδιαίτερα όταν τα προϊόντα προορίζονται για τον τομέα των φαρμάκων και τροφίμων. Από τη άλλη πλευρά, η τροποποίηση βιοπολυμερών με ενζυμικές μεθόδους είναι πλέον ευρέως διαδεδομένη καθώς τα ένζυμα χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα και καταλυτική δράση, εφαρμόζονται σε ήπιες συνθήκες, αποφεύγονται ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις και η χρήση επικίνδυνων αντιδραστηρίων και διαλυτών. Επομένως, λόγω της αυξανόμενης ανάγκης για ασφαλείς και φιλικές προς το περιβάλλον διεργασίες, τα ένζυμα αποτελούν σημαντικά εργαλεία για την τροποποίηση των βιοπολυμερών με φαινολικές ενώσεις και την ασφαλή αξιοποίηση τους σε πληθώρα εφαρμογών (Aljawish, A., et. al., 2014).

Η ενζυμική προσέγγιση περιλαμβάνει οξειδωτικά ένζυμα όπως οξειδάσες πολυφαινόλης (PPO) (τυροσινάσες, λακκάσες), υπεροξειδάσες (POD), λιπάσες, φωσφορυλάσες και τρανσγλουταμινάσες. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται επί το πλείστον για αυτό το σκοπό είναι οι λακκάσες, οι τυροσινάσες και οι υπεροξειδάσες, τα οποία έχουν την ικανότητα να παράγουν ενεργά ενδιάμεσα προϊόντα τα οποία έπειτα μπορούν να διαχυθούν μακριά από το ενεργό κέντρο του ενζύμου προς το μέσο της αντίδρασης, όπου συμμετέχουν σε περαιτέρω μη ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις. Μία έρευνα αναφέρεται στη τροποποίηση της χιτοζάνης με το ένζυμο τυροσινάση, όπου χαμηλού μοριακού βάρους κατεχόλες, όπως το καφεϊκό οξύ και το χλωρογενικό οξύ, μπορούν να συνδεθούν στο πολυμερές με ομοιοπολικό δεσμό και να τροποποιήσουν τις ιδιότητες του (Fras-Zemljic, L., Kokol, V., & Čakara, D., 2011). Σε μία άλλη έρευνα αξιοποιήθηκε το ίδιο ένζυμο για να τροποποιηθούν ίνες χιτοζάνης με τα φλαβονοειδή

κερσετίνη, κατεχίνη, επικατεχίνη, ρουτίνη, φισετίνη, εσπεριδίνη με σκοπό την αύξηση της αντιμικροβιακή τους δράσης έναντι των μικροοργανισμών *Bacillus subtilis* και *Pseudomonas aeruginosa* (Sousa, F., Guebitz, G. M., & Kokol, V., 2009). Επίσης, μία άλλη μελέτη αναφέρεται στην αξιοποίηση της χλωροϋπεροξειδάσης (CPO) από τον θαλάσσιο μύκητα *Caldariomyces fumago* για την οξείδωση φλαβονοειδών, όπως η κερσετίνη, η ρουτίνη, η ναρινγίνη, η εσπεριδίνη και η χρυσίνη ώστε να παραχθούν δραστικά ενδιάμεσα που μπορούν να συνδεθούν σε ένα επόμενο βήμα στη χιτοζάνη (Aljawish A., et. al., 2015).

### 1.2.1. Οξειδοαναγωγικά ένζυμα

Οι οξειδοαναγωγάσες (EC 1) είναι μία μεγάλη κατηγορία ενζύμων που καταλύουν την οξείδωση ή την αναγωγή ενός υποστρώματος, δηλαδή αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων (σε ορισμένες περιπτώσεις συνοδεύεται και με μεταφορά πρωτονίων) από ένα υπόστρωμα δότη ηλεκτρονίων σε ένα άλλο υπόστρωμα που είναι ο δέκτης. Στις αντιδράσεις αυτές γίνεται μεταφορά αναγωγικών ισοδύναμων από το υπόστρωμα-δότη στο προϊόν-δέκτη με οποιαδήποτε μορφή π.χ. άτομα υδρογόνου, ηλεκτρόνια ή υβρίδια ( $H^{\cdot}$ ). Ρόλο αποδέκτη αναγωγικών ισοδύναμων έχουν διάφορα συνένζυμα ( $NADH/NAD^+$ ,  $NADPH/NADP^+$ ,  $FAD$ ). Οι οξειδοαναγωγάσες κατατάσσονται σε έξι υποομάδες, οι οποίες περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω.

- Αφυδρογονάσες: καταλύουν αντιδράσεις αφυδρογόνωσης
- Υδροξυλάσες: καταλύουν την ενσωμάτωση ενός ατόμου ατμοσφαιρικού μοριακού οξυγόνου σε ένα υπόστρωμα προκαλώντας υδροξυλίωση, ενώ το δεύτερο άτομο ανάγεται σε νερό
- Διοξυγονάσες: καταλύουν την ενσωμάτωση δύο ατόμων οξυγόνου στο υπόστρωμα τους
- Οξειδάσες: καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες ο τελικός δέκτης των αναγωγικών ισοδύναμων είναι το μοριακό οξυγόνο
- Υπεροξειδάσες: χρησιμοποιούν το υπεροξειδίου του υδρογόνου ως αποδέκτη για να καταλύσουν την οξείδωση ενός πλήθους οργανικών και ανόργανων υποστρωμάτων
- Καταλάσες: καταλύουν τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου («Ενζυμική Βιοτεχνολογία Με Στοιχεία Νανοβιοτεχνολογίας», Σταμάτης Χ., 2016).

### 1.2.1.1. Λακκάση

#### 1.2.1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι λακκάσες (EC 1.10.3.2) ή αλλιώς μπλε οξειδάσες του χαλκού καταλύουν την οξείδωση πολλών οργανικών αρωματικών υποστρωμάτων, κυρίως φαινολικών συστατικών και διαμινών, αλλά δεν οξειδώνουν την τυροσίνη (Thurston, 1994, Minussi et al. 2002). Υποστρώματα της λακκάσης είναι διάφορες ο- και p-διφαινόλες, πολυφαινόλες, αμινοφαινόλες, αρυλοδιαμίνες και πολυαμίνες καθώς και η λιγνίνη.

Οι λακκάσες είναι ευρέως διαδεδομένες σε οργανισμούς όπως οι μύκητες, τα ανώτερα φυτά και τα βακτήρια, αλλά έχουν καταγραφεί και σε οργανισμούς όπως τα έντομα, οι λειχήνες και οι σπόγγοι (Mate & Alcalde, 2017). Η πρώτη καταγραφή του ενζύμου έγινε τον 19<sup>ο</sup> αιώνα από τον Yoshida και αποτελούσε συστατικό των Ιαπωνικών ρητινοφόρων δέντρων *Rhus vernicifera* (Riva, 2006). Άλλα ανώτερα φυτικά είδη φαίνεται επίσης να περιέχουν λακκάση όμως πιο περιορισμένη σε αντίθεση με τους μύκητες. Οι μυκητιακής προέλευσης λακκάσες ανακαλύφθηκαν κατά τη διάρκεια του 19<sup>ου</sup> αιώνα και έκτοτε, η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί σε κάθε μύκητα που έχει μελετηθεί έως τώρα (Hatakka, 2006). Οι λακκάσες έχουν βρεθεί σε σειρές μυκήτων διαφόρων κλάσεων. Παράγονται από ασκομύκητες, όπως οι *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, από δευτερομύκητες, όπως από *Podospora anserine* και το μύκητα του κρασιού *Botrytis cinerea* και τέλος από αρκετά γένη βασιδιομυκήτων. Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει και τους πλέον σημαντικούς μύκητες ως προς την παραγωγή λακκάσων. Όσον αφορά τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, έχουν βρεθεί γονίδια που κωδικοποιούν λακκάσες σε αρνητικά και θετικά κατά gram βακτήρια συμπεριλαμβανομένων και ειδών που ζουν σε ακραία ενδιαιτήματα (Claus et al., 2003).

#### 1.2.1.1.2. Μηχανισμός κατάλυσης

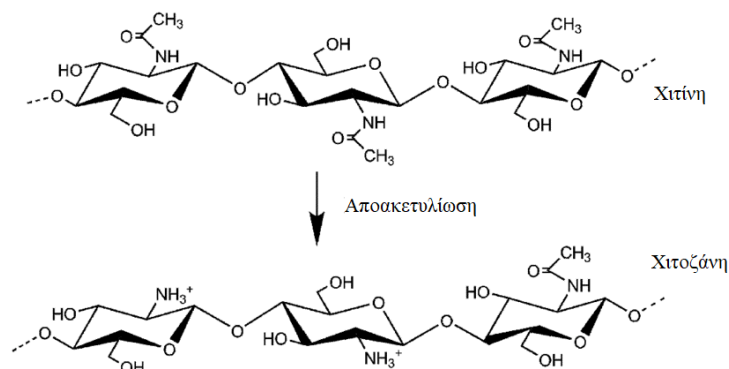
Οι λακκάσες περιλαμβάνουν στη δομή τους τέσσερα ενεργά κέντρα, το καθένα από τα οποία περιέχει ένα ιόν χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Τα τέσσερα ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$  κατανέμονται σε διαφορετικές θέσεις και ταξινομούνται σε τρεις τύπους, T1, T2 και T3. Ο τύπος χαλκού T1 εμπλέκεται στην πρόσληψη και μεταφορά ηλεκτρονίων, ο τύπος T2 ενεργοποιεί το μοριακό οξυγόνο, ενώ ο τύπος T3 (που αποτελείται από 2 ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$ ) είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του οξυγόνου (Palmer et al. 2001). Στα ενεργά αυτά κέντρα πραγματοποιείται οξείδωση των φαινολικών συστατικών (τυπικά υποστρώματα δράσης του ενζύμου) μέσω μιας εξωτερικής μεταφοράς ηλεκτρονίων και

αντίστοιχη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό σχετίζεται με τη μετατροπή του υποστρώματος και πιο συγκεκριμένα με οξείδωση των φαινολικών συστατικών. Όσο αφορά τη δράση της λακκάσης, ένα φαινολικό συστατικό υφίσταται οξείδωση (απομακρύνοντας ένα ηλεκτρόνιο), σχηματίζοντας σε πρώτη φάση μια φαινοξυ-ρίζα, η οποία μετέπειτα έχει τη δυνατότητα είτε να μετασχηματιστεί σε κινόνη ή να προκαλέσει τον πολυμερισμό της ενδιάμεσης αυτής ρίζας (Minussi et al. 2002).

Συγκεκριμένα, το πρώτο βήμα είναι η κατάλυση της οξείδωσης του υποστρώματος από την αναγωγή του χαλκού στην περιοχή T1, που είναι ο κύριος δέκτης ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από την οξείδωση του υποστρώματος μεταφέρονται μέσω ενός τριπεπτιδίου Ιστιδίνης (His)-Κυστεΐνης (Cys)-Ιστιδίνης (His) στην τριπυρηνική περιοχή T2/T3, με αποτέλεσμα τη μετατροπή της μορφής ανάπαυσης του ενζύμου (πλήρως οξειδωμένη) σε μία πλήρως ανηγμένη και ενεργή κατάσταση. Μια διαδοχική οξείδωση τεσσάρων ηλεκτρονίων, από τέσσερα μόρια υποστρώματος, προκαλεί την πλήρη αναγωγή του ενζύμου. Η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το μόριο του οξυγόνου συνδέεται πρώτα με την περιοχή T2/T3, και δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται ταχέως στα άτομα χαλκού T3, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδιάμεσου υπεροξειδίου. Το ενδιάμεσο υπεροξείδιο διασπάται σε ρίζα οξέος και υποβάλλεται σε διηλεκτρονιακή αναγωγική διάσπαση του δεσμού O-O με την απελευθέρωση ενός μορίου νερού. Ο χαλκός T1 σχηματίζει μία ευρεία κοιλότητα στην επιφάνεια του ενζύμου, λειτουργώντας σαν πόρτα και δίνοντας την δυνατότητα να εισέλθουν τα μόρια των υποστρωμάτων. Στο τελευταίο βήμα, και τα τέσσερα κέντρα χαλκού οξειδώνονται, και το O<sup>2-</sup> απελευθερώνεται ως ένα δεύτερο μόριο νερού. **(Εικόνα 1)** (Oppellaro et al., Palmer et al. 2001, 2009, Su et al., 2018).

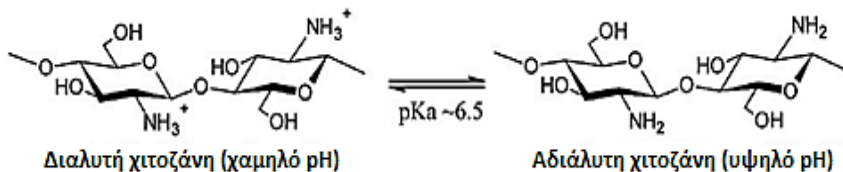






**Εικόνα 2: Δομική συσχέτιση των μορίων χιτίνης και χιτοζάνης.**

Η χιτοζάνη είναι μία ασθενής βάση, αδιάλυτη σε κοινούς οργανικούς διαλύτες, και διαλυτή μόνο σε αραιά διαλύματα οξέων (ανόργανα και οργανικά οξέα όπως υδροχλωρικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, οξικό οξύ) κάτω από τη τιμή pKa 6.3 (Vlacha Maria et. al., 2016 & Vicentini et. al., 2010). Σε αραιό διάλυμα οξέων οι αμινομάδες στη μοριακή αλυσίδα της χιτοζάνης αλληλεπιδρούν με τα πρωτόνια του υδατικού διαλύματος, καθιστώντας τη χιτοζάνη έναν θετικά φορτισμένο πολυηλεκτρολύτη (**Εικόνα 3**). Ως εκ τούτου, η ύπαρξη κατιόντων έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων χιτοζάνης, και έτσι καθίστανται διαλυτή στο νερό. Η διαλυτότητα της χιτοζάνης επηρεάζεται επίσης από το μοριακό της βάρος και το βαθμό αποακετυλίωσης της. Συγκεκριμένα, όσο υψηλότερος είναι ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτοζάνης, τόσο υψηλότερος είναι ο βαθμός πρωτονίωσης των αμινομάδων της, και τόσο πιο εύκολο είναι να διαλυθεί. Όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος χιτοζάνης, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ενδο- και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται στην αλυσίδα του πολυμερούς, καθιστώντας τη χιτοζάνη λιγότερο διαλυτή.



**Εικόνα 3:** Απεικόνιση της διαλυτότητας του μορίου της χιτοζάνης συναρτήσει του pH του μέσου αντίδρασης (Liu et al., 2014).

Η χιτοζάνη είναι ένα πολλά υποσχόμενο βιοπολυμερές, καθώς εμφανίζει μοναδικές βιολογικές και χημικές ιδιότητες όπως βιοσυμβατότητα, βιοδραστικότητα και μη τοξικότητα (Hosseini

Mehdi S. et al. 2019). Επίσης, λόγω της αφθονίας της στη φύση χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος, γεγονός που επιτρέπει την ευρεία χρήση της σε πλήθος εφαρμογών.

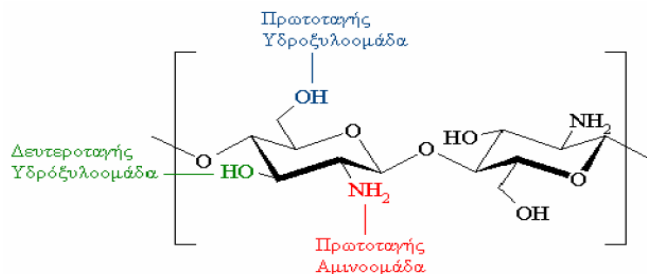
Τόσο η χιτίνη όσο και η χιτοζάνη έχει βρεθεί ότι έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι ενός μεγάλου εύρους οργανισμών όπως θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, ζύμες και μούχλες σε in vivo και in vitro πειράματα. Έχει δειχθεί ότι η χιτοζάνη έχει βακτηριοστατική και μυκητοστατική δράση και γι' αυτό το λόγο έχει εφαρμοστεί ευρέως στον τομέα των τροφίμων. Επιπλέον, η χιτοζάνη εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση καθώς μπορεί να απομακρύνει ελεύθερες ρίζες, για παράδειγμα ρίζες υπεροξειδίου, υδροξυλίου και DPPH (Wang W. et. al., 2020). Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η χιτοζάνη έχει ανασταλτική επίδραση σε καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, αναστέλλει άμεσα το πολλαπλασιασμό τους προκαλώντας απόπτωση (H. Huang et al., 2019 & Y.Q. Xu et al., 2018). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η χιτοζάνη μπορεί να αυξήσει την παραγωγή λεμφοκινών και να οδηγήσει στον πολλαπλασιασμό T-λεμφοκυττάρων. Η χιτοζάνη μπορεί επιπλέον να καταστείλει την ανάπτυξη κυτταρικών όγκων ασκώντας ένα ανοσο-ενισχυτικό αποτέλεσμα (Wang W. et. al., 2020). Σύμφωνα με αναφορές, η χιτοζάνη συμβάλει στη μείωση της αρτηριακής πίεσης και της χοληστερόλης, στην αναστολή της απορρόφησης λίπους, προωθεί την περισταλτικότητα του λεπτού εντέρου, και τη βελτίωση της ανοσίας του σώματος (Inanli A.G.et. al.,2020).

#### 1.3.1.1. Ενζυμική τροποποίηση χιτοζάνης

Η χιτοζάνη έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος εφαρμογών ωστόσο είναι απαραίτητη η επεξεργασία της πριν την χρήση της με χημικές ή ενζυμικές μεθόδους έτσι ώστε να είναι σε μία αξιοποιήσιμη μορφή καθώς η χρήση της περιορίζεται από τη χαμηλή διαλυτότητά της σε ουδέτερο pH και το χαμηλό αντιοξειδωτικό της χαρακτήρα λόγω της έλλειψης δότη ατόμων H. Η τροποποίηση της χιτοζάνης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων, των ρεολογικών ιδιοτήτων της, της αντοχής στην οξείδωση και της αντιβακτηριακής της δράσης έτσι ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί ευρύτατα σε διαφορετικές εφαρμογές.

Στο μόριο της χιτοζάνης υπάρχουν τρεις τύποι δραστικών ομάδων: η αμινομάδα στον άνθρακα 2 και η πρωτοταγής και δευτεροταγής υδροξυλομάδα στον άνθρακα 3 και άνθρακα 6 αντίστοιχα (**Εικόνα 4**). Κατά κανόνα, η αμινομάδα είναι πιο δραστική από την πρωτοταγή ομάδα υδροξυλίου και η πρωτοταγής ομάδα υδροξυλίου είναι πιο δραστική από τη δευτεροταγή ομάδα υδροξυλίου. Επομένως, η τροποποίηση της χιτοζάνης θα μπορούσε να συμβεί σε αμινο-,

υδροξυλ- ή αμινο και υδροξυλ- ομάδες ώστε να σχηματιστούν N-τροποποιημένα, O-τροποποιημένα ή N, O-τροποποιημένα παράγωγα χιτοζάνης.

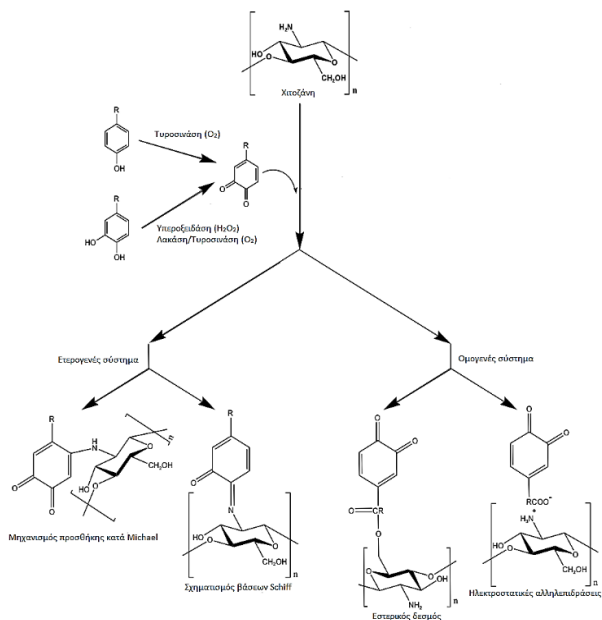


**Εικόνα 4:** Δραστικές ομάδες στη δομή της χιτοζάνης.

Οι δυνατότητες αντίδρασης μεταξύ των δραστικών ομάδων χιτοζάνης και των ενδιάμεσων προϊόντων (ελευθέρων ριζών) ή του αρχικού υποστρώματος εξαρτώνται από το pH (οξύ ή βασικό), το οποίο με τη σειρά του καθορίζει τη μορφή της χιτοζάνης στο μέσο αντίδρασης (διαλυτή, αδιάλυτη). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί δύο συστήματα για την κατάλυση της ενζυμικής τροποποίησης της χιτοζάνης με βάση το pH του μέσου και διακρίνονται σε ομογενή και σε ετερογενή. Το ετερογενές σύστημα επικρατεί όταν το pH είναι μεγαλύτερο από 6.5 και η χιτοζάνη βρίσκεται στην αδιάλυτη μορφή της, δηλαδή οι αμινομάδες είναι αποπρωτονιωμένες στη μορφή NH<sub>2</sub> (πυρηνόφιλο). Στο σύστημα αυτό οι αμινομάδες μπορούν να αντιδράσουν με το ενεργό ενδιάμεσο προϊόν (ηλεκτρονιόφιλο και ελεύθερες ρίζες) προς το σχηματισμό βάσεων Schiff (C=N) ή το σχηματισμό προϊόντων προσθήκης κατά Michael (C-NH) μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης. Από την άλλη πλευρά, το ομογενές σύστημα επέρχεται όταν το pH του μέσου είναι μικρότερο από 6.5 και η χιτοζάνη είναι διαλυτή. Στο σύστημα αυτό οι αμινομάδες της χιτοζάνης είναι πρωτονιωμένες στη μορφή NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (μη πυρηνόφιλη δράση) και μπορούν να αντιδράσουν με το αρχικό υπόστρωμα (μη οξειδωμένο) και με τα προϊόντα οξείδωσης που προκύπτουν μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Επιπρόσθετα, τα προϊόντα οξείδωσης (ελεύθερες ρίζες) ή τα αρχικά υποστρώματα μπορούν να αντιδράσουν με τις υδροξυλομάδες του μορίου της χιτοζάνης στις θέσεις C-6 και C-3 προς το σχηματισμό ομοιοπολικού εστερικού δεσμού (**Εικόνα 5**) (Aljawish, et al., 2014).

Γενικά, τα ενδιάμεσα προϊόντα οξείδωσης είναι ηλεκτρονιόφιλα και ιδιαίτερα δραστικά και μπορούν είτε να αντιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας διμερή και τριμερή ή να αντιδράσουν χημικά με το αρχικό υπόστρωμα για την παραγωγή νέων ελευθέρων ριζών ή την αντιδράσουν μη ενζυμικά με πυρηνόφιλες ομάδες σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς, όπως με τις ελεύθερες αμινομάδες χιτοζάνης (σε pH <6,3). Αν και ο ακριβής μηχανισμός εξακολουθεί να

είναι ελάχιστα κατανοητός, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι αυτά τα προϊόντα μπορούν να ακολουθήσουν (τουλάχιστον) δύο διαφορετικούς τύπους αντιδράσεων με πυρηνόφιλες ομάδες όπως οι αποπρωτονιωμένες αμινομάδες της χιτοζάνης για τη δημιουργία είτε βάσεων Schiff (C = N) είτε προσθήκη τύπου Michael (C-NH) με ομοιοπολικούς δεσμούς όσον αφορά τα φαινολικά υποστρώματα και τις πρωτεΐνες. Επιπλέον, οι αντιδράσεις σχηματισμού oligομερών με άλλες κινόνες μπορούν να οδηγήσουν σε ένα σύνθετο μείγμα μονομερών ή oligομερών συνδεδεμένα πάνω στη χιτοζάνη (Aljawish, et al., 2014).

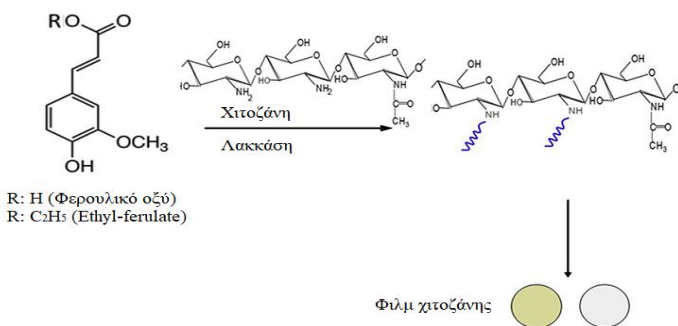


**Εικόνα 5:** Μηχανισμοί ενζυμικής τροποποίησης της χιτοζάνης με πολυφαινολικές οξειδάσες.

Οι λακκάσες, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, καταλύουν την οξείδωση των ο-ή p-διφαινολών μέσω αντίδρασης ελευθέρων ριζών που οδηγεί στον σχηματισμό των αντίστοιχων κινόνων παρουσία μοριακού οξυγόνου (O<sub>2</sub>) που ανάγεται σε νερό. Επιπλέον, καταλύουν την οξείδωση των μονοφαινολών σε αντίστοιχες ημι-κινόνες χωρίς προηγούμενη υδροξυλίωση και την οξείδωση αμινοφαινολών και μεθοξυφαινολών. Τα προϊόντα οξείδωσης μπορούν να πολυμερίζονται αυθόρμητα μέσω σύζευξης ριζών ή να αναδιατάσσονται σε υψηλής δραστηριότητας κινόνες ανάλογα με τις συνθήκες αντίδρασης. Αυτά τα προϊόντα μπορούν επίσης να συνδέονται αυθόρμητα με πρωτοταγείς αμινομάδες μέσω βάσης Schiff ή προσθήκης κατά Michael σε μεταγενέστερη μη ενζυμική αντίδραση. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να εκμεταλλευτεί κατά την ενζυμική τροποποίηση της χιτοζάνης ώστε τα δραστικά οξειδωμένα προϊόντα που

παράγονται από τη δράση της λακκάσης να συνδεθούν με τις αμινομάδες της χιτοζάνης (Aljawish, et. al., 2015).

Αρκετές μελέτες αναφέρονται στη αξιοποίηση της δράσης των λακκασών για την τροποποίηση της χιτοζάνης με βιοδραστικές ενώσεις όπως το καφεϊκό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το κινναμωνικό οξύ, η κατεχόλη, το 2,5-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ, το σιναπικό οξύ, η ευγενόλη κ.α. με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων του βιοπολυμερούς (Yang, C et. al., 2016, Brzonova, I et. al., 2011, Huber, D. et al., 2017). Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί η τροποποίηση της χιτοζάνης με το φερουλικό οξύ και τον αιθυλ-εστέρα του φερουλικού οξέος μέσω της δράσης της λακκάσης από το μικροοργανισμό *Myceliophthora thermophyla* (**Εικόνα 6**) με στόχο τη δημιουργία ενός βιοπολυμερούς με αυξημένη αντιοξειδωτική δράση το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί για τη συσκευασία τροφίμων και ως αντιοξειδωτικό πρόσθετο για τρόφιμα και καλλυντικά (Aljawish, et. al., 2012). Μία άλλη μελέτη αναφέρεται στην ενζυμική τροποποίηση της χιτοζάνης με κερσετίνη και ταννικό οξύ μέσω της δράσης της λακκάσης από το μικροοργανισμό *Trametes versicolor*, με σκοπό την δημιουργία φιλμ το οποίο εμφάνισε αυξημένη αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων (Božič M. et. al., 2012). Επίσης, η συγκεκριμένη λακκάση έχει χρησιμοποιηθεί για τη τροποποίηση της χιτοζάνης με γαλλικό και καφεϊκό οξύ με σκοπό την δημιουργία φιλμ χιτοζάνης με αυξημένη αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *Escherichia coli* και *Listeria monocytogenes*, με εφαρμογές στη βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων (Božič M, et. al., 2012).



**Εικόνα 6:** Τροποποίηση της χιτοζάνης με φαινολικές ενώσεις μέσω της δράσης της λακκάσης από το μικροοργανισμό *Myceliophthora thermophyla*.

### 1.3.1.2. Εφαρμογές της χιτοζάνης και των παραγώγων της

Η χιτοζάνη έχει αξιοποιηθεί ευρύτατα στον τομέα της Βιοϊατρικής, της Φαρμακευτικής και σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων της. Στην φαρμακευτική τεχνολογία χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο ως μέσο μεταφοράς φαρμάκων και εν γένει βιοδραστικών ουσιών με σκοπό την ελεγχόμενη απελευθέρωση τους. Συγκεκριμένα, η χιτοζάνη έχει τη δυνατότητα να λειτουργεί ως ένας εξαιρετικός φορέας φαρμάκων καθώς είναι βιοσυμβατή, μη τοξική και έχει τη ικανότητα να αποσυντίθεται από τη λυσοζύμη στο ανθρώπινο σώμα και να απορροφάται πλήρως από τον ιστό. Τα φάρμακα μπορούν να συνδυαστούν με τη χιτοζάνη σχηματίζοντας μικροσφαίρες, δισκία, μικροκάψουλες ή φιλμ παρατεταμένης απελευθέρωσης. Για παράδειγμα, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης που αξιοποιήθηκαν ως φορείς του φαρμάκου δοξορουβικίνη για την αποτελεσματική θεραπεία συμπαγών όγκων. Η επιλεκτική στόχευση και η σταθερή και συνεχής κυκλοφορία του φαρμάκου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των τοξικών παρενεργειών (B.Q. Liu et. al. 2019). Μία άλλη μελέτη αναφέρεται στη δημιουργία νανοσωματιδίων χιτοζάνης για την αξιοποίηση τους ως φορείς της βιοδραστικής ένωσης φερουλικό οξύ, όπου μελετήθηκε η αντικαρκινική τους δράση έναντι της ME-180 κυτταρικής σειράς του ανθρώπου για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Panwar Richa et. al., 2016).

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αξιοποίηση της χιτοζάνης ως υλικό για την επούλωση πληγών, η οποία αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία και είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί η μόλυνση του τραύματος. Η χιτοζάνη επιτρέπει την προσκόλληση των κυττάρων σ' αυτή λόγω του υψηλού θετικού φορτίου στην επιφάνειάς της, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη θρόμβωση και τη πήξη του αίματος. Επιπλέον, στην επιφάνεια του φιλμ χιτοζάνης υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες, οι οποίες μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο με τις όξινες ομάδες των κυττάρων του αίματος (Wang, W. et al. 2020). Οι μεμβράνες χιτοζάνης χαρακτηρίζονται από ελεγχόμενη απώλεια νερού, εξαιρετική διαπερατότητα και επιπλέον παρεμποδίζουν τη διείσδυση μικροοργανισμών. Έχει δειχθεί ότι με αυτό τον τρόπο η διαδικασία επούλωσης των πληγών επιταχύνεται κατά 30 τοις εκατό (Rinaudo Marguerite, 2006), αποτρέποντας τη δημιουργία ουλών καθώς σχηματίζεται ένα προστατευτικό κάλυμμα στην πληγή (Prashanth, K.V. Harish, 2007). Μια έρευνα έδειξε ότι η τροποποιημένη με γουανιδίνη χιτοζάνη μείωσε σημαντικά το χρόνο πήξης του αίματος και είχε αιμοστατικές ιδιότητες (X. Yao et. al., 2017), ενώ μία άλλη μελέτη αναφέρεται στο σχηματισμό υδρογέλης αποτελούμενη από χιτοζάνη και πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) για την αποκατάσταση του πάχους του επιθηλίου του κερατοειδούς έπειτα από σοβαρή βλάβη (Yueh Chien, et. al., 2012). Επιπλέον, η εφαρμογή της

χιτοζάνης επεκτείνεται και στον τομέα των εγκαυμάτων διότι σχηματίζει βιοσυμβατά και απορροφητικά φιλμ όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 7**, τα οποία τοποθετούνται πάνω στο έγκαυμα. Σε αντίθεση με άλλα κοινά επιθέματα που χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά, η χιτοζάνη δε χρειάζεται να αφαιρεθεί μετά την επούλωση καθώς βιοδιασπάται και απορροφάται από το δέρμα (Rinaudo Marguerite, 2006). Λόγω των κοινών χαρακτηριστικών των μεμβρανών χιτοζάνης με τις γλυκάνες, είναι δυνατό να γίνει πάνω τους σύνθεση νέου ιστού καθώς αποτελούν υποκατάστατο για την αντικατάσταση του δέρματος σε πλαστικές επεμβάσεις.



Εικόνα 7: Φιλμ χιτοζάνης για τοποθέτηση σε εγκαύματα.

Η χιτοζάνη είναι ένας ασφαλής και μη τοξικός πολυσακχαρίτης, συμβατός με τους ανθρώπινους ιστούς και το αίμα, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ικρίωμα αναγέννησης ιστού ικανό να δρα ως κυτταρικός μεταφορέας, αποτρέποντας ανοσολογικές αντιδράσεις και φλεγμονές. Η χιτοζάνη χαρακτηρίζεται όχι μόνο από αντιμικροβιακή και αιμοστατική δράση, αλλά και από σημαντική βιολογική δράση, η οποία προάγει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυττάρων και την επισκευή ιστών. Στο σώμα, η χιτοζάνη παραμένει σχετικά σταθερή, δεν «παραμορφώνεται» εύκολα και μπορεί να απορροφηθεί από τον οργανισμό εξαιτίας της δράσης της λυσοζύμης. Επιπλέον, τα φιλμ χιτοζάνης έχουν την ικανότητα να κατακρατούν την υγρασία, επιτρέπουν την αναπνοή και χαρακτηρίζονται από αντοχή και ανθεκτικότητα. Τα παραγόμενα προϊόντα χιτοζάνης μπορούν εύκολα να κατασκευαστούν στο επιθυμητό σχήμα έτσι ώστε να είναι κατάλληλα για τη στήριξη και την αναγέννηση ιστών (Prabaharan M. et. al., 2009 & Sivashankari P.R, et. al., 2016). Ως εκ τούτου, η χιτοζάνη αποτελεί κατάλληλο υλικό για το σχηματισμό ικριώματος με εφαρμογή στη μηχανική ιστών δέρματος, χόνδρων, κερατοειδούς, αιμοφόρων αγγείων και ήπατος. Μία σχετική έρευνα αναφέρεται στη δημιουργία ενός πολυμερούς χιτοζάνης και πολυγαλακτικού οξέος μέσω της δράσης της παγκρεατικής λιπάσης χοίρου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως ικρίωμα για μηχανική ιστών (Zeng Q.H et. al., 2012). Επίσης, έχουν σχηματιστεί και άλλα πολυμερή χιτοζάνης γι' αυτό το σκοπό, όπως το πολυμερές χιτοζάνης-γλυκολικού/φλορετικού οξέος που θα μπορούσε



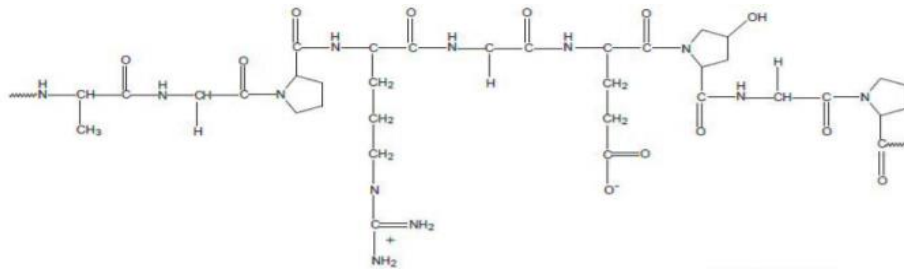
να χρησιμοποιηθεί για την αναγέννηση του χόνδρου, το πολυμερές χιτοζάνης -3- (p587 υδροξυφαινυλ) προπιονικού οξέος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη μηχανική ιστών και την μεταφορά φαρμάκων και το πολυμερές χιτοζάνης-υδροξυφαινυλοπιονικού οξέος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για μηχανική ιστών μεγάλου πάχους (Jin R. et. al., 2009, Sakai S., et. al. 2009, Chen Z.P., et. al., 2013).

Ένας άλλος τομέας που έχει εκμεταλλευτεί τις ιδιότητες της χιτοζάνης είναι η βιομηχανία τροφίμων, όπου η χιτοζάνη έχει αξιοποιηθεί ως γαλακτωματοποιητής, συντηρητικό τροφίμων και διατροφικό συμπλήρωμα. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αποθήκευση και συσκευασία τροφίμων λόγω της μυκητοστατικής και βακτηριοστατικής της δράσης (Aljawish, I. et. al., 2012 & Božič, M et. al., 2012). Μία άλλη κατηγορία προϊόντων που εκμεταλλεύεται τις ιδιότητες της χιτοζάνης είναι τα καλλυντικά σκευάσματα. Η χιτοζάνη είναι συμβατή με πολλά ενεργά συστατικά των καλλυντικών και έχει τη δυνατότητα απορρόφησης της επιβλαβούς ακτινοβολίας. Έχει αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες εξαιτίας των οποίων χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία καλλυντικών. Συγκεκριμένα, οι εφαρμογές της σχετίζονται με την προστασία των μαλλιών, του δέρματος και του στόματος. Η χιτοζάνη δημιουργεί ένα ελαστικό φιλμ πάνω στα αρνητικά φορτισμένα μαλλιά λόγω του θετικού φορτίου της, βελτιώνοντας έτσι την απαλότητα και την αντοχή τους. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται σε διάφορα καλλυντικά προϊόντα όπως σαμπουάν, βαφές, λοσιόν κ.α. Επίσης, είναι φιλική προς το δέρμα καθώς το ενυδατώνει και λόγω του υψηλού μοριακού της βάρους δε μπορεί να το διαπεράσει. Επιπλέον, η χιτοζάνη έχει αξιοποιηθεί ως συστατικό σε κρέμες, σε προϊόντα καθαρισμού, κραγιόν κ.α (Rinaudo, Marguerite, 2006).

### **1.3.2. Ζελατίνη**

Το κολλαγόνο, η πρόδρομος ένωση της ζελατίνης, είναι η κύρια πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού των ζώων (Pati et al., 2010). Το κολλαγόνο είναι μία ινώδης πρωτεΐνη που αποτελείται από 3 πολυπεπτιδικές α-αλυσίδες που ενώνονται μεταξύ τους προς σχηματισμό μίας τριπλής έλικας (Schrieber & Gareis, 2007, Senaratne et al., 2006). Οι αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ γειτονικών ομάδων -CO και -NH αλλά και από ομοιοπολικούς δεσμούς. Η δομή αυτή χαρακτηρίζεται από τη παρουσία μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας τριών αμινοξέων, Gly-X-Y, όπου X και Y μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ, αλλά συνήθως το X είναι προλίνη (Pro) και το Y, υδρόξυ-προλίνη (HyPro) (Burjanadze, 2000). Κατά τη θέρμανση του κολλαγόνου (σε θερμοκρασία περίπου

40°C) οι δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν την ελικοειδή διάταξη του, σπάνε, οδηγώντας στο σχηματισμό υδατοδιαλυτού κολλαγόνου, δηλαδή ζελατίνης. Επομένως, η ζελατίνη είναι το υδατοδιαλυτό μίγμα πρωτεϊνών και πεπτιδίων που προκύπτει από τη μερική υδρόλυση του κολλαγόνου (**Εικόνα 8**). Γενικά, η ζελατίνη μπορεί να παραχθεί από την όξινη, αλκαλική ή ενζυμική υδρόλυση του κολλαγόνου. Τα παρασκευάσματα ζελατίνης δεν είναι "καθαρά" από χημικής απόψεως καθώς περιέχουν νερό, άλατα και ενδεχομένως μικρές ποσότητες σακχάρων αλλά και άλλων μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών (Schrieber & Gareis, 2007). Η χημική σύσταση της ζελατίνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πρώτη ύλη καθώς και τη μέθοδο που εφαρμόζεται για την παραγωγή της (Jongjareonprak et al., 2006, Cheow et al. 2007, Rahman et al. 2008). Όλες οι βιομηχανικές διεργασίες παραγωγής ζελατίνης γίνονται από δέρμα ψαριών, κόκκαλα, δέρμα βοοειδών και χοίρων με μετέπειτα καθαρισμό, συμπύκνωση και διεργασίες ξήρανσης.



**Εικόνα 8:** Απεικόνιση χημικής δομής της ζελατίνης.

Η ζελατίνη κατά την προσθήκη ψυχρού νερού διογκώνεται λόγω της πρόσληψης του. Αυτό συμβαίνει διότι τα μόρια της ζελατίνης συνδέονται μεταξύ τους μέσω δισθενών δεσμών για να σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο πλέγμα και το νερό συγκροτείται και ακινητοποιείται εντός του πλέγματος. Σε ξηρή μορφή η ζελατίνη αποτελείται από 98-99% w/w σε πρωτεΐνη. Το μέγιστο μοριακό βάρος της ζελατίνης βρίσκεται μεταξύ 20.000 έως 250.000 Da. Λόγω της πρωτεϊνικής της φύσης, η αλληλουχία αμινοξέων της ζελατίνης καθορίζει τις λειτουργικές της ιδιότητες (Muyonga et al. 2004). Έχει αναφερθεί ότι όλα τα αμινοξέα που υπάρχουν στις πρωτεΐνες των τροφίμων υπάρχουν στη ζελατίνη, με εξαίρεση την τρυπτοφάνη και την κυστεΐνη. Επιπλέον, η περιεκτικότητα της ζελατίνης σε μεθειονίνη και τυροσίνη είναι χαμηλή, ενώ η γλυκίνη είναι το κύριο αμινοξύ και αντιπροσωπεύει περί το 33% του συνόλου των αμινοξέων.

### 1.3.2.1. Ενζυμική τροποποίηση ζελατίνης

Η ζελατίνη, πέραν του χαμηλού κόστους, διαθέτει πληθώρα λειτουργικών ομάδων, γεγονός που ενισχύει την τροποποίηση της και την επακόλουθη αξιοποίηση της σε ένα ευρύ φάσμα βιοϊατρικών εφαρμογών. Οξειδωαναγωγικά ένζυμα, όπως η λακκάση, η τυροσινάση και η υπεροξειδάση, έχουν την ικανότητα να προάγουν ενδομοριακές αντιδράσεις σύζευξης μεταξύ βιοπολυμερών και φυσικών φαινολικών. Συγκεκριμένα, οι λακκάσες μπορούν να μετατρέπουν τις φαινολικές ενώσεις σε ηλεκτρονιόφιλες κινόνες, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν περαιτέρω με πυρηνόφιλα μόρια, όπως οι αμινομάδες της ζελατίνης. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί που δημιουργούνται μπορεί να είναι προσθήκης κατά Michael ή βάσης Schiff (Rocasalbas, G., et. al., 2013). Συγκεκριμένα, μία μελέτη αναφέρεται στο σχηματισμό ενός υβριδικού βιοπολυμερούς ζελατίνης/χιτοζάνης το οποίο τροποποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης της λακκάσης από το μικροοργανισμό *Trametes sp.* με μίγμα φαινολικών ενώσεων, όπως τανίνες και μικρές προανθοκυανιδίνες. Με αυτό το τρόπο παρασκευάστηκε ένα βιοδραστικό υλικό που αξιοποιήθηκε για τη θεραπεία χρόνιων πληγών, εμφάνισε αντιβακτηριακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* και ανασταλτική δράση έναντι της μυελοϋπεροξειδάσης, της κολλαγενάσης και των ROS (Rocasalbas, G., et. al., 2013). Επίσης, μία άλλη μελέτη αναφέρεται στην ενζυμική τροποποίηση της ζελατίνης με το φλαβονοειδές κατεχίνη, που είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αντιοξειδωτικής της δράσης έναντι των ριζών υπεροξειδίου και ενισχυμένη ανασταλτική δράση στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας του ανθρώπου (Chung, J. E., et. al., 2003).

### 1.3.2.2. Εφαρμογές ζελατίνης και των παραγώγων της.

Το κολλαγόνο και η ζελατίνη αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα βιοϋλικών που ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των πρωτεϊνών, επομένως χαρακτηρίζονται από εξαιρετική βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητα. Το κολλαγόνο και η ζελατίνη είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα βιοϋλικά πρωτεϊνικής φύσης στην μηχανική ιστών για την παραγωγή ικριωμάτων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι διαθέτουν βιοενεργές περιοχές που επιτρέπουν την αλληλεπίδραση του εκάστοτε ικριώματος με την περιοχή του ιστού στην οποία εμφυτεύονται (Soon Mo Choi, et. al. 2018, Alexandra L. Rutz & Ramille N. Shah, 2016).

Η ζελατίνη ακόμη και μετά την υδρόλυση της διατηρεί σημαντικές ακολουθίες αμινοξέων όπως τις σειρές κυτταρικής προσκόλλησης (RGD) και αποικοδόμησης (MPP) διατηρώντας τις ιδιότητες του κολλαγόνου (Alexandra L. Rutz & Ramille N. Shah, 2016). Επίσης λόγω του

αυξημένου πορώδους δικτύου της αξιοποιείται στη μηχανική ιστών είτε ως βασική μήτρα είτε συνδυαστικά με άλλα βιοϋλικά για την κατασκευή ικριωμάτων. Η ζελατίνη σχηματίζει μία υποστηρικτική επιφάνεια με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό και επιτρέπει τη μετακίνηση θρεπτικών συστατικών μέσω των πόρων της (Choi, Y. R. et. al., 2018). Μία έρευνα αναφέρεται στη παρασκευή υδρογέλης ζελατίνης/λαμινίνης με τη βοήθεια μιας μικροβιακής τρανσγλουταμινάσης, η οποία αξιοποιήθηκε στη νευρομυϊκή μηχανική ιστών για την ενσωμάτωση διαφόρων τύπων κυττάρων σε αυτή (Besser, R, et. al., 2019).

Ωστόσο, η αξιοποίηση της ζελατίνης σε αυτό το τομέα εμφανίζει κάποιους περιορισμούς λόγω έλλειψης γνώσης αναφορικά με τις ακριβείς μηχανικές ιδιότητες της όταν βρίσκεται σε φυσιολογικές συνθήκες διαλύματος και θερμοκρασίας (περίπου 37°C) (επίδραση της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας, χρόνος ζωής, μηχανική αντοχή). Σε αντίθεση με το κολλαγόνο που έχει μορφή διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου και άνω, το διάλυμα ζελατίνης αποκτά μορφή πηγματος σε θερμοκρασίες περίπου 35°C και κάτω. Το τελευταίο αποδίδεται στην αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου της ζελατίνης, από τυχαία σπειροειδή, σε ελικοειδή μορφή, που οδηγεί σε οργάνωση των πολυμερικών αλυσίδων της σε ένα τριδιάστατο δίκτυο. Επιπλέον, δεν είναι γνωστές οι διαφορετικές συμπεριφορές μεταξύ των διάφορων τύπων ζελατίνης υπό φυσιολογικές συνθήκες.

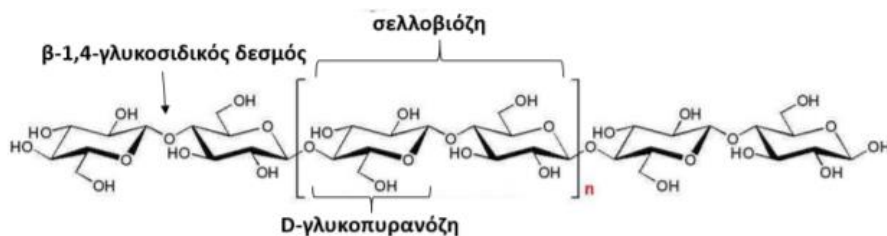
Η ζελατίνη πέρα από την αξιοποίηση της για τη πρόσφυση και την ανάπτυξη κυττάρων έχει αξιοποιηθεί ευρύτατα και σε άλλους τομείς της Βιοϊατρικής όπως στη σύνθεση φαρμάκων ως συνδετικό μέσο, σε εμβόλια ως σταθεροποιητής, ως γέλη για κάψουλες και αλοιφές, ως διαστολέας πλάσματος στην εντατική θεραπεία και ως αιμοστατική μήτρα σε χειρουργική επέμβαση κρανιακής και σπονδυλικής στήλης για να εξασφαλιστεί επαρκής αιμόσταση. Όσον αφορά τη νανοϊατρική, τα συστήματα σωματιδίων ζελατίνης έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη διανομή φαρμάκων και στη γονιδιακή θεραπεία. Έχουν αναπτυχθεί τέτοια νανοσωματίδια μεταφοράς φαρμάκων για όλες σχεδόν τις οδούς χορήγησης όπως από του στόματος, ρινική, ενδοφλέβια, οφθαλμική, διαδερμική και παρεντερική. Η ζελατίνη χοίρου έχει εφαρμοστεί για τη σταθεροποίηση μακρομορίων και σε συστήματα αποδέσμευσης παράδοσης αυξητικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, μια μελέτη αναφέρεται στη τροποποίηση της ζελατίνης με τυραμίνη μέσω της δράσης της υπεροξειδάσης του χρένου για τη παρασκευή ικριωμάτων για τη μεταφορά βλαστικών κυττάρων και αυξητικών παραγόντων (Linh, N. T. B., et. al., 2017). Τέλος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ζελατίνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την επούλωση πληγών καθώς μπορεί να λειτουργήσει ως ανταγωνιστικό υπόστρωμα για αρκετά πρωτεολυτικά

ένζυμα που υπάρχουν στη θέση του τραύματος παρεμποδίζοντας την ανεξέλεγκτη αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας (Rocasalbas, G, et. al., 2013).

### 1.3.3. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων, αφού καταλαμβάνει το 35-50% του ξηρού βάρους των φυτών. Η περιεκτικότητά της μπορεί να ποικίλλει στα διάφορα φυτά, εφόσον στο ξύλο αποτελεί το 50% του ξηρού του βάρους, ενώ οι ίνες βαμβακιού είναι σχεδόν καθαρή κυτταρίνη. Στην πραγματικότητα το μισό του συνολικού οργανικού άνθρακα στον έμβιο κόσμο περιέχεται στην κυτταρίνη, γεγονός που την κάνει να είναι η πιο άφθονη γνωστή οργανική ένωση (Raven P., 2013). Η κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από μονομερή *D*-γλυκοπυρανόζης ενωμένα με  $\beta$ -1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς (Εικόνα 9). Κάθε κατάλοιπο γλυκόζης έχει περιστραφεί κατά  $180^\circ$  σε σχέση με το γειτονικό του, οπότε ως βασική μονάδα του πολυμερούς μπορεί να θεωρηθεί η κελλοβιόζη, η οποία είναι ένας δισακχαρίτης αποτελούμενος από δύο μόρια γλυκοπυρανόζης (Lynd et al., 2002).

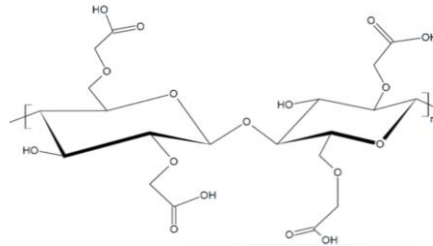
Η κυτταρίνη είναι ένα βιοσυμβατό πολυμερές χαμηλού κόστους που χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδική επιφάνεια, έχει εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες και χημική σταθερότητα, ιδιότητες που την καθιστούν εύκολα επεξεργάσιμη. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών καθίστανται κατάλληλη για βιοϊατρικές εφαρμογές όπως επούλωση πληγών, μηχανική ιστών, τρισδιάστατη εκτύπωση, παρασκευή ιατρικών εμφυτευμάτων και φορέων φαρμάκων (Joseph Blessy, et. al.,2020)



Εικόνα 9: Απεικόνιση δομής κυτταρίνης.

Η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) αποτελεί το ανιονικό υδατοδιαλυτό παράγωγο της κυτταρίνης και λαμβάνεται από την καρβοξυμεθυλίωση της. Όσον αφορά τη χημική της δομή, οι ομάδες  $-\text{CH}_2\text{OH}$  των μορίων γλυκόζης που εμφανίζονται στο μόριο της κυτταρίνης έχουν

αντικατασταθεί από ομάδες  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{COOH}$  στη καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, με αποτέλεσμα την αλλαγή των ιδιοτήτων του πολυμερούς (**Εικόνα 10**). Η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη χαρακτηρίζεται από υψηλό ιξώδες, τη δυνατότητα σχηματισμού τζελ, ενώ επίσης είναι μη τοξική και θεωρείται υποαλλεργική, καθώς η κύρια πηγή της είναι είτε πολτός από μαλακό ξύλο είτε βαμβάκι. Επομένως, είναι ένα ασφαλές πολυμερές που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων ως τροποποιητής ιξώδους ή πυκνωτικό και για τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων σε διάφορα προϊόντα (Javanbakht Siamak & Shaabani, Ahmad, 2019). Επίσης, χρησιμοποιείται στη βιομηχανία καλλυντικών ως συστατικό σε κρέμες, λοσιόν, σαμπουάν, προϊόντα περιποίησης μαλλιών αλλά και για την παρασκευή πηκτωμάτων με εφαρμογή στον καθαρισμό δοντιών. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ευρέως στην φαρμακευτική βιομηχανία ως φορέας φαρμάκων και άλλων δραστικών ενώσεων, όπως αντικαρκινικών φαρμάκων, πεπτιδίων και προβιοτικών (Javanbakht Siamak & Shaabani, Ahmad, 2019).



**Εικόνα 10:** Απεικόνιση δομής καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης.

### 1.3.3.1. Ενζυμική τροποποίηση κυτταρίνης

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες που στοχεύουν στην τροποποίηση της κυτταρίνης με πλήθος ενώσεων με σκοπό την βελτίωση των ιδιοτήτων της. Το ερευνητικό ενδιαφέρον τελευταία στρέφεται στη τροποποίηση της μέσω ενζυμικών μεθόδων λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας των ενζύμων αλλά και για την αποφυγή της χρήσης τοξικών αντιδραστηρίων. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κυρίως γι' αυτό το σκοπό είναι οι λακκάσες κυρίως από τους μικροοργανισμούς *Trametes versicolor*, *Trametes villosa* και *Trametes hirsute*. Επίσης, έχουν αξιοποιηθεί διαφορετικοί τύποι κυτταρίνης ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή. Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα αποτελεί η ενζυμική τροποποίηση της βακτηριακής κυτταρίνης με το πολυ(3-υδροξυβουτυρικό) οξύ. Αυτή η τροποποίηση είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή των ιδιοτήτων της κυτταρίνης όπως την αύξηση της φυσικής και μηχανικής της αντοχής και θερμοανθεκτικότητας. Επίσης, λόγω της βιοσυμβατότητας και της βιοαποικοδομησιμότητας που εμφανίζει θεωρείται κατάλληλο βιοϋλικό για τη κατασκευή βιοαισθητήρων, τη μεταφορά

φαρμάκων αλλά και τη μηχανική ιστών (Iqbal H. M. N., et. al., 2014). Επίσης, σε μία άλλη έρευνα η αιθυλο-κυτταρίνη ενζυμικά τροποποιημένη με πολυ(3-υδροξυβουτυρικό) οξύ και λακκάση αξιοποιήθηκε σε ένα μετέπειτα βήμα για τη πρόσδεση των φαινολικών ενώσεων γαλλικό οξύ και θυμόλη στην επιφάνεια της. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτά τα βιοπολυμερή εμφάνισαν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων *B. subtilis* NCTC 3610 και *S. aureus* NCTC 6571 και των αρνητικών κατά Gram στελεχών *E. coli* NTCT 10418 και *P. aeruginosa* NCTC 10662. Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε ότι είχαν την ικανότητα να υποστηρίξουν και να διατηρήσουν την διαφοροποίηση ανθρώπινων κερατινοκυττάρων κυττάρων του δέρματος *in vitro*. Επομένως, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε εφαρμογές βιοϊατρικού τύπου, όπως αναγέννηση δέρματος, η μηχανική ιστών και σε ιατρικά εμφυτεύματα (Iqbal H. M. N., et. al., 2015). Μία άλλη έρευνα αναφέρεται στην τροποποίηση της κυτταρίνης με βιοδραστικές ενώσεις όπως είναι το καφεϊκό οξύ, το *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ, η ντοπαμίνη, η ευγενόλη, η ισο-ευγενόλη και η θυμόλη μέσω της δράσης της λακκάσης από το μικροοργανισμό *Trametes pubescens* για τη παρασκευή προϊόντων με υψηλή αντιβακτηριακή δράση (Elegir G, et. al., 2008). Επίσης, έχει αναφερθεί η χρήση και άλλων ενζύμων για τη τροποποίηση της κυτταρίνης και την αξιοποίηση της σε βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα η χρήση της γαλακτοσιδάσης από το μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae* για τη τροποποίηση της υδροξυαιθυλοκυτταρίνης (HEC) με γαλακτόζη. Το τροποποιημένο πολυμερές εφαρμόστηκε στη μηχανική ιστών για την προσκόλληση ηπατοκυττάρων (Li, J., Cheng et. al., 1999).

### **1.3.3.2. Εφαρμογές κυτταρίνης και των παραγώγων της**

Αρκετές μελέτες εστιάζουν στην ανάπτυξη βιοϊατρικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από κυτταρίνη καθώς είναι βιοσυμβατή, μη τοξική και αποτελεί φθηνή πρώτη ύλη όντας το πιο άφθονο πολυμερές στη γη. Η κυτταρίνη μπορεί να εφαρμοστεί στην επούλωση πληγών, τη μηχανική ιστών, τη τρισιδιάστατη εκτύπωση, ως φορέας φαρμάκων καθώς και στη κατασκευή ιατρικών εμφυτευμάτων. (Blessy Joseph, et. al., 2020)

Η επούλωση πληγών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί αποτελεσματικές θεραπείες για την αναγέννηση του ιστού. Για το σκοπό αυτό έχουν παρασκευαστεί υλικά από πολυμερείς μήτρες κυτταρίνης στις οποίες έχουν ενσωματωθεί αντιμικροβιακές ενώσεις για την προστασία και θεραπεία πληγών. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί η ενσωμάτωση των φαινολικών ενώσεων γαλλικό οξύ και θυμόλη σε ενζυμικά τροποποιημένη με πολύ (3-υδροξυβουτυρικό) οξύ αιθυλο-

κυτταρίνη για την αξιοποίηση της στην αναγέννηση δέρματος και την επούλωση πληγών. Αυτά τα βιοϋλικά παρουσίασαν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων *B. subtilis* NCTC 3610 και *S. aureus* NCTC 6571 και των αρνητικών κατά Gram στελεχών *E. coli* NTCT 10418 και *P. aeruginosa* NCTC 10662. Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε ότι είχαν την ικανότητα να υποστηρίξουν και να διατηρήσουν την διαφοροποίηση ανθρώπινων κερατινοκυττάρων του δέρματος *in vitro* (Iqbal H. M. N., et. al., 2015). Μία άλλη έρευνα αναφέρεται στο σχηματισμό ενός υβριδικού πολυμερούς αποτελούμενο από οξειδωμένη βακτηριακή κυτταρίνη, χιτοζάνη και κολλαγόνο το οποίο εμφάνισε εξαιρετικές ιδιότητες όπως βελτιωμένη μηχανική αντοχή, *in vivo* βιοαποικοδόμηση, αντιμικροβιακή δράση, *in vivo* αιμοστατική δράση, ικανότητα πήξης του αίματος, βελτιωμένη πρόσφυση ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων και εξαιρετικά γρήγορη διακοπή της αιμορραγίας. Ως εκ τούτου το υβριδικό πολυμερές μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική επούλωση των πληγών και ως ένας προπηκτικός και αιμοστατικός παράγοντας για τον έλεγχο της εσωτερικής αιμορραγίας (Yuan et al. 2020). Τα τελευταία χρόνια έχουν κατασκευαστεί και άλλα υβριδικά πολυμερή κυτταρίνης που έχουν συνδυαστεί με διάφορα βιοπολυμερή όπως για παράδειγμα ζελατίνη και χιτοζάνη. Αυτά τα υβριδικά υλικά έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων καθώς μπορούν να παραχθούν προϊόντα που συνδυάζουν τις ιδιότητες των εκάστοτε βιοπολυμερών καθιστώντας τα κατάλληλα για ένα ευρύ φάσμα βιοϊατρικών εφαρμογών.

Στο πεδίο της αναγεννητικής ιατρικής και της μηχανικής ιστών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η πρόσφατα αναπτυγμένη τεχνική εκτύπωσης 3D. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την layer by layer εκτύπωση διαφορετικών βιοπολυμερών όπως πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών για τη σύνθεση τρισδιάστατων νανοδομών. Η κυτταρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως υπόστρωμα είτε ως συστατικό μελανιού (substrate or ink constituent). Έχουν διεξαχθεί μελέτες σχετικά με την κατασκευή νανοςύνθετου κυτταρίνης με τη μέθοδο εκτύπωσης 3D, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επίδεσμος για την υποβοήθηση της διαδικασίας επούλωσης τραυμάτων. Στην ίδια μελέτη, στον επίδεσμο έχει ενσωματωθεί ηλεκτρόδιο τυπωμένο με μελάνι από ασήμι για να καταγράφει τη θερμοκρασία του τραύματος (Sultan and Mathew, 2019).

Ένα άλλο πεδίο στο οποίο έχει αξιοποιηθεί η κυτταρίνη είναι η διαδερμική χορήγηση φαρμάκων καθώς αποτρέπει την εξάτμιση της υγρασίας, εμποδίζει την μόλυνση και διατηρεί στενή επαφή με την εκτεθειμένη, φλεγμονώδη ή νοσούσα περιοχή. Μία σχετική έρευνα αφορά τη παρασκευή μεμβρανών βακτηριακής κυτταρίνης εμβαπτισμένη σε χλωριούχο βενζαλκόνιο (benzalkonium chloride), το οποίο έχει αντιμικροβιακή δράση. Αυτή η μεμβράνη εφαρμόστηκε



σε μολυσμένη πληγή από τους μικροοργανισμούς *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis* και η επίδραση του φαρμάκου διήρκεσε τουλάχιστον 24 ώρες (Wei B et al, 2011).

## **2. Βιοδραστικές ενώσεις**

### **2.1. Αξιοποίηση βιοδραστικών ενώσεων στη Βιοϊατρική**

Τα φυσικά προϊόντα χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα στην παραδοσιακή ιατρική και οι ιδιότητες τους οφείλονται στην παρουσία των δευτερογενών μεταβολιτών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν μία σημαντική πηγή βιοδραστικών ενώσεων που συμβάλλουν στην ανθρώπινη υγεία και διατροφή. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες σχετίζονται με τη ρύθμιση του μεταβολισμού των φυτών, τη προστασία αυτών από παθογόνους μικροοργανισμούς, την προστασία από επιβλαβείς παράγοντες, όπως είναι η ακτινοβολία, η θερμοκρασία, η ξηρασία, η αλατότητα και άλλους παράγοντες πίεσης που προκαλούν τη δημιουργία και συσσώρευση ελεύθερων ριζών στα φυτικά κύτταρα. Ωστόσο, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης έχουν την ικανότητα να συμβάλλουν και στην υγεία ενός ατόμου που τις καταναλώνει μέσω της διατροφής του. Οι φαινολικές ενώσεις είναι αναπόσπαστο μέρος της διατροφής του ανθρώπου και είναι γνωστό ότι υπάρχουν περισσότερες από 8.000 φαινολικές δομές οι οποίες μπορούν να είναι είτε απλά μόρια είτε σύνθετα. Οι φαινολικές ενώσεις είναι ιδιαίτερα ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία, εντούτοις αποτελούν σοβαρούς περιβαλλοντικούς ρύπους όταν διατίθενται σε μεγάλες ποσότητες στο περιβάλλον. Επομένως, είναι απαραίτητη η απομάκρυνση αυτών των ενώσεων από το περιβάλλον και η αξιοποίηση τους σε βιομηχανίες φαρμακευτικών προϊόντων, τροφίμων και καλλυντικών.

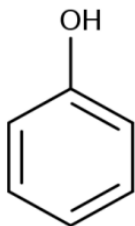
Οι ευεργετικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων οφείλονται στην ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση. Οι φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να διακόπτουν ή να αναστέλλουν την οξειδωση μέσω ελεύθερων ριζών είτε γιατί αντιδρούν με αυτές και τις εξουδετερώνουν, είτε γιατί δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα Fe, Cu, Zn, Na, Al, τα οποία ως εκκινητές οξειδωσης δημιουργούν χημικά σύμπλοκα. Το αποτέλεσμα είναι οι φαινολικές ενώσεις να προστατεύουν τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, κυρίως την LDL, από την οξειδωση αποτρέποντας την ανάπτυξη αθηρογένεσης και δυσλειτουργίας των κυττάρων. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική τους δομή. Για παράδειγμα, ο βαθμός υδροξυλίωσης επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα της ένωσης, καθώς όσο περισσότερες ομάδες υδροξυλίου διαθέτει μία φαινολική ένωση τόσο πιο ισχυρή είναι η αντιοξειδωτική της δράση. Επίσης, η παρουσία σακχάρου στο μόριο της φαινολικής ένωσης

παρεμποδίζει την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Οι ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών αποτελούν τις πιο δραστικές φαινολικές ενώσεις καθώς είναι καλοί δέκτες υδροξυλικών και υπεροξυλικών ριζών (Afanas, et al., 1989).

Πολλές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν σημαντική αντικαρκινική δράση καθώς εμπλέκονται σε μηχανισμούς που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση και πολλαπλασιασμό. Οξειδωτικές αντιδράσεις όπως η δημιουργία ενεργών ριζών οξυγόνου, όπως υδροξυλίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου παίζουν καθοριστικό ρόλο στη καρκινογένεση. Οι φαινολικές ενώσεις παρεμποδίζουν τις οξειδωτικές αυτές αντιδράσεις, προστατεύοντας το DNA από τις επιβλαβείς τους συνέπειες με αποτέλεσμα να αποτρέπουν την εμφάνιση καρκίνου. Επίσης, μερικά φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν ένζυμα του κυτοχρώματος P450 που προάγουν την ενεργοποίηση καρκινογόνων παραγόντων, όπως πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και ετεροκυκλικές αμίνες. Επίσης, επιδρούν στη πέψη μακροπρόθεσμων συστατικών ενώ οι φαινολικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και υψηλού βαθμού υδροξυλίωσης έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν και να καταβυθίζουν πρωτεΐνες. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι οι φαινολικές ενώσεις μπορούν επίσης να αναστείλουν ή να επάγουν τη δράση πολλών ενζύμων που εμπλέκονται σε σημαντικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (αντιαλλεργική δράση), την αποτοξίνωση και την απόκριση στη φλεγμονή. (Shahidi, F., & Ambigaipalan, P., 2015).

## 2.2. Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι συστατικά που έχουν μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες συνδεδεμένες άμεσα σε έναν αρωματικό δακτύλιο (**Εικόνα 11**). Μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης, προσθήκης ή πολυμερισμού του βασικού αρωματικού δακτυλίου προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός παραγώγων που μπορούν να κυμαίνονται από απλά μόρια, όπως φαινολικά οξέα, έως πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες (Buckanan, B., et. al., 2000). Οι φαινολικές ενώσεις τείνουν να είναι υδατοδιαλυτές, δεδομένου ότι εμφανίζονται πολύ συχνά συνδεδεμένες με σάκχαρα ως γλυκοζίτες. Τα συνδεδεμένα σάκχαρα μπορούν να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτες. Το πιο κοινό υπόλειμμα σακχάρου είναι η γλυκόζη, ωστόσο μπορεί να βρεθούν συνδεδεμένα και με άλλα σάκχαρα όπως γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, καθώς και με τα γλυκουρονικά και γαλακτουρονικά οξέα. Συνδέσεις με άλλες ενώσεις, όπως καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια, καθώς και συνδέσεις με άλλες φαινόλες είναι επίσης κοινές (Laura Bravo, 1998).



Εικόνα 11: Βασική δομή φαινόλης.

### 2.2.1. Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων

Παρά τα κοινά τους χαρακτηριστικά οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τη χημική τους δομή αλλά και τις ιδιότητες τους. Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται ανάλογα με την πηγή προέλευσης τους, τη βιολογική τους λειτουργία και τη χημική τους δομή στις εξής κύριες κατηγορίες (Taiz & Zeiger, 2006):

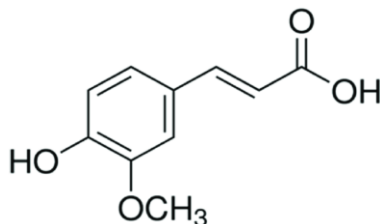
- Φαινολικά οξέα: Αποτελούν μία ομάδα οργανικών οξέων που έχουν τουλάχιστον μία καρβοξυλομάδα και ένα φαινολικό υδροξύλιο. Βιοσυνθετικά προέρχονται από την οδό του σικιμικού οξέος και διακρίνονται στα παράγωγα του βενζοϊκού (C6-C1) και του κινναμωμικού οξέος (C6-C3) ανάλογα με το δομικό τους σκελετό.
- Φλαβονοειδή: Η συνήθης δομή τους είναι αυτή των διφαινυλοπροπανίων (C6-C3-C6) και αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους μέσω τριών ατόμων άνθρακα. Χωρίζονται σε κατηγορίες όπως είναι: φλαβονόλες, φλαβονονόλες, φλαβόνες, φλαβανόλες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και ισοφλαβόνες.
- Κουμαρίνες: Πρόκειται για βενζολικά μόρια με δύο γειτονικά άτομα υδρογόνου, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί αντικατάσταση από μία λακτονοειδή αλυσίδα, σχηματίζοντας ένα δεύτερο εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο ο οποίος μοιράζεται δύο άνθρακες με το βενζολικό δακτύλιο. Απαντώνται σε ανώτερα φυτά αλλά και σε μικροοργανισμούς ως δευτερογενείς μεταβολίτες.

- Στιλβένια: Αποτελούν μικρή ομάδα φαινυλοπροπανοειδών, η βάση της δομής τους είναι το 1,2 διφαινυλοαιθυλένιο και περιέχουν έναν cis ή trans διπλό δεσμό, ο οποίος είναι υποκατεστημένος με φαινύλια και στα δύο άτομα άνθρακα του διπλού δεσμού. Η ένωση αυτής της κατηγορίας που έχει μελετηθεί εκτενώς για τις βιολογικές της δράσεις είναι η ρεσβερατρόλη καθώς και ο γλυκοζίτης της.
- Λιγνάνες: Πρόκειται για φαινολικές ενώσεις παραγόμενες από φαινυλαλανίνη διαμέσου διμερίωσης υποκατεστημένων κινναμικών αλκοολών σε ένα διβένζυλο-βουτανικό σκελετό. Αποτελούν μία πολυπληθή ομάδα φυσικώς προκύπτων πολυφαινολών που παράγονται από τη βιοσυνθετική οδό του σικιμικού οξέος.
- Ταννίνες: περιλαμβάνουν μια ομάδα ενώσεων με μια μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους. Είναι υδροξυλιωμένα μόρια που μπορούν να σχηματίσουν αδιάλυτα σύμπλοκα με υδατάνθρακες και πρωτεΐνες (Gulcin, İ., 2020).

### 2.2.1.1.Φερουλικό οξύ

#### 2.2.1.1.1.Γενικά χαρακτηριστικά

Το φερουλικό οξύ ή 4-υδρόξυ-3-μεθοξυκινναμωμικό οξύ κατατάσσεται στη κατηγορία των υδροξυκινναμικών οξέων και συναντάται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων (**Εικόνα 2**). Το φερουλικό οξύ είναι ένα μεθοξυ-παράγωγο του καφεϊκού οξέος και προσδίδει σταθερότητα και αντοχή στα φυτικά κύτταρα ενώ αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση δραστικών αρωματικών ενώσεων (Shahadi, 2004). Συναντάται σε φυτά όπως το μπρόκολο, το σπανάκι, το λάχανο, οι πατάτες, τα καρότα, οι ντομάτες, καθώς και σε άλλα βότανα και φρούτα (Zhao & Moghadasian, 2008).



**Εικόνα 12:** Χημική δομή φερουλικού οξέος.

### 2.2.1.1.2. Βιοδραστική λειτουργία

Το φερουλικό οξύ έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων καθώς σχετίζεται με ευεργετικές δράσεις για την ανθρώπινη υγεία, οι οποίες οφείλονται στην υψηλή αντιοξειδωτική του δράση. Η αντιοξειδωτική δράση του φερουλικού οξέος αποδίδεται στις 3-μεθοξυ- και 4-υδροξυλ- ομάδες που είναι συνδεδεμένες στο βενζολικό δακτύλιο και έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και να οδηγούν στο σχηματισμό μιας ενδιάμεσης φαινοξυλ-ρίζας τερματίζοντας την αλυσιδωτή αντίδραση ελεύθερων ριζών (Kanski, Aksenova, Stoyanova, & Butterfield, 2002). Η παρουσία καρβοξυλομάδων με ακόρεστους διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα σταθεροποιεί την ενδιάμεση φαινοξυλ- ρίζα και αποτελεί επιπρόσθετη θέση επίθεσης για ελεύθερες ρίζες. Το φερουλικό οξύ έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου, προστατεύοντας τα κύτταρα από τις βλαπτικές επιδράσεις της οξειδωτικής καταπόνησης.

Το φερουλικό οξύ στον ανθρώπινο οργανισμό προστατεύει το DNA και τα λιπίδια από την οξειδωση που προκαλούν οι δραστικές μορφές οξυγόνου και με αυτό τον τρόπο δρα ευεργετικά στην πρόληψη και θεραπεία παραγόντων που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες όπως το Alzheimer, ο διαβήτης, διάφορες μορφές καρκίνου, η υπέρταση, η αθηρωμάτωση και οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Ozaki.Y., 1992). Μία μελέτη αναφέρεται στη μείωση του σχηματισμού ελευθέρων ριζών με ταυτόχρονη αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων δισμουτάση σουπεροξειδίου, καταλάση και υπεροξειδάση γλουταθειόνης σε διαβητικούς αρουραίους που τους χορηγήθηκε φερουλικό οξύ (Ohsaki, Shirakawa, Koseki, & Komai, 2008). Σε μία άλλη έρευνα αναφέρεται ότι η χορήγηση φερουλικού οξέος σε διαβητικούς αρουραίους βελτίωσε την ανοχή στη γλυκόζη και τη δράση των γλυκολυτικών ενζύμων όπως η α-γλυκοσιδάση και η α-αμυλάση, ενώ παρατηρήθηκε ταυτόχρονη μείωση της δραστηριότητας των ηπατικών ενζύμων (αλκαλική φωσφατάση, γλουταμυλ-τρανσφεράση, αμινο-τρανσφεράση της αλανίνης και ασπαρτική αμινοτρανσφεράση) (Rukkumani, Aruna, Varma, & Menon, 2004; Yeh & Yen, 2006). Οι Jung, Kim, Hwang και Ha (2007) ανέφεραν την αναστολή ενζύμων της γλυκονοεογένεσης και την αναστροφή της οξειδωτική βλάβης προωθώντας την ανάκτηση και προστασία των παγκρεατικών κυττάρων. Επίσης, τα άλατα νατρίου του φερουλικού οξέος ανέστειλαν τον σχηματισμό θρόμβου και τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων (Wang, Ouyang, & Liu, 2004). Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η χορήγηση φερουλικού οξέος σε ποντικούς είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης και της απολιποπρωτεΐνης Β στους ιστούς του πλάσματος και του λιπώδους ιστού χωρίς σχηματισμό πλακών στην αορτή (Kwon et al., 2010) και ότι το φερουλικό οξύ έχει κατασταλτική επίδραση στην παραγωγή της

ιντερλευκίνης-8, έχοντας αντιφλεγμονώδη απόκριση (Ohsaki et al., 2008). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το φερουλικό οξύ παρεμποδίζει την φωτοξείδωση του λινελαϊκού οξέος και μπορεί να λειτουργήσει ως παράγοντας φωτοπροστασίας του δέρματος. (Ozaki.Y., 1992).

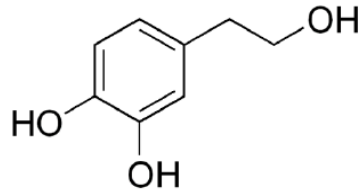
Το φερουλικό οξύ συνδέεται επίσης με την ομοιόσταση και το κυτταρικό στρες. Μία έρευνα αναφέρεται στην αναστολή της έκφρασης ενζύμων όπως της συνθάσης νιτρικού αζώτου, κασπασών και κυκλοοξυγενάσων-2 (Kim et al., 2011; Suzuki, Kagawa, & Fujii, 2002). *In vivo* πειράματα σε ποντικούς έδειξαν ότι το φερουλικό οξύ έχει ανασταλτική δράση έναντι στο καρκίνο του παχέος εντέρου (Hudson, Dinh, Kokubun, Simmonds, & Gescher, 2000). Επίσης, όσον αφορά τη νόσο Alzheimer, η χορήγηση φερουλικού οξέος είχε ως αποτέλεσμα την αντίσταση στην τοξικότητα που προκαλείται από Αβ1-42 στον εγκέφαλο βοηθώντας στη καταπολέμηση της νόσου (Calabrese, Mancuso, & Sapienza, 2007). Επίσης, έχει αναφερθεί ο συνδυασμός του φερουλικού οξέος με άλλες βιοδραστικές ενώσεις για την αποτελεσματική αντιμετώπιση ασθενειών. Ένα παράδειγμα αναφέρεται στην επίδραση του φερουλικού οξέος και των παραγώγων του οκτυλικού εστέρα στο καταρράκτη των αποπτωτικών πρωτεϊνών (κυκλοοξυγενάση (COX) και κασπάσες) όπου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης νεοπλασιών και την αναστολή καρκινικών κυττάρων στο στήθος, τους πνεύμονες, το κόλον και το κεντρικό νευρικό σύστημα. (Cione, Tucci, & Senatore, 2008, Jayaprakasam et al., 2006).

### **2.2.1.2. Υδροξυτυροσόλη**

#### **2.2.1.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά**

Η υδροξυτυροσόλη ή αλλιώς 2-(3-4 διυδροξυφαινυλ)αιθανόλη είναι από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά που προέρχονται από τη φύση (**Εικόνα 13**). Η υδροξυτυροσόλη εμπεριέχεται στο λάδι και το κρασί, είναι σταθερή στην ελεύθερη μορφή της και διαπερνά εύκολα τους ιστούς. Η υδροξυτυροσόλη, συναντάται στο καρπό και τα φύλλα της ελιάς (*Olea europaea* L.) και είναι ένα από τα κύρια συστατικά του παρθένου ελαιολάδου, των λυμάτων ελαιοτριβείων και του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς. Η περιεκτικότητα της ένωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα του λαδιού. Οι ποσότητες κυμαίνονται από 14 mg/kg (στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο) μέχρι <2 mg/kg. Η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, ως οξικό παράγωγο ή ως μέρος (σεκοϊριδοειδές παράγωγο) πιο πολύπλοκων ενώσεων όπως η ελαιασίνη, η ελευρωπαΐνη και η βερμπασκοσίδη. Η ελευρωπαΐνη είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση των ελιών, η οποία μειώνεται καθώς ο καρπός ωριμάζει, όπου η ελευρωπαΐνη μετατρέπεται σε μη γλυκοζυλιωμένη μορφή, το άγλυκο, και με ενζυμική υδρόλυση τελικά μετατρέπεται σε

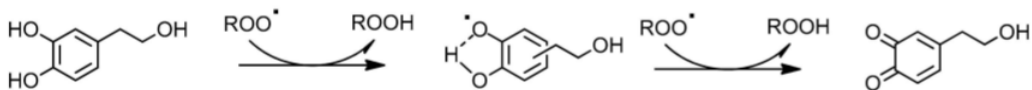
υδροξυτυροσόλη, η οποία αποτελεί δείκτη ωρίμανσης των ελιών. Η υδροξυτυροσόλη, έχει σημείο τήξης γύρω στους 55°C και είναι αρκετά διαλυτή σε νερό και πολικούς οργανικούς διαλύτες όπως αλκοόλες χαμηλού μοριακού βάρους. Όπως και άλλες πολυφαινόλες, οξειδώνεται εύκολα σε υδατικά διαλύματα. (Vilaplana-Perez, C., 2014, Bertelli M. et al. 2020).



**Εικόνα 13:** Η χημική δομή της υδροξυτυροσόλης.

#### 2.2.1.2.2. Βιοδραστική λειτουργία

Η υδροξυτυροσόλη ασκεί ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως καρδιοπροστατευτικών, αντικαρκινικών, νευροπροστατευτικών, αντιμικροβιακών, ενδοκρινικών και άλλων. Η μεγάλη ποικιλία των βιολογικών δράσεων της υδροξυτυροσόλης συσχετίζεται με την ισχυρή αντιοξειδωτική της δράση καθώς δρα ως δεσμευτής ελεύθερων ριζών και ως χηλικός παράγοντας μετάλλων. Η υψηλή αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα της αποδίδεται στην ορθο-διφαινολική δομή της. Η δράση της έγκειται κυρίως στο γεγονός ότι διακόπτει την αλυσίδα με το να δίνει ένα άτομο υδρογόνου σε περόξυ-ρίζες (ROO\*), οι οποίες καθίστανται μη δραστικές λόγω της παρουσίας ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου στη φαινολική ρίζα (**Εικόνα 14**). Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η υδροξυτυροσόλη μπορεί να προσφέρει πρόσθετη αντιοξειδωτική προστασία αυξάνοντας το ενδογενές αμυντικό σύστημα ενάντια στο οξειδωτικό στρες, ενεργοποιώντας διαφορετικά κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. (Marković Karković A. et al. 2019).



**Εικόνα 14:** Μηχανισμός δέσμευσης ελεύθερων ριζών της υδροξυτυροσόλης (Marković Karković A. et al. 2019).

Επιπλέον, η υδροξυτυροσώλη έχει σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση. Μελέτες *in vitro* και *in vivo* δείχνουν την εξασθένηση των προ-φλεγμονωδών παραγόντων που προκαλούν την έκφραση της συνθετάσης του νιτρικού οξέος (iNOS), της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και της ιντερλευκίνης (IL), την αναστολή ενεργοποίησης κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων από την υδροξυτυροσώλη. (Markovici Karkovici A. et al. 2019).

Έχει προταθεί ότι η υδροξυτυροσώλη είναι αποτελεσματική για τη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης. Η υδροξυτυροσώλη είναι πολύ αποτελεσματική στο να αποτρέπει την υπεροξείδωση των λιπιδίων και στο να προστατεύει την LDL από την οξείδωση που είναι ένα από τα βασικά βήματα στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης (Markovici Karkovici A. et al. 2019). Επιπροσθέτως, όσον αφορά την καρδιοπροστατευτική της δράση, έχει διαπιστωθεί ότι η υδροξυτυροσώλη εμποδίζει την οξείδωση της κακής χοληστερόλης και βελτιώνει το προφίλ των λιπιδίων. Επίσης, έχει δειχθεί ότι έχει ωφέλιμη επίδραση στην λειτουργία των αιμοπεταλίων και επιβεβαιώνεται η ικανότητα της να εμποδίζει τη συσσώρευση των τους *in vitro* (Visioli F. et al 2009).

Κατά την τελευταία δεκαετία, ένας μεγάλος αριθμός *in vitro* και *in vivo* μελετών έχουν δείξει ότι η υδροξυτυροσώλη έχει σημαντικά αντικαρκινικά αποτελέσματα έναντι διαφόρων τύπων κακοήθων κυττάρων, με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Μεγάλο μέρος της έρευνας επικεντρώθηκε στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ο τρίτος πιο συχνός καρκίνος παγκοσμίως. Πολλές μελέτες αναφέρουν διαφορετικούς αντι-πολλαπλασιαστικούς και προ-αποπτωτικούς μηχανισμούς της υδροξυτυροσώλης ανάλογα με τον τύπο του καρκινικού κυττάρου. Μέχρι σήμερα, τα ευεργετικά αντικαρκινικά αποτελέσματα της υδροξυτυροσώλης έχουν διερευνηθεί στο καρκίνο του ορθού, του μαστού, της ουροδόχου κύστης, του αίματος, του γαστρικού, του ήπατος, του δέρματος, του προστάτη, του τραχήλου της μήτρας, του εγκεφάλου και του πνεύμονα, που υποδηλώνει την πιθανή ευρεία εφαρμογή της στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου.

Οι νευροπροστατευτικές επιδράσεις της υδροξυτυροσώλης μελετήθηκαν *in vitro* και *ex vivo* με διαφορετικές στρατηγικές, μερικές από αυτές χρησιμοποίησαν χημικώς επαγόμενη νευροτοξικότητα ή βασίστηκαν στις βιοχημικές αλλοιώσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας υποξίας-επανοξυγόνωσης. Στον εγκέφαλο, η συσσώρευση της υδροξυτυροσώλης προκάλεσε νευροπροστατευτική δράση με την μείωση του οξειδωτικού στρες σε νευρωνικό επίπεδο. Μια από τις κύριες νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία και έχει μελετηθεί η δράση της υδροξυτυροσώλης είναι η νόσος του Alzheimer. Επίσης, η



υδροξυτυροσόλη είναι μια υποσχόμενη ένωση για τη φαρμακευτική αγωγή της νόσου του Parkinson, καθώς αναστέλλει την ενζυμική και αυθόρμητη οξειδωση της ενδογενούς ντοπαμίνης, μετριάζει την αύξηση της αυθόρμητης οξειδωσης κατά τη διάρκεια της αναστολής της MAO, έχει προστατευτική επίδραση έναντι της ντοπαμίνης και της 6-υδροξυντοπαμίνης (6-OHDA) και εξουδετερώνει την τοξικότητα που επάγεται από την α-συνουκλείνη.

Η υδροξυτυροσόλη έχει υπογλυκαιμική δράση σε διάφορα διαβητικά ζωϊκά μοντέλα επηρεάζοντας τις σημαντικές βιοχημικές διεργασίες που οδηγούν σε διαβητική αγγειοπάθεια. Σε ένα ζωϊκό μοντέλο, η υδροξυτυροσόλη έδειξε ότι θα μπορούσε να αποτρέψει αποτελεσματικά τη διαβητική νευροπάθεια. Αποδείχθηκε ότι βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και αποκαθιστά την σωστή σηματοδότηση της. Επίσης η υδροξυτυροσόλη παίζει σημαντικό ρόλο στη παχυσαρκία, καθώς αναστέλλει τη λιπογένεση, και τη de novo σύνθεση των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης χωρίς να επηρεάζει τη κυτταρική βιωσιμότητα ενώ παράλληλα αναστέλλει το μεταβολισμό του λινολεϊκού οξέος, της ρετινόλης, των σφιγγολιπιδίων και του αραχιδονικού οξέος.

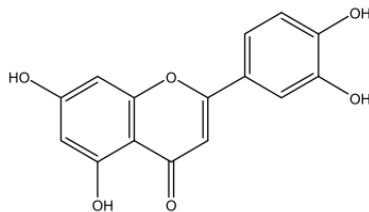
Η υδροξυτυροσόλη έχει μελετηθεί για τις *in vitro* αντιμικροβιακές ιδιότητες της έναντι μολυσματικών παραγόντων της αναπνευστικής και γαστρεντερικής οδού όπως *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* ή *Moraxella catarrhalis*, σε χαμηλές ανασταλτικές συγκεντρώσεις, καθώς και κατά ωφέλιμων μικροοργανισμών όπως *Lactobacillus acidophilus* και *Lactobacillus acidophilus Bifidobacterium bifidum* και σε παθογόνα των τροφίμων όπως *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Yersinia*. Επίσης, η υδροξυτυροσόλη έχει δράση έναντι του βακτηρίου *Propionibacterium acnes* και έναντι μυκοπλασμάτων όπως το *Mycoplasma pneumoniae*. Επιπροσθέτως, η υδροξυτυροσόλη αναγνωρίστηκε ως μια μοναδική κατηγορία αναστολέων του HIV-1 που εμποδίζουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο-ξενιστή και τη δέσμευση της καταλυτικής του θέσης (Marković Karković A. et al. 2019).

### 2.2.1.3. Λουτεολίνη

#### 2.2.1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Η λουτεολίνη ή 3',4',5,7-τετραϋδροξυ-φλαβόνη είναι μία πολυφαινολική ένωση που ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών, τα οποία συναντώνται εκτενώς σε πολλά είδη φυτών (**Εικόνα 15**). Από χημική άποψη, ο βασικός σκελετός της λουτεολίνης αποτελείται από 15 άτομα

άνθρακα που συγκροτούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους και έναν μη αρωματικό (περιέχει οξυγόνο με διπλό δεσμό C2-C3). Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία υδροξυλίου στους άνθρακες 5', 7', 3' και 4' και η παρουσία του διπλού δεσμού C2-C3 στο μόριο της ευθύνονται για τις πολλαπλές φαρμακολογικές της επιδράσεις. Πρόκειται για μία ένωση με εξαιρετικά ωφέλιμες ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία, ενώ φυτά πλούσια σε λουτεολίνη έχουν χρησιμοποιηθεί στην κινεζική παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία ασθενειών όπως η υπέρταση, οι φλεγμονώδεις διαταραχές και ο καρκίνος (Nabavi, S. F., et. al., 2015). Η λουτεολίνη, η οποία βρίσκεται φυσικά σε γλυκοζυλιωμένη μορφή, είναι ένα από τα πιο κοινά φλαβονοειδή που υπάρχουν στα βρώσιμα φυτά, καθώς συναντάται σε καρότα, πιπεριές, σέλινο, ελαιόλαδο, μέντα, θυμάρι, δεντρολίβανο, ρίγανη, μαρούλι, ρόδι, αγκινάρα, τη κάπαρη και το αγγούρι. Επίσης, έχει εντοπιστεί στο λεμόνι, τα παντζάρια, το λάχανο, το κουνουπίδι, το θυμάρι, το σέλινο, το μάραθο, το μαϊντανό, το σπανάκι και το πράσινο τσάι (Nabavi, S. F., et. al., 2015). Η λουτεολίνη που έχει απομονωθεί από το αρωματικό ανθοφόρο φυτό *Salvia tomentosa* Mill. (*Lamiaceae*), ευρέως διαδεδομένο στις περιοχές της Μεσογείου, έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για την αντιμετώπιση των κοιλιακών πόνων και για την επούλωση πληγών (Ulubelen, Miski, Neuman, & Mabry, 1979). Επίσης, η λουτεολίνη που έχει απομονωθεί από τους σπόρους του *Senna petersiana* (Bolle) Lock έχει αντιβακτηριακή δράση έναντι θετικών κατά gram βακτηρίων (Tshikalange, Meyer, & Hussein, 2005).



**Εικόνα 15:** Χημική δομή λουτεολίνης.

### 2.2.1.3.2.Βιοδραστική λειτουργία

Η λουτεολίνη και κάποια γλυκοσίδια της μελετώνται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής τους δράσης. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της λουτεολίνης προστατεύει τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες το οποίο μπορεί να προκαλέσει διάφορες διαταραχές όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, αθηροσκλήρωση, υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη, νευροεγκεφαλίστικές παθήσεις (Νόσος Alzheimer και νόσος Parkinson), ρευματοειδή αρθρίτιδα,

γήρανση και καρκίνο. Η αντιοξειδωτική της δράση είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη δομή της. Η παρουσία μιας ομάδας κατεχόλης στο β-δακτύλιο και η παρουσία διπλού δεσμού C2-C3 σε σύζευξη με μια οξο-ομάδα στον άνθρακα στη θέση 4' ευθύνονται για την ικανότητα της λουτεολίνης να δεσμεύει ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου και να προάγει τη χηλίωση μετάλλων που μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη μέσω της αντίδρασης Fenton, να αναστέλλει προοξειδωτικά ένζυμα, και να επάγει αντιοξειδωτικά ένζυμα. Η αντιοξειδωτική δράση της λουτεολίνης έχει παρατηρηθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Lopez-Lazaro, M., 2009). Η λουτεολίνη παρουσιάζει επίσης σημαντική αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία οφείλεται στην ικανότητα της να αναστέλλει τη δράση του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ. Ο NF-κΒ προάγει την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών και ενζύμων, όπως για παράδειγμα των TNF, IL-1, IL-6, IL8, COX-2, iNOS και η αναστολή της δράσης τους από τη λουτεολίνη μπορεί να προστατεύσει τον οργανισμό από τις επιβλαβείς συνέπειες της φλεγμονής (Lopez-Lazaro, M., 2009).

Από πολλές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η λουτεολίνη και τα παράγωγα της έχουν αντιβακτηριακή, αντική και αντιμυκητιακή δράση. Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι η λουτεολίνη και γενικά τα φλαβονοειδή έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι πολλών μικροοργανισμών όπως των *Eshesichia Coli*, *Streptococcus Mutans*, *Staphylococcus aureus*. Η δράση αυτή πιθανόν οφείλεται στην ικανότητα τους να δημιουργούν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και να παρεμποδίζουν έτσι τη δράση ενζύμων και πρωτεϊνών-μεταφορέων. Σε μία έρευνα αξιολογήθηκε η επίδραση της λουτεολίνης στη πορεία οξείας λοίμωξης από *Chlamydia pneumoniae in vivo* και η ανάλυση του ιστού από τον πνεύμονα έδειξε ότι η λουτεολίνη κατέστειλε την ανάπτυξη των βακτηρίων και μείωσε τη φλεγμονή (Tormakangas et al., 2005). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η λουτεολίνη είναι αποτελεσματική έναντι ιικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα έναντι του ιού του απλού έρπητα (HSV) και του ιού της γρίπης (Mucsi et. al., 1992). Οι Liu et al. διερεύνησαν την χημική σύσταση και την αντική δράση του *Elsholtzia rugulosa*, ένα κοινό κινέζικο βότανο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του κρυολογήματος και του πυρετού. Η μελέτη έδειξε ότι είχε υψηλή περιεκτικότητα σε λουτεολίνη και σε αυτό οφείλεται η αποτελεσματική του δράση έναντι του ιού της γρίπης (Liu, A.L., et. al., 2008). Η λουτεολίνη έχει επίσης δράση έναντι πολλών παρασίτων, συμπεριλαμβανομένων των *Leishmania donovani* και *Plasmodium falciparum*. Η αντιεϊσμανιακή δράση της λουτεολίνης έχει παρατηρηθεί σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις και φαίνεται ότι προκαλείται από την αναστολή της τοποϊσομεράσης II (Mitra, B., et. al., 2000, Tasdemir, D., et. al., 2006).

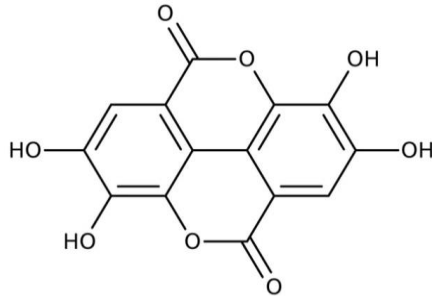
Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η λουτεολίνη θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως συμπληρωματικό φάρμακο για την πρόληψη και τη θεραπεία διαφορετικών τύπων καρκίνου, όπως του μαστού, του παγκρέατος και του πνεύμονα μεταξύ άλλων. Η ασφάλεια χορήγησης της λόγω της φυσικής της προέλευσης έναντι ενός συνθετικού φαρμάκου αλλά και το χαμηλό της κόστος καθώς μπορεί να απομονωθεί από πληθώρα φυσικών πηγών, την καθιστούν μία πολλά υποσχόμενη ένωση για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Συγκεκριμένα, η λουτεολίνη εμποδίζει την εξέλιξη της καρκινογένεσης, δηλαδή το μετασχηματισμό των κυττάρων, τη μετάσταση και την αγγειογένεση μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Η λουτεολίνη προάγει την καταστολή των κινασών, ρυθμίζει το κυτταρικό κύκλο, επάγει την απόπτωση και συμβάλλει στη μείωση των μεταγραφικών παραγόντων. Η απόπτωση σχετίζεται με τις αντικαρκινικές ιδιότητες της λουτεολίνης, που περιλαμβάνουν βλάβες στο DNA και τη ρύθμιση της δράσης των πρωτεϊνικών κινασών των καρκινικών κυττάρων που έχουν ως αποτέλεσμα τη καταστολή του πολλαπλασιασμού τους. Σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του στομάχου, του προστάτη και του μελανώματος, η λουτεολίνη προάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια της φάσης G1 που σχετίζεται με την καταστολή της δραστηριότητας της κινάσης CDK2 στον καρκίνο του παχέος εντέρου HT-29 και στα κύτταρα OCM-1 του μελανώματος (Imran, M., et. al., 2019).

#### **2.2.1.4. Ελλαγικό οξύ**

##### **2.2.1.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά**

Το ελλαγικό οξύ (2,3,7,8-tetrahydroxy-chromeno[5,4,3-cde]chromene-5,10-dione, C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>) είναι ένα διμερές παράγωγο του γαλλικού οξέος, ανήκει στην ομάδα των υδρόξυ-βενζοϊκών οξέων και απαντάται σε πολλές ταξινομικά διαφορετικές ομάδες φυτών, κυρίως μεταξύ των ευδικοτυλήδων. Το ελλαγικό οξύ παράγεται στα φυτά κυρίως μέσω της υδρόλυσης ελλαγιταννινών, μιας ευρέως διαδεδομένης ομάδας φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών. Το ελλαγικό οξύ αποτελείται από τέσσερις δακτυλίους που αντιπροσωπεύουν τη λιπόφιλη περιοχή και τέσσερις φαινολικές ομάδες και δύο λακτόνες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν την υδρόφιλη περιοχή που λειτουργεί ως δέκτης ηλεκτρονίων (**Εικόνα 16**) (Derosa, G., et. al., 2016). Το ελλαγικό οξύ συναντάται σε ορισμένα φρούτα, ξηρούς καρπούς και σπόρους, όπως ρόδια, σμέουρα, φράουλες, καρύδια και αμύγδαλα, ροδάκινα και κρασί. Το ελλαγικό οξύ είναι ένα θερμοσταθερό μόριο με σημείο τήξης 350°C, το οποίο είναι σχεδόν αδιάλυτο στο νερό και ελάχιστα διαλυτό σε αλκοόλη. Στα φυτικά κύτταρα, το ελλαγικό οξύ βρίσκεται σε ελεύθερη ή

ομοιοπολικά συνδεδεμένη μορφή, υπό μορφή γλυκοσιδίων και ελλαγιταννίνων, που το καθένα έχει διαφορετική χημική δράση, διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα (Sharifi-Rad Javad, et. al., 2022). Επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι η πρόσληψη τροφών πλούσιων σε ελλαγικό οξύ έχει προστατευτικό ρόλο έναντι ορισμένων χρόνιων ασθενειών, ωστόσο τα *in vitro* αποτελέσματα συχνά δεν συνάδουν με τις *in vivo* μελέτες. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του ελλαγικού οξέος (Landete, J. M., 2011).



Εικόνα 16: Χημική δομή του ελλαγικού οξέος.

#### 2.2.1.4.2. Βιοδραστική λειτουργία

Τις τελευταίες δεκαετίες, το ελλαγικό οξύ έχει προσελκύει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους και αντιπολλαπλασιαστικής δράσης του και των θεραπευτικών του δυνατοτήτων για την αντιμετώπιση πολλών ανθρώπινων ασθενειών. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι το ελλαγικό οξύ μπορεί εμπλέκεται στη ρύθμιση ενός ευρέος φάσματος οδών κυτταρικής σηματοδότησης για την πρόληψη ή την παρεμπόδιση της εξέλιξης χρόνιων διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών, νευροεκφυλιστικών ασθενειών, του διαβήτη, και του καρκίνου. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι αυτή η ένωση παρουσιάζει ηπατοπροστατευτική, νεφροπροστατευτική, καρδιοπροστατευτική, αντιαθηροσκληρωτική και αντιαλλεργική δράση (Sharifi-Rad Javad, et. al., 2022).

Πολλές μελέτες έχουν προτείνει ότι η βιολογική δράση του ελλαγικού οξέος σχετίζεται άμεσα με την αντιοξειδωτική του δράση, μέσω της οποίας αποφεύγονται οι αρνητικές επιδράσεις των ROS που δημιουργούνται κατά τον κυτταρικό μεταβολισμό (Vattem, D. A., & Shetty K., 2005). Η αντιοξειδωτική δράση του ελλαγικού οξέος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική του δομή. Η παρουσία αρκετών υδροξυλομάδων σε όρθο θέση ευθύνεται για την ισχυρή ικανότητα του να δίνει ένα άτομο υδρογόνου και να «υποστηρίζει» το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα του ελλαγικού οξέος μειώνεται όταν είναι συνδεδεμένο με

σάκχαρο. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του ελλαγιικού οξέος σχετίζεται με τη ρύθμιση όπως έκφρασης γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων, όπως του NFκB, AP1 και cfos που εμπλέκονται σε διάφορες οδούς παραγωγής ROS. Άλλες μελέτες έχουν επίσης προτείνει ότι το ελλαγιικό οξύ μπορεί να βοηθήσει στην αναγέννηση αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως η γλουταθειόνη (GSH), να ενεργοποιήσει ένζυμα όπως την τρανσφεράση της γκουταθειόνης (GST), να αναστείλει την τοποϊσομεράση του DNA, να συμβάλει στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και να ενεργοποιήσει αποπτωτικές οδούς για την αντιμετώπιση του καρκίνου και άλλων χρόνιων ασθενειών (Vattem, D. A., & Shetty K., 2005).

Το ελλαγιικό οξύ έχει επίσης μελετηθεί για τις αντιδιαβητικές του ιδιότητες καθώς δρα στα β-κύτταρα του παγκρέατος διεγείροντας την έκκριση ινσουλίνης. Μία μελέτη που αναφέρεται στη θεραπεία διαβητικών αρουραίων με το εκχύλισμα *Embllica officinalis*, το οποίο είναι πλούσιο σε ελλαγιικό οξύ, αναφέρει ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της γλυκόζης στο αίμα και αύξηση της ινσουλίνης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επίσης, στη μελέτη αναφέρθηκε ότι το ελλαγιικό οξύ πιθανά να οδήγησε και σε αύξηση του μεγέθους αλλά και του αριθμού των β-κυττάρων (Derosa, G., et. al., 2016).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το ελλαγιικό οξύ έχει σημαντική αντικαρκινική δράση έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου όπως του δέρματος, του οισοφάγου και του παχέος εντέρου. Το ελλαγιικό οξύ προάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα να προκαλεί απόπτωση και συμβάλλει στη προστασία του DNA αποτρέποντας τη γονιδιωματική αστάθεια που μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου (Umesalma S & Sudhandiran G., 2011). Για παράδειγμα, στον καρκίνο του εντέρου, το ελλαγιικό οξύ παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων προκαλώντας απόπτωση μέσω της μιτοχονδριακής οδού στα κύτταρα Caco-2, χωρίς να παρεμβαίνει στο φυσιολογικά κύτταρα (Larrosa M, et. al., 2006). Μία άλλη μελέτη αναφέρεται στην ικανότητα του ελλαγιικού οξέος να αποτρέπει τη δράση του PI3K/Akt που, με τη σειρά του, ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της ενδογενούς αποπτωτικής οδού (Umesalma S & Sudhandiran G., 2011). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι το ελλαγιικό οξύ προάγει την έκφραση και η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 που οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του κυτοχρώματος c και τελικά σε κυτταρικό θάνατο (Larrosa M, et. al., 2006).

## 2.4. Εκχυλίσματα από φυσικές πηγές

Από την αρχαιότητα, είναι γνωστό ότι τα φυτά αποτελούν πλούσια πηγή ενώσεων με ποικίλες βιολογικές δράσεις για τον ανθρώπινο οργανισμό. Η εκχύλιση είναι ένα από τα πιο σημαντικά βήματα στην επεξεργασία των φαρμακευτικών φυτών για την ανάλυση και την ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων. Περίπου τα τρία τέταρτα του παγκόσμιου πληθυσμού βασίζονται στη χρήση συγκεκριμένων φυτικών εκχυλισμάτων για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων. Τα φυσικά εκχυλίσματα είναι πολύπλοκα μείγματα χημικών ουσιών με βιολογικές ιδιότητες που προέρχονται κυρίως από τα φύλλα, τα στελέχη, τους καρπούς ή τις ρίζες των φυτών. Η εκχύλιση είναι μια διαδικασία διαχωρισμού που επιτυγχάνεται μέσω της κατανομής της αναλυόμενης ουσίας μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων. Τα εκχυλίσματα αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή βιοδραστικών συστατικών και έχουν ποικίλες ευεργετικές δράσεις για τον ανθρώπινο οργανισμό. Μεταξύ των βιολογικών δράσεων που παρουσιάζουν είναι η αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή, αντικαρκινική, αντιμυκητιακή, υπογλυκαιμική και αντιυπερτασική δράση. (Armendáriz-Barragán, B., et. al., 2016). Τα εκχυλίσματα από φυσικές πηγές χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες για τη θεραπεία διάφορων παθήσεων και μια ποικιλία δερματολογικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων των φλεγμονών, της ψωρίασης, της ατοπικής δερματίτιδας και της αλωπεκίας. Σήμερα, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που δείχνουν ότι τα φυτά διαθέτουν ένα τεράστιο πλήθος φυτοχημικών συστατικών που ανταποκρίνονται σε κλινικές και φαρμακολογικές δοκιμές, ωστόσο είναι απαραίτητη η επιλογή των κατάλληλων μεθόδων εκχύλισης για την αύξηση της απόδοσης των βιοδραστικών συστατικών στα εκχυλίσματα (Rahmanian, N., et. al., 2015 ).

### 2.4.1. Εκχύλισμα φύλλων ελιάς

#### 2.4.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Η ελιά (*Olea europaea*) είναι δέντρο αειθαλές, που ανήκει στην οικογένεια *oleacea* και πρωτοεμφανίστηκε στην ανατολική μεσόγειο, όπου καλλιεργείται για περισσότερα από 7000 χρόνια. Ο Αριστοτέλης μετέτρεψε την καλλιέργεια του ελαιόδεντρου σε επιστήμη. Εν συνεχεία ο Σόλων νομοθέτησε την προστασία του δέντρου, ενώ ο Όμηρος ονόμασε το λάδι ως το χρυσό υγρό. Στη σημερινή εποχή περισσότερα από 8 εκατομμύρια εκτάρια ελαιόδεντρων καλλιεργούνται παγκοσμίως και σχεδόν το 98% από αυτά βρίσκονται στη λεκάνη της Μεσογείου. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις θεραπευτικές ιδιότητες του ελαιόδεντρου και την αξιοποίησή του για την αντιμετώπιση πολλών νοσημάτων. Η πρώτη φαρμακευτική

αξιοποίηση του ελαιόδενδρου ήταν το 1854 όπου το εκχύλισμα φύλλων ελιάς συνέβαλε στη θεραπεία του πυρετού και της ελονοσίας. Στην Ιατρική χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της υπέρτασης, του διαβήτη και των ρευματικών παθήσεων, ενώ καταπραΰνει μυϊκούς πόνους και πόνους αρθρώσεων (Talhaoui, N., et. al., 2015).

Από την άλλη πλευρά, τα φύλλα ελιάς που προέρχονται τόσο από την επεξεργασία των ελιών όσο και από τη διαδικασία του κλαδέματος θεωρούνται απόβλητα του αγροβιομηχανικού τομέα. Επομένως, τα φύλλα ελιάς αποτελούν μια φθινή πρώτη ύλη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια πηγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η χημική σύσταση των φύλλων ελιάς ποικίλλει καθώς εξαρτάται από παράγοντες όπως η ποικιλία της ελιάς, οι κλιματικές συνθήκες, η ηλικία του δέντρου, οι γεωργικές διεργασίες αλλά και ο βιολογικός κύκλος της ελιάς. Τα φύλλα αποτελούν πλούσια πηγή ενώσεων όπως η ελευρωπαΐνη, η βερμπασκοσίδη, η ρουτίνη, η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη που εμφανίζουν σημαντική βιολογική δράση (Rahmanian, N., et. al., 2015). Το συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στα φύλλα ελιάς είναι η ελευρωπαΐνη, η οποία με ενζυμική ή χημική υδρόλυση παράγει υδροξυτυροσόλη, ελενολικό οξύ και γλυκόζη (Romani A. et al. 2019). Σε μια μελέτη του 2016, αναλύθηκαν αρκετά εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς και παρατηρήθηκαν ποιοτικές διαφορές στις συνολικές πολυφαινόλες και στο περιεχόμενο τους σε ελευρωπαΐνη. Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες ποικίλουν από 7,87 έως 34,21 mg/g, ενώ η ελευρωπαΐνη κυμαίνεται από 2,79 έως 21,03 mg/g ανάλογα με το είδος του φύλλου (νωπό, ψυγμένο, αποξηραμένο, κατεψυγμένο ή λυοφιλοποιημένο), τη ποικιλία, την εποχή δειγματοληψίας και τη περιοχή παραγωγής (Romani A, et al. 2016).

#### **2.4.1.2.Βιοδραστική λειτουργία**

Στη βιβλιογραφία υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων που αναφέρονται στις θεραπευτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς αλλά και των επιμέρους συστατικών τους. Τα εκχυλίσματα από τα φύλλα ελιάς χαρακτηρίζονται από αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς οφείλεται στο προεξέχον συστατικό της, την ελευρωπαΐνη. Συγκεκριμένα, η ελευρωπαΐνη προλαμβάνει τον σχηματισμό των ελεύθερων ριζών καθώς προάγει τη χηλίωση μετάλλων, όπως Cu και Fe, τα οποία καταλύουν τις αντιδράσεις δημιουργίας ελεύθερων ριζών, και αναστέλλει πολλά ένζυμα υπεύθυνα για φλεγμονές, όπως τις λιποξυγενάσες, χωρίς να επηρεάζει την οδό της κυκλο-οξυγενάσης. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η υδροξυτυροσόλη, η ελευρωπαΐνη, το καφεϊκό οξύ και η τυροσόλη έχουν την ικανότητα να αποτρέπουν τη δημιουργία δραστικών μορφών



οξυγόνου από άθικτα λευκοκύτταρα, χωρίς να προκαλούν τοξικότητα (Sedef N. El., & Karakaya, S., 2009). Οι φαινολικές ενώσεις των φύλλων ελιάς και του ελαιόλαδου στη μεσογειακή διατροφή έχουν συσχετιστεί με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρδιακών παθήσεων. Σε μια μελέτη των Somona et al., διερευνήθηκε η αντιυπερτασική, διουρητική, αντιαθηροσκληρωτική, αντιοξειδωτική και υπογλυκαιμική δράση του ολεανολικού οξέος, του ουρσολικού οξέος και των εκχυλισμάτων φύλλων αφρικανικής και ελληνικής ελιάς. Τα πειράματα έγιναν σε ένα γενετικό μοντέλο υπέρτασης αρουραίου ανθεκτικό στην ινσουλίνη, το οποίο εμφάνιζε σημαντικά αυξημένη γλυκόζη στο αίμα και ήταν επιρρεπής σε πρόωμη αθηροσκλήρωση με σημαντικά αυξημένη ολική χοληστερόλη και με τετραπλάσια αύξηση της LDL χοληστερόλης. Μετά από 6 εβδομάδες θεραπείας με ολεανολικό οξύ, ουρσολικό οξύ και εκχυλίσματα φύλλων ελιάς, όλες οι δοκιμές έδειξαν ισχυρή υπογλυκαιμική, αντιυπερλιπιδαιμική (αντιθηροσκληρωτική) και αντιοξειδωτική δράση (Somona LI, et. al., 2003). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς μπορούν να βοηθήσουν στη θεραπεία ενός ευρέος φάσματος μολυσματικών ασθενειών. Τα τελευταία χρόνια, τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί από τη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετα τροφίμων. Μέχρι σήμερα, τα εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς έχουν πωληθεί υπό τη μορφή αποξηραμένων φύλλων, ως σκόνες, εκχυλίσματα ή δισκία που χρησιμοποιούνται ως τσάι βοτάνων ή συμπληρώματα διατροφής, διαθέσιμα σε όλο τον κόσμο. Αυτά καταναλώνονται για την αύξηση της διούρησης και τη θεραπεία της υπέρτασης και του βρογχικού άσθματος. Τα φύλλα ελιάς επηρεάζουν επίσης το μεταβολισμό, επομένως χρησιμοποιούνται ως παραδοσιακό φυτικό φάρμακο για πολλά χρόνια. Πολλές μελέτες, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, καταδεικνύουν της σημαντικές βιολογικές ιδιότητες τους, συμπεριλαμβανομένων των αντι-πολλαπλασιαστικών και κυτταροτοξικών επιδράσεων στα καρκινικά κύτταρα (Romani A. et al. 2019). Σε προηγούμενες έρευνες, έχει δειχθεί ότι οι πολυφαινόλες των φύλλων ελιάς έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό πολλών καρκινικών κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων του παγκρέατος, της λευχαιμίας, του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου. Σημαντικό εύρημα είναι ότι η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη έχουν την ικανότητα να δρουν επιλεκτικά μόνο σε καρκινικά κύτταρα, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και επάγοντας την απόπτωση τους (Boss, A., et. al., 2016). Επομένως, πολλά οφέλη σχετίζονται με τις ιδιότητες και τα χημικά χαρακτηριστικά των φύλλων της ελιάς που οφείλονται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε βιοδραστικές ενώσεις.

### 3. Βιολογικές δράσεις τροποποιημένων πολυμερών

#### 3.1 Αντιοξειδωτική δράση

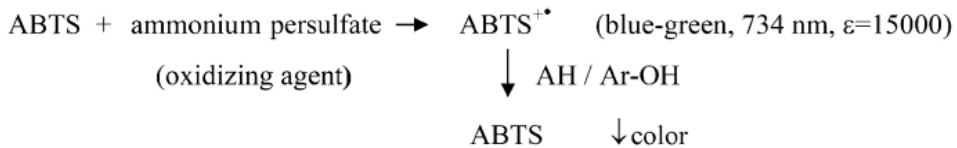
Η βιολογική δράση των φαινολικών ενώσεων, αλλά και των τροποποιημένων με φαινολικές ενώσεις βιοπολυμερών, αποδίδεται κυρίως στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα, τη δέσμευση ελεύθερων ριζών και τη χηλίωση μετάλλων. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από το χημικό τύπο και τον τρόπο κατανομής των υδροξυλομάδων στο μόριο. Όσον αφορά τα φαινολικά οξέα, η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων σε σχέση με την καρβοξυλομάδα και η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο βαθμός υδροξυλίωσης. Επίσης, η προπενική αλυσίδα στα υδροξυκιναμικά οξέα προσδίδει μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με τα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός πολυμερισμού τους, τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα τους να αδρανοποιούν ελεύθερες ρίζες. Ο πιο σημαντικός παράγοντας για την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών είναι η θέση των υποκαταστατών στο χώρο. Επίσης, παίζει ρόλο η θέση και ο βαθμός υδροξυλίωσης αλλά και η παρουσία γλυκοζιτών στο μόριο (Moore et. al., 2001)

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης αλλά καμία επίσημη μέθοδος προσδιορισμού. Γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με πολλές διαφορετικές μεθόδους. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες μεθόδων ανάλογα με τις χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης: (α) μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (SET), (β) μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT) και (γ) μέθοδοι που στηρίζονται τόσο σε SET όσο και σε HAT μηχανισμούς αντίδρασης. Η πρώτη κατηγορία βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο σε ένα οξειδωτικό αντιδραστήριο με αποτέλεσμα αυτό να ανάγεται. Κατά την αναγωγή του αντιδραστήριου γίνεται αλλαγή του χρώματός του. Ο βαθμός της αλλαγής αυτής εξαρτάται από την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στο δείγμα προς μέτρηση, ενώ θεωρείται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι ίση με την αναγωγική ικανότητα. Στην δεύτερη κατηγορία οι μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητα που έχει το αντιοξειδωτικό να δίνει ένα άτομο υδρογόνου, καταστρέφοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες και εμποδίζοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούνται από την παραγωγή των ελεύθερων ριζών. (Huang et. al., 2005). Η κατηγορία SET περιλαμβάνει τις μεθόδους: FRAP (ferric reducing ability of plasma), ABTS (2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) και DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl

radical scavenging), ενώ η κατηγορία HAT περιλαμβάνει τις μεθόδους: ORAC (oxygen radical absorbance capacity), μέθοδος φωτο-χημειοφωταύγειας (photo-chemiluminescence), μέθοδος αποχρωματισμού β-καροτενίου/λινολεϊκού οξέος και αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Οι μέθοδοι DPPH και ABTS ανήκουν, επίσης, στην τρίτη κατηγορία καθώς χρησιμοποιούν και τους δύο μηχανισμούς αντίδρασης.

- Μέθοδος του οξειδωμένου ABTS<sup>·+</sup>

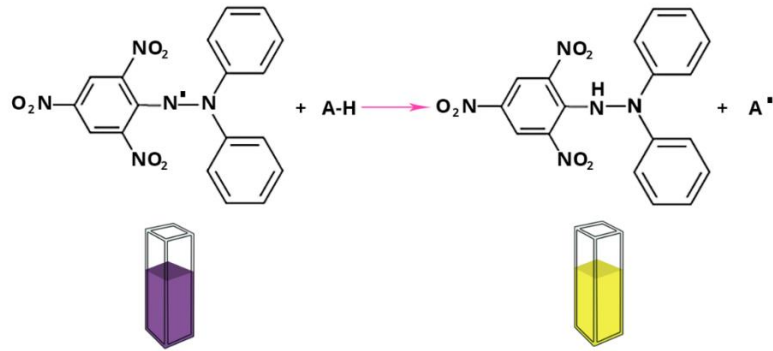
Η μέθοδος του οξειδωμένου ABTS<sup>·+</sup> εφαρμόζεται ευρέως για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός αντιοξειδωτικού, δηλαδή την ποσότητα των ελεύθερων ριζών που είναι ικανό να δεσμεύσει. Το ABTS οξειδώνεται παρουσία ενός χημικού οξειδωτικού παράγοντα (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) ή ενζυμικά με χρήση του ενζύμου υπεροξειδάση (HRP) και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS<sup>·+</sup>. Τα αντιοξειδωτικά που μελετώνται προστίθενται στο διάλυμα που περιέχει την ρίζα του ABTS<sup>·+</sup> (πράσινο χρώμα) με αποτέλεσμα η ρίζα να ανάγεται και να το διάλυμα να αποχρωματίζεται. Μετά την πάροδο ορισμένου χρόνου, η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος προσδιορίζεται φωτομετρικά και ποσοτικοποιείται η εναπομείνουσα ρίζα ABTS<sup>·+</sup> (Shalaby, E. A., & Shanab, S. M., 2013)



**Εικόνα 17:** Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του οξειδωμένου ABTS<sup>·+</sup>.

- Μέθοδος DPPH (2,2,-δифαινυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο)

Η μέθοδος DPPH βασίζεται την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα DPPH<sup>·</sup>. Η ρίζα DPPH<sup>·</sup> είναι μία σταθερή ρίζα και σε διάλυμα αιθανόλης έχει χρώμα μωβ με μέγιστη απορρόφηση στα 515 nm, Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα της ρίζας DPPH<sup>·</sup> να δέχεται ένα άτομο H από μία αντιοξειδωτική ένωση με αποτέλεσμα να ανάγεται σε DPPH<sub>2</sub> και να παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος από μωβ σε κίτρινο με αντίστοιχη μείωση της απορρόφησης στα 515 nm (Schaich, K. M., et. al., 2015).

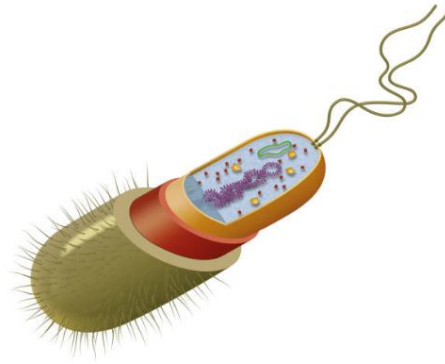


Εικόνα 18: Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH.

## 3.2 Αντιμικροβιακή δράση

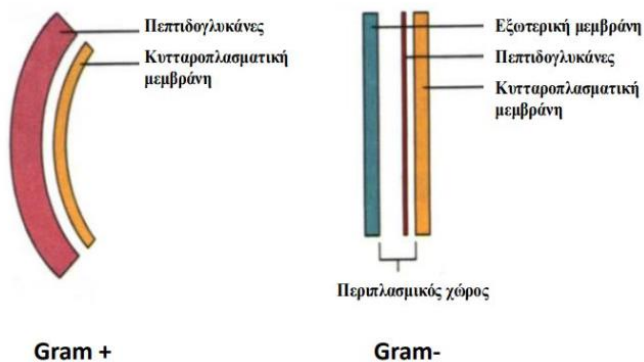
### 3.2.1 Βακτήρια

Το προκαρυωτικό κύτταρο είναι η μικρότερη και απλούστερη μορφή ζωής που μπορεί να αναπτυχθεί αυτόνομα, με διάμετρο μικρότερη από 1  $\mu\text{m}$  (Εικόνα 19). Οι πλέον χαρακτηριστικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι τα βακτήρια. Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι οργανισμοί που δεν διαθέτουν οργανίδια. Όσον αφορά τη δομή τους, περιβάλλονται από τη πλασματική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμά τους υπάρχουν ελεύθερα ριβοσώματα στα οποία γίνεται η πρωτεϊνσύνθεση. Η πλασματική τους μεμβράνη περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα και σε ορισμένα βακτήρια το κυτταρικό τοίχωμα περιβάλλεται από ένα άλλο περίβλημα, την **κάψα**. Συχνά διαθέτουν ειδικούς σχηματισμούς (μαστίγια ή βλεφαρίδες) για τη μετακίνησή τους και όταν βρεθούν σε αντίξοες συνθήκες (π.χ. πολύ υψηλές ή πολύ χαμηλές θερμοκρασίες) μετατρέπονται σε ανθεκτικές μορφές που ονομάζονται ενδοσπόρια (Michael T. Madigan, et al., *Biology of microorganism*, 2005).



**Εικόνα 19:** Δομή του βακτηριακού κυττάρου.

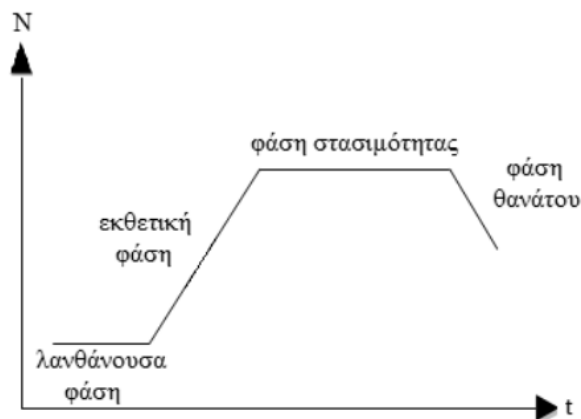
Τα βακτήρια διακρίνονται σε δύο κατηγορίες σε θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Η διάκριση αυτή βασίστηκε αρχικά στη τεχνική της χρώσης κατά Gram, η οποία διακρίνει τα κύτταρα βάσει των διαφορών στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Το τοίχωμα του αρνητικού κατά Gram βακτηρίου είναι πιο σύνθετο, ενώ το τοίχωμα του θετικού κατά Gram βακτηρίου είναι παχύτερο και συγκροτείται από έναν μόνο τύπο μορίου, τη πεπτιδογλυκάνη (**Εικόνα 20**). Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί ένα στρώμα που συντίθεται από δύο παράγωγα σακχάρων, την *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη και το *N*-ακετυλομουραμικό οξύ, και μία μικρή ομάδα αμινοξέων αποτελούμενη από L-αλανίνη, D-αλανίνη, D-γλουταμινικό οξύ και λυσίνη (Michael T. Madigan, et al., *Biology of microorganism*, 2005). Το κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων περιβάλλεται από μια δεύτερη εξωτερική μεμβράνη ή περίβλημα που αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο για τα αντιβιοτικά. Το εξωτερικό περίβλημα αποτελείται από πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες ή και τα δύο. Ένα καλά μελετημένο κατά Gram-αρνητικό βακτήριο είναι το *E. coli* που έχει μορφή ράβδου και ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηρίων. Πρόκειται για έναν συμβιωτικό οργανισμό που εντοπίζεται φυσιολογικά στο κόλον του ανθρώπου, ωστόσο κάποια παθογόνα στελέχη μπορεί να προκαλέσουν γαστρεντερίτιδα ή ουρολοιμώξεις.



**Εικόνα 20:** Δομικές διαφορές του κυτταρικού τοιχώματος των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

### 3.2.2. Τυπική καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης

Η καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης είναι η καμπύλη που εμφανίζεται σε διάγραμμα οπτικής πυκνότητας συναρτήσει του χρόνου επώασης και περιγράφει την ανάπτυξη των βακτηρίων σε ένα κλειστό σύστημα καλλιέργειας. Η καμπύλη ανάπτυξης χαρακτηρίζεται από τις ακόλουθες περιοχές: (1) φάση επώασης ή προσαρμογής, (2) εκθετική φάση, (3) φάση επιβράδυνσης, (4) φάση στασιμότητας, (5) φάση θανάτου (**Εικόνα 21**). Η φάση επώασης είναι το χρονικό διάστημα που χρειάζονται τα κύτταρα να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον. Η φάση αυτή ξεκινάει μετά τον εμβολιασμό και δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης τα κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με τον μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης. Μετά τη φάση αυτή ακολουθεί η φάση επιβράδυνσης, μία σχετικά σύντομη σε διάρκεια φάση, κατά την οποία η ανάπτυξη του μύκητα επιβραδύνεται λόγω εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών, είτε λόγω συσσώρευσης τοξικών για τον μικροοργανισμό προϊόντων. Ύστερα ακολουθεί η φάση στασιμότητας που χαρακτηρίζεται από εξισορρόπηση των ρυθμών ανάπτυξης και θανάτου. Σε αυτή τη φάση οι μικροοργανισμοί παρόλο που δεν αναπτύσσονται είναι μεταβολικά ενεργοί και μπορούν να παράγουν δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα. Τέλος, η μείωση των θρεπτικών συστατικών και η αύξηση των τοξικών συστατικών στο μέσο ανάπτυξης οδηγούν στη φάση θανάτου.



Εικόνα 21: Απεικόνιση της βακτηριακής καμπύλης ανάπτυξης.

### 3.2.3. Αντιμικροβιακή δράση βιοπολυμερών

Διάφορα πολυμερή, όπως η χιτοζάνη και η πολύ(ε-λυσίνη), παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι κατά Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων αλλά και μυκήτων. Η αντιμικροβιακή αυτή ιδιότητα είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό για τα πολυμερή ιδιαίτερα όταν αυτά εφαρμόζονται τόσο στη ιατρική όσο και στα τρόφιμα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η χιτοζάνη παρουσιάζει, ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων, η οποία οφείλεται στις θετικά φορτισμένες αμινομάδες της που αλληλεπιδρούν με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη των μικροοργανισμών, οδηγώντας σε σταδιακή συρρίκνωση της και σε καταστροφή διαφόρων πρωτεϊνικών και άλλων ενδοκυτταρικών συστατικών των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα τη θανάτωση τους. Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης πολυμερών ή τροποποιημένων πολυμερών. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί η δημιουργία υβριδικών φιλμ, όπως για παράδειγμα χιτοζάνης/ζελατίνης το οποίο παρουσιάζει σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι του αρνητικού κατά Gram βακτηρίου *Escherichia coli* και θετικού κατά Gram βακτηρίου *Listeria monocytogenes innocua* (Pereda, M., et. al., 2011). Άλλα πολυμερή, όπως η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη που έχει αυξημένη μηχανική αντοχή και χρησιμοποιείται στη μηχανική ιστών και τη συσκευασία τροφίμων, έχουν τροποποιηθεί με αντιμικροβιακές ενώσεις και εκχυλίσματα με σκοπό την ενίσχυση των ιδιοτήτων τους. Για παράδειγμα, μία μελέτη διερεύνησε την αντιμικροβιακή δράση ενός φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης τροποποιημένου με εκχύλισμα από σουσάμι το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα φιλμ παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του

Gram-θετικού βακτηρίου *Staphylococcus aureus*, του Gram-αρνητικού βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* και του ζυμομύκητα *Candida albicans* (Akl, E. M., et. al., 2020).

## Υλικά και Μέθοδοι

### 4. Υλικά

#### 4.1 Ένζυμα-Πρωτεΐνες

- Για την τροποποίηση των βιοπολυμερών χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λακάση από τον μικροοργανισμό *Agaricus bisporus*, λυοφιλωμένο σκεύασμα με ενεργότητα >4 Units mg<sup>-1</sup> (Sigma)
- Για την ενζυμική τροποποίηση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς χρησιμοποιήθηκε το δι-ενζυμικό νανοβιοκαταλυτικό σύστημα αποτελούμενο από τα ένζυμα β-γλυκοσιδάση από *Thermotoga maritima* – λιπάση A από *Candida antarctica* συν-ακινητοποιημένα σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με χιτοζάνη, η παρασκευή του οποίου έχει περιγραφεί σε προηγούμενη δημοσίευση του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας (Giannakopoulou, A., et. al., 2021).

#### 4.2 Βακτηριακό στέλεχος

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BL21DE3 από το βακτήριο *Escherichia coli*.

#### 4.3 Υπόστρωμα

- Φερουλικό οξύ (4-υδροξυ- 3-μεθοξυκινναμωμικό οξύ) (Acros)
- Υδροξυτυροσόλη (3-υδροξυτυροσόλη) (CarboSynth)
- Λουτεολίνη (CarboSynth)
- Ελλαγικό οξύ (Calbiochem, Millipore)

#### 4.4 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων

Θρεπτικό μέσο για υγρή καλλιέργεια LB Broth (Lennox), NEOGEN

#### 4.5 Διαλύματα

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων ήταν προϊόντα αναλυτικού βαθμού καθαρότητας των εταιριών Fluka και Sigma Aldrich.



- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών κιτρικού οξέος 100 mM pH 6.5
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 100 mM, pH 4.58
- Υδατικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS buffer, 1X, pH 7.4)
- Διάλυμα χιτοζάνης 1,5 % w/v σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 1% v/v, pH 4.58
- Διάλυμα χιτοζάνης 2 % w/v σε υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 1% v/v, pH 4.58
- Διάλυμα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης 1,5 % w/v σε υδατικό διάλυμα οξικών 100 mM, pH 4.58
- Διάλυμα ζελατίνης 2 % w/v σε υδατικό διάλυμα οξικών 100 mM, pH 4.58
- Φυσιολογικός ορός (0.9% w/v NaCl)
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου (20% w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διπλωματική ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας:

- Αιθανόλη 99.8% (AppliChem)
- Μεθανόλη, HPLC grade (Fischer)
- Οξικό οξύ, >99.8% (Sigma)
- Υδροχλωρικό οξύ (Riedel)

#### **4.6. Αντιδραστήρια**

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν:

- Αντιδραστήριο ανίχνευσης ολικών φαινολικών συστατικών Folin-Ciocalteu (Sigma)
- Δυναμώνιο 2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό (ABTS) (Sigma)
- 2,2-δι(4-τεροκτυλφαινυλο)-1-πυκρλυδραζύλιο (DPPH) (Sigma)
- Ανθρακικό νάτριο (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Riedel)
- Χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους, βαθμός αποακετυλίωσης >75 % (Sigma)
- Ζελατίνη από δέρμα βοοειδών (Fluka)

- Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (άλας νατρίου), χαμηλό ιξώδες (Sigma)
- Εκχύλισμα φύλλων ελιάς από κάψουλες SOLGAR
- Υπερθειικό κάλιο ( $K_2S_2O_8$ ) (Merck)

## 5. Μέθοδοι

### 5.1. Παρασκευή διαλυμάτων βιοπολυμερών

#### 5.1.1 Διάλυμα χιτοζάνης

Αρχικά πραγματοποιείται καθαρισμός και ενεργοποίηση της χιτοζάνης. Συγκεκριμένα, δημιουργείται διάλυμα χιτοζάνης (CS) 1.5 % w/v σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 1% v/v, το οποίο επωάζεται για 24 ώρες στους 70°C υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της επώασης, το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 8000 rpm. Έπειτα, το αδιάλυτο υλικό απομακρύνεται, ενώ το υπερκείμενο φυλάσσεται. Το pH του υπερκειμένου ρυθμίζεται σε pH 4.58 μέσω προσθήκης NaOH.

#### 5.1.2. Διάλυμα ζελατίνης/χιτοζάνης

Για τη δημιουργία του διαλύματος του υβριδικού πολυμερούς ζελατίνης/χιτοζάνης παρασκευάζονται δύο διαλύματα τα οποία σε ένα μετέπειτα βήμα αναμιγνύονται. Συγκεκριμένα, παρασκευάζεται διάλυμα ζελατίνης 2% w/w σε υδατικό διάλυμα οξικών 100mM pH 4.58 και διάλυμα χιτοζάνης 2% w/w σε υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 1% v/v. Τα δύο διαλύματα επωάζονται στους 60 °C για 24 ώρες, υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της επώασης, το διάλυμα χιτοζάνης φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 8000 rpm και απομακρύνεται το αδιάλυτο υλικό. Έπειτα, το pH του υπερκειμένου ρυθμίζεται σε pH 4.58 μέσω προσθήκης NaOH. Έπειτα, τα διαλύματα χιτοζάνης και ζελατίνης αναμιγνύονται σε αναλογία 2:3 w/w και επωάζονται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

#### 5.1.3. Διάλυμα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης

Για τη παρασκευή του διαλύματος καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης διαλύεται σταδιακά σκόνη καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης σε υδατικό διάλυμα οξικών 100mM pH 4.58 με τελική συγκέντρωση 1.5 % w/v. Το διάλυμα επωάζεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περίπου 40 °C μέχρι να γίνει ομοιογενές.

## 5.2. Ενζυμική τροποποίηση βιοπολυμερών με τις ενώσεις φερουλικό οξύ,

### υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ

#### 5.2.1. Ενζυμική τροποποίηση χιτοζάνης με τις φαινολικές ενώσεις

Η χιτοζάνη που έχει υποστεί επεξεργασία (παράγραφος 2.2.1) τροποποιείται ενζυμικά από τη λακάση από τον μικροοργανισμό *Agaricus bisporus* με τη φαινολική ένωση φερουλικό οξύ. Συγκεκριμένα, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 mL, προστίθενται διάλυμα χιτοζάνης τελικής συγκέντρωσης 1.3% w/v και η ένωση φερουλικό οξύ σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Για την εκκίνηση της αντίδρασης προστίθενται το ένζυμο λακάση σε τελική συγκέντρωση 60 μg mL<sup>-1</sup>. Επίσης, παρασκευάζεται δείγμα αναφοράς το οποίο περιέχει χιτοζάνη χωρίς τη πρότυπη ένωση. Οι αντιδράσεις επιστρώνονται σε τρυβλία petri και επωάζονται στους 30°C για 24 ώρες υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των αντιδράσεων, τα τρυβλία τοποθετούνται ανοιχτά για ξήρανση στους 30°C για 24 ώρες ώστε να σχηματιστούν σε μορφή φιλμ. Όλα τα φιλμ που δημιουργούνται ξεπλένονται τρεις φορές με μεθανόλη για την απομάκρυνση της ποσότητας του φερουλικού οξέος που δεν έχει αντιδράσει.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για την ενζυμική τροποποίηση της χιτοζάνης με τις ενώσεις υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ σε τελικές συγκεντρώσεις 5mM, 1mM και 1mM, αντίστοιχα.

#### 5.2.2 Ενζυμική τροποποίηση ζελατίνης/χιτοζάνης με τις φαινολικές ενώσεις

Το διάλυμα του υβριδικού πολυμερούς ζελατίνης/χιτοζάνης που παρασκευάστηκε (παράγραφος 2.2.2) τροποποιείται ενζυμικά με τη λακάση από τον μικροοργανισμό *Agaricus bisporus* με το φερουλικό οξύ. Σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 mL, προστίθενται διάλυμα ζελατίνης/χιτοζάνης τελικής συγκέντρωσης 1.7% w/v και η πρότυπη ένωση φερουλικό οξύ σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Για την εκκίνηση της αντίδρασης προστίθενται λακάση σε τελική συγκέντρωση 60 μg mL<sup>-1</sup>. Επίσης, παρασκευάζεται δείγμα αναφοράς το οποίο περιέχει το υβριδικό πολυμερές χωρίς τη πρότυπη ένωση. Οι αντιδράσεις επιστρώνονται σε τρυβλία petri και επωάζονται στους 30°C για 24 ώρες υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των αντιδράσεων, τα τρυβλία τοποθετούνται χωρίς το καπάκι για ξήρανση στους 30°C για 24 ώρες. Όλα τα φιλμ που δημιουργούνται ξεπλένονται τρεις φορές με μεθανόλη.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για την ενζυμική τροποποίηση του υβριδικού πολυμερούς με υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ σε τελικές συγκεντρώσεις 5 mM, 1 mM και 1 mM, αντίστοιχα.

### 5.2.3 Ενζυμική τροποποίηση κυτταρίνης με τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις

Το διάλυμα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης που παρασκευάστηκε (παράγραφος 2.2.3) τροποποιείται ενζυμικά με τη λακάση από τον μικροοργανισμό *Agaricus bisporus* με το φερουλικό οξύ. Σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 mL, προστίθενται διάλυμα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης τελικής συγκέντρωσης 1.3% w/v και το φερουλικό οξύ σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Η αντίδραση ξεκινά κατά τη προσθήκη λακάσης σε τελική συγκέντρωση 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Επίσης, παρασκευάζεται δείγμα αναφοράς το οποίο περιέχει το πολυμερές χωρίς τη πρότυπη ένωση. Οι αντιδράσεις επιστρώνονται σε τρυβλία petri και επωάζονται στους 30°C για 24 ώρες υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των αντιδράσεων, τα τρυβλία τοποθετούνται ανοιχτά για ξήρανση στους 30 °C για 24 ώρες ώστε να σχηματιστούν σε μορφή φιλμ. Όλα τα φιλμ που σχηματίζονται ξεπλένονται τρεις φορές με μεθανόλη.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για την ενζυμική τροποποίηση του πολυμερούς με υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ σε τελικές συγκεντρώσεις 5 mM, 1 mM και 1 mM, αντίστοιχα.

### 5.2.4. Παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων τροποποίησης των βιοπολυμερών με τις φαινολικές ενώσεις

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων τροποποίησης των βιοπολυμερών με τις πρότυπες ενώσεις γίνεται σε φασματοφωτόμετρο μέσω της λήψης φασμάτων ορατού-υπεριώδους στο εύρος 200-800 nm, σε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 1 cm (Spectrophotometer Shimadzu, UV-1601, UV-visible). Συγκεκριμένα, σε τελικό όγκο αντίδρασης 2 mL, προστίθενται διάλυμα του βιοπολυμερούς χιτοζάνης, ή ζελατίνης/χιτοζάνης ή κυτταρίνης σε τελική συγκέντρωση 0.5 % w/v και η εκάστοτε πρότυπη ένωση φερουλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ σε τελικές συγκεντρώσεις 0.05mM, 0.25 mM, 0.05 mM, 0.05 mM αντίστοιχα. Για την εκκίνηση της αντίδρασης προστίθενται το ένζυμο λακάση σε τελική συγκέντρωση 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$ . Επίσης, παρασκευάζονται δείγματα αναφοράς τα οποία περιέχουν χιτοζάνη με ένζυμο χωρίς τη πρότυπη ένωση και χιτοζάνη με τη πρότυπη ένωση. Σε χρονικά διαστήματα: 0, 5, 10, 20, 30, 45, 65, 85 λεπτά και 24 ώρες λαμβάνεται δείγμα και γίνεται λήψη του φάσματος ορατού-υπεριώδους.

### **5.3. Παρασκευή ενζυμικά τροποποιημένου εκχυλίσματος φύλλων ελιάς**

#### **5.3.1 Παρασκευή υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς**

Για τη παρασκευή υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς αρχικά διαλύονται 30 gr σκόνης από κάψουλες SOLGAR σε 250 mL υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O. Έπειτα, ακολουθεί βρασμός για μία ώρα υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθεί φιλτράρισμα με διηθητικό χαρτί δύο φορές ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα. Ύστερα ακολουθεί λυοφιλίωση.

#### **5.3.2 Ενζυμική τροποποίηση υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς**

Η ενζυμική τροποποίηση του υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς πραγματοποιείται μέσω της δράσης του συν-ακινητοποιημένου νανοβιοκαταλυτικού συστήματος  $\beta$ -γλυκοσιδάσης από *Thermotoga maritima* – λιπάσης από *Candida antarctica* σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου, το οποίο είχε παρασκευαστεί σε προηγούμενη εργασία (Giannakopoulou, A., et al., 2021). Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 60°C, σε υδατικό διάλυμα φωσφορικών κιτρικού οξέος 100 mM pH 6.5 για 24 ώρες. Η τελική συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς είναι 0.1gr mL<sup>-1</sup> και η τελική συγκέντρωση του βιοκαταλύτη στην αντίδραση είναι 1.0 mg/mL. Τόσο κατά την εκκίνηση, όσο και μετά το πέρας της αντίδρασης λαμβάνεται δείγμα ποσότητας 150 μl και προστίθεται 150 μl μεθανόλης. Το δείγμα φιλτράρεται και ακολουθεί ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).

#### **5.3.3 Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)**

Η ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των μιγμάτων πριν και μετά την ενζυμική τροποποίηση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς πραγματοποιείται μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) σε υγρό χρωματογράφο της εταιρείας Shimadzu (Τόκιο , Ιαπωνία), με ανιχνευτή πολλαπλών διόδων της Shimadzu (Ιαπωνία), ο οποίος ελέγχεται από το λογισμικό ShimadzuClass-vp, v.6.1. και σε στήλη Bondapack™ C18 ανάστροφης φάσης της εταιρείας Waters (Ιρλανδία) με διαστάσεις 3.9 x 300 mm, μέγεθος σωματιδίων 10 μm και μέγεθος πόρων 125 Å.

Για την ανάλυση των μιγμάτων, πριν και μετά την ενζυμική τροποποίηση του εκχυλίσματος στις εκάστοτε συνθήκες και στο χρονικό διάστημα των 24 h, λαμβάνεται δείγμα και προστίθενται μεθανόλη (αναλογία 1:1). Στην συνέχεια τα δείγματα φιλτράρονται με την χρήση φίλτρων 0.45 μm, διαμέτρου 13 mm. Η σύσταση του δείγματος αναλύεται μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC), όπου ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιείται με

βάση το μέγεθος και το βαθμό λιποφιλικότητάς τους και καταγράφονται χρωματογραφήματα στα 280 nm.

Οι διαλύτες που εφαρμόστηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων με βαθμίδωση ήταν οι εξής:

**Πίνακας 1:** Συνθήκες ανάλυσης.

Διαλύτες	Χρόνος ανάλυσης	Θερμοκρασία	Ροή διαλυτών
A: Ακετονιτρίλιο B: Νερό HPLC grade με 0.1% οξικό οξύ	30min	35 °C	1mL/min

**Πίνακας 2:** Πρόγραμμα έκλουσης ανάλυσης.

Time Program (min)	Διαλύτης A	Διαλύτης B
0-11	40% (v/v)	60% (v/v)
11-15	100% (v/v)	0% (v/v)
15-25	100% (v/v)	0% (v/v)
25-30	40% (v/v)	60% (v/v)

#### 5.4. Ενζυμική τροποποίηση βιοπολυμερών με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς

Για την ενζυμική τροποποίηση των βιοπολυμερών χιτοζάνη, ζελατίνη/χιτοζάνη και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη με το τροποποιημένο ή μη εκχύλισμα φύλλων ελιάς ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιεγράφηκε στις παραγράφους 1.3.1, 1.3.2, 1.3.3. Συνοπτικά, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 mL, προστίθενται το διάλυμα πολυμερούς (τελικής συγκέντρωσης 1.13% w/v για τη χιτοζάνη και τη καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, 1.5% w/v για το υβριδικό πολυμερές ζελατίνη/χιτοζάνη) και 20 mg/mL τροποποιημένο ή μη εκχύλισμα φύλλων ελιάς από το οποίο έχει αφαιρεθεί ο βιοκαταλύτης με τη χρήση μαγνήτη. Για την εκκίνηση της αντίδρασης προστίθενται λακάση από το μικροοργανισμό *Agaricus bisporus* σε τελική συγκέντρωση 90 μg mL<sup>-1</sup>. Επίσης, παρασκευάζονται δείγματα αναφοράς τα οποία περιέχουν το πολυμερές χωρίς το

εκχύλισμα φύλλων ελιάς. Οι αντιδράσεις επιστρώνονται σε τρυβλία petri και επωάζονται στους 30 °C για 24 ώρες υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των αντιδράσεων, τα τρυβλία τοποθετούνται χωρίς καπάκι για ξήρανση στους 30 °C για 24 ώρες ώστε να σχηματιστούν σε μορφή φιλμ. Όλα τα φιλμ που δημιουργούνται ξεπλένονται τρεις φορές με μεθανόλη.

### **5.5. Προσδιορισμός ποσοστού σύνδεσης φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu**

Ο προσδιορισμός του ποσοστού σύνδεσης των φαινολικών ενώσεων στα βιοπολυμερή χιτοζάνη, ζελατίνη/χιτοζάνη και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη πραγματοποιείται με το χρωματομετρικό αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC). Το αντιδραστήριο FC είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδενικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό (765nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> που δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του FC και του προϊόντος της αντίδρασης αφενός, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των φαινολικών ιόντων (Blainski, A., et. al., 2013).

Όσον αφορά τη διαδικασία, κομμάτι από κάθε φιλμ (περίπου 20 mg) ξεπλένεται πέντε φορές με 500 μL μεθανόλης, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που δεν έχουν προσδεθεί στο κάθε πολυμερές, και κάθε κλάσμα συλλέγεται (δείγμα). Σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL, προστίθενται με την ακόλουθη σειρά 20 μL δείγματος, 480 μL υπερκάθαρου νερού και 50 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Μετά το πέρας 3 λεπτών προστίθενται 100 μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (συγκέντρωσης 20% w/v) και 350 μL υπερκάθαρο νερό. Οι αντιδράσεις επωάζονται για 1 ώρα σε σκοτεινό χώρο. Επίσης, προετοιμάζεται δείγμα αναφοράς (τυφλό), όπου αντί για δείγμα χρησιμοποιείται ο διαλύτης μεθανόλη. Οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιούνται εις τριπλούν και εξάγεται ο μέσος όρος. Οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιούνται σε φωτόμετρο στα 725 nm (Spectrophotometer Shimadzu, UV-1601, UV-visible).

Επίσης, με την αντίδραση που περιεγράφηκε κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με εύρος συγκεντρώσεων 0.156 mM έως 5 mM. Η εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:  $y = 0.3077[FA] + 0.0254$ , όπου το y αντιστοιχεί στην απορρόφηση στα 725 nm.

## 5.6. Έλεγχος βιολογικών δράσεων των τροποποιημένων φιλμ

### 5.6.1. Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης των τροποποιημένων φιλμ

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των τροποποιημένων και μη φιλμ πραγματοποιείται τόσο με το πρωτόκολλο του οξειδωμένου ABTS (ABTS•+) όσο και με το πρωτόκολλο DPPH.

#### 5.6.1.1. Μέθοδος του οξειδωμένου ABTS

Για τη παρασκευή του διαλύματος οξειδωμένου ABTS (ABTS•+) προστίθενται 7 mM ABTS και 2.45 mM υπερθειικό κάλιο σε υπερκάθαρο νερό με τελικό όγκο αντίδρασης 4 mL. Το διάλυμα επωάζεται στο σκοτάδι για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τη χρήση το διάλυμα οξειδωμένου ABTS αραιώνεται με διάλυμα φωσφορικών αλάτων, προκειμένου να έχει απορρόφηση  $0.700 \pm 0.025$  στα 734 nm.

Η αντίδραση για την παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής δράσης ξεκινά με τη προσθήκη 1 mL διαλύματος οξειδωμένου ABTS σε 0.5 mg του εκάστοτε φιλμ. Η μέτρηση γίνεται με δειγματοληψία 300  $\mu$ L από το διάλυμα επώασης και φωτομέτρηση στα 725 nm σε Eliza, για τους χρόνους 0, 5, 10, 20, 30 και 40 λεπτά. Μετά από κάθε μέτρηση η ποσότητα δείγματος επιστρέφεται στο διάλυμα αντίδρασης. Τα δείγματα που δοκιμάζονται είναι τα τροποποιημένα βιοπολυμερή, τα μη τροποποιημένα βιοπολυμερή καθώς και οι πρότυπες ενώσεις. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Κατασκευάζεται διάγραμμα του ποσοστού αντιοξειδωτικής δράσης συναρτήσει του χρόνου επώασης. Το ποσοστό υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Αντιοξειδωτική δράση (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{\text{control}}] * 100$$

Όπου  $A_{\text{control}}$  η απορρόφηση του οξειδωμένου ABTS μετά την αραιώση με διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS).

#### 5.6.1.2. Μέθοδος DPPH

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τροποποιημένων και μη τροποποιημένων φιλμ, η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται αιθανόλη ως διαλύτης, 0.03 mM ρίζας DPPH• και το φιλμ (δείγμα) σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα



517 nm. Σε κάθε πείραμα η ρίζα DPPH• (0.03 mM) σε αιθανόλη αποτελεί το μάρτυρα και κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Το επί τοις εκατό ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση: Αντιοξειδωτική δράση (%) =  $[(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{\text{control}}] * 100$

όπου  $A_{\text{control}}$  and  $A_{\text{sample}}$  είναι οι τιμές της απορρόφησης για το μάρτυρα και το δείγμα αντίστοιχα. Επίσης, για να συγκρίνουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφορετικών φιλμ, υπολογίζουμε το IC<sub>50</sub>, τη συγκέντρωση δηλαδή που εξουδετερώνει τη ρίζα κατά 50%. Ο υπολογισμός γίνεται από το διάγραμμα που δείχνει το % ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.

### 5.6.2. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης των τροποποιημένων φιλμ

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των τροποποιημένων και μη τροποποιημένων φιλμ ακολουθείται πρωτόκολλο 3 ημερών σε βακτηριακούς πληθυσμούς απουσία θρεπτικού μέσου. Αναλυτικά, κατά τη πρώτη εργαστηριακή μέρα παρασκευάζεται προκαλλιέργεια μέσω εμβολιασμού περίπου 100  $\mu\text{L}$  βακτηριακού πληθυσμού *Escherichia coli* BL21DE3 από stock βακτηριακών κυττάρων αποθηκευμένα σε γλυκερόλη, σε 5mL φρέσκου θρεπτικού μέσου LB. Ακολούθως, η υγρή καλλιέργεια τοποθετείται για επώαση στους 37°C, O/N (overnight) υπό ανάδευση στα 160rpm. Κατά τη 2<sup>η</sup> εργαστηριακή μέρα μετριέται η απορρόφηση της προκαλλιέργειας στα 600 nm και αραιώνεται με θρεπτικό μέσο LB, έτσι ώστε η απορρόφηση της ανακαλλιέργειας να είναι 0,08 σε τελικό όγκο 5 mL. Η ανακαλλιέργεια επωάζεται στους 37°C, υπό ανάδευση στα 160rpm, για περίπου 1.5 ώρα ώστε ο βακτηριακός πληθυσμός να περάσει στην εκθετική φάση, εμφανίζοντας απορρόφηση που κυμαίνεται από 0.2-0.5. Έπειτα, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στα 4000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο που προκύπτει απομακρύνεται και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl). Πραγματοποιούνται συνολικά τρεις διαδοχικές πλύσεις του βακτηριακού ιζήματος με φυσιολογικό ορό, και τελικά γίνεται επαναδιαλυτοποίηση σε ίσο όγκο με αυτόν της καλλιέργειας. Εν συνεχεία, προετοιμάζονται δείγματα βακτηριακού πληθυσμού της τάξης των 10<sup>7</sup> CFU/mL. Η ποσότητα αυτή υπολογίζεται, γνωρίζοντας ότι η απορρόφηση 0.632 αντιστοιχεί σε 4\*10<sup>8</sup>CFU/mL βακτηριακών κύτταρων *E.coli* και λαμβάνοντας υπόψιν την απορρόφηση που λαμβάνεται μετά την ανακαλλιέργεια. Περίπου 0.5 mg από κάθε φιλμ, τοποθετείται σε erpendorf, όπου προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  από τα δείγματα βακτηριακού πληθυσμού της τάξης των 10<sup>7</sup> CFU/mL και επωάζονται για 12 ώρες σε κρυοθάλαμο. Την επόμενη μέρα (3<sup>η</sup> εργαστηριακή μέρα) μετά την 12ωρη επώαση των δειγμάτων, πραγματοποιείται εμβολιασμός 25 $\mu\text{L}$  από αυτά σε

πηγαδάκι αποστειρωμένης πλάκας Elisa και φόρτωση των αντίστοιχων πηγαδιών με 225  $\mu\text{L}$  θρεπτικού μέσου LB έτσι ώστε ο τελικός όγκος κάθε πηγαδιού να είναι 250 $\mu\text{L}$ . Ανά μία ώρα, για διάστημα 8 ωρών, μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων στην πλάκα Elisa με επώαση αυτής στους 37°C για τα χρονικά διαστήματα μεταξύ των μετρήσεων. Τέλος, κατασκευάζονται καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου, απουσία και παρουσία των υπό εξέταση φιλμ.

\*Όλες οι παραπάνω διεργασίες πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες.

## **5.7. Χαρακτηρισμός ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ**

### **5.7.1. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)**

Για τον χαρακτηρισμό των τροποποιημένων φιλμ με τις φαινολικές ενώσεις λαμβάνονται φάσματα ορατού-υπεριώδους στο εύρος 200-800 nm, σε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 1 cm. Για την παρασκευή των υπό εξέταση δειγμάτων, 1 mg τροποποιημένου ή μη τροποποιημένου φιλμ διαλυτοποιείται σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 1% v/v. Επίσης, παρασκευάζονται δείγματα των πρότυπων ενώσεων φερουλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ σε τελικές συγκεντρώσεις 0.05 mM, 0.05 mM, 0.25 mM, 0.05 mM αντίστοιχα. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται το διάλυμα οξικού οξέος.

### **5.7.2. Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR/ATR)**

Τα τροποποιημένα και μη τροποποιημένα φιλμ χαρακτηρίζονται με υπέρυθρη φασματοσκοπία με την τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (ATR). Η υπέρυθρη φασματοσκοπία βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας συγκεκριμένης συχνότητας από ένα μόριο λόγω δονήσεων και περιστροφών που λαμβάνουν χώρα σε αυτό στην ίδια συχνότητα. Για τον χαρακτηρισμό των φιλμ χρησιμοποιείται η περιοχή με μήκη κύματος από 2 έως 50  $\mu\text{m}$  ή με κυματαριθμούς από 4000 έως 200  $\text{cm}^{-1}$ , δηλαδή η μέση υπέρυθρη περιοχή. Στο διάστημα από 4000 έως 1500  $\text{cm}^{-1}$ , απορροφούν οι χαρακτηριστικές ή δραστικές ομάδες ενώ το διάστημα από 1500 έως 200  $\text{cm}^{-1}$  σχετίζεται με απορροφήσεις των δονήσεων του σκελετού των οργανικών ενώσεων. Το φάσμα απορρόφησης που σχετίζεται με το δεύτερο διάστημα είναι χαρακτηριστικό για κάθε ένωση και αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμά» της (Valand, R., et. al., 2019). Ένα από τα φασματοφωτόμετρα που ανήκουν στην κατηγορία των FT-IR, είναι το φασματοφωτόμετρο μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR-FT-IR), κατά το οποίο, η υπέρυθρη ακτινοβολία πριν προσπέσει στο δείγμα διαπερνά έναν κρύσταλλο υψηλού δείκτη διάθλασης, που κατασκευάζεται από γερμάνιο ή διαμάντι. Η ακτινοβολία προσπίπτει υπό συγκεκριμένη γωνία, συνήθως 45°, όπου υπόκειται σε πολλαπλές ολικές ανακλάσεις εντός του κρυστάλλου, διεισδύοντας σε πολύ μικρό βάθος μέσα στο δείγμα, της

τάξης του 1 μm και τελικά καταλήγει στον ανιχνευτή. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, η ανάλυση των τροποποιημένων και μη τροποποιημένων φιλμ πραγματοποιείται σε φασματοόμετρο της εταιρίας Jasco FT/IR 4700. Τα φάσματα καταγράφονται σε εύρος 400-4000 cm<sup>-1</sup> ενώ το τελικό φάσμα προκύπτει από την μέση τιμή 128 σαρώσεων με ανάλυση 2 cm<sup>-1</sup>.

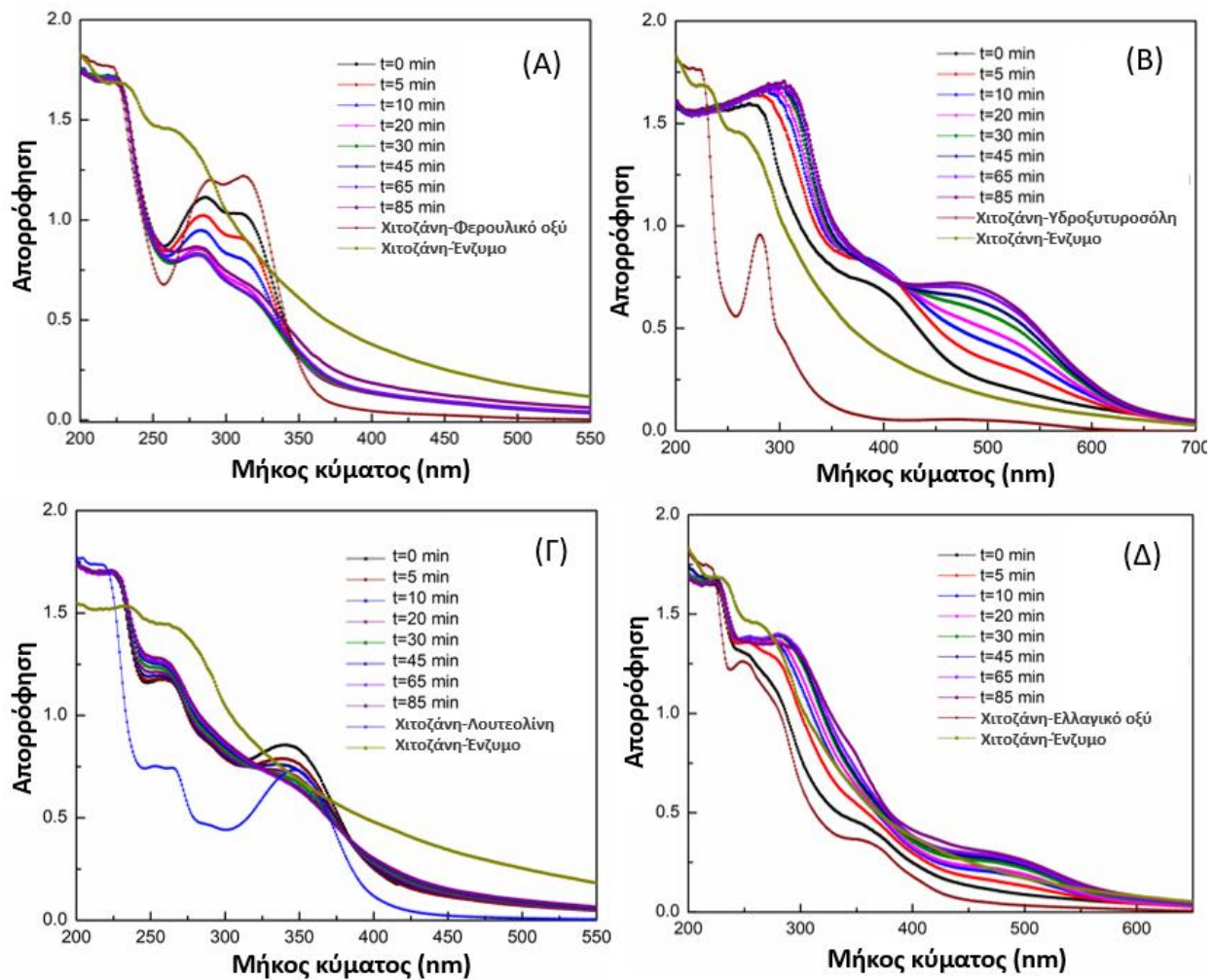
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 6. Ενζυμική τροποποίηση πολυμερών με φαινολικές ενώσεις

#### 6.1 Παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης της ενζυμικής τροποποίησης βιοπολυμερών με διάφορες φαινολικές ενώσεις (φερουλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη, ελλαγικό οξύ)

Προκειμένου να μελετηθεί η πορεία της αντίδρασης τροποποίησης των διαφορετικών βιοπολυμερών με φαινολικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), όπου καταγράφηκαν οι αλλαγές στα φάσματα UV κατά την οξείδωση των ενώσεων φερουλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ. Στην **Εικόνα 22** παρουσιάζονται οι πορείες των αντιδράσεων τροποποίησης της χιτοζάνης με (Α) φερουλικό οξύ, (Β) υδροξυτυροσόλη, (Γ) λουτεολίνη και (Δ) ελλαγικό οξύ. Από τη **Εικόνα 22(Α)**, η οποία αντιστοιχεί στη πορεία της αντίδρασης της ενζυμικής τροποποίησης της χιτοζάνης με το φερουλικό οξύ, παρατηρείται σημαντική μείωση της απορρόφησης στο εύρος 275–320 nm με την πάροδο του χρόνου, ακολουθούμενη από σταδιακή μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης στα 280 nm. Όσον αφορά την ενζυμική τροποποίηση της χιτοζάνης με την υδροξυτυροσόλη, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 22(Β)**, παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα φάσματα UV–vis κατά την πορεία της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση της απορρόφησης της κορυφής στα 405 nm με τη πάροδο του χρόνου, ενώ παράλληλα εμφανίζεται μία νέα κορυφή στο εύρος 450 και 550 nm, η οποία αυξάνεται όσο εξελίσσεται η αντίδραση. Στη περίπτωση της ενζυμικής τροποποίησης της χιτοζάνης με τη λουτεολίνη, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 22(Γ)**, παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στο εύρος 250-380 nm, με ταυτόχρονη μείωση της κορυφής στα 345 nm, όσο εξελίσσεται η αντίδραση. Όσον αφορά την ενζυμική τροποποίηση της χιτοζάνης με το ελλαγικό οξύ, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 22(Δ)**, στο φάσμα διακρίνονται σημαντικές αλλαγές κατά την πορεία της αντίδρασης, καθώς παρατηρείται μείωση της απορρόφησης της κορυφής στα 370 nm και εμφάνιση μίας νέας κορυφής στο εύρος 460 και

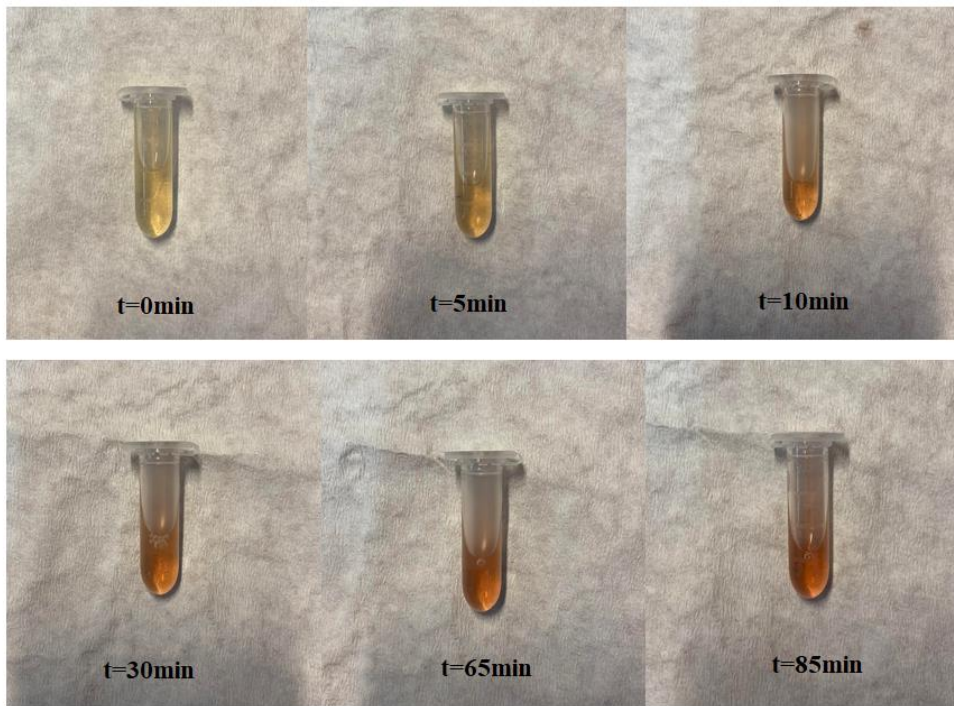
510 nm με τη πάροδο του χρόνου. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί στη μελέτη των Božič, M., κ.α., όπου μελετήθηκε με φασματοσκοπία UV-vis η πορεία της αντίδρασης τροποποίησης της χιτοζάνης με το καφεϊκό και γαλλικό οξύ με τη δράση της λακκάσης από το μικροοργανισμό *Trametes versicolor* (Božič, M., et. al., 2012). Σε όλες τις περιπτώσεις, παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα τυφλά διαλύματα (control), δηλαδή διάλυμα χιτοζάνης παρουσία των διαφορετικών φαινολικών ενώσεων και απουσία του ενζύμου καθώς και διάλυμα χιτοζάνης παρουσία του ενζύμου και απουσία των φαινολικών ενώσεων, στα οποία δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα φάσματα UV-vis με το πέρασμα του χρόνου.



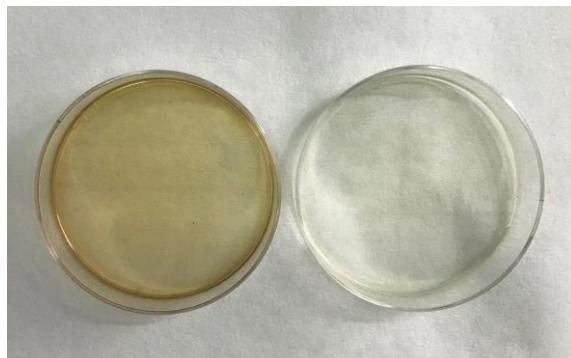
**Εικόνα 22:** Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) της πορείας αντίδρασης τροποποίησης της χιτοζάνης με διάφορες φαινολικές ενώσεις. (Α) φερουλικό οξύ, (Β) υδροξυτυροσόλη, (Γ) λουτεολίνη, και (Δ) ελλαγικό οξύ.

Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος από άχρωμο σε πορτοκαλί αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου (Εικόνα 23), ενώ στα αντίστοιχα διαλύματα ελέγχου δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο χρώμα, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία του ενζύμου

είναι απαραίτητη για την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων και την επακόλουθη σύνδεση τους στη χιτοζάνη. Επίσης, η αντίστοιχη αλλαγή χρώματος παρατηρήθηκε και κατά τον σχηματισμό των φιλμ (**Εικόνα 24**). Οι ίδιες αλλαγές στα φάσματα UV-vis παρατηρούνται και στις αντιδράσεις των φαινολικών ενώσεων με τα πολυμερή ζελατίνη/χιτοζάνη και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη και παρατίθενται στο **Παράρτημα 1-2**. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η λακκάση έχει την ικανότητα να οξειδώνει τις φαινολικές ενώσεις σε βιοδραστικά ενδιάμεσα προϊόντα, τα οποία σε ένα μετέπειτα μη ενζυμικό βήμα συνδέονται στα πολυμερή και τα τροποποιούν.



**Εικόνα 23:** Απεικόνιση της χρωματικής αλλαγής του διαλύματος της ενζυμικής αντίδρασης τροποποίησης της χιτοζάνης με το φερουλικό οξύ.



**Εικόνα 24:** Απεικόνιση του ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης με φερουλικό οξύ (αριστερά) και του μη τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης (δεξιά).

## 6.2 Προσδιορισμός του ποσοστού σύνδεσης των φαινολικών ενώσεων στα ενζυμικά τροποποιημένα πολυμερή

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της ενζυμικής τροποποίησης των πολυμερών χιτοζάνη, ζελατίνη/χιτοζάνη και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη με τις φαινολικές ενώσεις, προσδιορίστηκε το ποσοστό σύνδεσης του φερουλικού οξέος, της υδροξυτυροσόλης, της λουτεολίνης και του ελλαγικού οξέος μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu (Aljawish et al. 2016). Με τη μέθοδο αυτή αρχικά προσδιορίστηκε η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που δεν αντέδρασε και απομακρύνθηκε μέσω των πλύσεων με μεθανόλη από κάθε φιλμ. Από την απορρόφηση που προέκυψε και αφού κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη (**Παράγραφος 2.5**), υπολογίστηκε η συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης στο κάθε δείγμα μεθανόλης που δεν είχε αντιδράσει. Έπειτα, το άθροισμα αυτών των συγκεντρώσεων αφαιρέθηκε από την αρχική συγκέντρωση κάθε ένωσης που προστέθηκε στην αντίδραση τροποποίησης (5 mM φερουλικό οξύ και υδροξυτυροσόλη και 1 mM λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ). Τα ποσοστά σύνδεσης των φαινολικών ενώσεων στα αντίστοιχα πολυμερή παρατίθενται στον **Πίνακα 3**. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η τροποποίηση ήταν επιτυχής στις περισσότερες περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, υψηλά ποσοστά σύνδεσης (πάνω από 90%) επιτεύχθηκαν κατά την τροποποίηση της χιτοζάνης με το φερουλικό οξύ (95%), την υδροξυτυροσόλη (92%) και τη λουτεολίνη (94%), κατά την τροποποίηση του πολυμερούς ζελατίνη/χιτοζάνη με το φερουλικό οξύ (97%) και κατά την τροποποίηση της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με την υδροξυτυροσόλη (96%) και το ελλαγικό οξύ (90%). Έπειτα, ακολουθούν τα φιλμ χιτοζάνης που τροποποιήθηκαν με ελλαγικό οξύ (66%), ζελατίνης/χιτοζάνης τροποποιημένα με υδροξυτυροσόλη (76%) και ελλαγικό οξύ (64%) και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης τροποποιημένα με φερουλικό οξύ (85%) και λουτεολίνη (86%). Το χαμηλότερο ποσοστό σύνδεσης (κάτω από 50%) παρουσίασε το φιλμ ζελατίνη/χιτοζάνη τροποποιημένο με λουτεολίνη (35%).

**Πίνακας 3:** Ποσοστό σύνδεσης των διαφορετικών φαινολικών ενώσεων στα ενζυμικά τροποποιημένα φιλμ. (Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 5% σε όλες τις περιπτώσεις).

Πολυμερές	Φαινολική ένωση	Ποσοστό σύνδεσης φαινολικών ενώσεων (%)
Χιτοζάνη	Φερουλικό οξύ	95
	Υδροξυτυροσόλη	92
	Λουτεολίνη	94

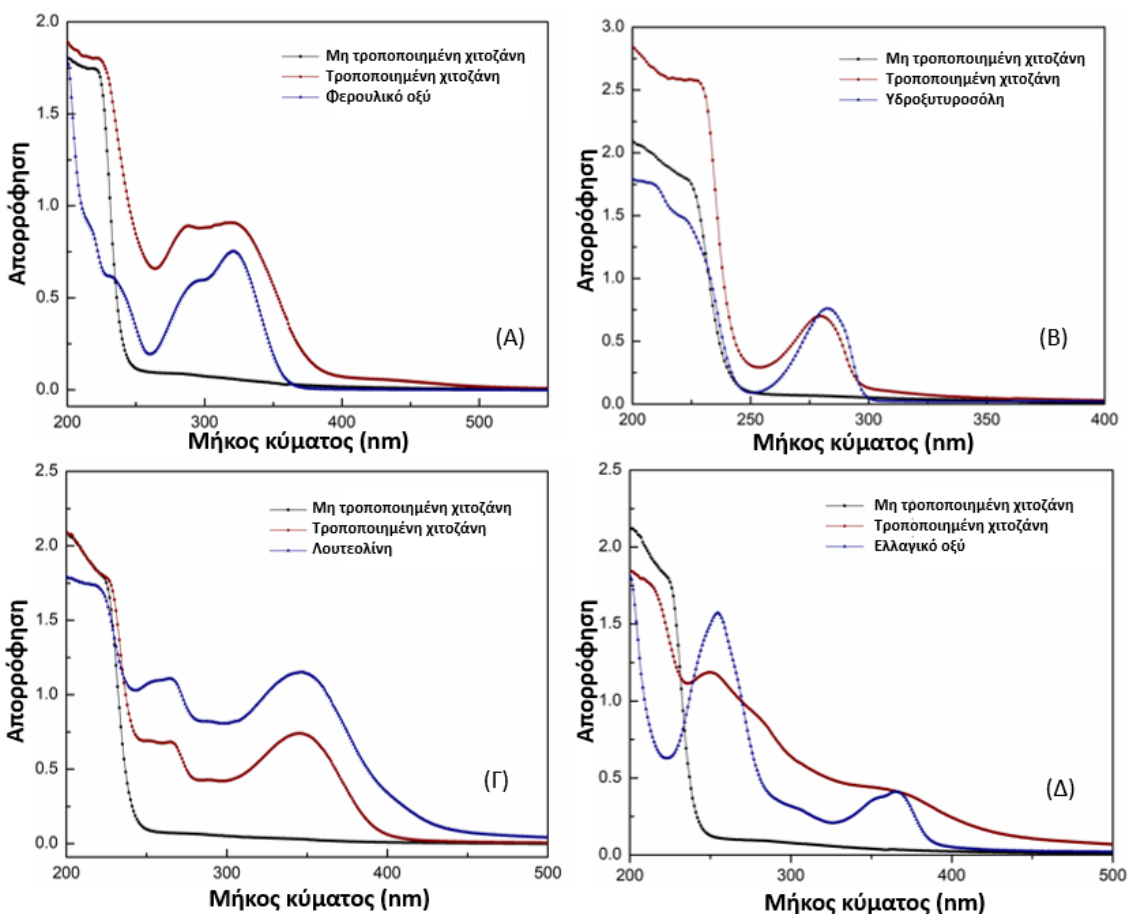
	Ελλαγικό οξύ	66
Ζελατίνη/Χιτοζάνη	Φερουλικό οξύ	97
	Υδροξυτυροσώλη	76
	Λουτεολίνη	35
	Ελλαγικό οξύ	64
Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη	Φερουλικό οξύ	85
	Υδροξυτυροσώλη	96
	Λουτεολίνη	86
	Ελλαγικό οξύ	89

### 6.3 Χαρακτηρισμός των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ χιτοζάνης

#### 6.3.1 Χαρακτηρισμός των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Για την ταυτοποίηση της ύπαρξης φαινολικών ενώσεων συνδεδεμένων στα φιλμ χιτοζάνης, ζελατίνης/χιτοζάνης και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis). Στην **Εικόνα 25** παρουσιάζονται τα φιλμ χιτοζάνης που έχουν τροποποιηθεί ενζυμικά (Α) με φερουλικό οξύ, (Β) υδροξυτυροσώλη, (Γ) λουτεολίνη και (Δ) ελλαγικό οξύ. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 25**, τα μη τροποποιημένα πολυμερή δεν εμφανίζουν κάποια χαρακτηριστική κορυφή στο εύρος 200-400 nm. Από την άλλη πλευρά, οι φαινολικές ενώσεις απορροφούν στη περιοχή 250-370 nm και παρουσιάζουν μία χαρακτηριστική κορυφή στα 240 nm περίπου, η οποία οφείλεται στο π-σύστημα του βενζοϊκού δακτυλίου. Μόλις τα πολυμερή τροποποιηθούν ενζυμικά και συνδεθούν σε αυτά οι φαινολικές ενώσεις και τα προϊόντα της οξείδωσης αυτών, τότε εμφανίζονται χαρακτηριστικές κορυφές που υποδηλώνουν αρχικά την επιτυχή οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από τη λακκάση και στη συνέχεια την επιτυχή τροποποίηση των πολυμερών. Οι φαινόξυ-ρίζες που προκύπτουν από την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων απεντοπίζονται και οι ενδιάμεσες ρίζες σταθεροποιούνται με αντιδράσεις σύζευξης C-C ή C-O. Σε ένα μετέπειτα βήμα, τα δραστικά μεθυλο- παράγωγα των κινονών που σχηματίζονται κατά τις αντιδράσεις διμερισμού μπορούν να σταθεροποιηθούν αντιδρώντας με τις ελεύθερες ομάδες -OH και -NH<sub>2</sub> των βιοπολυμερών, όπως επιβεβαιώνεται και από τη σημαντική αύξηση της απορρόφησης των φασμάτων στο ορατό-υπεριώδες (UV-vis) (Quideau, S., et., al., 2014). Τα ίδια αποτελέσματα λήφθηκαν και κατά την ενζυμική τροποποίηση των πολυμερών ζελατίνη/χιτοζάνη και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη με τις αντίστοιχες φαινολικές ενώσεις, τα οποία παρατίθενται στο **Παράρτημα 3-4**, υποδεικνύοντας επίσης ότι τα δραστικά προϊόντα που σχηματίζονται από τη δράση της λακκάσης μπορούν να συνδεθούν

ομοιοπολικά στα πολυμερή. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν επίσης και με βιβλιογραφικά δεδομένα που σχετίζονται με τη τροποποίηση της χιτοζάνης με το φερουλικό οξύ μέσω της δράσης μιας ανασυνδυασμένης βακτηριακής λακκάσης (Yang, J., et. al., 2018) και με τη τροποποίηση του πολυμερούς πηκτίνη με το φερουλικό οξύ μέσω της δράσης της λακκάσης από το μικροοργανισμό *Myceliophthora thermophila* (Karakı N., et. al., 2017).



**Εικόνα 25:** Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των διαλυτοποιημένων, σε 1% v/v υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, τροποποιημένων φιλμ χιτοζάνης καθώς και των επιμέρους συστατικών τους. (Α) Φιλμ χιτοζάνης ενζυμικά τροποποιημένο με φερουλικό οξύ, (Β) Φιλμ χιτοζάνης ενζυμικά τροποποιημένο με υδροξυτυροσόλη, (Γ) Φιλμ χιτοζάνης ενζυμικά τροποποιημένο με λουτεολίνη, (Δ) Φιλμ χιτοζάνης ενζυμικά τροποποιημένο με ελλαγικό οξύ.

### 6.3.2 Χαρακτηρισμός των τροποποιημένων φιλμ με φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR/ATR)

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής διασύνδεση των οξειδωμένων προϊόντων των φαινολικών ενώσεων στα πολυμερή χιτοζάνη, ζελατίνη/χιτοζάνη και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, ελήφθησαν φάσματα υπερύθρου (ATR) των μη τροποποιημένων και των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ (**Γράφημα 1-3**). Όσον αφορά τη τροποποίηση της χιτοζάνης, όπως φαίνεται στο **Γράφημα 1**, και τα δύο φιλμ εμφανίζουν όλες τις χαρακτηριστικές κορυφές αυτού

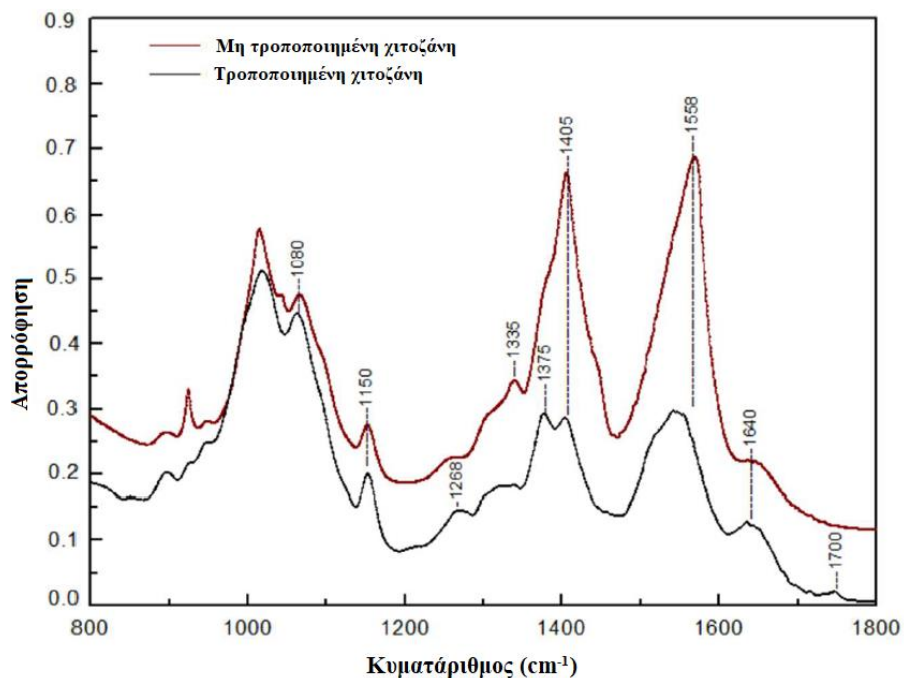


του πολυσακχαρίτη που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, δηλαδή, τη κορυφή στα  $1640\text{ cm}^{-1}$ , που αντιστοιχεί στην περιοχή Amide I (δονήσεις έκτασης  $\text{C}=\text{O}$ ), καθώς και τη κορυφή στα  $1558\text{ cm}^{-1}$ , που αντιστοιχεί στην περιοχή Amide II (δονήσεις κάμψης  $\text{NH}$ ) (Kumirska, J., et. al., 2010). Επιπλέον, διακριτές κορυφές που υπάρχουν και στα δύο φάσματα, δηλαδή, η κορυφή περίπου στα  $1150\text{ cm}^{-1}$  (αντισυμμετρική τάση των δεσμών  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ) και η κορυφή περίπου στα  $1080\text{ cm}^{-1}$  (δονήσεις που περιλαμβάνουν την έκταση των δεσμών  $\text{C}-\text{O}$ ), είναι χαρακτηριστικές της δομής του πολυσακχαρίτη χιτοζάνη, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Božič, M., et. al., 2012). Στα φάσματα του τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης παρατηρείται απουσία της κορυφής στα  $1335\text{ cm}^{-1}$ , η οποία χαρακτηρίζει τις αμινομάδες της χιτοζάνης (Aljawish, A., et. al., 2012), υποδηλώνοντας την απώλεια των ομάδων  $-\text{NH}_2$  (Kim, S., et. al., 2009). Επιπλέον, μια νέα κορυφή εμφανίζεται περίπου στα  $1700\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα της τροποποιημένης χιτοζάνης, που αντιστοιχεί σε εστερικό δεσμό (Yang, C., et. al., 2016), ενώ παρατηρείται συγχρόνως και μείωση της απορρόφησης της κορυφής στα  $1404\text{ cm}^{-1}$ , που αποδίδεται στις δονήσεις κάμψης της ομάδας  $-\text{CH}_2$ , που βρίσκεται δίπλα στην ομάδα υδροξυλίου του άνθρακα  $\text{C}_6$ . Ωστόσο, οι κορυφές στην ευρύτερη περιοχή  $1260-1230\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται σε δονήσεις πλάτους  $\text{C}-\text{C}(\text{O})-\text{C}$ , που αποτελεί δεσμό που εμφανίζεται στους εστέρες. Οι αλλαγές που ανιχνεύονται στο φάσμα της τροποποιημένης χιτοζάνης υποδηλώνουν ότι τόσο οι αμινομάδες όσο και οι υδροξυλομάδες είναι οι ομάδες που συμμετέχουν στη δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού με τα δραστικά προϊόντα οξείδωσης του φερουλικού οξέος. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι ενδιάμεσες ρίζες που προκύπτουν κατά στην οξείδωση του φερουλικού οξέος (όπως επίσης και της λουτεολίνης, του ελλαγικού οξέος και της υδροξυτυροσόλης, βλ. Παράρτημα 5) μπορούν να σταθεροποιηθούν μέσω αντιδράσεων σύζευξης  $\text{C}-\text{C}$  ή  $\text{C}-\text{O}$ , σχηματίζοντας δραστικές κινόνες, οι οποίες σε ένα μετέπειτα μη ενζυμικό βήμα μπορούν περαιτέρω να σταθεροποιηθούν αντιδρώντας τόσο με τις ελεύθερες ομάδες  $-\text{OH}$  και  $-\text{NH}_2$  που υπάρχουν στη χιτοζάνη (Giannakopoulou, A., et. al., 2022, Quideau, S., et. al., 2014).

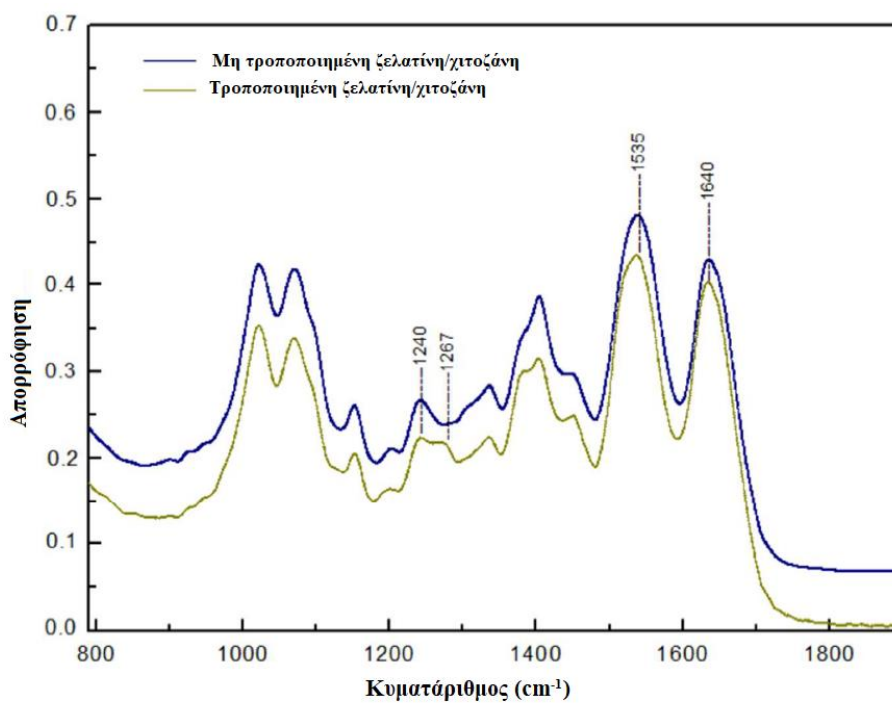
Όσον αφορά τα φάσματα χιτοζάνης/ζελατίνης, όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 2**, και τα δύο φιλμ (τροποποιημένο και μη τροποποιημένο) παρουσίασαν τις χαρακτηριστικές ζώνες στα  $1640\text{ cm}^{-1}$  (Amide I) και  $1535\text{ cm}^{-1}$  (κάμψη  $-\text{NH}_2$ ). Ωστόσο, στο φάσμα του ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης, η απορρόφηση αυτών των κορυφών μειώθηκε σε σύγκριση με το μη τροποποιημένο φιλμ, υποδηλώνοντας πιθανώς την συμμετοχή αυτών των ομάδων στην αντίδραση σύνδεσης των προϊόντων οξείδωσης του φερουλικού οξέος (όπως και με αντίστοιχο τρόπο της υδροξυτυροσόλης, του ελλαγικού οξέος και της λουτεολίνης) στο πολυμερές. Επιπροσθέτως, στο τροποποιημένο φιλμ εμφανίστηκε μια νέα κορυφή στην περιοχή  $1220-1275\text{ cm}^{-1}$ , περίπου στα  $1267\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αποδίδεται σε δονήσεις τάσης των δεσμών  $\text{C}-\text{N}$ , ενώ η

κορυφή στα  $1240\text{ cm}^{-1}$  θα μπορούσε να αποδοθεί στη μείωση των αλκυλαμιμών (Rocasalbas, G., et. al., 2013). Αυτές οι αλλαγές επιβεβαιώνουν την επιτυχή σύνδεση των δραστικών προϊόντων της οξειδωσης του φερουλικού οξέος (όπως και των υπόλοιπων φαινολικών ενώσεων, βλ. Παράρτημα 5) με τις ελεύθερες αμινομάδες που υπάρχουν στο υβριδικό πολυμερές ζελατίνη/χιτοζάνη. Όσον αφορά τα φάσματα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης, όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 3**, και τα δύο φάσματα (τροποποιημένο και μη τροποποιημένο) εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές κορυφές στα  $3250\text{ cm}^{-1}$ ,  $1550\text{ cm}^{-1}$  και  $1050\text{ cm}^{-1}$ , που αποδίδονται στις δονήσεις τάσης  $\text{-OH}$ ,  $\text{C=O}$  και  $\text{-O-}$  αντίστοιχα. Ωστόσο, μια νέα κορυφή εμφανίστηκε στα  $1269\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα της ενζυμικά τροποποιημένης καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της ευρείας κορυφής περίπου στα  $1015\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα της τροποποιημένης καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης, υποδηλώνοντας πιθανώς το σχηματισμό αιθερικού δεσμού (Morin, S., et. al., 2019, Akl, E.M. et. al., 2021). Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης της κορυφής στα  $2900\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα της τροποποιημένης καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης, που θα μπορούσε να αποδοθεί στους δεσμούς  $\text{C-H}$  των ομάδων μεθυλίου ( $\text{-CH}_3$ ) και μεθυλενίου ( $\text{-CH}_2$ ) των φαινολικών ομάδων (Yang, J., et. al., 2018). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την επιτυχή δέσμευση των οξειδωμένων από τη λακκάση προϊόντων του φερουλικού οξέος (όπως και των υπολοίπων φαινολικών ενώσεων, βλ. Παράρτημα 5) στη καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη πιθανώς μέσω του σχηματισμού εστερικών δεσμών.

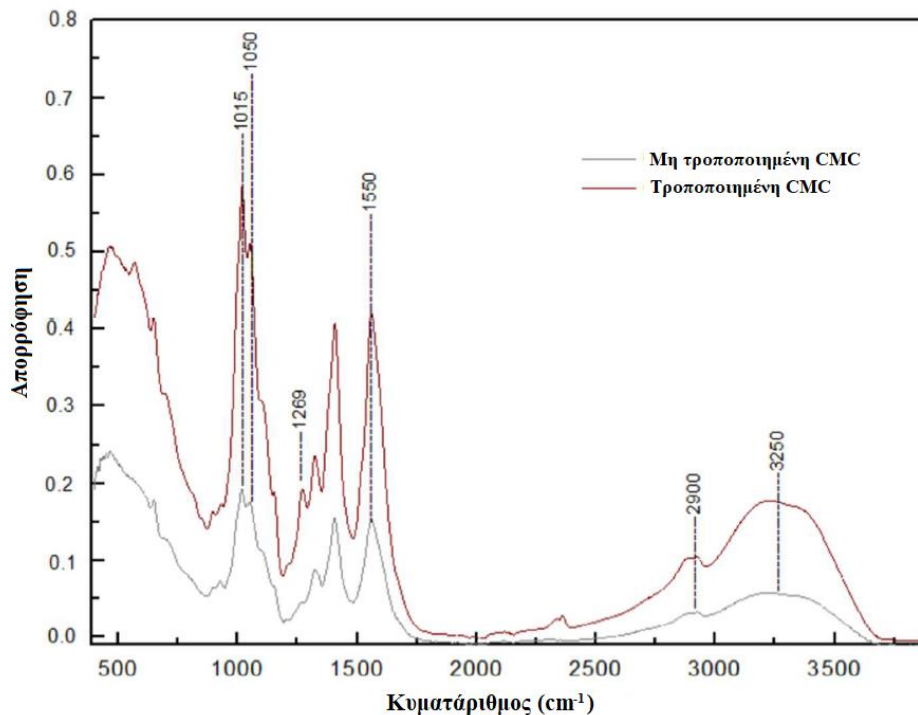
Τα φάσματα υπερύθρου των ενζυμικά τροποποιημένων πολυμερών με υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ παρατίθενται στο Παράρτημα 5. Σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρήθηκαν οι αντίστοιχες αλλαγές στις χαρακτηριστικές κορυφές μεταξύ των τροποποιημένων και μη τροποποιημένων βιοπολυμερών, όπως περιγράφεται παραπάνω για τη περίπτωση του φερουλικού οξέος, Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ενζυμική τροποποίηση των βιοπολυμερών ακολουθεί τον ίδιο μηχανισμό στην περίπτωση των φαινολικών ενώσεων υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ και επιβεβαιώνουν την επιτυχή δέσμευση των οξειδωμένων προϊόντων στα βιοπολυμερή.



**Γράφημα 1:** Φάσμα υπεράυθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης με φερούλικό οξύ.



**Γράφημα 2:** Φάσμα υπεράυθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης με φερούλικό οξύ.



**Γράφημα 3:** Φάσμα υπεράυθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με φερουλικό οξύ.

#### 6.4 Μελέτη βιολογικής δράσης των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ

Με βάση τα διαθέσιμα πρωτόκολλα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης που υπάρχουν στη βιβλιογραφία συνάγεται ότι καμία μέθοδος από μόνη της δεν επαρκεί για να αντικατοπτρίσει με ακρίβεια το μηχανισμό δράσης όλων των αντιοξειδωτικών. Η απόκριση ενός αντιοξειδωτικού στις διάφορες οξειδωτικές πηγές μπορεί να διαφέρει. Επομένως, θα πρέπει να εφαρμόζονται ποικίλες *in vitro* αντιοξειδωτικές μελέτες και συνδυασμός αυτών για την ακριβέστερη εκτίμηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των υπό μελέτη δειγμάτων, που ωστόσο είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ τους. Γι' αυτό το λόγο στη παρούσα διπλωματική εργασία εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης, το πρωτόκολλο του οξειδωμένου ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) και η μέθοδος DPPH.

##### 6.4.1 Αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων φιλμ με τη μέθοδο του οξειδωμένου ABTS

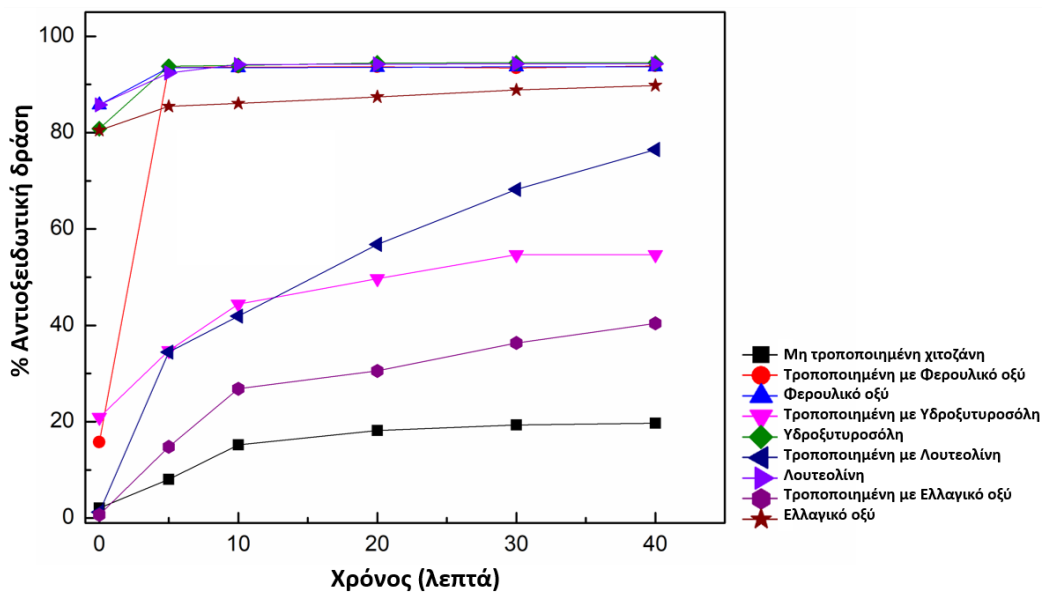
Εφόσον διαπιστώθηκε ότι η σύνδεση των φαινολικών ενώσεων στα διάφορα πολυμερή ήταν επιτυχής, αρχικά, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των φιλμ που παρασκευάστηκαν, μέσω του πρωτοκόλλου του οξειδωμένου ABTS (ABTS<sup>•+</sup>). Η μέθοδος εφαρμόστηκε τόσο για την διερεύνηση

της αντιοξειδωτικής δράσης των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ, όσο και των επιμέρους συστατικών τους, δηλαδή των πολυμερών χιτοζάνη, ζελατίνη/χιτοζάνη, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη και των φαινολικών ενώσεων φερουλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ. Όπως φαίνεται στα **Γραφήματα 4-6**, μεταξύ των μη τροποποιημένων φιλμ, το φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης παρουσίασε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (περίπου 40%) μετά από επώαση 40 λεπτών στο διάλυμα του οξειδωμένου ABTS, ενώ τα φιλμ χιτοζάνης και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης παρουσίασαν χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση, περίπου 15% και 10% αντίστοιχα. Η χαμηλή αντιοξειδωτική δράση της χιτοζάνης πιθανότατα οφείλεται στους δια- και ένδο- μοριακούς δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται εντός του δικτύου της χιτοζάνης. Κατά την ενσωμάτωση της ζελατίνης στη χιτοζάνη, οι χημικοί δεσμοί εντός του δικτύου της χιτοζάνης αλλάζουν, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται καλύτερη πρόσβαση του ABTS στο υβριδικό πολυμερές, άρα και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Aljawish, A., et. a., 2014).

Όσον αφορά τα ενζυμικά τροποποιημένα φιλμ, σε όλες τις περιπτώσεις, παρουσίασαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα μη τροποποιημένα φιλμ, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή τροποποίησή τους. Η βελτιωμένη δράση των τροποποιημένων φιλμ πιθανότατα οφείλεται στην ενσωμάτωση μιας ομάδας που λειτουργεί ως δότης ατόμου H, κατά τη σύνδεση των οξειδωμένων προϊόντων των φαινολικών ενώσεων στα πολυμερή (Aljawish, et. al., 2014). Γενικά, η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από τον αριθμό και θέση των υδροξυλομάδων που συνδέονται με τον αρωματικό δακτύλιο και η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο βαθμός υδροξυλίωσης. Για παράδειγμα, η παρουσία υδροξυλομάδων, στις θέσεις 5 και 7 του δακτυλίου A των φλαβονοειδών, όπως στη περίπτωση της λουτεολίνης, συνεισφέρει στη μετατόπιση του ηλεκτρονίου κατά τη δέσμευση σε ρίζες, καθώς επίσης και η παρουσία μιας καρβονυλικής ομάδας στη θέση 4 του δακτυλίου C αυξάνει την αντιοξειδωτική της ικανότητα. (Cook & Samman, 1996, Bur da & Oleszek, 2001, Rice-Evans et. al., 2001). Επίσης, όσον αφορά τα φαινολικά οξέα, η παρουσία ομάδων  $-CH=CH-COOH$  στα κινναμικά οξέα, όπως το φερουλικό οξύ, τα καθιστά περισσότερο δραστικά από ότι τα βενζοϊκά οξέα. Επίσης, η παρουσία μιας υδροξυλ ομάδας σε θέση όρθο ή πάρα σε ένα μονοφαινολικό οξύ, όπως στη περίπτωση του φερουλικού οξέος, αυξάνει την αντιοξειδωτική του δράση (Rice-Evans, et. al., 2001).

Στο **Γράφημα 4** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τροποποιημένων φιλμ χιτοζάνης με τις ενώσεις φερουλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ. Την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασε το φιλμ που τροποποιήθηκε με το φερουλικό οξύ (περίπου

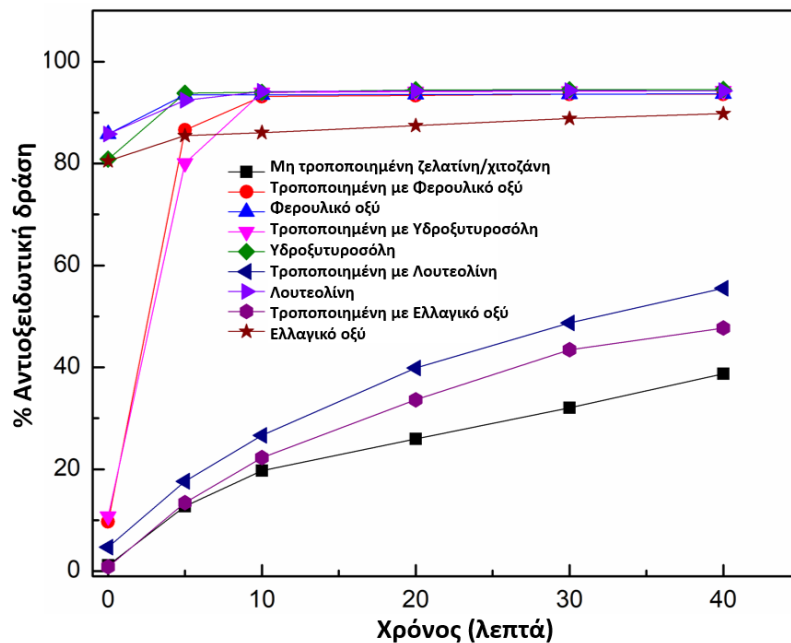
90%), ακολουθούμενο από τα φιλμ που τροποποιήθηκαν με λουτεολίνη (περίπου 77%), υδροξυτυροσόλη (59%) και τέλος με ελλαγικό οξύ (περίπου 40%). Η αντιοξειδωτική δράση του τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης πιθανότατα συνδέεται με την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που συνδέονται σε αυτό. Για παράδειγμα, η υψηλή αντιοξειδωτική δράση του φιλμ χιτοζάνης που τροποποιήθηκε ενζυμικά με το φερουλικό οξύ πιθανότατα αποδίδεται στην υψηλότερη ποσότητα φερουλικού οξέος που συνδέθηκε σε αυτό, ενώ το φιλμ που τροποποιήθηκε με το ελλαγικό οξύ παρουσίασε τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση λόγω του μικρότερου ποσοστού σύνδεσης της ένωσης αυτής στο μόριο της χιτοζάνης. Βιβλιογραφικά δεδομένα συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καθώς σε μελέτη που αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική δράση ενός ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης με το φερουλικό οξύ, παρατηρήθηκε εξαιρετικά σημαντική αναστολή της ρίζας του ABTS (Aljawish, A., et. al., 2016).



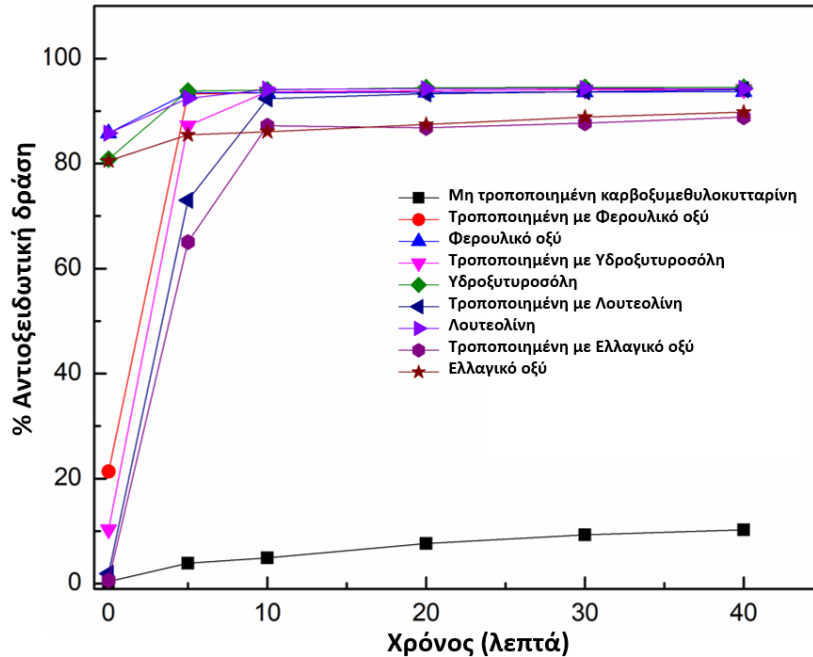
**Γράφημα 4:** % Αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων φιλμ χιτοζάνης, του μη τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης και των επιμέρους φαινολικών ενώσεων, με το πρωτόκολλο του οξειδωμένου ABTS, συναρτήσει του χρόνου. (Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 5% σε όλες τις περιπτώσεις).

Στο **Γράφημα 5** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τροποποιημένων φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης με τις ενώσεις φερουλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ. Τα τροποποιημένα φιλμ με φερουλικό οξύ και υδροξυτυροσόλη χρειάζονται περίπου μόλις 10 λεπτά ώστε να αναστείλουν πλήρως τις ελεύθερες ρίζες του ABTS, κάτι που αναμενόταν δεδομένου ότι τα συγκεκριμένα φιλμ χαρακτηρίζονται από το υψηλότερο ποσοστό σύνδεσης των εκάστοτε φαινολικών ενώσεων. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μία πρόσφατη μελέτη, όπου εφαρμόστηκε το πρωτοκόλλο του οξειδωμένου ABTS για τη διερεύνηση της

αντιοξειδωτικής δράσης του ενζυμικά τροποποιημένου κολλαγόνου με φαινολικά οξέα, συμπεριλαμβανομένου και του φερουλικού οξέος (Tanga Pingping, et. al., 2022). Επίσης, τα φιλμ που τροποποιήθηκαν με λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ φαίνεται να έχουν ανασταλτική δράση έναντι των ριζών του ABTS, με μικρότερη απόδοση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα (56% και 48% αντίστοιχα). Στο **Γράφημα 6**, το οποίο απεικονίζει τα φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης, παρατηρείται ότι τα τροποποιημένα φιλμ, σε όλες τις περιπτώσεις, χρειάζονται μόλις 10 λεπτά ώστε να αναστείλουν πλήρως τις ελεύθερες ρίζες του ABTS, επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά φιλμ. Σε μία μελέτη που αξιοποιήθηκε η μέθοδος του οξειδωμένου ABTS για την διερεύνηση της αντιοξειδωτικής δράσης σε φιλμ κυτταρίνης (cellulose nanofibril film) που τροποποιήθηκαν με φαινολικά οξέα, μη ενζυμικά, και χρησιμοποιώντας παράγοντες σύζευξης, αποδείχθηκε ότι και σε αυτή τη περίπτωση ότι τα τροποποιημένα φιλμ εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα μη τροποποιημένα λόγω της παρουσίας των φαινολικών ενώσεων (Lakshmi Balasubramaniama S.P., et. al., 2022).



**Γράφημα 5:** % Αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης, του μη τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης και των επιμέρους φαινολικών ενώσεων με το πρωτόκολλο του οξειδωμένου ABTS, συναρτήσει του χρόνου. (Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 5% σε όλες τις περιπτώσεις).



**Γράφημα 6:** % Αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης, του μη τροποποιημένου φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης και των επιμέρους φαινολικών ενώσεων με το πρωτόκολλο του οξειδωμένου ABTS, συναρτήσει του χρόνου. (Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 5% σε όλες τις περιπτώσεις).

#### 6.4.2 Αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων φιλμ με τη μέθοδο DPPH

Για την εκτίμηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των προς μελέτη δειγμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος DPPH, που βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων να δίνουν ένα άτομο υδρογόνου στις ρίζες DPPH και να τις αδρανοποιούν. Οι τιμές  $SC_{50}$  των ενζυμικά τροποποιημένων και μη τροποποιημένων φιλμ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. Αρχικά, τόσο το μη τροποποιημένο φιλμ χιτοζάνης όσο και το μη τροποποιημένο φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης φαίνεται να μη δρουν αποτελεσματικά έναντι των ριζών DPPH, πιθανώς λόγω των δια- και ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται εντός του δικτύου των δύο πολυμερών, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Aljawish, A., et. al., 2012, Morin, S., et. al., 2019). Ωστόσο, η ενζυμική τροποποίηση όλων των πολυμερών με τις φαινολικές ενώσεις είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση στην αντιοξειδωτική τους δράση σε όλες τις περιπτώσεις. Όσον αφορά τη χιτοζάνη, τα ενζυμικά τροποποιημένα φιλμ με φερουλικό οξύ και λουτεολίνη εμφανίζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, που είναι περίπου έξι φορές μεγαλύτερη έναντι του μη τροποποιημένου φιλμ. Επίσης, η τροποποίηση με υδροξυτυροσώλη επιτυγχάνει τετραπλάσια αντιοξειδωτική δράση έναντι του μη τροποποιημένου φιλμ, ενώ η τροποποίηση με ελλαγικό οξύ



επιτυγχάνει διπλάσια αντιοξειδωτική δράση έναντι του μη τροποποιημένου φιλμ. Στην περίπτωση του υβριδικού πολυμερούς ζελατίνης/χιτοχάνης, όλα τα τροποποιημένα φιλμ εμφάνισαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε τρισήμισι φορές αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης του τροποποιημένου φιλμ με υδροξυτυροσόλη σε σύγκριση με το μη τροποποιημένο φιλμ, ενώ για τα υπόλοιπα τροποποιημένα φιλμ παρατηρήθηκε αύξηση περίπου μιάμισι φορά της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Τέλος, όσον αφορά τα φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης, η τροποποίηση με φερουλικό οξύ επιφέρει επταπλάσια αντιοξειδωτική δράση έναντι του μη τροποποιημένου φιλμ, ύστερα ακολουθούν τα τροποποιημένα φιλμ με υδροξυτυροσόλη και λουτεολίνη με περίπου τριπλάσια αντιοξειδωτική δράση και τέλος το ελλαγικό οξύ με διπλάσια αντιοξειδωτική δράση. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα τροποποιημένα φιλμ εμφανίζουν ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην επιτυχή σύνδεση των φαινολικών ενώσεων στα διάφορα πολυμερή. Η εισαγωγή μιας ομάδας-δότη ατόμου H, που προκύπτει από την ενσωμάτωση των οξειδωμένων προϊόντων των φαινολικών ενώσεων, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολυμερών με σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, όπου εφαρμόζεται η μέθοδος DPPH για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων βιοπολυμερών κατά την τροποποίησή τους με φαινολικές ενώσεις. Σε μία μελέτη που αφορά την ενζυμική τροποποίηση της χιτοζάνης με φερουλικό οξύ και ethyl ferulate (Aljawish, A., et. al., 2016), καθώς και σε μία άλλη μελέτη που αφορά την τροποποίηση της χιτοζάνης με φερουλικό οξύ από μία ανασυνδυασμένη βακτηριακή λακκάση (Yang, J., et. al., 2018), φαίνεται και στις δύο περιπτώσεις ότι τα τροποποιημένα φιλμ εμφάνισαν αυξημένη αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, σε μία άλλη έρευνα φιλμ κολλαγόνου τροποποιήθηκε μέσω της δράσης της λακκάσης από το μικροοργανισμό *Trametes versicolor* με τα φαινολικά οξέα βανίλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, φερουλικό οξύ και καφεϊκό οξύ, όπου διαπιστώθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο DPPH ότι το τροποποιημένο φιλμ εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από το μη τροποποιημένο (Tanga Pingping, et. al., 2022).

**Πίνακας 4:** Τιμές SC<sub>50</sub> (mg/mL) για τα μη τροποποιημένα και τροποποιημένα φιλμ με τις φαινολικές ενώσεις φερουλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη και ελλαγικό οξύ σύμφωνα με τη μέθοδο DPPH. (Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 5% σε όλες τις περιπτώσεις.)

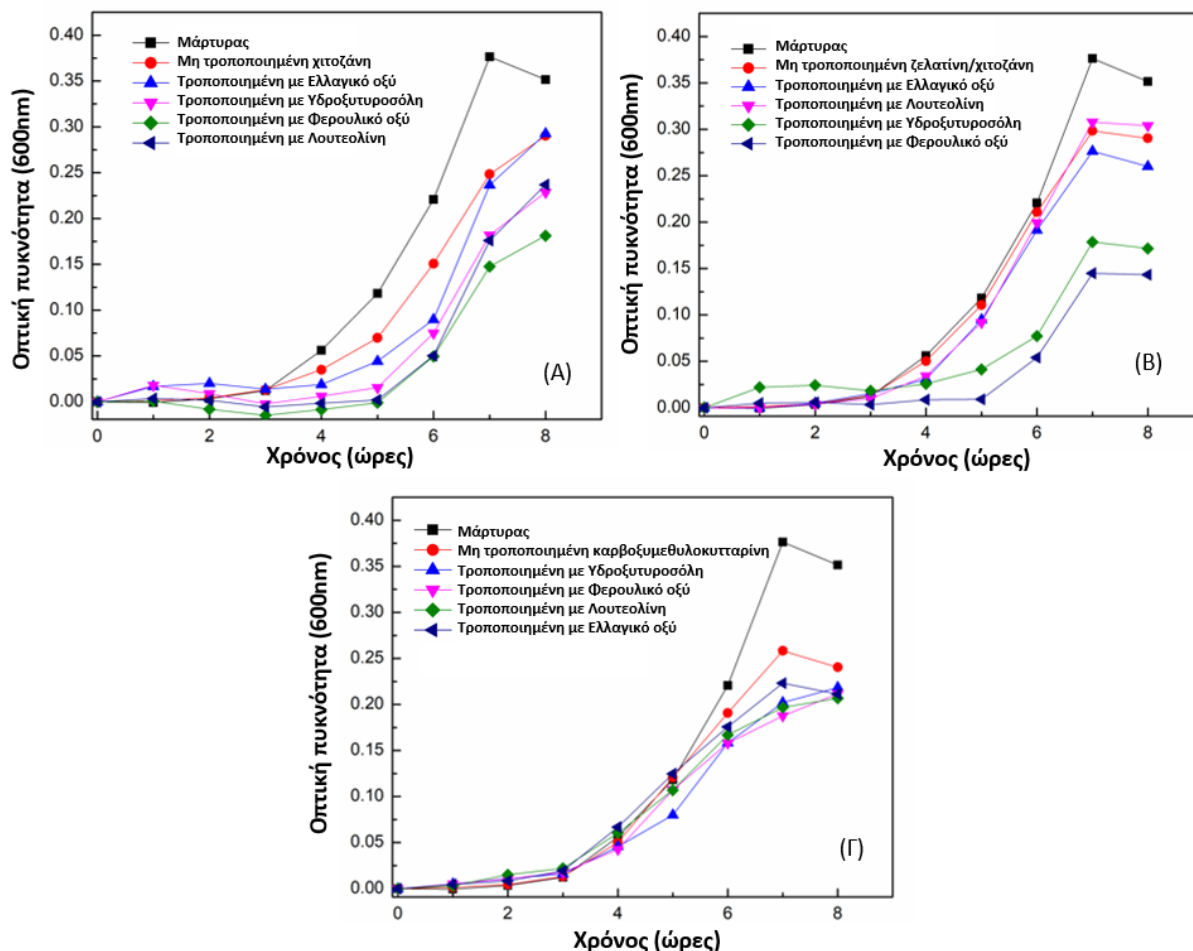
Πολυμερές	Ενζυμική τροποποίηση	SC <sub>50</sub> (mg/ml)

Χιτοζάνη	Μη τροποποιημένο φιλμ	70
	Φερουλικό οξύ	11
	Υδροξυτυροσόλη	18
	Λουτεολίνη	14
	Ελλαγικό οξύ	36
Ζελατίνη/Χιτοζάνη	Μη τροποποιημένο φιλμ	36
	Φερουλικό οξύ	19
	Υδροξυτυροσόλη	10
	Λουτεολίνη	27
	Ελλαγικό οξύ	31
Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη	Μη τροποποιημένο φιλμ	74
	Φερουλικό οξύ	10
	Υδροξυτυροσόλη	21
	Λουτεολίνη	29
	Ελλαγικό οξύ	41

#### 6.4.3 Αντιμικροβιακή δράση των τροποποιημένων φιλμ με φαινολικές ενώσεις

Πέραν της αντιοξειδωτικής δράσης μελετήθηκε και η αντιμικροβιακή δράση των τροποποιημένων φιλμ με τις φαινολικές ενώσεις. Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε είναι το BL21DE3, το οποίο ανήκει στα Gram<sup>-</sup> βακτήρια. Σύμφωνα με την **Εικόνα 26**, φαίνεται ότι τόσο το μη τροποποιημένο φιλμ χιτοζάνης όσο και το μη τροποποιημένο φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση. Η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης αποδίδεται στις θετικά φορτισμένες αμινομάδες του πολυμερούς που αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών, οδηγώντας σε διαρροή των πρωτεϊνικών και άλλων ενδοκυτταρικών συστατικών των μικροοργανισμών, εμποδίζοντας κατά τον τρόπο αυτό την επιβίωσή τους (Sousa, F., et. al., 2009, Pereda, M., et. al., 2011). Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση που εμφανίζει το υβριδικό πολυμερές ζελατίνης/χιτοζάνης πιθανότατα οφείλεται τόσο στις αμινομάδες της χιτοζάνης, όσο και στις αμινομάδες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων της ζελατίνης, οι οποίες αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων (Pereda, M., et. al., 2011). Από την άλλη πλευρά το μη τροποποιημένο φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης παρουσιάζει σχεδόν μηδενική αντιμικροβιακή δράση, το οποίο επιβεβαιώνεται και από βιβλιογραφικά δεδομένα (Salama, H. E., et. al., 2019). Από την **Εικόνα 26**,

παρατηρείται ότι όλα τα τροποποιημένα φιλμ με τις φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν ίση ή μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση συγκριτικά με τα μη τροποποιημένα φιλμ. Η σύνδεση των φαινολικών ενώσεων στα πολυμερή, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των διαθέσιμων δραστικών ομάδων που θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με την κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων και να εμποδίσουν την ανάπτυξη τους (Sousa, F., et. al., 2009). Ωστόσο, από βιβλιογραφικά δεδομένα έχει επιβεβαιωθεί η αντιμικροβιακή δράση και των τεσσάρων φαινολικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία, με αποτέλεσμα η αντιμικροβιακή δράση των τροποποιημένων φιλμ να εξισορροπείται ή να ενισχύεται, όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 26** (Utami, N. D., et. al., 2020, Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J., 2005, Borges, A., et. al., 2013, Vilela, C., et. al., 2017). Η αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στις υδροξυλομάδες, οι οποίες δρουν ως εναλλάκτες πρωτονίων, αλλάζοντας την ηλεκτροχημική βαθμίδωση κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, αναστέλλοντας έτσι τη μεταφορά ασβεστίου και καλίου μέσω των καναλιών ασβεστίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξάντληση των αποθεμάτων ATP, οδηγώντας στο κυτταρικό θάνατο (Fernandes, S.C.M, et. al., 2013). Επομένως, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η επιτυχής τροποποίηση των πολυμερών με φαινολικές ενώσεις οδηγεί στη δημιουργία καινοτόμων βιολικών με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση για την αξιοποίηση τους σε πλήθος εφαρμογών. Σε μία παρόμοια έρευνα, η ενζυμικά τροποποιημένη χιτοζάνη με κινναμικά οξέα (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ και χλωρογενικό οξύ), αποδείχθηκε ότι εμφάνισε αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση έναντι του κατά Gram αρνητικού βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* (Yang C., et. al., 2016). Επίσης, παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν σε μία έρευνα που μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση της ενζυμικά τροποποιημένης χιτοζάνης με το φερουλικό οξύ έναντι των μικροοργανισμών *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, και *M. guilliermondii* (Yang, J., et. al., 2018).



**Εικόνα 26:** Καμπύλη ανάπτυξης των βακτηριακών πληθυσμών του στελέχους BL21DE3 μετά από 12 ώρες επώασης παρουσία των τροποποιημένων φιλμ με τις φαινολικές ενώσεις. (Α) Φιλμ χιτοζάνης, (Β) Φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης, (Γ) Φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης. (Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 5% σε όλες τις περιπτώσεις).

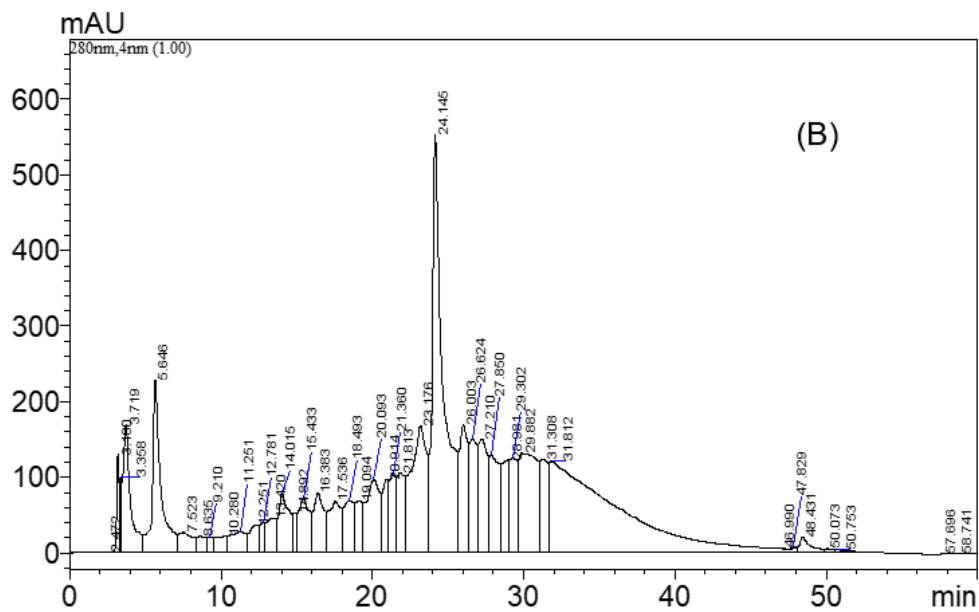
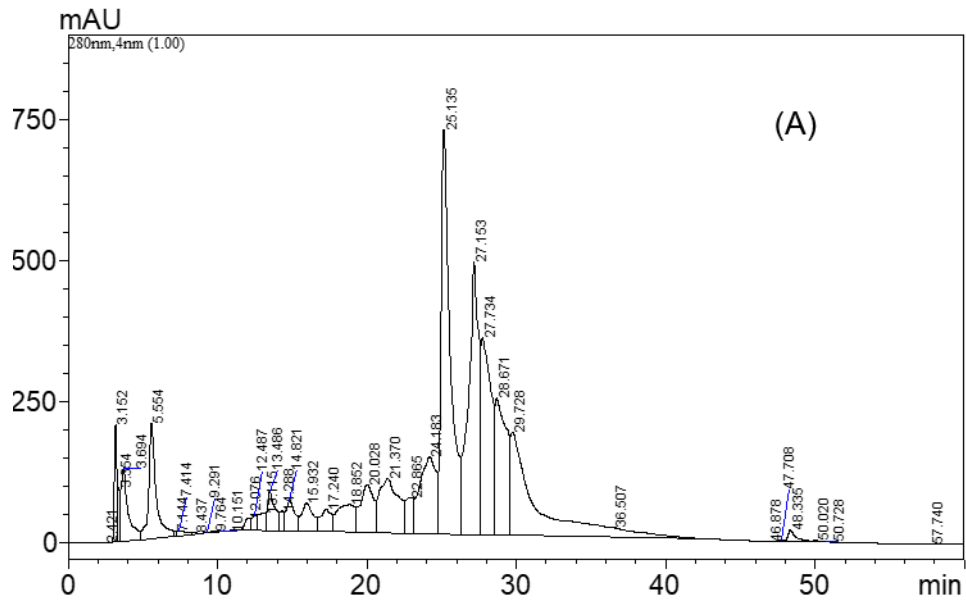
## 7 Ενζυμική τροποποίηση των βιοπολυμερών με εκχύλισμα φύλλων ελιάς

### 7.1 Παρακολούθηση της πορείας της ενζυμικής αντίδρασης τροποποίησης του υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς με το δι-ενζυμικό σύστημα β-γλυκοσιδάση/λιπάση

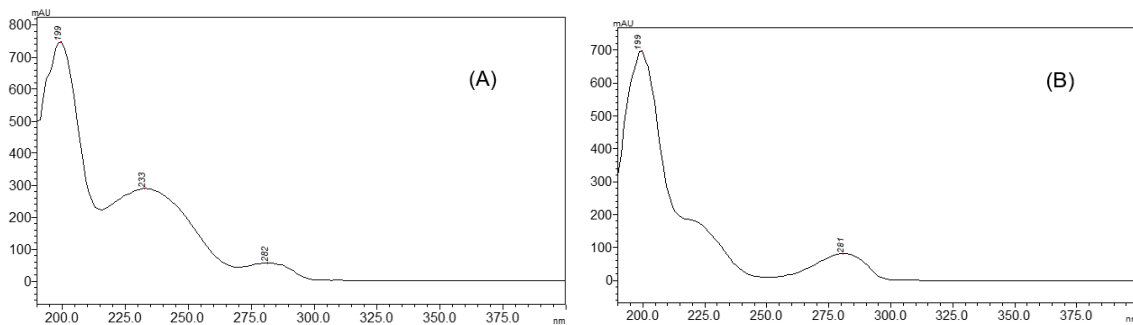
Ο εμπλουτισμός του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσώλη μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ενζυμικής τροποποίησης του, όπου η ελευρωπαΐνη, το βασικό συστατικό στα φύλλα ελιάς, υδρολύεται και διασπάται στα επιμέρους συστατικά της. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αυτή η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω υδρολυτικών ενζύμων, όπου σε ένα πρώτο στάδιο, η β-γλυκοσιδάση μπορεί να διασπάσει το γλυκοσιδικό δεσμό και να απομακρυνθεί η γλυκόζη από το μόριο της ελευρωπαΐνης ώστε να σχηματιστεί το άγλυκο της ελευρωπαΐνης, και σε ένα δεύτερο στάδιο, η λιπάση, μπορεί να υδρολύσει το άγλυκο της ελευρωπαΐνης και έτσι να σχηματιστεί η

υδροξυτυροσόλη και το ελενολικό οξύ.

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η ενζυμική τροποποίηση του υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς μέσω της δράσης του συν-ακινητοποιημένου νανοβιοκαταλυτικού συστήματος  $\beta$ -γλυκοσιδάσης από *Thermotoga maritima* – λιπάσης από *Candida antarctica* σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου, το οποίο είχε παρασκευαστεί σε προηγούμενη εργασία (Giannakopoulou, A., et. al., 2021). Η **Εικόνα 27** απεικονίζει τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) που αντιστοιχεί στην έναρξη (**Εικόνα 27A**) και στο τέλος (**Εικόνα 27B**) της αντίδρασης ενζυμικής τροποποίησης του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς από το δι-ενζυμικό σύστημα. Η κύρια ένωση που παρατηρείται κατά την έναρξη της αντίδρασης είναι η ελευρωπαΐνη με μεγαλύτερη κορυφή να εμφανίζεται σε χρόνο έκλουσης 25.13 min, ενώ η κορυφή με χρόνο έκλουσης 5.55 min, αντιστοιχεί στην υδροξυτυροσόλη που υπάρχει στο εκχύλισμα. Μετά το τέλος της αντίδρασης, φαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην ελευρωπαΐνη να έχει μειωθεί, ενώ η κορυφή που αντιστοιχεί στην υδροξυτυροσόλη έχει αυξηθεί. Η ταυτοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με βάση το φάσμα απορρόφησης τους στα 280 nm (**Εικόνα 28**). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς εμπλουτίστηκε επιτυχώς σε υδροξυτυροσόλη, εφόσον ένα μέρος της ελευρωπαΐνης μετατράπηκε από το δι-ενζυμικό σύστημα σε υδροξυτυροσόλη. Παρόμοιες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για τη βιομετατροπή της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη, όπου για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιείται η αναλυτική τεχνική HPLC. Μία μελέτη αφορά την χημειο-ενζυμική υδρόλυση της ελευρωπαΐνης, όπου αρχικά πραγματοποιήθηκε υδρόλυση της ελευρωπαΐνης μέσω του ενζύμου  $\beta$ -γλυκοσιδάση από τον μικροοργανισμό *Thermotoga maritima* και σε ένα μετέπειτα μη ενζυμικό βήμα απομακρύνθηκε ο βιοκαταλύτης και αυξήθηκε το pH και η θερμοκρασία (60 °C για 1 ώρα σε pH 7) για να επιτευχθεί περαιτέρω απελευθέρωση της υδροξυτυροσόλης (Chatzikonstantinou A. V. et al., 2019). Επίσης, σε μία άλλη μελέτη περιγράφεται η βιομετατροπή της ελευρωπαΐνης από διαφορετικά ένζυμα, από τα οποία τη βέλτιστη απόδοση απέδωσαν τα ένζυμα ημικυτταρινάση, κυτταρινάση και  $\beta$ -γλυκοσιδάση (Yuan J. et al., 2015).



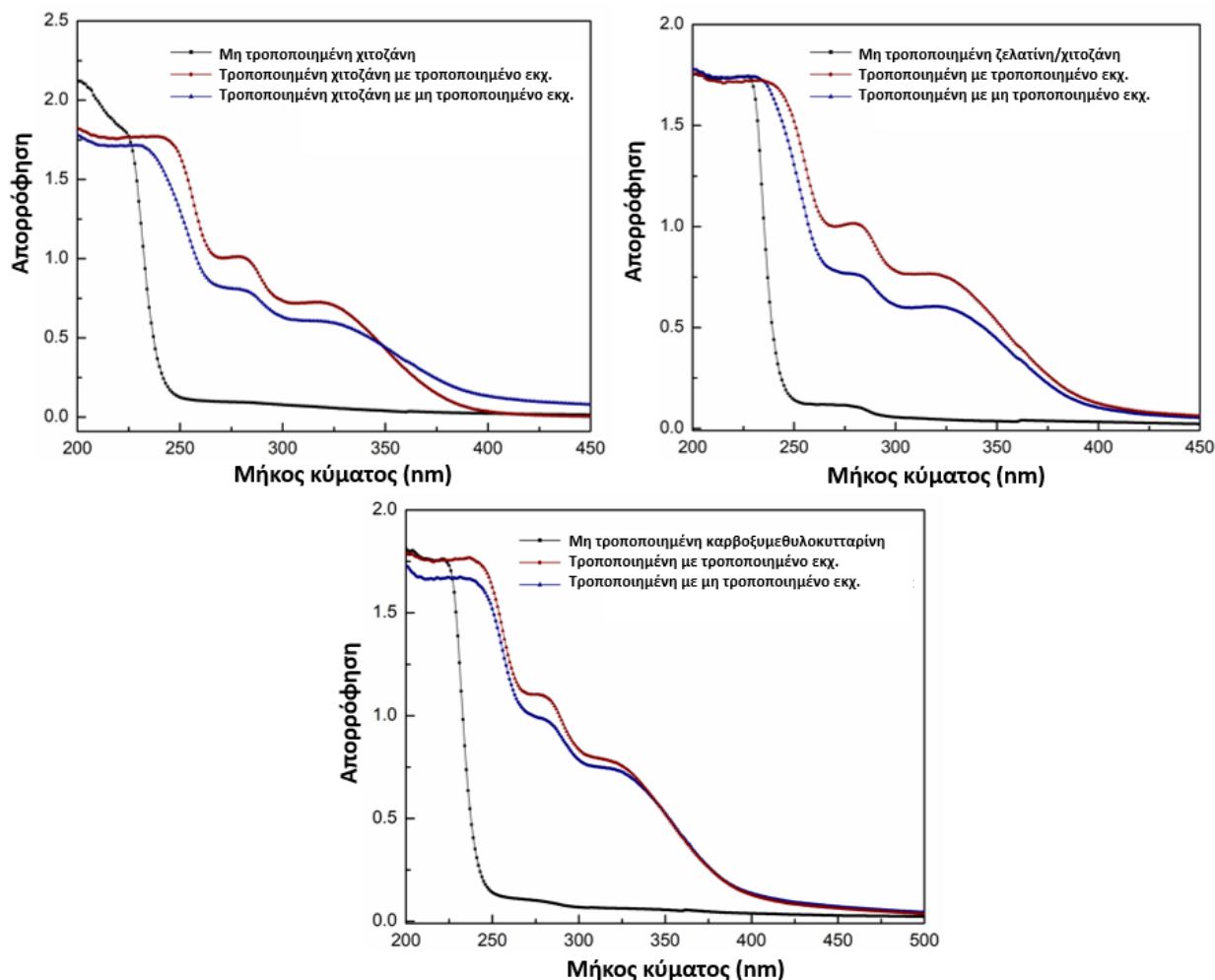
**Εικόνα 27:** Χρωματογράφημα της αντίδρασης ενζυμικής τροποποίησης του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς από το δι-ενζυμικό σύστημα. (Α) έναρξη της αντίδρασης, (Β) τερματισμός της αντίδρασης (24 ώρες).



**Εικόνα 28:** Φάσμα απορρόφησης στα 280 nm (A) της ελευρωπαϊκής, (B) της υδροξυτυροσόλης.

## 7.2 Χαρακτηρισμός των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Η πιο άφθονη ένωση στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς είναι η ελευρωπαϊνή, ακολουθούμενη από την υδροξυτυροσόλη, τους φλαβονο-7-γλυκοζίτες της λουτεολίνης και της απιγενίνης και τη βερμπασκοσίδη. Η βερμπασκοσίδη είναι ένας συζευγμένος γλυκοζίτης υδροξυτυροσόλης και καφεϊκού οξέος (Benavente-García, O., et. al., 2000). Στην **Εικόνα 29** παρουσιάζονται τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας των μη τροποποιημένων πολυμερών και των τροποποιημένων πολυμερών με εμπλουτισμένο και μη εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσόλη (α) πολυμερές χιτοζάνη, (β) πολυμερές ζελατίνη/χιτοζάνη, (γ) πολυμερές καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη. Τα μη τροποποιημένα πολυμερή δεν εμφανίζουν κάποια διακριτή κορυφή στο εύρος 200-400 nm. Ωστόσο, στα φάσματα των τροποποιημένων φιλμ παρατηρούνται δύο χαρακτηριστικές κορυφές στα 280 nm και 325 nm. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν το χαρακτηρισμό εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, αυτές οι κορυφές αντιστοιχούν στις κύριες φαινολικές ενώσεις που εμπριέχονται σε αυτό. Συγκεκριμένα, η κορυφή στα 280 nm αντιστοιχεί στην ελευρωπαϊνή και την υδροξυτυροσόλη, ενώ η κορυφή στα 325 nm αντιστοιχεί στους αβον-7-γλυκοζίτες της λουτεολίνης και της απιγενίνης και τη βερμπασκοσίδη (Da Silva, et. al., 2019). Μεταξύ των φασμάτων των τροποποιημένων φιλμ με το εμπλουτισμένο ή μη εκχύλισμα δεν διακρίνονται σημαντικές διαφορές, πέραν της ελαφρώς υψηλότερης απορρόφησης των φασμάτων των φιλμ με το τροποποιημένο εκχύλισμα που μπορεί να οφείλεται στην ποσότητα της υδροξυτυροσόλης που αυξάνεται κατά την τροποποίηση του εκχυλίσματος.



**Εικόνα 29:** Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των διαλυτοποιημένων, σε 1% v/v υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, μη τροποποιημένων και τροποποιημένων φιλμ με τροποποιημένο και μη τροποποιημένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς. (Α) Φιλμ χιτοζάνης τροποποιημένο με εκχύλισμα φύλλων ελιάς, (Β) Φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης τροποποιημένο με εκχύλισμα φύλλων ελιάς, (Γ) Φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης τροποποιημένο με εκχύλισμα φύλλων ελιάς.

### 7.3 Μελέτη βιολογικής δράσης τροποποιημένων φιλμ με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς

#### 7.3.1 Αντιοξειδωτική δράση τροποποιημένων φιλμ με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς

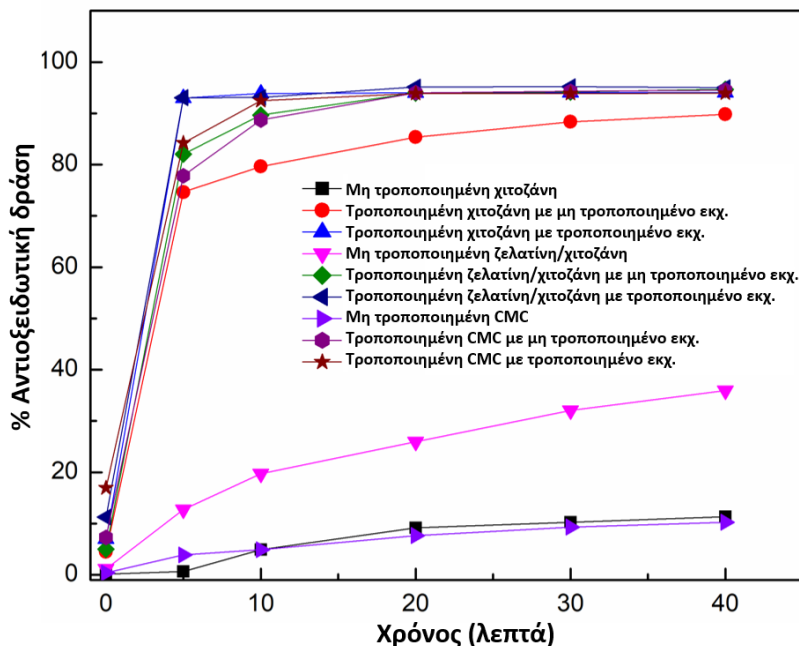
##### 2.3.1.1 Μέθοδος του οξειδωμένου ABTS

Εφόσον πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η τροποποίηση των φιλμ με το ενζυμικά εμπλουτισμένο σε υδροξυτυροσόλη εκχύλισμα φύλλων ελιάς ακολούθησε η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής του δράσης και η σύγκριση της με το φιλμ που τροποποιήθηκε με εκχύλισμα φύλλων ελιάς, μη εμπλουτισμένο σε υδροξυτυροσόλη. Αρχικά, η αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων και



μη τροποποιημένων με τα εκχυλίσματα φιλμ, εκτιμήθηκε με τη μέθοδο του οξειδωμένου ABTS και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 7**. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αντιοξειδωτική δράση των φαινολών εξαρτάται από τη θέση και τον αριθμό των υδροξυλομάδων που φέρουν στον φαινολικό τους δακτύλιο (Tricoli et al., 2005). Συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται με τη αύξηση του αριθμού των υδροξυλομάδων, καθώς οι ομάδες αυτές λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων και οδηγούν σε ένα σταθερό προϊόν ρίζας, άρα και καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (Xie et al., 2015). Πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν δείξει ότι τόσο η υδροξυτυροσόλη όσο και η ελευρωπαΐνη εμφανίζουν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση (Nenadis and Tsimidou, 2002; Visioli et al., 1998). Ωστόσο, η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει σχεδόν τρεις φορές ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από την ελευρωπαΐνη, το οποίο οφείλεται στην παρουσία του γλυκοζυλιωμένου ελενολικού οξέος στην δεύτερη, με αποτέλεσμα την στερεοχημική παρεμπόδιση της διάθεσης του δεύτερου ατόμου Η του τμήματος της υδροξυτυροσόλης (Visioli et al., 1998). Επομένως, γι' αυτό το λόγο αξίζει να μελετηθεί ο ενζυμικός εμπλουτισμός των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσόλη και να διερευνηθούν οι βελτιωμένες ιδιότητες τους.

Όπως φαίνεται από το **Γράφημα 7**, τα ενζυμικά τροποποιημένα φιλμ τόσο με τροποποιημένο όσο και με μη τροποποιημένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς φαίνεται να έχουν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα μη τροποποιημένα φιλμ χιτοζάνης, ζελατίνης/χιτοζάνης και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα φιλμ που έχουν τροποποιηθεί με το εμπλουτισμένο σε υδροξυτυροσόλη εκχύλισμα φαίνεται να έχουν ελαφρώς αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα φιλμ που τροποποιήθηκαν με το μη τροποποιημένο εκχύλισμα, το οποίο αποδίδεται στην μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης έναντι της ελευρωπαΐνης.



**Γράφημα 7:** % Αντιοξειδωτική δράση των μη τροποποιημένων φιλμ, των τροποποιημένων φιλμ με τροποποιημένο ή μη εκχύλισμα φύλλων ελιάς με το πρωτόκολλο του οξειδωμένου ABTS, συναρτήσει του χρόνου. (Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 5% σε όλες τις περιπτώσεις).

### 7.3.1.2. Μέθοδος DPPH

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ με τροποποιημένο ή μη τροποποιημένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH•. Οι τιμές SC<sub>50</sub> των υπό μελέτη δειγμάτων φαίνονται στον **Πίνακα 5**. Σε όλες τις περιπτώσεις, όπως είναι αναμενόμενο, φαίνεται ότι τα μη τροποποιημένα φιλμ εμφάνισαν την χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, παρατηρείται ότι το φιλμ χιτοζάνης που τροποποιήθηκε με το εμπλουτισμένο σε υδροξυτυροσόλη εκχύλισμα φύλλων ελιάς φαίνεται να έχεις τρεις φορές υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και τα φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης δύο φορές υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα αντίστοιχα φιλμ που τροποποιήθηκαν με το μη εμπλουτισμένο εκχύλισμα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης είναι μεγαλύτερη από αυτή της ελευρωπαϊνης και γι' αυτό το λόγο παρατηρείται αυτή η διαφορά στις τιμές SC<sub>50</sub>. Σε μία μελέτη όπου πραγματοποιήθηκε ενζυμική τροποποίηση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με διάφορα υδρολυτικά ένζυμα αυξήθηκε σημαντικά η αντιοξειδωτική τους δράση μετά την τροποποίηση (Hamza et al., 2012). Επίσης, σε μία αντίστοιχη μελέτη, όπου το εκχύλισμα φύλλων ελιάς τροποποιήθηκε

χημειο-ενζυμικά, παρόλο που η συνολική περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε φαινόλες μειώθηκε κατά 6%, η αντιοξειδωτική του δράση ήταν 20% υψηλότερη σε σύγκριση με το μη τροποποιημένο εκχύλισμα. Αυτό οφείλεται τόσο στον εμπλουτισμό του εκχυλίσματος σε υδροξυτυροσόλη, όσο και σε άλλες ενώσεις που προκύπτουν από την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης, όπως η το άγλυκο της ελευρωπαΐνης, το οποίο είναι επίσης γνωστό για την αντιοξειδωτική του ικανότητα (Chatzikonstantinou V. Alexandra, et. al., 2022). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, καθώς και οι βιολογικές τους δράσεις, εξαρτώνται όχι μόνο από την περιεκτικότητά τους σε συγκεκριμένες ενώσεις αλλά και από τη συνεργιστική δράση της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά (Ziogas et al. 2010; Xie et. al. 2015).

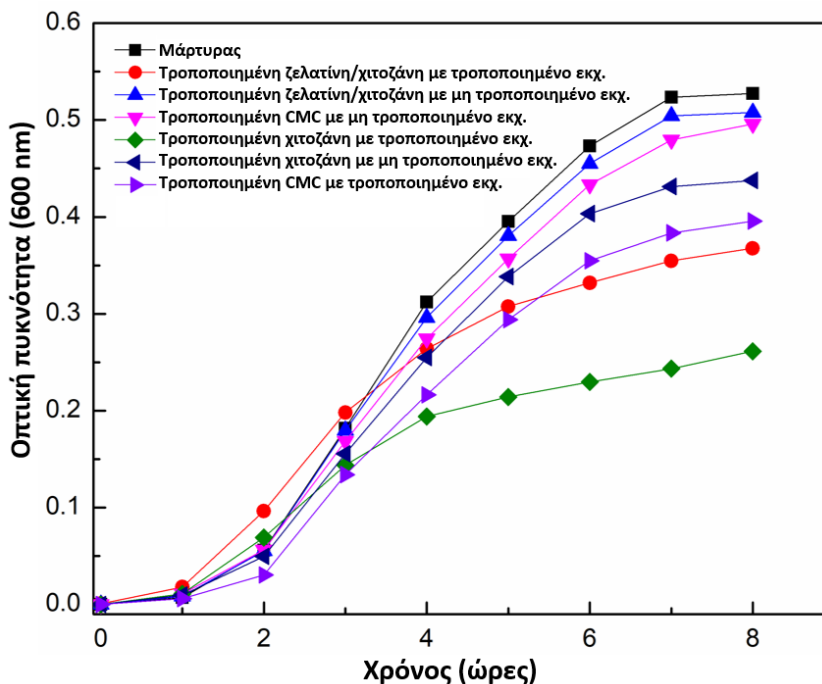
**Πίνακας 5:** Τιμές SC<sub>50</sub> (mg/mL) για τα ενζυμικά τροποποιημένα φιλμ με το τροποποιημένο και μη τροποποιημένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς σύμφωνα με τη μέθοδο DPPH. (Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 5% σε όλες τις περιπτώσεις.)

	Χιτοζάνη SC <sub>50</sub> (mg/ml)	Ζελατίνη/χιτοζάνη SC <sub>50</sub> (mg/ml)	Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη SC <sub>50</sub> (mg/ml)
Μη τροποποιημένο φιλμ	70	36	74
Φιλμ με μη τροποποιημένο εκχύλισμα	6	12	19
Φιλμ με τροποποιημένο εκχύλισμα	2	7	10

### 7.3.2 Αντιμικροβιακή δράση τροποποιημένων φιλμ με το εκχύλισμα φύλλων ελιάς

Η αντιμικροβιακή δράση των τροποποιημένων φιλμ με το τροποποιημένο και μη τροποποιημένο υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς αξιολογήθηκε έναντι του κατά Gram αρνητικού βακτηρίου *E. coli*. Τα εκχύλισματα φύλλων ελιάς είναι γνωστό ότι εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες λόγω της πλούσιας περιεκτικότητάς τους σε φαινολικές ενώσεις (Bojjan et al. 2020). Η αντιβακτηριακή δράση των υπό μελέτη δειγμάτων παρουσιάζεται στον **Γράφημα 8**. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα φιλμ που τροποποιήθηκαν με το εμπλουτισμένο σε υδροξυτυροσόλη εκχύλισμα φαίνεται να έχουν υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση από τα αντίστοιχα τροποποιημένα φιλμ με μη τροποποιημένο εκχύλισμα, με τη μεγαλύτερη δράση να παρουσιάζει το τροποποιημένο φιλμ χιτοζάνης. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, όπου έχει αναφερθεί ότι η

υδροξυτυροσόλη έχει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση από τη πρόδρομη ένωση της, την ελευρωπαΐνη, έναντι διαφόρων ανθρώπινων παθογόνων όπως το *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* και *Staphylococcus aureus*, επομένως η τροποποίηση των βιοπολυμερών με το εμπλουτισμένο σε υδροξυτυροσόλη εκχύλισμα εμφανίζει και υψηλότερη δράση (Bisignano et al., 1999). Παρόμοιες μελέτες επιβεβαιώνουν την υψηλή αντιμικροβιακή και πιο συγκεκριμένα αντιβακτηριακή δράση των υδατικών εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς (Pereira et al. 2007). Σε μία έρευνα, όπου μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση του χημειο-ενζυμικά τροποποιημένου και μη τροποποιημένου εκχυλίσματος φύλλων ελιάς έναντι των βακτηρίων *E. coli* και *Corynebacterium*, αποδείχθηκε ότι το τροποποιημένο εκχύλισμα είχε 6,9 και 3,4 φορές υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση από αυτή του μη τροποποιημένου, για τα δύο βακτήρια αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι πέρα από την υδροξυτυροσόλη και τα άλλα προϊόντα υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης, όπως το άγλυκο της ελευρωπαΐνης και το ελενολικό οξύ, χαρακτηρίζονται επίσης από υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τη πρόδρομη ένωση (Fleming et al. 1973, Soler-Rivas et al. 2000, Medina et al. 2007), υποδεικνύοντας ότι η ενισχυμένη αντιμικροβιακή δράση των φιλμ με το τροποποιημένο εκχύλισμα θα μπορούσε να αποδοθεί και στον σχηματισμό των προαναφερθέντων προϊόντων υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης.



**Γράφημα 8:** Καμπύλη ανάπτυξης των βακτηριακών πληθυσμών του στελέχους BL21DE3 μετά από 12 ώρες επώασης παρουσία των τροποποιημένων φιλμ με τροποποιημένο ή μη εκχύλισμα φύλλων ελιάς. (Η τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 5% σε όλες τις περιπτώσεις).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε με σκοπό την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών για την τροποποίηση των βιοπολυμερών χιτοζάνη, ζελατίνη/χιτοζάνη και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη με βιοδραστικές ενώσεις, τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν γι' αυτό το σκοπό είναι οι φαινολικές ενώσεις φερούλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, ελλαγικό οξύ, λουτεολίνη καθώς και το ενζυμικά τροποποιημένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς, τα οποία εμφανίζουν σημαντική βιολογική δράση όπως αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, νευροπροστατευτική, καρδιοπροστατευτική κ.α. Η τροποποίηση των βιοπολυμερών πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της λακάσης από τον μικροοργανισμό *Agaricus bisporous*, κατά την οποία οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται και τα παραγόμενα προϊόντα αναδιατάσσονται σε υψηλής δραστηριότητας κινόνες, οι οποίες σε ένα μετέπειτα μη ενζυμικό βήμα συνδέονται με χαρακτηριστικές ομάδες των βιοπολυμερών.

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των βιοπολυμερών χιτοζάνη, ζελατίνη/χιτοζάνη και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη και ύστερα πραγματοποιήθηκε η ενζυμική τροποποίηση τους με τις βιοδραστικές ενώσεις στις κατάλληλες συνθήκες. Επιπροσθέτως, παρασκευάστηκε το υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς, το οποίο τροποποιήθηκε ενζυμικά με το συν-ακίνητοποιημένο νανοβιοκαταλυτικού συστήματος β-γλυκοσιδάσης από *Thermotoga maritima* – λιπάσης από *Candida antarctica* σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου. Η παρακολούθηση της πορείας της ενζυμικής τροποποίησης του εκχυλίσματος ελέγχθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Έπειτα, το τροποποιημένο αλλά και μη τροποποιημένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς αξιοποιήθηκε για την ενζυμική τροποποίηση των βιοπολυμερών. Για τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων τροποποίησης των βιοπολυμερών με τις βιοδραστικές ενώσεις οι πορείες των αντιδράσεων παρακολούθηθηκαν φασματοσκοπικά μέσω λήψης φασμάτων ορατού-υπεριώδους (UV-vis). Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς τροποποίησης των πολυμερών με τις φαινολικές ενώσεις, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των ενζυμικά τροποποιημένων φιλμ με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους (UV-vis) και φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR/ATR). Αφού ελέγχθηκε η επιτυχής τροποποίηση των βιοπολυμερών, υπολογίστηκε το ποσοστό σύνδεσης των φαινολικών ενώσεων σε αυτά μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Σε ένα επόμενο βήμα, τα τροποποιημένα φιλμ ελέγχθηκαν ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες και έγινε σύγκριση με τα μη τροποποιημένα φιλμ. Γι' αυτό το σκοπό, προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων βιοπολυμερών με τις μεθόδους DPPH και του οξειδωμένου ABTS αλλά και η αντιμικροβιακή δράση έναντι του Gram<sup>-</sup> βακτηρίου *E.Coli*.

Αρχικά, ακολουθήθηκε η πορεία της τροποποίησης των βιοπολυμερών με τις φαινολικές ενώσεις φερουλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, ελλαγικό οξύ και λουτεολίνη μέσω της λήψης φασμάτων ορατού-υπεριώδους στο εύρος 200-800 nm. Σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρήθηκαν αλλαγές στα φάσματα UV κατά την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων, όπως μείωση ή μετατόπιση χαρακτηριστικών κορυφών αλλά και εμφάνιση νέων κορυφών, οι οποίες επιβεβαιώνουν των οξείδωση των φαινολικών ενώσεων. Οι αλλαγές αυτές επιβεβαιώνονται και από την αλλαγή χρώματος από άχρωμο σε πορτοκαλί που παρατηρείται αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου στο διάλυμα των αντιδράσεων. Στα αντίστοιχα διαλύματα ελέγχου δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο χρώμα, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία του ενζύμου είναι απαραίτητη για την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων και την επακόλουθη σύνδεση τους στα βιοπολυμερή.

Έπειτα προσδιορίστηκε το ποσοστό σύνδεσης των βιοδραστικών ενώσεων μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της ενζυμικής τροποποίησης των πολυμερών χιτοζάνη, ζελατίνη/χιτοζάνη και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η τροποποίηση ήταν επιτυχής στις περισσότερες περιπτώσεις, με τα υψηλότερα ποσοστά σύνδεσης (πάνω από 90%) να επιτυγχάνονται κατά την τροποποίηση της χιτοζάνης με το φερουλικό οξύ (95%) την υδροξυτυροσόλη (92%) και τη λουτεολίνη (94%), κατά την τροποποίηση του πολυμερούς ζελατίνη/χιτοζάνη με το φερουλικό οξύ (97%) και κατά την τροποποίηση της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με την υδροξυτυροσόλη (96%) και το ελλαγικό οξύ (90%).

Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR/ATR) για την ταυτοποίηση της ύπαρξης φαινολικών ενώσεων συνδεδεμένων στα φιλμ. Από τα φάσματα UV-Vis που λήφθηκαν παρατηρήθηκε ότι τα μη τροποποιημένα πολυμερή δεν εμφανίζουν κάποια χαρακτηριστική κορυφή στο εύρος 200-400 nm, ενώ από την άλλη πλευρά στα φάσματα των τροποποιημένων φιλμ εμφανίζονται χαρακτηριστικές κορυφές στη περιοχή 250-370 nm και στα 240 nm που υποδηλώνουν αρχικά την επιτυχή οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από τη λακκάση και στη συνέχεια την επιτυχή σύνδεση τους στα πολυμερή. Όσον αφορά την φασματοσκοπία υπερύθρου, οι αλλαγές που ανιχνεύονται στο φάσμα των τροποποιημένων και μη τροποποιημένων φιλμ, υποδηλώνουν ότι οι ενδιάμεσες ρίζες που προκύπτουν κατά στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων μπορούν να σταθεροποιηθούν μέσω αντιδράσεων σύζευξης C-C ή C-O, σχηματίζοντας δραστικές κινόνες, οι οποίες σε ένα μετέπειτα μη ενζυμικό βήμα μπορούν περαιτέρω να σταθεροποιηθούν αντιδρώντας με τις ελεύθερες ομάδες -OH και -NH<sub>2</sub> που υπάρχουν στη χιτοζάνη μέσω ομοιοπολικού δεσμού, με τις ελεύθερες -NH<sub>2</sub> που υπάρχουν στο υβριδικό πολυμερές

ζελατίνη/χιτοζάνη, είτε στη καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη πιθανώς μέσω του σχηματισμού εστερικών δεσμών.

Εφόσον διαπιστώθηκε ότι η σύνδεση των φαινολικών ενώσεων στα διάφορα πολυμερή ήταν επιτυχής, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των φιλμ που παρασκευάστηκαν, μέσω του πρωτοκόλλου του οξειδωμένου ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) και της μεθόδου DPPH. Τα ενζυμικά τροποποιημένα φιλμ, σε όλες τις περιπτώσεις, παρουσίασαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα μη τροποποιημένα φιλμ. Όσον αφορά τη μέθοδο ABTS, την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασε το φιλμ χιτοζάνης που τροποποιήθηκε με το φερουλικό οξύ (περίπου 90%), τα φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης που τροποποιήθηκαν με το φερουλικό οξύ και την υδροξυτυροσόλη (πάνω από 90%) και τα φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με τις τέσσερις φαινολικές ενώσεις (πάνω από 80%). Όσον αφορά τη μέθοδο DPPH, τα φιλμ χιτοζάνης τροποποιημένα με φερουλικό οξύ και λουτεολίνη και το φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με φερουλικό οξύ εμφανίζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το αντίστοιχο μη τροποποιημένο φιλμ, που είναι περίπου έξι φορές μεγαλύτερη.

Επίσης, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των τροποποιημένων φιλμ έναντι του βακτηριακού στελέχους BL21DE3. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι τα μη τροποποιημένα φιλμ χιτοζάνης και ζελατίνης/χιτοζάνης παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση, ενώ το μη τροποποιημένο φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης παρουσιάζει σχεδόν μηδενική αντιμικροβιακή δράση. Όλα τα ενζυμικά τροποποιημένα φιλμ με τις φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν ίση ή μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση συγκριτικά με τα μη τροποποιημένα φιλμ, με την υψηλότερη δράση να εμφανίζεται στα τροποποιημένα φιλμ χιτοζάνης με φερουλικό οξύ και ζελατίνης/χιτοζάνης με φερουλικό οξύ και υδροξυτυροσόλη.

Όσον αφορά την ενζυμική τροποποίηση του εκχύλισματος φύλλων ελιάς με το δι-ενζυμικό σύστημα  $\beta$ -γλυκοσιδάσης από *Thermotoga maritima* – λιπάσης από *Candida antarctica*, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μιγμάτων πριν και μετά την αντίδρασης τροποποίησης μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Από τη λήψη των φασμάτων πριν και μετά την αντίδραση, παρατηρείται ότι η κορυφή που αντιστοιχεί στην ελευρωπαΐνη μειώνεται μετά το τέλος της αντίδρασης, ενώ η κορυφή της υδροξυτυροσόλης αυξάνεται σημαντικά, υποδηλώνοντας ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς εμπλουτίστηκε επιτυχώς σε υδροξυτυροσόλη. Ύστερα το εμπλουτισμένο εκχύλισμα αξιοποιήθηκε για την ενζυμική τροποποίηση των βιοπολυμερών ενώ ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων φιλμ πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας UV-vis. Τα μη τροποποιημένα πολυμερή δεν εμφανίζουν κάποια διακριτή κορυφή, ενώ στα φάσματα των τροποποιημένων φιλμ παρατηρούνται χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες

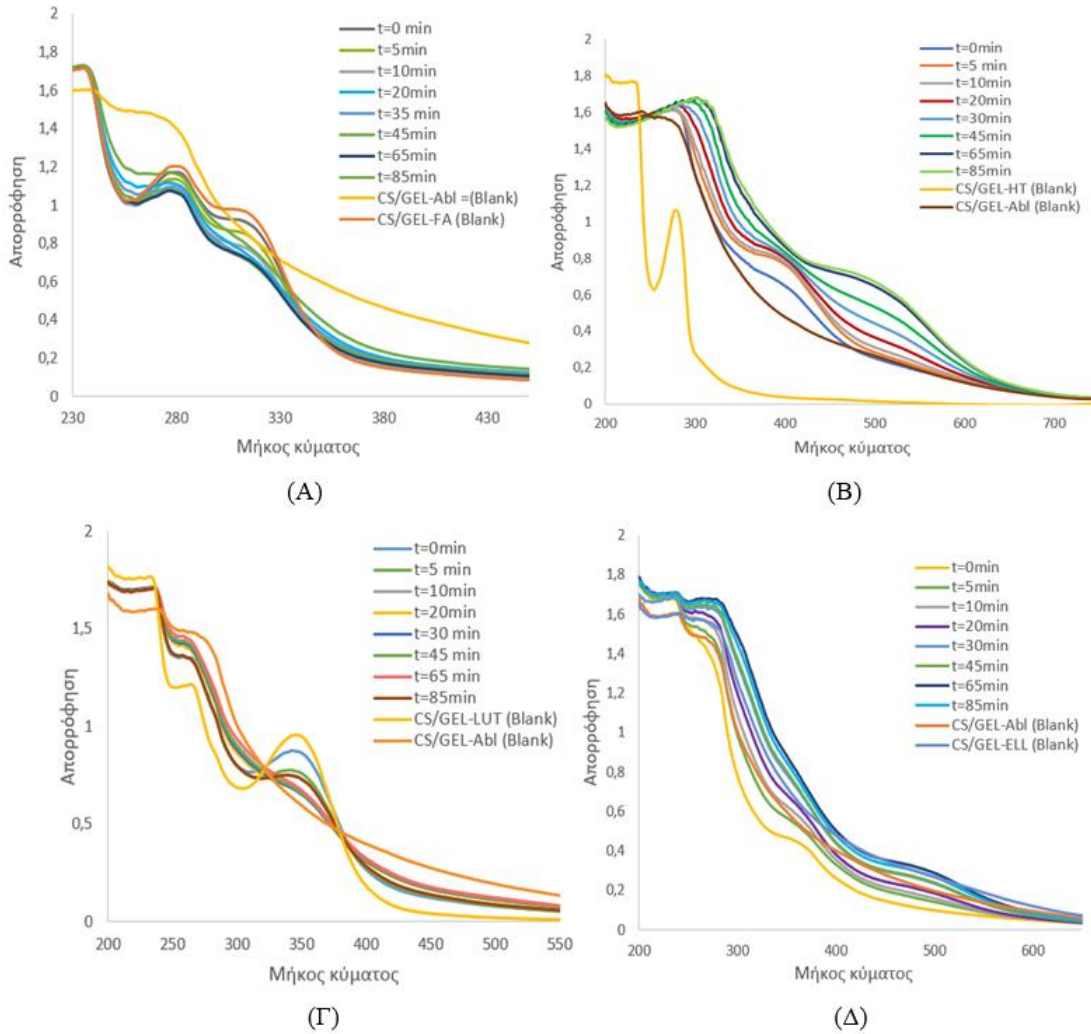
πιθανότητα αντιστοιχούν στις κύριες φαινολικές ενώσεις που εμπεριέχονται στο εκχύλισμα, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή τροποποίηση τους. Μεταξύ των φασμάτων των τροποποιημένων φιλμ με το εμπλουτισμένο ή μη εκχύλισμα διακρίνεται μία ελαφρώς υψηλότερη απορρόφηση στα φάσματα με το τροποποιημένο εκχύλισμα που μπορεί να οφείλεται στην ποσότητα της υδροξυτυροσόλης που αυξάνεται κατά την τροποποίηση του εκχυλίσματος.

Ακολούθως, διερευνήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των φιλμ που τροποποιήθηκαν με το εμπλουτισμένο και μη εκχύλισμα με τη μέθοδο ABTS και DPPH, όπου τα ενζυμικά τροποποιημένα φιλμ τόσο με τροποποιημένο όσο και με μη τροποποιημένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς έχουν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα μη τροποποιημένα φιλμ. Επίσης, τα φιλμ που έχουν τροποποιηθεί με το εμπλουτισμένο σε υδροξυτυροσόλη εκχύλισμα έχουν ελαφρώς μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα φιλμ που τροποποιήθηκαν με το μη εμπλουτισμένο εκχύλισμα, πιθανώς λόγω της παρουσίας υψηλότερης συγκέντρωσης υδροξυτυροσόλης στα πρώτα. Όσον αφορά τις αντιμικροβιακές μελέτες, σε όλες τις περιπτώσεις τα φιλμ που τροποποιήθηκαν με το εμπλουτισμένο σε υδροξυτυροσόλη εκχύλισμα φαίνεται να έχουν υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση από τα αντίστοιχα τροποποιημένα φιλμ με το μη εμπλουτισμένο εκχύλισμα, με τη μεγαλύτερη δράση να παρουσιάζει το τροποποιημένο φιλμ χιτοζάνης. Επομένως, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η επιτυχής τροποποίηση των πολυμερών με όλες τις βιοδραστικές ενώσεις που μελετήθηκαν οδηγεί στη δημιουργία καινοτόμων βιολικών με βελτιωμένες ιδιότητες για την αξιοποίηση τους σε πλήθος βιοϊατρικών εφαρμογών.



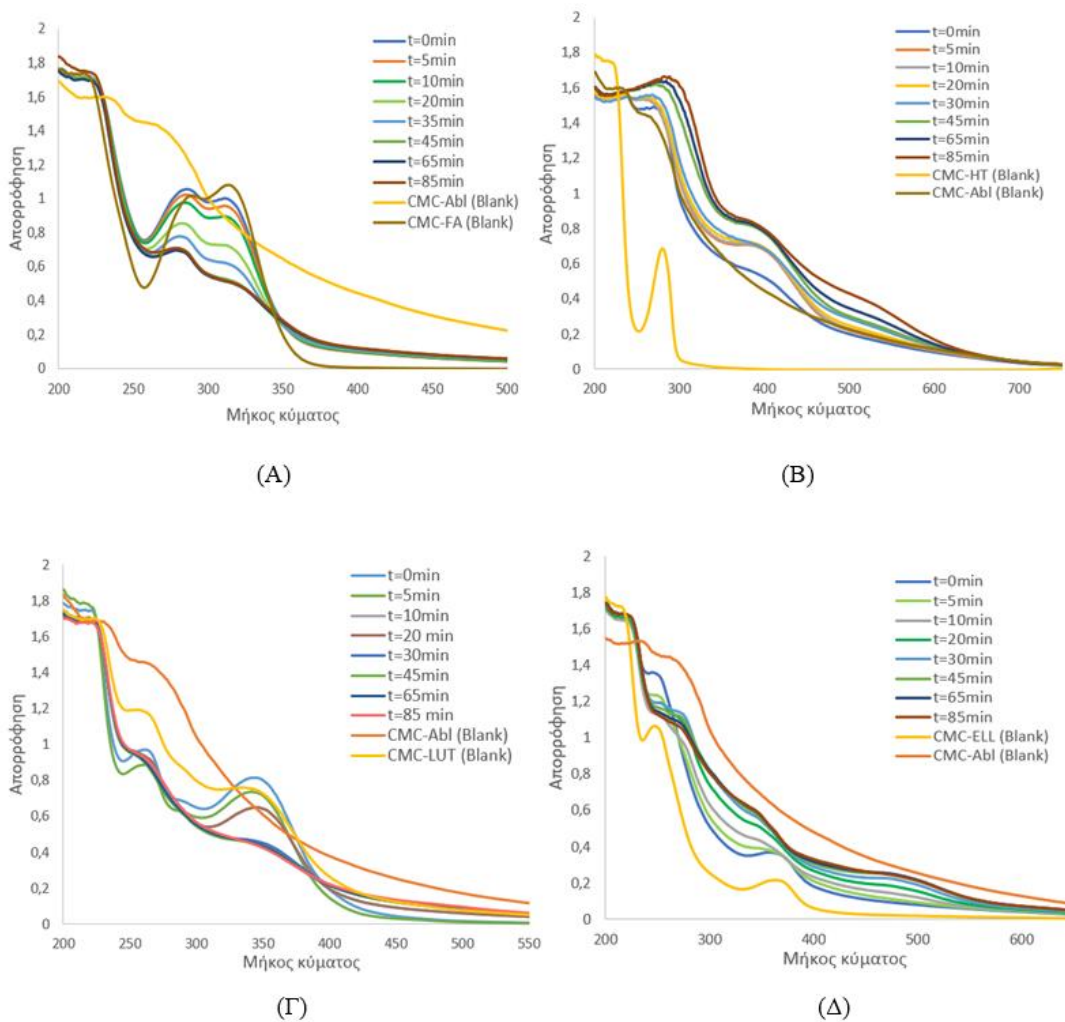
## Παράρτημα

1) Παρακολούθηση πορείας της ενζυμικής αντίδρασης τροποποίησης της ζελατίνης/ χιτοζάνης με τις φαινολικές ενώσεις



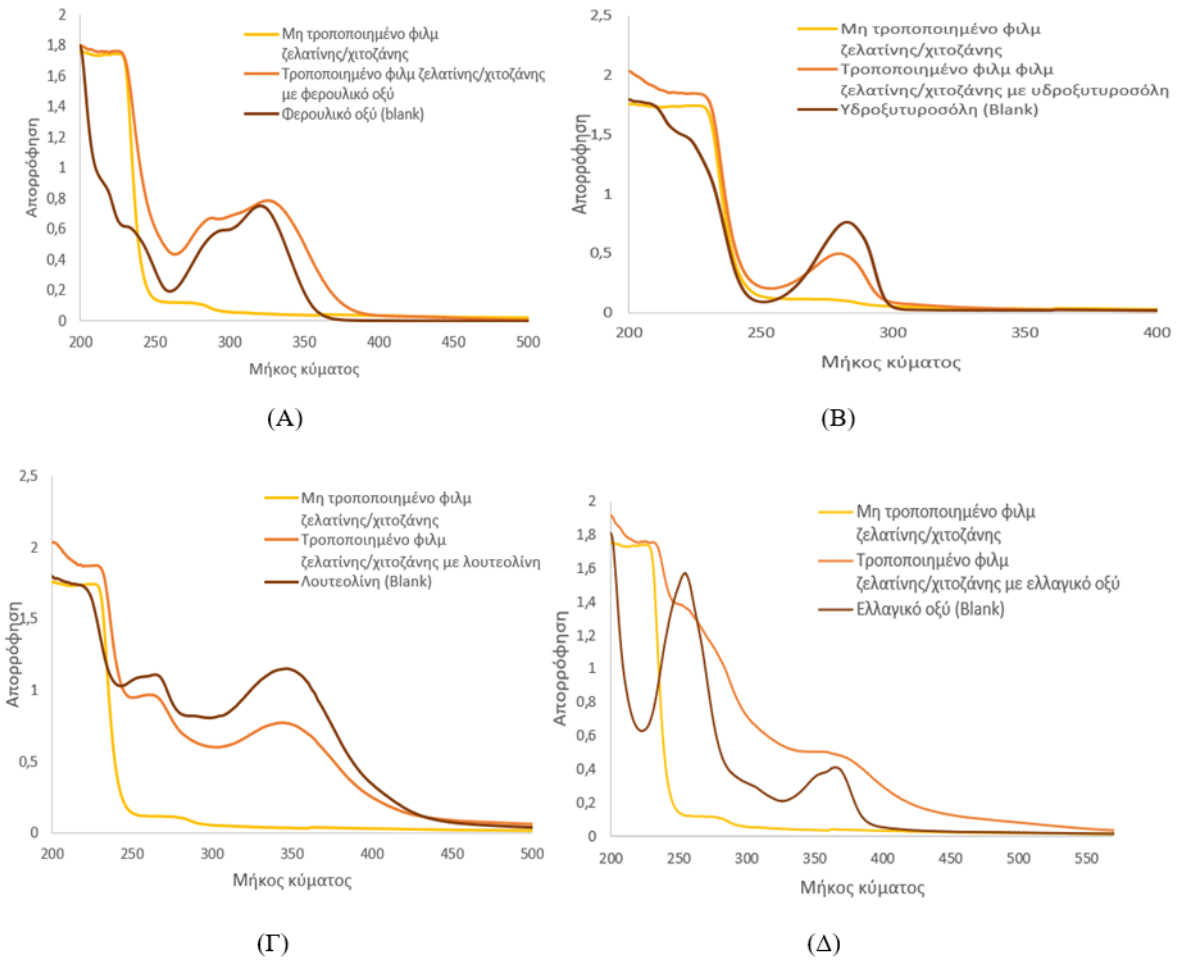
**Εικόνα 30:** Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) της πορείας αντίδρασης τροποποίησης της ζελατίνης/χιτοζάνης με τις φαινολικές ενώσεις. (Α) Τροποποίηση ζελατίνης/χιτοζάνης με φερουλικό οξύ, (Β) Τροποποίηση ζελατίνης/χιτοζάνης με υδροξυτυροσώλη, (Γ) Τροποποίηση ζελατίνης/χιτοζάνης με λουτεολίνη, (Δ) Τροποποίηση ζελατίνης/χιτοζάνης με ελλαγικό οξύ.

2) Παρακολούθηση πορείας της ενζυμικής αντίδρασης τροποποίησης της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με τις φαινολικές ενώσεις



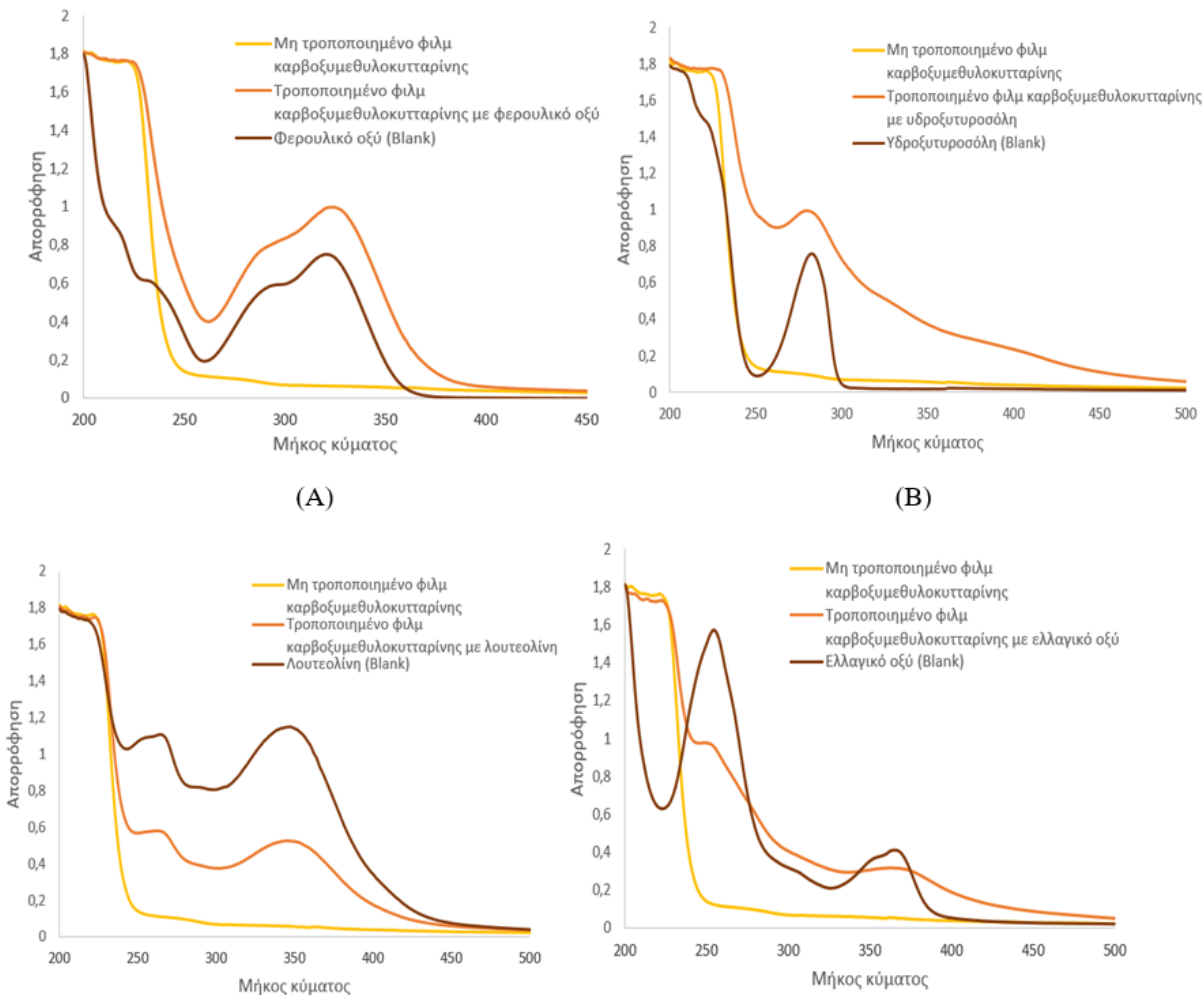
**Εικόνα 31:** Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) της πορείας αντίδρασης τροποποίησης της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με τις φαινολικές ενώσεις. (Α) Τροποποίηση καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με φερουλικό οξύ, (Β) Τροποποίηση καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με υδροξυτυροσόλη, (Γ) Τροποποίηση καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με λουτεολίνη, (Δ) Τροποποίηση καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με ελλαγικό οξύ.

3) Χαρακτηρισμός μεμβρανών τροποποιημένης ζελατίνης/χιτοζάνης με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)



**Εικόνα 32:** Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των διαλυτοποιημένων, σε 1% v/v υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, τροποποιημένων φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης καθώς και των επιμέρους συστατικών τους.

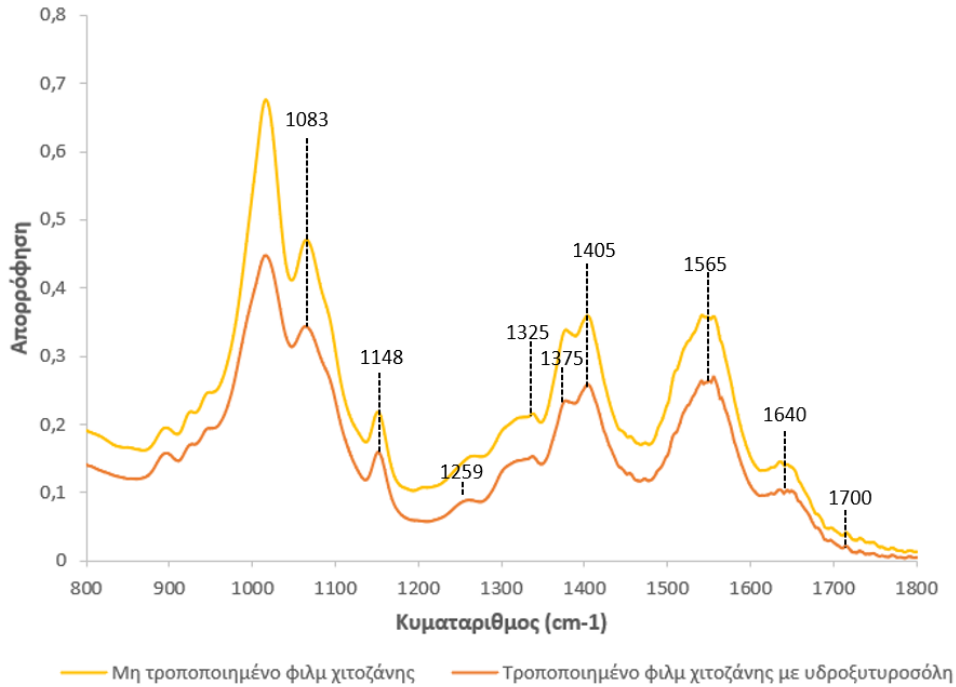
#### 4) Χαρακτηρισμός μεμβρανών τροποποιημένης καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)



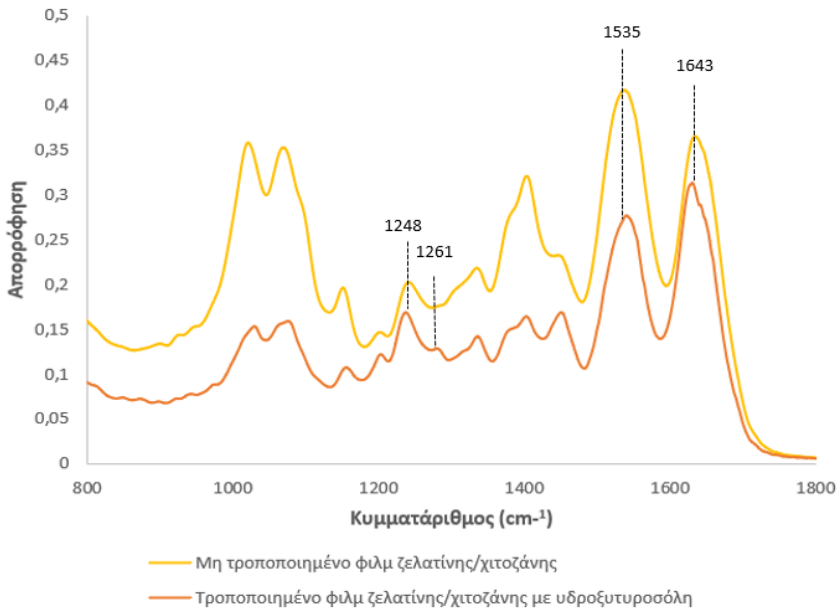
**Εικόνα 33:** Φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) των διαλυτοποιημένων, σε 1% v/v υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, τροποποιημένων φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης καθώς και των επιμέρους συστατικών τους. (Α) Φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης τροποποιημένο με φερουλικό οξύ, (Β) Φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης τροποποιημένο με υδροξυτυροσόλη, (Γ) Φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης τροποποιημένο με λουτεολίνη, (Δ) Φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης τροποποιημένο με ελλαγικό οξύ.

## 5) Χαρακτηρισμός των τροποποιημένων φιλμ με φασματοσκοπία υπερύθρου (ATR)

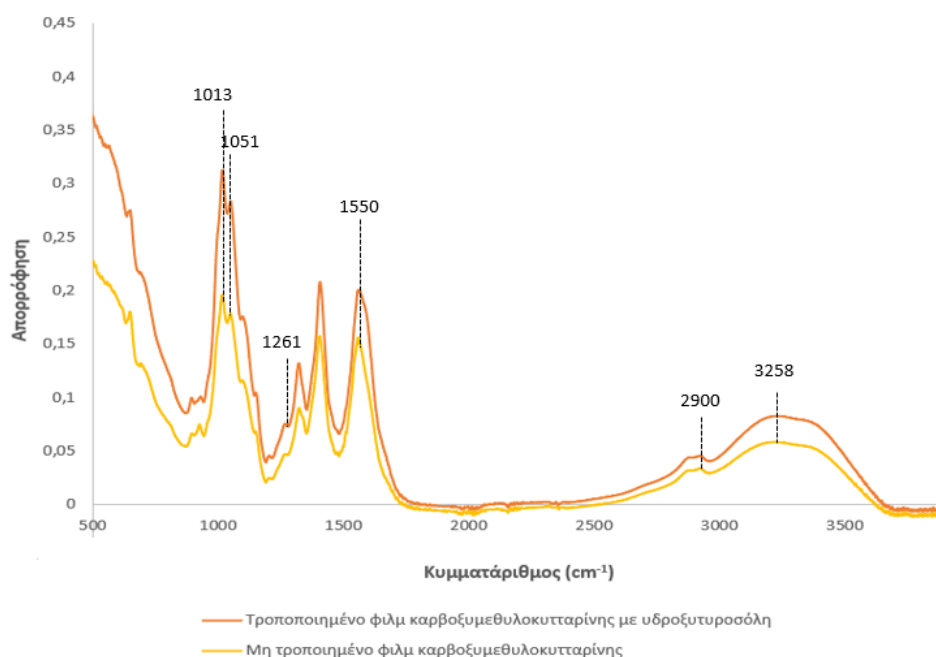
### A) Υδροξυτυροσώλη



**Γράφημα 9:** Φάσμα υπερύθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης με υδροξυτυροσώλη.

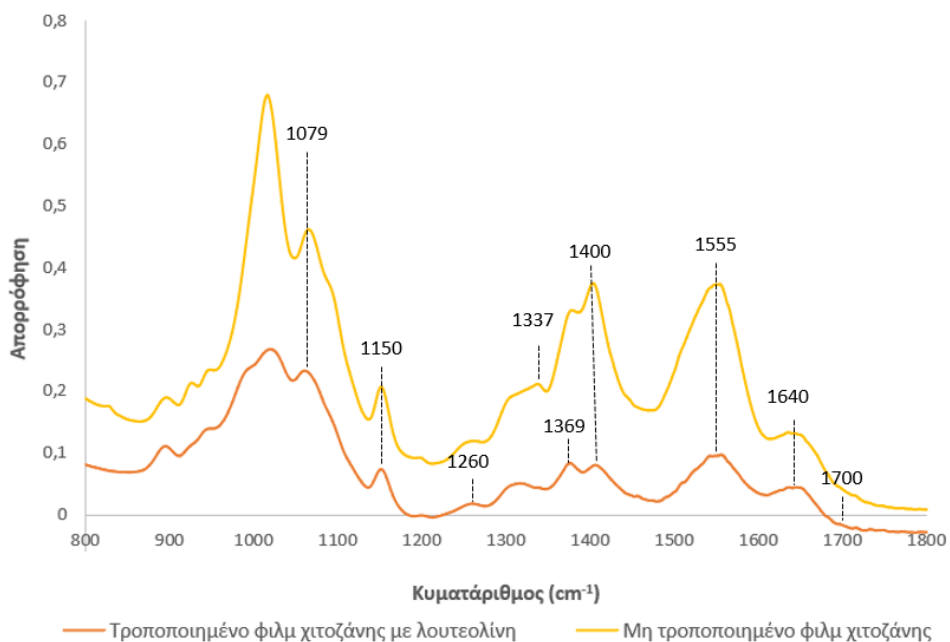


**Γράφημα 10:** Φάσμα υπερύθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης με υδροξυτυροσώλη.

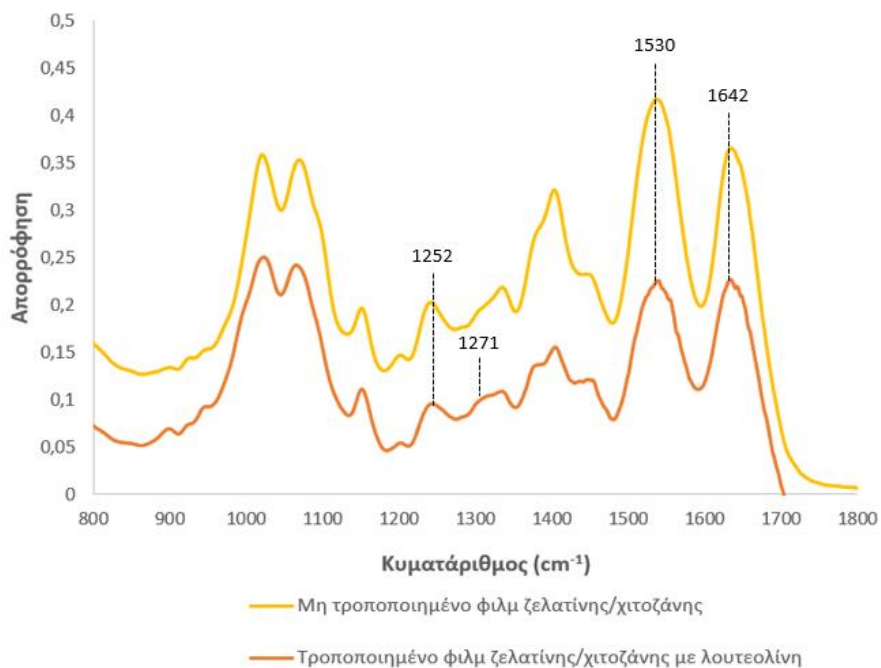


**Γράφημα 11:** Φάσμα υπεράθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με υδροξυτυροσόλη.

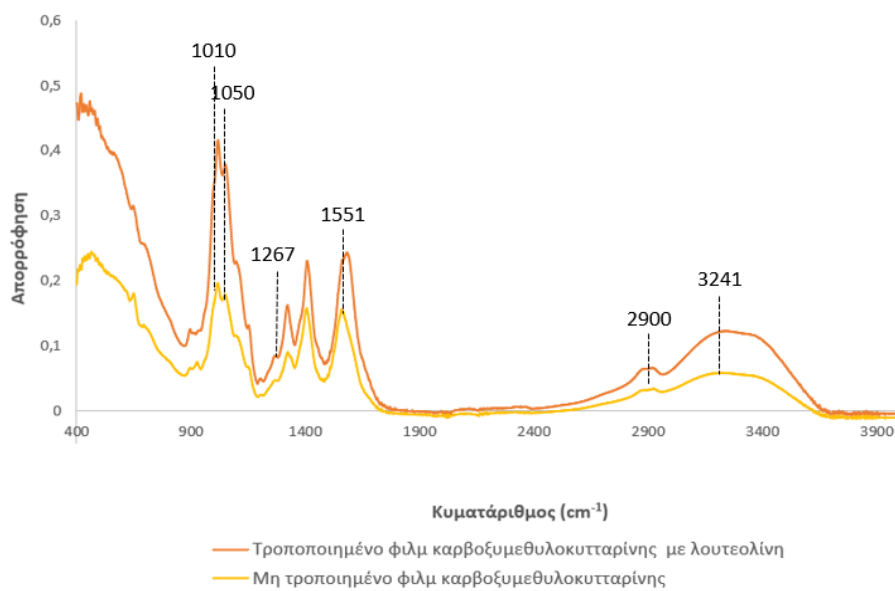
## Β) Λουτεολίνη



**Γράφημα 12:** Φάσμα υπεράθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης με λουτεολίνη

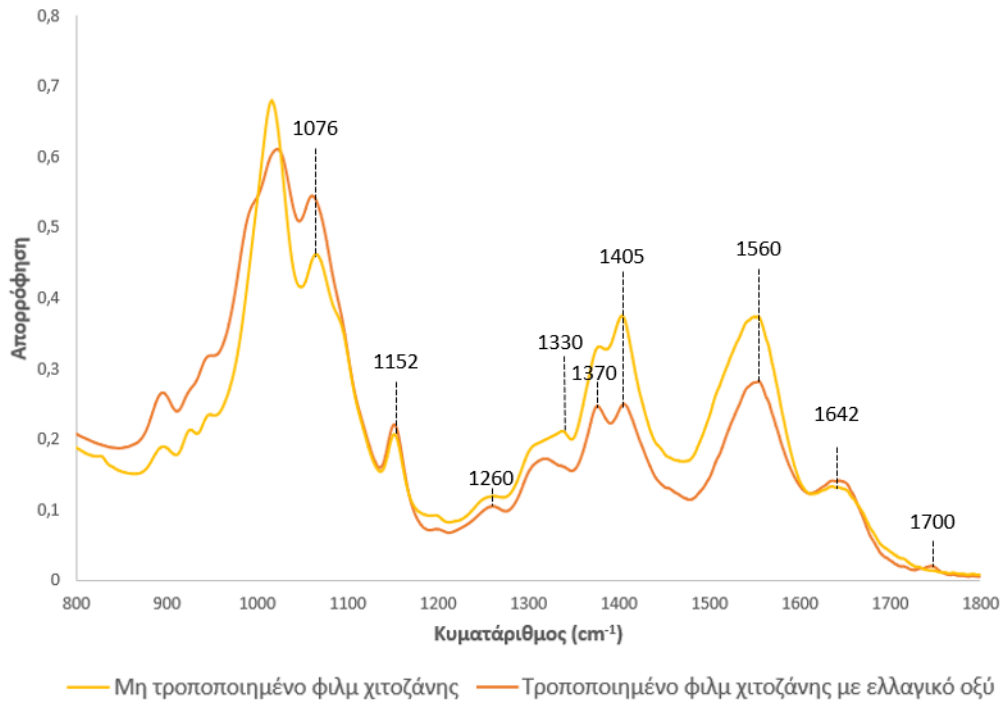


**Γράφημα 13:** Φάσμα υπερίθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης με λουτεολίνη.

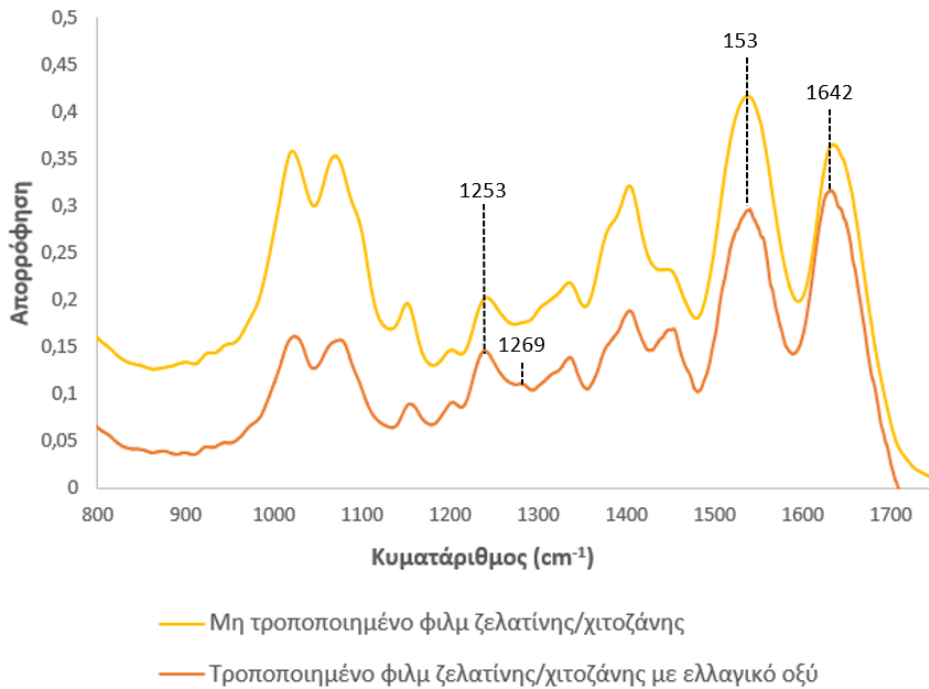


**Γράφημα 14:** Φάσμα υπερίθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με λουτεολίνη.

### Γ) Ελλαγικό οξύ



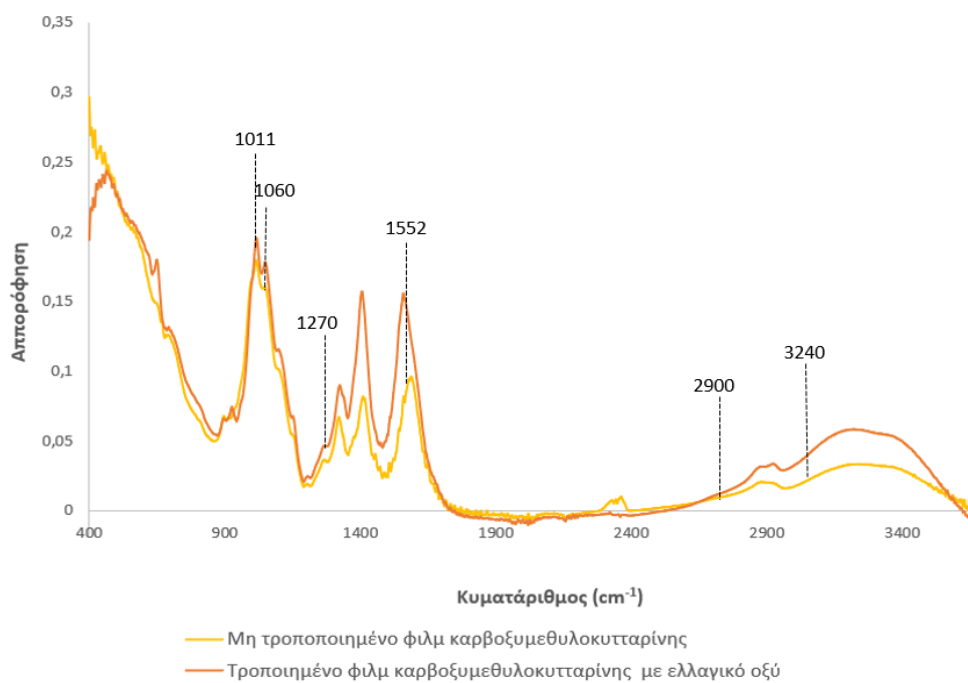
**Γράφημα 15:** Φάσμα υπερόθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ χιτοζάνης με ελλαγικό οξύ.



**Γράφημα 16:** Φάσμα υπερόθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης και ενζυμικά



τροποποιημένου φιλμ ζελατίνης/χιτοζάνης με ελλαγικό οξύ.



**Γράφημα 17:** Φάσμα υπερώθρου (ATR) του μη τροποποιημένου φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης και ενζυμικά τροποποιημένου φιλμ καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης με ελλαγικό οξύ.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **ΒΙΒΛΙΑ**

- ❖ Σταμάτης Χ., (2016), Ενζυμική Βιοτεχνολογία Με Στοιχεία Νανοβιοτεχνολογίας, Ιωάννινα
- ❖ Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jacker Parker, (2005), Biology of microorganism

### **ΑΡΘΡΑ**

- Aewsiri, T., Benjakul, S., Visessanguan, W., Eun, J.-B., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin modified by oxidised phenolic compounds. *Food Chemistry*, 2009, 117(1), 160–168
- Afanas, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V. et al., (1989). Chelating and free radicalscavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38,1763-1769
- Akl, E. M., Dacrory, S., Abdel-Aziz, M. S., Kamel, S., & Fahim, A. M. Preparation and characterization of novel antibacterial blended films based on modified carboxymethyl cellulose/phenolic compounds. *Polymer Bulletin*, 2020
- Alexandra L. Rutz and Ramille N. Shah, Protein-Based Hydrogels, Polymeric Hydrogels as *Smart Biomaterials*, 2016, 73 – 105
- Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Scher, J., & Muniglia, L. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, 112, 25–39
- Aljawish A., I. Chevalot, B. Piffaut, C. Rondeau-Mouro, M. Girardin, J. Jasniewski, L. Muniglia, Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions, *Carbohydr. Polym.* 2012, 87 (1) 537–544
- Aljawish, A., Muniglia, L., Klouj, A., Jasniewski, J., Scher, J., & Desobry, S. (2016). Characterization of films based on enzymatically modified chitosan derivatives with phenol compounds. *Food Hydrocolloids*, 60, 551–558
- Anwar, M., Nisa, K., & Indirayati, N. Acid-base evaluation of chitosan-ferulic acid conjugate by a free radical grafting method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, 251
- Armendáriz-Barragán, B., Zafar, N., Badri, W., Galindo-Rodríguez, S. A., Kabbaj, D., Fessi, H., & Elaissari, A. Plant extracts: from encapsulation to application. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2016, 13(8), 1165–1175
- Bertelli, Matteo, Kiani, Aysha Karim, Paolacci, Stefano, Manara, Elena, Kurti, Danjela, Dhuli, Kristjana, Bushati, Vilma, Miertus, Jan, Pangallo, Domenico, Baglivo, Mirko, Beccari, Tommaso, Michellini, Sandro, Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities, *Journal of Biotechnology*, 2020, 309, 29-33

- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., & Del Rio, J. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457–462.
- Besser, R., Bowles, A., Alassaf, A., Carbonero, D., Claire, I., Jones, E., ... Agarwal, A.. Enzymatically Crosslinked Gelatin-Laminin Hydrogels for Applications in Neuromuscular Tissue Engineering. *Biomaterials Science*, 2019
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A (1999) On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol* 51:971–974.
- Blainski, A., Lopes, G., & de Mello, J. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865
- Brzonova, I., Steiner, W., Zankel, A., Nyanhongo, G. S., & Guebitz, G. M. Enzymatic synthesis of catechol and hydroxyl-carboxylic acid functionalized chitosan microspheres for iron overload therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, 79(2), 294–303.
- Božič, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2388–2398.
- Borjan D, Leitgeb M, Knez Ž (2020) Microbiological and Antioxidant activity of phenolic compounds in olive leaf extract. *Molecules* 25:5946
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–265
- Boss, A., Bishop, K., Marlow, G., Barnett, M., & Ferguson, L. Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. *Nutrients*, 2016, 8(8), 513
- Buckanan, B., Grissem, W. (Eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists. Rockville, 2000
- Joseph, B., K, S. V., Sabu, C., Kalarikkal, N., & Thomas, S. Cellulose nanocomposites: Fabrication and biomedical applications. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 2020
- Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2774–2779
- B.Q. Liu, C.C. Che, J.F. Liu, M.R. Si, Z.J. Gong, Y. Li, J.M. Zhang, G. Yang, Fabrication and antitumor mechanism of a nanoparticle drug delivery system: graphene oxide/chitosan oligosaccharide/ $\gamma$ -polyglutamic acid composites for anticancer drug delivery, *Chemistry Select* 2019, 4 (43), 12491–12502
- Calabrese, V., Mancuso, C., & Sapienza, M. Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress and Chaperones*, 2007, 12, 299–306
- Chatzikonstantinou V. Alexandra, Giannakopoulou Archontoula, Spyrou Stamatia, Simos V.

- Yannis, Kontogianni G. Vassiliki, Peschos Dimitrios, Katapodis Petros, Polydera C. Angeliki & Stamatis Haralambos (2022). Production of hydroxytyrosol rich extract from *Olea europaea* leaf with enhanced biological activity using immobilized enzyme reactors. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 29624–29637
- Chen Z.P., W. Wang, L. Guo, Y.Y. Yu, Z. Yuan, *Science China-Chemistry*, 2013, 56, 885 1701-1709
- Chen Z.P., W. Wang, L. Guo, Y.Y. Yu, Z. Yuan, *Science China-Chemistry*, 2013, 56, 885 1701-1709
- Choi, Y. R., Kim, E. H., Lim, S., & Choi, Y. S. Efficient preparation of a permanent chitosan/gelatin hydrogel using an acid-tolerant tyrosinase. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 129, 50–56
- Claus H, Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* 2003, 179: 145 150
- Cheow, C.S., Norizah, M.S., Kyaw, Z.Y. & Howell, N.K. Preparation and characterization of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*), *Food Chemistry*, 2007, 101, 386-391
- Chung, J. E., Kurisawa, M., Uyama, H., & Kobayashi, S. Enzymatic synthesis and antioxidant property of gelatin-catechin conjugates. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(23), 1993–1997
- Cione, E., Tucci, P., & Senatore, V. Synthesized esters of ferulic acid induce release of cytochrome c from rat testes mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2008, 40, 19- 26
- Cook N. C., Samman S. Flavonoids-Chemistry,metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996, 7: 66-76
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356
- Da Silva, A. C. P., Paiva, J. P., Diniz, R. R., dos Anjos, V. M., Silva, A. B. S. M., Pinto, A. V. Santos, B. A. M. C. (2019). Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to oleuropein: In vitro and in silico approach for improved sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 193, 162–171
- Derosa, G., Maffioli, P., & Sahebkar, A. Ellagic Acid and Its Role in Chronic Diseases. *Anti-Inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*, 2016, 473-479
- Elegir, G., Kindl, A., Sadocco, P., & Orlandi, M. Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 43(2), 84–92
- Fleming HP, Walter WM, Etchells JL (1973) Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives1. *Appl Microbiol* 26:777–782
- Fras-Zemljič, L., Kokol, V., & Čakara, D. Antimicrobial and antioxidant properties of

- chitosan-based viscose fibres enzymatically functionalized with flavonoids. *Textile Research Journal*, 2011, 81(15), 1532–1540
- Giannakopoulou, A., Chatzikonstantinou, A. V., Chalmpes, N., Tsapara, G., Gournis, D., Polydera, A. C., & Stamatis, H. (2021). Development of a Novel Bi-Enzymatic Nanobiocatalyst for the Efficient Bioconversion of Oleuropein to Hydroxytyrosol. *Catalysts*, 11(6), 749
- Giannakopoulou, A., Tsapara, G., Troganis, A.N., Koralli, P., Chocho, C.L. Polydera, A.C., Katapodis, P., Barkoula, N.-M., Stamatis, H. Development of a Multi-Enzymatic Approach for the Modification of Biopolymers with Ferulic Acid. *Biomolecules* 2022, 12, 992
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94, 651–715
- Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi, production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Lett* 2006, 13:125–135
- Hamza, M., Khoufi, S., Sayadi, S., 2012. Fungal enzymes as a powerful tool to release antioxidants from olive mill wastewater. *Food Chem.* 131, 1430–1436
- Heim Kelly E., Anthony R. Tagliaferro, Dennis J. Bobilya. Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The journal of nutritional Biochemistry*, 2002
- Hosseini, Seyed Mehdi, Kim Min, Soo, Sayed Mahmoud, Younesi Habibollah, Bahramifar, Nader, Park, Ji Hoon, Pyo, Sang Hyun, Lipase-immobilized chitosan-crosslinked magnetic nanoparticle as a biocatalyst for ring opening esterification of itaconic anhydride, *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 143, 141-150
- Hosseini, Seyed Mehdi, Kim Min, Soo, Sayed Mahmoud, Younesi Habibollah, Bahramifar, Nader, Park, Ji Hoon, Pyo, Sang Hyun, Lipase-immobilized chitosan-crosslinked magnetic nanoparticle as a biocatalyst for ring opening esterification of itaconic anhydride, *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 143, 141-150
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(6), 1841–1856
- Huber, D., Tegl, G., Baumann, M., Sommer, E., Gorji, E. G., Borth, N., Guebitz, G. M. Chitosan hydrogel formation using laccase activated phenolics as cross-linkers. *Carbohydrate Polymers*, 2017 157, 814–822
- H. Huang, D. Liao, Y. Zou, H. Chi, The effects of chitosan supplementation on body weight and body composition: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2019, 1–11
- Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, M. S., Gescher, A. C. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2000, 9, 1163–1170
- Imran, M., Rauf, A., Abu-Izneid, T., Nadeem, M., Shariati, M. A., Khan, I. A., Mubarak, M.

- S. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 112, 108612
- Inanli A.G., E.T.A. Tümerkan, N.E. Abed, J.M. Regenstein, F. Özogul, The impact of chitosan on seafood quality and human health: a review, *Trends Food Sci. Technol.* 97 2020, 404–416
- Iqbal, H. M. N., Kyazze, G., Tron, T., & Keshavarz, T. A preliminary study on the development and characterisation of enzymatically grafted P(3HB)-ethyl cellulose based novel composites. *Cellulose*, 2014, 21(5), 3613–3621
- Iqbal, H.M.N., Kyazze, G., Locke, I.C., Tron, T. and Keshavarz, T. Development of bio-composites with novel characteristics: Evaluation of phenol-induced antibacterial, biocompatible and biodegradable behaviours. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 131, 197-207
- Iqbal, H. M. N., Kyazze, G., Locke, I. C., Tron, T., & Keshavarz, T. (2015). *In situ development of self-defensive antibacterial biomaterials: phenol-g-keratin-EC based bio-composites with characteristics for biomedical applications*. *Green Chemistry*, 17(7), 3858–3869
- Javanbakht, Siamak; Shaabani, Ahmad. Carboxymethyl cellulose-based oral delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019
- Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S. V., & Tamura, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82(2), 227–232
- Jin R., L.S.M. Teixeira, P.J. Dijkstra, M. Karperien, C.A. van Blitterswijk, Z.Y. Zhong, 880 J. Feijen, *Biomaterials*, 2009, 30, 2544-2551. 881
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. & Tanaka, M. Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: Chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20, 1216-1222
- Joseph, Blessy; K, Sagarika V; Sabu, Chinnu; Kalarikkal, Nandakumar; Thomas, Sabu. Cellulose nanocomposites: Fabrication and biomedical applications. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 2020
- Juan Carlos Cabrera; Pierre Van Cutsem . Preparation of chitoooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan., 2005, 25(2), 165–172
- Jung, E. H., Kim, S. R., Hwang, I. K., & Ha, T. Y. Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-db/db mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 9800–9804
- Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., & Butterfield, D. A. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: Structure activity studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, 13, 273–281

- Karaki, N., Aljawish, A., Muniglia, L., Bouguet-Bonnet, S., Leclerc, S., Paris, C., Humeau-Virot, C. (2017). Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 104, 1–8
- Kim, H. Y., Park, J., Lee, K. H., Lee, D. U., Jong, H. K., Yeong, S. K., & Lee, S. M. Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Toxicology*, 2011, 282, 104–111
- Kim, S., Liu, Y., Gaber, M.W., Bumgardner, J.D., Haggard, W.O., Yang, Y. Development of chitosan-ellagic acid films as a local drug delivery system to induce apoptotic death of human melanoma cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2009, 90, 145–155
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., Stepnowski, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Mar. Drugs* 2010, 8, 1567–1636
- LakshmiBalasubramaniam SuriyaPrakaash, Howellb Caitlin, Tajvidic Mehdi, Skonberg Denise (2022). Characterization of novel cellulose nanofibril and phenolic acid-based active and hydrophobic packaging films, *Food Chemistry*, 374
- Landete, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 2011, 44(5), 1150–1160
- Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem* 2006, 17(9):611–625
- Laura Bravo, Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, 1998, 31 7-333
- Linh, N. T. B., Abueva, C. D. G., & Lee, B.-T. Enzymatic in situ formed hydrogel from gelatin–tyramine and chitosan-4-hydroxyphenyl acetamide for the co-delivery of human adipose-derived stem cells and platelet-derived growth factor towards vascularization. *Biomedical Materials*, 2017, 12(1), 015026
- Liu, A.L., Liu, B., Qin, H.L., Lee, S.M., Wang, Y.T., Du, G.H. Anti-Influenza Virus Activities of Flavonoids from the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa*. *Planta Med.*, 2008, 74, 847-51
- Lopez-Lazaro, M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2009, 9(1), 31-59
- Lynd, L.R. et al.,. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(3), 506– 577
- Marković, Ana Karković, Torić, Jelena, Barbarić, Monika, Brala, Cvijeta Jakobušić, Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health, *Molecules*, 2019, 24
- Mate, D. M., & Alcalde, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6), 1457–1467

- Medina E, Brenes M, Romero C, García A, De Castro A (2007) Main antimicrobial compounds in table olives. *J Agric Food Chem* 55:9817–9823
- Minussi R. S. Purification, characterization and application of laccase, 2002
- Mittra, B., Saha, A., Chowdhury, A.R., Pal, C., Mandal, S., Mukhopadhyay, Sandyopadhyay, S., Majumder, H.K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol. Med.*, 2000, 6, 527-41
- Morin, S., Bockstal, L., Jacquet, N., Richel, A. One-step enzymatic grafting of ferulic acid with cellulose to enhance matrices– fibres compatibility in bio-composites. *J. Mater. Sci.* 2019, 54, 13314–13321
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Parajó, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 2001, 72(2), 145–171
- Muyonga, J.H., Cole, C.G.B. & Duodu, K.G. Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18, 581-592
- Muzzalupo, Innocenzo, Badolati, Giuliana, Chiappetta, Adriana, Picci, Nevio, Muzzalupo, Rita, In vitro Antifungal Activity of Olive (*Olea europaea*) Leaf Extracts Loaded in Chitosan Nanoparticles, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8, 1-10
- Musci I., Gylai Z, Beladi I. Combined effects of flavonoids and acyclovir against viruses in cell cultures. *Acta Microbiol Hung*, 39, 1992, 137-147
- Nabavi, S. F., Braidy, N., Gortzi, O., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M., Skalicka-Woźniak, K., & Nabavi, S. M. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Research Bulletin*, 2015, 119, 1–11
- Nenadis, N., Tsimidou, M., 2002. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH.) Tests. *JAOCS, J. Am. Oil Chem*
- Ohsaki, A. Y., Shirakawa, H., Koseki, T., & Komai, M. Novel effects of a single administration of ferulic acid on the regulation of blood pressure and the hepatic lipid metabolic profile in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 2825–2830.
- Oppellaro G., Sakurai T. and Huang H.W. A novel mixed valence form of *Rhus vernicifera* laccase and its reaction with dioxygen to give a peroxide intermediate bound to the trinuclear center. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 157:174–209
- Ozaki, Y. Antiinflammatory effect of tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Chemical & pharmaceutical Bulletin* 1992, 40, 954-56
- Palmer P. I. Quantifying the seasonal and interannual variability of North American isoprene emissions using satellite observations of the formaldehyde column, *Journal of Geophysical*



*research*, 2001, 111, 1984-2012

- Panwar, Richa; Sharma, Asvane K.; Kaloti, Mandeep; Dutt, Dharm; Pruthi, Vikas. Characterization and anticancer potential of ferulic acid-loaded chitosan nanoparticles against ME-180 human cervical cancer cell lines. *Applied Nanoscience*, 2016, 6(6), 803–813.
- Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A., & Martucci, J. F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5), 1372–1381.
- Pattanashetti, N. A., Heggannavar, G. B., & Kariduraganavar, M. Y. *Smart Biopolymers and their Biomedical Applications. Procedia Manufacturing*, 2017, 12, 263-279
- Pati, F., Adhikari, B. & Santanu, D. Isolation of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 2010, 101, 3737-3742.
- Prashanth K.V. Harish . Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potentialdan overview. *ELSEVIER*. 2007, 18, 117-131
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30(1), 37–44
- Quideau, S., Deffieux, D., & Pouységu, L. (2014). 3.13 Oxidative Coupling of Phenols and Phenol Ethers. *Comprehensive Organic Synthesis II*, 656–740.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956
- Riva, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(5), 219–226
- Rocasalbas, G.; Francesko, A.; Touriño, S., Fernández-Francos, X., Guebitz, G.M., Tzanov, T. Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel stabilized with plant polyphenols. *Carbohydr. Polym.* 2013, 92, 989–996.
- Romani, Annalisa, Ieri, Francesca, Urciuoli, Silvia, Noce, Annalisa, Marrone, Giulia, Nediani, Chiara, Bernini, Roberta, Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L., *Nutrients*, 2019, 11
- Prabaharan M., R. Jayakumar, Chitosan-graft- $\beta$ -cyclodextrin scaffolds with controlled drug release capability for tissue engineering applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 2009, 44 (4), 320–325.
- Rahman, M.S., Al-Saidi, G.S. & Guizani, N. Thermal characterization of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and mammalian gelatin. *Food Chemistry*, 2008, 108, 472-481
- Raven P, Evert R, E.S. *Biology of Plants* 8th ed., W.H. Freeman and Company, 2013
- Rahmanian, N., Jafari, S. M., & Wani, T. A. Bioactive profile, dehydration, extraction and

- application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology*, 2015, 42(2), 150–172.
- Rinaudo, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. *ELSEVIER*. 2006, 31, 603-632
- Rocasalbas, G., Francesko, A., Touriño, S., Fernández-Francos, X., Guebitz, G. M., & Tzanov, T. Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel stabilized with plant polyphenols. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(2), 989–996.
- Romani, A., Pinelli, P., Ieri, F., Bernini, R. Sustainability, Innovation, and Green Chemistry in the Production and Valorization of Phenolic Extracts from *Olea europaea* L. *Sustainability* 2016, 8, 1002.
- Rukkumani, R., Aruna, K., Varma, P. S., & Menon, V. P. Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant/antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2004, 55, 551–561.
- Sakai S., Y. Yamada, T. Zenke, K. Kawakami, *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19 878, 230-235. 879
- Salama, H. E., Abdel Aziz, M. S., & Sabaa, M. W. (2019). Development of antibacterial carboxymethyl cellulose/chitosan biguanidine hydrochloride edible films activated with frankincense essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 2015, 14, 111–125
- Schrieber, R. & Gareis, H. *Gelatine Handbook*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2007, 45-117
- Sedef N. El, & Karakaya, S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 2009, 67(11), 632–638
- Senaratne, L.S., Park, P.-J. & Kim, S.-K. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 2006, 97, 191-197
- Sha, Bi Ying, Liu, Qing Shan, You, Jing Jing, Ren, Xiao Dan, Feng, Hui, Yin, Xiao Ying, Preparation of chitosan/TPP nanoparticles used as carrier in enzyme immobilization, *Advanced Materials Research*, 2013, 718-720, 271-274
- Shahadi, Feredoon, Naczki, Marian. Phenolics in food and nutraceuticals. Florida, USA: *CRC Press LLC*. 2004
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18, 820897

- Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 2013, 42, 556-564
- Sharifi-Rad Javad, Cristina Quispe, Carla Marina Salgado Castillo, Rodrigo Caroca, Marco A. Lazo-Vélez, Halyna Antonyak, Alexandr Polishchuk, Roman Lysiuk, Petro Oliinyk, Luigi De Masi, Paola Bontempo, Miquel Martorell, Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Oxidative Stress-Induced Diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022
- Sivashankari P.R., M. Prabakaran, Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, 93, 1382–1389.
- Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves. *J Ethnopharmacol.* 2003, 84:299–305
- Soler-Rivas C, Espiñ JC, Wichers HJ (2000) Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric* 80:1013–1023
- Soon Mo Choi, Prerna Chaudhry, Sun Mi Zo, and Sung Soo Han Advances in Protein-Based Materials: From Origin to Novel Biomaterials, Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018, 161-210
- Sousa, F., Guebitz, G. M., & Kokol, V. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. *Process Biochemistry*, 2009, 44(7), 749–756
- Sroka, Z., & Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 753–758.
- Su, J., Fu, J., Wang, Q., Silva, C., & Cavaco-Paulo, A. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(2), 294–307.
- Suzuki, A., Kagawa, D., & Fujii, A. Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, 2002, 15, 351–357.
- Taiz L. and Zeiger E., *Plant Phytochemistry*, Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, 2006
- Tanga Pingping, Zhenga Tingting, Yanga Changkai, Liab Guoying (2022). Enhanced physicochemical and functional properties of collagen films cross-linked with laccase oxidized phenolic acids for active edible food packaging. *Food Chemistry*, 393
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 2015, 77, 92–108.
- Thurston C. F. The structure and function of fungal laccases. *In: Microbial Physiology Research Group*, 1994, 165-168, 172

- Tormakangas, L., Vuorela, P., Saario, E., Leinonen, M., Saikku, P., Vuorela, H. *In vivo* treatment of acute Chlamydia pneumoniae infection with the flavonoids quercetin and luteolin and an alkyl gallate, octyl gallate, in a mouse model. *Biochem. Pharmacol.*, 2005, 70, 1222-30
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M., 2005. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.* 18, 98–112.
- Tshikalange, T., Meyer, J., Hussein, A. 2005. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 515-519.
- Ulubelen, A., Miski, M., Neuman, P., Mabry, T. Flavonoids of *Salvia tomentosa* (Labiatae). *Journal of natural products*, 1979, 42(3), 261-263
- Umesalma S, Sudhandiran G. Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660(2–3):249–258
- Utami, N. D., Nordin, A., Katas, H., Bt Hj Idrus, R., & Fauzi, M. B. (2020). Molecular Action of Hydroxytyrosol in Wound Healing: An In Vitro Evidence-Based Review. *Biomolecules*, 10(10), 1397
- Valand, R., Tanna, S., Lawson, G., & Bengtström, L. (2019). A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–20
- VATTEM, D. A., & SHETTY, K. (2005). BIOLOGICAL FUNCTIONALITY OF ELLAGIC ACID: A REVIEW. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 234–266.
- Vicentini, Denice S., Arthur Smania Jr, Mauro C.M. Laranjeira. Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers. *ELSEVIER. Materials Science and Engineering C*, 2010, 30, 503–508
- Vilaplana-Perez, C., Aunon, D., Garcia-Flores, L. A., & Gil-Izquierdo, A. Hydroxytyrosol and Potential Uses in Cardiovascular Diseases, Cancer, and AIDS. *Frontiers in Nutrition*, 2014
- Vilela, C., Pinto, R. J. B., Coelho, J., Domingues, M. R. M., Daina, S., Sadocco, P., ... Freire, C. S. R. *Bioactive chitosan/ellagic acid films with UV-light protection for active food packaging. Food Hydrocolloids*, 2017, 73, 120–128
- Visioli, F., Bellomo, G., Galli, C., 1998. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 60–64
- Vlacha, Maria; Giannakas, Aris; Katapodis, Petros; Stamatis, Haralambos; Ladavos, Athanasios; Barkoula, Nektaria-Marianthi. On the efficiency of oleic acid as plasticizer of chitosan/clay nanocomposites and its role on thermo-mechanical, barrier and antimicrobial properties – Comparison with glycerol. *Food Hydrocolloids*, 2016, 57, 10-19
- Visioli, F., Wolfram, R., Richard, D., Abdullah, M. I. C. B., & Crea, R. Olive phenolics

- increase glutathione levels in healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 1793–1796
- Wang, B., Ouyang, J., & Liu, Y. Sodium ferulate inhibits atherosclerosis in hyperlipidemia rabbits. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2004, 43, 549–554
- Wang, W., Xue, C., & Mao, X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application, *International Journal of Biological Macromolecule*, 2020
- Wei, B., Yang, G., & Hong, F.. *Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. Carbohydrate Polymers*, 2011, 84(1), 533–538
- Xie, P., Huang, L., Cai-hong, Z., Zhang, Y., 2015. Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships. *J. Funct. Foods* 16, 460–471
- Yang, C., Zhou, Y., Zheng, Y., Li, C., Sheng, S., Wang, J., & Wu, F. Enzymatic modification of chitosan by cinnamic acids: Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 87, 577–585
- Yang, J., Sun, J., An, X., Zheng, M., Lu, Z., Lu, F., & Zhang, C. Preparation of ferulic acid-grafted chitosan using recombinant bacterial laccase and its application in mango preservation. *RSC Advances*, 2018, 8(13), 6759–6767
- Yao X., M. Jing, J. Guan, Hemostatic property and cytotoxicity of the guanidine modified chitosan, *Chinese Journal of Tissue Engineering Research* 21 (6) 2017, 906–910
- Yeh, C. T., & Yen, G. C. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *Journal of Nutrition*, 2006, 136, 11–15
- Ying X.Y, D. Cui, L. Yu, Y.Z. Du, Solid lipid nanoparticles modified with chitosan oligosaccharides for the controlled release of doxorubicin, *Carbohydr. Polym.* 2011, 84 (4), 1357–1364.
- Yuan, J., Wang, C., Ye, J., Tao, R., Zhang, Y., 2015. Enzymatic Hydrolysis of Oleuropein from *Olea europaea* (Olive) Leaf Extract and Antioxidant Activities. *Molecules* 2903–2921.
- Yueh Chien; Yi-Wen Liao; Dean-Mo Liu; Heng-Liang Lin; Shih-Jen Chen; Hen-Li Chen; Chi-Hsien Peng; Chang-Min Liang; Chung-Yuan Mou; Shih-Hwa Chiou. *Corneal repair by human corneal keratocyte-reprogrammed iPSCs and amphiphatic carboxymethyl-hexanoyl chitosan hydrogel*, 2012, 33(32)
- Y.Q. Xu, Z.Q. Wang, Z. Qin, S.M. Yan, B.L. Shi, Effects of chitosan addition on growth performance, diarrhoea, anti-oxidative function and serum immune parameters of weaned piglets, *South African Journal of Animal Science* 2018, 48 (1), 142–150
- Zeng Q.H., Y. Tian, C.R. Zhou, B.H. Luo, *Acta Polymerica Sinica*, 2012, 593-598
- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 2008, 109, 691–702

