



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ Ι ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ



ΣΠΟΥΔΑΣΤΗΣ:
ΣΟΡΟΚΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Δρ.
ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ,
ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αιθέρια έλαια (essential oils) αποτελούν αρωματικά ελαιώδη υγρά, που εκχυλίζονται από διάφορα μέρη των αρωματικών φυτών, όπως το φλοιό, τους σπόρους, τους καρπούς και τις ρίζες και συνιστούν μίγματα πτητικών ενώσεων κυρίως τερπενίων και τερπενοειδών. Λόγω της έντονης ζήτησης για φυσικά συστατικά σε πολλούς τομείς, συναντώνται σε ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών, όπως τα τρόφιμα, τα καλλυντικά και τα φάρμακα. Οι μέθοδοι απομόνωσής τους από τα φυτά είναι αρκετές, με κύρια την απόσταξη με ατμό.

Μια επιμέρους κατηγορία αυτών με ενδιαφέρουσες ιδιότητες αποτελούν τα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών φρούτων (λεμονιού, πορτοκαλιού, μανταρινιού και γκρέιπφρουτ) εκχυλισμένων μέσω ψυχρής συμπίεσης από τις φλούδες αυτών, με κύριο συστατικό τους το λιμονένιο.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη δύο διαφορετικών μεθόδων εγκλεισμού αυτών των ελαίων α) σε νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού) οξέος PLA και β) σε μοριακά σύμπλοκα με β-κυκλοδεξτρίνη (σύμπλοκα εγκλεισμού), με στόχο την προστασία τους από διάφορους παράγοντες, όπως η εξάτμιση, το φως και το νερό. Το PLA επιλέχθηκε λόγω της υψηλής του βιοσυμβατότητας και του βιοδιασπώμενου χαρακτήρα του, ενώ η β-κυκλοδεξτρίνη αποτελεί το βασικό παράγοντα συμπλοκοποίησης μεταξύ των τριών κύριων κυκλοδεξτρινών, λόγω του χαμηλού κόστους της και των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων.

Ο εγκλεισμός στα PLA νανοσωματίδια έγινε μέσω μεθόδου γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση οργανικών διαλυτών. Τα βιοπολυμερικά σωματίδια μελετήθηκαν ως προς τρία βασικά χαρακτηριστικά τους : το μέγεθος, το δείκτη διασποράς και το ζ-δυναμικό μέσω μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Το μικρότερου μέσου μεγέθους νανοσωματίδια προέκυψαν στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του λεμονιού (≈ 250 nm), ενώ τα μεγαλύτερα σε εκείνη του γκρέιπφρουτ. Με εξαίρεση τα τελευταία, όλα τα υπόλοιπα δείγματα είχαν χαμηλή-ικανοποιητική διασπορά. Επίσης, το ζ-δυναμικό κυμαινόταν από -12 έως -32 mV.

Ο σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου συν-ίζηματοποίησης. Τα ξηρά σύμπλοκα που παρήχθησαν χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το δυναμικό επιφανείας μέσω μεθόδου DLS. Τα δείγματα των διαφορετικών συμπλόκων εγκλεισμού λεμονιού, μανταρινιού και γκρέιπφρουτ παρουσίαζαν σχετικά καλή διασπορά με μικρό και επαναλήψιμο μέγεθος. Επίσης, οι νανοδομές που προέκυψαν ήταν κατά κόρον ηλεκτρικά σταθεροποιημένες. Τέλος, το ποσοστό ανάκτησης των ξηρών συμπλόκων ήταν κατά μέσο όρο της τάξης του 75%, ενώ το ποσοστό εγκλεισμού του ελαίου στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης ανήλθε σε 77%.

Πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση μέσω φασματοσκοπίας FT-IR σε ένα δείγμα PLA νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ποσότητα αιθέριου ελαίου λεμονιού και σε όλα τα δείγματα συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης. Στην πρώτη περίπτωση ταυτοποιήθηκε ο εγκλεισμός του ελαίου στις νανοδομές του βιοδιασπώμενου πολυμερούς, ενώ στη δεύτερη η συμπλοκοποίηση ποσότητας ελαίου με τα μόρια της κυκλοδεξτρίνης.

Επιστημονική Περιοχή : Οργανική Χημεία, Τεχνολογία Νανοεγκλεισμού

Λέξεις Κλειδιά : αιθέρια έλαια, εσπεριδοειδή φρούτα, ψυχρή έκθλιψη, νανοεγκλεισμός, πολυμερικά νανοσωματίδια, πολυ(γαλακτικό) οξύ, μοριακά σύμπλοκα εγκλεισμού, β-κυκλοδεξτρίνη

ABSTRACT

Essential oils (EOs) are aromatic oily liquids extracted from different parts of aromatic plants, such as peel, seeds, fruits and roots. EOs are complex mixtures of volatile compounds, mainly terpenes and terpenoids. They are used in many applications, such as food, cosmetics and pharmaceuticals, due to strong demand for natural ingredients in many fields. Several methods can be used to isolate them from plants, the most well-known of which being steam distillation.

Citrus fruits essential oils (lemon, orange, mandarin and grapefruit) constitute a subcategory of essential oils, which demonstrate interesting properties. They are extracted from the peels of them through cold pressing, with limonene being their main compound.

The current thesis deals with two different methods for encapsulation of these citrus essential oils, a) in nanoparticles of polylactic acid (PLA) and b) in molecular complexes with β -cyclodextrin (inclusion complexes), protecting them from several factors, such as volatilization, light and water. PLA was the polymer of choice as it is highly biodegradable and biocompatible, whereas β -cyclodextrin is the primary complexing agent among the three main cyclodextrins, as it combines low cost with physicochemical properties.

Encapsulation in PLA nanoparticles was achieved via the emulsification-solvent evaporation technique. The biopolymeric particles were studied regarding three basic characteristics : size, polydispersity index and ζ -potential, which were measured with the method Dynamic Light Scattering (DLS) method. Lemon essential oil provided nanoparticles of the smallest mean size, whereas the biggest ones were obtained from grapefruit essential oil. Moreover, ζ -potential fluctuated from -12 to -32 mV.

The formation of inclusion complexes was carried out via co-precipitation method. The produced dried complexes were characterized in terms of size, polydispersity index and surface potential with DLS method. Samples of lemon, mandarin and grapefruit inclusion complexes presented a relatively good dispersion with small and reproducible size. Also, the nanostructures obtained were chiefly electrically stabilized. Finally, the recovery of dry complex was of 75% on average, while the inclusion efficiency of oil inside the cyclodextrin cavity reached 77%.

Qualitative analysis using FT-IR spectroscopy was performed on a sample of PLA nanoparticles with an amount of encapsulated lemon essential oil and on all samples of cyclodextrin complexes. Oil encapsulation in the nanostructures of the biodegradable polymer and complexation of oil with cyclodextrin molecules were identified in the first and in the second case, respectively.

Scientific area : Organic Chemistry, Nanoencapsulation Technology

Keywords : essential oils, citrus fruits, cold pressing, nanoencapsulation, polymeric nanoparticles, polylactic acid, molecular inclusion complexes, β -cyclodextrin

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014 – 2015.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε κάποιους ανθρώπους που βοήθησαν άμεσα ή έμμεσα και ο καθένας με τον δικό του τρόπο στην εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα, Δρ. Αναστασία Δέτση, Επίκουρο Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη καθοδήγηση τόσο σε γνωστικό όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο, τη συμπαράσταση και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Χωρίς τη βοήθεια και τις πολύτιμες υποδείξεις της, η εργασία αυτή δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερος την Δρ. Σταματίνα Βουγιούκα, Επίκουρο Καθηγήτρια ΕΜΠ για τις πολύτιμες συμβουλές, παρατηρήσεις και οδηγίες της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον Δρ. Κωνσταντίνο Κορδάτο, για την καθοδήγηση και το γενικότερο γνωστικό πλαίσιο γύρω από τη χρήση του φασματοφωτομέτρου ορατού - υπεριώδους UV-Vis, όπως και για τις χρησιμότερες γνώσεις του στον τομέα των εγκλεισμών.

Επιπλέον ευχαριστώ πολύ την Ελένη Καβέτσου, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, για την καθοδήγησή της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, την προθυμία της να απαντήσει σε οποιοδήποτε ερώτημά μου και το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας που είχαμε αναπτύξει.

Θα επιθυμούσα τέλος να ευχαριστήσω την Ανδρομάξη Τζάνη, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, για τη στήριξη και τη θέλησή της να συνδράμει στην ευκολότερη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και το προσφιλές μου περιβάλλον για την αμέριστη συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
ABSTRACT.....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
I. <u>ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ</u>	9
1.1. <u>Γενικά Στοιχεία</u>	9
1.1.1. Ορισμός-Προέλευση-Χαρακτηριστικά.....	9
1.1.2. Εφαρμογές αιθέριων ελαίων.....	9
1.2. <u>Χημική Σύσταση Αιθέριων Ελαίων</u>	10
1.3. <u>Εκχύλιση Αιθέριων Ελαίων</u>	16
1.3.1. Κλασσικές/Συμβατικές Μέθοδοι.....	16
1.3.2. Καινοτόμες Μέθοδοι.....	18
1.4. <u>Αιθέρια Έλαια Εσπεριδοειδών (Citrus Essential Oils, EOs)</u>	20
1.4.1. Προέλευση – Χημική Σύσταση.....	20
1.4.2. Εφαρμογές Αιθέριων Ελαίων Εσπεριδοειδών.....	21
II. <u>ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ</u>	24
2. <u>Τεχνολογία Νανοεγκλεισμού</u>	24
3. <u>Συστήματα Νανομεταφοράς (Loaded Nanodelivery Systems)</u>	24
3.1. <u>Πολυμερικοί Νανοφορείς</u>	25
3.1.1. Γενικά Στοιχεία.....	25
3.1.2. Πολύ(γαλακτικό) Οξύ.....	26
3.1.3. Εγκλεισμός σε πολυμερικά νανοσωματίδια.....	26
3.2. <u>Μοριακά Σύμπλοκα</u>	30
3.2.1. Κυκλοδεξτρίνες.....	30
3.2.2. Σύμπλοκα εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης.....	34
3.2.3. Μηχανισμός Συμπλοκοποίησης.....	36
3.2.4. Τεχνικές Συμπλοκοποίησης.....	37
3.2.5. Εφαρμογές Συμπλόκων.....	41
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	44
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	45
1. <u>ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΕ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΑ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΠΟΛΥ(ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ) ΟΞΕΟΣ</u>	45
1.1.1. Σχηματισμός Νανοσωματιδίων Πολυ(Γαλακτικού) Οξέος (PLA) - Εγκλεισμός Μικρής Κλίμακας.....	45

1.1.2.	Χαρακτηρισμός Νανοδοματιδίων (Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό)	47
1.1.3.	Λυοφιλοποίηση νανοδοματιδίων (Freeze Drying)	49
1.1.4.	Ξήρανση νανοδοματιδίων στην αντλία υψηλού κενού Edwards.....	50
1.1.5.	Άμεσος Προσδιορισμός Ποσοστού Εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων στα PLA νανοδοματίδια (EE%).....	50
1.1.6.	Σχηματισμός Νανοδοματιδίων Πολυ(Γαλακτικού) Οξέος (PLA) - Εγκλεισμός Μεγάλης Κλίμακας.....	51
1.2.1.	Χαρακτηρισμός Νανοδοματιδίων (Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό)	52
1.2.2.	Λυοφιλοποίηση νανοδοματιδίων (Freeze Drying).....	52
1.2.3.	Εκχύλιση υπερκείμενου διαλύματος για τον άμεσο υπολογισμό του Ποσοστού Εγκλεισμού (EE%).....	53
2.	<u>NANOΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΕ β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗ - ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ (INCLUSION COMPLEXES)</u>	55
2.1.	Συμπλοκοποίηση αιθέριων ελαίων σε μόρια β-κυκλοδεξτρίνης.....	55
2.2.	Χαρακτηρισμός σωματιδίων συμπλόκων εγκλεισμού (Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό)	56
2.3.	Άμεσος Προσδιορισμός Ποσοστού Εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων στα σύμπλοκα με την β-CD (Entrapment Efficiency%) και προσδιορισμός Ποσοστού Φόρτωσης (Drug Loading).....	57
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
1.	<u>ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ</u>	58
2.	<u>NANOΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΕ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ PLA</u>	60
2.1.	Συνθήκες παρασκευής πολυμερικών νανοδοματιδίων με εγκλεισμένη ποσότητα αιθέριων ελαίων.....	60
2.2.	Σύγκριση σχηματιζόμενων γαλακτωμάτων κατά την ανάμιξη των δύο φάσεων.....	62
a.	Νανοδοματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο λεμονιού (Lemon-NPs).....	62
b.	Νανοδοματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο μανταρινιού (Mandarin -NPs)	63
c.	Νανοδοματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού (Orange-NPs)	64
d.	Νανοδοματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο γκρέιπφρουτ (Grapefruit-NPs)	64
2.3.	Χαρακτηρισμός νανοδοματιδίων (Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό).....	65

I.	Νανοςωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο λεμονιού(Lemon-NPs).....	66
II.	Νανοςωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο μανταρινιού (Mandarin-NPs)	70
III.	Νανοςωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού (Orange-NPs).....	71
IV.	Νανοςωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού (Grapefruit-NPs)	72
V.	Συνολική αποτίμηση χαρακτηριστικών PLA νανοςωματιδίων.....	73
2.4.	Λυοφιλοποίηση νανοςωματιδίων.....	73
2.5.	Ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού Edwards.....	75
2.6.	Σύγκριση μεθόδων ξήρανσης.....	75
2.7.	Άμεσος Προσδιορισμός Ποσοστού Εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων στα PLA νανοςωματίδια (EE%) και προσδιορισμός Ποσοστού Φόρτωσης (Drug Loading).....	76
2.8.	Μελέτη νανοςωματιδίων με φασμασκοπία FT-IR.....	76
3.	<u>ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΕ β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗ - ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ (INCLUSION COMPLEXES)</u>	79
a.	Χαρακτηριστικά νανοςωματιδίων (Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς, ζ-δυναμικού.....	79
b.	Ανάκτηση συμπλόκου.....	83
c.	Άμεσος Προσδιορισμός Ποσοστού Εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων στα σύμπλοκα με την β-CD (Entrapment Efficiency%) και Ποσοστού Φόρτωσης (Drug Loading).....	85
d.	Μελέτη συμπλόκων εγκλεισμού με φασματοσκοπία FT-IR.....	89
4.	<u>ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ</u>	93
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	94
	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	97
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	99
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	106
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	107
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	110
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	111

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

1.1. Γενικά Στοιχεία

1.1.1. Ορισμός-Προέλευση-Χαρακτηριστικά

Τα αιθέρια έλαια (Essential Oils, EOs) ή αλλιώς αιθερικά (ethereal) ή πτητικά ή φυτικά έλαια είναι αρωματικά ελαιώδη και σπανίως έγχρωμα υγρά που απομονώνονται από ένα ολόκληρο φυτό ή από μεμονωμένα μέρη του φυτού, όπως τα φύλλα, τους φλοιούς, τα άνθη, τους σπόρους, τις ρίζες, τους μίσχους, τα ξύλα, τον καρπό και το περικάρπιο μέσω εκχύλισης [1],[2],[3],[4],[5].

Ωστόσο, σύμφωνα με τις προδιαγραφές κατά ISO (International Standards Organization) 9235.2, ως αιθέριο έλαιο ορίζεται «Ένα προϊόν που λαμβάνεται από φυτικές πρώτες ύλες είτε με απόσταξη με νερό ή με ατμό, είτε από το επικάρπιο εσπεριδοειδών με μηχανική διαδικασία»^[6].

Βιοσυντίθενται και αποθηκεύονται σε εκκριτικούς κόκκους στο εσωτερικό των οργάνων και στην επιφάνεια των φυτών, σε αδενικά τριχώματα, ενώ συναντώνται και στο κυτταρόπλασμα των εκκριτικών κυττάρων των διαφόρων μερών του φυτού^{[7],[8]}. Το χαρακτηριστικό τους άρωμα ωστόσο απελευθερώνεται διαμέσου των επιδερμικών κυττάρων των πετάλων του φυτού και οφείλεται στους διαφορετικούς τύπους και ποσότητες συστατικών που συναντώνται σε αυτά^{[1],[6]}.

Αποτελούν παραπροϊόντα του μεταβολισμού των φυτών και γι' αυτό συχνά αναφέρονται και ως δευτερογενείς μεταβολίτες^[8]. Ανάμεσα στα διάφορα είδη φυτών, εκείνα που περιέχουν αιθέρια έλαια αποτελούν μόλις το 10% και ονομάζονται αρωματικά^[7]. Υπάρχουν περισσότερα από 17000 τέτοια φυτικά είδη σε ολόκληρο τον κόσμο και κατατάσσονται σε ένα αριθμό οικογενειών, που είναι οι εξής : Lamiaceae, Lauraceae, Asteraceae, Rutaceae, Apiaceae, Fabaceae, Hypericaceae, Liliaceae, Myrtaceae, Pinaceae, Cupressaceae, Rosaceae, Santalaceae, Zingiberaceae, Zygophyllaceae και Piperaceae^{[2],[7]}. Ωστόσο, τα αιθέρια έλαια αντιπροσωπεύουν μόλις το 1% ή και λιγότερο του υγρού βάρους των φυτών αυτών^[2].

Λόγω της φύσης και της χαμηλότερης πυκνότητάς τους σε σχέση με το νερό, φέρουν λιποφιλικό χαρακτήρα, είναι μη-αναμίξιμα με το νερό και διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες^[7].

1.1.2. Εφαρμογές αιθέριων ελαίων

Τα αιθέρια έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε όλο τον κόσμο και η χρήση τους αυξάνεται συνεχώς λόγω της έντονης ζήτησης για καθαρά φυσικά συστατικά σε πολλούς τομείς^[9]. Είναι ασφαλή και φιλικά προς το περιβάλλον χωρίς να προκαλούν κινδύνους στο οικοσύστημα^[10].

Περισσότερα από 3000 είδη αιθέριων ελαίων είναι γνωστά. Εντούτοις, μόνο 300 είναι εμπορικά διαθέσιμα στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και

αρωμάτων. Τα ίδια τα αιθέρια έλαια ή πολλά από τα συστατικά τους χρησιμοποιούνται σε αρώματα και προϊόντα μακιγιάζ, στην οδοντιατρική και στη γεωργία και ως συντηρητικά και πρόσθετα τροφίμων. Χαρακτηριστική είναι η χρήση τους στη συντήρηση τροφίμων και ως αντιμικροβιακά, αναλγητικά, ηρεμιστικά, αντιφλεγμονώδη, σπασμολυτικά και τοπικά αναισθητικά φάρμακα, λόγω των αντισηπτικών τους ιδιοτήτων (βακτηριοκτόνες, ιοκτόνες, μυκητοκτόνες). Για παράδειγμα, το d-λιμονένιο, ο οξικός γερανυλεστέρας και η d-καρβόνη χρησιμοποιούνται σε αρώματα, σε κρέμες, σε σαπούνια, σαν αρωματικά πρόσθετα σε τρόφιμα, ως αρώματα σε προϊόντα οικιακού καθαρισμού και ως διαλύτες για χρήση στη βιομηχανία. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί πως ορισμένα αιθέρια έλαια εμφανίζουν και θεραπευτικές ιδιότητες ενάντια σε κάποια δυσλειτουργία ενός οργάνου ή σε κάποια συστημική διαταραχή^[11]. Χρησιμοποιούνται ακόμη στην ιατρική λόγω των φαρμακευτικών τους ιδιοτήτων και της δράσης τους ως βιοκτόνα (βακτηριοκτόνα, ιοκτόνα και μυκητοκτόνα)^[7].

Ετησίως παράγονται περίπου 40000-60000 tons αιθέριων ελαίων, για να τροφοδοτήσουν τις βιομηχανίες αρωμάτων και καλλυντικών, όπως επίσης και τον τομέα της υγείας^{[6],[9]}. Μερικά αιθέρια έλαια μάλιστα παράγονται σε πολύ μεγάλη κλίμακα, π.χ. το 2008, η παραγωγή αιθέριων ελαίων πορτοκαλιού ανήλθε περίπου σε 51000 τόνους, της μέντας σε 32000 τόνους, και του λεμονιού σε 9200 τόνους^[9].

Με την εισαγωγή των μεθόδων εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων τα πεδία εφαρμογών τους πολλαπλασιάστηκαν. Η ενθλάκωση των πτητικών αυτών ενώσεων αύξησε χρονικά την δράση τους. Τα εγκλεισμένα αιθέρια έλαια βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορα πεδία μερικά εκ των οποίων είναι :

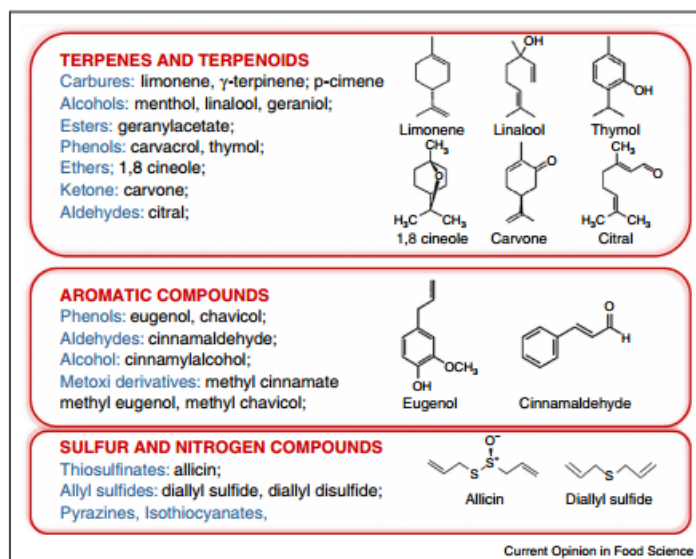
- η Ιατρική
- τα καλλυντικά και είδη προσωπικής φροντίδας
- η βιομηχανία Τροφίμων
- η Βιοτεχνολογία
- τα φαρμακευτικά προϊόντα
- η Ηλεκτρονική
- η Φωτογραφία
- η Χημική βιομηχανία
- η βιομηχανία υφασμάτων^[4]

1.2. Χημική Σύσταση Αιθέριων Ελαίων

Πρόκειται για πολύπλοκα μίγματα πτητικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους και αδιάλυτων στο νερό^[6]. Ένα απλό αιθέριο έλαιο μπορεί να περιέχει περισσότερα από 100 διαφορετικά συστατικά σε διάφορες αναλογίες, ενώ άλλα μπορεί να συνίστανται από 20 έως 60. Όλα όμως τα συστατικά είναι της κατηγορίας των υδρογονανθράκων και οξυγονωμένων παραγώγων αυτών^[2]. Τα αιθέρια έλαια περιέχουν δύο ή τρία κύρια συστατικά σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις (20-70%), ενώ άλλα μπορεί να βρίσκονται σε ίχνη^[11]. Ωστόσο, δεν υπάρχει συγκεκριμένη ονοματολογία για τα συστατικά αυτά, αλλά ο χαρακτηρισμός τους στηρίζεται στις ιδιότητες ή στην ιδιαίτερη προέλευσή τους^[6].

Εν γένει, τα χημικά συστατικά των αιθέριων ελαίων κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες : α) τερπένια και τερπενοειδή, β) φαινολοπροπανοειδή και γ) θειούχες και αζωτούχες ενώσεις. Αυτές οι ομάδες περιέχουν κυκλικές και άκυκλες ενώσεις, όπως αλκοόλες, εστέρες, φαινόλες, κετόνες, λακτόνες, αλδεΐδες, και τα οξείδια^[6].

Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται οι κύριες κατηγορίες χημικών ενώσεων των αιθέριων ελαίων.



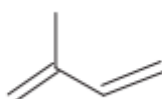
Εικόνα 1 : Τα κύρια χημικά συστατικά των αιθέριων ελαίων^[6]

Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο πως η σύσταση των αιθέριων ελαίων εξαρτάται από το είδος και το υποείδος του φυτού που εκχυλίζεται, την τοποθεσία στην οποία βρίσκεται και την τεχνική εκχύλισης που εφαρμόζεται^[6].

✚ Τερπένια (Ισοπρένια) και Τερπενοειδή:

Τα τερπένια επίσης γνωστά ως ισοπρένια και τα τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή (οξυγονωμένα παράγωγα των τερπενίων) αποτελούν την κυριότερη κατηγορία χημικών ενώσεων που συναντάται στα αιθέρια έλαια και μία ομάδα φυσικών υδρογονανθράκων, που υπάρχουν σε αφθονία^{[2],[7]}.

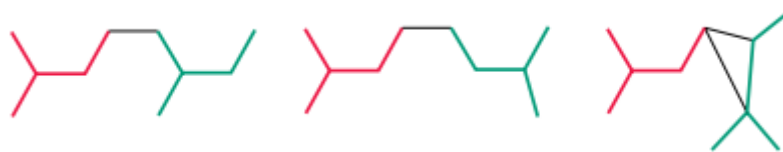
Τα τερπένια είναι μη πολικές ενώσεις με ακόρεστους υδρογονάνθρακες στις ανθρακικές αλυσίδες των μορίων, που προέρχονται από τη συνένωση επαναλαμβανόμενων διακλαδισμένων μονάδων, αποτελούμενων από πέντε άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν ισοπεντανικό σκελετό. Τα μονομερή αυτά καλούνται μονάδες ισοπρενίου (2-μέθυλο-1,3-βουταδιένιο)^{[7],[12],[13]}.



Εικόνα 2 : Χημική δομή μονάδας ισοπρενίου (C₅H₈)^[14]

Γι' αυτό τα τερπένια επομένως συνιστούν πολυμερή ισοπρενίου (C₅H₈), συνδεδεμένα μεταξύ τους με επαναλαμβανόμενο τρόπο κεφαλής – ουράς. Ωστόσο, μπορούν να συμβούν και

συνδυασμοί τύπου κεφαλής-κεφαλής, κεφαλής-μέσης και ουράς-ουράς^[2]. Ο γενικός μοριακός τους τύπος είναι $(C_5H_8)_n$, όπου n ο αριθμός των μονάδων ισοπρενίου^[1].



Εικόνα 3 : Τρεις τρόποι σύνδεσης μονάδων ισοπρενίου : (1) Κεφαλή-Ουρά (δεξιά), (2) Κεφαλή-Κεφαλή (μέση) και (3) Κεφαλή-Μέση (δεξιά)^[13]

Αξίζει να σημειωθεί πως τα τερπενοειδή διαθέτουν περισσότερες από 30000 δομές^[2].

Πιο συγκεκριμένα, κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες με βάση τον αριθμό μονάδων ισοπρενίου από τις οποίες αποτελούνται, παρά το γεγονός ότι μπορούν να προστεθούν ή να απομακρυνθούν άτομα άνθρακα από αυτές. Έτσι, τα ημι-, μονο-, σεσκι- και δι-τερπένια περιέχουν μία, δύο, τρεις και τέσσερις μονάδες ισοπρενίου αντιστοίχως. Επίσης τα τρι- και τετρα-τερπένια αποτελούνται από έξι και οκτώ μονάδες ισοπρενίου αντίστοιχα^[2].

Τα πιο γνωστά ωστόσο τερπένια που εμπεριέχονται στα αιθέρια έλαια είναι τα *μονοτερπένια* και τα *σεσκι-τερπένια*. Πολλά μάλιστα αποτελούνται κυρίως από αυτές τις δύο κατηγορίες τερπενίων και τα οξυγονωμένα παράγωγα αυτών^[2].

❖ Μονοτερπένια

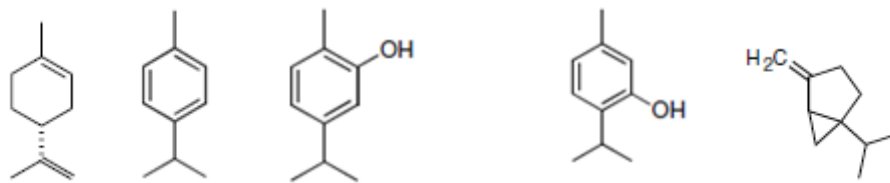
Αποτελούν τα πιο αντιπροσωπευτικά μόρια των αιθέριων ελαίων, αντιστοιχώντας στο 90% της σύστασης αυτών^[11]. Σχηματίζονται από την σύνδεση δύο μονάδων ισοπρενίου και έχουν μοριακό τύπο $C_{10}H_{16}$. Διακρίνονται σε κυκλικά (σχηματίζοντας δακτύλιο) ή ακυκλικά (γνωστά ως γραμμικά), τακτικά ή ατακτικά. Τέλος, σχηματίζουν παράγωγα τα οποία περιλαμβάνουν αλκοόλες, εστέρες, φαινόλες, κετόνες, λακτόνες, αλδεΐδες και οξείδια^[2]. Αξίζει να σημειωθεί πως έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από 1500 μονοτερπενοειδή, χωρίς όμως να συναντώνται όλα στα αιθέρια έλαια^{[2],[15]}. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κατηγορίες των μονοτερπενίων.

1. Κυκλικά Μονοτερπένια

Πρόκειται για τα συνήθη συστατικά των αιθέριων ελαίων, που περιέχουν στο μόριό τους ένα βενζοϊκό δακτύλιο. Λόγω του αρωματικού αυτού δακτυλίου αποδίδουν έντονη βιολογική δράση στα αιθέρια έλαια και είναι επίσης γνωστά ως αρωματικά μονοτερπένια. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μονοκυκλικές, δικυκλικές και τρικυκλικές ενώσεις, ο δακτύλιος των οποίων προέκυψε μέσω ενζυμικής κυκλοποίησης από ένζυμα που καλούνται μονοτερπενικές κυκλάσες^[2].

i. Μονοκυκλικά Μονοτερπένια

Αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα φυσικών μονοτερπενίων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το λιμονένιο, το α -, β - και γ -τερπινένιο και το τερπινολένιο^[2]. Επίσης συμπεριλαμβάνονται ο αρωματικός υδρογονάνθρακας του p-κουμενίου και τα υδροξυλιωμένα παράγωγα αυτού, η θυμόλη, η καρβακρόλη και το σαβινένιο^{[2],[11]}.



Εικόνα 4 : Χημική δομή λιμονενίου, p-κουμενίου, καρβακρόλης, θυμόλης και σαβινενίου αντιστοίχως ^{[3],[11]}

ii. Δικυκλικά Μονοτερπένια

Προέρχονται από την περαιτέρω κυκλοποίηση των μονοκυκλικών μονοτερπενίων. Τα πιο γνωστά μονοτερπένια αυτής της κατηγορίας που αποτελούν κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι το α- και β-πινένιο^[2].



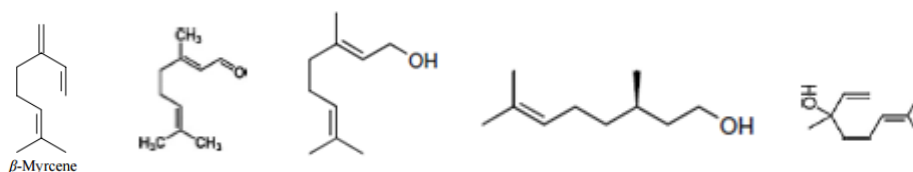
Εικόνα 5 : Χημική δομή α- και β- πινενίου^[11]

iii. Τρικυκλικά Μονοτερπένια

Τα μονοτερπένια αυτής της κατηγορίας δε συναντώνται τόσο συχνά στα αιθέρια έλαια, όσο τα μονο- και δικυκλικά. Ωστόσο, το οξείδιο του πινενίου και το τρικυκλένιο συνιστούν δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα τρικυκλικών μονοτερπενίων ως συστατικά αιθέριων ελαίων^[2].

2. Ακυκλικά Μονοτερπένια

Αποτελούν γραμμικές τακτικές δομές, όπου οι μονάδες ισοπρενίου συνδέονται με τρόπο κεφαλής-ουράς. Παραδείγματα αυτών που συναντώνται συχνά στα αιθέρια έλαια είναι η γερανιόλη, η λιναλοόλη και η σιτρονελόλη^[2]. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει και το μυρσένιο^[16].

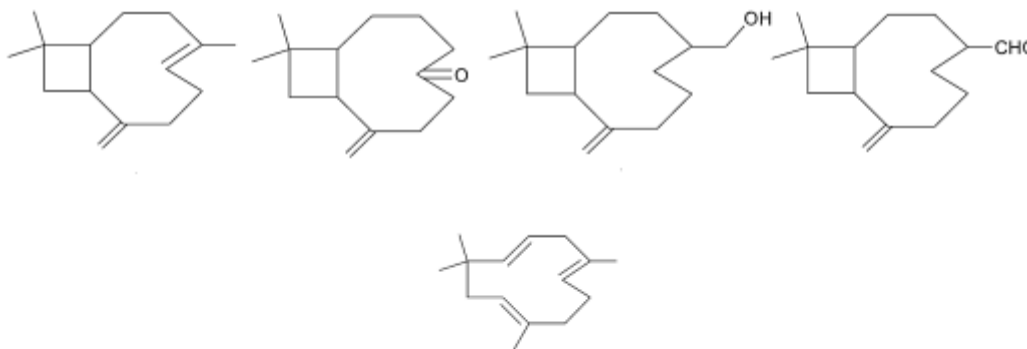


Εικόνα 6 : Χημική δομή β-μυρσενίου, κιτράλης, γερανιόλης, σιτρονελλόλης και λιναλοόλης αντιστοίχως ^{[7],[11],[16]}

❖ Σεσκιτερπένια

Ως προς την συχνότητα εμφάνισής τους στην περίπτωση των αιθέριων ελαίων, κατατάσσονται δεύτερα, μετά τα μονοτερπένια. Σχηματίζονται από την συνένωση τριών μονάδων ισοπρενίου και έχουν μοριακό τύπο $C_{15}H_{24}$. Αξιοσημείωτο είναι πως διαθέτουν περισσότερους από 120 διαφορετικούς σκελετικούς τύπους. Μπορεί να είναι γραμμικά, διακλαδωμένα ή κυκλικά μόρια. Προέρχονται τέλος, από διεργασίες κυκλοποίησης του πυροφωσφορικού φαρνεζιλίου ακολουθούμενες από κατάλληλη σκελετική αναδιάταξη^[2].

Χαρακτηριστικά παραδείγματα σεσκιτερπενίων αιθέριων ελαίων είναι το β-καρυοφυλλένιο, παράγωγα αυτού και το χουμουλένιο^[17].



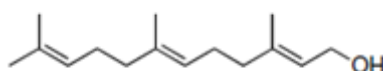
Εικόνα 7 : Χημική δομή β-καρυοφυλλενίου, τριών παραγώγων αυτού και χουμουλένιου αντιστοίχως^[17]

1. Κυκλικά Σεσκιτερπένια

Διακρίνονται σε μονο-, δι- και τρικυκλικά σεσκιτερπένια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το δικυκλικό καρυοφυλλένιο, β-καρυοφυλλένιο που είναι παρόν σε αρκετά αιθέρια έλαια αποτελώντας πολλές φορές και κύριο συστατικό αυτών. Επίσης, το κεδρένιο και η σαντανόλη αποτελούν παραδείγματα των τρικυκλικών σεσκιτερπενίων^[2].

2. Ακυκλικά Σεσκιτερπένια

Συναντώνται σε πολλά αιθέρια έλαια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών είναι το ισομερές της φαρνεζόλης και τα α- και β- συντακτικά ισομερή του φαρνεζένιου. Ακόμη, υπάρχουν αιθέρια έλαια που περιέχουν το ακυκλικό σεσκιτερπένιο (E)-νερολιδόλη σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 90% της συνολικής σύστασής τους^[2].



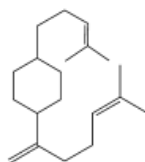
Εικόνα 8 : Χημική δομή φαρνεζόλης^[11]

❖ Διτερπένια

Η συγκέντρωσή τους στα αιθέρια έλαια είναι χαμηλή. Σχηματίζονται από την συνένωση τεσσάρων μονάδων ισοπρενίου. Λόγω του ότι ο γενικός μοριακός τους τύπος είναι $C_{20}H_{32}$, είναι πολύ βαρύτερα από τα μονο- και σεσκι-τερπενοειδή ομόλογά τους, γι' αυτό και απαιτούν περισσότερο χρόνο, για να απομονωθούν από τα φυτά μέσω απόσταξης με ατμό^[2].

1. Κυκλικά Διτερπένια

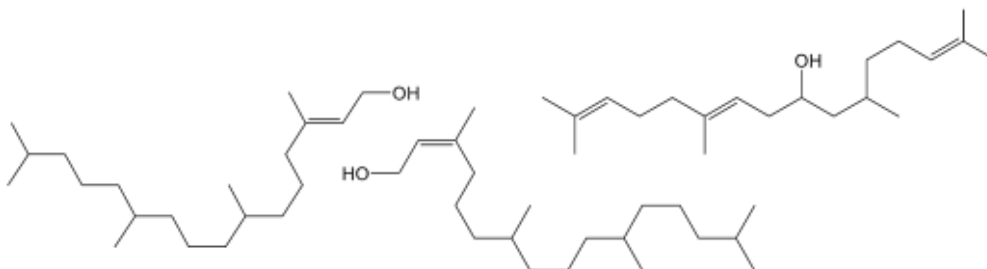
Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το μονοκυκλικό καμφορένιο γνωστό και ως διμερσένιο, που συναντάται στο καμφορέλαιο. Στα αιθέρια έλαια περιέχονται και διάφορα ισομερή αυτού του τερπενίου, όπως επίσης και δικυκλικά και τρικυκλικά διτερπένια. Τετρακυκλικά και πεντακυκλικά διτερπένια συναντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες^[2].



Εικόνα 9 : Χημική δομή καμφορενίου^[17]

2. Ακυκλικά Διτερπένια

Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αποτελούν η φυτόλη (3,7,11,15-τετραμεθυλο-2-εξαδεκεν-1-όλη), μια διτερπενική αλκοόλη με δύο ισομερείς μορφές : την *trans*-φυτόλη και την *cis*-φυτόλη και η γερανυλοσιτρονελλόλη^[17]. Η φυτόλη μάλιστα βρίσκεται στα φύλλα όλων των πράσινων φυτών^[2].



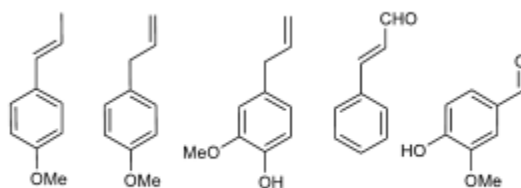
Εικόνα 10 : Χημική δομή *trans*-φυτόλης, *cis*-φυτόλης και γερανυλοσιτρονελλόλης αντιστοίχως^[17]

Φαινυλοπροπανοειδή

Οι ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα αυτή αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία συστατικών των αιθέριων ελαίων. Ωστόσο, η συχνότητα και η πληθώρα εμφάνισής τους ως συστατικά αυτών είναι μειωμένη συγκριτικά με εκείνη των τερπενοειδών. Συνολικά, έχουν περιγραφεί 50 διαφορετικά φαινυλοπροπανοειδή^[2].

Πρόκειται για ενώσεις με σκελετό C6-C3 αποτελούμενο από έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο με έξι άτομα άνθρακα και από μια πλευρική αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα. Τα φαινυλοπροπανοειδή προκύπτουν από τα αμινοξέα της φαινυλαλανίνης και της τυροσίνης^[2].

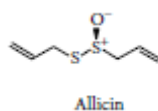
Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η ανηθόλη, η ευγενόλη, η μεθυλο-ευγενόλη, η χαβικόλη, η μεθυλο-χαβικόλη (εστραγόλη), η κινναμωμική αλδεΐδη και η βανιλίνη^{[2],[17]}.



Εικόνα 11 : Χημική δομή της ανηθόλης, εστραγόλης, ευγενόλης, κινναμωμικής αλδεΐδης και βανιλίνης αντιστοίχως^[17]

✚ Θεικές και Αζωτούχες Ενώσεις

Σπανίως ενδέχεται να περιέχονται θειικά και αζωτούχα μόρια στα αιθέρια έλαια. Τέτοιες ενώσεις είναι κυρίως οι αγλυκόνες και οι γλυκοσινολάτες και τα προϊόντα αυτών, όπως οι ισοθειοκυανάτες. Οι αγλυκόνες αποτελούν το μη-σακχαρώδες τμήμα ενός γλυκοζίτη. Οι γλυκοσινολάτες είναι θεικές ή αζωτούχες ενώσεις που προκύπτουν από την γλυκόζη και ένα εκ των οκτώ γνωστών αμινοξέων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αλλικίνη, μία οργανοθειική ένωση και το διαλλυλικό σουλφοξείδιο, που προκύπτει από την αποικοδόμηση αυτής^[2].



Εικόνα 12 : Χημική δομή αλλικίνης^[3]

Πιο συγκεκριμένα, στα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών, όπως εκείνα του λεμονιού και του μανταρινιού συναντάται συχνά ο ανθρανιλικός μεθυλεστέρας (methyl anthranilate)^[2].

1.3. Εκχύλιση Αιθέριων Ελαίων

Τα αιθέρια έλαια λαμβάνονται από τα φυτά μέσω μεθόδων εκχύλισης, οι οποίες μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες : α) τις κλασσικές ή συμβατικές και β) τις προηγμένες ή καινοτόμες^[7]. Οι νέες τεχνολογίες εκχύλισης έχουν αναπτυχθεί, προκειμένου να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα των κλασσικών μεθόδων^[6].

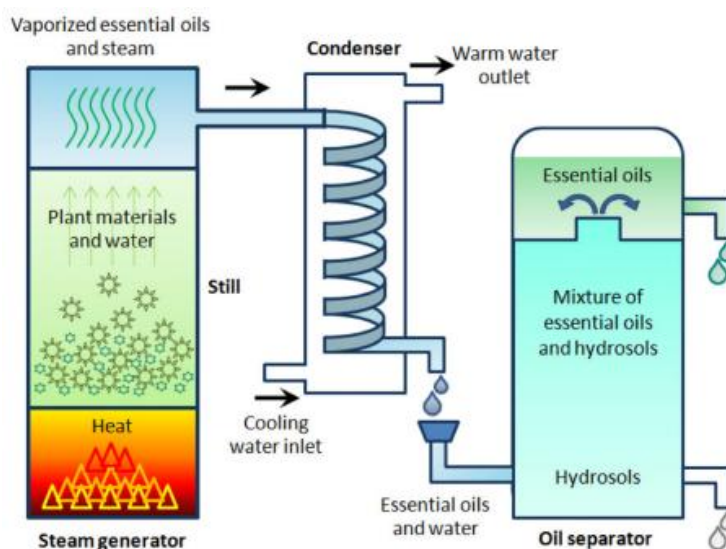
1.3.1. Κλασσικές/Συμβατικές Μέθοδοι

1.3.1.1. Υδροαπόσταξη (Hydrodistillation)

Στην διεργασία αυτή η φυτική πρώτη ύλη αναμιγνύεται με νερό και το σύστημα υφίσταται βρασμό. Ο προκύπτον ατμός συλλέγεται και συμπυκνώνεται, προκειμένου να διαχωριστεί το νερό από το κλάσμα του ελαίου. Το έλαιο έχοντας χαμηλότερη πυκνότητα από το νερό, αποτελεί το πάνω στρώμα του αποστάγματος (Εικόνα 13)^[18].

Πρόκειται για την πιο απλή και παλιά μέθοδο εκχύλισης αιθέριων ελαίων, με αρκετά πλεονεκτήματα, όπως ο υψηλός βαθμός απόδοσής της και ο εύκολος διαχωρισμός των

αιθέριων ελαίων από το νερό με απλή απόχυση. Ακόμη, η υδροαπόσταξη επιτρέπει την ανακύκλωση του συμπυκνώματος και είναι κατάλληλη για την εκχύλιση πετάλων και λουλουδιών. Ωστόσο, παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως υψηλούς χρόνους εκχύλισης, απώλεια ποσότητας νερού λόγω εξάτμισης και χημικές τροποποιήσεις ορισμένων τερπενίων λόγω παρατεταμένης επαφής με τα μόρια του νερού (όπως κυκλοποίηση, υδρόλυση, κ.ά.)^[7].



Εικόνα 13 : Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου υδροαπόσταξης^[1]

1.3.1.2. Απόσταξη με ατμό (Steam Distillation)

Πρόκειται για την κύρια μέθοδο παραγωγής αιθέριων ελαίων^[19]. Το 93% των αιθέριων ελαίων εκχυλίζονται μέσω απόσταξης με ατμό^[18]. Η διεργασία λαμβάνει χώρα σε ατμοσφαιρικές συνθήκες. Ειδικότερα, ο ατμός παράγεται σε έναν αναβραστήρα και διοχετεύεται μέσω ενός σωλήνα στον πυθμένα της στήλης απόσταξης, όπου το φυτό στηρίζεται σε έναν διάτρητο δίσκο ή είναι τοποθετημένο μέσα σε ένα καλάθι, ώστε να μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα μετά την εκχύλιση. Το συμπυκνωμένο απόσταγμα ως ένα μίγμα νερού - ελαίου διαχωρίζεται σε δύο στρώματα, εντός μίας φλάσκας με δύο εξόδους^[4].

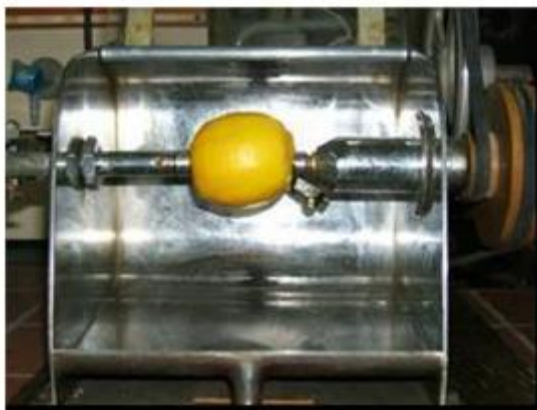
1.3.1.3. Εκχύλιση με χρήση οργανικού διαλύτη (Solvent Extraction Method)

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι : η ακετόνη, το εξάνιο, ο πετρελαϊκός αιθέρας, η μεθανόλη και η αιθανόλη. Ο διαλύτης αυτός αναμειγνύεται με το φυτό και το μίγμα που σχηματίζεται θερμαίνεται για να γίνει η εκχύλιση του αιθέριου ελαίου. Στη συνέχεια το μίγμα αυτό διηθείται και συμπυκνώνεται με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Το συμπύκνωμα αναμειγνύεται με καθαρή αλκοόλη, για να εκχυλιστεί το έλαιο και αποστάζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η αλκοόλη απορροφά το άρωμα του ελαίου και όταν αυτή εξατμιστεί, απομένει το αιθέριο έλαιο. Ωστόσο, η εκχύλιση με χρήση οργανικού διαλύτη είναι σχετικά χρονοβόρα μέθοδος^[1].

1.3.1.4. Ψυχρή Έκθλιψη (Cold Pressing)

Είναι η κλασική μέθοδος εκχύλισης αιθέριων ελαίων που προέρχονται από τη φλούδα εσπεριδοειδών φρούτων^[7]. Η αρχή της στηρίζεται στη μηχανική συμπίεση του περικάρπιου των εσπεριδοειδών σε θερμοκρασία δωματίου για την απελευθέρωση των αιθέριων ελαίων,

τα οποία εκπλένονται με κρύο νερό^[20]. Η ψυχρή έκθλιψη πραγματοποιείται μέσω συμπίεσης του καρπού των φυτών με κοχλία ή υδραυλική πρέσσα^[21]. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης σπάνε οι ελαιώδεις θύλακες και αδένες των εσπεριδοειδών που βρίσκονται στο εξωτερικό τμήμα του μεσοκαρπίου^[7]. Η ψυχρή έκθλιψη σχηματίζει ένα υδαρές γαλάκτωμα, το οποίο είτε φυγοκεντρείται για να διαχωριστεί το αιθέριο έλαιο από το νερό είτε αυτό απομακρύνεται με απλή απόχυση^{[20],[22]}. Υπερτερεί έναντι των κλασσικών μεθόδων λόγω του ότι δεν απαιτεί την χρήση οργανικών διαλυτών ή θέρμανσης^[21].

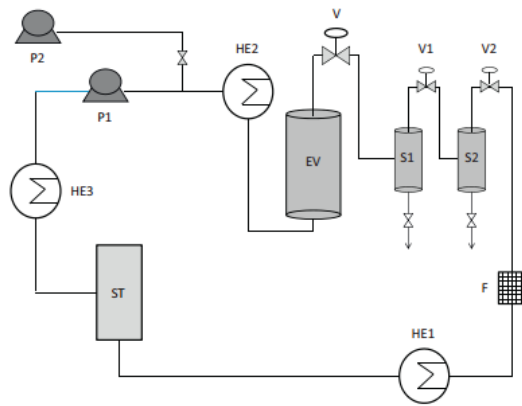


Εικόνα 14 : Μέθοδος ψυχρής έκθλιψης αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών^[22]

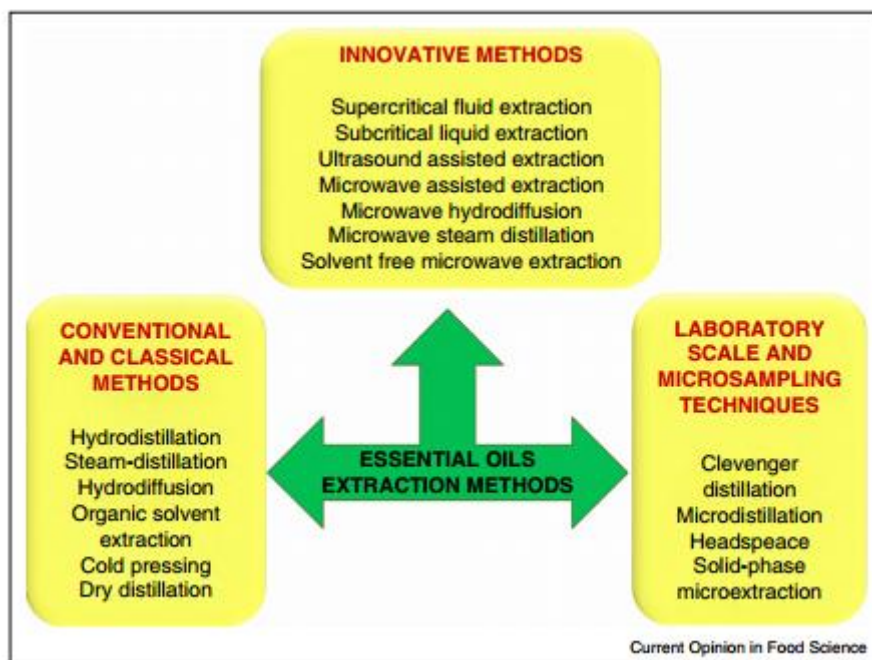
1.3.2. Καινοτόμες Μέθοδοι

1.3.2.1. Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

Η εκχύλιση με χρήση διοξειδίου του άνθρακα ως υπερκρίσιμου ρευστού (SFE) αποτελεί μία νέα μέθοδο για την απομόνωση αιθέριων ελαίων από φυτά. Αυτή η τεχνική παρέχει υψηλή ταχύτητα και αποτελεσματικότητα εκχύλισης, ικανοποιητική απόδοση σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες και αποφεύγει τη χρήση οργανικών διαλυτών, οι οποίοι είναι δυνητικά επιβλαβείς. Ως εκ τούτου, το διοξείδιο του άνθρακα είναι ένας ιδανικός διαλύτης για την εκχύλιση αιθέριων ελαίων από φυτά, λόγω του ότι είναι μη τοξικός, μη εκρηκτικός, άμεσα διαθέσιμος και διαχωρίζεται εύκολα από το τελικό προϊόν^[23]. Μάλιστα, έχει την ικανότητα να διαχωρίζει αρωματικά συστατικά, που σχηματίζουν ένα περίπλοκο μίγμα ενώσεων^[24]. Ο υπερκρίσιμος διαλύτης διοχετεύεται διαρκώς από το κάτω μέρος του δοχείου εκχύλισης. Στην έξοδο αυτού, ρέει μαζί με τις διαλυμένες ουσίες που εκχυλίστηκαν μέσω μιας βαλβίδας αποσυμπίεσης (V) σε ένα διαχωριστή (S1). Σε αυτόν λόγω χαμηλότερης πίεσης, γίνεται διαχωρισμός των εκχυλισμάτων από τον αέριο διαλύτη και συλλογή αυτών. Ορισμένες συσκευές SFE μπορεί να περιέχουν δύο ή περισσότερους διαχωριστές. Τέλος, καλό θα ήταν τα αιθέρια έλαια να ξηραίνονται πριν τη διαδικασία εκχύλισης, γιατί η λιγοςτή ποσότητα νερού που περιέχουν μπορεί να επηρεάζει την αλληλεπίδραση CO₂-διαλυμένης ουσίας^[14].



Εικόνα 15 : Διάταξη SFE για την εκχύλιση φυτών. P1: αντλία CO₂, P2: αντλία συνδιαλύτη. HE1, HE2, HE3: εναλλάκτες θερμότητας, EV: δοχείο εκχύλισης; S1, S2: διαχωριστές, V, V1, V2: βαλβίδες ρύθμισης πίεσης, ST: CO₂: δοχείο αποθήκευσης CO₂, F: φίλτρο.^[14]



Εικόνα 16 : Μέθοδοι εκχύλισης αιθέριων ελαίων^[6]

Παρά ταύτα, η εκχύλιση με χρήση οργανικών διαλυτών και η υπερκρίσιμη εκχύλιση θεωρείται πως παράγουν προϊόντα τα οποία δεν χαρακτηρίζονται ως πραγματικά αιθέρια έλαια. Ωστόσο, λόγω του ότι οι ουσίες αυτές είναι αρωματικές, με οσμή αντίστοιχης της πρώτης ύλης από την οποία προέρχονται, οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονται στην βιομηχανία αρωμάτων και τροφίμων^[4].

1.4. Αιθέρια Έλαια Εσπεριδοειδών (Citrus Essential Oils, CEOs)

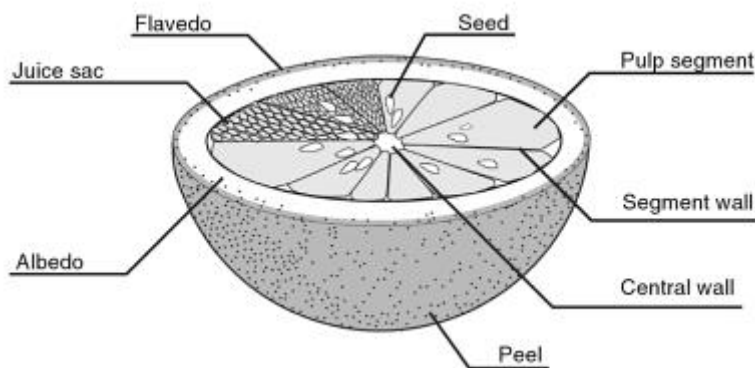
1.4.1. Προέλευση - Χημική Σύσταση

Τα φυτά της οικογένειας Rutaceae περιλαμβάνουν 150 γένη με περίπου 2.000 είδη. Τα κυριότερα είναι του γένους Citrus (εσπεριδοειδών) με περίπου 70 είδη και το γένος Terminalia με περίπου 200 είδη^[25].

Τα φυτά του γένους Citrus περιλαμβάνουν το λεμόνι (*Citrus limon*), το λάιμ (*Citrus Aurantifolia*), το γλυκό και ξινό πορτοκάλι (*Citrus sinensis* και *Citrus aurantium* αντιστοίχως), το γκρέιπφρουτ (*Citrus paradisi*), το μανταρίνι (mandarin – tangerine) (*Citrus Reticulata*) και το κίτρο (*Citrus medica*)^[26]. Ένα λιγότερο εμπορικό εσπεριδοειδές φρούτο είναι το περγαμόντο (*Citrus bergamia*)^[27].

Τα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών (citrus essential oils) είναι τα πιο δημοφιλή φυσικά αιθέρια έλαια και αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό των εμπορικών φυσικών γεύσεων και αρωμάτων^[9]. Προέρχονται από ένα μεγάλο αριθμό φρούτων του γένους Citrus και κατέχουν την πρώτη θέση στην παραγωγή αιθέριων ελαίων^{[9],[28]}. Τα εσπεριδοειδή μάλιστα είναι η σημαντικότερη καλλιέργεια οπωροφόρων δένδρων στον κόσμο, με ετήσια παραγωγή περίπου 102 εκατομμύρια τόννους^[29].

Τα αιθέρια έλαια αυτών είναι υγρά που περιέχουν μεταξύ άλλων συστατικών πτητικές αρωματικές ενώσεις από εσπεριδοειδή φυτά. Συγκεντρώνονται στον εξωτερικό φλοιό των φρούτων αυτών, που καλείται flavedo ή στο εξωκάρπιο αυτών^[30]. Το flavedo είναι το στρώμα που αποτελείται από την επιδερμίδα που καλύπτει το εξωκάρπιο των φρούτων, το οποίο συνίσταται από ακανόνιστα παρεγχυματικά κύτταρα, τα οποία εμπεριέχουν αδένες ή θύλακες ελαίου^[31]. Όταν σπάσουν οι αδένες του ελαίου στην περιοχή αυτή, απελευθερώνεται το αιθέριο έλαιο. Εκχλίζονται μέσω ψυχρής έκθλιψης από τις φλούδες λεμονιού, μανταρινιού, γκρέιπφρουτ, γλυκού και πικρού πορτοκαλιού, περγαμόντου και κλιμεντίνης και αποτελούν μόλις το 1% του μέσου βάρους των εσπεριδοειδών φρούτων από τα οποία προέρχονται^[32].



Εικόνα 17 : Δομή εσπεριδοειδούς φρούτου ^[32]

Τα CEOs είναι ένα μίγμα συνήθως 20-60 διαφορετικών ενώσεων^[30]. Περιέχουν υψηλές ποσότητες τερπενίων, αλειφατικών σесκιτερπενίων και οξυγονωμένων παραγώγων αυτών, όπως επίσης και αρωματικές ενώσεις. Η σύνθεσή τους ποικίλλει ανάλογα με το είδος του εσπεριδοειδούς. Ωστόσο, σε διαφορετικές αναλογίες το καθένα περιέχει : λιμονένιο, α-

πινένιο, β-πινένιο, μυρσένιο, λιναλοόλη και τερπινένιο^[33]. Το 97% της σύστασης των CEOs αποτελείται από μονοτερπένια, ενώ οι αλκοόλες, οι αλδεΐδες και οι εστέρες αντιπροσωπεύουν το 1.8-2.2% αυτής. Ειδικότερα, το κύριο συστατικό τους είναι το λιμονένιο και η συγκέντρωση αυτού κυμαίνεται ανάλογα με το είδος του εσπεριδοειδούς φρούτου, αντιστοιχώντας σε 32-45% στο περγαμόντο, σε 45-76% στο λεμόνι και σε 68-98% στο γλυκό πορτοκάλι^[30].

1.4.2. Ιδιότητες αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών

1.4.2.1. Αντιμικροβιακή - Αντιμυκητιακή δράση

Τα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών φρούτων παρουσιάζουν ιδιαίτερα έντονη αντιμικροβιακή δράση. Παρά ταύτα, λόγω της πολυπλοκότητας της σύστασής τους δεν είναι εύκολο να συσχετιστεί η ιδιότητά τους αυτή με κάποιο συγκεκριμένο συστατικό, καθώς πολλά από αυτά δρουν ανταγωνιστικά ή συνεργιστικά. Εν γένει, η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων οφείλεται στην παρουσία τερπενίων με αρωματικούς δακτυλίους που έχουν χημικό τύπο $C_{10}H_{16}$ και $C_{15}H_{24}$ και σε μια φαινολική υδροξυλομάδα ικανή να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα ενεργά κέντρα ενζύμων - στόχων. Ακόμη, συστατικά όπως αλκοόλες, αλδεΐδες και εστέρες συνεισφέρουν στην παρουσία αντιμικροβιακής δράσης στα πτητικά αυτά έλαια^[34].

Η βιομηχανία τροφίμων απαιτεί τον σχεδιασμό συντηρητικών τροφίμων, που θα διασφαλίζουν την αδρανοποίηση τυχόν μικροβίων. Γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιούνται αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών φρούτων, συντελώντας στην παραγωγή ασφαλέστερων προϊόντων με καλύτερες οργανοληπτικές ιδιότητες, καθώς η θέρμανση που εφαρμόζεται για την συντήρηση των τροφίμων αρκετές φορές αλλοιώνει τα χαρακτηριστικά αυτά^[35]. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται για την προστασία και την αύξηση του ορίου ζωής του ημιαποβουτυρωμένου και χαμηλών λιπαρών γάλακτος^[36].

Επίσης, τα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού, λεμονιού, μανταρινιού και γκρέιπφρουτ επιδεικνύουν αντιμυκητιακή δράση ενάντια στους μύκητες *A.niger*, *A. flavus*, *P. chrysogenum* και *P. verrucosum*. Πιο συγκεκριμένα, το αιθέριο έλαιο του μανταρινιού αποτελεί τον καλύτερο παρεμποδιστή του μύκητα *A. flavus*, ενώ εκείνο του γκρέιπφρουτ δρα περισσότερο αποτελεσματικά στον περιορισμό της ανάπτυξης των μυκήτων, *P. Chrysogenum* και *P. Verrucosum*^[37]. Χαρακτηριστική αντιμυκητιακή δράση από τα συστατικά των αιθέριων ελαίων του λεμονιού και του πορτοκαλιού εμφανίζει η κιτράλη^[35]. Ακόμη, τα πτητικά μονοτερπενικά συστατικά των αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών συνδέονται με την καταστολή και δύο άλλων μυκήτων, του *Penicillium digitatum* και του *P. Italicum*^[38].

1.4.2.2. Εντομοκτόνος – Εντομοαπωθητική Δράση

Μερικά συστατικά των αιθέριων ελαίων «θωρακίζουν» τα φυτά ενάντια σε φυτοφάγα έντομα, βοηθώντας στην καταπολέμηση αυτών. Πιο συγκεκριμένα, τα μονοτερπένια είτε λειτουργούν ως εντομοαπωθητικά και ανορεκτικά εντόμων, είτε παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή αυτών, και παρεμποδίζουν κάποια άλλη φυσιολογική διαδικασία, είτε καθίστανται τοξικά για αυτά. Γι' αυτό το λόγο, διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην προστασία των φυτών ενάντια στην επίθεση των εντόμων^[38].

Ειδικότερα, τα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών και πιο συγκεκριμένα το λιμονένιο και η λιναλοόλη ως συστατικά αυτών εμφανίζουν εντομοκτόνες ιδιότητες^[38].

Τα πτητικά έλαια της φλούδας πορτοκαλιού και μανταρινιού, που περιέχουν περισσότερο από 70% λιμονένιο, παρουσίασαν τοξικότητα απέναντι στο δεύτερο στάδιο της προνύμφης της *Spodoptera littoralis*. Γι' αυτό και χρησιμοποιούνται ως παρεμποδιστές της ανάπτυξης προνύμφων^[38].

Επίσης, στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου *Citrus aurantium* συστατικά όπως η κιμόλη και το λιμονένιο απεδείχθησαν θανατηφόρα για δύο είδη παρασίτων^[38].

Ένα από τα κυριότερα έντομα που συνδέονται με ανθρώπινες ασθένειες σε τροπικές και σε υποτροπικές περιοχές είναι τα κουνούπια^[39]. Τα κουνούπια αποτελούν έναν από τους κύριους λόγους ασθένειας ή θανάτου. Χαρακτηριστικές ασθένειες προκαλούμενες από αυτά είναι η ελονοσία και ο δάγκειος πυρετός. Μάλιστα, για τον περιορισμό των επιπτώσεων των κουνουπιών γίνεται ψεκασμός του βιοτόπου με χημικά τα οποία μπορεί να βλάψουν τη δημόσια υγεία. Γι' αυτό κρίνεται σκόπιμη η χρήση φυσικών φυτικών ενώσεων, ως νυμοκτόνα, καθώς πολλά εξ' αυτών δρουν ως εντομοκτόνα προνύμφων κουνουπιών ή ως απωθητικά κουνουπιών. Ειδικότερα, τα εσπεριδοειδή φρούτα περιέχουν στοιχεία τα οποία είναι αποτελεσματικά ενάντια στις ασθένειες του δάγκειου πυρετού και της ελονοσίας^[40]. Χαρακτηριστικά, τα πτητικά εκχυλίσματα γλυκού πορτοκαλιού και λάιμ παρουσιάζουν εντομοκτόνες ιδιότητες ενάντια στα κουνούπια^[8]. Πιο συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα της φλούδας πορτοκαλιού *C. Sinensis* επέδειξαν νυμοκτόνο, απωθητική και εντομοκτόνο δράση απέναντι στα εξής είδη κουνουπιών : *A. aegypti*, *A. stephensi* και *C. Quinquefasciatus*, υπαίτια για τις ασθένειες της ελονοσίας, του δάγκειου πυρετού και του ιού του Δυτικού Νείλου^[39].

1.4.2.3. Αντιοξειδωτική δράση

Ποικίλες μελέτες σχετικά με την χημική σύσταση και την βιοδραστικότητα των αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών, έχουν αποδείξει πως διαθέτουν έντονα δεσμευτική δράση απέναντι στις ελεύθερες ρίζες (radical scavenging activity), γι' αυτό και αναμένεται να παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ικανότητες. Πιο αναλυτικά, αρωματικά συστατικά αυτών, όπως το γ-τερπινένιο, το τερπινολένιο, η γερανιόλη, το β-πινένιο και το μυρσένιο παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση ακόμη και σε χαμηλή συγκέντρωση. Αιθέρια έλαια τα οποία περιέχουν τα τρία πρώτα σε αυξημένη συγκέντρωση, εμφανίζουν έντονα αυξημένες αντιοξειδωτικές ικανότητες^[41].

Ακόμη, συστατικά όπως το α-τερπινένιο, η καρβόνη, το λιμονένιο, η λιναλοόλη, η σιτρονελλάλη και το καμφένιο αποτελούν αρωματικές ενώσεις που συναντώνται στα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών και παρουσιάζουν αντιοξειδωτική ικανότητα^[33].

1.4.2.4. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή είναι μια φυσιολογική προστατευτική αντίδραση στον τραυματισμό ή στην μόλυνση ενός ιστού. Χρησιμεύει ακόμη στην καταπολέμηση εισβολέων, όπως μικροοργανισμών και στην αφαίρεση νεκρών ή κατεστραμμένων κυττάρων – ξενιστών. Η έντονη οξειδωση η οποία συμβαίνει σε διάφορα κύτταρα (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινοφιλα και μακροφάγα) αποτελεί μια φλεγμονώδη αντίδραση. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής πραγματοποιείται φαγοκύτωση των βακτηρίων, συνοδευόμενη από τον σχηματισμό ριζών ανιόντων υπεροξειδίου (O₂⁻), που γρήγορα μετατρέπονται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), και ρίζες υδροξυλίου (OH⁻), οι οποίες με τη σειρά τους όταν αντιδράσουν με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε περοξυλικές. Αυτές οι ρίζες

είναι γνωστές ως δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Λόγω του ότι ορισμένα αιθέρια έλαια είναι ικανά να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, δρουν επίσης σαν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Η αντιφλεγμονώδης δράση των αιθέριων αυτών ελαίων μπορεί να αποδοθεί και στις αλληλεπιδράσεις τους με τις κυτταροκίνες (κατάλληλοι σηματοδότες) και με παράγοντες μεταγραφής, όπως και στην έκφραση των προφλεγμονωδών γονιδίων^[42]. Πιο συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια από φλούδες γλυκού πορτοκαλιού, λεμονιού και μανταρινιού παρουσιάζουν καλή αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα, η οποία συνδέεται με την δράση του τερπενίου d-λιμονενίου, που αποτελεί και το κύριο συστατικό τους. Αναμένεται ωστόσο και το αιθέριο έλαιο του γκρέιπφρουτ, το οποίο είναι πλούσιο στο συστατικό αυτό, να εμφανίζει ανάλογη δράση. Πιο αναλυτικά, το d-λιμονένιο έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την δράση του ενζύμου 5-λιποξυγενάση, που προκαλεί την οξειδωση του αραχιδονικού οξέος, αντίδραση που παίζει καθοριστικό ρόλο στη φλεγμονή^[43].

1.4.2.5. Αντικαρκινική δράση

Πολλά από τα μονοτερπένια που αποτελούν κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων των εσπεριδοειδών παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση. Για παράδειγμα, το d-λιμονένιο το οποίο αποτελεί περισσότερο από το 90% της σύστασης του αιθέριου ελαίου της φλούδας πορτοκαλιού εμφανίζει χημειοπροληπτική δράση ενάντια στον καρκίνο του δέρματος, του ήπατος, των πνευμόνων, και του προστομάχου, όπως επίσης προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Ακόμη, η περυλλιλική αλκοόλη, ένα υδροξυλιωμένο ανάλογο του λιμονενίου επιδεικνύει ανάλογη δράση ενάντια στον καρκίνο του ήπατος, του μαστικού αδένου, του παγκρέατος και του παχέος εντέρου στα τρωκτικά. Ακόμη, η κατανάλωση αρωματικών ενώσεων όπως το α-τερπινένιο, η καρβόνη, το λιμονένιο, η λιναλοόλη, η σιτρονελλάλη και το καμφένιο μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία συνδέεται με τον καρκίνο^[33].

1.4.2.6. Αντι-ική Δράση

Διάφοροι ιοί, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου παθογόνου ιού του απλού έρπητος, που προκαλεί μερικές από τις πιο κοινές ιογενείς λοιμώξεις στους ανθρώπους, όπως βλεννογονοδερματική ερπητική λοίμωξη, ερπητική κερατίτιδα και εγκεφαλίτιδα, βρέθηκαν να είναι αρκετά επιρρεπείς στην ανασταλτική δράση των αιθέριων ελαίων. Γι' αυτό το λόγο τα αιθέρια έλαια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντι-ικά φάρμακα για την θεραπεία ιογενών λοιμώξεων. Μεταξύ αυτών, εκείνο του λεμονιού (Citrus sinensis essential oil) μειώνει το σχηματισμό πλάκας των δύο ιών του απλού έρπητος (HSV-1 και HSV-2) κατά 80%^[44].

II. ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

1. Τεχνολογία Νανοεγκλεισμού

Ο εγκλεισμός βιοδραστικών ενώσεων αντιπροσωπεύει μία αποτελεσματική προσέγγιση για την απελευθέρωσή τους, την αύξηση της φυσικής τους σταθερότητας, την προστασία τους από αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον, τον περιορισμό της πτητικότητάς και την ενίσχυση της βιοδραστικότητάς τους^[3].

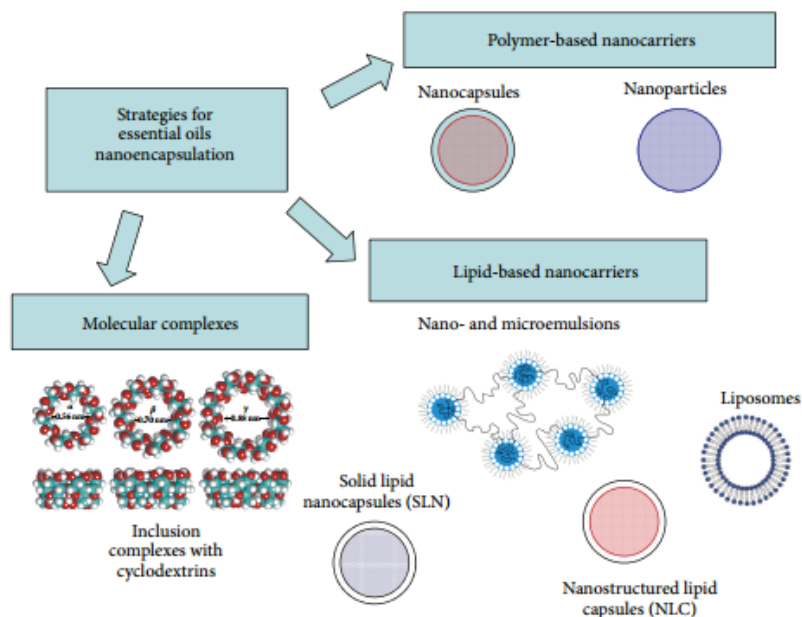
Σε ό,τι αφορά στον εγκλεισμό αιθέριων ελαίων, των ασταθών και πτητικών αυτών ενώσεων, είναι γνωστός ο σχηματισμός καψουλών μεγέθους μικρομέτρων, για την προστασία των δραστικών αυτών ουσιών από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το φως, το οξυγόνο, το νερό και το pH, τη μείωση της πτητικότητας αυτών, καθώς και την μετατροπή τους από έλαια σε σκόνη και την αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς τους^{[3],[45]}.

Ειδικότερα, το οξυγόνο παρουσία φωτός οδηγεί στην οξειδωση των ακόρεστων ενώσεων των αιθέριων ελαίων μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών. Επίσης, τα τελευταία χάνουν μικρές ποσότητες των πτητικών τους ενώσεων όταν αποθηκεύονται σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ ορισμένα συστατικά τους, είναι εξαιρετικά ασταθή στις διακυμάνσεις του pH, όπως η κιτράλη, η οποία αποσυντίθεται εύκολα σε όξινο περιβάλλον^[6]. Ακόμη, το νερό μπορεί να προκαλέσει υδρόλυση των αιθέρων και των εστέρων^[45].

Η ενθυλάκωση σε σωματίδια μεγέθους νανομέτρων συνιστά μια εναλλακτική για την αντιμετώπιση των άνωθεν προβλημάτων, καθώς επίσης λόγω του υποκυττάριου μεγέθους των σωματιδίων σε αυτή τη περίπτωση, δύναται να αυξηθούν οι μηχανισμοί κυτταρικής απορρόφησης και η βιοαποτελεσματικότητά των αιθέριων ελαίων[1].

2. Συστήματα Νανομεταφοράς (Loaded Nanodelivery Systems)

Οι νανοφορείς μπορούν να κατασκευαστούν από ποικιλία υλικών και μεθόδων. Τα συστήματα οργανικών νανοφορέων χαρακτηρίζονται από υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα και βιοσυμβατότητα και ταξινομούνται σε *νανοσωματίδια με βάση*: α) **τα πολυμερή** και β) **τα λιποσώματα**. Ωστόσο συστήματα νανομεταφοράς συνιστούν και τα **μοριακά σύμπλοκα**, όπως τα σύμπλοκα εγκλεισμού με κυκλοδεξτρίνες^[3].



Εικόνα 18 : Σχηματική αναπαράσταση των νανοσυστημάτων στην περίπτωση των αιθέριων ελαίων^[3]

Θα ακολουθήσει περαιτέρω ανάλυση των πολυμερικών νανοσωματιδίων και των μοριακών συμπλόκων, καθώς στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τα δύο αυτά συστήματα νανοφορέων^[3].

2.1. Πολυμερικοί Νανοφορείς

2.1.1. Γενικά Στοιχεία

Ο εγκλεισμός σε πολυμερικά νανοσωματίδια αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για να ξεπεραστούν περιορισμοί που σχετίζονται με τα αιθέρια έλαια (όπως η πτητικότητα τους), να εξασφαλιστεί η προστασία των συστατικών τους ενάντια στην αποσύνθεση, να μειωθεί η απαιτούμενη ποσότητά τους στις διάφορες εφαρμογές και να επιτραπεί η ελεγχόμενη αποδέσμευσή τους ως εγκλεισμένες ουσίες^{[3],[7]}.

Οι πολυμερικοί νανοφορείς ταξινομούνται σε νανοκάψουλες και νανόσφαιρες. Οι νανοκάψουλες απαρτίζονται από δύο διαμερίσματα : ένα πολυμερικό τείχος και έναν πυρήνα, ο οποίος συνήθως είναι ελαιώδης. Από την άλλη, οι νανόσφαιρες είναι συστήματα, όπου η δραστική ουσία διαχέεται μέσα στη πολυμερική μήτρα. Τα αιθέρια έλαια μπορούν να συζευχθούν με την μήτρα ή το τοίχωμα του πολυμερούς είτε να εγκλειστούν μέσα στον ελαιώδη πυρήνα^[3].

Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται ως νανοφορείς είναι βιοσυμβατά και διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες : α) τους βιο-εστέρες (βιοδιασπώμενοι εστέρες), όπως είναι το πολυ(γαλακτικό) οξύ, το πολυ(γλυκολικό) οξύ και το συμπολυμερές του γαλακτικού και γλυκολικού οξέος και β) στα αγρο-πολυμερή, όπως είναι οι πολυσακχαρίτες (π.χ. χιτοζάνη) και οι πρωτεΐνες (όπως η ζελατίνη)^{[3],[46]}. Τα πολυμερή αυτά παρουσιάζουν πέραν της βιοσυμβατότητας και βιοαποικοδομησιμότητα^[46].

2.1.2. Πολυ(γαλακτικό) οξύ

Μεταξύ των πολυεστέρων το πολυ(γαλακτικό) οξύ (polylactic acid, PLA) είναι ευρέως γνωστό, καθώς συνδυάζει τη χαμηλή τιμή κόστους με τις αξιοσημείωτες ιδιότητές του. Ανήκει στην κατηγορία των αλειφατικών πολυεστέρων, προερχόμενων από υδροξυοξέα. Χαρακτηρίζεται ως ένα φιλικό προς το περιβάλλον υλικό, καθώς τα βασικά του μονομερή παράγονται από ανανεώσιμες πηγές υδατανθράκων μέσω ζύμωσης. Πρόκειται επίσης για ένα βιοδιασπώμενο πολυμερές που εμφανίζει βιοσυμβατότητα ερχόμενο σε επαφή με ζωντανούς ιστούς. Γι' αυτό χρησιμοποιείται σε βιοιατρικές εφαρμογές, όπως εμφυτεύματα, ράμματα, για την ενθλάκωση φαρμάκων κ.ά.^[46].

Ανάμεσα στις εφαρμογές του PLA ξεχωρίζει η χρήση τους στην παραγωγή εύκαμπτων και άκαμπτων συσκευασιών. Οι περισσότερο δημοφιλείς εφαρμογές του στη βιομηχανία συσκευασίας τροφίμων είναι η παραγωγή :

- εύκαμπτων συσκευασιών
- άκαμπτων και θερμικά διαμορφωμένων ταινιών
- πακέτων προερχόμενων από διαδικασίες έγχυσης και χύτευσης
- πλαστικοποιημένου χαρτιού μέσω εκβολής.

Ο κύκλος ζωής του PLA μοντελοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το αποτύπωμα άνθρακα (carbon footprint)^[47].



Εικόνα 19 : Κύκλος ζωής πολυ(γαλακτικού) οξέος^[47]

2.1.3. Εγκλεισμός σε πολυμερικά νανοσωματίδια

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι εγκλεισμού σε πολυμερικά σωματίδια, οι οποίες εφαρμόζονται και στην περίπτωση αιθέριων ελαίων, προστατεύοντας τα συστατικά τους από την εξάτμιση και την αποικοδόμηση και επιτρέποντας την ελεγχόμενη αποδέσμευσή τους^[7].

a) Νανοκαταβύθιση – Μέθοδος εκτόπισης διαλύτη

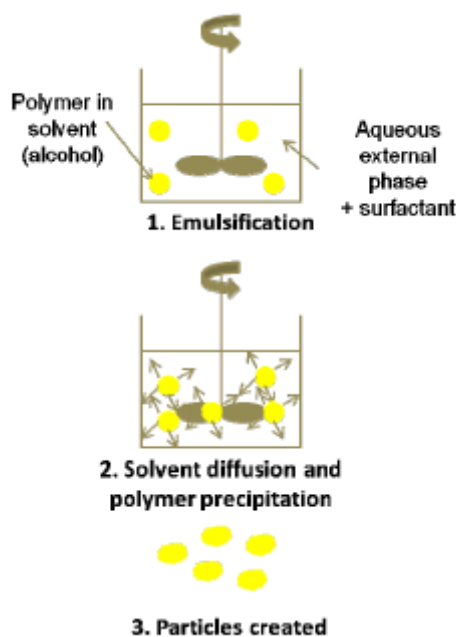
Πρόκειται για μια απλή και επαναλήψιμη τεχνική που επιτρέπει τον σχηματισμό νανοσωματιδίων με στενή κατανομή μεγέθους. Ενδείκνυται δε, για τον εγκλεισμό υδρόφοβων ενώσεων, όπως είναι τα αιθέρια έλαια.

Απαιτείται η ύπαρξη δύο αναμίξιμων φάσεων : της οργανικής και της υδατικής. Η μεν οργανική φάση περιέχει το διάλυμα του πολυμερούς σε έναν οργανικό διαλύτη και το αιθέριο έλαιο. Η δε υδατική φάση αποτελείται από ένα μη-διαλύτη ή από ένα μίγμα μη-διαλυτών του πολυμερούς που θα μπορούσε να συμπληρωθεί με ένα φυσικά ή συνθετικά τασιενεργό-επιφανειοδραστικό παράγοντα^[7]. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται έγχυση της οργανικής στην υδατική φάση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό νανοσωματιδίων μέσω της αυθόρμητης διάχυσης του διαλύτη στην υδατική φάση. Ειδικότερα, το πολυμερές, αδιάλυτο στο μίγμα νερού-διαλύτη, καθιζάνει σχηματίζοντας νανοσωματίδια, ενόσω πραγματοποιείται ενθουλάκωση της δραστικής ουσίας (active ingredient) εντός του πολυμερούς^[48].

Τα πολυμερή ωστόσο που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην συγκεκριμένη μέθοδο είναι φυσικά ή συνθετικά. Ωστόσο βιοδιασπώμενα πολυμερή που χρησιμοποιούνται ευρέως στην συγκεκριμένη μέθοδο είναι τα εξής :

- Η πολυ(καπρολακτόνη) (PCL)
- Το πολυ(γαλακτικό) οξύ (PLA)
- Το πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ (PLGA)

Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό νανοσωματιδίων «φορτωμένων» με καρβακρόλη ή ανηθόλη και καρβόνη^[7].



Εικόνα 20 : Εγκλεισμός με την μέθοδο της Νανοκαταβύθισης^[48]

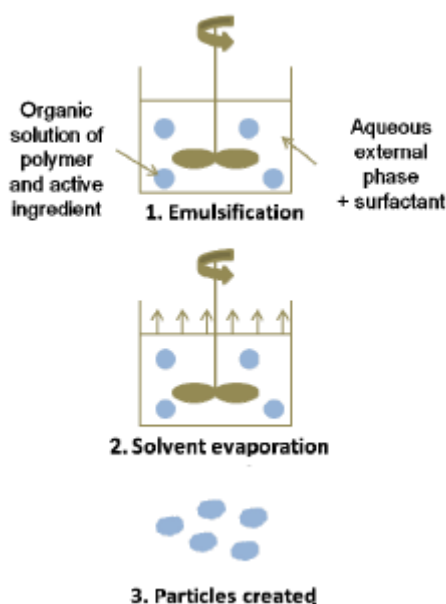
b) Μέθοδος γαλακτωματοποίησης με εξάτμιση οργανικού διαλύτη (Emulsification-Solvent Evaporation Method)

Στην μέθοδο εξάτμισης διαλύτη, επιλέγεται ένας πτητικός διαλύτης που παρουσιάζει πολύ μικρή αναμειξιμότητα με το νερό, όπως είναι το διχλωρομεθάνιο, το χλωροφόρμιο ή ο οξικός αιθυλεστέρας^{[48],[49]}. Αφότου διαλυθεί το πολυμερές σε αυτό τον διαλύτη, ακολουθεί η διάλυση ή διάχυση της δραστικής ουσίας στο πολυμερικό διάλυμα. Το μίγμα αυτό

προστίθεται σε μία μεγάλη ποσότητα νερού που περιέχει τον επιφανειοδραστικό παράγοντα (γαλακτωματοποιητή), και πραγματοποιείται ανάμιξή τους με χρήση ομογενοποιητή ή υπερήχων^[48]. Έτσι προκύπτει ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό (oil-in-water, o/w). Ως επιφανειοδραστικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται η ζελατίνη, η πολυ(βινυλική) αλκοόλη, κ.ά.^[49]. Υπό συνθήκες θέρμανσης και/ή κενού με ταυτόχρονη επίδραση ήπιας ανάδευσης πραγματοποιείται εξάτμιση του διαλύτη. Τέλος, η μέθοδος αυτή οδηγεί στο σχηματισμό μικρο- ή νανοσωματιδίων, τα οποία ξεπλένονται και συλλέγονται με διήθηση ή φυγοκέντρηση. Τέλος, ξηραίνονται ή λυοφιλοποιούνται^[48]. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται κυρίως για εργαστηριακής κλίμακας πειράματα^[49].

Οι ουσίες που μπορούν να εγκλωβιστούν με την παραπάνω μέθοδο είναι υδρόφοβες ενώσεις^[50]. Ένα παράδειγμα νανοεγκλεισμού μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής αποτελούν δύο συστατικά των αιθέριων ελαίων η καρβόνη και η ανηθόλη^[7].

Στην περίπτωση υδρόφιλων ενώσεων ακολουθείται μια παραλλαγή της μεθόδου, γνωστή ως μέθοδος διπλού γαλακτώματος (w/o/w), όπου η προς εγκλεισμό ουσία διαλύεται σε μια υδατική φάση. Στη συνέχεια, σχηματίζεται γαλάκτωμα από την ανάμιξη της υδατικής φάσης με την οργανική που περιέχει το πολυμερές. Το γαλάκτωμα αυτό, διασπείρεται σε μια δεύτερη υδατική φάση. Η ολοκλήρωση της μεθόδου είναι ίδια με αυτή του απλού γαλακτώματος o/w^[50].



Εικόνα 21 : Εγκλεισμός με την μέθοδο Γαλακτωματοποίησης-Εξάτμισης διαλύτη^[48]

c) Κροκίδωση (Coacervation)

Η μέθοδος αυτή διακρίνεται σε απλή και σύνθετη κροκίδωση ανάλογα με το αν χρησιμοποιούνται ένα ή δύο πολυμερή αντιστοίχως. Στην περίπτωση της σύνθετης κροκίδωσης χαρακτηριστική είναι η αλληλεπίδραση δύο αντίθετα φορτισμένων κολλοειδών. Ως κροκίδωση λοιπόν ορίζεται ο διαχωρισμός δύο υγρών φάσεων εντός ενός κολλοειδούς διαλύματος. Η μία από τις δύο υγρές φάσεις καλείται κροκιδωμένη φάση (coacervate phase) και είναι πλούσια σε πολυμερές, ενώ η άλλη καλείται διάλυμα ισορροπίας (equilibrium solution) και δεν περιέχει πολυμερές^[7].

☞ Απλή κροκίδωση (Simple Coacervation)

Βασίζεται στην προσθήκη ενός φτωχού διαλύτη σε ένα υδροφιλικό κολλοειδές διάλυμα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό δύο φάσεων : μιας πλούσιας σε κολλοειδή μόρια (coacervate) και μιας σχεδόν ολοκληρωτικά απαλλαγμένης από μόρια του κολλοειδούς. Για παράδειγμα, όταν διάλυμα θειϊκού νατρίου, ακετόνη ή αλκοόλη βαθμιαία προστίθεται σε ένα ζελατινώδες διάλυμα υπό συνθήκες ανάδευσης, σχηματίζεται η κροκιδωμένη φάση^[7].

☞ Σύνθετη κροκίδωση (Complex Coacervation)

Πρόκειται για ένα αυθόρμητο φαινόμενο που πραγματοποιείται μεταξύ δύο αντίθετα φορτισμένων πολυμερών. Η εξουδετέρωση των φορτίων αυτών είναι που προκαλεί το διαχωρισμό των δύο φάσεων (της φάσης που είναι πλούσια στο πολυμερές και της υδατικής). Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται ευρέως στην περίπτωση του μικροεγκλεισμού^[7].

Τα κυριότερα στάδια στην διεργασία κροκίδωσης για τον εγκλεισμό μιας υδρόφοβης ουσίας είναι τα ακόλουθα :

(i) Σχηματισμός γαλακτώματος με την προσθήκη της υδρόφοβης ουσίας σε ένα υδατικό διάλυμα αποτελούμενο από δύο διαφορετικά πολυμερή, συνήθως σε θερμοκρασία υψηλότερη του σημείου υαλοποίησης (gelling point) της πρωτεΐνης και σε pH ανώτερο του ισοηλεκτρικού σημείου αυτής.

(ii) Διαχωρισμός δύο υγρών φάσεων, ως αποτέλεσμα των ελκτικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα αντίθετα φορτισμένα πολυμερή. Η μία φάση είναι αδιάλυτη στο νερό και πλούσια σε πολυμερές και η άλλη, η υδατική είναι απαλλαγμένη και από τα δύο πολυμερή.

(iii) Σχηματισμός τοιχώματος μέσω απόθεσης της-πλούσιας σε πολυμερές-φάσης γύρω από τις σταγόνες της υδρόφοβης ουσίας, που προκαλείται από την ελεγχόμενη ψύξη σε θερμοκρασία χαμηλότερη του σημείου υαλοποίησης. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα πολυμερή για το σχηματισμό αυτού του τοιχώματος είναι η ζελατίνη και το Arabic gum.

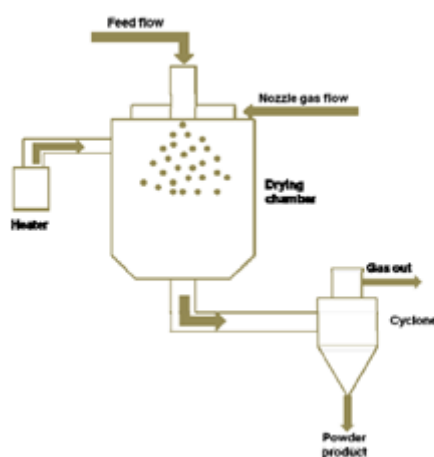
(iv) Σκλήρυνση του τοιχώματος μέσω προσθήκης ενός παράγοντα διασταύρωσης (crosslinking agent), ώστε να σχηματιστούν σκληρυμένες μικροκάψουλες^[7].

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για τον σχηματισμό σωματιδίων μικροκλίμακας. Η εφαρμογή ωστόσο νανοσωματιδίων στην φαρμακευτική και στα βιοϋλικά οδήγησε στην περαιτέρω μελέτη της συγκεκριμένης τεχνικής, με στόχο τον ευκολότερο σχηματισμό αυτών. Οι συνθήκες ωστόσο για το σχηματισμό αυτών είναι πολύ πιο αυστηρές, σε σύγκριση με εκείνες που απαιτούνται στην περίπτωση των μικροσωματιδίων, απαιτώντας κατάλληλα επιλεγμένο πολυσακχαρίτη, ισχυρά αρνητικά φορτισμένο, ώστε να προκύψουν διαλυτά σύμπλοκα^[51].

Αρκετά αιθέρια έλαια έχουν εγκλειστεί μέσω της μεθόδου της κροκίδωσης χρησιμοποιώντας ζελατίνη, πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή^[52]. Ένα παράδειγμα εγκλεισμού αιθέριων ελαίων σε νανοσωματίδια πολυμερούς μέσω διεργασίας σύνθετης κροκίδωσης είναι το αιθέριο έλαιο του γιασεμιού (jasmine essential oil). Και σε αυτήν την περίπτωση τα δύο πολυμερή ήταν η ζελατίνη και το Arabic gum^[7].

d) Ξήρανση με ψεκασμό (Spray Drying)

Στη διεργασία αυτή αρχικά η ουσία που πρόκειται να εγκλειστεί αναμειγνύεται με το υλικό-φορέα σε διάφορες αναλογίες. Έπειτα το μίγμα τροφοδοτείται σε ένα ξηραντήρα με ψεκασμό (spray dryer) και ψεκάζεται μέσω ενός ακροφυσίου ή περιστρεφόμενου τροχού. Το υγρό που γεμίζει τον ξηραντήρα μπορεί να είναι ένα διάλυμα, ένα γαλάκτωμα ή ένα αιώρημα. Κατά τη διάρκεια του ψεκασμού λαμβάνει χώρα επαφή ανάμεσα στην σταγόνα και στο ζεστό αέρα. Η θερμοκρασία του σταγονιδίου διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα λόγω της γρήγορης εξάτμισης του διαλύτη (που συνήθως είναι το νερό), η οποία και επιτρέπει την οιονεί ακαριαία ενθυλάκωση της δραστικής ένωσης. Τέλος, οι μικροκάψουλες συλλέγονται, αφού καθιζάνουν στον πυθμένα του ξηραντήρα^[52].



Εικόνα 22 : Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής Ξήρανσης με Ψεκασμό^[48]

Πρόκειται για μια τεχνική που χρησιμοποιείται επί δεκαετίες για τον εγκλεισμό πτητικών ουσιών σε πολυμερικές μήτρες. Σε μερικά αιθέρια έλαια έχει γίνει ήδη εγκλεισμός μέσω αυτής της μεθόδου, παράγοντας τόσο μικρο- όσο και νανοσωματίδια^[53].

2.2. Μοριακά Σύμπλοκα

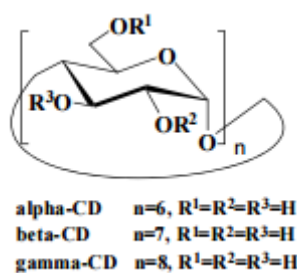
Μία απλή στρατηγική που εφαρμόζεται για την μεταφορά δραστικών ουσιών είναι η συμπλοκοποίησή τους με άλλα μόρια. Αυτή η μέθοδος βελτιώνει την διαλυτότητα των ουσιών και/ή αυξάνει την χημική σταθερότητα του συμπλοκοποιημένου συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, ένα μοριακό σύμπλοκο συνιστά μία φυσική σύνδεση ανάμεσα στο μόριο-ξενιστή και στο μόριο της δραστικής ουσίας. Στην περίπτωση δε των αιθερίων ελαίων, τα σύμπλοκα σχηματίζονται με κυκλοδεξτρίνες (CDs)^[3].

2.2.1. Κυκλοδεξτρίνες

2.2.1.1. Γενικά Στοιχεία

Ως προς τη χημική τους σύσταση οι κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, CyDs ή CDs) είναι μη τοξικοί μακροκυκλικοί ολιγοσακχαρίτες, αποτελούμενοι από υπομονάδες γλυκοκυρανόζης συνδεδεμένες με α-(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς, γνωστές για την δακτυλοειδούς σχήματος δομή τους^{[3],[48],[54]}. Στα χαρακτηριστικά των κυκλοδεξτρινών ανήκουν οι άκαμπτες λιπόφιλες

κοιλότητες που φέρουν και η υδρόφιλη εξωτερική τους επιφάνεια, που επιτρέπει την καλή διάλυση του συμπλόκου σε ένα υδατικό περιβάλλον. Συνάμα, επιτρέπουν το μοριακό εγκλεισμό έντονα υδρόφοβων μορίων στο εσωτερικό της κοιλότητάς τους^[3].



Εικόνα 23 : Χημική δομή μονάδας γλυκοκυτρανόζης με μορφή ανακλίντρου^[54]

Οι κυκλοδεξτρίνες, παράγονται από το άμυλο μέσω ενζυμικής μετατροπής (αποικοδόμησης και κυκλοποίησης) με τη χρήση γλυκοζυλοτρανσφερασών και εν μέρει α-αμυλασών. Απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τον Villiers το 1892 ως προϊόντα αποικοδόμησης του αμύλου από ένα μέσο που καλείται *Bacillus amylobacter*. Το προϊόν αυτό ονομάστηκε σελουλοζίνη (cellulosine), λόγω της ομοιότητάς του με την κυτταρίνη. Στη συνέχεια, ο Schardinger μελέτησε τα χαρακτηριστικά των κυκλοδεξτρινών και ήταν εκείνος που ανακάλυψε πως πρόκειται για κυκλικούς ολιγοσακχαρίτες^[55]. Ο ίδιος μάλιστα ταυτοποίησε και τις τρεις κύριες φυσικές κυκλοδεξτρίνες, την α-, β- και γ-. Γι' αυτό και καλούνται και ως “σάκχαρα ή δεξτρίνες του Schardinger”^{[56],[57]}.

Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία των κυκλοδεξτρινών γνωρίζει έντονη ανάπτυξη, λόγω μιας σειράς πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν :

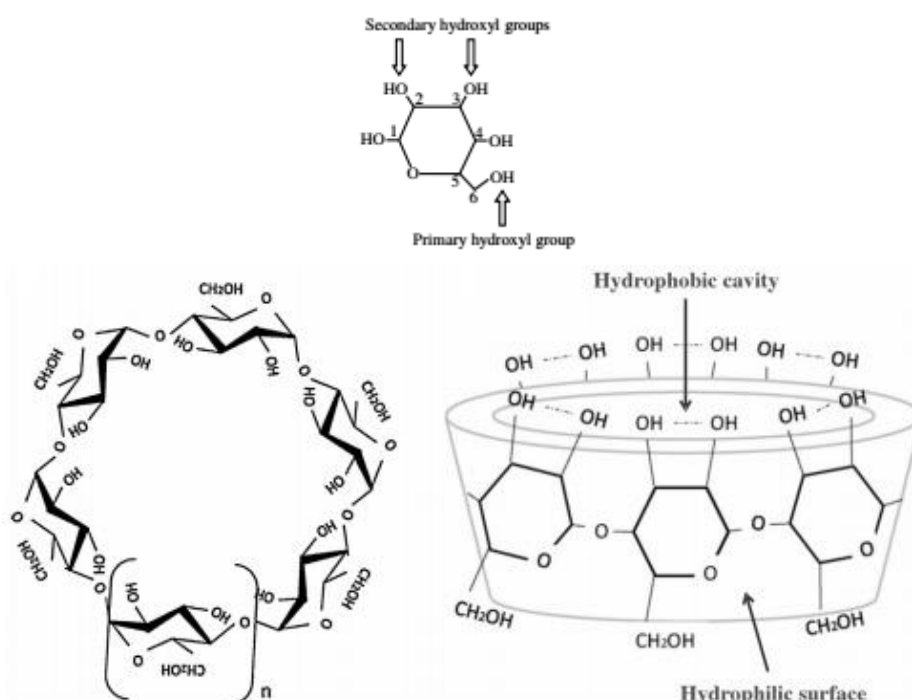
- Είναι ημιφυσικά προϊόντα, παραγόμενα, όπως αναφέρθηκε από ένα ανανεώσιμο φυσικό προϊόν (άμυλο) μέσω μιας απλής ενζυμικής μετατροπής.
- Η συνολική παραγωγή τους ανέρχεται σε 1000 ton/χρόνο μέσω περιβαλλοντικά φιλικών μεθόδων.
- Η σχετικά χαμηλή τιμή τους επιτρέπει τη χρήση τους για περιβαλλοντικούς σκοπούς.
- Μεταβάλλουν πολλές ιδιότητες ουσιών, επιτρέποντας τον σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού με αυτές. Πρόκειται για ένα είδος «μοριακού εγκλεισμού».
- Η τοξικότητά τους είναι περιορισμένη.
- Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά, τους επιτρέπουν να καταναλώνονται από τον άνθρωπο σαν συστατικά φαρμάκων, φαγητών ή και καλλυντικών^[58].

2.2.1.2. Χημική δομή κυκλοδεξτρινών

Η διάταξη των μονομερών στα μόρια της κυκλοδεξτρίνης είναι τέτοια που να σχηματίζει κύλινδρο ή, ακριβέστερα, ένα κόλουρο κώνου^[59]. Η κοιλότητά τους σχηματίζεται από H3 και H5 πρωτόνια και μονήρη ζεύγη από γλυκοζιτικά άτομα οξυγόνου του ίδιου επιπέδου, στοιχείο που προσφέρει υδροφοβικό χαρακτήρα στην κοιλότητα, ενώ οι βάσεις που σχηματίζονται από πρωτοταγείς και δευτεροταγείς υδροξυλομάδες δημιουργούν υδροφιλικό χαρακτήρα στο εξωτερικό του μορίου^[60].

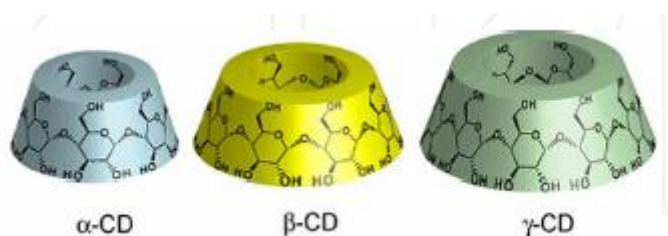
Πιο αναλυτικά, τα αιθερικά άτομα οξυγόνου μαζί με τα άπολα υδρογόνα των ανθράκων C3 και C5 που βρίσκονται στο εσωτερικό του μορίου με δομή τόρου (torus) προσδίδουν έναν

απολικό χαρακτήρα στην κοιλότητα, καθιστώντας τη μια υδροφοβική μήτρα^[57]. Εν αντιθέσει, λόγω της διαμόρφωσης 4C_1 των γλυκοζιτικών μονάδων (chair conformation), οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς υδροξυλομάδες (των ανθράκων C2 και C3) τοποθετούνται στο μεγαλύτερο και μικρότερο χείλος του δακτυλίου αντιστοίχως, προσδίδοντας υδροφιλικό χαρακτήρα στο εξωτερικό του μορίου, επιτρέποντας τη διάλυσή του στο νερό^{[57],[61]}. Τα μη συνδεδεμένα ζεύγη ηλεκτρονίων των αιθερικών ατόμων οξυγόνου που σχηματίζουν γλυκοζιτικές γέφυρες κατευθύνονται προς το εσωτερικό της κοιλότητας, δημιουργώντας υψηλή ηλεκτρονιακή πυκνότητα προσδίδοντας χαρακτήρα μιας βάσης κατά Lewis^[62]. Ακόμη, η C-2-OH ομάδα μιας γλυκοκυρανοζιτικής μονάδας σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την C-3-OH ομάδα της γειτονικής γλυκοκυρανοζιτικής μονάδας^[58].



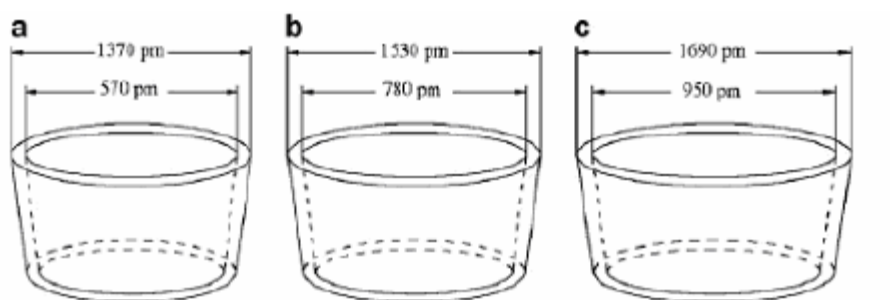
Εικόνα 24 : Σχηματική αναπαράσταση της γλυκοζιτικής μονάδας (πάνω), της χημικής δομής (κάτω αριστερά) και της δομής κόλουρου κωνου των κυκλοδεξτρινών (κάτω δεξιά)^{[62],[63]}

Σε ό,τι αφορά στις τρεις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κυκλοδεξτρίνες (α -, β - και γ -) είναι κρυσταλλικές, ομογενείς και μη-υγροσκοπικές ουσίες αποτελούμενες από 6,7 και 8 υπομονάδες γλυκοκυρανόζης αντιστοίχως^[48].



Εικόνα 25 : Σχηματική αναπαράσταση τριών κύριων κυκλοδεξτρινών^[61]

Οι διαστάσεις κόλουρου κώνου για κάθε μια από τις τρεις αυτές κύριες κυκλοδεξτρίνες είναι:



Εικόνα 26 : Οι κατά προσέγγιση γεωμετρικές διαστάσεις των a) α-, b) β-, c) γ-CD ^[64]

Οι κυκλοδεξτρίνες αυτές είναι επίσης γνωστές ως κυκλοαμυλόζες και κυκλομαλτόζες. Συγκεκριμένα, η α-κυκλοδεξτρίνη ως κυκλοεξανο-αμυλόζη (C6A) ή κυκλομαλτοεξόζη, η β- ως κυκλοεπτανο-αμυλόζη (C7A) ή κυκλομαλτοεπτόζη και η γ- ως κυκλοοκτανο-αμυλόζη (C8A) ή κυκλομαλτοοκτόζη ^[65].

Κυκλοδεξτρίνες με λιγότερο από 6 γλυκοπυρανοζικές μονάδες δεν υπάρχουν, ενδεχομένως για στερεοχημικούς λόγους. Εντούτοις, μεγαλύτερες έχουν εντοπιστεί. Συγκεκριμένα, ανακαλύφθηκαν η δ-, η ε-, η ζ-, η η- και προσφάτως η θ-κυκλοδεξτρίνη που περιέχουν 9, 10, 11, 12 και 13 γλυκοπυρανοζικές μονάδες αντιστοίχως ^[66].

2.2.1.3. β-Κυκλοδεξτρίνη

Η β-CD με τις επτά μονάδες σακχάρου αποτελεί την εμπορικά περισσότερο ελκυστική κυκλοδεξτρίνη. Συνιστά περισσότερο από το 95% των παραγόμενων και καταναλισκόμενων κυκλοδεξτρινών. Η ζήτησή της αυτή οφείλεται στην απλή της σύνθεση, στη διαθεσιμότητά της και στο χαμηλό της κόστος. Στα μειονεκτήματά της συγκαταλέγεται η σχετικά χαμηλή της υδατοδιαλυτότητα σε συνθήκες δωματίου συγκριτικά με τις άλλες κυκλοδεξτρίνες ^[62]. Οι δεσμοί υδρογόνου μάλιστα που συναντώνται στα μόρια της κυκλοδεξτρίνης αποδίδουν στη β-CD άκαμπτη δομή ^[61].

Αξίζει να σημειωθεί πως η ετήσια παραγωγή β-CD ανέρχεται σε 10000 tons και η τιμή της για χρήση σε τρόφιμα είναι μικρότερη των 5 U\$/kg. Αποτελεί επίσης την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κυκλοδεξτρίνη σε φαρμακευτικά σκευάσματα ^[59].

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της β-κυκλοδεξτρίνης συγκριτικά με τις άλλες δύο κύριες κυκλοδεξτρίνες :

Πίνακας 1 : Συγκριτικός πίνακας α-, β- και γ- κυκλοδεξτρινών^[65]

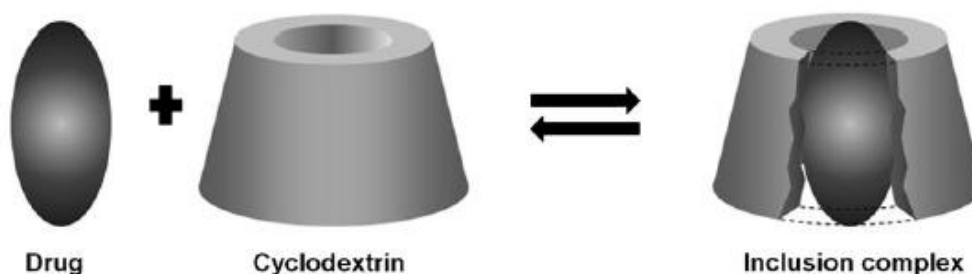
	α	β	γ
No. of glucose units	6	7	8
Molecular weight	972	1,135	1,297
Solubility in water (g/100 ml), room T	14.5	1.85	23.2
$[R]_D^{25^\circ C}$	150.0±0.5	162.5±0.5	177.4±0.5
Cavity diameter (Å)	4.7–5.3	6.0–6.5	7.5–8.3
Height of torus (Å)	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1
Diameter of outer periphery (Å)	14.6±0.4	15.4±0.4	17.5±0.4
Approximate cavity volume (Å ³)	174	262	427
Approximate cavity volume in 1 mol CD (ml)	104	157	256
Approximate cavity volume in 1 g CD (ml)	0.10	0.14	0.20
Crystalline forms (from water)	Hexagonal plates	Monoclinic parallelograms	Quadratic prisms
Crystal water, wt. %	10.2	13.2–14.5	8.13–17.7
Diffusion constant at 40°C	3.443	3.224	3.000
Hydrolysis by <i>A. oryzae</i> α-amylase	Negligible	Slow	Rapid
V_{max} value, min ⁻¹	5.8	166	2,300
Relative permittivity at pH 5.3, 25°C (on incorporating the toluidinyl group of 6- <i>p</i> -toluidinylnaphthalene 2-sulfonate)	47.5	52.0	70.0
Relative permittivity at pH 5.3, 25°C (on incorporating the naphthalene group)	– ^a	29.5	39.5
pK (by potentiometry) at 25°C	12.332	12.202	12.081
Partial molar volumes in solution (ml/mol)	611.4	703.8	801.2
Adiabatic compressibility in aqueous solutions ml (mol ⁻¹ bar ⁻¹)×10 ⁴	7.2	0.4	-5.0

^a Naphthalene group is too bulky for the αCD cavity

Μεταξύ των τριών κύριων κυκλοδεξτρινών, η β-CD παρουσιάζει την μεγαλύτερη χρησιμότητα σαν παράγοντας συμπλοκοποίησης στη φαρμακευτική, λόγω και του χαμηλού της κόστους και των υπόλοιπων ιδιοτήτων της^[67]. Χρησιμοποιείται ευρέως στον εγκλεισμό αιθερίων ελαίων, οδηγώντας σε μερικές από τις πιο υψηλές αποδόσεις αυτών^[52].

2.2.2. Σύμπλοκα εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης

Η πιο χαρακτηριστική ιδιότητα των κυκλοδεξτρινών είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν στερεά σύμπλοκα εγκλεισμού με μία ποικιλία στερεών, υγρών και αέριων ενώσεων, μέσω μοριακής συμπλοκοποίησης. Συγκεκριμένα το προς εγκλεισμό μόριο (guest) συγκρατείται μέσα στην κοιλότητα του μορίου της κυκλοδεξτρίνης^[68]. Γι' αυτό το λόγο, οι κυκλοδεξτρίνες θεωρούνται παράγοντες νανο-εγκλεισμού και ο σχηματισμός συμπλόκου ανάλογος του μοριακού εγκλεισμού, καθώς τα προς εγκλεισμό μόρια απομονώνονται το ένα από το άλλο και διασπείρονται μέσα στη μήτρα του ολιγοσακχαρίτη σε μοριακό επίπεδο^[55].



Εικόνα 27 : Σχηματισμός συμπλόκου εγκλεισμού^[65]

Ως ένωση εγκλεισμού (Inclusion Compound) ορίζεται μία μορφή χημικού συμπλόκου, στο οποίο ένα μόριο περικλείεται-εγκλείεται μέσα σε ένα άλλο ή σε ένα σύνολο αυτών^[55]. Τα

σύμπλοκα εγκλεισμού που σχηματίζονται, απομονώνονται είτε ως σταθερές άμορφες είτε ως μικροκρυσταλλικές ουσίες^[58].

Ο σχηματισμός συμπλόκου με κυκλοδεξτρίνη αποτελεί ένα στοιχειομετρικά μοριακό φαινόμενο, στο οποίο συνήθως η αναλογία ανάμεσα στα μόρια της κυκλοδεξτρίνης και του προς εγκλεισμό μορίου είναι 1:1. Ωστόσο σε περίπτωση μορίων χαμηλού μοριακού βάρους η κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης μπορεί να περιέχει περισσότερα παγιδευμένα μόρια προς εγκλεισμό. Από την άλλη, σε περίπτωση μορίων υψηλού μοριακού βάρους, περισσότερα του ενός μόρια κυκλοδεξτρίνης μπορούν να συνδεθούν με το προς εγκλεισμό μόριο. Συγκεκριμένα, ένα, δύο ή και τρία μόρια κυκλοδεξτρίνης περιέχουν ένα ή περισσότερα παγιδευμένα μόρια προς εγκλεισμό^[57].

Η ικανότητα μιας κυκλοδεξτρίνης να σχηματίζει ένα σύμπλοκο εγκλεισμού με ένα μόριο, το οποίο πρόκειται να εγκλειστεί, αποτελεί συνάρτηση δύο παραγόντων. Ο πρώτος έγκειται στη στερεοχημεία και εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το σχετικό μέγεθος της κυκλοδεξτρίνης προς εκείνο του προς εγκλεισμό μορίου ή συγκεκριμένων χαρακτηριστικών ομάδων αυτού, έτσι ώστε το τελευταίο να μπορεί να χωρέσει μέσα στην κοιλότητα του μορίου ξενιστή. Εν γένει, όσο πιο μικρό είναι το μέγεθος του προς εγκλεισμό μορίου, τόσο πιο αυξημένη είναι η ικανότητα συμπλοκοποίησής του. Αντιστοίχως, η δραστηριότητα των μεγάλων μορίων εξαρτάται από την παρουσία μιας ομάδας ή ενός δακτυλίου κατάλληλων να εισέλθουν στην κοιλότητα του ξενιστή. Ωστόσο, δεν απαιτείται να εισέλθει όλο το μόριο στην κοιλότητα, παρά ένα μέρος του λιπόφιλου τμήματός του. Μάλιστα, οι χωροταξικές απαιτήσεις για το σχηματισμό ενώσεων εγκλεισμού θυμίζουν το μηχανισμό ενζυμικής κατάλυσης, που προκύπτει εάν το υπόστρωμα προσανατολίζεται κατάλληλα σε σχέση με τα ενεργά κέντρα του ξενιστή. Ο δεύτερος παράγοντας σχετίζεται με τις θερμοδυναμικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα διαφορετικά συστατικά του συστήματος (κυκλοδεξτρίνη, προς εγκλεισμό μόριο, διαλύτης). Γι' αυτό, η α -κυκλοδεξτρίνη συμπλοκοποιεί μόρια μικρού μοριακού βάρους ή ενώσεις με αλειφατική αλυσίδα, η β - αρωματικές ενώσεις και η γ - φιλοξενεί μεγαλύτερα μόρια, όπως μακροκυκλικές ενώσεις και στεροΐδη^{[55],[57]}.

Ο εγκλεισμός μέσα σε κυκλοδεξτρίνες επιδρά στις φυσικοχημικές ιδιότητες των προς εγκλεισμό μορίων, όσο αυτά βρίσκονται εγκλωβισμένα μέσα στην κοιλότητα του μορίου-ξενιστή^[57]. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια αυτά παρουσιάζουν :

- βελτιωμένη διαλυτότητα στην περίπτωση που είναι αδιάλυτα,
- σταθεροποίηση ενάντια σε αποσυνθετικούς παράγοντες όπως αυτός της οξειδωσης, του ορατού και του υπέρυθρου φωτός, και της θερμότητας
- έλεγχο των φαινομένων πτητικότητας και της εξάχνωσής τους,
- φυσική απομόνωση των ασύμβατων ενώσεων
- προστασία των αρωμάτων
- κάλυψη ανεπιθύμητων οσμών και
- ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων και των αρωματικών ουσιών
- χρωματογραφικούς διαχωρισμούς^[57]

Στην περίπτωση δε του εγκλεισμού αρωματικών ουσιών, η τεχνική του μοριακού εγκλεισμού σε μόρια β -κυκλοδεξτρίνης είναι η περισσότερο αποτελεσματική και προστατεύει τα πτητικά έλαια από τυχόν αποικοδόμησή τους λόγω οξειδωσης, θερμότητας, φωτός ή και ενυδάτωσης^[69].

2.2.3. Μηχανισμός Συμπλοκοποίησης

Σε ένα υδατικό διάλυμα η ελαφρώς απολική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης καταλαμβάνεται από μόρια ύδατος που δημιουργούν ενεργειακά ασταθείς αλληλεπιδράσεις πολικού-μη πολικού^[70]. Γι' αυτό το λόγο μπορούν να αντικατασταθούν από μόρια λιγότερο πολικά από εκείνα, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη συνολική ενέργεια του συστήματος και προκαλώντας μεταβολές στην ενθαλπία του συστήματος^{[70],[71]}. Η λιποφιλική κοιλότητα των μορίων της κυκλοδεξτρίνης παρέχει ένα περιβάλλον κατάλληλο για την είσοδο μη πολικών χημικών ειδών, σχηματίζοντας σύμπλοκα εγκλεισμού με αυτή. Η διαλυμένη μάλιστα κυκλοδεξτρίνη αποτελεί το μόριο «ξενιστή»^[57].

Το σύμπλοκο εγκλεισμού μπορεί να σχηματιστεί ωστόσο είτε μέσα στο διάλυμα είτε στη κρυσταλλική μορφή^[72]. Η δομή των συμπλόκων CyD σε κρυσταλλική κατάσταση δεν είναι πάντοτε ταυτόσημη με εκείνη σε ένα διάλυμα. Στη διαλυμένη κατάσταση το σύνολο ή μέρος του προς εγκλεισμό μορίου τοποθετείται μέσα στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης και το σύμπλοκο περιτριγυρίζεται από ένα πολυστρωματικό ένυδρο κέλυφος. Από την άλλη, στην κρυσταλλική κατάσταση τα μόρια αυτά βρίσκονται όχι μόνο μέσα στην κοιλότητα της CyD, αλλά και μεταξύ των δακτυλίων CyD ως εγκλείσματα κρυσταλλικού πλέγματος, σχηματίζοντας και σύμπλοκα μη εγκλεισμού (non-inclusion complexes)^[55].

Πιο συγκεκριμένα, διαλύοντας ένα λιγοστά διαλυτό μόριο που πρόκειται να εγκλειστεί σ' ένα υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης, προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα :

- α) Η συγκέντρωση αυτού του μορίου στη διαλυμένη φάση αυξάνεται σημαντικά, ενώ η συγκέντρωση της διαλυμένης ελεύθερης CD μειώνεται.
- β) Οι οπτικές ιδιότητες του προς εγκλεισμό μορίου μεταβάλλονται.
- γ) Η δραστηριότητα του εγκλεισμένου μορίου μεταβάλλεται. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η δραστηριότητά του μειώνεται λόγω σταθεροποίησής του, αλλά σε αρκετές περιπτώσεις η CD συμπεριφέρεται ως ένα τεχνητό ένζυμο, επιταχύνοντας πολλές αντιδράσεις και μεταβάλλοντας το δρόμο της αντίδρασης.
- δ) Η διάχυση και η πτητικότητα του εγκλεισμένου μορίου μειώνονται αρκετά.
- ε) Το υδροφοβικό προς εγκλεισμό μόριο, μετά τη συμπλοκοποίηση μετατρέπεται σε υδροφιλικό σύμπλοκο.

Ενώ στη στερεά κατάσταση:

- α) Η συμπλοκοποιημένη ουσία διασπείρεται μοριακά μέσα σε μια μήτρα υδατόανθρακα σχηματίζοντας μια μικροκρυσταλλική ή άμορφη σκόνη, ακόμη και όταν τα μόριά της είναι σε αέρια κατάσταση.
- β) Η συμπλοκοποιημένη ουσία προστατεύεται αποτελεσματικά ενάντια σε οποιασδήποτε τύπο αντίδρασης, εκτός από εκείνες με τα υδροξύλια της κυκλοδεξτρίνης, ή αντιδράσεις που καταλύονται από αυτά.
- γ) Τα φαινόμενα εξάχνωσης και εξάτμισης περιορίζονται σε πολύ χαμηλό επίπεδο.
- δ) Το σύμπλοκο είναι υδρόφιλο, εύκολα διαβρέξιμο, και γρήγορα διαλυτό^[58].

Η κυριότερη ωθούσα δύναμη σχηματισμού του συμπλόκου είναι η απομάκρυνση μορίων ύδατος «υψηλής ενθαλπίας» από την κοιλότητα, τα οποία υποκαθίστανται από μόρια του υδροφοβικού προς εγκλεισμό μορίου που υπάρχουν μέσα στο διάλυμα και είναι λιγότερο πολικά από το νερό. Ωστόσο, άλλες σημαντικές δυνάμεις που συντελούν στον σχηματισμό συμπλόκων είναι οι δυνάμεις Van der Waals, οι δεσμοί υδρογόνου, οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις και οι αλληλεπιδράσεις μεταφοράς φορτίου^[70]. Τέλος, κατά τον σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού δε σχηματίζονται ούτε «σπάνε» ομοιοπολικοί δεσμοί και έτσι τα σύμπλοκα βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία με τα προς εγκλεισμό μόρια και τα μόρια της κυκλοδεξτρίνης, που βρίσκονται ελεύθερα μέσα στο διάλυμα^[73].

Συνολικά, υπάρχουν τέσσερις ενεργειακά ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις που υποβοηθούν την μετατόπιση της ισορροπίας προς σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού :

- Η απομάκρυνση των πολικών μορίων του νερού από την απολική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.
- Ο αυξημένος αριθμός δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται, καθώς τα υποκατεστημένα μόρια νερού επιστρέφουν στο υδατικό διάλυμα.
- Η μείωση των απωθητικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο υδροφοβικό προς εγκλεισμό μόριο και στο υδατικό διάλυμα.
- Η αύξηση των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, καθώς το προς εγκλεισμό μόριο εισέρχεται στην απολική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης^[66].

2.2.4. Τεχνικές Συμπλοκοποίησης

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι-τεχνικές σχηματισμού συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης-προς εγκλεισμό μορίου, ανάλογα με την φύση της χρησιμοποιούμενης κυκλοδεξτρίνης και τις ιδιότητες της ουσίας που εγκλείεται. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των κυκλοδεξτρινών, συμπεριλαμβανομένης της ιδιότητάς τους να σχηματίζουν σύμπλοκα επηρεάζεται ιδιαίτερα από το είδος, τον αριθμό και τη θέση των υποκαταστατών στο μόριό τους. Η τεχνική συμπλοκοποίησης μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα του συμπλόκου. Εν γένει, οι μέθοδοι συμπλοκοποίησης είναι οι εξής^[55].

1. Μέθοδος φυσικής ανάμειξης

Η παρασκευή ενός στερεού φυσικού μίγματος μεταξύ της κυκλοδεξτρίνης και της προς εγκλεισμό ουσίας πραγματοποιείται μέσω μηχανικής πολτοποίησης. Σε εργαστηριακή κλίμακα, η ανάμειξη αυτή γίνεται μέσα σε ένα γουδί και το τελικό προϊόν διέρχεται από κατάλληλο κόσκινο. Σε βιομηχανική αντιθέτως κλίμακα, η ανάμειξη πραγματοποιείται σε μηχανικό κοκκοποιητή για περίπου 30 min. Παραλαμβάνεται προϊόν σε μορφή σκόνης και αποθηκεύεται σε χώρο με ελεγχόμενες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας^[56].

2. Η μέθοδος ζύμωσης (Kneading Method)

Η προς εγκλεισμό ένωση η οποία βρίσκεται σε υγρή κατάσταση ή διαλυμένη σε κάποιο διάλυμα, προστίθεται σε έναν πολτό κυκλοδεξτρίνης και ζυμώνεται προσεκτικά μέσα σε ένα γουδί, προκειμένου να σχηματιστεί μία πάστα, η οποία εν συνεχεία θα ξηρανθεί. Το ανακτώμενο στερεό μετά την ξήρανση ξεπλένεται με ορισμένη ποσότητα διαλύτη, όπως είναι ο αιθέρας ή η αιθανόλη, ώστε να απομακρυνθεί η απορροφούμενη μη-συμπλοκοποιημένη

ένωση από το σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Εν συνεχεία, το στερεό επαναξηραίνεται υπό κενό. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για μόρια χαμηλής διαλυτότητας στο νερό, καθώς με τον σχηματισμό των ενώσεων εγκλεισμού εξασφαλίζεται η αργή διάλυσή τους. Αποδίδει υψηλές αποδόσεις σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού, ωστόσο αντενδείκνυται για σχηματισμό συμπλόκων μεγάλης κλίμακας^[55]. Αποτελεί την πιο κοινή και απλή μέθοδο παρασκευής συμπλόκων εγκλεισμού με πολύ χαμηλό κόστος^[66].

3. Συμπλοκοποίηση σε μορφή πολτού (Slurry Complexation)

Η μέθοδος αυτή έχει ως εξής : Πραγματοποιείται προσθήκη κυκλοδεξτρίνης σε νερό σε αναλογία 50-60% σε στερεά, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα κορεσμένο υδατικό διάλυμα. Με την προσθήκη και του προς εγκλεισμό μορίου, σχηματίζονται σύμπλοκα εγκλεισμού τα οποία κρυσταλλοποιούνται ή καθιζάνουν^[74].

4. Η μέθοδος της συνιζηματοποίησης (Co-precipitation Method)

Η μέθοδος της συνιζηματοποίησης είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος σε εργαστηριακή κλίμακα^[57].

α) Μη βασισμένη στην Διαλυτότητα των Φάσεων στο νερό

Το προς εγκλεισμό μόριο (guest) διαλύεται σε κάποιον οργανικό διαλύτη (διαιθυλαιθέρα, χλωροφόρμιο, βενζόλιο κλπ). Στο διάλυμα αυτό προστίθεται κατάλληλη ποσότητα κυκλοδεξτρίνης διαλυμένης σε νερό και αρχίζει η ανάδευση. Έπειτα το διάλυμα ψύχεται και πραγματοποιείται κρυστάλλωση. Οι κρύσταλλοι που δημιουργούνται ξεπλένονται με διαιθυλαιθέρα ή άλλον οργανικό διαλύτη και ξηραίνονται στους 50 °C, σχηματίζοντας σύμπλοκα σε μορφή σκόνης^[55].

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για μη-υδατοδιαλυτές ουσίες, αλλά οδηγεί σε μικρές αποδόσεις, διότι οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται σαν μέσο καθίζησης, μπορεί να αναστείλλουν τον εγκλεισμό^[55].

β) Βασισμένη στην Διαλυτότητα των Φάσεων στο νερό

Το προς εγκλεισμό μόριο και η κυκλοδεξτρίνη προστίθενται σε νερό και ανακινούνται καλά μέχρι να αποκατασταθεί ισορροπία διάλυσης, ή διαλύονται σε ζεστό νερό και εν συνεχεία ψύχονται με αργό ρυθμό. Οι ποσότητες των δύο συστατικών εκτιμώνται από την καμπυλότητα κατάλληλων διαγραμμάτων φάσης-διαλυτότητας τύπου BS. Η ένωση εγκλεισμού καθιζάνει ως μικροκρυσταλλική σκόνη και παραλαμβάνεται μέσω διήθησης. Κατά αυτόν τον τρόπο η στερεή ένωση εγκλεισμού διαχωρίζεται από το υδατικό διάλυμα. Τέλος, υφίσταται ξήρανση^[55].

Η περιορισμένη διαλυτότητα της κυκλοδεξτρίνης οδηγεί στη χρήση μεγάλων ποσοτήτων νερού. Έτσι η ενέργεια που απαιτείται για τα στάδια ψύξης και θέρμανσης, όπως και η χωρητικότητα της δεξαμενής αποτελούν παράγοντες κόστους για την μέθοδο[6]. Ακόμη, η μέθοδος αντενδείκνυται για συστήματα με διαγράμματα φάσης διαλυτότητας τύπου A, καθώς το σύμπλοκο που σχηματίζεται είναι διαλυτό στο υδατικό διάλυμα^[55].

5. Θέρμανση σε κλειστό δοχείο

Η μέθοδος αυτή ανακαλύφθηκε από τον Nakai, ο οποίος πρότεινε τη θέρμανση της δραστικής ένωσης του βενζοϊκού οξέος όσο και του μορίου-ξενιστή εντός ενός κλειστού δοχείου. Πιο συγκεκριμένα, το μίγμα αυτό αφού απορροφήσει μία συγκεκριμένη ποσότητα υδρατμών, αποθηκεύεται εντός του δοχείου και θερμαίνεται σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 43 έως 142 °C. Όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 70 °C, παράγεται η ένωση εγκλεισμού σε κρυσταλλική μορφή^[55]. Το σύμπλοκο που παράγεται απομακρύνεται από το δοχείο και υφίσταται ξήρανση. Η ποσότητα του νερού που προστίθεται (ανάλογα με το περιεχόμενο της κυκλοδεξτρίνης σε νερό), ο βαθμός ανάμιξης και ο χρόνος θέρμανσης εξαρτώνται από το εκάστοτε μόριο που πρόκειται να εγκλειστεί^[57]. Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί και με την επίδραση αερίου αζώτου. Είναι δε κατάλληλη για θερμικά σταθερές πτητικές ουσίες, καθώς τα μόρια που βρίσκονται σε αέρια κατάσταση εγκλείονται καλύτερα μέσα στην κοιλότητα του ξενιστή^[55].

6. Ξήρανση με ψεκασμό (Spray Drying)

Οι ποσότητες του προς εγκλεισμό μορίου και της κυκλοδεξτρίνης διαλύονται σε διαπιονισμένο νερό. Προκειμένου ωστόσο να προκύψουν διαυγή διαλύματα τα οποία εν συνεχεία θα ξηρανθούν, προστίθενται μικρές ποσότητες διαλύτη, όπως υδροξειδίου του αμμωνίου ή αιθανόλης ή άλλων συνδιαλυτών. Μόλις λοιπόν το διάλυμα γίνει διαυγές, αυτό ψεκάζεται μέσω ενός ακροφυσίου μέσα σε έναν θάλαμο ξήρανσης. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται μόνο για θερμικά σταθερά μόρια, καθώς οι θερμοκρασίες φτάνουν τους 50-70 °C^[55]. Πρόκειται για μια κοινή τεχνική που χρησιμοποιείται στα φαρμακευτικά προϊόντα για την παραγωγή συμπλόκων εγκλεισμού σε μορφή ξηρής σκόνης από μια υγρή φάση, αλλά και γενικότερα για την απομόνωση αυτών από διαλύματα^[56].

7. Λυοφιλοποίηση (Freeze Drying)

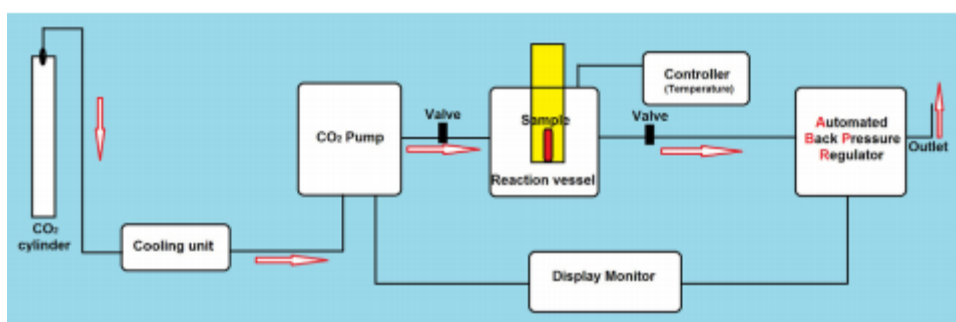
Το προς εγκλεισμό μόριο διαλύεται σε νερό παρουσία αμμωνίας, όπου αυτή κρίνεται απαραίτητη. Έπειτα η κυκλοδεξτρίνη προστίθεται στο διάλυμα σε κατάλληλη αναλογία και αναδεύεται μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή της. Το διάλυμα εν συνεχεία λυοφιλοποιείται. Αν χρειαστεί τα λυοφιλοποιημένα σωματίδια ξεπλένονται με διαιθυλαιθέρα και το υπόλειμμα ξηραίνεται υπό κενό. Έτσι, παράγεται προϊόν σε μορφή σκόνης. Αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για υδατοδιαλυτά μόρια, αφού αυτά και οι κυκλοδεξτρίνες πρέπει να διαλύονται σε νερό πριν από την ξήρανση. Η μέθοδος οδηγεί σε πολύ υψηλές αποδόσεις σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού και είναι κατάλληλη και για διεργασίες μεγάλης κλίμακας^[55]. Αποτελεί μία από τις πιο κατάλληλες μεθόδους αφυδάτωσης σχεδόν όλων των θερμοευαίσθητων υλικών και αρωμάτων, λόγω των χαμηλότερων θερμοκρασιών λειτουργίας, του αργού ρυθμού ξήρανσης και της χρήσης κενού. Αυτή η τεχνική έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στον εγκλεισμό αιθέριων ελαίων^[52].

8. Τεχνολογία Υπερκρίσιμων Ρευστών (Supercritical Fluid Technology)

Πρόκειται για μια τεχνική που αξιοποιεί τις ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών ως διαλύτες πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία και πίεσή τους. Κοντά στο κρίσιμο σημείο, τα υπερκρίσιμα ρευστά έχουν πυκνότητα ανάλογη των υγρών και ικανότητα διάχυσης όμοια με εκείνη των αερίων^[55].

Η τεχνολογία αυτή είναι μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση, μέσω της οποίας σχηματίζονται σύμπλοκα με μόρια κυκλοδεξτρίνης με λιγότερα στάδια επεξεργασίας, αποφεύγοντας τη χρήση επικίνδυνων διαλυτών, όπως του υδροξειδίου του αμμωνίου^[55].

Η διαδικασία η οποία ακολουθείται έχει ως εξής : Μίγμα διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) - αιθανόλης παρασκευάζεται εντός ενός κυλίνδρου. Η κυψελίδα υψηλής πίεσης αφού πληρωθεί με μίγμα κυκλοδεξτρίνης-μορίου που πρόκειται να εγκλειστεί (guest), βυθίζεται σε θερμοστατούμενο λουτρό σιλικόνης (στους 62 °C), όπου και αναδεύεται μηχανικά^[55]. Το μίγμα που βρίσκεται εντός του κυλίνδρου διοχετεύεται στο σύστημα μέσω μιας αντλίας υγρού (liquid pump), αφού πρώτα διέλθει από εναλλάκτη θερμότητας και η επιθυμητή πίεση καθορίζεται από έναν ρυθμιστή πίεσης. Ακολούθως, το σύστημα εξαερίζεται βραδέως με συνεχή τρόπο και η ποσότητα της σκόνης πριν ανακτηθεί μέσω αποσυμπίεσης, ξεπλένεται με CO₂ υψηλής πίεσης, για να απομακρυνθεί η αιθανόλη^{[55],[75]}.



Εικόνα 28 : Σχηματική αναπαράσταση της υπερκρίσιμης διεργασίας με χρήση CO₂ μέσω εξοπλισμού εκχύλισης^[75]

Το διοξείδιο του άνθρακα είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος υπερκρίσιμος διαλύτης λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζει. Είναι αδρανής, μη-διαβρωτικός, μη εύφλεκτος και εκρηκτικός, υπάρχει σε άφθονη ποσότητα, είναι χαμηλού κόστους, μη-τοξικός και συνδυάζει ορισμένες επιθυμητές φυσικές ιδιότητες, όπως χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία (T_c=31°C) και πίεση (P_c=73.8 bar), χαμηλό ιξώδες, χαμηλή επιφανειακή τάση, και μεγάλη ικανότητα διαχύσεως. Ωστόσο, δεν διαλύει πολλά μόρια (guests), γιατί είναι ένας μη-πολικός διαλύτης^[55].

Η υπερκρίσιμη διεργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού σε στερεή κατάσταση. Πρόκειται για μια οικονομική και αποδοτική μέθοδο για πού οδηγεί σε υψηλής απόδοσης σχηματισμό συμπλόκων και βασίζεται σε ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις^[75]. Ωστόσο λόγω του ότι δε χρησιμοποιεί οργανικούς διαλύτες, αποτελεί μία καινοτόμο μη-τοξική μέθοδο για τον σχηματισμό συμπλόκων και κατ' επέκτασιν εξαλείφονται τυχόν προβλήματα που δημιουργούνται από τα υπολείμματα των διαλυτών αυτών^{[55],[75]}.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού κιτράλης^[55].

9. Μέθοδος μικροκυματική ακτινοβολίας (Microwave irradiation method)

Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την αντίδραση μεταξύ της λιποφιλικής ουσίας και του παράγοντα συμπλοκοποίησης λόγω μικροκυματικής ακτινοβολίας εντός ενός φούρνου μικροκυμάτων. Πιο αναλυτικά, η ουσία και η κυκλοδεξτρίνη σε πλήρη μοριακή αναλογία διαλύονται σε ένα μίγμα νερού - οργανικού διαλύτη με συγκεκριμένη αναλογία εντός μίας

σφαιρικής φιάλης. Το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για περίπου 1-2 λεπτά σε 60 °C εντός του φούρνου. Αφότου ολοκληρωθεί η αντίδραση προστίθεται ποσότητα διαλύτη στο μίγμα, για να απομακρυνθεί η ποσότητα της ουσίας και της κυκλοδεξτρίνης που δε συμπλοκοποιήθηκαν. Το ίζημα που λαμβάνεται διαχωρίζεται με απλή διήθηση και ξηραίνεται υπό κενό σε φούρνο στους 40 °C για 48 ώρες. Πρόκειται για μια καινοτόμο μέθοδο με σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως είναι ο μικρός χρόνος αντίδρασης και η υψηλότερη απόδοση προϊόντος^[56].

2.2.5. Εφαρμογές Συμπλόκων

Λόγω της ικανότητας τους να σχηματίζουν σύμπλοκα, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλά βιομηχανικά προϊόντα και τεχνολογίες. Μάλιστα, η αμελητέα κυτοτοξική τους επίδραση τους επιτρέπει να συναντώνται σε ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών. Λειτουργούν σαν φορείς φαρμάκων, τροφίμων, αρωμάτων και καλλυντικών, καθώς επίσης χρησιμοποιούνται στην συσκευασία προϊόντων, σε υφάσματα και στη γεωργία^[55].

Ειδικότερα,

α) Στη βιομηχανία των τροφίμων

Ο κυκλοδεξτρίνες σαν συστατικά τροφίμων χρησιμοποιούνται κυρίως ως φορείς ευαίσθητων συστατικών, όπως αρωματικών υλών, εξασφαλίζοντάς τους εκτεταμένη διάρκεια συντήρησης. Σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με τα αιθέρια έλαια και τις πτητικές ενώσεις, που είναι παρούσες στα τρόφιμα και στα ποτά, βελτιώνοντας τα χαρακτηριστικά τους^[55]. Οι τρεις κύριες κυκλοδεξτρίνες μάλιστα συμπεριλαμβάνονται στη λίστα προϊόντων «Γενικά Αναγνωρισμένων ως Ασφαλείς-Generally Recognized As Safe, GRAS»^[61].

Τα τελευταία χρόνια αρκετές αναφορές έχουν γίνει σχετικά με την χρήση κυκλοδεξτρινών σε εφαρμογές τροφίμων. Χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές επεξεργασίας τροφίμων και ως προσθετικά αυτών με στόχο : να προστατεύσουν τα λιποφιλικά συστατικά τροφίμων από το οξυγόνο, το φως και τη θερμότητα που μπορεί να συντελέσουν στην αποικοδόμησή τους, να διαλύσουν τις χρωστικές ουσίες και τις βιταμίνες, να σταθεροποιήσουν αρώματα, γεύσεις, βιταμίνες, και αιθέρια έλαια, να καλύψουν δυσάρεστες οσμές ή γεύσεις και να επιτύχουν ελεγχόμενη απελευθέρωση ορισμένων συστατικών τροφίμων. Χαρακτηριστική είναι η χημική σταθερότητα που επιδεικνύει το έλαιο του λεμονιού, όταν σχηματίζει σύμπλοκα εγκλεισμού με την β-CD^[55].

Αξίζει να σημειωθεί πως η πικρή γεύση των χυμών grapefruit και μανταρινιού μειώθηκε κατά 0.3% με το σχηματισμό συμπλόκων αυτών με τη β-CD πριν από την θερμική επεξεργασία της συσκευασίας των κουτιών. Ακόμη, συμπλοκοποιημένοι αντιμικροβιακοί παράγοντες με κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται σε πλαστικές μεμβράνες συσκευασίας τροφίμων, ^{περιορίζοντας} την απώλεια αρωματικών ουσιών και βελτιώνοντας τη συντήρηση ενάντια στα μικρόβια κατά την αποθήκευσή τους^[55].

β) Στη βιομηχανία καλλυντικών

Στόχος είναι προστασία αρωμάτων μέσω ειδικής επεξεργασίας ή αποθήκευσής τους, η αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των προς εγκλεισμό μορίων και η σταθεροποίησή τους ενάντια σε αποσυνθετικές αντιδράσεις προκαλούμενες από το φως και τη θερμότητα, η προστασία τους ενάντια στην οξείδωση, την εξάτμιση, την υδρόλυση και τη χημική

αντίδραση με άλλα μόρια. Ακόμη, επιτρέπεται η μετατροπή υγρών ή ελαιωδών υλικών σε μορφή σκόνης, η «θωράκιση» ανεπιθύμητων οσμών και γεύσεων, η σταθεροποίηση γαλακτωμάτων και η ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών συστατικών^[76].

Έτσι, σύμπλοκα εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών χρησιμοποιούνται στα αρώματα ακόμη και σε στερεή μορφή, ενώ εφαρμόζονται στο δέρμα μέσω της αργής αποδέσμευσης των αρωμάτων, σε μορφή γαλακτώματος^[76]. Η αλληλεπίδραση μορίου προς εγκλεισμό - κυκλοδεξτρίνης αυξάνει το απαιτούμενο ενεργειακό φράγμα εξάτμισης. Έτσι εξασφαλίζει μεγαλύτερης διάρκειας αρώματα^[55].

γ) Στη βιομηχανία φαρμάκων

Οι φαρμακευτικές εφαρμογές των συμπλόκων εγκλεισμού παρουσιάζονται στην Εικόνα 29.



Εικόνα 29 : Φαρμακευτικές εφαρμογές κυκλοδεξτρινών^[77]

Πιο αναλυτικά, ο εγκλεισμός φαρμάκων μέσα στην κοιλότητα μορίων κυκλοδεξτρίνης προσφέρει :

i) Βελτίωση βιοδιαθεσιμότητας : Φάρμακα τα οποία εμφανίζουν μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα, έχουν χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και τείνουν να είναι ιδιαίτερα κρυσταλλικά. Γι' αυτό σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με τις κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες διαθέτουν υδροφιλικές υδροξυλομάδες στο εξωτερικό τους, επιτρέποντας την άμεση έκθεση στο περιβάλλον τους^[77]. Η συμπλοκοποίηση ωστόσο αυξάνει αποκλειστικά την βιοδιαθεσιμότητα φαρμάκων κατηγορίας II που προορίζονται για κατάποση. Σύμφωνα με το Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης πρόκειται για φάρμακα με χαμηλή διαλυτότητα και υψηλή διαπερατότητα^[55].

ii) Σταθεροποίηση των δραστικών ουσιών : Παρεμποδίζεται η αποικοδόμησή τους από παράγοντες όπως η ακτινοβολία, η θέρμανση, το οξυγόνο ή το νερό, καθώς δε μπορεί να πραγματοποιηθεί κάποια χημική αντίδραση, όσο αυτές είναι εγκλεισμένες μέσα στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης^[77].

iii) Μείωση των ερεθισμών : Δραστικά συστατικά τα οποία προκαλούν ερεθισμούς στο στομάχι, το δέρμα, και τα μάτια, κρίνεται σκόπιμο να εγκλείονται εντός μορίων κυκλοδεξτρίνης, ώστε να περιορίζεται ο ερεθισμός και οι παρενέργειες από την άμεση επαφή με τις βιολογικές μεμβράνες, μειώνοντας τη συγκέντρωση του ελεύθερου συστατικού^{[55],[77]}.

iv) Οφέλη διαχείρισης ουσιών : Ουσίες που βρίσκονται σε υγρή ή ελαιώδη μορφή, εγκλείονται μέσα σε μόρια κυκλοδεξτρίνης, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε στερεή σκόνη με καλύτερες ρεολογικές ιδιότητες και σε δισκία με απλές διαδικασίες παραγωγής.

v) Κάλυψη οσμών και αρωμάτων : Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται έχουν ελάχιστη έως καθόλου γεύση, καθιστώντας τα φάρμακα περισσότερο αποδεκτά από τους ασθενείς.

vi) Απομόνωση συστατικών, παρεμποδίζοντας τυχόν μεταξύ τους χημικές αλληλεπιδράσεις^[77].

Τα τελευταία χρόνια ωστόσο έχουν χρησιμοποιηθεί παράγωγα κυκλοδεξτρίνης ως φορείς φαρμάκων, όπως είναι οι μεθυλιωμένες, οι ακετυλιωμένες και οι υδροξυπροπυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες^[55]. Τα υδροφιλικά παράγωγα αυξάνουν τη διαλυτότητα ορισμένων φαρμάκων μέσω σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού με αυτά. Από την άλλη, τα υδροφοβικά παράγωγα ελέγχουν το ρυθμό αποδέσμευσης των υδατοδιαλυτών φαρμάκων^[56].

δ) Στη γεωργία

Ένα μέρος της ποσότητας των φυτοφαρμάκων «χάνεται» λόγω π.χ. εξάτμισης ή υδρόλυσης. Έτσι, καταναλώνονται υψηλές ποσότητες αυτών, προκειμένου να αντισταθμιστεί η απώλειά αυτή. Γι' αυτό κρίνεται σκόπιμος ο εγκλεισμός τους σε μόρια κυκλοδεξτρίνης, βελτιώνοντας την διαμόρφωση και την αποτελεσματικότητά τους, μέσω αύξησης της ρευστότητας, της διαλυτότητας και του ρυθμού διάλυσής τους, της θερμικής και χημικής σταθερότητάς τους και του περιορισμού της τάσης τους προς εξάτμιση. Επίσης, σύμπλοκα εγκλεισμού με την β-κυκλοδεξτρίνη προτείνονται και στην περίπτωση ζιζανιοκτόνων^[78].

ε) Στον κλάδο της κλωστοϋφαντουργίας

Στον τομέα κλωστοϋφαντουργίας, οι κυκλοδεξτρίνες συμπλοκοποιούνται με αρωματικές ενώσεις (fragrances), με ουσίες κατάλληλες για την περιποίηση της επιδερμίδας, όπως είναι η καφεΐνη, οι βιταμίνες ή ακόμη και τα βιοκτόνα^[61].

Πιο συγκεκριμένα, το έλαιο του κέδρου, το οποίο συναντάται σε ίνες από βαμβάκι ή σε ίνες από μίγμα PET-βαμβακιού, σχηματίζει σύμπλοκα με την β-κυκλοδεξτρίνη, επιδεικνύοντας εντομοαπωθητική δράση μεγαλύτερης διάρκειας ενάντια στο σκώρο, συγκριτικά με τα υφάσματα τα οποία περιέχουν μόνο έλαιο κέδρου. Αυτό οφείλεται στον περιορισμό της πτητικότητας του συμπλοκοποιημένου ελαίου^[61].

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με στόχο τη μελέτη νανοεγκλεισμού αιθερίων ελαίων, που προέρχονται από ψυχρή έκθλιψη εσπεριδοειδών φρούτων (λεμονιού, πορτοκαλιού, μανταρινιού και γκρέιπφρουτ). Πρόκειται για ενώσεις που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς εμφανίζουν αξιόλογη βιολογική δράση, που τους επιτρέπει να συναντώνται σε ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών. Πιο συγκεκριμένα, διερευνήθηκε ο εγκλεισμός αυτών μέσω δύο διαφορετικών μεθόδων :

α) εγκλεισμού σε νανοσωματίδια βιοδιασπώμενου πολυμερούς πολυ(γαλακτικού) οξέος (PLA) και β) σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού με μόρια β-κυκλοδεξτρίνης.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο σχηματισμός πολυμερικών νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένο κάθε φορά κάποιο εκ των τεσσάρων προαναφερθέντων αιθέριων ελαίων, μέσω της τεχνικής γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση οργανικού διαλύτη.

Η τεχνική του εγκλεισμού σε πολυμερικά νανοσωματίδια βελτιώνει τη σταθερότητά τους, καθώς προστατεύει τα αιθέρια έλαια από παράγοντες αποδόμησής τους, αυξάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη διάρκεια ζωής τους, καθώς επίσης επιτρέπει και την ελεγχόμενη αποδέσμευσή τους.

Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν σύμπλοκα εγκλεισμού (inclusion complexes) των αιθέριων αυτών ελαίων με μόρια β-κυκλοδεξτρίνης μέσω της μεθόδου της συν-καταβύθισης. Συγκεκριμένα, ποσότητα αυτών εγκλείστηκε μέσα στην κοιλότητα μορίων κυκλοδεξτρίνης, με αποτέλεσμα την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των υδρόφοβων αυτών ενώσεων, τη σταθεροποίησή τους έναντι σε αποσυνθετικούς παράγοντες, όπως η οξείδωση, η θέρμανση και το φως, τον περιορισμό της πτητικότητάς τους και την προστασία των αρωμάτων τους.

Το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς και το δυναμικό επιφανείας των σωματιδίων μετρήθηκαν μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS).

Η ταυτοποίηση των νανοσωματιδίων που προέκυψαν σε κάθε περίπτωση, πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. Επιβεβαιώθηκε με αυτόν τον τρόπο ο εγκλεισμός ορισμένης ποσότητας των αιθέριων ελαίων εντός του PLA και ο σχηματισμός συμπλόκων αιθέριου ελαίου-β – κυκλοδεξτρίνης.

Στόχος είναι η μελέτη της ενσωμάτωσης των ξηρών νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ποσότητα αιθέριων ελαίων σε αντικουνουπικά προϊόντα, λόγω της εντομοαπωθητικής-εντομοκτόνου δράσης που αυτά παρουσιάζουν.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΕ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΑ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΠΟΛΥ(ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ) ΟΞΕΟΣ

1.1.1. Σχηματισμός Νανοςωματιδίων Πολυ(Γαλακτικού) Οξέος (PLA) - Εγκλεισμός Μικρής Κλίμακας

Υλικά & Αντιδραστήρια

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία του εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων είναι :

- ❖ Πολυ(γαλακτικό) οξύ (PLA), με εμπορική ονομασία PLI005 και $M_r=51.700$ g/mol,
- ❖ Αιθέρια Έλαια
 1. λεμονιού (citrus limon),
 2. πορτοκαλιού (citrus sinensis),
 3. μανταρινιού (citrus reticulata) και
 4. γκρέιπφρουτ (citrus X paradise), προερχόμενα από κρυσυμπίεση.
- ❖ Πολυ(βινυλική) αλκοόλη (PVA), υδρολυμένη κατά 87-89%.
- ❖ Απιονισμένο νερό (d.H₂O)
- ❖ Ακετόνη υψηλής καθαρότητας
- ❖ Οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc)
- ❖ Διχλωρομεθάνιο (DCM)
- ❖ Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

Όργανα & σκεύη

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων εγκλεισμού αιθέριων ελαίων είναι :

- ☞ Μαγνητικός Αναδευτήρας
- ☞ Αναδευτήρας τύπου Vortex
- ☞ Ζυγός Ακριβείας
- ☞ Πιπέτα ακριβείας, της τάξης των 100-1000 μ L
- ☞ Περιστροφικός Εξατμιστήρας Rotary Evaporator
- ☞ Φυγόκεντρος 4239R ALC International
- ☞ Ποτήρια ζέσεως
- ☞ Κωνικές φιάλες
- ☞ Σφαιρική φιάλη
- ☞ Δοκιμαστικός Σωλήνας
- ☞ Γυάλινα Φιαλίδια

1.1.1.1 Παρασκευή υδατικού διαλύματος πολυ(βινυλικής) αλκοόλης (PVA) περιεκτικότητας 1% (w/v).

Την υδατική φάση των πειραμάτων νανοεγκλεισμού αποτέλεσε υδατικό διάλυμα πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PVA) περιεκτικότητας 1% (w/v). Για την παρασκευή 500 mL ενός υδατικού διαλύματος PVA με αυτήν την περιεκτικότητα, εισάγονται σε ποτήρι ζέσεως των 1000 mL, 5 gr PVA και 500 gr απιονισμένου νερού (d.H₂O). Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες σε μαγνητικό αναδευτήρα με ήπια ανάδευση και σε θερμοκρασία 47 °C (το ενδεικνυόμενο θερμοκρασιακό εύρος κυμαίνεται από 45-50°C). Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης), το διάλυμα αφότου επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποθηκεύεται σε κλειστό γυάλινο μπουκάλι (διάλυμα stock), από το οποίο λαμβάνεται η απαιτούμενη κάθε φορά ποσότητα για τα πειράματα του νανοεγκλεισμού. Σε περίπτωση μάλιστα που στο διάλυμα stock παρατηρηθούν αιωρήματα αδιάλυτης ποσότητας πολυ(βινυλικής αλκοόλης), πραγματοποιείται μία απλή διήθηση του διαλύματος, ώστε στο διηθητικό χαρτί να περισυλλεγεί όλη η αδιάλυτη ποσότητα αυτής και το διαυγές πλέον υδατικό διάλυμα να αποθηκευτεί ξανά στο γυάλινο μπουκάλι προς περαιτέρω χρήση.

2.1.1.2. Εγκλεισμός αιθέριων ελαίων σε πολυμερικά νανοσωματίδια PLA

Για τον εγκλεισμό των αιθέριων ελαίων σε νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού) οξέος (PLA) εφαρμόστηκε η *τεχνηκή γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη - Emulsification-Solvent evaporation method - μέθοδος απλού γαλακτώματος (o/w)*.

Οι εγκλεισμοί αυτοί πραγματοποιούνται με θεωρητικό ποσοστό φόρτωσης (Drug Loading) ίσο με 20%. Αυτό προκύπτει από την κάτωθι σχέση :

$$\text{Drug Loading (DL)} = \frac{\text{μάζα ουσίας προς εγκλεισμό (mg)}}{\text{μάζα πολυμερούς (mg)}}$$

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα πολυ(γαλακτικού) οξέος συγκέντρωσης 10 mg/mL (Διάλυμα A). Πιο αναλυτικά, 15 mg PLA και 1.5 mL ακετόνης τοποθετούνται εντός ενός δοκιμαστικού σωλήνα (κλεισμένου αεροστεγώς με septum) και οδηγούνται σε αναδευτήρα τύπου Vortex για περίπου 10 min μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του πολυμερούς.

Παράλληλα, 15 mL υδατικού διαλύματος PVA 1% (w/v) εισάγονται σε ποτήρι ζέσεως 100 mL και αφήνονται υπό ήπια ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ακολουθεί η προετοιμασία του διαλύματος της υπό εγκλεισμό ουσίας (Διάλυμα B). Συγκεκριμένα, ζυγίζονται 3 mg του εκάστοτε αιθέριου ελαίου (DL=20%) σε προζυγισμένο φιαλίδιο και διαλύονται σε 0.5 mL οργανικού διαλύτη (οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc), διχλωρομεθανίου (DCM) ή διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) κατά περίπτωση). Το φιαλίδιο αυτό φυλάσσεται στο ψυγείο μέχρι το στάδιο της ανάμειξης των δύο φάσεων.

Πίνακας 2 : Οργανικός διαλύτης κατά περίπτωση αιθέριου ελαίου

Αιθέριο Έλαιο	Διαλύτης
Λεμόνι	Οξικός αιθυλεστέρας
Μανταρίνι	Διχλωρομεθάνιο
Γκρέιπφρουτ	Διχλωρομεθάνιο
Πορτοκάλι	Διμεθυλοσουλφοξείδιο

Αφότου παρασκευαστούν τα δύο διαλύματα, αναμειγνύονται εντός ενός κρυσταλλωτηρίου (οργανική φάση) και με χρήση σύριγγας πραγματοποιείται ταχύτατη έγχυση της φάσης αυτής στο υπό ανάδευση υδατικό διάλυμα της πολυ(βινυλικής) αλκοόλης 1% (w/v). Κατά την έγχυση αυτή (ανάμειξη της υδατικής με την οργανική φάση) παρατηρείται σχηματισμός γαλακτώματος. Η ανάδευση συνεχίζεται για 10 min.

Προκειμένου να γίνει αργή εξάτμιση των οργανικών διαλυτών και να σχηματιστούν τα PLA νανοσωματίδια, το γαλάκτωμα διαβιβάζεται σε μία σφαιρική φιάλη των 250 mL. Η σφαιρική φιάλη μαζί με το γαλάκτωμα προζυγίζεται και κατόπιν οδηγείται στον περιστροφικό εξατμιστήρα rotary evaporator, για να γίνει η εξάτμιση. Το γαλάκτωμα παραμένει στο όργανο, μέχρι σταθεροποίησης του βάρους της σφαιρικής φιάλης. Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται η εξάτμιση όλων των οργανικών διαλυτών (της ακετόνης και του εκάστοτε διαλύτη του αιθέριου ελαίου). Ο κατά μέσο όρο απαιτούμενος χρόνος εξάτμισης ήταν 1,5 - 2 ώρες. Η εξάτμιση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό πίεση 500 mbar.

Ακολουθεί η διεξαγωγή τριών φυγοκεντρήσεων για την απομόνωση και συλλογή των σωματιδίων από το υδατικό διάλυμα. Η πρώτη φυγοκέντρωση πραγματοποιείται για 20 min, σε 17000 rpm και σε θερμοκρασία 0-10 °C, προκειμένου να καταβυθιστούν όλα τα σωματίδια. Αφότου το υπερκείμενο διάλυμα αυτής της φυγοκέντρωσης (S1) απομακρυνθεί και συλλεχθεί σε κωνική φιάλη, τα καταβυθισμένα ως συσσωμάτωμα νανοσωματίδια εκπλένονται με 1 mL απιονισμένου νερού, ώστε να απομακρυνθεί το PVA. Τα νανοσωματίδια φυγοκεντρώνονται ξανά για 20 min, σε 17000 rpm και σε θερμοκρασία 0-10 °C. Συλλέγεται το υπερκείμενο διάλυμα (S2) σε κωνική φιάλη και ακολουθούν εκπλύσεις των ευδιάκριτων καταβυθισμένων νανοσωματιδίων όπως πριν, με 1 mL απιονισμένου νερού. Η διασπορά που προέκυψε οδηγείται προς τρίτη φυγόκεντρο ιδίων συνθηκών με της δεύτερης, όπου και συλλέγεται σε νέα κωνική φιάλη το υπερκείμενο διάλυμα (S3). Πραγματοποιείται επαναδιασπορά των καταβυθισμένων νανοσωματιδίων με 1 mL απιονισμένου νερού και ακολουθεί συλλογή και μεταφορά όλου του προκύπτοντος διαλύματος από το erpendorf σε γυάλινο φυαλίδιο, όπου και προστίθενται άλλα 3 mL απιονισμένου νερού. Τέλος, το δείγμα αυτό των 4 mL αποθηκεύεται στο ψυγείο σφραγισμένο με parafilm.

1.1.2. Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων (Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό)

Υλικά & Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αυτών των μεγεθών είναι :

- ❖ Διασπορά πολυμερικών νανοσωματιδίων
- ❖ Δις-απιονισμένο νερό
- ❖ Απιονισμένο νερό

Όργανα & σκεύη

Κατά την πειραματική διαδικασία προσδιορισμού αυτών των μεγεθών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω :

- ☞ Malvern Zetasizer Nano ZSP, για μέτρηση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)
- ☞ Μαγνητικός αναδευτήρας

- ☞ Αναδευτήρας τύπου vortex
- ☞ Λουτρό Υπερήχων (Sonication Bath) Branson 2210
- ☞ Πιπέτα ακριβείας της τάξης των 10-100 μL
- ☞ Κυψελίδα Disposable capillary cell DTS1070
- ☞ Ποτήρι ζέσεως
- ☞ Φιαλίδιο 4 mL
- ☞ Ειδικά φίλτρα διαμέτρου 0.45 μm

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων σχετικά με το μέγεθος (size), το δείκτη πολυδιασποράς (polydispersity index, PDI) και το ζ-δυναμικό (zeta potential) πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

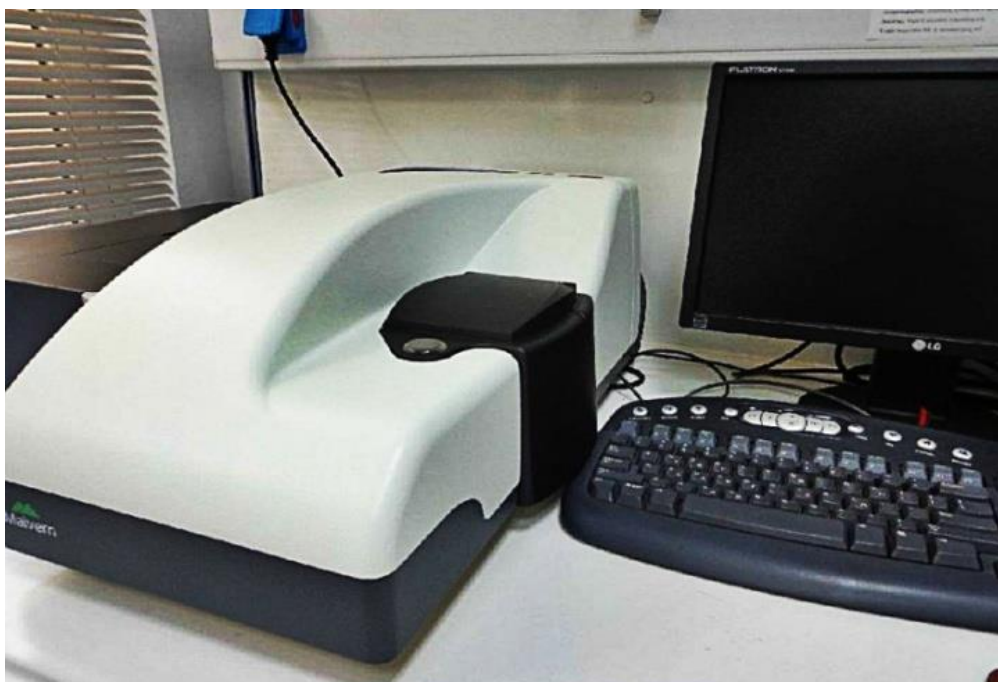
Για την παρασκευή του δείγματος που προορίζεται για μέτρηση DLS, λαμβάνονται 20 μL από το δείγμα των 4 mL που περιείχε τη διασπορά των νανοσωματιδίων και ήταν αποθηκευμένο στο ψυγείο και αραιώνονται με προσθήκη 2.98 mL δις-απιονισμένου νερού (d.d H_2O), προς τελικό όγκο 3 mL.

Το νέο αυτό δείγμα είτε οδηγείται προς ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, είτε οδηγείται σε αναδευτήρα τύπου vortex για περίπου 5 λεπτά (σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτούνταν και οι δύο τρόποι ανάδευσης). Στόχος της ανάδευσης είναι η επίτευξη καλής διασποράς των νανοσωματιδίων. Στις περισσότερες μάλιστα περιπτώσεις προκειμένου να καταστραφούν τυχόν συσσωματώματα νανοσωματιδίων που δεν διαλύθηκαν με την ανάδευση, πραγματοποιείται κατεργασία του δείγματος μέσα σε λουτρό υπερήχων για 5 λεπτά.

Έπειτα, με την χρήση σύριγγας λαμβάνεται μία ποσότητα του διαλύματος που εμπεριέχεται μέσα στο φιαλίδιο και τοποθετείται στην κυψελίδα για την λήψη των μετρήσεων. Το τμήμα της κυψελίδας που θα πρέπει να πληρωθεί με υγρό έχει σχήμα U. Για την τοποθέτηση του δείγματος η κυψελίδα κρατιέται ανάποδα και με κλίση, ώστε να γεμίζει αργά και χωρίς φυσαλίδες. Η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται είναι τέτοια, προκειμένου να διαβραχούν πλήρως τα ηλεκτρόδια της κυψελίδας. Τέλος, η κυψελίδα σφραγίζεται και τοποθετείται εντός του οργάνου.

Πραγματοποιούνται δύο ειδών μετρήσεις, μία πρώτη για τον προσδιορισμό του μεγέθους (size) των νανοσωματιδίων και μία δεύτερη για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού τους (z-potential). Τόσο για τον προσδιορισμό του μεγέθους όσο και για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις σε θερμοκρασία 25 ± 1 °C και λαμβάνεται ο μέσος όρος αυτών. Στις ρυθμίσεις του οργάνου ως δείκτης διάθλασης (Refractive index R.I.), λαμβάνεται ο δείκτης διάθλασης του νερού R.I. =1.330. Αφότου ολοκληρωθούν οι δύο μετρήσεις, η κυψελίδα ξεπλένεται καλά με απιονισμένο νερό και σκουπίζεται περιμετρικά και μαλακά με χαρτί.

Εν συνεχεία, επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία για τα δύο είδη μετρήσεων με νέα ποσότητα δείγματος λαμβανόμενη από το φιαλίδιο, αφότου πρώτα αυτή διέλθει από ειδικό φίλτρο διαμέτρου 0.45 μm , προκειμένου να συγκρατηθούν σε αυτό τα μεγάλα νανοσωματίδια. Στόχος είναι η παρουσίαση συγκρινόμενων αποτελεσμάτων.



Εικόνα 30: Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP, για τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).

2.1.2. Λυοφιλοποίηση νανοσωματιδίων (Freeze Drying)

Υλικά & αντιδραστήρια

- ❖ Νανοσωματίδια σε διασπορά
- ❖ Σακχαρόζη
- ❖ Απιονισμένο νερό

Όργανα & σκεύη

- ☞ Κρυσταλλωτήριο
- ☞ Κωνική φιάλη
- ☞ Φιαλίδιο

Αρχικά ζυγίζονται 40 mg σακχαρόζης τα οποία διαλύονται σε 2 mL απιονισμένου νερού, για να προκύψει διάλυμα 2% (w/v).

Έπειτα σε ένα προζυγισμένο κρυσταλλωτήριο προστίθενται η διασπορά των NPs που ήταν φυλαγμένη σε φιαλίδιο στο ψυγείο και το διάλυμα της σακχαρόζης.

Το κρυσταλλωτήριο σφραγίζεται με αλουμινόχαρτο και λαστιγάκι, ενώ ανοίγονται προσεκτικά τρύπες στο αλουμινόχαρτο, για να διευκολυνθεί η εξάχνωση. Εν συνεχεία, οδηγείται στην κατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για περίπου 20 λεπτά και τέλος ψύχεται υπό κενό στους $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight.

Με χρήση ειδικής σπάτουλας περισυλλέγεται όση περισσότερη ποσότητα λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων γίνεται από το κρυσταλλωτήριο, τοποθετείται σε προζυγισμένο φιαλίδιο και φυλάσσεται στην κατάψυξη.

1.1.3. Ξήρανση νανοσωματιδίων στην αντλία υψηλού κενού Edwards

Υλικά & σκεύη

- ❖ Νανοσωματίδια κατόπιν φυγοκέντρωσης με απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού
- ❖ Απιονισμένο νερό

Όργανα & σκεύη

- ☞ Αντλία υψηλού κενού Edwards
- ☞ Πιστόλι συσκευής Edwards
- ☞ Πιπέτα ακριβείας της τάξης των 100-1000 μL

Αρχικά, σε έναν απαγωγό τοποθετούνται 1-2 κουταλιές πεντοξειδίου του φωσφόρου (P_2O_5) στο πιστόλι της συσκευής Edwards. Πάνω από το P_2O_5 τοποθετείται βαμβάκι.

Η διασπορά των νανοσωματιδίων τοποθετείται σε προζυγισμένα φιαλίδια Eppendorf και φυγοκεντρείται στις 17000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά και σε θερμοκρασία 0-10 °C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και τα νανοσωματίδια ξηραίνονται στην αντλία υψηλού κενού Edwards για 6 ώρες.

1.1.4. Άμεσος Προσδιορισμός Ποσοστού Εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων στα PLA νανοσωματίδια (EE%)

Προκειμένου να υπολογιστεί άμεσα το EE%, θα πρέπει να «σπάσουν» τα νανοσωματίδια και να γίνει ποσοτικοποίηση της εγκλεισμένης ουσίας.

Υλικά & Αντιδραστήρια

- ❖ Ξηρά νανοσωματίδια από αντλία υψηλού κενού Edwards ή διεργασία Freeze Drying
- ❖ Οργανικός Διαλύτης του πολυμερούς (Οξικός Αιθυλεστέρας)

Όργανα & σκεύη

- ☞ Μαγνητικός αναδευτήρας
- ☞ Αναδευτήρας τύπου Vortex
- ☞ Φασματοφωτόμετρο ορατού - υπεριώδους UV-Vis διπλής δέσμης Cary 1E της Varian
- ☞ Κυψελίδες χαλαζία 4 mL
- ☞ Πιπέτα ακριβείας της τάξης των 10-100 μL

Τα ξηρά νανοσωματίδια στην αντλία Edwards ή μέσω Freeze Drying NPs διαλύονται στον διαλύτη που διαλύει το πολυμερές. Συγκεκριμένα, γίνεται διάλυσή τους σε 1.5 mL του οργανικού αυτού διαλύτη εντός σφαιρικής φιάλης.

Για να επιτευχθεί καλή διάλυση των νανοσωματιδίων, η σφαιρική φιάλη οδηγείται για λίγο χρόνο στο vortex και κατόπιν υπόκεινται σε ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 24 ώρες.

Έπειτα το δείγμα αυτό φωτομετρείται στο UV-Vis. Σε περίπτωση που οι τιμές της απορρόφησης υπερβαίνουν την μονάδα, τότε το δείγμα κρίνεται πυκνό και χρήζει κατάλληλης αραιώσης. Ωστόσο, όπως θα φανεί στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων, το

δείγμα στην περίπτωση μας ήταν αραιό εξ' αρχής λόγω των μικρών ποσοτήτων νανοσωματιδίων που προέκυψαν από την ξήρανση.



Εικόνα 31 : Φασματοφωτόμετρο UV-Vis Cary 1 της εταιρίας Varian

1.2.1 Σηματομορφές Νανοσωματιδίων Πολυ(Γαλακτικού) Οξέος (PLA) - Εγκλεισμός Μεγάλης Κλίμακας

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στον scaled-up εγκλεισμό ήταν ίδια με εκείνα της μικρής κλίμακας με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος τύπου Sorvall RC 28S.

1.2.1.1. Εγκλεισμός αιθέριων ελαίων σε πολυμερικά νανοσωματίδια PLA

Προκειμένου να παραχθεί μεγαλύτερη ποσότητα NPs, πραγματοποιήθηκαν ορισμένα πειράματα με μεγαλύτερη αρχική ποσότητα πολυμερούς και αιθέριου ελαίου. Η τεχνική παρασκευής των NPs ήταν και σε αυτήν την περίπτωση η *Γαλακτωματοποίηση με ταυτόχρονη Εξάτμιση Οργανικού Διαλύτη*.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 30 mg αιθέριου ελαίου και μέσω του DL=20% υπολογίστηκε και η απαιτούμενη ποσότητα PLA, η οποία αντιστοιχούσε σε 150 mg.

Η διαδικασία η οποία ακολουθείται είναι ανάλογη εκείνης που περιγράφηκε παραπάνω.

Αρχικά δηλαδή, παρασκευάζεται το διάλυμα του PLA. Τα 150 mg αυτού διαλύονται σε 15 mL ακετόνης εντός ενός δοκιμαστικού σωλήνα (αναλογία PLA/ακετόνης=1/10), μέσω ανάδευσης σε αναδευτήρα τύπου vortex για περίπου 25 min, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του πολυμερούς.

Έπειτα, λαμβάνονται 150 mL υδατικού διαλύματος PVA (1% w/v) από το διάλυμα stock και αφήνονται υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για μερικό χρόνο.

Εν συνεχεία, τα 30 mg του εκάστοτε αιθέριου ελαίου διαλύονται σε 5 mL του αντίστοιχου οργανικού διαλύτη (οξικού αιθυλεστέρα, διγλωρομεθανίου ή διμεθυλοσουλφοξειδίου κατά περίπτωση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω).

Οι δύο οργανικές φάσεις αναμειγνύονται και προστίθενται στην υδατική, με αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτώματος. Το γαλάκτωμα μετά από ήπια ανάδευση 10 min, τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη και οδηγήθηκε στο rotary evaporator για περίπου 2,5-3 ώρες (ανάλογα το εκάστοτε αιθέριο έλαιο και τον αντίστοιχο χρησιμοποιούμενο οργανικό διαλύτη).

Ακολουθεί η διεξαγωγή τριών φυγοκεντρήσεων, ορισμένων στις 12000 στροφές/min, στους 0 °C και για χρόνο 20 min, η συλλογή και η απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος καθώς και η επαναδιασπορά των νανοσωματιδίων με ορισμένη ποσότητα δις-απιονισμένου νερού. Για την διευκόλυνση της επαναδιασποράς αυτών πραγματοποιείται ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για περίπου 30 min. Μετά το πέρας της τρίτης φυγοκέντρου και αφού πραγματοποιηθεί η επαναδιασπορά με λίγη ποσότητα δις-απιονισμένου νερού, συλλέγεται όλο το διάλυμα σε μία κωνική φιάλη των 500 mL και αποθηκεύεται στο ψυγείο.

1.2.2 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων (Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό)

Τα Υλικά-Αντιδραστήρια όσο και η Οργανολογία είναι ανάλογα εκείνων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων παραπάνω.

Για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό χρησιμοποιήθηκε και σε αυτήν την περίπτωση η μέθοδος της Δυναμικής Σκέδασης φωτός (DLS).

Η διαδικασία η οποία ακολουθείται είναι η ίδια με αυτήν που περιγράφηκε παραπάνω. Η μοναδική διαφορά έγκειται στην ποσότητα που χρησιμοποιείται από το δείγμα σε διασπορά. Αντί λοιπόν για 20 µL του αποθηκευμένου δείγματος στο ψυγείο, αντλούνται 100 µL, τα οποία αραιώνονται σε 2.9 mL δις-απιονισμένου νερού, προς τελικό όγκο 3 mL.

Το νέο δείγμα αφού τεθεί υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 24 ώρες και εν συνεχεία για ορισμένο χρόνο σε αναδευτήρα τύπου vortex, υφίσταται κατεργασία με υπερήχους (sonication).

Τέλος, λαμβάνεται ορισμένη ποσότητα από το δείγμα και μεταφέρεται στην κυψελίδα, για να διεξαχθούν τα δύο είδη μετρήσεων. Τα δείγματα μάλιστα μετρώνται δύο φορές, χωρίς να διέλθουν και αφότου διέλθουν από ειδικό φίλτρο διαμέτρου 0.45 µm.

1.2.3 Λυοφιλοποίηση νανοσωματιδίων (Freeze Drying)

Τα Υλικά-Αντιδραστήρια όσο και η Οργανολογία είναι ίδια με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν στην διαδικασία freeze drying των νανοσωματιδίων παραπάνω.

Η διαδικασία της λυοφιλοποίησης προσομοιάζει αυτήν που περιγράφηκε παραπάνω, με την μόνη διαφορά πως δεν χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα σακχαρόζης. Τα νανοσωματίδια σε

διασπορά κατάψυχονται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για περίπου μισή ώρα και εισέρχονται στην συσκευή freeze drier στους $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, όπου και διατηρούνται κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Την επομένη, με χρήση ειδικής σπάτουλας συλλέγεται η ανακτώμενη ποσότητα των freeze dried NPs και τοποθετείται σε προζυγισμένα γυάλινα φιαλίδια, γεγονός που επιτρέπει τον ακριβή υπολογισμό της. Τέλος, φυλάσσονται στην κατάψυξη.

1.2.4 Εκχύλιση υπερκείμενου διαλύματος για τον άμεσο υπολογισμό του Ποσοστού Εγκλεισμού (EE%)

Υλικά & Αντιδραστήρια

- ❖ Υπερκείμενο διάλυμα πρώτης φυγοκέντρου, S1
- ❖ Οργανικός διαλύτης αιθέριου ελαίου
- ❖ Υδατικό διάλυμα πολυ(βινυλικής) αλκοόλης (PVA) 1% (w/v)

Όργανα & σκεύη

- ☞ Φασματοφωτόμετρο ορατού - υπεριώδους UV-Vis διπλής δέσμης Cary 1E της Varian
- ☞ Διαχωριστική χοάνη 250 mL
- ☞ Κωνική φιάλη
- ☞ Ποτήρι ζέσεως
- ☞ Πιπέτα ακριβείας της τάξης των 100-1000 μL
- ☞ Κυψελίδα χαλαζία 4 mL

Πραγματοποιείται εκχύλιση του υπερκείμενου διαλύματος της πρώτης φυγοκέντρωσης με χρήση του κατάλληλου οργανικού διαλύτη ανάλογα με το εκάστοτε αιθέριο έλαιο.

Στόχος, της εκχύλισης αυτής είναι αφότου γίνουν διαδοχικές ανακινήσεις-εκτονώσεις και αφεθεί το σύστημα σε ηρεμία, να παραληφθεί στην οργανική φάση όση μη εγκλεισμένη ουσία υπήρχε στο υπερκείμενο διάλυμα. Όπως θα φανεί στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων η μέθοδος της εκχύλισης εφαρμόστηκε μόνο στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του λεμονιού με διαλύτη τον οξικό αιθυλεστέρα.

Συγκεκριμένα, το υπερκείμενο διάλυμα S1 μεταφέρεται σε μία διαχωριστική χοάνη των 250 mL, όπου και προστίθενται 30 mL του οργανικού διαλύτη. Η διαχωριστική χοάνη κλείνεται αεροστεγώς με ειδικό πώμα.

Αφήνεται το διάλυμα σε ηρεμία, προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του λεμονιού για το οποίο πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση, η άνω φάση αντιστοιχεί στην οργανική και η κάτω στην υδατική. Ωστόσο, η οργανική φάση παρουσίασε όψη γαλακτώματος και αφρισμούς στην επιφάνειά της, γεγονός που δηλώνει πως ποσότητα της πολυ(βινυλικής) αλκοόλης μεταφέρθηκε στη φάση αυτή.

Εν συνεχεία, απομακρύνεται η υδατική φάση και συλλέγεται σε μία κωνική φιάλη η οργανική.

Τέλος, λαμβάνεται μία ποσότητα 2-3 mL από την οργανική φάση για απευθείας φωτομέτρηση στο UV-Vis, αφότου γίνει μηδενισμός (zero base) με διάλυμα του οργανικού

διαλύτη της ουσίας και του υδατικού διαλύματος της πολυ(βινυλικής) αλκοόλης για τον λόγο που αναφέρθηκε παραπάνω.

Σε περίπτωση που το δείγμα είναι πολύ πυκνό, γίνεται κατάλληλη αραιώσή του μέσω προσθήκης ποσότητας οργανικού διαλύτη.

2. ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΕ β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗ - ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ (INCLUSION COMPLEXES)

2.1. Συμπλοκοποίηση αιθέριων ελαίων σε μόρια β-κυκλοδεξτρίνης

Υλικά & Αντιδραστήρια

- ❖ β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD)
- ❖ Αιθέριο έλαιο (λεμονιού, πορτοκαλιού, μανταρινιού και γκρέιπφρουτ)
- ❖ Αιθανόλη (absolute)
- ❖ Δις-απιονισμένο νερό

Όργανα & σκεύη

- ☞ Κωνική φιάλη
- ☞ Πιπέτα ακριβείας της τάξης των 10-100 μL
- ☞ Ζυγός ακριβείας
- ☞ Μαγνητικός αναδευτήρας με θέρμανση
- ☞ Συσκευή διήθησης υπό κενό
- ☞ Γυάλινα φιαλίδια
- ☞ Αντλία υψηλού κενού Edwards
- ☞ Πιστόλι αντλίας Edwards

Για τον σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού β-κυκλοδεξτρίνης-αιθέριων ελαίων χρησιμοποιείται η **μέθοδος της συν-καταβύθισης**.

Σε ένα διάλυμα αιθανόλης-δις απιονισμένου νερού (σε αναλογία 1:2) συνολικού όγκου 5 mL διαλύονται 500 mg β-CD. Το σύστημα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα στους $55^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση της β-CD στο διάλυμα (συνήθως απαιτούμενος χρόνος : λιγότερο από 1 ώρα).

Ακολούθως, το αιθέριο έλαιο προστίθεται στάγδην στο θερμό διάλυμα της β-κυκλοδεξτρίνης, ενώ αυτό αναδεύεται στους 55°C . Η αναλογία αιθέριου ελαίου/β-CD αντιστοιχεί σε 20:80 (w/w). Κατά την προσθήκη παρατηρείται σχηματισμός γαλακτώματος.

Το γαλάκτωμα συνεχίζει να αναδεύεται για ορισμένο χρόνο, χωρίς θέρμανση, ενώ η θερμοκρασία του μειώνεται αυθόρμητα και καταλήγει ίση με εκείνη του περιβάλλοντος.

Στη συνέχεια, το τελικό διάλυμα ψύχεται για κάποιο χρόνο στο ψυγείο^[79].

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι χρόνοι ανάδευσης και ψύξης για το εκάστοτε αιθέριο έλαιο:

Πίνακας 3 : Χρόνος ανάδευσης και ψύξης για τον σχηματισμό συμπλόκων β-CD με αιθέρια έλαια

Αιθέριο Έλαιο	Χρόνος Ανάδευσης (h)	Χρόνος Ψύξης (h)
Λεμόνι	24	4
Μανταρίνι	24	2
Γκρέιπφρουτ	4	3
Πορτοκάλι	24	20

Ο χρόνος ανάδευσης καθορίζεται από την πλήρη διαλυτοποίηση του ελαίου και την εξάλειψη της ελαιώδους φάσης από το γαλάκτωμα που σχηματίζεται.

Ο χρόνος ψύξης κατά κόρον κυμαίνεται σε 2-3 ώρες. Έπειτα, το γαλάκτωμα διηθείται υπό κενό.

Το ίζημα ξηραίνεται στην αντλία υψηλού κενού Edwards, σε θερμοκρασία 40 °C για περίπου 3 ώρες. Η ανακτώμενη ποσότητα του συμπλόκου φυλάσσεται στην κατάψυξη.

2.2. Χαρακτηρισμός σωματιδίων συμπλόκων εγκλεισμού (Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό)

Υλικά & αντιδραστήρια

- ❖ Ξηρό σύμπλοκο β-CD-αιθέριου ελαίου
- ❖ Δις-απιονισμένο νερό
- ❖ Απιονισμένο νερό

Όργανα & σκεύη

- ☞ Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP, για μέτρηση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)
- ☞ Μαγνητικός αναδευτήρας
- ☞ Αναδευτήρας τύπου Vortex
- ☞ Λουτρό υπερήχων (sonication bath) Branson 2210
- ☞ Κυψελίδα (Disposable capillary cell DTS1070)
- ☞ Ποτήρι ζέσεως
- ☞ Γυάλινο φιαλίδιο

Ο χαρακτηρισμός των σωματιδίων αυτών γίνεται αναφορικά με τις παραμέτρους που μελετήθηκαν και στην περίπτωση των πολυμερικών νανοσωματιδίων, δηλαδή το μέγεθος (size), το δείκτη πολυδιασποράς (polydispersity index, PDI) και το ζ-δυναμικό (zeta potential). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε και σε αυτήν την περίπτωση είναι η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

Για την παρασκευή του δείγματος που προορίζεται για μέτρηση DLS, διαλύεται 1 mg ξηρού συμπλόκου β-CD-αιθέριου ελαίου σε 4 mL δις-απιονισμένου νερού μέσα σε ένα γυάλινο φιαλίδιο.

Το δείγμα αυτό οδηγείται προς ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για περισσότερο από 48 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μετά το πέρας αυτής για 15 ακόμη λεπτά στο όργανο vortex. Γενικά τα σύμπλοκα είναι λιγότερο διαλυτά στο νερό συγκριτικά με την καθαρή β-κυκλοδεξτρίνη^[69]. Στόχος της ανάδευσης είναι η επίτευξη καλής διασποράς των νανοσωματιδίων. Όπως και στα πολυμερικά νανοσωματίδια, έτσι και στα σωματίδια συμπλόκων τυχόν συσσωματώματα που δεν διαλύθηκαν με την ανάδευση, «σπάνε» μέσω κατεργασίας τους μέσα σε λουτρό υπερήχων (sonication bath) για 5 λεπτά.

Οι μετρήσεις που πραγματοποιούνται, καθώς και οι ρυθμίσεις του οργάνου είναι ανάλογες με εκείνες στην περίπτωση των πολυμερικών νανοσωματιδίων. Έτσι με την χρήση σύριγγας

λαμβάνεται μία ποσότητα του διαλύματος που εμπεριέχεται μέσα στο φιαλίδιο και τοποθετείται στην κυψελίδα, με ανάλογο τρόπο με εκείνον που εφαρμόζεται στην περίπτωση του εγκλεισμού σε PLA.

Στόχος και σε αυτήν την μέθοδο εγκλεισμού αιθέριων ελαίων είναι η λήψη συγκρινόμενων αποτελεσμάτων. Γι' αυτό αρχικά μετράται μία ποσότητα δείγματος χωρίς να φιλτραρισθεί και ύστερα νέα ποσότητα αυτού, αφότου πρώτα διέλθει από ειδικό φίλτρο διαμέτρου 0.45 μm.

Μετά την ολοκλήρωση κάθε κύκλου μετρήσεων (μεγέθους, ζ-δυναμικού και δείκτη πολυδιασποράς) η κυψελίδα ξεπλένεται προσεκτικά με απιονισμένο νερό.

2.3. Άμεσος Προσδιορισμός Ποσοστού Εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων στα σύμπλοκα με την β-CD (Entrapment Efficiency%) και Προσδιορισμός Ποσοστού Φόρτωσης (Drug Loading)

Υλικά & Αντιδραστήρια

- ❖ Ξηρό σύμπλοκο β-CD-αιθέριου ελαίου
- ❖ Ακετονιτρίλιο
- ❖ Δις-απιονισμένο νερό

Όργανα & σκεύη

- ☞ Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis διπλής δέσμης Cary 1E της Varian
- ☞ Μαγνητικός αναδευτήρας
- ☞ Ζυγός ακριβείας
- ☞ Κωνική φιάλη

Η ποσότητα της δραστικής ουσίας (αιθέριου ελαίου) που εγκλείστηκε στα σωματίδια συμπλόκων εγκλεισμού προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά με χρήση του οργάνου UV-Vis.

Σε 10 mL διαλύματος ακετονιτρίλιου - δις-απιονισμένου νερού (σε αναλογία 50:50) διαλύονται 10 mg ξηρού συμπλόκου β-CD - αιθέριου ελαίου.

Το διάλυμα τίθεται υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 48 ώρες, προκειμένου όλη η εγκλεισμένη δραστική ουσία να απελευθερωθεί στο διάλυμα.

Εν συνεχεία, το διάλυμα διέρχεται από ειδικό φίλτρο διαμέτρου 0.45 μm, ώστε να απομακρυνθεί κάθε αδιάλυτη ουσία από αυτό.

Το ποσοστό εγκλεισμού και το ποσοστό φόρτωσης για τα σύμπλοκα της β-CD με τα αιθέρια έλαια προσδιορίζονται αντιστοίχως μέσω των εξής εξισώσεων ^[79] :

$$EE\% = \frac{\text{μάζα του αιθέριου ελαίου που εγκλείστηκε (mg)}}{\text{αρχική μάζα του αιθέριου ελαίου (mg)}} * 100$$

$$DL = \frac{\text{ποσότητα αιθέριου ελαίου που εγκλείστηκε (mg)}}{\text{ποσότητα ξηρών συμπλόκων (mg)}} * 100$$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

Η εκχύλιση των αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της ψυχρής συμπίεσης (cold pressing).

Η χημική σύσταση καθενός εκ των τεσσάρων χρησιμοποιούμενων αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών (λεμονιού, πορτοκαλιού, μανταρινιού και γκρέιπφρουτ) της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4 : Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών

Συστατικά	RT**(min)	Δείγμα 1 (%σύσταση)	Δείγμα 2 (%σύσταση)	Δείγμα 3 (%σύσταση)	Δείγμα 4 (%σύσταση)
<i>α</i> -thujene (<i>α</i> -θυιόνη)	8.96	0.83			
<i>α</i> -pinene (<i>α</i> -πινένιο)	9.24	3.09		0.93	0.92
Camphene (καμφένιο)	9.88				
Sabinene (σαβινένιο)	11.12			t*	1.04
<i>β</i> -pinene (<i>β</i> -πινένιο)	11.38	14.80			
Myrcene (μυρσένιο)	12.11	2.71	3.56	3.16	3.16
Limonene (λεμονένιο)	14.19	50.30	96.44	95.87	86.93
trans- <i>β</i> -ocimene (trans- <i>β</i> -κυμένιο)	15.03	0.25			t
<i>γ</i> -terpinene (<i>γ</i> -τερπινένιο)	15.66	14.08			
<i>α</i> -terpinolene (<i>α</i> -τερπινολένιο)	17.42	0.97			t
Nonanal (νονανάλη)	17.69	0.23			
Citronellal (σιτρονελλάλη)	20.05	0.37			t
<i>α</i> -terpineol (<i>α</i> -τερπινεόλη)	21.77	0.39			0.94
Decanal (δεκανάλη)	22.62	t		t	0.52
Neral (νεράλη)	24.23	t			
Citral (κιτράλη)	25.67	2.72			
neryl acetate (οξικό νερούλιο)	29.81	1.56			
<i>α</i> -copaene (<i>α</i> -κοπαένιο)	30.12				t
lavandulyl acetate (οξικό λαβανδύλιο)	30.63	1.21			
<i>β</i> -cubebene (<i>β</i> -κουβεβένιο)	30.76				t
<i>β</i> -caryophyllene (<i>β</i> - καρυοφυλλένιο)	31.98	0.84			1.02
<i>α</i> -bergamotene	32.689	1.37			

(α-περγαμοτένιο)			
germacrene D (D-γερμακρένιο)	34.69		t
Valencene (βαλενσένιο)	34.99	0.21	t
Bicyclgermacrene (δικυκλογερμακρένιο)	35.14	0.18	
β-bisabolene (β-βισαβολένιο)	35.73	1.97	
δ-cadinene (δ-καδινένιο)	36.44		t
Nootkatone (νουκκατόνη)	46.53		1.30
UI*	69.97		4.11

t* : trace elements (συστατικά σε ίχνη), RT** : retention time (χρόνος κατακράτησης συστατικών), UI* : unidentified (μη ταυτοποιημένα συστατικά)

Πίνακας 5 : Ονοματολογία δειγμάτων αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών

Δείγματα	Αιθέριο Έλαιο
Δείγμα 1	Citrus limon (αιθέριο έλαιο λεμονιού)
Δείγμα 2	Citrus sinensis (αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού)
Δείγμα 3	Citrus reticulata (αιθέριο έλαιο μανταρινιού)
Δείγμα 4	Citrus X paradisi (αιθέριο έλαιο γκρέιφρουτ)

Σύγκριση χημικής σύστασης δειγμάτων

Στο Δείγμα 1 το συστατικό το οποίο βρίσκεται σε ποσοστό 50% είναι το λιμονένιο. Έπειτα ακολουθούν το β-πινένιο και το γ-τερπινένιο σε ποσοστά χαμηλότερα του 1/3 του λιμονένιου. Όλα τα υπόλοιπα συστατικά που καταγράφονται στον Πίνακα 4 για το δείγμα αυτό, βρίσκονται σε πολύ μικρή έως και στοιχειακή ποσότητα.

Το Δείγμα 2 συνίστανται κυρίως από λιμονένιο (96.44%). Σε χαμηλότερη συγκέντρωση περιέχει και μυρσένιο (3.56%). Το λιμονένιο και το μυρσένιο συνιστούν συστατικά της κατηγορίας των μονοτερπενίων.

Το Δείγμα 3 έχει αντίστοιχη σύσταση με το 2 (λιμονένιο σε ποσοστό 95.87% και μυρσένιο 3.16%) με την διαφορά ότι περιέχει ακόμη, σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση α-πινένιο και ίχνη σαμπινενίου και δεκανάλης.

Το Δείγμα 4 είναι μίγμα πολλών πηθικών ενώσεων. Συνίσταται κυρίως από λιμονένιο (86.93%). Σε χαμηλότερη συγκεντρώση περιέχει μυρσένιο και σε ακόμη χαμηλότερες νουκκατόνη, β-καρνοφυλλένιο, α-τερπινολένιο και α-πινένιο. Υπάρχουν επίσης και άλλα οργανικά συστατικά τα οποία βρίσκονται σε ίχνη. Αξίζει δε να σημειωθεί πως υπάρχει ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 4% που αντιστοιχεί σε συστατικά, τα οποία δεν έχουν ταυτοποιηθεί.

Συμπερασματικά, το κύριο συστατικό των αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών είναι το λιμονένιο. Εντούτοις, το αιθέριο έλαιο του λεμονιού περιέχει στο χαμηλότερο ποσοστό το

συγκεκριμένο μονοτερπενικό υδρογονάνθρακα, σε σχέση με τα υπόλοιπα έλαια. Ακόμη, ενώ τα αιθέρια έλαια του λεμονιού και του γκρέιπφρουτ είναι μίγματα πολλών συστατικών, το μανταρίνι και το πορτοκάλι συνίστανται από μικρότερο αριθμό οργανικών ουσιών. Τέλος, τα δύο κύρια συστατικά των αιθέρων ελαίων του μανταρινιού, του πορτοκαλιού και του γκρέιπφρουτ είναι το λιμονένιο και το μυρσένιο.

Χρόνος Κατακράτησης (Retention Time, RT)

Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) και ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζας (Mass Spectroscopy, MS) είναι οι κύριες μέθοδοι που εφαρμόζονται στην ποιοτική ανάλυση των αιθέρων ελαίων. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ποιοτικός προσδιορισμός και ταυτοποίηση της σύστασης δειγμάτων μέσω μεθόδου GC-MS και να αυξηθεί η αξιοπιστία των αναλυτικών αποτελεσμάτων, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν δείκτες κατακράτησης (retention indices) των εκάστοτε συστατικών^[80].

Ωστόσο, ακόμη και σε αυτήν την περίπτωση υπάρχουν προβλήματα σχετικά με τον ποιοτικό προσδιορισμό των αιθέρων ελαίων. Συγκεκριμένα, η αλληλεπικάλυψη των κορυφών σε ένα χρωματογράφημα και η χαμηλή συγκέντρωση πολλών ενώσεων που αποδίδει «χαμηλό» σήμα στο φάσμα μάζας, δυσχεραίνουν την ακριβή ταυτοποίηση των συστατικών τους^[81].

Το σύστημα δεικτών κατακράτησης (Retention Index System) αποτελεί ένα μέτρο των σχετικών χρόνων κατακράτησης αναφορικά με τις ομόλογες σειρές των οργανικών ενώσεων^[82].

Ως χρόνος κατακράτησης (retention time) ορίζεται το χρονικό διάστημα μεταξύ της στιγμής εγχύσεως της προς μελέτη ουσίας και της ανίχνευσης των επιμέρους συστατικών της. Λόγω του ότι οι χρόνοι αυτοί διαφοροποιούνται ανάλογα με την ταυτότητα του συστατικού, χρησιμοποιούνται για ποιοτική ανάλυση^[83].

Από τον Πίνακα 4 γίνεται εμφανές πως από τα ταυτοποιημένα συστατικά το μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης εμφανίζει η νουτκατόνη. Ωστόσο, υπάρχουν και ορισμένα συστατικά που δε ταυτοποιήθηκαν μέσω του ενδεικτικού αυτού χρόνου.

2. ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΕ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ PLA

2.1. Συνθήκες παρασκευής πολυμερικών νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ποσότητα αιθέρων ελαίων

- Συνθήκες παρασκευής νανοσωματιδίων με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο λεμονιού

Λόγω δυσκολίας ακριβούς προσέγγισης και ζύγισης των αντιδραστηρίων τόσο τα τρία δείγματα εγκλεισμού μικρής κλίμακας όσο και εκείνο μεγάλης κλίμακας παρουσιάζουν ορισμένες αποκλίσεις στις ποσότητες των αντιδραστηρίων που αρχικά χρησιμοποιήθηκαν σε σχέση με τις προβλεπόμενες από την περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας. Ακόμη, και ο ρυθμός περιστροφής κατά την διάρκεια των φυγοκεντρήσεων διαφοροποιείται στον εγκλεισμό μεγάλης κλίμακας από τον αντίστοιχο μικρής. Στα δείγματα μικρής κλίμακας

επίσης δεν πραγματοποιήθηκε κατεργασία με υπερήχους πριν την μέτρηση στο όργανο Zetasizer, ενώ στο scaled-up δείγμα ναί. Οι διαφορές αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 6 : Ακριβείς ποσότητες και πειραματικές συνθήκες εγκλεισμών μικρής και μεγάλης κλίμακας αιθέριου ελαίου λεμονιού

Δείγμα	Αρχική ποσότητα PLA Mr=57000 g/mol (mg)	Αρχική ποσότητα αιθέριου ελαίου (mg)	Ποσοστό φόρτωσης (DL%)	Ποσότητα PVA 1% (w/v) (mL)	Ρυθμός ανάδευσης (rpm)	Ρυθμός περιστροφής κατά τις φυγοκέντρους (rpm)
Lemon-NPs-1	14.8	2.7	18.2	15	250	17000
Lemon-NPs-2	14.4	3.4	23.6	15	250	17000
Lemon-NPs-3	12.5	2.9	23.2	13	250	17000
Lemon-NPs-4	151.2	30.3	20.03	151	250	12000

- Συνθήκες παρασκευής νανοδοματιδίων με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο μανταρινιού

Η αδυναμία ακριβούς ζύγισης και υπολογισμού των επιθυμητών ποσοτήτων οδήγησε σε ένα εύρος τιμών αυτών και στην περίπτωση των εγκλεισμών αιθέριου ελαίου μανταρινιού, που συνοψίζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 7 : Ακριβείς ποσότητες και πειραματικές συνθήκες εγκλεισμών αιθέριου ελαίου μανταρινιού

Δείγμα	Αρχική ποσότητα PLA Mr=57000 g/mol (mg)	Αρχική ποσότητα αιθέριου ελαίου (mg)	Ποσοστό φόρτωσης (DL%)	Ποσότητα PVA 1% (w/v) (mL)	Ρυθμός ανάδευσης (rpm)	Ρυθμός περιστροφής κατά τις φυγοκέντρους (rpm)
Mandarin-NPs-1	16.6	3.4	20.48	16	250	17000
Mandarin-NPs-2	18.2	4.1	22.5	18	250	17000

- Συνθήκες παρασκευής νανοδοματιδίων με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού

Σχετικά με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που ζυγίστηκαν, όπως και τις πειραματικές συνθήκες σε αυτήν την περίπτωση ήταν οι προβλεπόμενες από την πειραματική διαδικασία.

Πίνακας 8 : Ακριβείς ποσότητες και πειραματικές συνθήκες εγκλεισμών αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού

Δείγμα	Αρχική ποσότητα PLA Mr=57000 g/mol (mg)	Αρχική ποσότητα αιθέριου ελαίου (mg)	Ποσοστό φόρτωσης (DL%)	Ποσότητα PVA 1% (w/v) (mL)	Ρυθμός ανάδευσης (rpm)	Ρυθμός περιστροφής κατά τις φυγοκέντρους (rpm)
Orange-NPs-1	150	30	20	150	250	12000

- Συνθήκες παρασκευής νανοσωματιδίων με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο γκρέιπφρουτ

Και στην περίπτωση του γκρέιπφρουτ λόγω των μικρών απαιτούμενων ποσοτήτων αντιδραστηρίων και της αδυναμίας ακριβούς ζύγισης αυτών προέκυψε σφάλμα στις μετρήσεις. Οι τελικές μετρήσεις παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα.

Πίνακας 9 : Ακριβείς ποσότητες και πειραματικές συνθήκες εγκλεισμών αιθέριου ελαίου γκρέιπφρουτ

Δείγμα	Αρχική ποσότητα PLA Mr=57000 g/mol (mg)	Αρχική ποσότητα αιθέριου ελαίου (mg)	Ποσοστό φόρτωσης (DL%)	Ποσότητα PVA 1% (w/v) (mL)	Ρυθμός ανάδευσης (rpm)	Ρυθμός περιστροφής κατά τις φυγοκέντρους (rpm)
Grapefruit-NPs-1	16.9	3.8	22.4	17	250	17000

2.2. Σύγκριση σχηματιζόμενων γαλακτωμάτων κατά την ανάμειξη των δύο φάσεων

a. Νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο λεμονιού (Lemon-NPs)

Στην περίπτωση του εγκλεισμού αιθέριου ελαίου λεμονιού το γαλάκτωμα που σχηματίστηκε σε κάθε περίπτωση μετά την ανάμειξη των δύο φάσεων ήταν παρόμοιο σε όλα τα δείγματα. Ενδεικτικά, παρατίθενται οι εικόνες των γαλακτωμάτων που προέκυψαν στα δείγματα Lemon-NPs-3 και 4. Η όψη του γαλακτώματος είναι λευκού χρώματος και έντονα θολερή.



Εικόνα 32 : Σχηματισμός γαλακτώματος κατά την έγχυση της οργανικής στην υδατική φάση στο δείγμα Lemon-NPs-3 (αριστερά) και στο δείγμα Lemon-NPs-4 (δεξιά)

b. Νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο μανταρινιού (Mandarin - NPs)

Το γαλάκτωμα που σχηματίστηκε στην περίπτωση των δειγμάτων με εγκλεισμένη ποσότητα αιθέριου ελαίου μανταρινιού ήταν λιγότερο θολερό και περισσότερο διαυγές από εκείνο του λεμονιού. Ο σχηματισμός γαλακτώματος διαφορετικής φύσης πιθανώς να οφείλεται στην αλλαγή του οργανικού διαλύτη και της προς εγκλεισμό ουσίας. Ωστόσο, στο δείγμα Mandarin-NPs-2 αιωρούνταν ινίδια στην μάζα του διαλύματος, που ενδέχεται να αποδίδονται σε αδιάλυτη ποσότητα πολυμερούς ή PVA.



Εικόνα 33 : Σχηματισμός γαλακτώματος κατά την έγχυση της οργανικής στην υδατική φάση στο δείγμα Mandarin-NPs-1 (αριστερά) και Mandarin-NPs-2 (δεξιά)

Θα πρέπει να σημειωθεί πως στην περίπτωση του μανταρινιού έγινε και μια προσπάθεια εγκλεισμού μεγάλης κλίμακας, η οποία απέτυχε (Mandarin-NPs-3). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν διπλάσιες ποσότητες αντιδραστηρίων από εκείνες των παραπάνω εγκλεισμών. Ωστόσο, παρότι το γαλάκτωμα που προέκυψε είχε επιθυμητή όψη-ανάλογη εκείνης του λεμονιού, τα νανοσωματίδια που καταβυθίστηκαν μετά τη πρώτη φυγόκεντρο, είχαν σχηματίσει συσσωμάτωμα, καθιστώντας αδύνατη την επαναδιασπορά τους.



Εικόνα 34 : Γαλάκτωμα κατά την εξάτμιση του DCM (αριστερά) και καταβυθισμένα νανοσωματίδια μετά την 1η φυγόκεντρο (δεξιά) στο δείγμα Mandarin-NPs-3

c. Νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού (Orange-NPs)

Το γαλάκτωμα που σχηματίστηκε σε αυτήν την περίπτωση διαφοροποιούνταν από εκείνο των προηγούμενων εγκλεισμών. Προέκυψε ένα θολερό διάλυμα ανοιχτού γαλάζιου χρώματος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 37. Η διαφοροποίηση αυτή αφενός οφείλεται στην αλλαγή αιθέριου ελαίου, αφετέρου στη χρήση διαφορετικού οργανικού διαλύτη (DMSO).



Εικόνα 35 : Σχηματισμός γαλακτώματος κατά την έγχυση της οργανικής στην υδατική φάση στο δείγμα Orange-NPs-1

d. Νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο γκρέιφρουτ (Grapefruit-NPs)

Το γαλάκτωμα που σχηματίστηκε στην περίπτωση του γκρέιφρουτ έμοιαζε αρκετά με εκείνο στην περίπτωση του μανταρινιού, λόγω χρήσης του ίδιου οργανικού διαλύτη (διχλωρομεθανίου) αλλά και παρόμοιας σύστασης των ελαίων (κύρια συστατικά λιμονένιο και μυρσένιο).

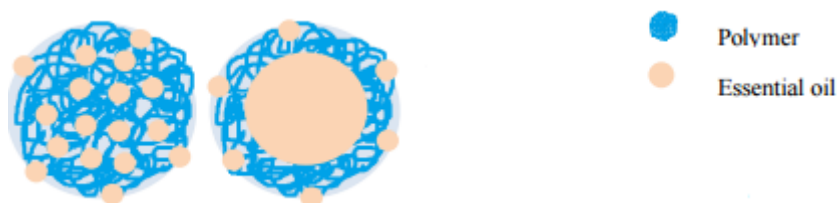


Εικόνα 36 : Σχηματισμός γαλακτώματος κατά την έγχυση της οργανικής στην υδατική φάση στο δείγμα Grapefruit-NPs-1

2.3. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων (Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό)

➤ Μέγεθος νανοσωματιδίων

Το μέγεθος των πολυμερικών νανοσωματιδίων στην περίπτωση εγκλεισμού αιθέριων ελαίων σχετίζεται με την σταδιακή αποδέσμευσή τους από αυτά. Τα μικρότερα σωματίδια έχουν υψηλότερο λόγο επιφάνειας/όγκο, που οδηγεί σε μεγαλύτερη απελευθέρωση του αιθέριου ελαίου. Στην Εικόνα 32 φαίνονται τα δύο είδη πολυμερικών νανοσωματιδίων^[84].



Εικόνα 37 : Σχηματική αναπαράσταση των πολυμερικών νανόσφαιρων (αριστερά) και των πολυμερικών νανοκαψουλών (δεξιά) με εγκλεισμένη ποσότητα αιθέριου ελαίου^[84]

Εν γένει, τα πολυμερικά νανοσωματίδια από βιοδιασπώμενα και βιοσυμβατά πολυμερή έχουν μέγεθος από 10-1000 nm, εγκλείοντας στο εσωτερικό τους την επιθυμητή δραστική ουσία^[85].

➤ Δείκτης πολυδιασποράς

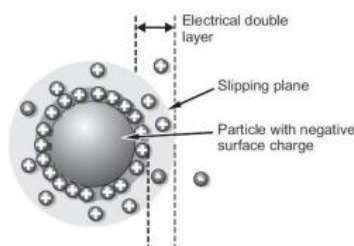
Η μέθοδος DLS (Diffraction Light Scattering, Δυναμική Σκέδαση Φωτός) είναι μια γρήγορη μέθοδος προσδιορισμού του μέσου μεγέθους, της κατανομής μεγέθους και του δείκτη διασποράς (pd_i) των νανοσωματιδίων του δείγματος^[87]. Το προς μέτρηση δείγμα είναι ένα πολύ αραιό διάλυμα νανοσωματιδίων. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των νανοσωματιδίων που βρίσκονται στο δείγμα και μιας ακτίνας λέιζερ. Ιδανικά, η κατανομή μεγέθους θα πρέπει να είναι στενή ($0.1 \leq pd_i \leq 0.25$) με ένα μικρό μέσο μέγεθος^[86]. Τα αποτελέσματα του DLS θα πρέπει να ερμηνεύονται με ιδιαίτερη προσοχή, καθώς το pH, το

ξώδες, η θερμοκρασία και η καθίζηση των σωματιδίων αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την διαμόρφωση των τιμών των μεγεθών^[87].

Επίσης στην περίπτωση παρουσίας συσσωματωμάτων ή σκόνης, το μέσο μέγεθος θα αυξηθεί δραματικά δίνοντας παραπλανητικά αποτελέσματα. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητο το φιλτράρισμα του δείγματος.

➤ Δυναμικό Επιφανείας

Η μέτρηση του ζ-δυναμικού είναι ένας τρόπος για τον καθορισμό του επιφανειακού φορτίου των νανοσωματιδίων σε ένα κολλοειδές διάλυμα. Τα νανοσωματίδια είναι επιφανειακά φορτισμένα προσελκύοντας έτσι ένα λεπτό στρώμα ιόντων αντίθετου φορτίου στην επιφάνειά τους (slipping plane). Το διπλό αυτό στρώμα ιόντων είναι προσκολλημένο πάνω στο νανοσωματίδιο, καθώς αυτό διαχέεται στο διάλυμα. Αυτά τα δύο στρώματα σχηματίζουν μια ηλεκτρική διπλή στοιβάδα (electrical double layer) γύρω από το νανοσωματίδιο, που παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα^[88]:



Εικόνα 38 : Ηλεκτρική διπλή στοιβάδα που περιβάλλει το νανοσωματίδιο^[88]

Η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται μεταξύ του διπλού στρώματος και της κυρίως μάζας του διαλύματος ορίζεται ως ζ-δυναμικό (z-potential) του νανοσωματιδίου και παίρνει τιμές από +100mV μέχρι -100mV. Η τιμή του ζ-δυναμικού δίνει μια εικόνα για την σταθερότητα του κολλοειδούς διαλύματος. Πιο συγκεκριμένα, νανοσωματίδια με ζ-δυναμικό μεγαλύτερο των +25mV ή μικρότερο των -25mV θεωρούνται σταθερά. Σε αντίθετη περίπτωση είναι πιθανή η έλξη μεταξύ σωματιδίων λόγω δυνάμεων Van der Waals, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό συσσωματωμάτων^[88].

Σε διεργασίες ηλεκτροφόρησης, ένα υψηλό ζ-δυναμικό είναι επιθυμητό, καθώς βελτιώνει την ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου και αποτρέπει την καθίζηση και την δημιουργία συσσωματωμάτων. Τα αιωρήματα σωματιδίων με υψηλό ζ-δυναμικό (αρνητικό ή θετικό) είναι ηλεκτρικά περισσότερο σταθεροποιημένα συγκριτικά με εκείνα που εμφανίζουν χαμηλές απόλυτες τιμές ζ-δυναμικού^[89].

I. Νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο λεμονιού (Lemon-NPs)

Τα αποτελέσματα του μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς καθώς και του ζ-δυναμικού στην περίπτωση εγκλεισμού αιθέριου ελαίου λεμονιού σε νανοσωματίδια PLA παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και λαμβάνεται ο μέσος όρος αυτών ± τυπική απόκλιση.

Πίνακας 10 : Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο λεμονιού.

Δείγμα	Μέτρηση	Μέγεθος (nm)	PDI	Z-δυναμικό (mV)
Unfiltered Lemon-NPs- 1*	<u>1ⁿ</u>	223.4	0.19	-12.9
	<u>2ⁿ</u>	228.8	0.164	-12.7
	<u>3ⁿ</u>	224.9	0.186	-15.6
	<u>M.O.</u>	225.7±2.8	0.180±0.014	-13.7±1.6
Unfiltered Lemon-NPs- 2*	<u>1ⁿ</u>	269.8	0.148	-13.4
	<u>2ⁿ</u>	264.5	0.119	-19.4
	<u>3ⁿ</u>	264.9	0.104	-13.7
	<u>M.O.</u>	266.4±2.95	0.124±0.022	-15.5 ±3.4
Filtered Lemon-NPs- 3*	<u>1ⁿ</u>	295.4	0.501	-9.89
	<u>2ⁿ</u>	257.9	0.418	-11.7
	<u>3ⁿ</u>	295.6	0.354	-14.9
	<u>M.O.</u>	283±21.7	0.424±0.074	-12.2±2.5
Filtered Lemon-NPs- 4**	<u>1ⁿ</u>	293.2	0.381	-27.3
	<u>2ⁿ</u>	263.3	0.35	-22.1
	<u>3ⁿ</u>	250.6	0.333	-22.7
	<u>M.O.</u>	269±21.9	0.355±0.024	-24±2.84
Unfiltered Lemon-NPs- 4**	<u>1ⁿ</u>	659	0.524	-21
	<u>2ⁿ</u>	571.5	0.505	-20.8
	<u>3ⁿ</u>	566.1	0.487	-19.1
	<u>M.O.</u>	598.9±52.15	0.505±0.019	-20.3±1.04

*εγκλεισμός μικρής κλίμακας, **εγκλεισμός μεγάλης κλίμακας

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων PLA που περιέχουν εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο λεμονιού είναι σχετικά επαναλήψιμο, της τάξης των 225-283 nm. Εντούτοις, στην περίπτωση του δείγματος Lemon-NPs-3 και 4 λόγω χρήσης ειδικού φίλτρου διαμέτρου 0.45 μm, τα νανοσωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερο από 450 nm, συγκρατήθηκαν και δεν μεταφέρθηκαν στο δείγμα της κυψελίδας.

Ο δείκτης πολυδιασποράς των δύο πρώτων δειγμάτων είναι επίσης πολύ ικανοποιητικός (0.18 και 0.12), γεγονός που υποδεικνύει ομοιόμορφη κατανομή των παραγόμενων νανοσωματιδίων και μονοδιάσπαρτο δείγμα. Η τιμή του ανήκει στην περιοχή $0.1 \leq \text{pdi} \leq 0.25$ όπου και το μέγεθος των σωματιδίων είναι αρκετά μικρό. Ωστόσο, το δείγμα Lemon-NPs-3 εμφανίζει τον υψηλότερο δείκτη πολυδιασποράς για τους εγκλεισμούς λεμονιού μικρής κλίμακας, τιμή που δηλώνει σχετικά ευρεία κατανομή μεγέθους στο δείγμα. Επίσης και το δείγμα Lemon-NPs-4 εμφανίζει σχετικά αυξημένο δείκτη διασποράς (0.355) σε σχέση με τους δύο πρώτους εγκλεισμούς μικρής κλίμακας.

Τα τρία πρώτα δείγματα με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο λεμονιού παρουσιάζουν υψηλή τιμή ζ-δυναμικού (-13.7, -15.5 και -12.2 mV αντιστοίχως), αλλά εκτός της περιοχής όπου το σύστημα θεωρείται ιδιαίτερα σταθερό. Επομένως, είναι πιθανή η δημιουργία συσσωματωμάτων. Το μηχάνημα ωστόσο αξιολόγησε ως ικανοποιητικές τις τιμές αυτές. Ακόμη, η τιμή του ζ-δυναμικού στην περίπτωση εγκλεισμού μεγάλης κλίμακας είναι ικανοποιητικά υψηλή, γεγονός που υποδεικνύει σταθερότητα των νανοσωματιδίων.

Σύγκριση εγκλεισμών αιθέριου ελαίου λεμονιού μικρής και μεγάλης κλίμακας

Στα πειράματα εγκλεισμού μεγάλης κλίμακας χρησιμοποιούνται δεκαπλάσιες ποσότητες αντιδραστηρίων απ' ό,τι στις μικρής.

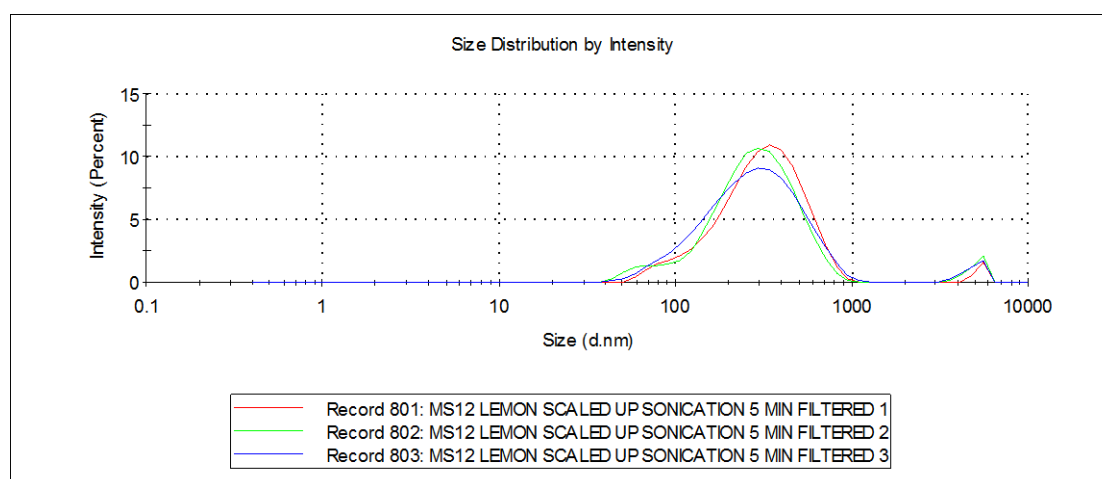
Από τη σύγκριση των εγκλεισμών μικρής και μεγάλης κλίμακας σε ό,τι αφορά στο μέγεθος των νανοσωματιδίων παρατηρείται πως οι τιμές μοιάζουν αρκετά μεταξύ τους. Συνεπώς, η χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων των διαφόρων υλικών δεν επηρεάζει αρνητικά την διαμόρφωση μεγέθους των νανοσωματιδίων. Στην περίπτωση του scale-up μάλιστα προέκυψαν δύο οικογένειες νανοσωματιδίων, γεγονός που φαίνεται από τις δύο κορυφές του Διαγράμματος 1.

Αντιθέτως, ο δείκτης PDI παρουσίασε αύξηση, συγκριτικά με τα δύο πρώτα δείγματα μικρής κλίμακας. Ωστόσο παραμένει σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, γεγονός που δηλώνει σχετική ομοιογένεια δείγματος.

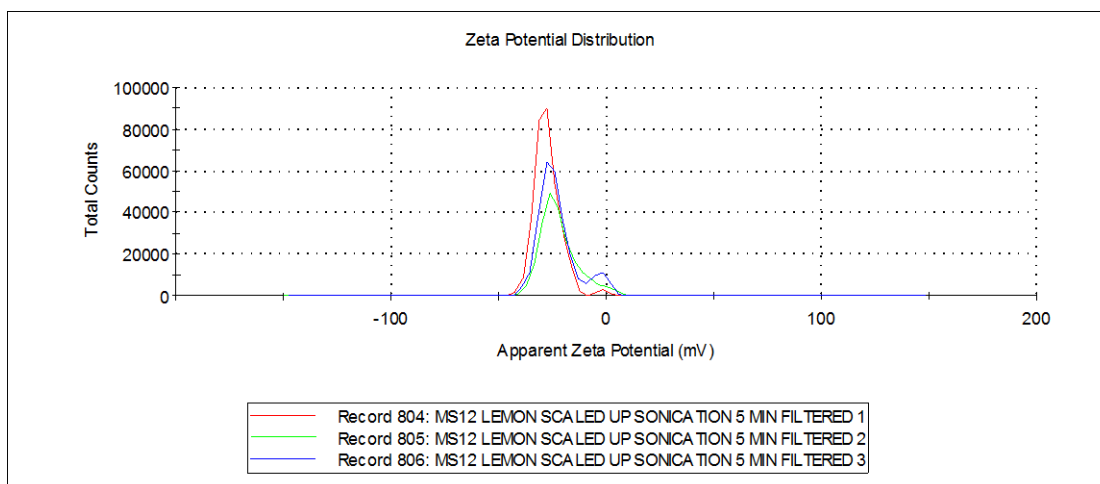
Παρατηρείται ακόμη πως ο εγκλεισμός μεγάλης κλίμακας αύξησε κατά απόλυτη τιμή το ζ-δυναμικό. Η μέση τιμή αυτού προσεγγίζει αρκετά την περιοχή στην οποία το σύστημα των νανοσωματιδίων εμφανίζει σταθερότητα.

Συμπερασματικά, το scale-up δεν φαίνεται να επηρέασε αρνητικά τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο λεμονιού. Διατήρησε τις τιμές τους εντός των επιθυμητών ορίων.

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα της μέσης κατανομής μεγέθους καθώς και της κατανομής του δυναμικού επιφανείας του δείγματος Lemon-NPs-4, όπως προέκυψαν από την μέτρηση μέσω της μεθόδου DLS.



Διάγραμμα 1 : Κατανομή μεγέθους του φιλτραρισμένου δείγματος Lemon-NPs-4

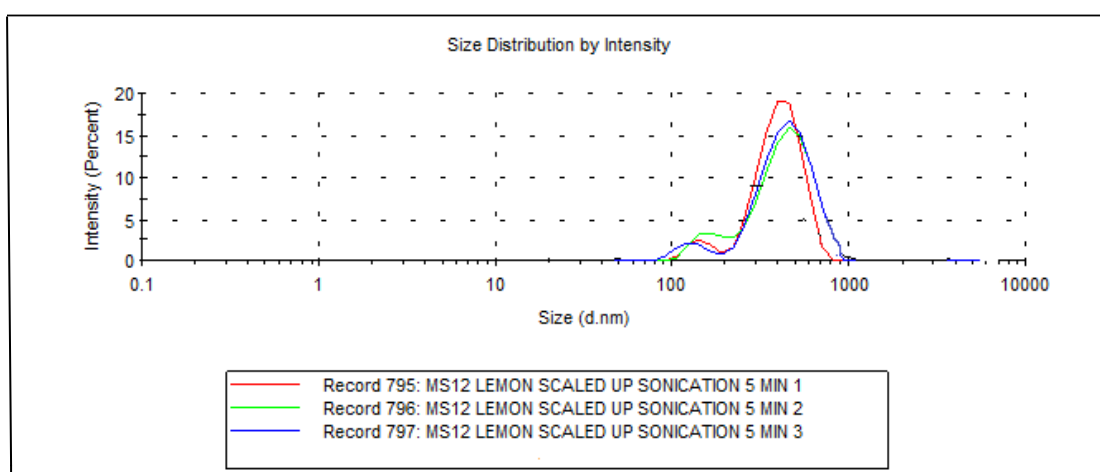


Διάγραμμα 2 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας του φιλτραρισμένου δείγματος Lemon-NPs-4

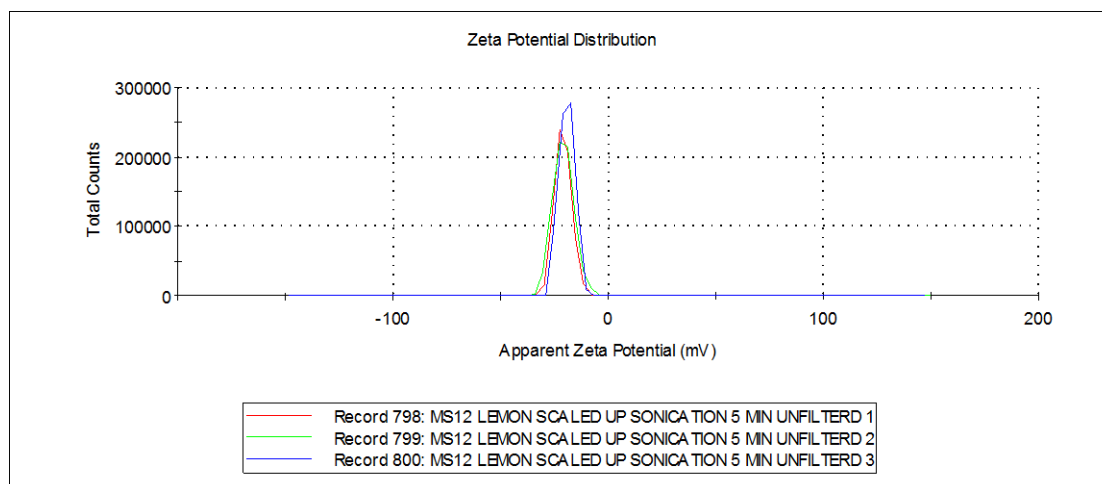
Σύγκριση μετρήσεων μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και δυναμικού επιφανείας αφιλτράριστου και φιλτραρισμένου δείγματος Lemon-NPs-4

Προκειμένου να αποδειχθεί πόσο αποτελεσματική είναι η χρήση φίλτρου στην κατακράτηση σκονών ή άλλων ανεπιθύμητων σωματιδίων και στην παρεμπόδιση της διέλευσης αυτών στην κυψελίδα, στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα των μετρήσεων για το αφιλτράριστο δείγμα Lemon-NPs-4. Τα μεγέθη των νανοσωματιδίων είναι σχεδόν 2.5 φορές μεγαλύτερα από εκείνα του φιλτραρισμένου δείγματος, ενώ ο δείκτης PDI είναι αυξημένος κατά 0.15, αποκτώντας υψηλές τιμές (της τάξης του 0.5) που δηλώνουν σχετική ανομοιογένεια δείγματος. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει και μια μειονότητα νανοσωματιδίων με πολύ μικρότερο μέγεθος. Σε αυτά αποδίδεται η δεύτερη χαμηλή κορυφή στα διαγράμματα κατανομής μεγέθους. Αντιθέτως, ενώ οι τιμές του δυναμικού επιφανείας είναι χαμηλότερες, πλησιάζουν την περιοχή στην οποία το σύστημα εξασφαλίζει ηλεκτρική σταθερότητα και γι' αυτό εκτιμώνται ως ικανοποιητικές από το όργανο. Οι τρεις μάλιστα αυτές τιμές συγκλίνουν αρκετά μεταξύ τους, γεγονός που φαίνεται και από το σχετικό Διάγραμμα.

Ενδεικτικά παρουσιάζονται και τα γραφήματα μεγέθους και δυναμικού επιφανείας του αφιλτράριστου δείγματος Lemon-NPs-4 :



Διάγραμμα 3 : Κατανομή μεγέθους αφιλτράριστου δείγματος Lemon-NPs-4



Διάγραμμα 4 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας αφιλτράριστου δείγματος Lemon-NPs-4

II. Νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο μανταρινιού (Mandarin-NPs)

Στον Πίνακα 8 παρατίθενται τα αποτελέσματα των χαρακτηριστικών που προκύπτουν από την DLS μέτρηση για δύο δείγματα νανοσωματιδίων «φορτωμένων» με αιθέριο έλαιο μανταρινιού.

Πίνακας 11 : Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο μανταρινιού.

Δείγμα	Μέτρηση	Μέγεθος (nm)	PDI	Z-δυναμικό (mV)
Filtered Mandarin-NPs-1*	<u>1</u> ^η	365.5	0.298	-30.8
	<u>2</u> ^η	384.4	0.289	-26.7
	<u>3</u> ^η	390.3	0.368	-39.7
	M.O.	380.1±12.95	0.318±0.043	-32.4±6.6
Filtered Mandarin-NPs-2*	<u>1</u> ^η	256.1	0.315	-19.6
	<u>2</u> ^η	260.4	0.385	-22.9
	<u>3</u> ^η	235.8	0.294	-19.4
	M.O.	250.8±13.1	0.331±0.048	-20.6± 1.97

*εγκλεισμός μικρής κλίμακας

Στην περίπτωση των δειγμάτων Mandarin-NPs-1 και 2 έγινε χρήση φίλτρου διαμέτρου 0.45 μm, καθώς τα αποτελέσματα που προέκυψαν χωρίς τη χρήση αυτού παρουσίαζαν πολύ μεγαλύτερες τιμές μεγέθους (άνω των 385 nm και 675 nm αντιστοίχως). Τα νανοσωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερο των 450 nm (ή και συσσωματώματα αυτών) συγκρατήθηκαν από το φίλτρο αυτό. Επίσης, ο δείκτης PDI κυμαινόταν στο εύρος μεταξύ 0.4-0.7 και στις δύο περιπτώσεις, με αποτέλεσμα η συσκευή να εκτιμά τα αποτελέσματα ως μη-ικανοποιητικά.

Από τον Πίνακα 8 γίνεται εμφανές πως ενώ στο δείγμα Mandarin-NPs-2, το μέγεθος των νανοσωματιδίων που σχηματίστηκαν (250 nm) είναι αντίστοιχο εκείνου των δειγμάτων Lemon-NPs-1 και 2, στο δείγμα Mandarin-NPs-1 το μέγεθος αυτών αυξήθηκε στα 380 nm.

Ωστόσο η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς των δύο δειγμάτων συγκριτικά με εκείνη των δύο προαναφερθέντων δειγμάτων λεμονιού παρουσιάζεται αυξημένη (της τάξης του 0.3), αλλά παραμένει εντός των επιθυμητών ορίων, υποδεικνύοντας μια σχετικά ικανοποιητική διασπορά στο διάλυμα των νανοσωματιδίων.

Τα νανοσωματίδια του δείγματος Mandarin-NPs-1 παρουσιάζουν αρκετά υψηλή μέση τιμή ζ-δυναμικού (-32.4 mV) και αυξημένη ως προς αυτή των δειγμάτων Lemon-NPs-1 και 2. Πρόκειται λοιπόν για ένα σύστημα σταθερών νανοσωματιδιακών δομών, χωρίς πιθανότητα παρουσίας συσσωματωμάτων. Ωστόσο, το δείγμα Mandarin-NPs-2 εμφανίζει χαμηλότερη τιμή δυναμικού επιφανείας (-20.6 mV), που όμως προσεγγίζει την περιοχή στην οποία το σύστημα εμφανίζει ηλεκτρική σταθερότητα. Παρά ταύτα, ενώ σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο η μία από τις τρεις τιμές μετρήσεων του ζ-δυναμικού (-22.6) κρίνεται εν γένει αποδεκτή, εκτιμήθηκε ως μη ικανοποιητική από το όργανο.

III. Νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού (Orange-NPs)

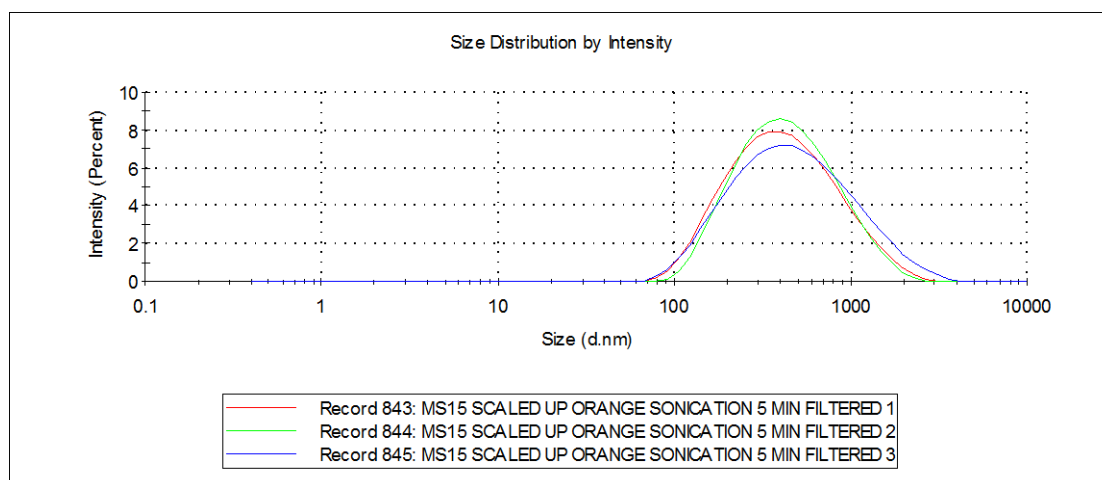
Πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα εγκλεισμού αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού μεγάλης κλίμακας σε πολυμερικά νανοσωματίδια PLA.

Τα αποτελέσματα μεγέθους, δείκτη διασποράς και ζ-δυναμικού συνοψίζονται στον παρακάτω Πίνακα 10.

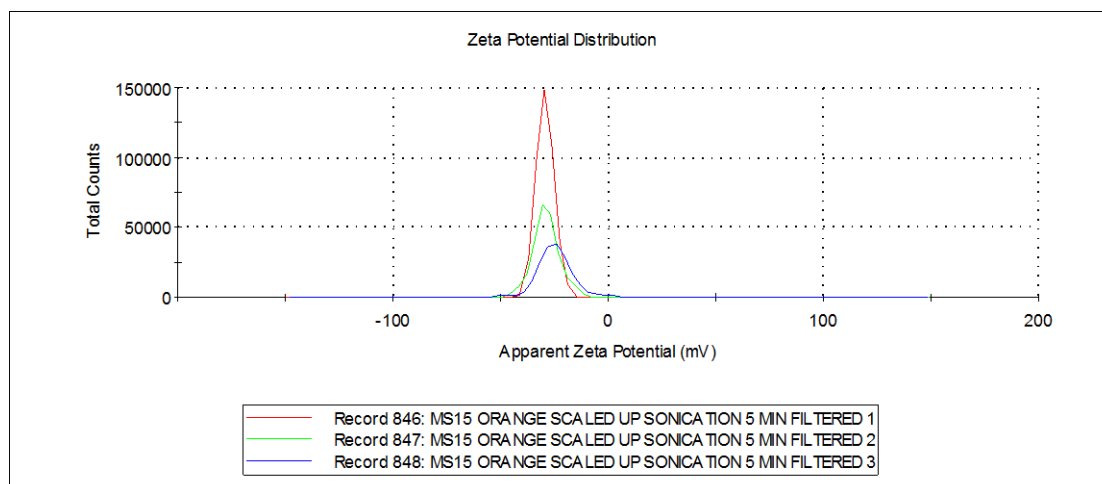
Πίνακας 12 : Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού.

Δείγμα (Κωδικός)	Μέτρηση	Μέγεθος (nm)	PDI	Z-δυναμικό (mV)
Filtered Orange-NPs-1	1 ^η	334.3	0.301	-29.3
	2 ^η	355.8	0.283	-28.8
	3 ^η	366.6	0.312	-24.8
	M.O.	352.2±16.4	0.299±0.015	-27.6±2.5

Ενδεικτικά παρουσιάζονται και τα διαγράμματα μέσης κατανομής μεγέθους και ζ-δυναμικού για το συγκεκριμένο δείγμα.



Διάγραμμα 5 : Κατανομή μεγέθους του δείγματος Orange-NPs-1



Διάγραμμα 6 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας του δείγματος Orange-NPs-1

Σύγκριση εγκλεισμών μεγάλης κλίμακας αιθέριου ελαίου λεμονιού και πορτοκαλιού

Από την σύγκριση των δύο εγκλεισμών μεγάλης κλίμακας γίνεται εμφανές πως στην περίπτωση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού σχηματίστηκαν νανοσωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους. Συγκρίνοντας τις καμπύλες κατανομής μεγέθους των δύο δειγμάτων, γίνεται εμφανές πως στην περίπτωση του λεμονιού η καμπύλη είναι ελάχιστα πιο στενή. Αυτό οφείλεται στο ότι ο δείκτης πολυδιασποράς σε αυτήν την περίπτωση ήταν μικρότερος, γεγονός που δηλώνει μεγαλύτερη ομοιογένεια δείγματος και πιο στενή κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων. Ακόμη οι δύο τιμές του δυναμικού επιφανείας είναι παραπλήσιες, με τα νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού να παρουσιάζουν ελάχιστα μεγαλύτερη ηλεκτρική σταθερότητα.

Συνεπώς, η χρήση διαφορετικού αιθέριου ελαίου ως την προς εγκλεισμό ουσία στην περίπτωση του scale-up, μετέβαλε (αύξησε) την τιμή του μεγέθους, ενώ δεν διαφοροποίησε ιδιαίτερα τον δείκτη πολυδιασποράς και το δυναμικό επιφανείας των νανοσωματιδίων που προκύπτουν.

IV. Νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο γκρέιφρουτ (Grapefruit-NPs)

Πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα εγκλεισμού αιθέριου ελαίου γκρέιφρουτ μικρής κλίμακας.

Οι μετρήσεις των μεγεθών, του δείκτη διασποράς και του δυναμικού επιφανείας συνοψίζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 13 : Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο γκρέιφρουτ.

Δείγμα (Κωδικός)	Μέτρηση	Μέγεθος (nm)	PDI	Z-δυναμικό (mV)
Grapefruit-NPs-1	1 ^η	261.9	0.456	-25.1
	2 ^η	299.3	0.469	-14.9
	3 ^η	653.0	0.669	-9.40
	M.O.	404.7±215.8	0.531±0.119	-16.5±7.97

Οι δύο πρώτες μετρήσεις του μεγέθους είναι αρκετά ικανοποιητικές και παραπλήσιες μεταξύ τους (262 και 299 nm). Η τρίτη ωστόσο δηλώνει σωματίδια μεγάλου μεγέθους και αποκλίνει από τις δύο προηγούμενες. Γι' αυτό και το κατά μέσο όρο μέγεθος των νανοσωματιδίων του δείγματος ανέρχεται στα 404 nm (υψηλότερο μέσο μέγεθος από όλες τις περιπτώσεις αιθέριων ελαίων). Ο δείκτης πολυδιασποράς είναι υψηλός (0.531) και εκτός των επιθυμητών ορίων, γεγονός που δηλώνει σχετικά ανομοιόμορφη κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων. Ειδικότερα, είναι εμφανές πως η τρίτη κατά σειρά μέτρηση μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς είναι μη ικανοποιητική, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από το μηχάνημα. Το ζ-δυναμικό τέλος έχει σχετικά υψηλή μέση τιμή που όμως δεν ανήκει στην περιοχή στην οποία το σύστημα θεωρείται ιδιαίτερα σταθερό. Είναι πιθανή επομένως η δημιουργία συσσωματωμάτων λόγω έλξης των σωματιδίων^{[88],[89]}. Πιο συγκεκριμένα, η τρίτη κατά σειρά μέτρησή του είναι αρκετά χαμηλή, γι' αυτό και το όργανο την θεώρησε ως μη αποδεκτή.

V. Συνολική αποτίμηση χαρακτηριστικών PLA νανοσωματιδίων

Συγκρίνοντας τα χαρακτηριστικά όλων των νανοσωματιδίων προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα. Το μικρότερο μέγεθος είχαν εκείνα που περιείχαν εγκλεισμένη ποσότητα αιθέριου ελαίου λεμονιού (κατά μέσο όρο 260 nm). Σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο, το μικρό αυτό μέγεθος επιτρέπει την μεγαλύτερη απελευθέρωση του αιθέριου αυτού ελαίου από τα πολυμερικά νανοσωματίδια^[84]. Ιδανικό δείκτη πολυδιασποράς εμφάνισαν τα δείγματα Lemon-NPs-1 και 2, εξασφαλίζοντας μια στενή κατανομή μεγέθους. Ωστόσο στην περίπτωση εγκλεισμού μεγάλης κλίμακας λεμονιού και πορτοκαλιού, όπως και στους εγκλεισμούς του μανταρινιού ο δείκτης PDI ήταν σχετικά ικανοποιητικός (της τάξης του 0.3). Ακόμη, πολύ υψηλές τιμές δυναμικού επιφανείας εμφάνισαν τα δείγματα μανταρινιού και πορτοκαλιού, όπως και το scaled-up δείγμα του λεμονιού, γεγονός που δηλώνει πως τα συστήματα νανοσωματιδίων εμφάνιζαν ηλεκτρική σταθερότητα. Τέλος, το scale-up διατήρησε τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων σε επιθυμητές τιμές, μη επηρεαζόμενο από τη χρήση διαφορετικού αιθέριου ελαίου.

2.4. Λυοφιλοποίηση νανοσωματιδίων

Η διαδικασία της λυοφιλοποίησης είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος ξήρανσης με στόχο τη σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων που είναι σε διασπορά. Βασίζεται στην απομάκρυνση του νερού από ένα παγωμένο δείγμα μέσω εξάχνωσης και εκρόφησης υπό κενό. Διακρίνεται σε τρία στάδια : α) την κατάψυξη (στερεοποίηση), β) την εξάχνωση του πάγου (πρωτογενής ξήρανση) και γ) τη δευτερογενή ξήρανση (απομάκρυνση νερού σε υγρή μορφή).

Η διαδικασία της λυοφιλοποίησης δημιουργεί συνθήκες υψηλής καταπόνησης, που μπορεί να αποσταθεροποιήσουν την κολλοειδή διασπορά των νανοσωματιδίων. Ακόμη οι κρύσταλλοι πάγου που δημιουργούνται ενδέχεται να αναπτύξουν μηχανικές καταπονήσεις, προκαλώντας και αυτές την αποσταθεροποίηση των νανοσωματιδίων.

Γι' αυτόν τον λόγο κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη κατάλληλων εκδόχων στη διασπορά των νανοσωματιδίων, πριν την έναρξη του freeze-drying, προκειμένου να προστατευτούν από τις διάφορες καταπονήσεις. Τα προστατευτικά αυτά στοχεύουν κυρίως στην προστασία των νανοσωματιδίων από την καταπόνηση κατάψυξης (κρυοπροστατευτικά, cryoprotectants) ή από την καταπόνηση ξήρανσης (λυοπροστατευτικά, lyoprotectants). Τα πιο γνωστά κρυοπροστατευτικά είναι διάφορα σάκχαρα, όπως η τριχαλόζη, η σουκρόζη και η γλυκόζη.

Η αναλογία κρυοπροστατευτικού παράγοντα/νανοσωματιδίων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων. Από κάποια συγκέντρωση κρυοπροστατευτικού και πάνω, μπορεί να αποσταθεροποιηθεί το σύστημα των νανοσωματιδίων. Ωστόσο, δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη αναλογία η οποία θα πρέπει να εφαρμόζεται. Έγκειται στην εκάστοτε περίπτωση που μελετάται^[90].

Στην παρούσα διπλωματική τα δείγματα Lemon-NPs-1, 2 και 4 αλλά και το δείγμα Mandarin-NPs-1 υπέστησαν ξήρανση υπό κενό μέσω μεθόδου freeze drying στους -40 °C, με στόχο την ανάκτηση στερεών νανοσωματιδίων για περαιτέρω ανάλυση - χρήση.

Πίνακας 14 : Ποσότητες πριν και μετά τη λυοφιλοποίηση των διαφόρων δειγμάτων

Δείγμα	Αρχική ποσότητα PLA (mg)	Ποσότητα σουκρόζης (mg)	Ποσότητα λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων (mg)	%Ποσοστό ανάκτησης
Lemon-NPs-1	14.8	40.4	3.5	23.65
Lemon-NPs-2	14.4	40.6	3.3	22.92
Mandarin-NPs-1	16.6	39.4	5.4	32.53
Lemon-NPs-4	151.2	-	16.2	10.71

Τα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια λευκού χρώματος που προέκυψαν σε όλα τα δείγματα, στην περίπτωση χρήσης κρυοπροστατευτικού παράγοντα, είχαν ινώδη και κολλώδη υφή, που δυσχέραινε την περισυλλογή τους από τα κρυσταλλωτήρια. Στο δείγμα στο οποίο δεν χρησιμοποιήθηκε σακχαρόζη, η κολλώδης υφή περιορίστηκε αρκετά και τα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια είχαν κυρίως υφή βαμβακιού.

Σε όλες τις περιπτώσεις το ποσοστό των ανακτώμενων νανοσωματιδίων ήταν μικρό συγκριτικά με την αρχικά χρησιμοποιούμενη ποσότητα πολυμερούς, όπως φαίνεται στον Πίνακα 14. Εντούτοις, στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του μανταρινιού επετεύχθη το υψηλότερο % ποσοστό ανάκτησης νανοσωματιδίων.

Παρά ταύτα, στην περίπτωση του scaled-up εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου του λεμονιού λήφθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα freeze-dried νανοσωματιδίων. Ωστόσο το % ποσοστό ανάκτησης μειώθηκε περισσότερο από 50% σε σχέση με τα αντίστοιχα στους εγκλεισμούς μικρής κλίμακας.

Μάλιστα, ενώ στα δείγματα εγκλεισμών μικρής κλίμακας έγινε χρήση του κρυοπροστατευτικού παράγοντα της σακχαρόζης, στο δείγμα Lemon-NPs-4 τα νανοσωματίδια ξηράθηκαν χωρίς την προσθήκη αυτής στην διασπορά των νανοσωματιδίων.

Ενδεικτικά παρουσιάζεται η εικόνα των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων των δειγμάτων Lemon-NPs-1 και 4 και Mandarin-NPs-1.



Εικόνα 39 : Λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια Lemon-NPs-4 (αριστερά), Lemon-NPs-1 (κεντρικά) και Mandarin-NPs-1 (δεξιά)

Τέλος, η παρουσία έντονης κολλώδους υφής στα περισσότερα δείγματα οφείλεται στην παρουσία του κρυοπροστατευτικού παράγοντα. Δηλώνει μάλιστα πως προστέθηκε μεγαλύτερη ποσότητα σακχαρόζης από την απαιτούμενη. Γενικά, το πλεόνασμα κρυοπροστατευτικού μακροπρόθεσμα μπορεί προκαλέσει αποσταθεροποίηση των νανοδομών^[90]. Χαρακτηριστική κολλώδης φάση παρατηρήθηκε στα δείγματα Lemon-NPs-1 και Mandarin-NPs-1 και ιδιαίτερα στο δείγμα του μανταρινιού.

2.5. Ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού Edwards

Στόχος της ξήρανσης είναι η λήψη ποσότητας νανοσωματιδίων για περαιτέρω ανάλυση.

Μικρές ποσότητες υγρασίας μπορούν να απομακρυνθούν μέσω ξήρανσης στην αντλία υψηλού κενού Edwards. Η όψη των δειγμάτων που προέκυψαν προσομοίαζε αρκετά εκείνη των λυοφιλοποιημένων δειγμάτων. Πρόκειται για ινώδη δείγματα με υφή βαμβακιού.

Συγκεκριμένα αφού ισομοιράστηκε η ποσότητα νανοσωματιδίων που βρίσκονταν σε διασπορά σε τρία προζυγισμένα erpendorfs, τα οποία και φυγοκεντρήθηκαν όπως περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία και λήφθηκε το υπερκείμενο διάλυμα, ξηράθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέσω της αντλίας Edwards. Το τελικό ποσοστό ανάκτησης είναι αρκετά ικανοποιητικό.

Πίνακας 15 : Συνθήκες ξήρανσης στην αντλία υψηλού κενού Edwards

Δείγμα	Αρχική ποσότητα PLA (mg)	Ποσότητα ξηρών νανοσωματιδίων (mg)	%Ποσοστό ανάκτησης
Lemon-NPs-3	12.5	9.4	75.2

2.6. Σύγκριση δύο μεθόδων ξήρανσης

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους ξήρανσης των νανοσωματιδίων προκύπτει πως στην περίπτωση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου του λεμονιού, μέσω της αντλίας Edwards το ποσοστό των ανακτώμενων σε ξηρή μορφή νανοσωματιδίων σε σχέση με την αρχική ποσότητα αυτών, σχεδόν τετραπλασιάζεται. Ακόμη, πρόκειται για μια πιο απλή διαδικασία, στην οποία το δείγμα υπόκειται σε ηπιότερες συνθήκες. Το μειονέκτημα ωστόσο που εμφανίζει είναι πως απαιτεί πολύ μικρή ποσότητα υγρασίας στο αρχικό δείγμα.

2.7. Άμεσος Προσδιορισμός Ποσοστού Εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων στα PLA νανοσωματίδια (EE%) και Ποσοστού Φόρτωσης (Drug Loading)

Δύο δείγματα νανοσωματιδίων «φορτωμένων» με αιθέριο έλαιο λεμονιού χρησιμοποιήθηκαν για τον άμεσο προσδιορισμό του Ποσοστού Εγκλεισμού. Στο ένα δείγμα έγινε ξήρανση μέσω αντλίας Edwards και στο άλλο μέσω Freeze Drying.

Πίνακας 16 : Ποσότητες και πειραματικές συνθήκες ξήρανσης στην αντλία υψηλού κενού Edwards

Δείγμα	Μέθοδος Ξήρανσης	Ανακτώμενη ποσότητα NPs (mg)	Χρόνος ανάδευσης (d)
Lemon-NPs-3	Αντλία υψηλού κενού Edwards	9.4	1
Lemon-NPs-4	Freeze Drying	16.2	2

Και στις δύο ωστόσο περιπτώσεις οι τιμές των απορροφήσεων είχαν αρνητική τιμή σε όλο το εύρος μηκών κύματος από 200-600 nm, γεγονός που δηλώνει πως η συγκέντρωση του προκύπτοντος διαλύματος ήταν πολύ χαμηλή ($c_1=9.4$ mg NPs/1.5 mL EtOAc και $c_2=16.2$ mg NPs/1.5 mL EtOAc) και άρα τα διαλύματα αραιά. Συνεπώς, δε μπόρεσε να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα περί του ποσοστού εγκλεισμού.

2.8. Μελέτη νανοσωματιδίων με φασμασκοπία FT-IR

Με στόχο τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε συμπληρωματικά ανάλυση FT-IR ενός δείγματος blank NPs και του Lemon-NPs-2. Το θεωρητικό υπόβαθρο σχετικά με την φασματοσκοπία υπέρυθρου έχει ως εξής^{[91],[92]}:

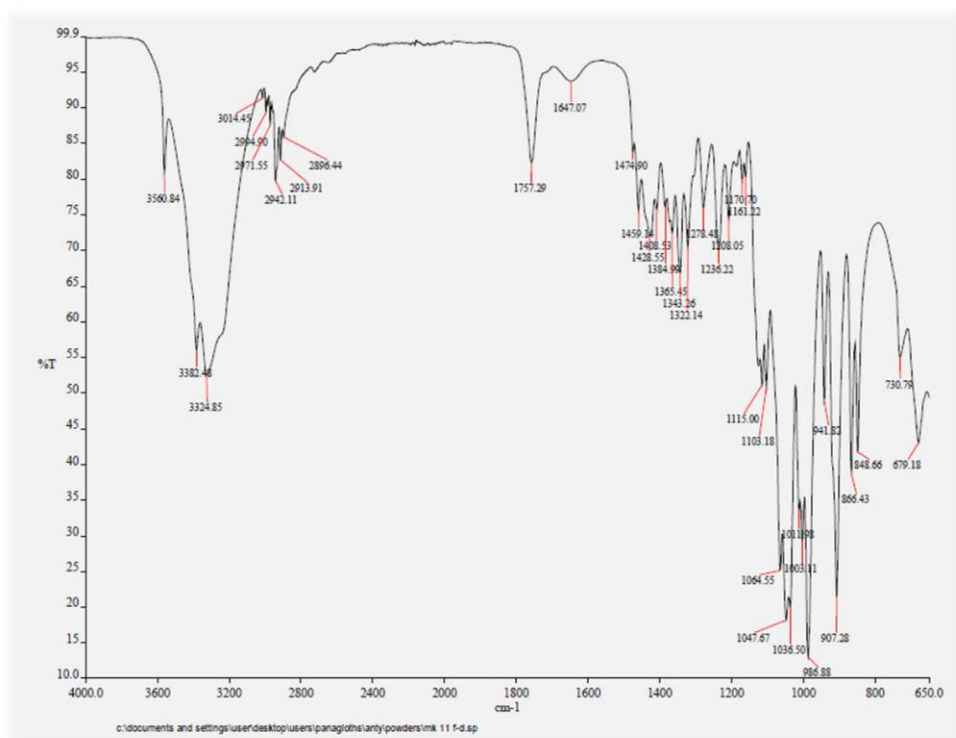
Ασχολείται με την υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που εκτείνεται από τη περιοχή του ορατού μέχρι την περιοχή των μικροκυμάτων. Ένα υπέρυθρο φάσμα αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα ενός δείγματος με κορυφές απορρόφησης που αντιστοιχούν στις συχνότητες δονήσεων μεταξύ των δεσμών των ατόμων που απαρτίζουν ένα υλικό. Καθώς κάθε υλικό είναι ένας μοναδικός συνδυασμός ατόμων, δεν υπάρχουν διαφορετικές ενώσεις που να παράγουν ακριβώς το ίδιο υπέρυθρο φάσμα. Λόγω αυτού η φασματομετρία υπέρυθρου χρησιμοποιείται για ποιοτική ανάλυση άλλα και για ποσοτική μέσω του μεγέθους των κορυφών του φάσματος.

Πιο συγκεκριμένα, η υπέρυθρη περιοχή διακρίνεται σε τρεις περιοχές: εγγύς, μέσο και άπω IR. Η φασματομετρία υπέρυθρου αναφέρεται, για αναλυτικούς σκοπούς, στο μέσο IR ($4000-400$ cm^{-1}), όπου από $4000-1600$ cm^{-1} παρέχονται πληροφορίες για την χαρακτηριστική ομάδα του μορίου (περιοχή Χαρακτηριστικής ομάδας), ενώ από $1600-400$ cm^{-1} για τους δεσμούς του μορίου αυτού (περιοχή απορρόφησης μορίων ή δακτυλικού αποτυπώματος).

Η αρχή στην οποία βασίζεται η φασματομετρία IR είναι ότι η απορρόφηση των μορίων σε συγκεκριμένες συχνότητες, που είναι χαρακτηριστικές για την δομή τους. Οι απορροφήσεις αυτές επιτυγχάνονται από τον συντονισμό των δεσμών με την συχνότητα της απορροφούμενης υπέρυθρης ακτινοβολίας. Ένα μόριο για να είναι ανιχνεύσιμο (“ενεργό”) με την μέθοδο IR, θα πρέπει η διπολική ροπή του να αλληλεπιδρά με την IR ακτινοβολία, με αποτέλεσμα το μόριο να δονείται.

Ένα μόριο μπορεί να δονηθεί με διάφορους τρόπους. Στην υπέρυθη φασματομετρία διερευνούνται οι δονήσεις τάσης, κάμψης και ψαλιδιού του μορίου (πχ. συμμετρικό και αντισυμμετρικό stretching, scissoring, rocking) Η δόνηση τάσης συμβολίζεται με ν ενώ εκείνη της κάμψης με $\delta(1,2)$.

Το φάσμα FT-IR του δείγματος blank NPs έχει ως εξής :

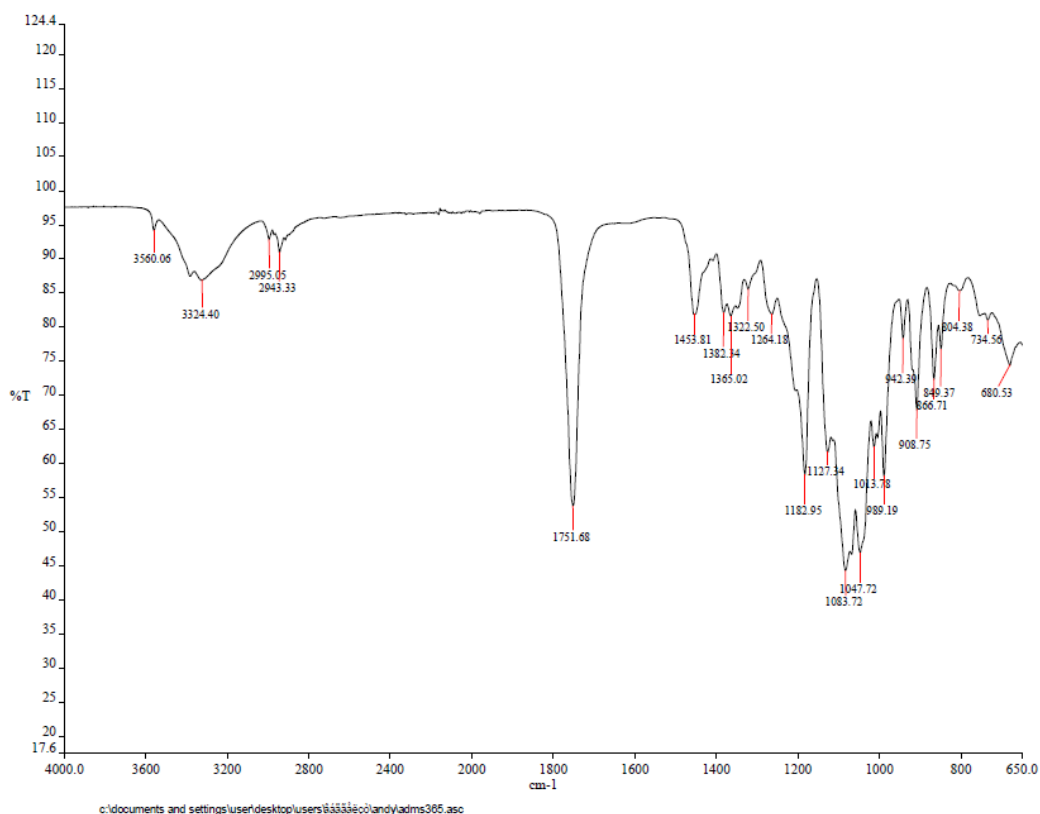


Εικόνα 40 : Φάσμα FT-IR "κενών" PLA νανοσωματιδίων

Στο φάσμα των blank NPs, οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στους εξής κυματάρθμους :

- i) στα 3324.85 cm^{-1} οφειλόμενη στη δόνηση τάσης (stretching vibration) του δεσμού OH,
- ii) στα 2942.11 cm^{-1} , που αποδίδεται στη δόνηση τάσης των δεσμών C-H της κύριας αλυσίδας του PLA,
- iii) στα 1757.29 cm^{-1} λόγω δόνησης τάσης του δεσμού C=O των καρβονυλικών ομάδων των επαναλαμβανόμενων εστέρων και
- iv) στα 1047.67 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-O των εστέρων.

Το φάσμα FT-IR του δείγματος Lemon-NPs-2 έχει ως εξής :



Εικόνα 41 : Φάσμα FT-IR Lemon-NPs-2

Η πιο χαρακτηριστική κορυφή των τερπενίων του αιθέριου ελαίου γύρω στα 1600 cm^{-1} είναι πολύ μικρής έντασης. Εμφανίζεται ωστόσο άλλη μία στα 1182.95 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση τάσης του απλού δεσμού C-C των τερπενίων του αιθέριου ελαίου του λεμονιού. Η απορρόφηση σε αυτή τη συχνότητα αποτελεί απόδειξη του εγκλεισμού ποσότητας αυτού μέσα στα νανοσωματίδια PLA. Οι υπόλοιπες χαρακτηριστικές κορυφές, κατά αντιστοιχία στους εξής κυματάρθμους : 3324.40 , 2943.33 , 1751.68 , 1047.72 cm^{-1} οφείλονται στους δεσμούς και τις χαρακτηριστικές ομάδες του πολυ(γαλακτικού) οξέος, όπως παρουσιάζονται στα φάσμα της Εικόνας 40. Η κορυφή ωστόσο στα 2943.3 cm^{-1} οφείλεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων $-\text{CH}_2$ τόσο της αλυσίδας του PLA όσο και των τερπενίων του αιθέριου ελαίου.

3. ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΕ β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗ - ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ (INCLUSION COMPLEXES)

3.1. Χαρακτηριστικά νανοσωματιδίων (Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς, ζ-δυναμικό)

Πίνακας 17 : Χαρακτηριστικά νανοσωματιδίων συμπλόκων β-CD-αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών

Δείγμα	Μέτρηση	Μέγεθος (nm)	PDI	Z-δυναμικό (mV)
Filtered β-CD-lemon	1 ⁿ	242.1	0.279	-19.8
	2 ⁿ	233.8	0.408	-27.2
	3 ⁿ	229.7	0.439	-31.2
	M.O.	235.2±6.3	0.375±0.085	-26.1±5.8
Filtered β-CD-mandarin	1 ⁿ	200.6	0.253	-26.3
	2 ⁿ	196.7	0.331	-22.2
	3 ⁿ	194.9	0.363	-22.8
	M.O.	197.4±2.9	0.316±0.057	-23.8±2.2
Filtered β-CD-grapefruit	1 ⁿ	175.9	0.334	-6.67
	2 ⁿ	193.1	0.317	-6.14
	3 ⁿ	190	0.259	-5.86
	M.O.	186.3±9.2	0.303±0.039	-6.22±0.4
Filtered β-CD-orange	1 ⁿ	596.7	0.572	-29.6
	2 ⁿ	581.8	0.543	-28.4
	3 ⁿ	471.3	0.474	-24.5
	M.O.	549.9±68.5	0.530±0.05	-27.5±2.7

Η εφαρμογή διαφορετικής μεθόδου νανοεγκλεισμού οδήγησε με την σειρά της σε αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα μεγεθών, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των περισσότερων νανοσωματιδιακών συμπλόκων που προέκυψαν.

Στις περιπτώσεις των αιθέριων ελαίων του λεμονιού, μανταρινιού και γκρέιπφρουτ, το μέγεθος των σωματιδίων είναι μικρό και κυμαίνεται στο εύρος 186-235 nm. Τα σύμπλοκα με το μεγαλύτερο μέγεθος σχηματίζονται στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου λεμονιού, ενώ του μικρότερου μεγέθους σε εκείνη του γκρέιπφρουτ.

Θα πρέπει να σημειωθεί πως το μέγεθος των συμπλόκων στις περιπτώσεις των αιθέριων ελαίων ενδεχομένως καθορίζεται από το κύριο συστατικό αυτών, που είναι το λιμονένιο.

Ο δείκτης πολυδιασποράς των τριών ειδών συμπλόκων είναι σχεδόν ίδιος σε όλες τις περιπτώσεις (της τάξης του 0.3). Η τιμή του αντιστοιχεί στην περιοχή 0.303-0.375. Οι τιμές αυτές δηλώνουν πως το αιώρημα εμφανίζει σχετική ομοιογένεια. Ωστόσο κατά φθίνουσα σειρά έχει ως εξής : PDI_{β-CD-λεμονιού}, PDI_{β-CD-μανταρινιού}, PDI_{β-CD-grapefruit}.

Επιπλέον οι τιμές του ζ-δυναμικού για τα σύμπλοκα β-CD με τα αιθέρια έλαια λεμονιού και μανταρινιού είναι παρεμφερείς, με το σύμπλοκο β-CD-lemon ειδικότερα να σχηματίζει ιδιαίτερα σταθερές σωματιδιακές δομές και το σύμπλοκο β-CD-mandarin να προσεγγίζει αρκετά την περιοχή στην οποία το σύστημα εμφανίζει ηλεκτρική σταθερότητα. Ωστόσο,

εκείνο του γκρέιπφρουτ παρουσιάζει χαμηλές τιμές ζ-δυναμικού, για τις οποίες το σύστημα είναι ηλεκτρικά ασταθές, με μεγάλη πιθανότητα δημιουργίας συσσωματωμάτων.

Ωστόσο, στην περίπτωση του συμπλόκου της β-CD με το αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού τα αποτελέσματα μεγέθους και PDI δεν ήταν ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα, το μέγεθος των σωματιδίων αντιστοιχούσε περίπου σε 0.5 μm και η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς δηλώνει σχετική ανομοιογένεια δείγματος. Ενδεχομένως, οι ανεπιθύμητες αυτές μετρήσεις να οφείλονται στον μικρό χρόνο ανάδευσης του δείγματος στο vortex, με αποτέλεσμα να μην επιτευχθεί καλή διασπορά των σωματιδίων. Από την άλλη, οι τιμές του δυναμικού επιφανείας εξασφαλίζουν ηλεκτρική σταθερότητα.

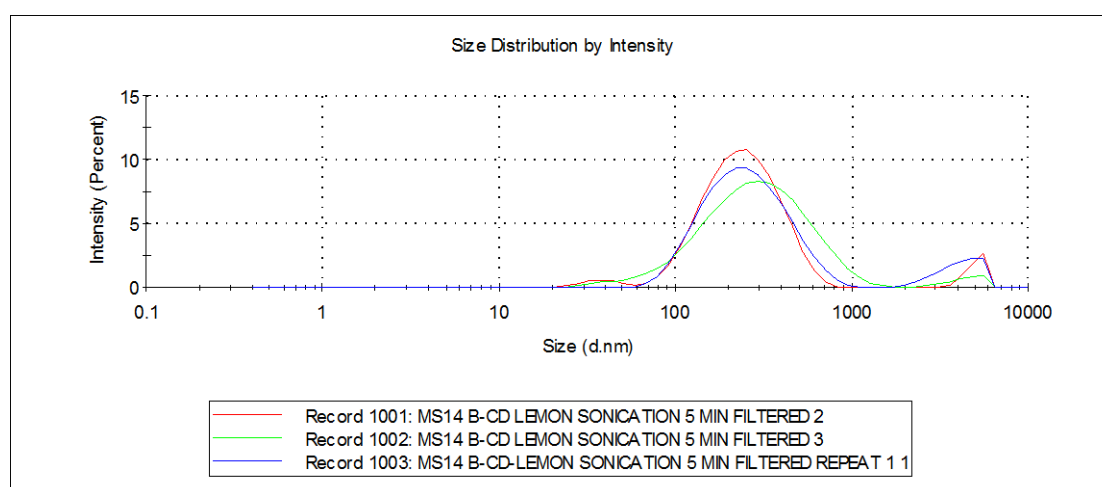
Προκειμένου να «σπάσουν» τυχόν συσσωματώματα που υπήρχαν στα δείγματα διασποράς νανοσωματιδίων, πραγματοποιήθηκε κατεργασία τους με υπερήχους διάρκειας 5 λεπτών πριν την διεξαγωγή της μέτρησης. Επίσης, όλα τα δείγματα διήλθαν από ειδικό φίλτρο, γεγονός που δηλώνει πως υπήρχαν και μεγαλύτερου μεγέθους νανοσωματίδια συμπλόκων, που συγκρατήθηκαν από το φίλτρο αυτό και δεν πέρασαν στην κυψελίδα.

Συνολική αποτίμηση χαρακτηριστικών νανοσωματιδιακών συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης

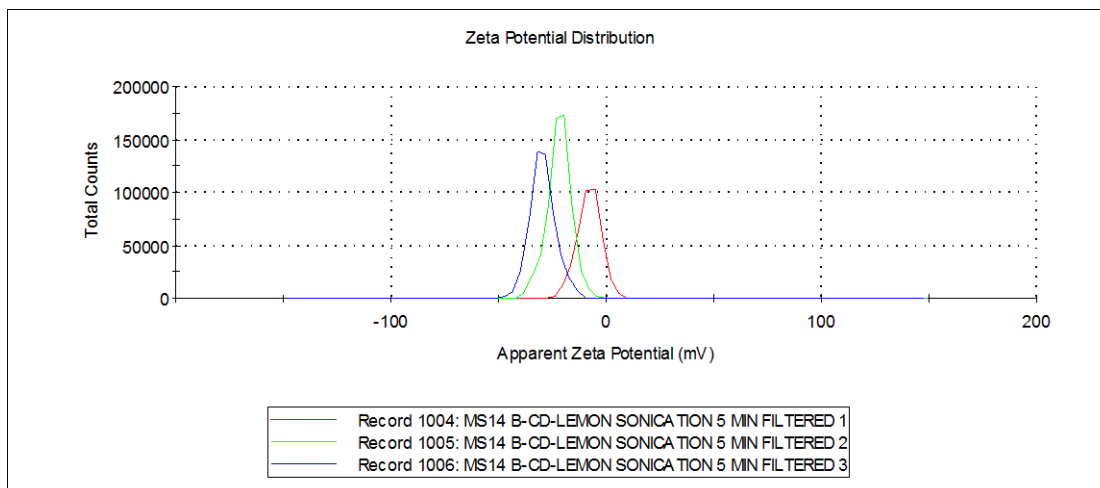
Συμπεραίνεται λοιπόν πως η χρήση διαφορετικών αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών (λεμονιού, μανταρινιού και γκρέιπφρουτ) έχει πολύ μικρή και αμελητέα αντιστοιχώς επίδραση στη μεταβολή του μεγέθους των νανοσωματιδίων και της παραμέτρου του δείκτη πολυδιασποράς αυτών. Ωστόσο, ενώ τα σύμπλοκα β-CD-lemon και β-CD-mandarin εμφανίζουν ανάλογες τιμές ζ-δυναμικού, στην περίπτωση του γκρέιπφρουτ, το δυναμικό επιφανείας παρουσιάζει αρκετά μειωμένη απόλυτη τιμή, που καθιστά πιθανή την έλξη των σωματιδίων προς σχηματισμό συσσωματωμάτων. Διαφοροποίηση στις τιμές μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς εμφανίζει το σύμπλοκο β-CD-orange, σχηματίζοντας σχετικά ανομοιογενή σωματίδια μεγάλου μεγέθους, λόγω πιθανώς μη καλής επαναδιασποράς τους.

Οι κατανομές μεγέθους και ζ-δυναμικού σε κάθε περίπτωση σχηματισμού συμπλόκου β-CD με το εκάστοτε αιθέριο έλαιο παρατίθενται στα ακόλουθα γραφήματα.

A. β-CD-lemon

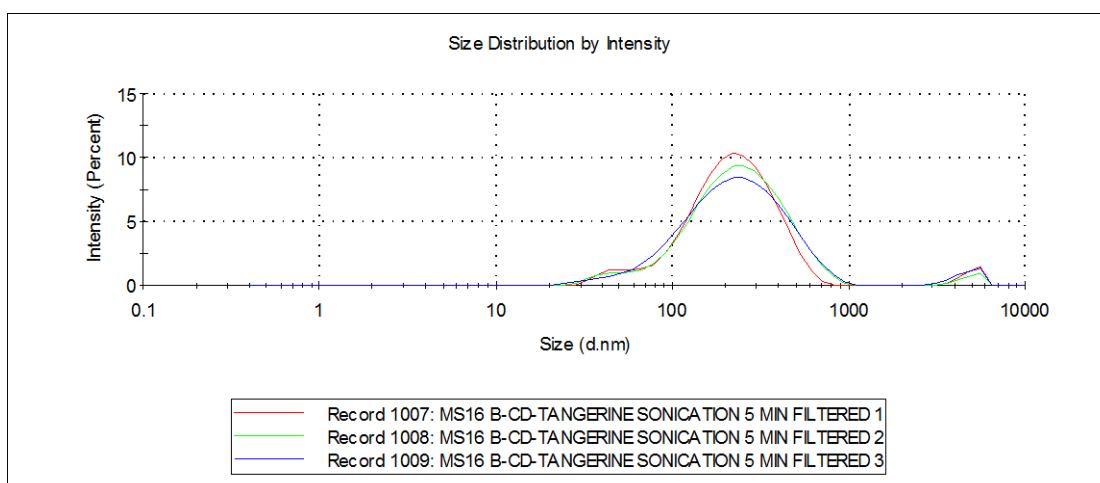


Διάγραμμα 7 : Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων συμπλόκων β-CD-lemon

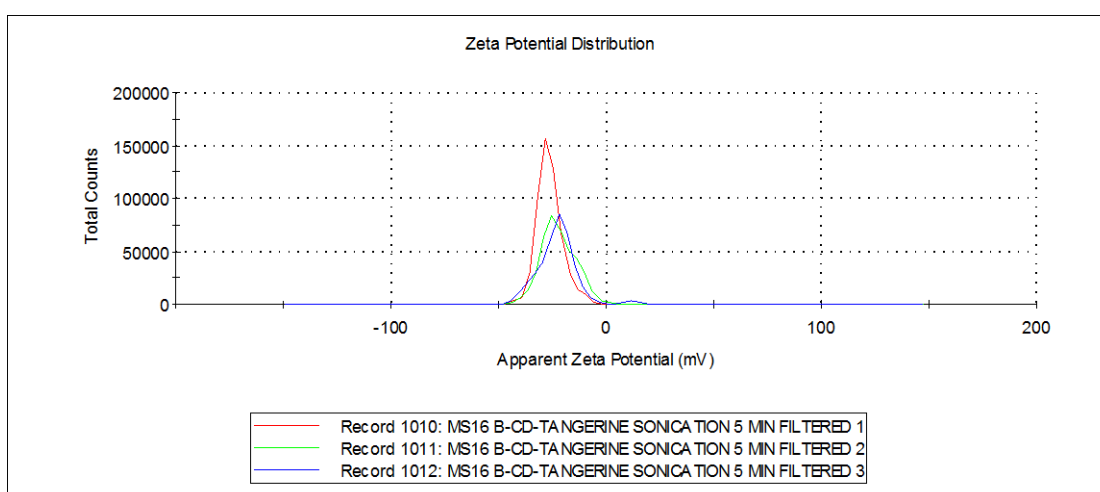


Διάγραμμα 8 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας νανοσωματιδίων συμπλόκων β-D-lemon

B. β-CD-mandarin

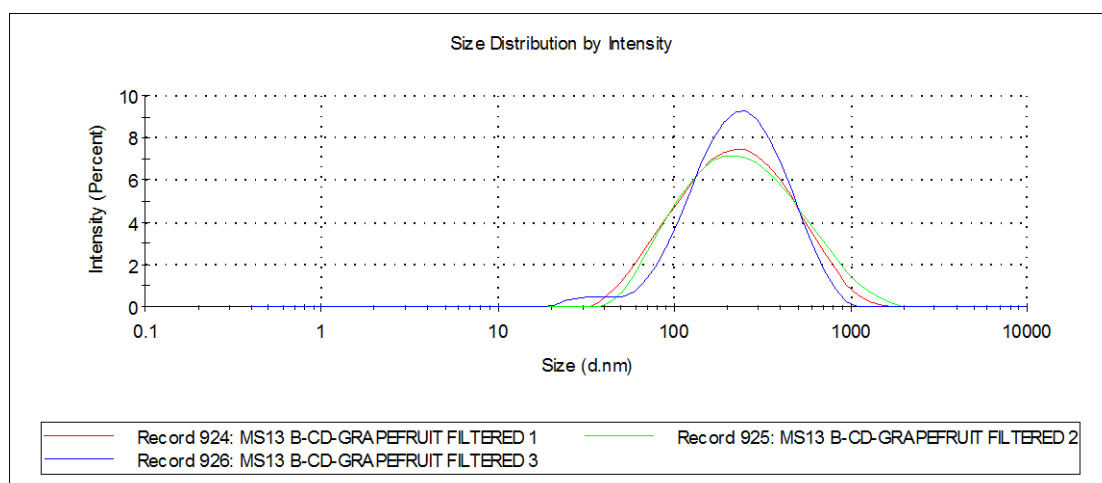


Διάγραμμα 9 : Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων συμπλόκων β-CD-tangerine

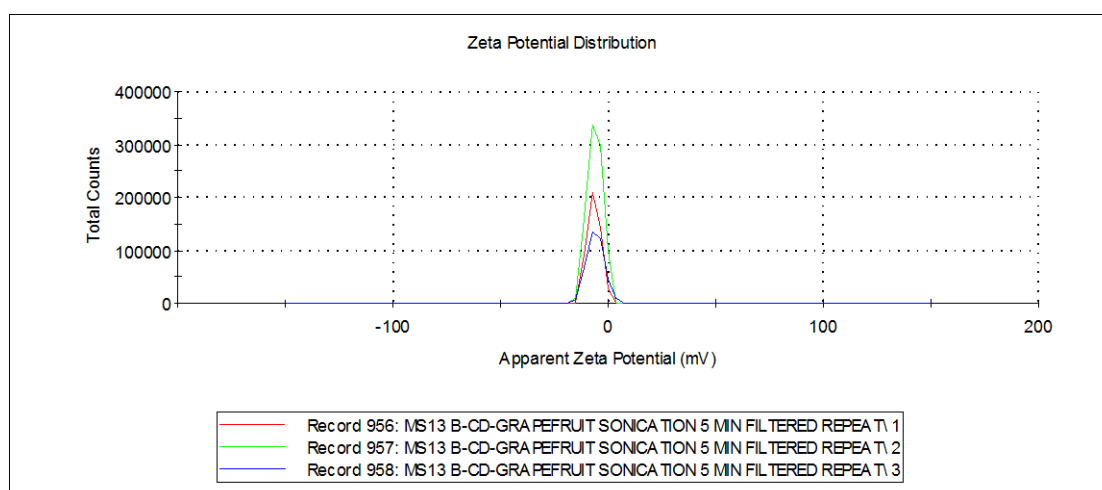


Διάγραμμα 10 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας νανοσωματιδίων συμπλόκων β-D-tangerine

C. β -CD-grapefruit

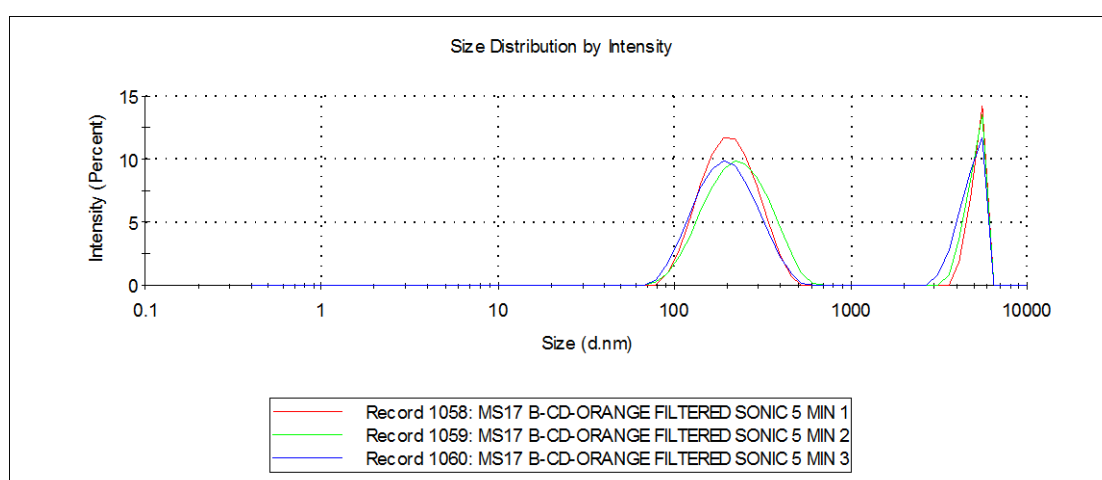


Διάγραμμα 11 : Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων συμπλόκων β -CD-grapefruit

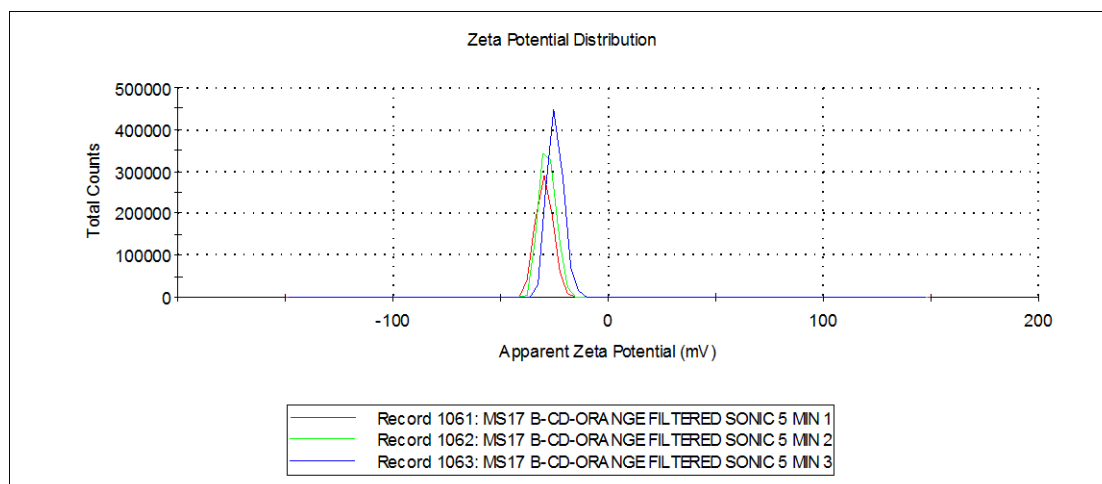


Διάγραμμα 12: Κατανομή δυναμικού επιφανείας νανοσωματιδίων συμπλόκων β -D-grapefruit

D. β -CD-orange



Διάγραμμα 13 : Κατανομή μεγέθους συμπλόκων β -CD-orange



Διάγραμμα 14 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας συμπλόκων β-CD-range

Στο Διάγραμμα 14 γίνεται εμφανές πως υπάρχουν δύο μεγάλες οικογένειες σωματιδίων, αφού εμφανίζονται δύο χαρακτηριστικές κορυφές, καθιστώντας το δείγμα ανομοιογενές. Η οικογένεια που αντιστοιχούσε στο δεύτερο peak σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα είχε μέγεθος της τάξης των 5 μm και συνιστούσε περίπου το 25% του δείγματος. Επίσης, στην περίπτωση του λεμονιού και του μανταρινιού εμφανίζεται άλλη μία μικρή οικογένεια νανοσωματιδίων, στα οποία και οφείλεται η χαμηλή δεύτερη κορυφή στα γραφήματα μεγέθους αυτών .

Όπως φαίνεται και από τα γραφήματα την μικρότερη κατανομή μεγέθους παρουσιάζουν τα σύμπλοκα εγκλεισμού στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του γκρέιπφρουτ.

3.2. Ανάκτηση συμπλόκου

Οι αρχικές ποσότητες όπως και η τελικά ανακτώμενη ποσότητα συμπλόκου, μετά από ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού Edwards, σε κάθε περίπτωση παρουσιάζονται στον Πίνακα 17. Η αρχική αναλογία αιθέριου ελαίου/β-κυκλοδεξτρίνης αντιστοιχεί σε 20/80 (w/w).

Πίνακας 18 : Ανάκτηση συμπλόκου από τα συστήματα β-CD-αιθέριων ελαίων

Σύστημα	Αρχική ποσότητα β-CD (mg)	Αρχική ποσότητα αιθέριου ελαίου (mg)	Συνολική αρχική ποσότητα αντιδρώντων (mg)	Ποσότητα ανακτώμενου συμπλόκου (mg)	%Ποσοστό Ανάκτησης*
β-CD-λεμόνι	500.7	125.1	625.8	462.4	73.89
β-CD-μανταρίνι	500.5	124.9	625.4	477	76.27
β-CD-grapefruit	500.7	125.2	625.9	487.8	77.94
β-CD-πορτοκάλι	500.2	125.2	625.4	436.9	69.86

*Το %ποσοστό ανάκτησης ισούται με την ποσότητα ανακτώμενου συμπλόκου (mg)/συνολική αρχική ποσότητα αντιδρώντων (mg).

Τα ποσοστά ανάκτησης συμπλόκων εγκλεισμού είναι αρκετά υψηλά, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην αρχική υψηλή αναλογία β-κυκλοδεξτρίνης-αιθέριου ελαίου. Η μεγαλύτερη ποσότητα ανακτώμενου συμπλόκου όπως και το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης επετεύχθη στην περίπτωση του συστήματος β-CD-grapefruit.

Η απώλεια ποσότητας μπορεί να οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες. Ο πρώτος σχετίζεται με την πτητικότητα που χαρακτηρίζει τα αιθέρια έλαια., καθώς ποσότητα αυτών μπορεί να εξατμίστηκε τη στιγμή που γινόταν η προσθήκη τους στο θερμό διάλυμα β-κυκλοδεξτρίνης-νερού-αιθανόλης. Ακόμη, μπορεί να συνέβη εξάτμιση της επιφανειακά προσροφημένης ποσότητας του ελαίου στο μόριο της β-κυκλοδεξτρίνης κατά τη διάρκεια της συμπλοκοποίησης. Επιπλέον, όση ποσότητα ελαίου δεν σχημάτισε σύμπλοκα με την β-κυκλοδεξτρίνη ενδέχεται να εξατμίστηκε για όσο χρόνο πραγματοποιούνταν η ξήρανση του στερεού συμπλόκου στην αντλία υψηλού κενού Edwards, καθώς η θερμοκρασία που επικρατούσε ήταν 40 °C. Δύναται επίσης να κατακρατήθηκε ποσότητα ελαίου στο διάλυμα μετά το σχηματισμό των συμπλόκων. Ωστόσο, τυχόν απώλεια β-κυκλοδεξτρίνης και συμπλόκων μπορεί να οφείλεται και στη διαλυτότητά τους στο νερό. Η ποσότητα που συμπλοκοποιήθηκε βρίσκεται από τον εξής τύπο ^[69].

Ποσότητα που συμπλοκοποιήθηκε στην κοιλότητα της β – κυκλοδεξτρίνης = ολική ποσότητα ελαίου που περιέχεται στο στερεό σύμπλοκο – επιφανειακά προσροφημένη ποσότητα ελαίου ^[69]

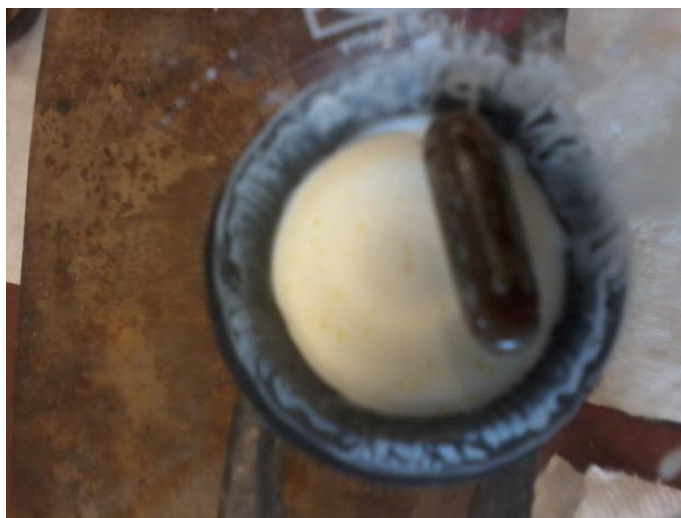
Σε όλες τις περιπτώσεις μάλιστα μετά την προσθήκη του ελαίου και μέχρι την πλήρη συμπλοκοποίησή του, σχηματίστηκε ένα διφασικό διάλυμα, όπου στην επιφάνεια του προκύπτοντος γαλακτώματος αιωρούταν ποσότητα αδιάλυτου ελαίου. Ο χρόνος που απαιτήθηκε για την πλήρη εξάλειψη της ελαιώδους φάσης εξαρτάται από την φύση του εκάστοτε ελαίου.



Εικόνα 42 : Σχηματισμός διφασικού διαλύματος μετά την προσθήκη αιθέριου ελαίου grapefruit στο θερμό διάλυμα β-CD

Στην περίπτωση του λεμονιού και του μανταρινιού δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός έντονης ελαιώδους φάσης, λόγω της πιθανής διαλυτότητας των αιθέριων αυτών ελαίων στο διάλυμα αιθανόλης-νερού.

Επιπλέον μετά την διήθηση υπό κενό τα σύμπλοκα έφεραν ένα χαρακτηριστικό κιτρινωπό χρώμα και πιο συγκεκριμένα στις περισσότερες περιπτώσεις, όπως του αιθέριου ελαίου του πορτοκαλιού ήταν εμφανή σταγονίδια ελαίου στην επιφάνεια των συμπλόκων, γεγονός που δηλώνει πως μία ποσότητα αυτού δεν εγκλείστηκε μέσα στα μόρια της β-κυκλοδεξτρίνης.



Εικόνα 43 : Σύμπλοκο β-CD - αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού μετά τη διήθηση

Το ανακτώμενο σύμπλοκο με μορφή σκόνης μετά την ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού Edwards είχε λευκό χρώμα σε όλες τις περιπτώσεις.



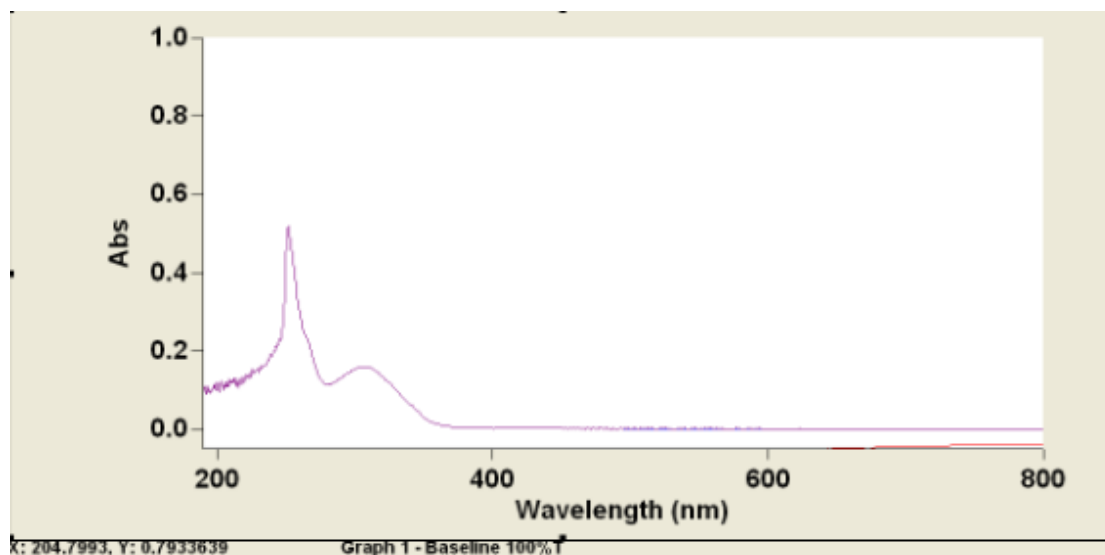
Εικόνα 44 : Ανάκτηση συμπλόκων β-CD-αιθέριων ελαίων μετά την ξήρανση

3.3. Άμεσος Προσδιορισμός Ποσοστού Εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων στα σύμπλοκα με την β-CD (Entrapment Efficiency%) και Προσδιορισμός Ποσοστού Φόρτωσης (Drug Loading)

Πραγματοποιήθηκε απόπειρα άμεσου προσδιορισμού της απόδοσης εγκλεισμού (Entrapment Efficiency, EE%) σε δείγμα συμπλόκων β-CD-lemon.

Η ποσότητα του αιθέριου ελαίου του λεμονιού που εγκλείστηκε μέσα στα σωματίδια συμπλόκων β-CD προσδιορίζεται άμεσα με χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis. Το δείγμα προς φωτομέτρηση προετοιμάστηκε, όπως περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία.

Πιο συγκεκριμένα, προκειμένου να προσδιοριστεί το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης για το αιθέριο έλαιο του λεμονιού, λήφθηκε το φάσμα απορρόφησης του στο εύρος μηκών κύματος από 190-800 nm. Έτσι προέκυψε το λ_{max} στα 252.2 nm.



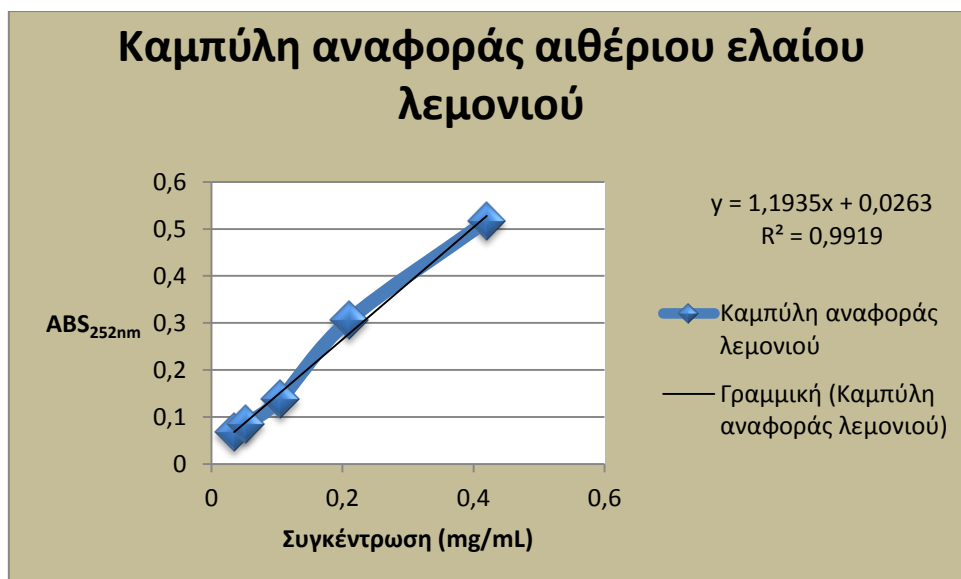
Εικόνα 45 : Φάσμα απορρόφησης αιθέριου ελαίου λεμονιού

Ακολούθησε φωτομέτρηση πέντε πρότυπων διαλυμάτων του συγκεκριμένου αιθέριου ελαίου στο παραπάνω εύρος μηκών κύματος και καταγράφηκε η τιμή της απορρόφησης τους στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται ακολούθως:

Πίνακας 19 : Τιμές απορροφήσεων πέντε πρότυπων διαλυμάτων για την διαμόρφωση της καμπύλης αναφοράς

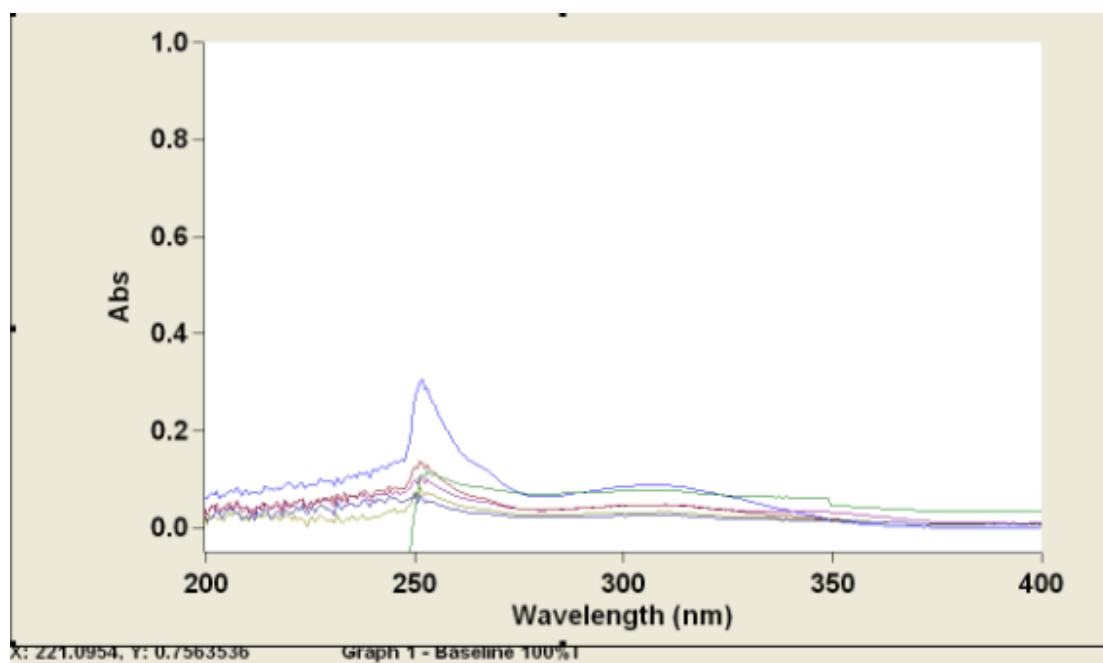
Συγκέντρωση (mg/mL)	Απορρόφηση (ABS)
0.035	0.068
0.0525	0.084
0.105	0.138
0.21	0.306
0.42	0.517

Βάσει των παραπάνω μετρήσεων κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς του αιθέριου ελαίου του λεμονιού στα 252 nm, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 16.



Διάγραμμα 15 : Καμπύλη αναφοράς του αιθέριου ελαίου του λεμονιού στα 252 nm

Τα φάσματα απορροφήσεων των πέντε πρότυπων διαλυμάτων παρουσιάζονται στην Εικόνα 46.



Εικόνα 46 : Φάσμα απορροφήσεων πρότυπων διαλυμάτων αιθέριου ελαίου λεμονιού

Για τον προσδιορισμό της εγκλωβισμένης ουσίας στα σύμπλοκα λήφθηκαν αρχικά 3 mL από το αρχικό διάλυμα συμπλόκων β-CD-lemon σε δις-απιονισμένο νερό-ακετονιτρίλιο (1:1). Επειδή η τιμή της απορρόφησης στα 252 nm υπερέβαινε την μονάδα, αραιώθηκε κατάλληλα αρχικά στο ½ (ABS>1) και εν συνεχεία στο ¼ της αρχικής συγκέντρωσης, λαμβάνοντας 1 mL από το αρχικό πυκνό διάλυμα και προσθέτοντας 3 mL διαλυτών σε αναλογία 1:1. Η απορρόφηση που προέκυψε στο τελικώς αραιωμένο δείγμα στα 251 nm ήταν ABS=0.648.

Μέσω της καμπύλης αναφοράς του αιθέριου ελαίου του λεμονιού και της απορρόφησης αυτής, υπολογίζεται η συγκέντρωση του αραιωμένου διαλύματος $C_2=0.52 \text{ mg/mL}$. Από τον νόμο της αραιώσης :

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Όπου,

$V_1=1 \text{ mL}$ και $V_2=4 \text{ mL}$,

προσδιορίζεται και η συγκέντρωση του αρχικού πυκνού διαλύματος $C_1=2.08 \text{ mg/mL}$.

Κατόπιν υπολογίζεται η ποσότητα του αιθέριου ελαίου στο ανακτώμενο σύμπλοκο ίση με 96.17 mg .

Συνεπώς, το ποσοστό εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου λεμονιού στα σύμπλοκα με την β -CD προσδιορίζεται ως εξής :

$$EE\% = \frac{96.17 \text{ mg}}{125.1 \text{ mg}} = 76.87\%$$

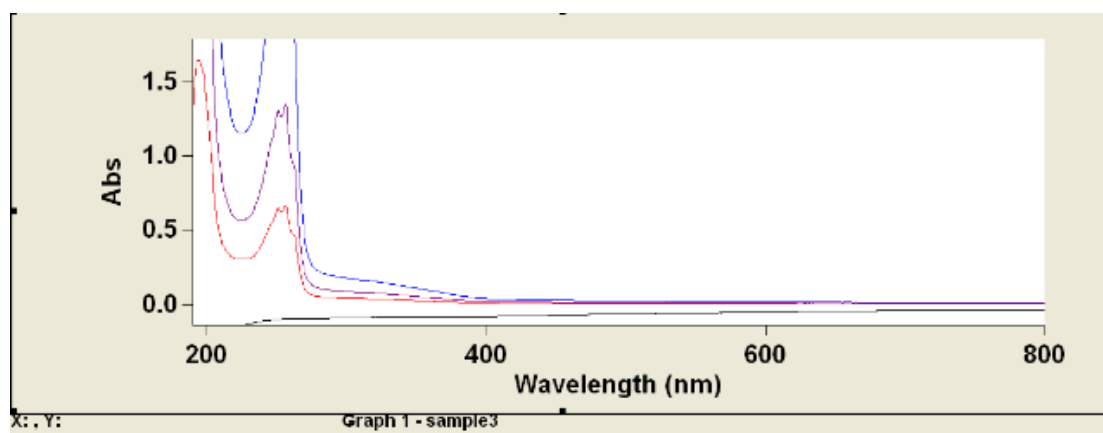
Συνεπώς, το ποσοστό της ποσότητας του ελαίου που εγκλείστηκε σχηματίζοντας σύμπλοκο με την β -κυκλοδεξτρίνη είναι αρκετά υψηλό.

Επίσης το ποσοστό φόρτωσης (drug loading) υπολογίζεται ως εξής :

$$DL = \frac{96.17 \text{ mg}}{462.4 \text{ mg}} = 20.8\%$$

Η τιμή αυτού είναι επίσης ικανοποιητική σύμφωνα με ανάλογα πειράματα σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού με αιθέρια έλαια που έχουν μελετηθεί βιβλιογραφικά^[79].

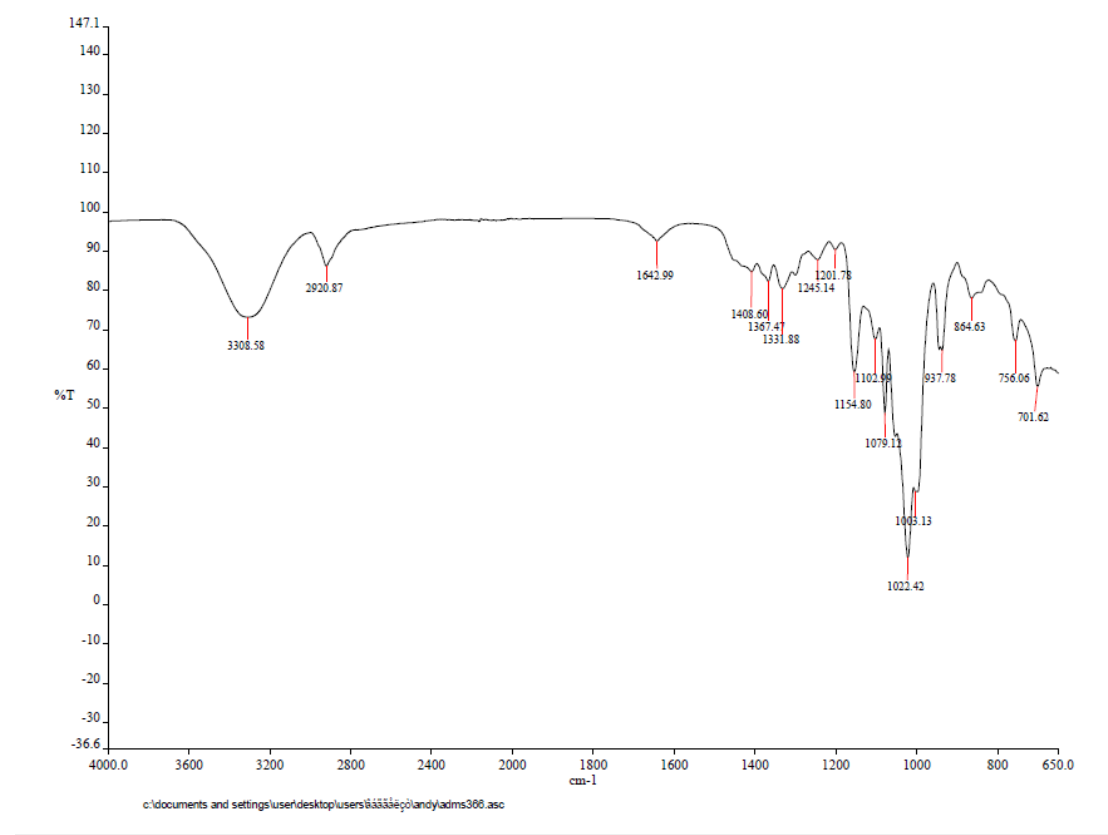
Τα φάσματα απορρόφησης του αρχικού πυκνού διαλύματος, όπως και των δύο διαδοχικά αραιωμένων διαλυμάτων αυτού παρουσιάζονται ακολούθως :



Εικόνα 47 : Φάσματα απορροφήσεων διαλυμάτων συμπλόκων β -CD-lemon σε δις-απιονισμένο νερό – ακετονιτρίλιο (μπλε : αραιωμένου 1:4, μωβ : αραιωμένου 1:2 και κόκκινο : πυκνού-αρχικού)

3.4. Μελέτη συμπλόκων εγκλεισμού με φασματοσκοπία FT-IR

β-CD-lemon



Εικόνα 48 : Φάσμα FT-IR συμπλόκων β-CD-lemon

Στο φάσμα των συμπλόκων β-CD-lemon οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές αντιστοιχούν σε απορροφήσεις στους εξής κυματάριθμους :

i)στα 3308.58 cm^{-1} που οφείλεται στην δόνηση τάσης του δεσμού O-H του μορίου της β-κυκλοδεξτρίνης,

ii)στα 2920.87 cm^{-1} που αποδίδεται στη δόνηση τάσης των ομάδων $-\text{CH}_2$ που υπάρχουν στα μόρια της β-κυκλοδεξτρίνης όσο και σε εκείνα των τερπενικών συστατικών του αιθέριου ελαίου του λεμονιού.

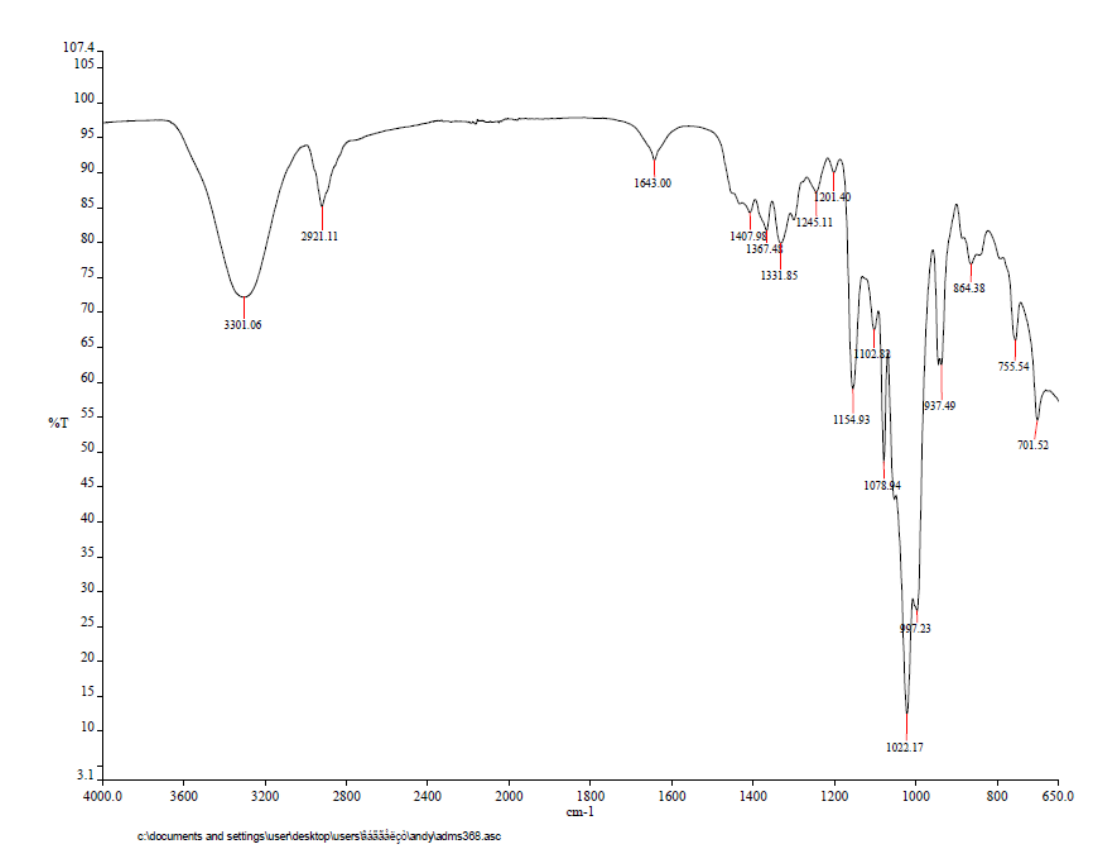
iii)στα 1642.99 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση τάσης του διπλού δεσμού C=C, που είναι χαρακτηριστικός των τερπενίων των αιθέριων ελαίων. Αυτή η κορυφή είναι χαρακτηριστική αυτών, αφού ο δεσμός αυτός δεν εμφανίζεται στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης. Έτσι, επιβεβαιώνεται η συμπλοκοποίηση του αιθέριου ελαίου του λεμονιού με το μόριο της β-CD.

iv)στα 1408.60 , 1367.47 και 1331.88 cm^{-1} που αποδίδονται στην δόνηση τάσης των ομάδων $-\text{CH}_3$ και $-\text{CH}_2$ των τερπενικών υδρογονανθράκων.

v)στα 1154.80 cm^{-1} λόγω δονήσεων τάσης του απλού δεσμού C-C που συναντάται τόσο στα μόρια της κυκλοδεξτρίνης όσο και των τερπενίων.

νί)στα 1022.42 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση κάμψης (bending vibration) του δεσμού O-H στο μόριο της β-CD.

β-CD-mandarin

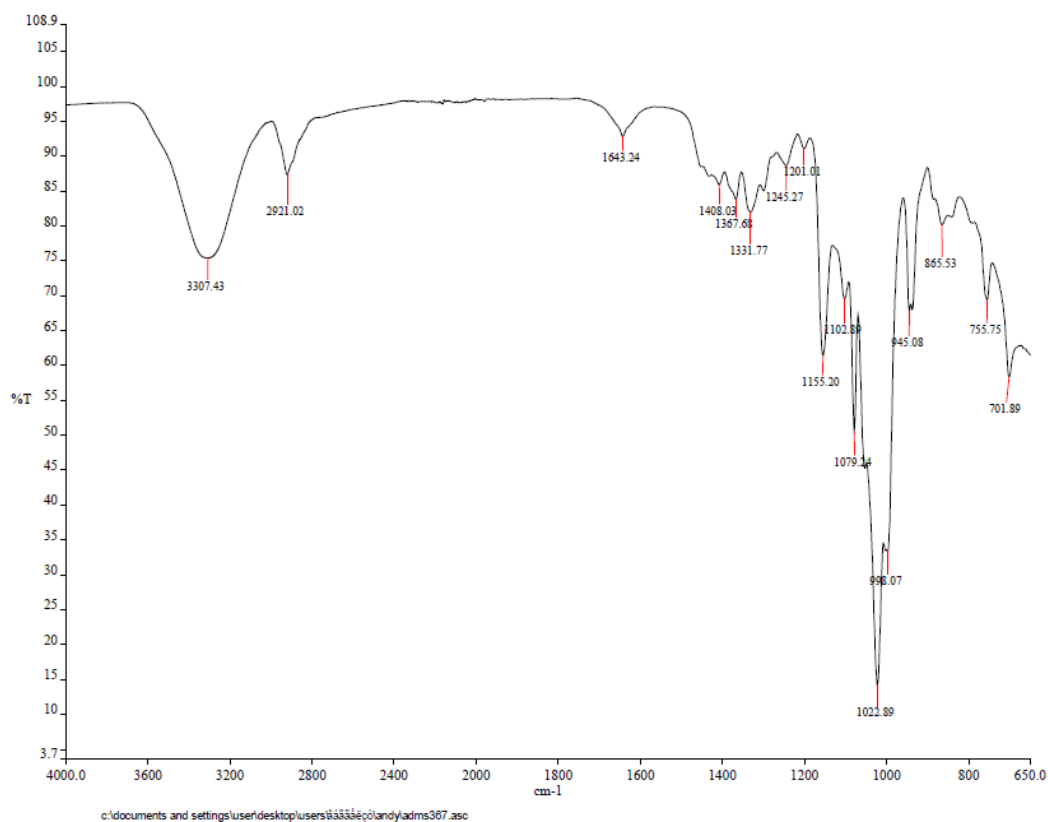


Εικόνα 49 : Φάσμα FT-IR συμπλόκων β-CD-mandarin

Ομοίως με τα δύο ανωτέρω φάσματα, ερμηνεύεται και αυτό του συμπλόκου β-CD-mandarin. Συγκεκριμένα, μελετώντας το φάσμα από αριστερά προς τα δεξιά οι χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3301.06 , 2921.11 , 1643.00 , 1407.98 , 1367.48 , 1331.85 και 1154.93 cm^{-1} λόγω δονήσεων τάσης χαρακτηριστικών ομάδων και δεσμών, όπως αναφέρεται και στις δύο προηγούμενες περιπτώσεις. Η πιο χαρακτηριστική είναι εκείνη των 1643.00 cm^{-1} που αποδίδεται στους διπλούς δεσμούς C=C των τερπενίων, απόδειξη πως το έλαιο σχημάτισε σύμπλοκο με το μόριο της β-CD. Εμφανίζεται μία ακόμη κορυφή στα 1022.17 cm^{-1} που οφείλεται σε δονήσεις κάμψης των υδροξυλομάδων της β-CD.

β-CD-grapefruit

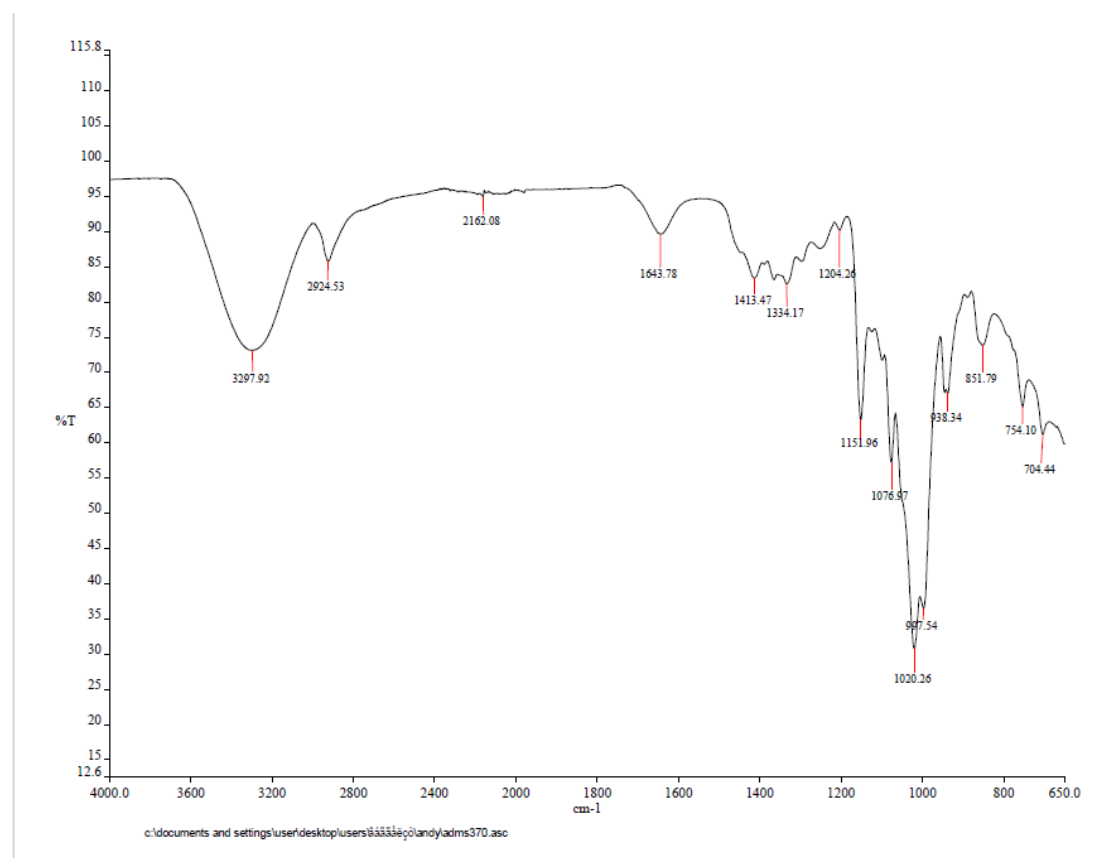
C



Εικόνα 50 : Φάσμα FT-IR συμπλόκων β-CD-grapefruit

Το φάσμα των συμπλόκων β-CD-grapefruit παρουσιάζει ορισμένες ζώνες απορρόφησης. Συγκεκριμένα, οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 3307.43 cm⁻¹ και 2921.02 cm⁻¹ οφείλονται στις δονήσεις τάσης των υδροξυλομάδων (-OH) του μορίου της β-CD και σε αυτές των ομάδων -CH₂ τόσο αυτής όσο και των τερπενίων του αιθέριου ελαίου του γκρέιπφρουτ, αντιστοίχως. Ακόμη, η πιο σημαντική χαρακτηριστική κορυφή στα 1643.24 cm⁻¹ αποδίδεται στη δόνηση τάσης των διπλών δεσμών C=C των τερπενίων του αιθέριου αυτού ελαίου. Επιπροσθέτως, λόγω δονήσεων τάσης των ομάδων -CH₃ και -CH₂ των τερπενίων εμφανίζονται κορυφές στα 1408.03, 1367.68 και 1331.77 cm⁻¹. Ωστόσο, μία ακόμη χαρακτηριστική κορυφή στα 1155.20 cm⁻¹ οφείλεται στη δόνηση τάσης του απλού δεσμού C-C των μορίων της β-CD και των τερπενίων. Τέλος, ο δεσμός O-H δημιουργεί άλλη μία κορυφή στα 1022.89 cm⁻¹ λόγω δονήσεων κάμψης.

β-CD-orange



Εικόνα 51 : Φάσμα FT-IR συμπλόκων β-CD-orange

Το φάσμα του συμπλόκου β-CD-orange παρουσιάζει κορυφές στα 3297.92, 2924.53, 1643.78, 1413.47, 1334.17, 1204.26, 1151.96 και 1020.26 cm^{-1} , αντιστοίχως. Κατά σειρά αυτές αποδίδονται σε δονήσεις τάσης και κάμψης, όπως αναφέρονται παραπάνω.

Συμπερασματικά, τα φάσματα παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες, λόγω του ότι η σύσταση των αιθέριων ελαίων είναι ανάλογη σε όλες τις περιπτώσεις έχοντας ως κύριο συστατικό τους το λιμονένιο. Συνεπώς, οι κορυφές εμφανίζονται σε παραπλήσιους κυματάριθμους και αποδίδονται στους ίδιους δεσμούς και χαρακτηριστικές ομάδες.

3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

Από τη συγκριτική μελέτη των δύο διαφορετικών μεθόδων νανοεγκλεισμού που μελετήθηκαν απορρέουν οι εξής παρατηρήσεις :

1. Ο σχηματισμός συμπλόκων με τη μέθοδο της συν-καταβύθισης εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι του εγκλεισμού με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση των οργανικών διαλυτών. Συνολικά, τα στάδια προετοιμασίας του είναι ευκολότερα και δεν απαιτούν τη διαρκή ανθρώπινη παρέμβαση. Ακόμη, το έλαιο προστίθεται στο υδατικό διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης, χωρίς να απαιτείται η διάλυσή του σε κάποιον οργανικό διαλύτη. Η προσθήκη του γίνεται στάγδην και όχι με άμεσο τρόπο, όπως στην τεχνική της γαλακτωματοποίησης. Η ανάδευση του γαλακτώματος ωστόσο διαρκεί κατά κόρον μία ημέρα, μέχρι τη συμπλοκοποίηση όλης της ελεύθερης ποσότητας του ελαίου, ενώ στην τεχνική για την παρασκευή PLA NPs διαρκούσε μόλις 10 min.
2. Κατά τη συμπλοκοποίηση με την προσθήκη του ελαίου η λευκού χρώματος όψη του προκύπτοντος γαλακτώματος ήταν ίδια για όλα τα αιθέρια έλαια, ενώ στην περίπτωση των πολυμερικών νανοσωματιδίων, η όψη του γαλακτώματος διαμορφωνόταν ανάλογα με το εκάστοτε έλαιο και τον οργανικό διαλύτη αυτού. Γι' αυτό και στην περίπτωση του γκρέιπφρουτ το γαλάκτωμα ήταν ανάλογο με εκείνο του μανταρινιού στον εγκλεισμό μικρής κλίμακας, αφού παρουσιάζουν αρκετά κοινά κύρια συστατικά και ήταν διαλυμένα σε διγλωρομεθάνιο.
3. Ωστόσο, το στάδιο της συμπλοκοποίησης, όπως επίσης και η ξήρανση του ανακτώμενου συμπλόκου απαιτούν υψηλή θερμοκρασία, οδηγώντας σε απώλεια ποσότητας των πτητικών συστατικών του αιθέριου ελαίου λόγω εξάτμισης και σε μείωση της τελικής ποσότητας αυτού σε σχέση με τις αρχικές ποσότητες των αντιδραστηρίων.
4. Το ποσοστό των ξηρών συμπλόκων που ανακτώνται μετά την απομάκρυνση της υγρασίας στην αντλία Edwards είναι αρκετά ικανοποιητικό (της τάξης του 70-75%), εν αντιθέσει με το ποσοστό ανάκτησης μέσω λυοφιλοποίησης των πολυμερικών νανοσωματιδίων. Ωστόσο, και σε αυτήν την περίπτωση όταν έγινε ξήρανση στην Edwards το ποσοστό ανάκτησης ήταν αρκετά υψηλό.
5. Τα ξηρά σύμπλοκα ανακτώνταν σε μορφή σκόνης, ενώ τα πολυμερικά νανοσωματίδια ως ίνες (μέσω Edwards) ή/και κολλοειδείς δομές (μέσω freeze drying).
6. Το μέγεθος των νανοσωματιδιακών συμπλόκων β-CD αιθέριων ελαίων λεμονιού, μανταρινιού και γκρέιπφρουτ είναι μικρότερο σε σχέση με των αντίστοιχων πολυμερικών, λαμβάνοντας επαναλήψιμες τιμές της τάξης των 186-235 nm, γεγονός που πιθανώς αποδίδεται στο κύριο συστατικό των ελαίων, το λιμονένιο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε μελέτη δύο διαφορετικών μεθόδων νανοεγκλεισμού αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών φρούτων (λεμονιού, πορτοκαλιού, μανταρινιού και γκρέιπφρουτ), α) σε σωματίδια βιοδιασπώμενου πολυ(γαλακτικού) οξέος και β) σε μοριακά σύμπλοκα.

Τα αιθέρια έλαια της κατηγορίας αυτής είναι ελαιώδη αρωματικά υγρά και παρουσιάζουν αξιόλογη δράση, συνδυάζοντας ικανότητες όπως αντιοξειδωτικές, εντομοαπωθητικές και αντιϊικές. Σχετικά με τη χημική τους σύσταση, το κύριο συστατικό τους είναι ο μονοτερπενικός υδρογονάνθρακας του λιμονενίου. Επίσης περιέχουν συστατικά όπως το μυρσένιο και τα πινένια.

Πιο αναλυτικά σε σχέση με τον εγκλεισμό τους :

α) Ο εγκλεισμός σε νανοσωματίδια PLA, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση των οργανικών διαλυτών-μέθοδος απλού γαλακτώματος (o/w). Τα πειράματα διεξήχθησαν τόσο σε μικρή όσο και σε μεγάλη κλίμακα. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων (μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς, δυναμικό επιφανείας).

Σε ό,τι αφορά στους εγκλεισμούς μικρής κλίμακας, το μέγεθος των νανοσωματιδίων επηρεάζεται σαφώς από τη χρήση διαφορετικού αιθέριου ελαίου αλλά και από τον εκάστοτε οργανικό διαλύτη της προς εγκλεισμό ουσίας. Το μικρότερο μέσο μέγεθος εμφάνισαν τα νανοσωματίδια με εγκλεισμένη ποσότητα αιθέριου ελαίου λεμονιού (225-289 nm) σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Εν αντιθέσει, το μεγαλύτερο μέγεθος (της τάξης των 405 nm) παρουσίασαν τα νανοσωματίδια στην περίπτωση του γκρέιπφρουτ με διαλύτη το διχλωρομεθάνιο, ενώ σε εκείνη του μανταρινιού χρησιμοποιώντας τον ίδιο οργανικό διαλύτη, προέκυψαν μεγέθη των 250 και 380 nm. Την μεγαλύτερη λοιπόν απελευθέρωση ελαίου αναμένεται να εμφανίζουν τα Lemon-NPs, λόγω του μικρότερου δυνατού μεγέθους.

Στην περίπτωση του λεμονιού πραγματοποιήθηκε και scale-up εγκλεισμός, όπου οι τιμές μεγέθους διατηρήθηκαν στα ίδια χαμηλά επίπεδα (269 nm), σχηματίζοντας ηλεκτρικά πιο σταθεροποιημένες νανοδομές, με σχετικά χαμηλή αν και αυξημένη διασπορά. Συγκριτικά, στον εγκλεισμό μεγάλης κλίμακας του πορτοκαλιού παρήχθη ένα περισσότερο ομοιογενές δείγμα με μεγαλύτερα νανοσωματίδια της τάξης των 350 nm συγκριτικά με του λεμονιού, και με δυναμικό επιφανείας που αποκλείει τυχόν τάσεις αστάθειας. Συμπερασματικά, το scale-up διατήρησε τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων σε επιθυμητές τιμές, μη επηρεαζόμενο από τη χρήση διαφορετικού αιθέριου ελαίου.

Ακόμη μελετήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι ξήρανσης των PLA NPs, η λυοφιλοποίηση (freeze-drying) και η ξήρανση με μία πιο απλή μέθοδο στην αντλία υψηλού κενού Edwards. Κατά τη λυοφιλοποίηση παρατηρήθηκε πως η χρήση σακχαρόζης ως κρυοπροστατευτικού παράγοντα προσέδιδε μία έντονα κολλώδη υφή στα νανοσωματίδια, που μπορεί να οδηγήσει σε αποσταθεροποίηση των νανοδομών. Εν αντιθέσει, η απουσία σακχαρόζης ενίσχυε την εμφάνιση ινώδους υφής. Η ανακτώμενη ωστόσο ποσότητα ξηρών νανοσωματιδίων ήταν σημαντικά μικρότερη από εκείνη που λήφθηκε από την Edwards.

β) Ο σχηματισμός μοριακών συμπλόκων εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων με μόρια β-κυκλοδεξτρίνης μέσω μεθόδου συν-καταβύθισης αποτελεί μία εξίσου ικανοποιητική μέθοδο εγκλεισμού αυτών. Τα νανοσωματίδια που προέκυψαν στην περίπτωση του λεμονιού, του μανταρινιού και του γκρέιπφρουτ είχαν μικρά και παραπλήσια μεγέθη στο εύρος 186 - 235 nm. Ο δείκτης πολυδιασποράς των δειγμάτων έλαβε επαναλήψιμες τιμές (0.3) εξασφαλίζοντας σχετικά καλή ομοιογένεια δειγμάτων, ενώ οι νανοσωματιδιακές δομές με εξαίρεση το γκρέιπφρουτ εξασφάλιζαν ηλεκτρική σταθερότητα. Τέλος, τα σύμπλοκα β-CD - αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού είχαν ανεπιθύμητες τιμές μεγέθους και PDI λόγω μη αποτελεσματικής διασποράς του δείγματος. Το ποσοστό εγκλεισμού στην περίπτωση του ελαίου του λεμονιού έφτασε $\approx 77\%$.

Από τη σύγκριση των δύο μεθόδων προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα :

1)Εν γένει, η μέθοδος της συμπλοκοποίησης και συγκεκριμένα της συν-καταβύθισης πλεονεκτεί έναντι της μεθόδου που εφαρμόστηκε για τον σχηματισμό πολυμερικών νανοσωματιδίων, καθώς περιλαμβάνει ευκολότερα στάδια, ενώ δεν προαπαιτεί τη διάλυση του αιθέριου ελαίου σε κάποιο οργανικό διαλύτη. Η προσθήκη τους μάλιστα στο υδατικό διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης γίνεται στάγδην και όχι με ταχύτητα, όπως στην τεχνική της γαλακτωματοποίησης. Παρά ταύτα, απαιτείται πολύ μεγαλύτερος χρόνος ανάδευσης του γαλακτώματος.

2)Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στο διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης προέκυψε ένα λευκό γαλάκτωμα σε όλες τις περιπτώσεις εγκλεισμού, ανεξάρτητο από τη χρήση διαφορετικού αιθέριου ελαίου κάθε φορά. Αντιθέτως, στην περίπτωση του εγκλεισμού σε PLA η αλλαγή της προς εγκλεισμό ουσίας σε συνδυασμό με τη χρήση διαφορετικού οργανικού διαλύτη οδήγησε σε γαλακτώματα διαφορετικής όψης, με εκείνα των εγκλεισμών μικρής κλίμακας του μανταρινιού και του γκρέιπφρουτ να μοιάζουν αρκετά, λόγω πιθανώς διάλυσής τους στον ίδιο διαλύτη (DCM).

3)Ακόμη, το ποσοστό ανάκτησης των ξηρών συμπλόκων είναι αρκετά υψηλό ($\approx 70-75\%$), ανάλογο της ξήρανσης των PLA NPs στην αντλία Edwards, σε αντίθεση με εκείνο των ξηρών PLA νανοσωματιδίων μέσω λυοφιλοποίησης.

4)Επιπλέον, παρατηρήθηκε διαφορά και ως προς την όψη των ξηρών σωματιδίων σε κάθε μέθοδο, με τα πολυμερικά νανοσωματίδια να έχουν μία ινώδη-κολλώδη υφή, ενώ τα σύμπλοκα μορφή σκόνης.

5)Ωστόσο, το στάδιο της συμπλοκοποίησης, όπως επίσης και η ξήρανση του ανακτώμενου συμπλόκου απαιτούν υψηλή θερμοκρασία, οδηγώντας σε απώλεια ποσότητας των πτητικών συστατικών του αιθέριου ελαίου και σε μείωση της τελικής ποσότητας του συμπλόκου σε σχέση με τις αρχικές ποσότητες των αντιδραστηρίων.

6)Επίσης, τα σύμπλοκα εγκλεισμού στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν ακόμη μικρότερου μεγέθους συγκριτικά με τα πολυμερικά νανοσωματίδια (186-235 nm).

Τέλος, ο εγκλεισμός ποσότητας ελαίου εντός των νανοσωματιδίων PLA επιβεβαιώθηκε μέσω ανάλυσης των ξηρού δείγματος Lemon-NPs-2 με τη μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR. Συγκεκριμένα, στο φάσμα που λήφθηκε, εμφανίστηκαν κυρίως κορυφές οφειλόμενες στο PLA, αλλά και μία χαρακτηριστική κορυφή αποδιδόμενη στα τερπένια των ελαίων.

Αντιστοίχως, απεδείχθη και η συμπλοκοποίηση ποσότητας ελαίου με μόρια β-κυκλοδεξτρίνης.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν ενώσεις με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς συνδυάζουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες και συναντώνται σε ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών, όπως τα φάρμακα, τα τρόφιμα και τα καλλυντικά. Ο νανοεγκλεισμός των ευαίσθητων αυτών ουσιών κυρίως εξασφαλίζει τη σταθερότητά τους, «θωρακίζοντάς» τα απέναντι σε αποσυνθετικούς παράγοντες και περιορίζοντας της τάση τους για εξάτμιση, καθώς επίσης αυξάνει την υδατοδιαλυτότητά τους.

Με πυρήνα την διεξαγωγή πειραμάτων και την εξαγωγή ανάλογων συμπερασμάτων, θεωρείται σκόπιμη η περαιτέρω διερεύνηση και μελέτη των τεχνικών και μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν. Έτσι, παρουσιάζονται οι εξής προτάσεις για το μέλλον :

Σε ό,τι αφορά στον εγκλεισμό σε πολυμερικά νανοσωματίδια :

1. Η μελέτη των παραμέτρων της διεργασίας εγκλεισμού σε νανοσωματίδια, όπως η χρήση πολυ(γαλακτικού) οξέος διαφορετικού μοριακού βάρους, η ενδεχόμενη μείωση του λόγου οργανικής/υδατικής φάσης, η μεταβολή του ποσοστού φόρτωσης και του ρυθμού ανάδευσης κατά τον σχηματισμό του γαλακτώματος.
2. Η χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων αντιδραστηρίων για μεγάλης κλίμακας εγκλεισμούς, ώστε η ανακτώμενη ποσότητα ξηρών NPs μέσω λυοφιλοποίησης να επαρκεί για τον άμεσο προσδιορισμό του ποσοστού εγκλεισμού.
3. Η αλλαγή της μεθόδου παρασκευής PLA NPs με εφαρμογή της σύνθετης κροκίδωσης.
4. Η επιφανειακή τροποποίηση των PLA νανοσωματιδίων με επικάλυψη στρωμάτων άλλων βιοπολυμερών, όπως χιτοζάνης ή πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος και μελέτη της βιολογικής τους δράσης.
5. Η χρήση διαφορετικού βιοπολυμερούς, όπως χιτοζάνης ή συμπολυμερούς γαλακτικού-γλυκολικού οξέος.
6. Ο έμμεσος προσδιορισμός του ποσοστού εγκλεισμού μέσω υγρής και αέριας χρωματογραφίας (Liquid και Gas chromatography).
7. Η μελέτη της βιολογικής δράσης των πολυμερικών νανοσωματιδίων που περιέχουν εγκλεισμένη ποσότητα αιθέρια ελαίων (αντιοξειδωτικής, αντιμυκητιακής, αντικαρκινικής).

Σε ό,τι αφορά στον σχηματισμό μοριακών συμπλόκων εγκλεισμού :

1. Η μελέτη των παραμέτρων της διαδικασίας συμπλοκοποίησης, όπως της μεταβολής της αναλογίας αιθέριου ελαίου/κυκλοδεξτρίνης σε 5:95, 10:90 και 15:85 (w/w).
2. Η χρήση κάποιου παραγώγου κυκλοδεξτρίνης ως παράγοντα συμπλοκοποίησης (όπως μεθυλιωμένης, ακετυλιωμένης ή υδροξυπροπυλιωμένης κυκλοδεξτρίνης).
3. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης της προς εγκλεισμό ουσίας και της κυκλοδεξτρίνης, όπως επίσης και του σχηματισμού συμπλόκων μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), Φασματοσκοπίας απορρόφησης Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis), Φασματοσκοπία Μάζας (MS) και Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) ή Κρυσταλλογραφία Ακτίνων Χ. Η κρυσταλλογραφία Ακτίνων Χ δίνει πληροφορίες για τη δομή του συμπλόκου, όπως και την επαναλαμβανόμενη διάταξη των μορίων μέσα στον κρύσταλλο.

4. Η μελέτη των συμπλόκων εγκλεισμού β-κυκλοδεξτρίνης-αιθέριων ελαίων ως προς την ενδιαφέρουσα εντομοαπωθητική τους δράση ενάντια στα κουνούπια, μέσω ενσωμάτωσής τους σε κατάλληλα αντικουνουπικά προϊόντα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249.
- [2] Carson, C. F., & Hammer, K. A. (2011). Chemistry and bioactivity of essential oils. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*, 203-238.
- [3] Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- [4] Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2009). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press.
- [5] Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213-226.
- [6] Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29-35.
- [7] El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., ... & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1), 220-243.
- [8] Burfield, T., & Reekie, S. L. (2005). Mosquitoes, malaria and essential oils. *International Journal of Aromatherapy*, 15(1), 30-41.
- [9] Do, T. K. T., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S., & Fernandez, X. (2015). Authenticity of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, 146-157.
- [10] Hafeez, F., Akram, W., & Shaalan, E. A. S. (2011). Mosquito larvicidal activity of citrus limonoids against *Aedes albopictus*. *Parasitology research*, 109(1), 221-229.
- [11] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- [12] Gonçalves, D., Teschke, M. E., Koshima, C. C., Gonçalves, C. B., Oliveira, A. L., & Rodrigues, C. E. (2015). Fractionation of orange essential oil using liquid–liquid extraction: Equilibrium data for model and real systems at 298.2 K. *Fluid Phase Equilibria*, 399, 87-97.
- [13] Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- [14] Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., & Reglero, G. (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1250, 34-48.
- [15] Breitmaier, E. (2006). *Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*. John Wiley & Sons.

- [16] De Sousa, D. P. (2011). Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*, 16(3), 2233-2252.
- [17] Berger, R. G. (Ed.). (2007). *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer Science & Business Media.
- [18] Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833-839.
- [19] Li, H., Chen, C., & Cao, X. (2015). Essential oils-oriented chiral esters as potential pesticides: Asymmetric syntheses, characterization and bio-evaluation. *Industrial Crops and Products*, 76, 432-436.
- [20] Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2014). Essential Oils: From Conventional to Green Extraction. In *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry* (pp. 9-20). Springer International Publishing.
- [21] Moslavac, T., Jokić, S., Šubarić, D., Aladić, K., Vukoja, J., & Prce, N. (2014). Pressing and supercritical CO₂ extraction of *Camelina sativa* oil. *Industrial Crops and Products*, 54, 122-129., 122
- [22] Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of food Engineering*, 90(3), 409-413.
- [23] Arranz, E., Jaime, L., de las Hazas, M. L., Reglero, G., & Santoyo, S. (2015). Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. *Industrial Crops and Products*, 67, 121-129.
- [24] Capuzzo, A., Maffei, M. E., & Occhipinti, A. (2013). Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Molecules*, 18(6), 7194-7238.
- [25] Campêlo, L. M. L., de Almeida, A. A. C., de Freitas, R. L. M., Cerqueira, G. S., de Sousa, G. F., Saldanha, G. B., ... & de Freitas, R. M. (2011). Antioxidant and antinociceptive effects of Citrus limon essential oil in mice. *BioMed Research International*, 2011.
- [26] <http://www.britannica.com/plant/mandarin-orange> (Λήφθηκε την 13/09/2015)
- [27] Mandalari, G., Bennett, R. N., Bisignano, G., Saija, A., Dugo, G., Lo Curto, R. B., ... & Waldron, K. W. (2006). Characterization of flavonoids and pectins from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a major byproduct of essential oil extraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1), 197-203.
- [28] Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in food science & technology*, 19(3), 156-164
- [29] González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 327-345.

- [30] Ruiz, B., & Flotats, X. (2014). Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. *Waste Management*, 34(11), 2063-2079.
- [31] Chanthaphon, S., Chanthachum, S., & Hongpattarakere, T. (2008). Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1), 125-131.
- [32] Sawamura, M. (Ed.). (2011). *Citrus essential oils: flavor and fragrance*. John Wiley & Sons.
- [33] Mohamed, A. A., El-Emary, G. A., & Ali, H. F. (2010). Influence of some citrus essential oils on cell viability, glutathione-S-transferase and lipid peroxidation in Ehrlich ascites carcinoma cells. *J Am Sci*, 6(10), 820-826.
- [34] Belletti, N., Ndagijimana, M., Sisto, C., Guerzoni, M. E., Lanciotti, R., & Gardini, F. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(23), 6932-6938.
- [35] Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food control*, 22(6), 896-902.
- [36] Chanthaphon, S., Chanthachum, S., & Hongpattarakere, T. (2008). Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1), 125-131.
- [37] Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food control*, 19(12), 1130-1138.
- [38] Ibrahim, M. A., Kainulainen, P., & Aflatuni, A. (2001). Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and Food Science*, 10(3), 243-259.
- [39] Murugan, K., Kumar, P. M., Kovendan, K., Amerasan, D., Subrmaniam, J., & Hwang, J. S. (2012). Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology research*, 111(4), 1757-1769.
- [40] Din, S., Akram, W., Khan, H. A. A., Hussain, A., & Hafeez, F. (2011). Citrus waste-derived essential oils: Alternative larvicides for dengue fever mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse)(Culicidae: Diptera). *Pak J Zool*, 43(2), 367-372.
- [41] Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K., & Therios, I. (2013). Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*, 18(9), 10639-10647.
- [42] Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.

- [43] Baylac, S., & Racine, P. (2003). Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy*, 13(2), 138-142.
- [44] Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine*, 16(2), 79-90.
- [45] Sherry, M., Charcosset, C., Fessi, H., & Greige-Gerges, H. (2013). Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *Journal of liposome research*, 23(4), 268-275.
- [46] Avérous, L. (2008). *Polylactic acid: synthesis, properties and applications*(pp. 433-450). Elsevier: Oxford, UK.
- [47] Ingrao, C., Tricase, C., Cholewa-Wójcik, A., Kawecka, A., Rana, R., & Siracusa, V. (2015). Polylactic acid trays for fresh-food packaging: A Carbon Footprint assessment. *Science of The Total Environment*, 537, 385-398.
- [48] Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829.
- [49] Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release*, 70(1), 1-20.
- [50] Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 26(5), 1025-1058.
- [51] Lv, Y., Yang, F., Li, X., Zhang, X., & Abbas, S. (2014). Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, 35, 305-314.
- [52] Martín, Á., Varona, S., Navarrete, A., & Cocero, M. J. (2010). Encapsulation and coprecipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *Open Chemical Engineering Journal*, 4(1), 31-41.
- [53] de Oliveira, E. F., Paula, H. C., & de Paula, R. C. (2014). Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 146-151.
- [54] Zhang, J. Q., Wu, D., Jiang, K. M., Zhang, D., Zheng, X., Wan, C. P., ... & Lin, J. (2015). Preparation, spectroscopy and molecular modelling studies of the inclusion complex of cordycepin with cyclodextrins. *Carbohydrate research*, 406, 55-64
- [55] Marques, H. M. C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313-326.
- [56] JS, P., Kadam, D. V., Marapur, S. C., & Kamalapur, M. V. INCLUSION COMPLEX SYSTEM; A NOVEL TECHNIQUE TO IMPROVE THE SOLUBILITY AND BIOAVAILABILITY OF POORLY SOLUBLE DRUGS: A REVIEW.
- [57] Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, 39(9), 1033-1046.

- [58] Szejtli, J. (2004). Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry*, 76(10), 1825-1845.
- [59] Kurkov, S. V., & Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins. *International journal of pharmaceuticals*, 453(1), 167-180.
- [60] Dodziuk, H. (Ed.). (2006). *Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications*. John Wiley & Sons.
- [61] Voncina, B., & Vivod, V. (2013). *Cyclodextrins in textile finishing*. INTECH Open Access Publisher.
- [62] Costa, P., Medronho, B., Gonçalves, S., & Romano, A. (2015). Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three Lamiaceae species. *Industrial Crops and Products*, 70, 341-346.
- [63] Lawtrakul, L., Inthajak, K., & Toochinda, P. (2014). Molecular calculations on β -cyclodextrin inclusion complexes with five essential oil compounds from *Ocimum basilicum* (sweet basil). *SCIENCEASIA*, 40(2), 145-151.
- [64] Harata, K. (1998). Structural aspects of stereodifferentiation in the solid state. *Chemical reviews*, 98(5), 1803-1828.
- [65] Salústio, P. J., Pontes, P., Conduto, C., Sanches, I., Carvalho, C., Arrais, J., & Marques, H. M. C. (2011). Advanced technologies for oral controlled release: cyclodextrins for oral controlled release. *AAPS PharmSciTech*, 12(4), 1276-1292.
- [66] Saravana, K. K., Sushma, M., & Prasanna, R. Y. (2013). Dissolution Enhancement of Poorly Soluble Drugs by Using Complexation Technique—A Review. *J Pharm Sci Res*, 5(5), 120-124.
- [67] Rawat, S., & Jain, S. K. (2004). Solubility enhancement of celecoxib using β -cyclodextrin inclusion complexes. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*, 57(2), 263-267.
- [68] Singh, M., Sharma, R., & Banerjee, U. C. (2002). Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology advances*, 20(5), 341-359.
- [69] Petrović, G., Stojanović, G., & Radulović, N. (2010). Encapsulation of cinnamon oil in β -cyclodextrin. *J. Med. Plants Res*, 4(14), 1382-1390.
- [70] Rafati, A. A., Hamnabard, N., Ghasemian, E., & Nojini, Z. B. (2009). Study of inclusion complex formation between chlorpromazine hydrochloride, as an antiemetic drug, and β -cyclodextrin, using conductometric technique. *Materials Science and Engineering: C*, 29(3), 791-795.
- [71] Miranda, J. C. D., Martins, T. E. A., Veiga, F., & Ferraz, H. G. (2011). Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(4), 665-681.

- [72] Haiyun, D., Jianbin, C., Guomei, Z., Shaomin, S., & Jinhao, P. (2003). Preparation and spectral investigation on inclusion complex of β -cyclodextrin with rutin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59(14), 3421-3429.
- [73] Hadžiabdić, J., Elezović, A., Rahić, O., & Mujezin, I. (2012). Effect of cyclodextrin complexation on the aqueous solubility of diazepam and nitrazepam: phase-solubility analysis, thermodynamic properties. *American Journal of Analytical Chemistry*, 3(12), 811-819
- [74] Shimpi, S., Chauhan, B., & Shimpi, P. (2005). Cyclodextrins: application in different routes of drug administration. *Acta pharmaceutica*, 55(2), 139-156.
- [75] Rudrangi, S. R. S., Bhomia, R., Trivedi, V., Vine, G. J., Mitchell, J. C., Alexander, B. D., & Wicks, S. R. (2015). Influence of the preparation method on the physicochemical properties of indomethacin and methyl- β -cyclodextrin complexes. *International journal of pharmaceutics*, 479(2), 381-390.
- [76] Buschmann, H. J., & Schollmeyer, E. (2002). Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *Journal of cosmetic science*, 53(3), 185-192.
- [77] Katageri, A. R., & Sheikh, M. A. (2012). Cyclodextrin a gift to pharmaceutical world review. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(1), 52-56.
- [78] Yáñez, C., Cañete-Rosales, P., Castillo, J. P., Catalán, N., Undabeytia, T., & Morillo, E. (2012). Cyclodextrin inclusion complex to improve physicochemical properties of herbicide bentazon: exploring better formulations. *PloS one*, 7(8), e41072.
- [79] Tao, F., Hill, L. E., Peng, Y., & Gomes, C. L. (2014). Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 247-255.
- [80] Baharum, S. N., Bunawan, H., Ghani, M. A. A., Mustapha, W. A. W., & Noor, N. M. (2010). Analysis of the chemical composition of the essential oil of *Polygonum minus* Huds. using two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF MS). *Molecules*, 15(10), 7006-7015.
- [81] Zhao, C. X., Liang, Y. Z., Fang, H. Z., & Li, X. N. (2005). Temperature-programmed retention indices for gas chromatography–mass spectroscopy analysis of plant essential oils. *Journal of Chromatography A*, 1096(1), 76-85.
- [82] Zhao, C. X., Li, X. N., Liang, Y. Z., Fang, H. Z., Huang, L. F., & Guo, F. Q. (2006). Comparative analysis of chemical components of essential oils from different samples of *Rhododendron* with the help of chemometrics methods. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 82(1), 218-228.
- [83] <http://www.britannica.com/science/retention-time> (Λήφθηκε στις 17/09/2015)
- [84] São Pedro, A., Santo, I., Silva, C., Detoni, C., & Albuquerque, E. (2013). The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them (Méndez-Vilas, A., ed.) Formatex Research Center Publisher*, 2, 1364-1374.

- [85] Bei, D., Meng, J., & Youan, B. B. C. (2010). Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises. *Nanomedicine*, 5(9), 1385-1399.
- [86] Wu, L., Zhang, J., & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 63(6), 456-469.
- [87] Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 1-9.
- [88] www.nanocomposix.com (Λήφθηκε την 18/09/2015)
- [89] Hanaor, D., Michelazzi, M., Leonelli, C., & Sorrell, C. C. (2012). The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. *Journal of the European Ceramic Society*, 32(1), 235-244.
- [90] Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced drug delivery reviews*, 58(15), 1688-1713.
- [91] Μ. Όξενκιουν-Πετροπούλου, Α. Παππά. “Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης Εργαστηριακές Ασκήσεις”, 2009, 3η έκδοση, εκδόσεις ΕΜΠ
- [92] Α. Παππά, “Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης”, 2004, εκδόσεις ΕΜΠ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

EO : αιθέριο έλαιο

CEO : αιθέριο έλαιο εσπεριδοειδών φρούτων

PLA : πολυ(γαλακτικό) οξύ

PVA : πολυ(βινυλική) αλκοόλη

PLGA : πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ

PCL: πολυ(ε-καπρολακτόνη)

DLS : Δυναμική Σκέδαση Φωτός

UV-Vis: Φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού

NPs : νανοσωματίδια

CD : κυκλοδεξτρίνη

CyD : κυκλοδεξτρίνη

β-CD : β-κυκλοδεξτρίνη

EtOAc : οξικός αιθυλεστέρας

DCM : διχλωρομεθάνιο

DMSO : διμέθυλο-σουλφοξείδιο

NMR : Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

MS : Φασματοσκοπία Μάζας

DSC : Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης

ROS : Δραστικές μορφές οξυγόνου

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 : Τα κυριότερα χημικά συστατικά των αιθέριων ελαίων.....	11
Εικόνα 2 : Χημική δομή μονάδας ισοπρενίου (C_5H_8).....	11
Εικόνα 3 : Τρεις τρόποι συνένωσης μονάδων ισοπρενίου : (1) Κεφαλή-Ουρά (δεξιά), (2) Κεφαλή-Κεφαλή (μέση) και (3) Κεφαλή-Μέση (δεξιά).....	12
Εικόνα 4 : Χημική δομή λιμονενίου, p-κουμενίου, καρβακρόλης, θυμόλης και σαβινενίου αντιστοίχως.....	13
Εικόνα 5 : Χημική δομή α- και β- πινενίου.....	13
Εικόνα 6 : Χημική δομή β-μυρσενίου, κιτράλης, γερανιόλης σιτρονελλόλης και λιναλοόλης αντιστοίχως.....	13
Εικόνα 7 : Χημική δομή β-καρυοφυλλενίου, τριών παραγώγων αυτού και χουμουλενίου αντιστοίχως.....	14
Εικόνα 8 : Χημική δομή φαρνεζόλης.....	14
Εικόνα 9 : Χημική δομή καμφορενίου.....	15
Εικόνα 10 : Χημική δομή trans-φυτόλης, cis-φυτόλης και γερανυλοσιτρονελλόλης αντιστοίχως.....	15
Εικόνα 11 : Χημική δομή της ανηθόλης, εστραγόλης, ευγενόλης, κινναμωμικής αλδεΐδης και βανιλίνης αντιστοίχως.....	16
Εικόνα 12 : Χημική δομή αλλικίνης.....	16
Εικόνα 13 : Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου υδροαπόσταξης.....	17
Εικόνα 14 : Μέθοδος ψυχρής έκθλιψης αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών.....	18
Εικόνα 15 : Διάταξη SFE για την εκχύλιση φυτών. P1: αντλία CO ₂ , P2: αντλία συνδιαλύτη. HE1, HE2, HE3: εναλλάκτες θερμότητας, EV: δοχείο εκχύλισης; S1, S2: διαχωριστές, V, V1, V2: βαλβίδες ρύθμισης πίεσης, ST: CO ₂ : δοχείο αποθήκευσης CO ₂ , F: φίλτρο.....	19
Εικόνα 16 : Μέθοδοι εκχύλισης αιθέριων ελαίων.....	19
Εικόνα 17 : Δομή εσπεριδοειδούς φρούτου.....	20
Εικόνα 18 : Σχηματική αναπαράσταση των νανοσυστημάτων στην περίπτωση των αιθέριων ελαίων.....	25
Εικόνα 19 : Κύκλος ζωής πολυ(γαλακτικού) οξέος.....	26
Εικόνα 20 : Εγκλεισμός με την μέθοδο της Νανοκαταβύθισης.....	27
Εικόνα 21 : Εγκλεισμός με την μέθοδο Γαλακτωματοποίησης-Εξάτμισης διαλύτη.....	28

Εικόνα 22 : Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής Ξήρανσης με Ψεκάσμο.....	30
Εικόνα 23 : Χημική δομή μονάδας γλυκοπυρανόζης σε μορφή ανακλίντρου.....	31
Εικόνα 24 : Σχηματική αναπαράσταση της γλυκοζιτικής μονάδας (πάνω), της χημικής δομής (κάτω αριστερά) και της δομής κόλουρου κωνου των κυκλοδεξτρινών (κάτω δεξιά).....	32
Εικόνα 25 : Σχηματική αναπαράσταση τριών κύριων κυκλοδεξτρινών.....	32
Εικόνα 26 : Οι κατά προσέγγιση γεωμετρικές διαστάσεις των a) α-, b) β-, c) γ-CD.....	33
Εικόνα 27 : Σχηματισμός συμπλόκου εγκλεισμού.....	34
Εικόνα 28 : Σχηματική αναπαράσταση της υπερκρίσιμης διεργασίας με χρήση CO ₂ μέσω εξοπλισμού εκχύλισης.....	40
Εικόνα 29 : Φαρμακευτικές εφαρμογές κυκλοδεξτρινών.....	42
Εικόνα 30 : Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP, για τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)	49
Εικόνα 31 : Φασματοφωτόμετρο UV-Vis Cary 1 της εταιρίας Varian.....	51
Εικόνα 32 : Σχηματισμός γαλακτώματος κατά την έγχυση της οργανικής στην υδατική φάση στο δείγμα Lemon-NPs-3 (αριστερά) και στο δείγμα Lemon-NPs-4 (δεξιά)	63
Εικόνα 33 : Σχηματισμός γαλακτώματος κατά την έγχυση της οργανικής στην υδατική φάση στο δείγμα Mandarin-NPs-1 (αριστερά) και Mandarin-NPs-2 (δεξιά)	63
Εικόνα 34 : Γαλάκτωμα κατά την εξάτμιση του DCM (αριστερά) και καταβυθισμένα νανοσωματίδια μετά την 1η φυγόκεντρο (δεξιά) στο δείγμα Mandarin-NPs-3.....	64
Εικόνα 35 : Σχηματισμός γαλακτώματος κατά την έγχυση της οργανικής στην υδατική φάση στο δείγμα Orange-NPs-1.....	64
Εικόνα 36 : Σχηματισμός γαλακτώματος κατά την έγχυση της οργανικής στην υδατική φάση στο δείγμα Grapefruit-NPs-1.....	65
Εικόνα 37 : Σχηματική αναπαράσταση των πολυμερικών νανόσφαιρων (αριστερά) και των πολυμερικών νανοκαψουλών (δεξιά) με εγκλεισμένη ποσότητα αιθέριου ελαίου.....	65
Εικόνα 38 : Ηλεκτρική διπλή στοιβάδα που περιβάλλει το νανοσωματίδιο.....	66
Εικόνα 39 : Λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια Lemon-NPs-4 (αριστερά), Lemon-NPs-1 (κεντρικά) και Mandarin-NPs-1 (δεξιά)	75
Εικόνα 40 : Φάσμα FT-IR "κενών" PLA νανοσωματιδίων.....	77
Εικόνα 41 : Φάσμα FT-IR Lemon-NPs-2.....	78
Εικόνα 42 : Σχηματισμός διφασικού διαλύματος μετά την προσθήκη αιθέριου ελαίου grapefruit στο θερμό διάλυμα β-CD.....	84
Εικόνα 43 : Σύμπλοκο β-CD - αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού μετά την διήθηση.....	85

Εικόνα 44 :	Ανάκτηση συμπλόκων β-CD-αιθέριων ελαίων μετά την ξήρανση.....	85
Εικόνα 45 :	Φάσμα απορρόφησης αιθέριου ελαίου λεμονιού.....	86
Εικόνα 46 :	Φάσμα απορροφήσεων πρότυπων διαλυμάτων αιθέριου ελαίου λεμονιού.....	87
Εικόνα 52 :	Φάσματα απορροφήσεων διαλυμάτων συμπλόκων β-CD-lemon σε δις-απιονισμένο νερό – ακετονιτρίλιο (μπλε : αραιωμένου 1:4, μωβ : αραιωμένου 1:2 και κόκκινο : πυκνού-αρχικού)	88
Εικόνα 48 :	Φάσμα FT-IR συμπλόκων β-CD-lemon.....	89
Εικόνα 49 :	Φάσμα FT-IR συμπλόκων β-CD-grapefruit.....	90
Εικόνα 50 :	Φάσμα FT-IR συμπλόκων β-CD-mandarin.....	91
Εικόνα 51 :	Φάσμα FT-IR συμπλόκων β-CD-orange.....	92

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 : Συγκριτικός πίνακας α-, β- και γ- κυκλοδεξτρινών.....	34
Πίνακας 2 : Οργανικός διαλύτης κατά περίπτωση αιθέριου ελαίου.....	46
Πίνακας 3 : Χρόνος ανάδευσης και ψύξης για τον σχηματισμό συμπλόκων β-CD με αιθέρια έλαια	55
Πίνακας 4 : Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών.....	58
Πίνακας 5 : Ονοματολογία δειγμάτων αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών.....	59
Πίνακας 6 : Ακριβείς ποσότητες και πειραματικές συνθήκες εγκλεισμών μικρής και μεγάλης κλίμακας αιθέριου ελαίου λεμονιού.....	61
Πίνακας 7 : Ακριβείς ποσότητες και πειραματικές συνθήκες εγκλεισμών αιθέριου ελαίου μανταρινιού.....	61
Πίνακας 8 : Ακριβείς ποσότητες και πειραματικές συνθήκες εγκλεισμών αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού.....	62
Πίνακας 9 : Ακριβείς ποσότητες και πειραματικές συνθήκες εγκλεισμών αιθέριου ελαίου γκρέιπφρουτ.....	69
Πίνακας 10 : Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο λεμονιού.	67
Πίνακας 11 : Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο μανταρινιού.	70
Πίνακας 12 : Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού.....	71
Πίνακας 13 : Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο γκρέιπφρουτ.	72
Πίνακας 20 : Ποσότητες πριν και μετά τη λυοφιλοποίηση των διαφόρων δειγμάτων.....	74
Πίνακας 15 : Συνθήκες ξήρανσης στην αντλία υψηλού κενού Edwards.....	75
Πίνακας 16 : Ποσότητες και πειραματικές συνθήκες ξήρανσης στην αντλία υψηλού κενού Edwards.....	76
Πίνακας 17 : Χαρακτηριστικά νανοσωματιδίων συμπλόκων β-CD-αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών.....	79
Πίνακας 18 : Ανάκτηση συμπλόκου από τα συστήματα β-CD-αιθέριων ελαίων.....	83
Πίνακας 19 : Τιμές απορροφήσεων πέντε πρότυπων διαλυμάτων για την διαμόρφωση της καμπύλης αναφοράς.....	86

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1 : Κατανομή μεγέθους του φιλτραρισμένου δείγματος Lemon-NPs-4.....	68
Διάγραμμα 2 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας του φιλτραρισμένου δείγματος Lemon-NPs-4.....	69
Διάγραμμα 3 : Κατανομή μεγέθους αφιльтράριστου δείγματος Lemon-NPs-4.....	69
Διάγραμμα 4 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας αφιльтράριστου δείγματος Lemon-NPs-4..	70
Διάγραμμα 5 : Κατανομή μεγέθους του δείγματος Orange-NPs-1.....	71
Διάγραμμα 6 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας του δείγματος Orange-NPs-1.....	72
Διάγραμμα 7 : Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων συμπλόκων β-CD-lemon.....	80
Διάγραμμα 8 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας νανοσωματιδίων συμπλόκων β-D-lemon..	81
Διάγραμμα 9 : Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων συμπλόκων β-CD-tangerine.....	81
Διάγραμμα 10 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας νανοσωματιδίων συμπλόκων β-D-tangerine.....	81
Διάγραμμα 11 : Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων συμπλόκων β-CD-grapefruit.....	82
Διάγραμμα 12 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας νανοσωματιδίων συμπλόκων β-D-grapefruit.....	82
Διάγραμμα 13 : Κατανομή μεγέθους συμπλόκων β-CD-orange.....	82
Διάγραμμα 14 : Κατανομή δυναμικού επιφανείας συμπλόκων β-CD-range.....	83
Διάγραμμα 15 : Καμπύλη αναφοράς του αιθέριου ελαίου του λεμονιού στα 252 nm.....	87