



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ (Ι) – ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Εγκλεισμός εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και χυμού ροδιού σε β-
κυκλοδεξτρίνη για εφαρμογή σε καλλυντικό σκεύασμα

Κυριακή Τζόκα

Επιβλέπουσα

Αναστασία Δέτση

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

ΑΘΗΝΑ 2018

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ε.Μ.Π κας Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα Αναστασία Δέτση, για την εμπιστοσύνη, τον χρόνο που αφιέρωσε, τη διαρκή καθοδήγηση της, τις συμβουλές της και την βοήθεια που μου προσέφερε ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς η διπλωματική μου εργασία.

Επίσης, ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Νεφέλη Ποντίλλο, για τη διαρκή βοήθειά της και τις συμβουλές της, καθώς επίσης και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία στα πλαίσια ενός φιλικού περιβάλλοντος.

Ευχαριστώ, επίσης, την Επίκουρη Καθηγήτρια Ε.Μ.Π κα Σταματίνα Βουγιούκα και την Καθηγήτρια κα Βάσω Ωραιοπούλου για την συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα και την οικογένειά μου, η οποία στήριξε την προσπάθειά μου και τις επιλογές μου σε όλη τη διάρκεια της πενταετούς φοίτησής μου, έχοντας καθοριστική συμβολή στην επίτευξη των στόχων μου.

Κυριακή Τζόκα

Αθήνα 2018

Περίληψη

Το ρόδι (*Punica granatum* L.), ο χυμός και τα εκχυλίσματά του χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα κυρίως για διατροφικούς σκοπούς αλλά και για θεραπευτικές εφαρμογές λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους. Ωστόσο, τα ευεργετικά συστατικά των εκχυλισμάτων και του χυμού ροδιού επηρεάζονται αρνητικά από περιβαλλοντικούς παράγοντες λόγω της έκθεσής τους στο φως, το οξυγόνο και τη θερμότητα. Για την αποφυγή αυτών των ανεπιθύμητων επιπτώσεων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η διεργασία του εγκλεισμού για την προστασία και ενίσχυση της διάρκειας ισχύος των ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων και του χυμού και την ελεγχόμενη αποδέσμευση των επιθυμητών συστατικών.

Προς την κατεύθυνση αυτή, ως ένας συχνά χρησιμοποιούμενος φορέας εγκλεισμών επιλέγεται η β-κυκλοδεξτρίνη. Πρόκειται για έναν μη τοξικό, κυκλικό ολιγοσακχαρίτη, αποτελούμενο από μια υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και μια υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα. Κατ' αυτό τον τρόπο, ο συγκεκριμένος φορέας μπορεί να φιλοξενεί στο εσωτερικό του μη υδατοδιαλυτά μόρια, σχηματίζοντας, ωστόσο, υδατοδιαλυτά σύμπλοκα εγκλεισμού.

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι ο εγκλεισμός του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και του χυμού ροδιού σε β-κυκλοδεξτρίνη, μέσω σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού με τη μέθοδο συγκαταβύθισης (CM) και τη μέθοδο λυοφιλοποίησης (FD). Τα αποτελέσματα των προκύπτων δειγμάτων συγκρίνονται μεταξύ τους με γνώμονα τις τροποποιήσεις που εφαρμόστηκαν σε παραμέτρους και συνθήκες. Επίσης, διεξάγεται περαιτέρω μελέτη και ανάλυση επιλεγμένων δειγμάτων.

Η απόδοση διεργασίας είναι σε κάθε περίπτωση υψηλότερη για τα δείγματα της μεθόδου λυοφιλοποίησης φτάνοντας το 95%, ενώ της μεθόδου συγκαταβύθισης προσεγγίζει το 44%. Χρήσει της φασματομετρίας UV-Vis βρέθηκε ότι οι αποδόσεις εγκλεισμού και τα ποσοστά επιφανειακής πρόσδεσης είναι πολύ χαμηλά, της τάξης του 1,7%-3,8% και 1,1%-1,4%, αντίστοιχα, για τα δείγματα εγκλεισμού με εκχύλισμα φλούδας ροδιού, με τη μέθοδο συγκαταβύθισης. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τη μέθοδο λυοφιλοποίησης είναι περίπου 100% για την απόδοση εγκλεισμού και 80,4%-100% για τα ποσοστά επιφανειακής πρόσδεσης. Για τους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού, οι αποδόσεις εγκλεισμού της μεθόδου συγκαταβύθισης ανήκουν στο διάστημα 7,0%-22,2% ενώ της μεθόδου λυοφιλοποίησης είναι περίπου 16% και, τέλος, ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης κατάφερε να προσδιοριστεί μόνο για το δείγμα της μεθόδου λυοφιλοποίησης, γύρω στο 16%.

Τα μεγέθη των σχηματιζόμενων συμπλόκων που μετρώνται με την τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), είναι σχετικά μεγάλα, 600,4-938,9 nm για τους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού και 738,9-1254 nm για τους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού. Ο δείκτης πολυδιασποράς λαμβάνει υψηλές τιμές, δηλαδή 0,588-0,693 για τους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού και 0,524-0,865 για τους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού, αντίστοιχα, λόγω ευρείας κατανομής μεγέθους. Το ζ-δυναμικό παίρνει αρνητικές τιμές, δηλαδή -15,2 mV μέχρι -30,6 mV για τους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού, -7,69 mV μέχρι -27,8 mV για τους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού και για τις πιο ισχυρά αρνητικές τιμές οι διασπορές των συμπλόκων θεωρούνται σταθερές.

Επιπλέον, ο σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού επιλεγμένων δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές φασματομετρίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), τη θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA), τη διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) και τη φασματοσκοπία πυρηνικού

μαγνητικού συντονισμού (NMR). Ακόμη, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις φαινολικών, φλαβονοειδών, συμπυκνωμένων τανινών, καθώς και η αντιοξειδωτική δράση επιλεγμένων δειγμάτων. Μελετήθηκε, επίσης, η απελευθέρωση σε δύο από τα καλύτερα δείγματα εγκλεισμών και προκύπτει σταθερό προφίλ απελευθέρωσης για το δείγμα από εκχύλισμα φλούδας ροδιού με ποσοστό απελευθέρωσης γύρω στο 82% και μεταβαλλόμενο προφίλ απελευθέρωσης για το δείγμα από χυμό ροδιού με μέγιστο ποσοστό απελευθέρωσης 26% που σταθεροποιείται στο 2%.

Τέλος, το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, ο χυμός ροδιού και δύο δείγματα εγκλεισμών ενσωματώθηκαν σε δείγματα βάσης καλλυντικής κρέμας που παρασκευάστηκε στο τμήμα R&D, της εταιρείας KORRES A.E. και υποβλήθηκαν σε έλεγχο σταθερότητας διάρκειας ενός μήνα. Διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα με μη εγκλεισμένο το εκχύλισμα και τον χυμό παρουσίασαν αλλοιώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενώ τα δείγματα κρέμας με εγκλεισμένο τον χυμό ροδιού δεν παρουσίασαν καμία αλλοίωση.

Λέξεις- Κλειδιά: εγκλεισμός, β-κυκλοδεξτρίνη, εκχύλισμα φλούδας ροδιού, χυμός ροδιού, σύμπλοκα εγκλεισμού, συγκαταβύθιση, λυοφιλοποίηση

Abstract

Pomegranate (*Punica granatum L.*) and its extracts and juice have been used since ancient years for nutritional purposes as well as for therapeutic applications due to their antioxidant and antimicrobial properties. However, the beneficial ingredients of pomegranate extracts and pomegranate juice are negatively affected by environmental factors due to their exposure to light, oxygen and heat. To avoid these undesirable effects, the encapsulation process is used for the protection and enhancement of the extracts' and juice's properties and the controlled release of the desired ingredients.

In this regard, β -cyclodextrin is chosen as the most commonly used carrier for encapsulation. It is a non-toxic, cyclic oligosaccharide, consisting of a hydrophilic outer surface and a hydrophobic internal cavity. In this way, this carrier can host lipophilic molecules internally, forming water-soluble inclusion complexes.

The purpose of this diploma thesis is to encapsulate the pomegranate peel extract and the pomegranate juice in β -cyclodextrin through the formation of inclusion complexes. The co-precipitation method (CM) and the freeze-drying method (FD) are used to create the inclusion complexes. The results of the formed samples are compared with each other, based on the modifications applied to parameters and conditions. Also, further study and analysis of selected samples is carried out.

The process yield is higher for samples formed by freeze-drying method reaching 95%, while process yield approaches 44% by co-precipitation method. Using UV-Vis spectrometry, it was found that the encapsulation efficiency and the percentage of surface efficiency are very low, 1,7%-3,8% and 1,1%-1,4%, respectively, for the inclusion complexes with pomegranate peel extract and co-precipitation method. The results for the freeze-drying method are about 100% for the encapsulation efficiency and 80,4% - 100% for the percentage of surface efficiency. For the inclusion complexes with pomegranate juice and co-precipitation method, the encapsulation efficiency is in the range of 7,0%-22,2% while with freeze-drying method is about 16%. Percentage of surface efficiency, about 16%, has been determined only for the sample by freeze-drying method.

The particle sizes, measured by the DLS method, are relatively large, 600,4-938,9 nm for the inclusion complexes with pomegranate peel extract and 738,9-1254 nm for the inclusion complexes with pomegranate juice. The polydispersity index is high, i.e. 0,588-0,693 for the inclusion complexes with pomegranate peel extract and 0,524-0,865 for the inclusion complexes with pomegranate juice, due to wide size distribution. The ζ -potential values are negative, -15,2 mV to -30,6 mV for the inclusion complexes with pomegranate peel extract, -7,69 mV to -27,8 mV for the inclusion complexes with pomegranate juice and complexes in dispersion are considered stable, for the strongly negative values.

In addition, inclusion complexes formation of selected samples was confirmed by infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC) and nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR). Furthermore, the concentration of phenolic compounds, flavonoids, condensed tannins, as well as the antioxidant activity of selected samples were determined. The release of two of the best encapsulations was, also, studied and the results are a stable release profile for the pomegranate peel extract encapsulation sample with a release rate close to 82% and a varying release profile for the pomegranate juice encapsulation sample with a maximum release rate of approximately 26% which is stabilized at 2%.

Finally, pomegranate peel extract, pomegranate juice and two encapsulation samples were incorporated in samples of cosmetic cream base, which were prepared in the R&D department of KORRES S.A. and were subjected to one-month stability test. It was indicated that the samples with the extract and the juice showed alterations in the organoleptic characteristics whereas no alteration was found for the samples with encapsulated juice.

Keywords: encapsulation, β -cyclodextrin, pomegranate peel extract, pomegranate juice, inclusion complexes, co-precipitation, freeze-drying

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	3
Abstract.....	5
Ευρετήριο Συμβολισμών.....	12
Κατάλογος Εικόνων.....	13
Κατάλογος Πινάκων.....	15
Κατάλογος Διαγραμμάτων.....	17
1. Ρόδι.....	19
1.1. Γενικά Στοιχεία.....	19
1.2. Χημική Σύσταση Ροδιών.....	19
1.3. Ιδιότητες Ροδιών.....	21
1.3.1. Το Ρόδι ως Λειτουργικό Τρόφιμο.....	21
1.3.2. Λειτουργικές Ιδιότητες.....	22
1.4. Εκχύλισμα Φλούδας Ροδιού.....	26
1.4.1. Γενικά Στοιχεία.....	26
1.4.2. Χημική Σύνθεση Φλούδας Ροδιού.....	26
1.5. Χυμός Ροδιού.....	28
1.5.1. Γενικά Στοιχεία.....	28
1.5.2. Πολυφαινολικά Συστατικά Χυμού Ροδιού.....	29
1.6. Τοξικότητα Ροδιού.....	29
2. Κυκλοδεξτρίνες.....	31
2.1. Γενικά Στοιχεία.....	31
2.2. Ιδιότητες.....	31
2.3. Τοξικολογικές Εκτιμήσεις.....	34
2.4. β-κυκλοδεξτρίνη.....	35
2.5. Σχηματισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού.....	36
2.6. Τροποποιημένες Κυκλοδεξτρίνες (CDs).....	38
2.7. Εφαρμογές Κυκλοδεξτρινών.....	39
2.7.1. Εφαρμογές στις Βιομηχανίες Τροφίμων και Ποτών.....	40
2.7.2. Εφαρμογές στη Βιομηχανία Καλλυντικών.....	40
2.7.3. Εφαρμογές στη Φαρμακευτική Βιομηχανία.....	41
2.7.4. Εφαρμογές σε Γεωργικές και Χημικές Βιομηχανίες.....	42

2.7.5.	Εφαρμογές σχετικές με Συγκολλητικά, Επικαλύψεις και άλλα Πολυμερή	43
3.	Σχηματισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού	44
3.1.	Μέθοδοι Σχηματισμού Συμπλόκων	44
3.1.1.	Μέθοδος Συγκαταβύθισης	44
3.1.2.	Μέθοδος Δημιουργίας Πολτού.....	45
3.1.3.	Μέθοδος Δημιουργίας Πάστας	45
3.1.4.	Μέθοδος Υγρής Ανάμιξης και Θέρμανσης	45
3.1.5.	Μέθοδος Εξώθησης (Extrusion).....	45
3.1.6.	Μέθοδος Ξηρής Ανάμιξης.....	46
3.1.7.	Μέθοδος Λυοφιλοποίησης ή Λυοφιλίωσης–Freeze-Drying	46
3.2.	Ξήρανση Συμπλόκων	46
3.2.1.	Πολύ Ασταθή Φιλοξενούμενα Μόρια	46
3.2.2.	Ξήρανση με Ψεκάσμο	46
3.2.3.	Ξήρανση σε Χαμηλή Θερμοκρασία	47
3.3.	Απελευθέρωση-Release.....	47
3.4.	Σχηματισμός Δομών Μικκυλίων (Non-inclusion Complexes).....	47
4.	Ανίχνευση και Χαρακτηρισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού	49
4.1.	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	49
4.2.	Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS).....	49
4.2.1.	Μέγεθος.....	50
4.2.2.	Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)	50
4.2.3.	ζ-δυναμικό	51
4.3.	Ορατή και Υπεριώδης Φασματοσκοπία	52
4.4.	Οπτικές Μέθοδοι	52
4.5.	Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	52
4.6.	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία	53
4.7.	Θερμικές Μέθοδοι DSC, TGA και DTA	53
4.8.	Μέθοδοι υπό Κενό.....	54
4.9.	Περίθλαση με Ακτίνες Χ.....	54
4.10.	Χρωματογραφία.....	54
4.11.	Φασματομετρία Μάζας	55
5.	Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας.....	56
6.	Αναλυτικές Μέθοδοι Χαρακτηρισμού και Ταυτοποίησης Συμπλόκων Εγκλεισμού	58

6.1.	Φασματομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)	58
6.2.	Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS).....	59
6.3.	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC).....	60
6.4.	Θερμοβαρμετρική Ανάλυση (TGA).....	61
6.5.	Φασματομετρία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)	61
6.6.	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	62
6.7.	Προσδιορισμός Ύπαρξης Ολικών Φαινολικών-Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	62
6.8.	Προσδιορισμός Ύπαρξης Φλαβονοειδών-Χρωματομετρική Μέθοδος Χλωριούχου Αργιλίου..	63
6.9.	Προσδιορισμός του Συνόλου Συμπυκνωμένων Τανινών-Μέθοδος Βανιλίνης-Υδροχλωρίου ...	64
6.10.	Μελέτη Αντιοξειδωτικής Δράσης-DPPH	64
6.11.	Μελέτη Απελευθέρωσης-Release Study	64
7.	Πειραματικό Μέρος.....	67
7.1.	Υλικά και Αντιδραστήρια	67
7.2.	Συσκευές και Όργανα	68
7.3.	Σχηματισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού	68
7.3.1.	Συνοπτική Περιγραφή.....	68
7.3.2.	Διαδικασία Μεθόδου Συγκαταβύθισης.....	70
7.3.3.	Διαδικασία Μεθόδου Λυοφιλοποίησης - Freeze-Drying	70
7.3.4.	Ανακλιμάκωση της Διεργασίας Συγκαταβύθισης-Δείγμα KTZ16	71
7.3.5.	Πειραματικές Συνθήκες και Αποτελέσματα Εγκλεισμών	71
7.4.	Χαρακτηρισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού	72
7.4.1.	Απόδοση Εγκλεισμού και Δημιουργίας Συμπλόκων β-CD-Εκχυλίσματος Φλούδας Ροδιού/Χυμού Ροδιού	72
7.4.2.	Προσδιορισμός Ποσότητας Εκχυλίσματος Φλούδας Ροδιού/Χυμού Ροδιού προσδεμένου Επιφανειακά στη β-CD.....	73
7.4.3.	Μέγεθος Σωματιδίων, Δείκτης Πολυδιασποράς, ζ-δυναμικό	74
7.5.	Θερμική Ανάλυση με χρήση Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC).....	75
7.6.	Θερμοβαρμετρική Ανάλυση (TGA).....	75
7.7.	Ανάλυση μέσω Υπέρυθρης Φασματομετρίας με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).....	76
7.8.	Ανάλυση Συμπλόκου Εγκλεισμού β-κυκλοδεξτρίνης-Εκχυλίσματος Φλούδας Ροδιού/Χυμού Ροδιού μέσω Φασματομετρίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	76
7.9.	Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών-Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	77
7.10.	Προσδιορισμός Φλαβονοειδών-Χρωματομετρική Μέθοδος Χλωριούχου Αργιλίου	78

7.11.	Προσδιορισμός Συνόλου Συμπυκνωμένων Τανινών-Μέθοδος Βανιλίνης-Υδροχλωρίου-Προανθοκυανιδίνες σε ισοδύναμα κατεχίνης.....	78
7.12.	Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης-Ικανότητα Δέσμευσης της Σταθερής Ελεύθερης Ρίζας DPPH	78
7.13.	Μελέτη Απελευθέρωσης-Release Study	79
7.14.	Πειράματα Ενσωμάτωσης σε Καλλυντική Κρέμα και Μελέτη Σταθερότητας.....	79
7.14.1.	Έλεγχος Σταθερότητας σε Συνθήκες Σταθερής Θερμοκρασίας.....	81
7.14.2.	Έλεγχος Σταθερότητας σε Συνθήκες Εναλλασσόμενης Θερμοκρασίας	82
8.	Αποτελέσματα-Σχολιασμός Αποτελεσμάτων	83
8.1.	Απόδοση Διεργασίας	83
8.2.	Απόδοση Εγκλεισμού-Ποσοστό Ολικού Εγκλεισμού και Επιφανειακής Πρόσδεσης Εκχυλίσματος/Χυμού Ροδιού σε β-κυκλοδεξτρίνη.....	85
8.3.	Μέγεθος Σωματιδίων, Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό	90
8.4.	Θερμική ανάλυση μέσω Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) και Θερμοβαρυμετρικής Ανάλυσης (TGA)	95
8.5.	Ανάλυση μέσω Υπέρυθρης Φασματομετρίας Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)	106
8.6.	Ανάλυση μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	111
8.7.	Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών-Αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu	117
8.8.	Προσδιορισμός Φλαβονοειδών-Αποτελέσματα της Χρωματομετρικής Μεθόδου Χλωριούχου Αργιλίου	119
8.9.	Προσδιορισμός Συμπυκνωμένων Τανινών-Προανθοκυανιδινών σε Ισοδύναμα Κατεχίνης - Αποτελέσματα της Μεθόδου Βανιλίνης-Υδροχλωρίου	120
8.10.	Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης-Ικανότητα Δέσμευσης της Σταθερής Ελεύθερης Ρίζας DPPH	121
8.11.	Μελέτη Απελευθέρωσης-Release Study	122
8.12.	Αποτελέσματα Ελέγχου Σταθερότητας Καλλυντικών Κρεμών	124
8.12.1.	Οργανοληπτικά Χαρακτηριστικά	125
8.12.2.	pH στους 25 °C	126
8.12.3.	Ιξώδες.....	126
8.12.4.	Φυγοκεντρήσεις.....	126
9.	Συμπεράσματα και Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα	128
9.1.	Συμπεράσματα.....	128
9.2.	Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα	130
	Παράρτημα	132
10.	Βιβλιογραφία.....	136

Ευρετήριο Συμβολισμών

ETs: Ελλαγικές τανίνες

EA: Ελλαγικό οξύ

CD: Κυκλοδεξτρίνη

β-CD: β-κυκλοδεξτρίνη

CM: Μέθοδος συγκαταβύθισης

FD: Μέθοδος λυοφιλοποίησης

PDI: Δείκτης πολυδιασποράς

ROT: Εξάτμιση με ελαττούμενη πίεση

UV-Vis: Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού

DLS: Δυναμική σκέδαση φωτός

SOP: (Standard Operating Procedure) Τυποποιημένο πρόγραμμα λειτουργίας

FT-IR: Υπέρυθρη φασματομετρία με μετασχηματισμό Fourier

DSC: Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης

TGA: Θερμοβαρυμετρική ανάλυση

NMR: Φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

¹H-NMR: Φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου

DPPH: 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ

DMSO-d₆: διμεθυλοσουλφοξείδιο

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Διαφορετικά μέρη του φρούτου του ροδιού (Α). Β: χυμός ροδιού. C: τμήμα ροδιού. D: φλούδα ροδιού. E: αρίλες ροδιού. F: σπόροι ροδιού. [2].....	20
Εικόνα 2: Χημική δομή της ένωσης <i>rupicalagin</i> (αριστερά) και της ένωσης <i>rupicic acid</i> (δεξιά). [7, 8]...	21
Εικόνα 3: Κύριες λειτουργικές και φαρμακευτικές επιδράσεις του ρόδιου. [2].....	22
Εικόνα 4: Χημικές δομές επιλεγμένων ενώσεων σε φλούδα ροδιού. [6].....	27
Εικόνα 5: α) α -κυκλοδεξτρίνη από την πλευρά O (6), b) και c) β - και γ -κυκλοδεξτρίνες αντίστοιχα όπως φαίνεται από το O (2), O (3) με κλειστό δακτύλιο O (3). . O (2) δεσμούς υδρογόνου μεταξύ γειτονικών μονάδων γλυκόζης. d) πλάγια όψη της β -κυκλοδεξτρίνης (μοντέλο CPK). Όλες οι κυκλοδεξτρίνες έχουν ύψος δακτυλίου περίπου 8 Å (βλέπε εικόνα 6). [27].....	32
Εικόνα 6: Χημική δομή και αρίθμηση των υποφαινόμενων ατόμων για την β -κυκλοδεξτρίνη. Με μαύρη κουκίδα απεικονίζονται τα άτομα οξυγόνου και με κύκλο οι υδροξυλομάδες. [27]	33
Εικόνα 7: Υδροξύλια που βρίσκονται στην άκρη του δακτυλίου της β -κυκλοδεξτρίνης. [26].....	35
Εικόνα 8: Δομή κυκλοδεξτρίνης και σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού. [29].....	36
Εικόνα 9: Απεικόνιση σχηματισμού συμπλόκου εγκλεισμού και συνένωση συμπλόκων για σχηματισμό συσσωματωμάτων. [40]	48
Εικόνα 10: Απεικόνιση ενός σωματιδίου, που έχει ένα αρνητικό επιφανειακό δυναμικό, μια στιβάδα Stern που αποτελείται από αρνητικά ιόντα, μια στιβάδα διάχυσης που περιβάλλει τόσο τα σωματίδια όσο και το μετρούμενο ζ-δυναμικό βρίσκεται στο επίπεδο ολίσθησης. Η πορεία της πιθανής καμπύλης σχεδιάζεται ως συνάρτηση της απόστασης από την επιφάνεια των σωματιδίων. [44].....	51
Εικόνα 11: Διαβαθμίσεις στα χρώματα πρότυπων δειγμάτων γαλλικού οξέος, συγκέντρωσης από 0-100 $\mu\text{g/mL}$. [50].....	63
Εικόνα 12: Μοντέλα βιοδραστικής απελευθέρωσης από νανοσυστήματα. Με συνεχή γραμμή απεικονίζεται το μοντέλο της παρατεταμένης απελευθέρωσης και με διακεκομμένη γραμμή το μοντέλο της καθυστερημένης απελευθέρωσης. [55].....	65
Εικόνα 13: Προφίλ απελευθέρωσης του εγκλεισμένου, σε β -κυκλοδεξτρίνη, αιθέριου ελαίου ρίγανης στους 37 ° C και pH 5,5, σε διάστημα 11 ημερών. [56].....	66
Εικόνα 14: Παγάκια χυμού ροδιού (αριστερά), χυμός ροδιού (δεξιά).	67
Εικόνα 15: Φάση A της βάσης της καλλυντικής κρέμας, πριν τη γαλακτωματοποίηση (αριστερά) και η μορφή της κατά τη γαλακτωματοποίηση (δεξιά).....	80
Εικόνα 16: Καλλυντική κρέμα με: εκχύλισμα φλούδας ροδιού (αριστερά), με χυμό ροδιού (κέντρο) και με δείγμα KTZ14 εγκλεισμού (δεξιά).....	81
Εικόνα 17: Δείγματα εγκλεισμού με την τροποποιημένη μέθοδο λυοφιλοποίησης. KTZ15 (αριστερά) και KTZ14 (δεξιά).	83
Εικόνα 18: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού KTZ8	91
Εικόνα 19: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού KTZ6	91
Εικόνα 20: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού KTZ14	92
Εικόνα 21: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού KTZ15	92
Εικόνα 22: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού KTZ9	93
Εικόνα 23: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού KTZ16	93
Εικόνα 24: Το γράφημα DSC της β -κυκλοδεξτρίνης.	95
Εικόνα 25: Το γράφημα TGA της β -κυκλοδεξτρίνης.....	96
Εικόνα 26: Το γράφημα DSC του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού.	97
Εικόνα 27: Το γράφημα TGA του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού.....	98

Εικόνα 28: Το γράφημα DSC του δείγματος εγκλεισμού KTZ6 .	99
Εικόνα 29: Το γράφημα TGA του δείγματος εγκλεισμού KTZ6 .	100
Εικόνα 30: Το γράφημα DSC του δείγματος εγκλεισμού KTZ9 .	101
Εικόνα 31: Το γράφημα TGA του δείγματος εγκλεισμού KTZ9 .	102
Εικόνα 32: Το γράφημα DSC του χυμού ροδιού.	103
Εικόνα 33: Το γράφημα TGA του χυμού ροδιού.	104
Εικόνα 34: Το γράφημα TGA του δείγματος εγκλεισμού KTZ13 .	105
Εικόνα 35: Φάσμα FT-IR (KBr) της β-κυκλοδεξτρίνης.	106
Εικόνα 36: Φάσμα FT-IR (KBr) του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού.	107
Εικόνα 37: Φάσμα FT-IR (KBr) του χυμού ροδιού.	108
Εικόνα 38: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού KTZ6 .	109
Εικόνα 39: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού KTZ9 .	109
Εικόνα 40: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού KTZ13 .	110
Εικόνα 41: (α) Στερεοχημική διαμόρφωση της β-κυκλοδεξτρίνης, (b) κωνική δομή της β-κυκλοδεξτρίνης με αριθμημένα εσωτερικά και εξωτερικά πρωτόνια. [63]	111
Εικόνα 42: Φάσμα ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 600MHz) και χημική δομή (πάνω αριστερά) της β-κυκλοδεξτρίνης.	112
Εικόνα 43: Φάσμα ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 600MHz) του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού.	113
Εικόνα 44: Φάσμα ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 600MHz) του χυμού ροδιού.	113
Εικόνα 45: Φάσμα ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 600MHz) του δείγματος εγκλεισμού KTZ6 .	114
Εικόνα 46: Φάσμα ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 600MHz) του δείγματος εγκλεισμού KTZ9 .	115
Εικόνα 47: Φάσμα ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 600MHz) του δείγματος εγκλεισμού KTZ13 .	116
Εικόνα 48: Δείγματα καλλυντικών κρεμών μετά τον έλεγχο σταθερότητας, διάρκειας ενός μήνα, στους 25 °C: τυφλό (πάνω αριστερά), 564 (πάνω κεντρικά), 565 (πάνω δεξιά), 566 (κάτω αριστερά), 567 (κάτω δεξιά).	125
Εικόνα 49: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος KTZ7 .	132
Εικόνα 50: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού KTZ8 .	132
Εικόνα 51: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού KTZ10 .	133
Εικόνα 52: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού KTZ11 .	133
Εικόνα 53: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού KTZ15 .	134
Εικόνα 54: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος KTZ12 .	134
Εικόνα 55: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού KTZ14 .	135
Εικόνα 56: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού KTZ16 .	135

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Κύρια συστατικά διαφόρων τμημάτων της ροδιάς και του ροδιού. [2]	21
Πίνακας 2: Αντιβακτηριδιακές ιδιότητες των φρούτων ροδιού. [2]	24
Πίνακας 3: Μερικές φυσικές ιδιότητες των κυκλοδεξτρίνων. Ύψος του δακτυλίου κυκλοδεξτρίνης: 7,9 – 8 Å (μετρούμενο με τη βοήθεια μοντέλων CPK). [27].....	34
Πίνακας 4: Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.....	68
Πίνακας 5: Συσκευές και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.	68
Πίνακας 6: Στοιχεία πειραμάτων εγκλεισμού με εκχύλισμα φλούδας ροδιού.....	71
Πίνακας 7: Στοιχεία πειραμάτων εγκλεισμού με χυμό ροδιού.....	72
Πίνακας 8: Στοιχεία αρχείων SOP: KTZ1-1.sop, KTZ1-1 ZETA.sop, KTZ extract 125mg.sop και KTZ extract 125mg zeta.sop.....	75
Πίνακας 9: Στοιχεία θερμοκρασιακού προγράμματος DSC.	75
Πίνακας 10: Στοιχεία θερμοκρασιακού προγράμματος TGA.	76
Πίνακας 11: Αναλογίες μάζας νερού και δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν για τελική ποσότητα καλλυντικής κρέμας 300 g, για το κάθε δείγμα.	81
Πίνακας 12: Δεδομένα και αποτελέσματα απόδοσης διεργασίας με πρώτη ύλη το εκχύλισμα φλούδας ροδιού.....	84
Πίνακας 13: Δεδομένα και αποτελέσματα απόδοσης διεργασίας με πρώτη ύλη τον χυμό ροδιού.....	84
Πίνακας 14: Αποτελέσματα απόδοσης εγκλεισμού και ποσοστού επιφανειακής πρόσδεσης με βάση το εκχύλισμα φλούδας ροδιού.	87
Πίνακας 15: Αποτελέσματα απόδοσης εγκλεισμού και ποσοστού επιφανειακής πρόσδεσης με βάση τον χυμό ροδιού.....	87
Πίνακας 16: Αποτελέσματα μετρήσεων μεγέθους σωματιδίων, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού για τους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού.....	90
Πίνακας 17: Αποτελέσματα μετρήσεων μεγέθους σωματιδίων, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού για τους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού.	90
Πίνακας 18: Μετατοπίσεις χαρακτηριστικών κορυφών της β-κυκλοδεξτρίνης στα φάσματα FT-IR των δειγμάτων εγκλεισμού KTZ6 , KTZ9 και KTZ13	111
Πίνακας 19: Χημικές μετατοπίσεις (δ) της β-κυκλοδεξτρίνης και διαφορά χημικών μετατοπίσεων μεταξύ αυτής σε ελεύθερη μορφή και στα δείγματα εγκλεισμού KTZ6 , KTZ9 και KTZ13	117
Πίνακας 20: Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης και προσδιορισμός ολικών φαινολικών του εκχυλίσματος, του χυμού και των δειγμάτων KTZ6 , KTZ9 και KTZ13	118
Πίνακας 21: Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης και προσδιορισμός φλαβονοειδών του εκχυλίσματος, του χυμού και των δειγμάτων KTZ6 , KTZ9 και KTZ13	119
Πίνακας 22: Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης και προσδιορισμός συμπυκνωμένων τανινών του εκχυλίσματος, του χυμού και των δειγμάτων KTZ6 , KTZ9 και KTZ13	121
Πίνακας 23: Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής του χυμού ροδιού, του δείγματος εγκλεισμού KTZ13 και της β-κυκλοδεξτρίνης.....	122
Πίνακας 24: Αποτελέσματα συγκέντρωσης IC ₅₀ του χυμού ροδιού και του δείγματος εγκλεισμού KTZ13	122
Πίνακας 25: Πειραματικά δεδομένα μέτρησης του pH στους 25 °C κατά τους ελέγχους σταθερότητας.	126
Πίνακας 26: Πειραματικά δεδομένα μέτρησης ιξώδους (cSt) κατά τους ελέγχους σταθερότητας.	126

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς και εξίσωση εκχυλίσματος φλούδας ροδιού.....	86
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς και εξίσωση χυμού ροδιού.	86
Διάγραμμα 3: Τα σημεία ποσοστού απελευθέρωσης που προκύπτουν από πειραματικές μετρήσεις απορρόφησης για το δείγμα KTZ9 , συναρτήσει του χρόνου (σε ώρες).....	123
Διάγραμμα 4: Τα σημεία ποσοστού απελευθέρωσης που προκύπτουν από πειραματικές μετρήσεις απορρόφησης για το δείγμα KTZ13 , συναρτήσει του χρόνου (σε ώρες).	124

Θεωρητικό μέρος

1. Ρόδι

1.1. Γενικά Στοιχεία

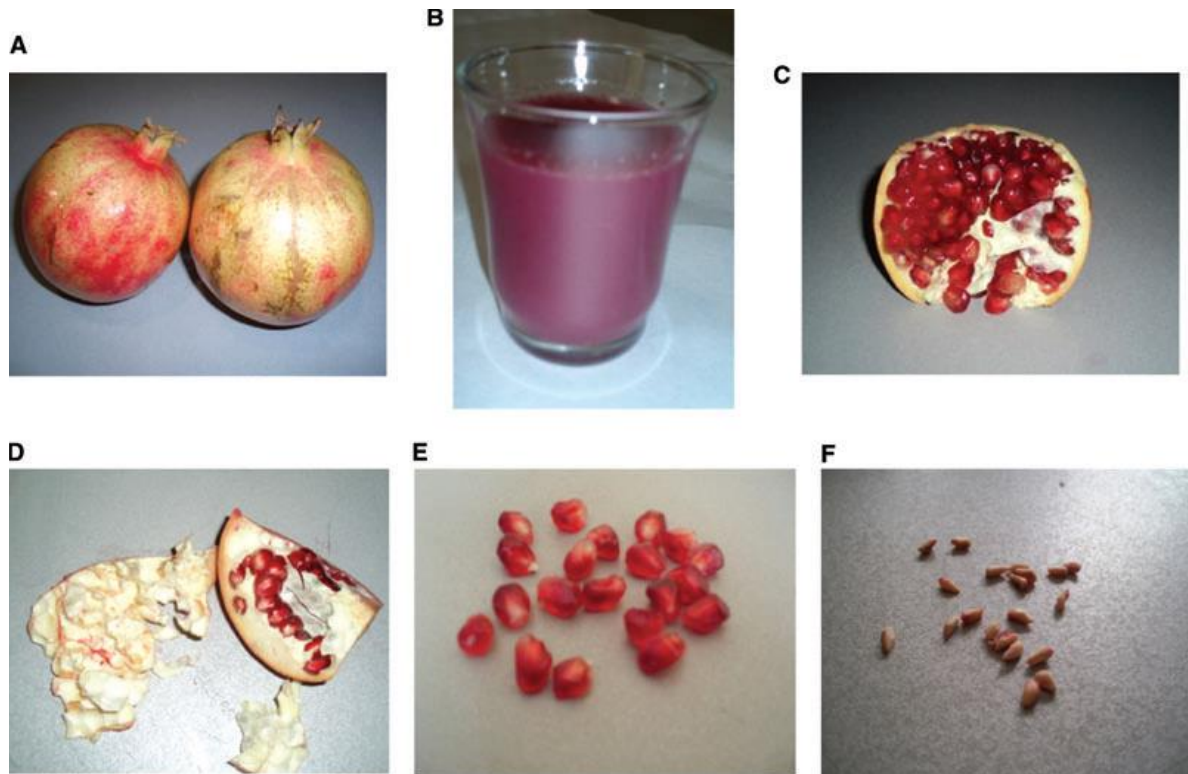
Το ρόδι (*Punica granatum* L.) είναι ένα αρχαίο φρούτο που προέρχεται από την Κεντρική Ασία και έχει παραμείνει σχεδόν αναλλοίωτο σε όλη την ιστορία του ανθρώπου. Μετά την ανακάλυψη της γεωργίας, περίπου 10.000 χρόνια πριν, είναι γνωστό ότι καλλιεργήθηκε στην Αίγυπτο. Βρέθηκε στην κοιλάδα του Ινδού τόσο νωρίς ώστε υπάρχει μια λέξη στο σανσκριτικό για το ρόδι. Το ινδικό βασίλειο ξεκινούσε τα συμπόσια με ρόδι, σταφύλια και τζιτζιφο. Το ρόδι είναι επίσης σημαντικό στην εβραϊκή παράδοση. Λέγεται ότι έχει 613 σπόρους για να αντιπροσωπεύσει τις 613 εντολές στην Τορά. Το ρόδι εμφανίστηκε στην Κίνα κατά τη διάρκεια των δυνασθειών Χαν και Σουνγκ, που κατά πάσα πιθανότητα έφεραν από τη Μέση Ανατολή οι έμποροι. Έγινε γνωστό σιγά-σιγά στη μεσαιωνική Ευρώπη και ήταν γνωστό στην Ελισαβετιανή Αγγλία, όπως φαίνεται από ένα απόσπασμα από το *Ρωμαίος και Ιουλιέτα*. Οι Ισπανοί κατακτητές έφεραν το ρόδι στην Αμερική. Ιησουίτες ιεραπόστολοι το μετέφεραν βόρεια στην Καλιφόρνια, όπου τώρα αναπτύσσεται σε αφθονία στο ήπιο μεσογειακό κλίμα αυτής της πολιτείας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής. [1-5]

Το ρόδι ανήκει στην οικογένεια *Punicaceae*. Τα βρώσιμα μέρη του ροδιού καταναλώνονται νωπά ή χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φρέσκου χυμού, κονσερβοποιημένων ποτών, ζελέ, μαρμελάδας και πολτών, καθώς και για προϊόντα αρωματισμού και χρωματισμού ποτών. Η παρουσία σημαντικών ποσοτήτων βιοδραστικών ενώσεων στο ρόδι, όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και τανίνες, του προσδίδει σημαντική διατροφική αξία ενώ καθιστά ωφέλιμη τη χρήση του σε θεραπευτικές φόρμουλες, καλλυντικά και καρυκεύματα. Από την αρχαιότητα, το ρόδι έχει θεωρηθεί ως «θεραπευτικό φαγητό» με πολλές ευεργετικές επιδράσεις σε διάφορες ασθένειες. Πράγματι, χρησιμοποιείται ευρέως σε γιατροσόφια, για την εξάλειψη των παρασίτων, ως ανθελμινθικό και αντισκωληκικό φάρμακο, για την θεραπεία της αφθώδους στοματίτιδας, των ελκών, της διάρροιας, της οξέωσης, της δυσεντερίας, της αιμορραγίας, των μικροβιακών λοιμώξεων και των αναπνευστικών προβλημάτων. Έχει χρησιμοποιηθεί επίσης και ως αντιπυρετικό. [1, 2]

Οι σπόροι του ροδιού σε πολλές παραδόσεις έχουν δημιουργήσει την ιδέα ότι τα ρόδια προάγουν τη γονιμότητα, αλλά δεν υπάρχουν ενδείξεις για αυτό μέχρι στιγμής. Η ανακάλυψη των μυστικών που κρύβονται μέσα σε αυτό το αρχαίο φρούτο απαιτεί την εφαρμογή όλων των σύγχρονων μεθόδων της επιστήμης της διατροφολογίας, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιωματικής των θρεπτικών ουσιών, της πρωτεϊνωματικής και λεπτομερών μελετών των υποκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης στα φυσιολογικά και νοσούντα κύτταρα. [1]

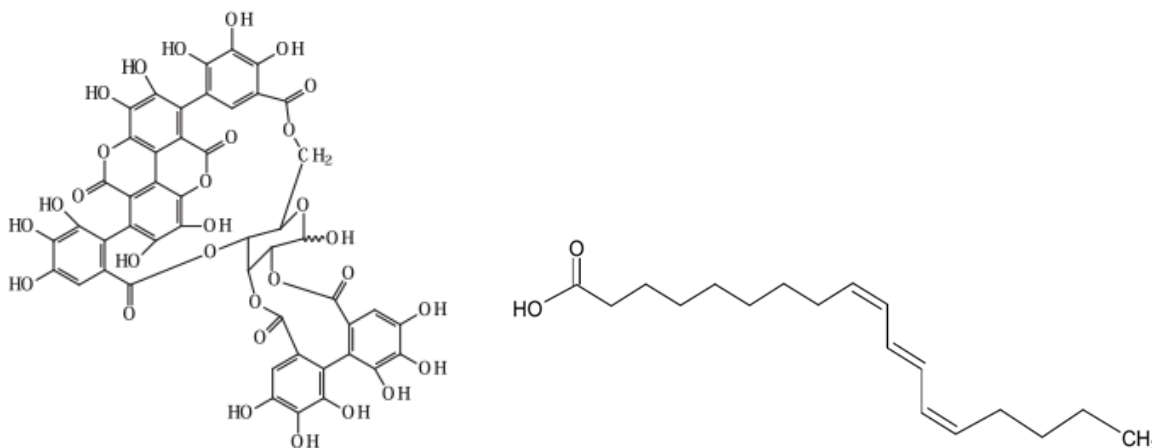
1.2. Χημική Σύσταση Ροδιών

Το ρόδι (Εικόνα 1) έχει πολύτιμες ενώσεις σε διάφορα μέρη του. Αυτές μπορεί να βρίσκονται στην φλούδα, στους σπόρους και στους καρπούς ή αρίλες (αρίλες: ο βοτανικός όρος για το μέρος που συνήθως καταναλώνεται, συμπεριλαμβανομένης της σάρκας και του σπόρου). Ένα άλλο σημαντικό προϊόν που λαμβάνεται από τα φρούτα αυτά είναι ο χυμός, ο οποίος μπορεί να ληφθεί από αρίλες ή από ολόκληρο το φρούτο. [2]



Εικόνα 1: Διαφορετικά μέρη του φρούτου του ροδιού (Α). Β: χυμός ροδιού. C: τμήμα ροδιού. D: φλούδα ροδιού. E: αρίλες ροδιού. F: σπόροι ροδιού. [2]

Η χημική σύσταση των ροδιών (Πίνακας 1) διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία, την περιοχή, το κλίμα, την ωριμότητα, τις συνθήκες και τον τρόπο καλλιέργειας και τις συνθήκες αποθήκευσης. Υπάρχουν σημαντικές διακυμάνσεις των οργανικών οξέων, φαινολικών ενώσεων, σακχάρων, υδατοδιαλυτών βιταμινών και ανόργανων αλάτων των ροδιών. Περίπου το 50% του συνολικού βάρους των φρούτων αντιστοιχεί στην φλούδα. Το ρόδι περιέχει μια πλούσια ποικιλία φλαβονοειδών, που αποτελούν περίπου το 0,2-1,0% του βάρους του. Το 50% αποτελεί το βρώσιμο μέρος του φρούτου εκ των οποίων το 10% είναι σπόροι. Οι σπόροι είναι πλούσια πηγή ολικών λιπιδίων και το έλαιο σπόρων ροδιού αποτελεί το 12% έως 20% του συνολικού βάρους του σπόρου. Το έλαιο χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα (n-3) λιπαρά οξέα όπως λινολενικό, λινολεϊκό και άλλα λιπίδια όπως το runicic acid, το ελαϊκό οξύ, το στεατικό οξύ και το παλμτικό οξύ. Το runicic acid (Εικόνα 2, δεξιά) είναι ένα σπάνιο λιπίδιο, το οποίο ουσιαστικά, είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ μακράς αλυσίδας μήκους 18 ατόμων, παρόμοιο με το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ αλλά έχει έναν πρόσθετο διπλό δεσμό. Οι σπόροι περιέχουν επίσης πρωτεΐνες, ακατέργαστες ίνες, βιταμίνες, ανόργανα άλατα, πηκτίνη, σάκχαρα, πολυφαινόλες, ισοφλαβόνες (κυρίως γενιστεΐνη). [2, 6, 7]



Εικόνα 2: Χημική δομή της ένωσης runicalagin (αριστερά) και της ένωσης runicic acid (δεξιά). [7, 8]

Πίνακας 1: Κύρια συστατικά διαφόρων τμημάτων της ροδιάς και του ροδιού. [2]

Μέρος του φυτού	Συστατικά
Χυμός ροδιού	Ανθοκυανίνες, γλυκόζη, οργανικό οξύ, ασκορβικό οξύ, ελλαγικό οξύ (EA), ETs, γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, κατεχίνη, κερκετίνη, ρουτίνη, μέταλλα
Έλαιο σπόρων ροδιού	Συζευγμένο λινολενικό οξύ, λινελαϊκό οξύ, ελαϊκό οξύ, στεατικό οξύ, runicic acid, ελαιοστεατικό οξύ, catalpic acid
Φλούδα ροδιού	Λουτεολίνη, κερκετίνη, gallagic, EA γλυκοζίτες, EA, runicalagin, runicalin, pedunculagin
Φύλλα ροδιού	EA, λιπαρά οξέα
Άνθος ροδιάς	Πολυφαινόλες, runicalin runicicalin, EA
Ρίζες ροδιάς και φλοιός	Αλκαλοειδή, ETs

1.3. Ιδιότητες Ροδιών

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον από τους καταναλωτές, τους ερευνητές και τη βιομηχανία τροφίμων για το πώς τα τρόφιμα μπορούν να συμβάλλουν στη διατήρηση της υγείας και ο ρόλος που διαδραματίζει η διατροφή στην πρόληψη και θεραπεία πολλών ασθενειών έχει γίνει ευρέως αποδεκτός. Σήμερα, δίνεται μεγάλη σημασία στα λειτουργικά τρόφιμα (functional foods) τα οποία, εκτός από τις βασικές διατροφικές τους λειτουργίες, παρέχουν φυσιολογικά οφέλη και παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη των ασθενειών ή επιβραδύνουν την εξέλιξη των χρόνιων νόσων. Παρατηρείται μια πραγματική έκρηξη ενδιαφέροντος για το ρόδι ως φάρμακο και θρεπτικό προϊόν λόγω της πολυλειτουργικότητάς του και του μεγάλου οφέλους του στην ανθρώπινη διατροφή, καθώς περιέχει διάφορες ομάδες ουσιών που είναι χρήσιμες για τη μείωση των κινδύνων μιας ασθένειας. [1, 2, 6]

1.3.1. Το Ρόδι ως Λειτουργικό Τρόφιμο

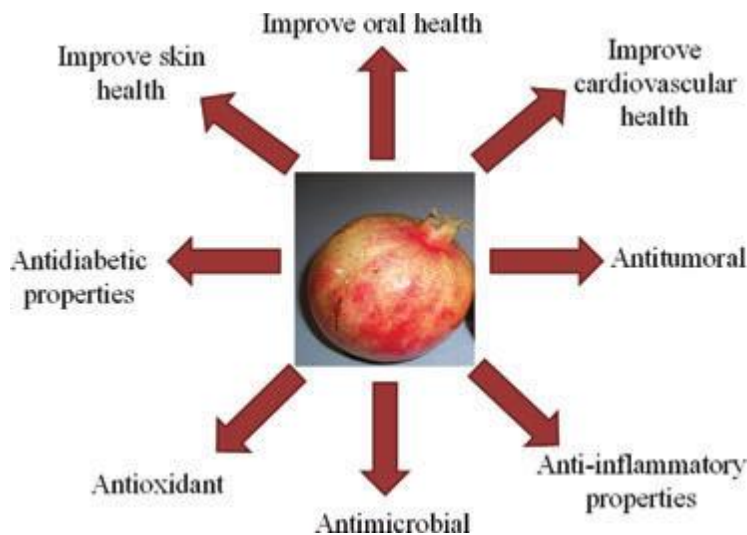
Η θετική επίδραση ενός λειτουργικού τροφίμου μπορεί να περιλαμβάνει τη διατήρηση της υγείας ή τη μείωση του κινδύνου να υποστεί κάποιος μια συγκεκριμένη ασθένεια. Λειτουργικό τρόφιμο μπορεί να ληφθεί με την τροποποίηση ενός ή περισσότερων συστατικών ή με την απομάκρυνσή τους. Για να

αναπτυχθούν αυτοί οι τύποι προϊόντων, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι γνώμες των καταναλωτών, ενώ οι σημαντικότερες πτυχές ποιότητας είναι ότι τα τρόφιμα αυτά πρέπει να έχουν αρεστή γεύση, να είναι υγιεινά και να έχουν θρεπτική αξία. Οποιαδήποτε λειτουργική τροφή πρέπει να είναι ασφαλής, υγιεινή και νόστιμη. Τα ρόδια συμμορφώνονται με αυτόν τον ορισμό με διάφορους τρόπους, αν και η αναγνώριση και καθιέρωση οποιασδήποτε λειτουργίας συνεπάγεται τον εντοπισμό των βιοδραστικών συστατικών για να διευκρινιστούν οι πιθανές ευεργετικές τους επιδράσεις στην υγεία. [1, 2, 6]

1.3.2. Λειτουργικές Ιδιότητες

Επί του παρόντος, είναι μεγάλο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με τις λειτουργικές ιδιότητες του ροδιού και των παραγώγων του (χυμός, έλαιο σπόρων, φλοιός κλπ.), οι πιο σημαντικές από τις οποίες είναι αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές ή σχετικές με την καταπολέμηση αγγειακών παθήσεων, διαβήτη και καρκίνου. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα επί του θέματος. [2, 9, 10]

Ο καρπός του ροδιού θα μπορούσε να θεωρηθεί λειτουργικό τρόφιμο επειδή έχει πολύτιμα συστατικά σε διάφορα μέρη του με λειτουργικές και φαρμακευτικές επιδράσεις (Εικόνα 3). Αυτά μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά, ως αντικαρκινικά ή αντιηπατοτοξικά και να βελτιώσουν την καρδιαγγειακή υγεία. Έχει βρεθεί ότι έχουν αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντιικές ιδιότητες, ιδιότητες κατά του διαβήτη και μπορούν να βελτιώσουν τη στοματική υγιεινή και την υγεία του δέρματος. Βοηθούν στην πρόληψη της νόσου του Alzheimer και βελτιώνουν την ποιότητα των σπερματοζωαρίων και τη στυτική δυσλειτουργία σε άνδρες ασθενείς. Ωστόσο, έχουν ολοκληρωθεί λίγες καλά ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές και οι επιδράσεις αυτές δεν έχουν τεκμηριωθεί επαρκώς και γι' αυτό απαιτείται βαθύτερη έρευνα σε αυτόν τον ταχέως αναπτυσσόμενο τομέα. [2, 9, 10]



Εικόνα 3: Κύριες λειτουργικές και φαρμακευτικές επιδράσεις του ρόδιου. [2]

1.3.2.1. Η υγεία της καρδιάς

Η υψηλή αρτηριακή πίεση ή υπέρταση είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου και ο μεγαλύτερος παράγοντας που συμβάλλει στην καρδιαγγειακή νόσο παγκοσμίως. Σύμφωνα με μια έρευνα, μετά από 1 χρόνο κατανάλωσης χυμού ροδιού, η συστολική αρτηριακή πίεση μειώθηκε κατά 21% και οι ερευνητές πιστεύουν ότι αυτό σχετίζεται με τις ιδιαίτερες ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών ροδιού. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η διατροφική

κατανάλωση φλαβονοειδών μέσω του ροδιού μειώνει τον κίνδυνο που σχετίζεται με τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο. [1, 2, 10]

1.3.2.2. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή, το πρώτο σύστημα φυσικής άμυνας στο ανθρώπινο σώμα, μπορεί να προστατεύσει από τραυματισμούς που προκαλούνται από πληγές, δηλητηριάσεις και ούτω καθεξής. Αυτό το αμυντικό σύστημα, που ονομάζεται επίσης βραχυχρόνια φλεγμονή, μπορεί να καταστρέψει μολυσματικούς μικροοργανισμούς, να εξαλείψει ερεθισμούς και να διατηρήσει σε κανονικά επίπεδα φυσιολογικές λειτουργίες. Ωστόσο, η μακροχρόνια υπερ-φλεγμονή μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργίες όπως το άσθμα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Έχει βρεθεί ότι το puniic acid έχει ένα in vivo αντιφλεγμονώδες αποτέλεσμα περιορίζοντας την ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων και τις συνέπειες υπεροξειδωσης λιπιδίων που ευθύνονται για τις προαναφερθείσες δυσλειτουργίες. [1, 2, 6]

1.3.2.3. Αντικαρκινικές ιδιότητες

Πολλά από τα μη θρεπτικά συστατικά των φρούτων και των λαχανικών είναι γνωστό ότι έχουν πιθανή δράση ως χημειοπροστατευτικά μέσα κατά του καρκίνου. Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των καρπών ροδιού και των παραγώγων που έχουν μια πολύ υψηλή αντιοξειδωτική δράση ως αντιπολλαπλασιαστικοί, μη επεμβατικοί και προ-αποπτωτικοί παράγοντες σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και ζωικά μοντέλα. Έχει βρεθεί ότι εκχυλίσματα από διάφορα μέρη του ροδιού δρουν συνεργιστικά και είναι ισχυροί αναστολείς της κυτταρικής ανάπτυξης όσον αφορά στα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, μειώνεται η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου και καθυστερεί η ανάπτυξη όγκων. [1, 2, 10]

1.3.2.4. Ιδιότητες κατά του διαβήτη

Ένας τρόπος για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη είναι μέσω της διατροφής. Τα ρόδια και τα παράγωγα τους μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο. Πράγματι, πολυάριθμες μελέτες επιβεβαιώνουν την αντιδιαβητική τους δράση. Το ρόδι και τα παράγωγά του έχουν υπογλυκαιμική δράση. Οι ενώσεις ροδιού που σχετίζονται με αντιδιαβητικά αποτελέσματα περιλαμβάνουν τα ολενολικά, ουρσολικά και γαλλικά οξέα. Οι κύριες ενώσεις που παρουσιάζουν αντιδιαβητικές ιδιότητες είναι οι πολυφαινόλες, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν τη γλυκαιμία μέσω διαφόρων μηχανισμών. Αρκετές in vitro μελέτες σε κύτταρα καλλιέργειας έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να αυξήσουν την πρόσληψη γλυκόζης από τους περιφερειακούς ιστούς, γεγονός που θα μείωνε τη γλυκαιμία. [2, 9]

1.3.2.5. Βελτίωση της υγείας του δέρματος

Η βλάβη στο δέρμα συμβαίνει ως συνέπεια της φυσικής διαδικασίας γήρανσης και επιδεινώνεται με το εκτεθειμένο στον ήλιο δέρμα (φωτογήρανση). Η παρατεταμένη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) έχει αναγνωριστεί ως αιτία σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών στο ανθρώπινο δέρμα, συμπεριλαμβάνοντας το οξειδωτικό στρες, την πρόωρη γήρανση του δέρματος, το ηλιακό έγκαυμα, την ανοσοκαταστολή και τον καρκίνο του δέρματος. Το έλαιο σπόρων ροδιού, αλλά όχι τα υδατικά εκχυλίσματα ζυμωμένου χυμού, φλοιού ή σπόρου, έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων σε μονοστρωματική καλλιέργεια. Τα υδατικά εκχυλίσματα ροδιού (ειδικά φλούδες ροδιού) προάγουν την αναγέννηση του δέρματος και το έλαιο σπόρων ροδιού προάγει την αναγέννηση της επιδερμίδας. [2, 10]

1.3.2.6. Βελτίωση της στοματικής υγείας

Το ρόδι περιέχει παράγοντες, ειδικά πολυφαινολικά φλαβονοειδή, τα οποία μπορεί να θεωρηθεί ότι δρουν συμβάλλοντας στην καλή στοματική υγιεινή, ιδιαίτερα σε σχέση με την ανάπτυξη της ουλίτιδας.

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το ξέπλυμα του στόματος για 1 λεπτό, με στοματικό διάλυμα που περιέχει εκχύλισμα ροδιού, μειώνει αποτελεσματικά την ποσότητα των μικροοργανισμών που καλλιεργούνται από την οδοντική πλάκα. [2, 10]

1.3.2.7. Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Δεδομένου ότι η βακτηριακή αντοχή στα αντιμικροβιακά φάρμακα αυξάνεται, τα φαρμακευτικά φυτά έχουν θεωρηθεί ως εναλλακτικοί παράγοντες. Το ρόδι έχει εγκριθεί ευρέως για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Η αντιμικροβιακή δράση μερικών από τις κοινές ποικιλίες ροδιού έχει μελετηθεί ευρέως (Πίνακας 2). Αρκετοί in vitro προσδιορισμοί επιδεικνύουν τη βακτηριοκτόνο δράση έναντι αρκετών εξαιρετικά παθογόνων και μερικές φορές ανθεκτικών σε αντιβιοτικά οργανισμών. [2, 10]

Πίνακας 2: Αντιβακτηριακές ιδιότητες των φρούτων ροδιού. [2]

Μέρος του φυτού	Εκχύλισμα	Βακτηριακά στελέχη
Αρίλες	Υδατικά εκχυλίσματα	<i>Bacillus megaterium</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i> <i>E. coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Micrococcus luteus</i>
Ολόκληρο το φρούτο	Υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα	<i>S. typh</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Salmonella paratyphi</i>
Φλοιός	Εκχυλίσματα νερού, μεθανόλης, πετρελαϊκού αιθέρα και χλωροφορμίου	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>
Ολόκληρο το φρούτο	Υδατικά και αιθανολικά εκχυλίσματα	Different strains of <i>E. coli</i>
Φλοιός	Εξανίου, βουτανόλης και οξικού αιθυλεστέρα	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>
Φλοιός	Υδατικά εκχυλίσματα	Methicillin-sensitive and methicillin-resistant <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>S. typhi</i>
Ολόκληρο το φρούτο	Αιθανολικά εκχυλίσματα	<i>P. aeruginosa</i> <i>B. subtilis</i>
Ολόκληρο το φρούτο	Ακατέργαστα εκχυλίσματα	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>

		<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>Micrococcus luteus</i>
Ολόκληρο το φρούτο	Υδατικό-αιθανολικό εκχύλισμα	<i>Aeromonas sobria</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Chryseobacterium sp.</i>
Παραπροϊόντα	Υδατικό εκχύλισμα	<i>Pathogenic Clostridium</i> <i>S. aureus</i>
Χυμός	Υδατικό εκχύλισμα	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Ολόκληρο το φρούτο	Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>

1.3.2.8. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Η αντιοξειδωτική δράση των συστατικών του ροδιού αποτέλεσε αντικείμενο πολλών μελετών, οι περισσότερες από τις οποίες διεξήχθησαν *in vitro* και *in vivo*. Αυτή η δράση μπορεί να σχετίζεται με τις ποικίλες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο ρόδι, συμπεριλαμβανομένων ισομερών της runicalagin, παραγώγων ελλαγικού οξέος και ανθοκυανινών (δελφινιδίνη, κυανιδίνη και πελαργονιδίνη 3-γλυκοζίτες και 3,5-διγλυκοζίτες). Αυτές οι ενώσεις είναι γνωστές για τις ιδιότητές τους να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν την οξείδωση των λιπιδίων *in vitro*. Ωστόσο, η runicalagin της φλούδας είναι ένα από τα σημαντικότερα φυτοχημικά που συμβάλλουν στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού ροδιού, ενώ οι ανθοκυανίνες παίζουν μόνο ένα μικρό ρόλο σε αυτή τη δράση. [1, 2, 6, 9]

Ο μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης αυτών των ενώσεων δεν είναι ακόμη σαφώς κατανοητός διότι οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με βιολογικά συστήματα είναι πολύ περίπλοκοι και διάφοροι παράγοντες μπορούν να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο. Τα πολυφαινολικά μόρια ροδιού υφίστανται αντιδράσεις οξειδοαναγωγής επειδή οι φαινολικές υδροξυλομάδες δίνουν εύκολα υδρογόνο στους αναγωγικούς παράγοντες. Οι αναγωγικές ιδιότητες γενικά συνδέονται με την παρουσία αναγωγών. Η αντιοξειδωτική δράση των αναγωγών βασίζεται στη θραύση της αλυσίδας ελευθέρων ριζών με τη δωρεά ενός ατόμου υδρογόνου. Οι αναγωγικές ενώσεις αντιδρούν επίσης με ορισμένους πρόδρομους υπεροξειδίων, εμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό υπεροξειδίων. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται στην ικανότητά τους να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες ή να σχηματίζουν χηλικά μεταλλικά κατιόντα. [2]

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ροδιών εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως από την ποικιλία και τις κλιματολογικές συνθήκες κατά την ωρίμανση και από το τμήμα των χρησιμοποιούμενων φρούτων. Έχει βρεθεί ότι ένα μεθανολικό εκχύλισμα φλούδας ροδιού έχει πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από εκείνη των σπόρων ενώ τα ομογενοποιημένα προϊόντα που παρασκευάζονται από ολόκληρο το φρούτο παρουσιάζουν περίπου 20 φορές υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από αυτή του χυμού από τις αρίλες. [2]

1.3.2.9. Άλλες ιδιότητες

Το ρόδι μπορεί να προσφέρει και ένα πλήθος άλλων βελτιωτικών για την υγεία επιδράσεων σχετικά με την εντερική μικροχλωρίδα, την ποιότητα σπέρματος, τη στυτική δυσλειτουργία, την παχυσαρκία, την εξασφάλιση της υγείας του ήπατος, την ύπαρξη αντικών ιδιοτήτων. Εντούτοις, χρειάζονται πιο

ενδελεχείς μελέτες για να επιβεβαιωθούν αυτές οι επιδράσεις, επειδή υπάρχουν πολύ λίγες αναφορές στην επιστημονική βιβλιογραφία για να τεκμηριωθούν αυτά τα αποτελέσματα. [2, 10]

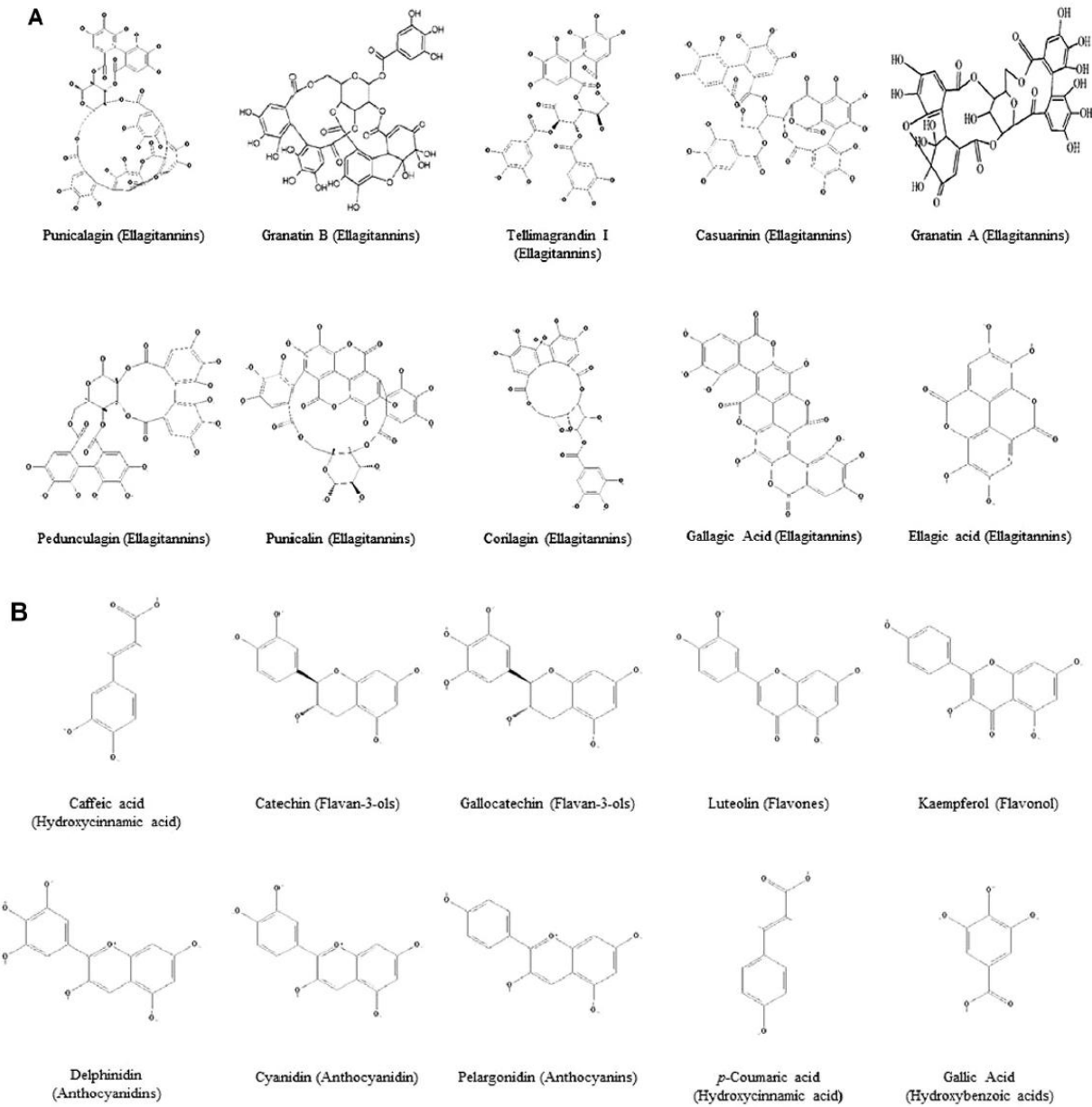
1.4. Εκχύλισμα Φλούδας Ροδιού

1.4.1. Γενικά Στοιχεία

Η φλούδα του ροδιού αν και θεωρείται μη εδώδιμο τμήμα του φρούτου, και απόβλητο, περιέχει ακόμη και υψηλότερες ποσότητες συγκεκριμένων θρεπτικά πολύτιμων και βιολογικά δραστικών συστατικών σε σύγκριση με τους βρώσιμους καρπούς. Η φλούδα του ροδιού και τα εκχυλίσματά της δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, διαθέτουν αντιμικροβιακές, αντι-αθηρογόνες και αντιμεταλλαξιόνες ιδιότητες κι επιδρούν θετικά ενάντια σε πολλές κρίσιμες ασθένειες. Επίσης, παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, χρωστικές και αρωματικές ιδιότητες και μπορούν ακόμη να λειτουργήσουν ως εξαιρετικά φυσικά πρόσθετα για τη διατήρηση των τροφίμων και την ενίσχυση της ποιότητάς τους. Κατά συνέπεια, η χρήση των κλασματωμένων ενώσεων της φλούδας στη βιομηχανία τροφίμων αυξάνεται. Επίσης, δεδομένου ότι το κλάσμα φλούδας ροδιού είναι μια πολύτιμη δεξαμενή διαφοροποιημένων πολυφαινολών, όπως μονοσακχαριτών και ολιγομερών ελλαγικών τανινών, έχει χρησιμοποιηθεί συχνά ως φυσικό αντιοξειδωτικό σε διάφορα διαιτητικά συμπληρώματα. [6]

1.4.2. Χημική Σύνθεση Φλούδας Ροδιού

Όπως προαναφέρθηκε, η φλούδα του ροδιού αντιπροσωπεύει περίπου το 50% του βάρους του και αποτελεί σημαντική πηγή βιοδραστικών ενώσεων όπως φαινολικά, флаβονοειδή, ελλαγικές τανίνες (ETs) και ενώσεις προανθοκυανιδίνης (Εικόνα 4), μέταλλα, κυρίως κάλιο, άζωτο, ασβέστιο, φωσφόρο, μαγνήσιο και νάτριο, και πολύπλοκοι πολυσακχαρίτες που συνολικά παρουσιάζουν ισχυρά αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αποπρωτικές ιδιότητες. Περίπου το 30% όλων των ανθοκυανινών του ροδιού συγκεντρώνονται στο τμήμα φλούδας. Το κόκκινο/μωβ χρώμα των ενώσεων αυτών παρέχει το πλούσιο χρώμα στη φλούδα του ροδιού. Η φλούδα περιέχει το πιο σημαντικό σύνολο φαινολικών (κυρίως εκείνων που προέρχονται από υδρολυόμενες τανίνες) σε σύγκριση με οποιοδήποτε άλλο τμήμα του φρούτου. [2, 6]



Εικόνα 4: Χημικές δομές επιλεγμένων ενώσεων σε φλούδα ροδιού. [6]

Οι υδρολύμενες πολυφαινόλες της φλούδας, συγκεκριμένα οι ελλαγικές τανίνες, είναι τα πιο δραστικά αντιοξειδωτικά μεταξύ των τανινών που υπάρχουν σε αυτή. Αυτές οι ενώσεις (ελλαγικό οξύ, punicalagin, punicalin και γαλαγικό οξύ) έχει αποδειχθεί ότι διατηρούν αυξημένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες και κυρίως ότι δρουν συνεργιστικά. Η ένωση punicalagin (Εικόνα 2, αριστερά) είναι ένα μεγάλο αντιοξειδωτικό πολυφαινόλης. Στην ελλαγική αυτή τανίνη τα γαλακτικά και γαλλικά οξέα συνδέονται με ένα τμήμα σακχάρου. Αυτό το μόριο με μοριακό βάρος πάνω από 1000 Daltons δεν εισέρχεται στο ανθρώπινο σώμα άθικτο. Αντ' αυτού, διασπάται σε τμήματα ελλαγικού οξέος που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος για αρκετές ώρες. [6, 8]

Οι ελλαγιικές τανίνες υψηλού μοριακού βάρους είναι υδατοδιαλυτές φυτικές φαινολικές ενώσεις που παράγουν διαφορετικά βιολογικά παραπροϊόντα κατά την υδρόλυση. Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, οι ελλαγιικές τανίνες που λαμβάνονται από το στόμα υφίστανται μικροβιακή υδρόλυση από τη μικροχλωρίδα του εντέρου σε σχετικά μικρότερη ένωση, δηλαδή ελλαγιικό οξύ και, κατά τον περαιτέρω βακτηριακό μεταβολισμό, σε ουρολιθίνες. Η υδρόλυση ελλαγιικών τανινών, είτε μέσω όξινης, βασικής ή μικροβιακής δραστηριότητας, αποδίδει ελλαγιικό οξύ. Η ένωση runicalagin είναι μοναδική για το ρόδι και πρόκειται για το κύριο συστατικό της φλούδας του ροδιού. Αποτελεί μέρος μιας οικογένειας ελλαγιικών τανινών που περιλαμβάνει τις μικρές τανίνες που ονομάζονται runicalin και γαλακτικό οξύ, οι οποίες χαρακτηρίζονται από καλή υδατοδιαλυτότητα. [6, 11, 12]

Η φλούδα περιέχει υψηλή συγκέντρωση υδρολυόμενων τανινών, δηλαδή 27-172 g/kg, με επικράτηση μονομερών φαινολικών. Οι μονομερείς υδρολυόμενες τανίνες έχει βρεθεί ότι έχουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση σε σύγκριση με ολιγομερείς τανίνες και διμερείς και τριμερείς προκυανιδίνες. Οι χημικές δομές των υδρολυόμενων είτε των συμπυκνωμένων τανινών ή των φλαβονοειδών ευθύνονται για την τάση που έχουν, να δρουν ως αντιοξειδωτικά, ή να παρουσιάζουν αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά. Οι ελλαγιικές τανίνες της φλούδας, οι οποίες φέρουν πολλαπλές φαινολικές υδροξυλομάδες, μεταφέρουν υπολείμματα υδροξυλίου σε ελεύθερες ρίζες, μειώνοντας έτσι αυτά τα επιβλαβή είδη. Γενικά, η σχετική ισχύς των φλαβονοειδών του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού να δρουν ως αντιοξειδωτικά αποδίδεται στον αριθμό και τη διαμόρφωση των ομάδων υδροξυλίου. [2, 6, 9, 10]

Τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, παρά οι ανθοκυανίνες, είναι οι κυρίαρχες ενώσεις που επηρεάζουν τη βιοδραστικότητα του ροδιού. Ορισμένες ελλαγιικές τανίνες και πολυφαινόλες που περιέχονται τόσο στη φλούδα όσο και στο χυμό του ροδιού έχει αποδειχθεί ότι ασκούν ανασταλτική δράση έναντι σε διάφορα ιικά στελέχη όπως HIV, H5N1 του ιού της γρίπης, ηπατίτιδα Β και C, αλλά οι σχέσεις δομής-δραστικότητας για αυτά τα αποτελέσματα δεν έχουν διερευνηθεί. [6, 10]

Οι ελλαγιικές τανίνες ασκούν αντιβακτηριακές δράσεις σε έναν μεγάλο αριθμό παθογόνων και μολυσματικών μικροοργανισμών (π.χ. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Proteus mirabilis*) αλλά, δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη μελέτη δομής-δραστικότητας για τα αντιβακτηριακά αποτελέσματα. [2, 6, 10]

1.5. Χυμός Ροδιού

1.5.1. Γενικά Στοιχεία

Ο χυμός ροδιού είναι ένας πλούσιος σε πολυφαινολικά συστατικά φρουτοχυμός με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Σε ορισμένες μελέτες σε ανθρώπους και ποντίκια, ο χυμός ροδιού έχει δείξει σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιυπερτασικές και αντι-φλεγμονώδεις επιδράσεις, θετική συμβολή στην καταπολέμηση του διαβήτη τύπου 2, μειώνοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων, και πιθανά καρδιοπροστατευτικά οφέλη από την κατανάλωση του φρουτοχυμού, τα οποία αξίζουν περαιτέρω κλινική έρευνα. [13]

Οι αρίλες, από τις οποίες προκύπτει ο φρέσκος χυμός, περιέχουν 85% νερό, 10% ολικά σάκχαρα, κυρίως φρουκτόζη και γλυκόζη, 1,5% πηκτίνη, οργανικά οξέα όπως ασκορβικό οξύ, κιτρικό οξύ και μηλικό οξύ και βιοδραστικές ενώσεις όπως φαινόλες και φλαβονοειδή, κυρίως ανθοκυανίνες. Σε χυμό ροδιού, η φρουκτόζη και η γλυκόζη υπάρχουν σε παρόμοιες ποσότητες, το ασβέστιο είναι το 50% της περιεκτικότητάς του σε τέφρα και τα κύρια αμινοξέα είναι γλουταμινικά και ασπαρτικά οξέα. Η

περιεκτικότητα σε διαλυτή πολυφαινόλη κυμαίνεται μεταξύ 0,2 και 1,0% και περιλαμβάνει κυρίως ελλαγιικές τανίνες, γαλλικά και ελλαγιικά οξέα, ανθοκυανίνες και κατεχίνες. [1, 2, 6]

1.5.2. Πολυφαινολικά Συστατικά Χυμού Ροδιού

Σύμφωνα με κάποιες μελέτες, η αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού ροδιού βρέθηκε να είναι τρεις φορές υψηλότερη από εκείνη του κόκκινου κρασιού και του πράσινου τσαγιού, έχει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών σε σύγκριση με χυμούς φρούτων που καταναλώνονται συνήθως, όπως το σταφύλι, το γκρέιπφρουτ ή ο χυμός πορτοκαλιού. Οι κύριες αντιοξειδωτικές πολυφαινόλες στο χυμό ροδιού περιλαμβάνουν τις ελλαγιικές τανίνες και τις ανθοκυανίνες. Τόσο οι ελλαγιικές τανίνες όσο και οι ανθοκυανίνες αποτελούν ομάδες με την υψηλότερη περιεκτικότητα στο χυμό ροδιού ενώ η λουτεολίνη (φλαβονοειδές) και το ελλαγιικό οξύ (ελλαγιική τανίνη) αποτελούν τα κύρια συστατικά του χυμού ροδιού. [2, 13-17]

Οι ανθοκυανίνες περιλαμβάνουν τη δελφινιδίνη, την κυανιδίνη και 3-γλυκοζίτες και 3,5-διγλυκοζίτες πελαργονιδίνης (pelargonidin). Οι ελλαγιικές τανίνες αντιπροσωπεύουν το 92% της αντιοξειδωτικής δράσης του χυμού ροδιού και συγκεντρώνονται στις φλούδες, τις μεμβράνες και τις καρδιές των σπόρων. Ο εμπορικός χυμός ροδιού, ο οποίος λαμβάνεται πιέζοντας ολόκληρο το φρούτο ροδιού και τις φλούδες, περιέχει σημαντικές ποσότητες των υδατοδιαλυτών runicalagins, οι οποίες είναι μεταβλητές ανάλογα με τις καλλιέργειες φρούτων, τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης. [13, 14]

Οι φυσιολογικές επιδράσεις των συστατικών του χυμού ροδιού είναι αξιοσημείωτες όσον αφορά στην πρόληψη έναντι δύο κύριων χρόνιων ασθενειών οι οποίες είναι οι καρδιακές παθήσεις και καρκίνος. Στις καρδιακές παθήσεις, το πρωτοποριακό έργο του Michael Aviram σε πολυφαινόλες από ρόδι έδειξε την ικανότητά τους να μειώνουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και την αύξηση της αρτηριοσκλήρωσης σε ζωικά μοντέλα. Ο βραβευμένος με το βραβείο Νόμπελ Lou Ignarro επέδειξε αξιοσημείωτη ενίσχυση της παραγωγής νιτρικού οξειδίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα, γεγονός που αποκαλύπτει έναν άλλο συναρπαστικό και ίσως πρωταρχικό τρόπο για την πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων. [1]

Αναφορικά με την πρόληψη έναντι του καρκίνου, υπάρχουν σημαντικά νέα ευρήματα που υποδηλώνουν ότι ο χυμός ροδιού μπορεί να είναι δραστικός έναντι κοινών μορφών καρκίνου. Σε βασικές εργαστηριακές μελέτες, τα εκχυλίσματα χυμού ροδιού και οι τανίνες καθώς και οι ανθοκυανίνες έχουν σημαντικές αντιπολλαπλασιαστικές και προαποπτωτικές επιδράσεις σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων in vitro συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου, του καρκίνου του προστάτη και του καρκίνου του εγκεφάλου και του τραχήλου. [1, 10]

1.6. Τοξικότητα Ροδιού

Γενικά, η τοξικότητα του ροδιού δεν έχει μελετηθεί εντατικά. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, δεν παρατηρούνται τοξικές επιδράσεις σε ποντίκια που έχουν υποστεί αγωγή με υδατικά εκχυλίσματα ροδιού παρόμοια με εκείνα που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική. Έχει βρεθεί ότι το υδροαλκοολικό εκχύλισμα ροδιού μπορεί να προκαλέσει γενετική βλάβη και απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να καθοριστεί σε ποιο βαθμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ολόκληρο το εκχύλισμα ροδιού ή τα συστατικά του χωρίς κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. [18, 19]

Η από του στόματος κατάποση χυμού ροδιού θεωρείται ασφαλής για τους περισσότερους ανθρώπους ενώ υπάρχουν ορισμένοι που δύναται να εμφανίσουν κάποια αλλεργική αντίδραση σε φρούτα ροδιού. Επίσης, το εκχύλισμα ροδιού είναι, γενικά, ασφαλές όταν εφαρμόζεται στο δέρμα. Υπάρχει, όμως, περίπτωση να εμφανίσει κανείς συμπτώματα ευαισθησίας όπως φαγούρα και ρινική καταρροή. Τα φρούτα ροδιού (εκτός από τη φλούδα) δεν είναι τοξικά, αλλά οι ρίζες και η φλούδα του ροδιού είναι. Η τοξική δραστηριότητα ενός εκχυλίσματος φλούδας ροδιού σχετίζεται με την περιεκτικότητά του σε αλκαλοειδή. [18-24]

2. Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) έχουν αποτελέσει στόχο εντατικής έρευνας λόγω μοναδικών δομικών, φυσικών και χημικών ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα, η ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με επιθυμητά μόρια είναι από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Επιπλέον, σύμπλοκα εγκλεισμού με διάφορους τύπους φιλοξενούμενων μορίων θα μπορούσαν να απομονωθούν αναστρέψιμα με χρήση εξωτερικών ερεθισμάτων. Αυτά τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά έχουν δώσει μια μοναδική οδό για την κατασκευή νανομηχανών με τη χρήση κυκλοδεξτρινών. [25]

2.1. Γενικά Στοιχεία

Ένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά των κυκλοδεξτρινών είναι ότι σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού τόσο σε διάλυμα όσο και σε στερεά κατάσταση, όπου κάθε φιλοξενούμενο μόριο περιβάλλεται από το υδρόφοβο περιβάλλον της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή των φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων των φιλοξενούμενων μορίων και μπορεί τελικά να έχει σημαντικό αντίκτυπο στις διάφορες εφαρμογές. Οι φυσικά και χημικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για να βελτιώσουν τις διάφορες ιδιότητες του φιλοξενούμενου μορίου, όπως η διαλυτότητα, ο ρυθμός διάλυσης, η σταθερότητα ή η βιοδιαθεσιμότητα. [26]

Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή φαρμάκων, φυτοφαρμάκων, τροφίμων και προϊόντων καλλωπισμού – οι εγκλεισμένες δραστικές και αρωματικές ουσίες που περικλείονται εντός αυτών προστατεύονται από τις επιδράσεις του φωτός και της ατμόσφαιρας και μπορούν εύκολα να διακινούνται και σε μορφή σκόνης. Ο εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνη μπορεί επίσης να οδηγήσει σε μια αυξημένη διαλυτότητα της εγκλεισμένης ουσίας ενώ οι κρέμες και τα γαλακτώματα μπορούν να σταθεροποιηθούν. Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να τροποποιηθούν χημικά για πολλούς διαφορετικούς σκοπούς. [27]

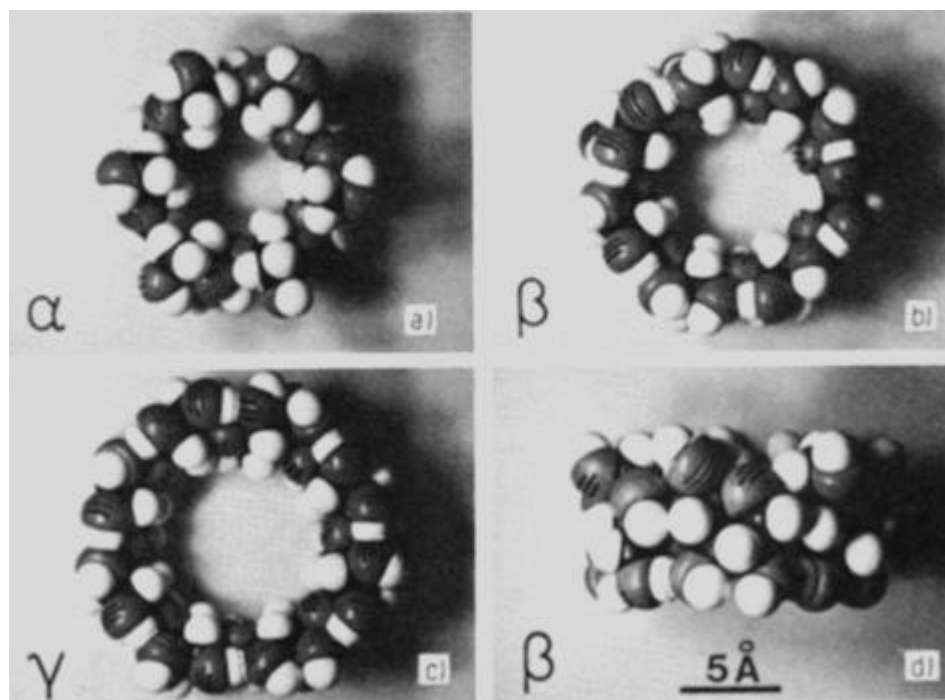
Επιπρόσθετα, οι ενώσεις εγκλεισμού χρησιμοποιούνται επίσης σε εργαστήρια και στη βιομηχανία ως ιοντοανταλλάκτες, ως καταλύτες σε χημικές αντιδράσεις ή για το μικρο-εγκλεισμό ευαίσθητων, ενεργών και αρωματικών ουσιών. Η σημαντικότερη ιδιότητα των ενώσεων εγκλεισμού είναι ότι ένα συστατικό "ξενιστής" μπορεί να δέχεται "φιλοξενούμενα" συστατικά στην κοιλότητα του χωρίς να σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί. [27]

2.2. Ιδιότητες

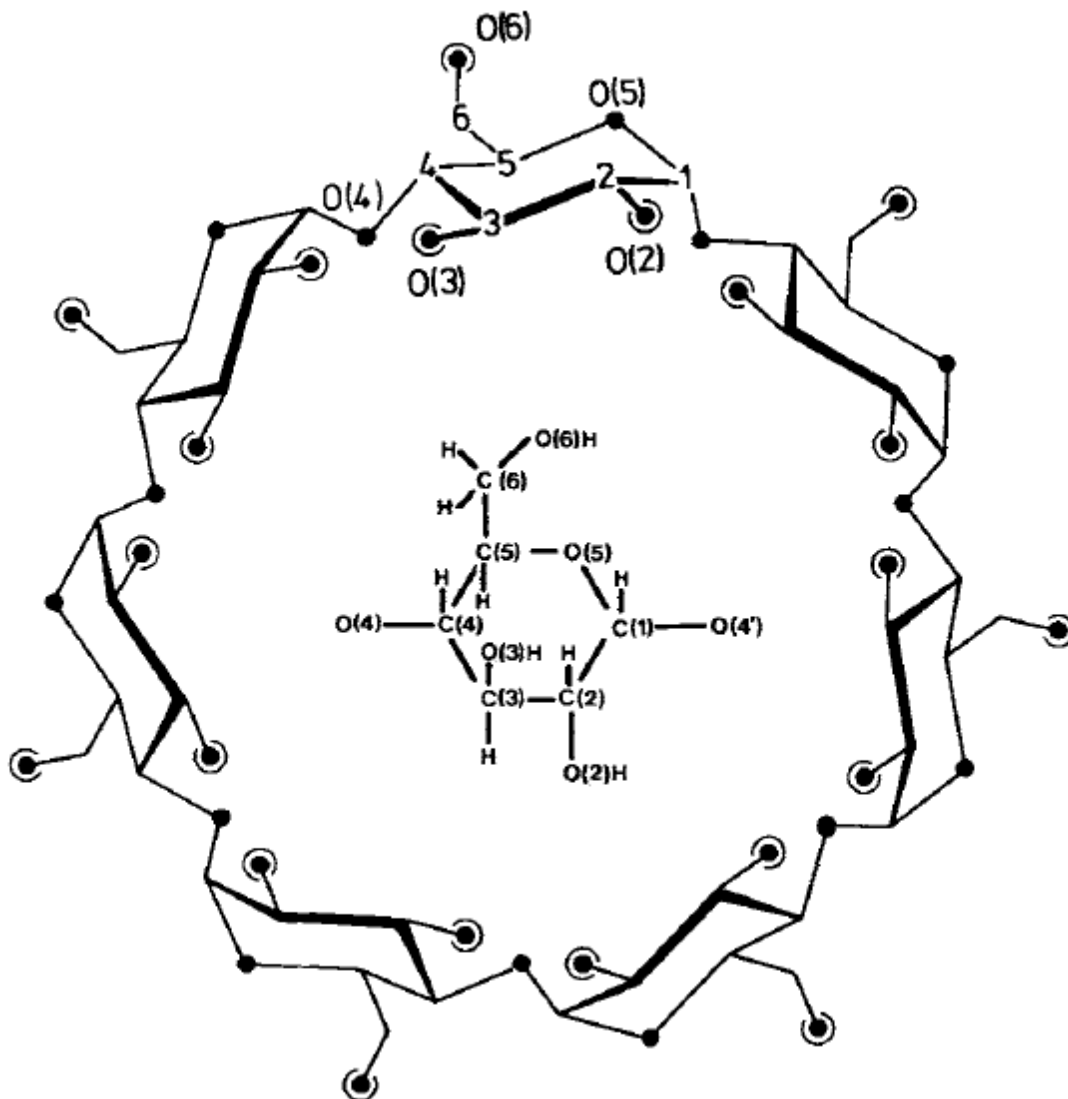
Οι κυκλοδεξτρίνες απομονώθηκαν αρχικά το 1891 από τους Villiers ως προϊόντα αποικοδόμησης αμύλου και χαρακτηρίστηκαν ως κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες το 1904 από τον Schardinger. Για το λόγο αυτό οι κυκλοδεξτρίνες (κυκλοαμυλόζες) περιγράφονται από ορισμένους συγγραφείς, ειδικά στην παλαιότερη βιβλιογραφία, ως δεξτρίνες Schardinger. Το 1938 ο Freudenberg ανέφερε ότι οι κυκλοδεξτρίνες κατασκευάζονται από μονάδες γλυκόζης που συνδέονται με α (1→4) γλυκοζυτικό δεσμό, αλλά τα μοριακά βάρη των πλέον κοινών α -, β - και γ -κυκλοδεξτρινών προσδιορίστηκαν πολύ αργότερα (Εικόνες 5 και 6, Πίνακας 3). Ο Freudenberg αναγνώρισε ότι οι κυκλοδεξτρίνες θα μπορούσαν να σχηματίσουν ενώσεις εγκλεισμού και, όπως ο French, επεξεργάστηκε διαδικασίες για τη σύνθεση καθαρών κυκλοδεξτρινών. Ο σχηματισμός των συμπλοκών με κυκλοδεξτρίνες μελετήθηκε συστηματικά

από τον Cramer. Ο Cramer επίσης ανακάλυψε ότι οι κυκλοδεξτρίνες έχουν καταλυτική δράση σε μερικές αντιδράσεις και περιέγραψε την ανάλυση του ρακεμικού με κυκλοδεξτρίνες. [27]

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κυκλοδεξτρίνες είναι η α -, η β - και η γ -κυκλοδεξτρίνη. Πρόκειται για κυκλικούς ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενους από έξι, επτά ή οκτώ μονάδες γλυκόζης αντίστοιχα, οι οποίες μπορούν να ληφθούν από άμυλο σε μεγάλη κλίμακα. Σχηματίζουν ενώσεις εγκλεισμού με μικρότερα μόρια που ταιριάζουν στην κοιλότητα των 5-8 Å. Αυτά τα (κρυσταλλικά) σύμπλοκα παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την επιστημονική έρευνα καθώς υπάρχουν σε υδατικό διάλυμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μελετήσουν τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που είναι σημαντικές στα βιολογικά συστήματα. [27, 28]



Εικόνα 5: α) α -κυκλοδεξτρίνη από την πλευρά O (6), b) και c) β - και γ -κυκλοδεξτρίνες αντίστοιχα όπως φαίνεται από το O (2), O (3) με κλειστό δακτύλιο O (3). . . O (2) δεσμούς υδρογόνου μεταξύ γειτονικών μονάδων γλυκόζης. d) πλάγια όψη της β -κυκλοδεξτρίνης (μοντέλο CPK). Όλες οι κυκλοδεξτρίνες έχουν ύψος δακτυλίου περίπου 8 Å (βλέπε εικόνα 6). [27]



Εικόνα 6: Χημική δομή και αρίθμηση των υποφαινόμενων ατόμων για την β-κυκλοδεξτρίνη. Με μαύρη κουκίδα απεικονίζονται τα άτομα οξυγόνου και με κύκλο οι υδροξυλομάδες. [27]

Πίνακας 3: Μερικές φυσικές ιδιότητες των κυκλοδεξτρίνων. Ύψος του δακτυλίου κυκλοδεξτρίνης: 7,9 – 8 Å (μετρούμενο με τη βοήθεια μοντέλων CPK). [27]

Κυκλοδεξτρίνη	Αριθμός μονάδων γλυκόζης	Μοριακό Βάρος (g/mol)	Διαλυτότητα σε νερό ¹	[α] _D ²⁵	Διάμετρος (Å) ²	
					Κοιλότητας	Εξωτερική
α	6	972	14,5	150,5 ± 0,5	4,7 – 5,2	14,6 ± 0,4
β	7	1135	23,2	162,5 ± 0,5	6,0 – 6,4	15,4 ± 0,4
γ	8	1297	1,85	177,4 ± 0,5	7,5 – 8,3	17,5 ± 0,4
Διαλυτότητα σε ³						
T (°C)	Νερό	Αιθανόλη	n-Προπανάλη	Γλυκερίνη	διμεθυλοφορμαμίδιο	διμεθυλοσουλφοξείδιο
25	1,79	0,1	0,1	4,3	άριστη	
45	3,1	0,1	0,1	0,8		

Λόγω της ικανότητάς τους να συνδέονται ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά με άλλες κυκλοδεξτρίνες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δομικά τεμάχια για την κατασκευή υπερμοριακών συμπλοκών. Η ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με οργανικά μόρια ξενιστών προσφέρει δυνατότητες δημιουργίας υπερμοριακών νημάτων. Αυτά τα δομικά στοιχεία, τα οποία δεν μπορούν να παρασκευαστούν με άλλες μεθόδους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για παράδειγμα, για τον διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων μορίων και εναντιομερών. [29]

2.3. Τοξικολογικές Εκτιμήσεις

Τα προφίλ ασφαλείας των τριών πιο κοινών φυσικών κυκλοδεξτρίνων και ορισμένων από τα παράγωγά τους έχουν πρόσφατα αναθεωρηθεί. Γενικά, οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες και τα υδρόφιλα παράγωγά τους είναι ικανές να διεισδύσουν μόνο σε λιπόφιλες βιολογικές μεμβράνες, όπως στον οφθαλμό του κερατοειδούς, με μεγάλη δυσκολία. Ακόμη και η λιπόφιλη τυχαία μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη δεν διαπερνά εύκολα τις λιπόφιλες μεμβράνες, αν και αλληλεπιδρά ευκολότερα με τις μεμβράνες από ότι τα υδρόφιλα παράγωγα της κυκλοδεξτρίνης. Όλες οι μελέτες τοξικότητας έδειξαν ότι οι από του στόματος χορηγούμενες κυκλοδεξτρίνες είναι πρακτικά μη τοξικές, λόγω μη απορρόφησης τους από την γαστρεντερική οδό.

Επιπλέον, αρκετές αξιολογήσεις ασφαλείας έχουν δείξει ότι η γ-κυκλοδεξτρίνη, η 2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη, η θειική α-κυκλοδεξτρίνη και η μαλτοζυλ β-κυκλοδεξτρίνη φαίνεται να είναι ασφαλείς ακόμη και όταν χορηγούνται παρεντερικά. Ωστόσο, τοξικολογικές μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η πρώτη γενιά α- και β-κυκλοδεξτρίνη και οι μεθυλιωμένες β-κυκλοδεξτρίνες δεν είναι κατάλληλες για παρεντερική χορήγηση. [29]

¹ g/100mL διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου

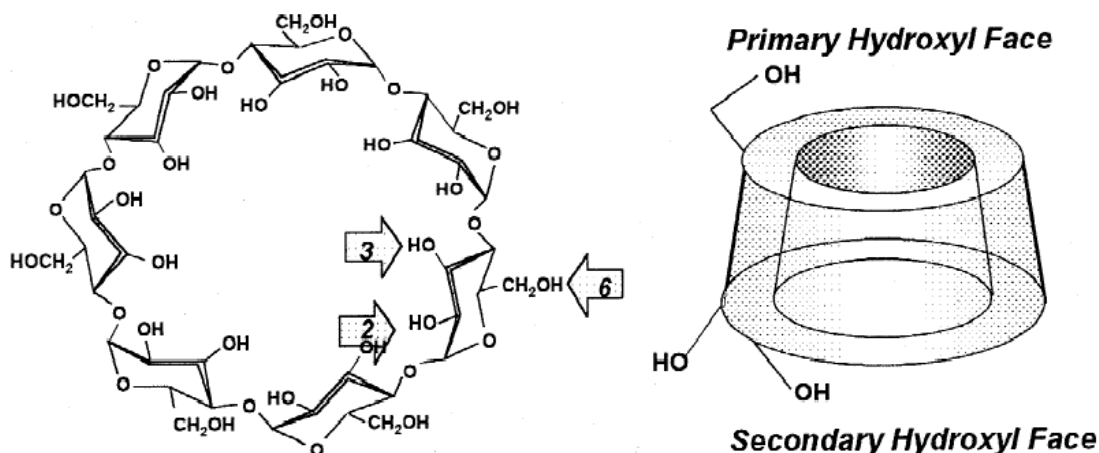
² Όπως μετράται σε μοντέλα CPK (βλέπε εικόνα 5): η μικρότερη τιμή είναι για το δακτύλιο των ατόμων H που συνδέονται με το C (5) και η μεγαλύτερη τιμή για τον δακτύλιο των ατόμων H συνδεδεμένων με το C (3).

³ g β-κυκλοδεξτρίνης/100 mL διαλύματος.

2.4. β-κυκλοδεξτρίνη

Ήδη από το 1986, η β-κυκλοδεξτρίνη έχει αναγνωρισθεί επισήμως ως ενζυματικά τροποποιημένο άμυλο. Ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα τρόφιμα στα οποία, σύμφωνα με τους ήδη ισχύοντες κανονισμούς (θετικοί κατάλογοι συστατικών (positive lists of ingredients)), επιτρέπεται η χρήση ενζυματικά τροποποιημένου αμύλου. Από το 2001, η β-κυκλοδεξτρίνη χαρακτηρίζεται γενικά αναγνωρισμένη ως ασφαλής (GRAS) ως φορέας οσμής και γεύσης (flavor carrier) και προστασίας, σύμφωνα με την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (USFDA). [30, 31]

Η β-κυκλοδεξτρίνη είναι η πιο συνηθισμένη φυσική κυκλοδεξτρίνη γιατί είναι η πιο προσιτή, με τη χαμηλότερη τιμή και ευνοείται η χρήση της λόγω μεγέθους. Έχει 21 υδροξυλομάδες, δηλαδή επτά πρωτεύοντα και 14 δευτεροταγή υδροξύλια (Εικόνα 7). Όλες αυτές οι ομάδες υδροξυλίου είναι διαθέσιμες ως σημεία εκκίνησης για δομικές τροποποιήσεις και διάφορες λειτουργικές ομάδες έχουν εισαχθεί στον μακροκυκλικό δακτύλιο. Η β-κυκλοδεξτρίνη και τα παράγωγά της είναι ικανά να βελτιώσουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φιλοξενούμενων μορίων. [26, 29, 32]

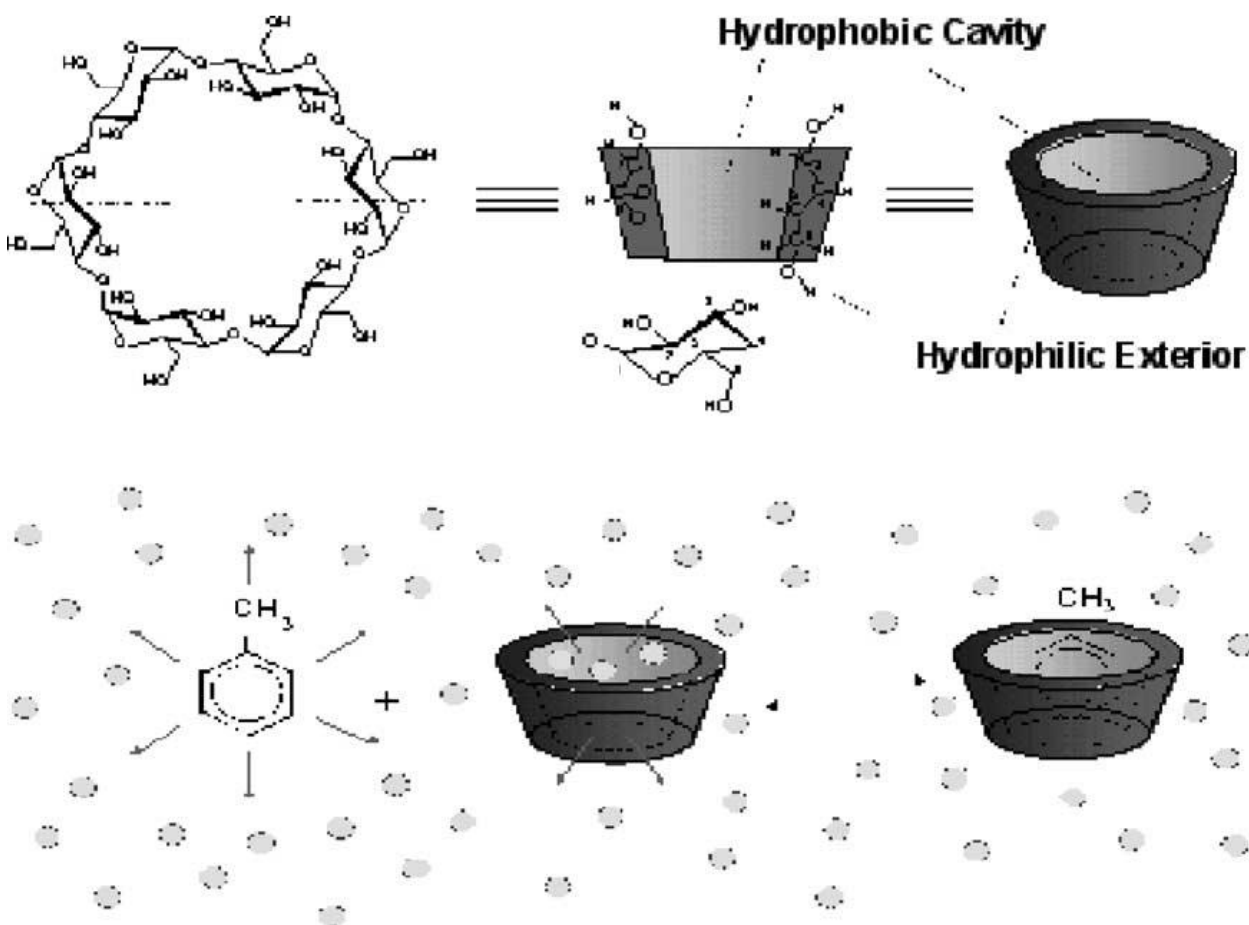


Εικόνα 7: Υδροξύλια που βρίσκονται στην άκρη του δακτυλίου της β-κυκλοδεξτρίνης. [26]

Η υδρόφιλη επιφάνεια και η υδρόφοβη κοιλότητα της επιτρέπουν τον εγκλεισμό των μη πολικών φιλοξενούμενων μορίων, τα οποία μπορούν να εισέλθουν εν μέρει ή εξ ολοκλήρου στην υδρόφοβη κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης, μετακινώντας τα μόρια νερού υψηλής ενέργειας. Η β-κυκλοδεξτρίνη μπορεί όχι μόνο να σταθεροποιήσει και να προστατέψει την εγκλεισμένη ένωση από τους μηχανισμούς αποικοδόμησης που προκαλούνται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, αλλά μπορεί επίσης να μειώσει τις αισθητικές μεταβολές με την κάλυψη δυνατών αρωμάτων και γεύσεων. Επιπλέον, ο εγκλεισμός με β-κυκλοδεξτρίνη μπορεί να τροποποιήσει τις φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες του φιλοξενούμενου μορίου βελτιώνοντας το ρυθμό διάλυσης, τη διαπερατότητα των κυττάρων και τη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμακοτροφίμων (nutraceuticals) χαμηλής διαλυτότητας. [31]

2.5. Σχηματισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των κυκλοδεξτρίνων είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν συμπαγή σύμπλοκα εγκλεισμού (συμπλέγματα ξενιστών-φιλοξενούμενων μορίων) με ένα πολύ ευρύ φάσμα στερεών, υγρών και αερίων ενώσεων, με μοριακή συμπλοκοποίηση. Σε αυτά τα σύμπλοκα (Εικόνα 8), ένα φιλοξενούμενο μόριο συγκρατείται εντός της κοιλότητας του μορίου ξενιστή κυκλοδεξτρίνης. Ο σχηματισμός συμπλόκου βασίζεται σε διαστασιολογική προσαρμογή μεταξύ της κοιλότητας του ξενιστή και του φιλοξενούμενου μορίου. Οι ενώσεις που δύναται να εγκλειστούν με τη βοήθεια κυκλοδεξτρίνων είναι κατά κύριο λόγο αλειφατικές, αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, οργανικά οξέα, λιπαρά οξέα, αρωματικά, αέρια και πολικές ενώσεις όπως ευθείες ή διακλαδισμένες αλυσίδες όπως αλογόνα, οξυοξέα και αμίνες. [29]



Εικόνα 8: Δομή κυκλοδεξτρίνης και σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού. [29]

Η λιπόφιλη κοιλότητα των μορίων κυκλοδεξτρίνης είναι ουσιαστικά ένα μικροπεριβάλλον εντός του οποίου μπορούν να εισέλθουν κατάλληλα μεγέθη μη πολικών μορίων για να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού. Μη ομοιοπολικοί δεσμοί διασπώνται ή σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του συμπλόκου. Η κύρια κινητήρια δύναμη του σχηματισμού συμπλόκου είναι η απελευθέρωση πλούσιων σε ενθαλπία μορίων νερού από την κοιλότητα. Τα μόρια νερού αντικαθίστανται από τα πιο υδρόφοβα φιλοξενούμενα μόρια που υπάρχουν στο διάλυμα για να επιτευχθεί σύνδεση μεταξύ άπολων και η μείωση της τάσης του δακτυλίου κυκλοδεξτρίνης ώστε να επέλθει σε μια πιο σταθερή κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας. [29]

Μια δυναμική ισορροπία αποκαθίσταται μεταξύ των φιλοξενούμενων μορίων και της κυκλοδεξτρίνης του ξενιστή που οδηγεί στη δέσμευσή τους και δεν πρόκειται για μια μόνιμη ή σταθερή κατάσταση. Η δύναμη δέσμευσης εξαρτάται από το πόσο καλά αλληλεπιδρούν στο σύμπλοκο τα φιλοξενούμενα μόρια και ο ξενιστής αλλά και από συγκεκριμένες τοπικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιφανειακών ατόμων. Τα σύμπλοκα μπορούν να σχηματιστούν είτε σε διάλυμα είτε σε κρυσταλλική κατάσταση και το νερό είναι ο διαλύτης που συνήθως επιλέγεται. Ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μη υδατικός διαλύτης που εντάσσεται στην περίπτωση συμπλοκοποίησης με σύστημα συν-διαλύτη. Η αρχιτεκτονική της κυκλοδεξτρίνης παρέχει σε αυτά τα μόρια ευρύ φάσμα χημικών ιδιοτήτων σημαντικά διαφορετικών από εκείνες που εμφανίζονται από μη κυκλικούς υδατάνθρακες στο ίδιο εύρος μοριακού βάρους. [29]

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φιλοξενούμενων μορίων επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την ενσωμάτωσή τους σε κυκλοδεξτρίνες. Αυτό συμβαίνει γιατί τα φιλοξενούμενα μόρια προσωρινά κλειδώνονται ή τοποθετούνται μέσα στην κοιλότητα του ξενιστή προκαλώντας ευεργετικές τροποποιήσεις των φιλοξενούμενων μορίων, οι οποίες δεν μπορούν να επιτευχθούν με άλλο τρόπο. Αυτές οι τροποποιήσεις σχετίζονται με την ενίσχυση της διαλυτότητας των ιδιαίτερα αδιάλυτων φιλοξενούμενων μορίων, τη σταθεροποίηση ασταθών φιλοξενούμενων έναντι των αποικοδομητικών επιδράσεων της οξειδωσης, του ορατού ή υπεριώδους φωτός και της θερμότητας. Ακόμη, οι τροποποιήσεις αυτές σχετίζονται με τον έλεγχο της πηκτικότητας και της εξάχνωσης, τη φυσική απομόνωση των μη συμβατών ενώσεων, τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, την αλλοίωση της γεύσης με κάλυψη αρωμάτων, τις δυσάρεστες οσμές και την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων και γεύσεων. Σαν αποτέλεσμα, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα, καλλυντικά, στην προστασία του περιβάλλοντος, βιομετατροπή, συσκευασία και κλωστοϋφαντουργία. [29]

Δύο βασικοί παράγοντες επηρεάζουν την ικανότητα μιας κυκλοδεξτρίνης να σχηματίσει ένα σύμπλοκο εγκλεισμού με ένα μόριο. Ο πρώτος είναι η στερεοχημεία και σχετίζεται με το μέγεθος της κυκλοδεξτρίνης σε σχέση με το μέγεθος του φιλοξενούμενου μορίου ή με ορισμένες βασικές λειτουργικές ομάδες του φιλοξενούμενου μορίου. Εάν το φιλοξενούμενο μόριο δεν έχει το κατάλληλο μέγεθος, δεν θα τοποθετηθεί σωστά στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Ο δεύτερος κρίσιμος παράγοντας είναι οι θερμοδυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων συστατικών του συστήματος (κυκλοδεξτρίνη, φιλοξενούμενο μόριο, διαλύτης). Για ένα πολύπλοκο σχήμα, πρέπει να υπάρχει μια ευνοϊκή ενεργητική κινητήρια δύναμη που να τραβά το φιλοξενούμενο μόριο στην κυκλοδεξτρίνη. [29]

Όπως έχει προαναφερθεί, το ύψος της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης είναι το ίδιο και για τους τρεις τύπους ενώ ο αριθμός μονάδων γλυκόζης καθορίζει την εσωτερική διάμετρο της κοιλότητας, επομένως και τον όγκο της. Γίνεται, λοιπόν, εύκολα κατανοητό ότι η α-κυκλοδεξτρίνη μπορεί τυπικά να σχηματίζει σύμπλοκα με μόρια χαμηλού μοριακού βάρους ή ενώσεις με αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες, η β-κυκλοδεξτρίνη συνήθως συμπλοκοποιείται με αρωματικά και ετεροκυκλικά μόρια και η γ-κυκλοδεξτρίνη μπορεί να φιλοξενήσει μεγαλύτερα μόρια όπως μακροκυκλικά και στεροειδή. [29]

Εν γένει, υπάρχουν τέσσερις ενεργειακά ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις που συμβάλλουν στη μετατόπιση της ισορροπίας με στόχο το σχηματισμό συμπλόκου εγκλεισμού: [29]

- Η εκτόπιση πολικών μορίων νερού από την μη πολική κοιλότητα κυκλοδεξτρίνης.

- Ο αυξημένος αριθμός δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται καθώς το εκτοπισμένο νερό επιστρέφει στο εξωτερικό περιβάλλον της κυκλοδεξτρίνης.
- Μείωση των απωθητικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υδρόφοβου φιλοξενούμενου μορίου και του υδατικού περιβάλλοντος.
- Αύξηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων καθώς το φιλοξενούμενο μόριο εισέρχεται στη μη πολική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.

Η αρχική ισορροπία που αφορά στο σχηματισμό του συμπλόκου, αποκαθίσταται πολύ γρήγορα (συντά μέσα σε λίγα λεπτά), ενώ η αποκατάσταση της τελικής ισορροπίας μπορεί να διαρκέσει πολύ περισσότερο. Από τη στιγμή που το φιλοξενούμενο μόριο εισέλθει στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, κάνει διαμορφωτικές προσαρμογές για να εκμεταλλευτεί στο έπακρο τις υπάρχουσες δυνάμεις van der Waals. Υπάρχει μια ποικιλία τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό συμπλόκων και εξαρτώνται από τις ιδιότητες του δραστικού υλικού, την κινητική ισορροπίας, τα άλλα συστατικά και τις διεργασίες σχηματισμού και την επιθυμητή τελική δοσολογική μορφή. Ωστόσο, κάθε μια από αυτές τις διεργασίες απαιτεί μια μικρή ποσότητα νερού για την καθοδήγηση της θερμοδυναμικής. Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται είναι η απλή ανάμιξη σε ξηρή κατάσταση, η ανάμιξη σε διαλύματα και εναιωρήματα που ακολουθούνται από κατάλληλο διαχωρισμό, η παρασκευή παστών και αρκετές θερμομηχανικές τεχνικές. [29]

2.6. Τροποποιημένες Κυκλοδεξτρίνες (CDs)

Εκτός από αυτές τις φυσικώς απαντώμενες κυκλοδεξτρίνες, έχουν συντεθεί πολλά συνθετικά παράγωγα κυκλοδεξτρίνης τα οποία συνήθως παράγονται με αμινοποιήσεις, εστεροποιήσεις ή αιθεροποιήσεις πρωτοταγών και δευτεροταγών υδροξυλομάδων των κυκλοδεξτρινών. Ανάλογα με τον υποκαταστάτη, η διαλυτότητα των παραγώγων κυκλοδεξτρίνης είναι συνήθως διαφορετική από εκείνη των μητρικών κυκλοδεξτρινών τους. Ουσιαστικά, όλα τα παράγωγα έχουν έναν μεταβαλλόμενο όγκο υδρόφοβης κοιλότητας και επίσης αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να βελτιώσουν τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα έναντι του φωτός ή του οξυγόνου και να βοηθήσουν στον έλεγχο της χημικής δραστηριότητας των φιλοξενούμενων μορίων. [29]

Η λειτουργικότητα των κυκλοδεξτρινών αυξάνεται σημαντικά με χημική τροποποίηση λόγω της ύπαρξης πολλαπλών δραστικών ομάδων υδροξυλίου. Με αυτό τον τρόπο επεκτείνονται οι εφαρμογές των κυκλοδεξτρινών. Οι κυκλοδεξτρίνες τροποποιούνται μέσω υποκατάστασης διαφόρων λειτουργικών ενώσεων στην πρωτεύουσα ή/και δευτερεύουσα όψη του μορίου. Οι τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μιμητικά ενζύμων επειδή οι υποκατεστημένες λειτουργικές ομάδες δρουν στη μοριακή αναγνώριση. Η ίδια ιδιότητα χρησιμοποιείται για την στοχοθετημένη χορήγηση φαρμάκων και την αναλυτική χημεία, καθώς οι τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες δείχνουν αυξημένη εναντιοεκλεκτικότητα έναντι των εγγενών κυκλοδεξτρινών. [29]

Εντατική έρευνα αναμένεται στον τομέα της χημικής και ενζυμικής τροποποίησης των κυκλοδεξτρινών. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι κυκλοδεξτρίνες περιέχουν 18 (α -CD), 21 (β -CD) ή 24 (γ -CD) υποκατεστημένες υδροξυλομάδες, ο αριθμός των πιθανών παραγώγων είναι απεριόριστος. Μέχρι το 1997, είχαν δημοσιευτεί οι συνθέσεις περισσότερων από 1500 παραγώγων. Τα γνωστά παράγωγα μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τους υποκαταστάτες τους, την πολικότητα τους, το μέγεθος κλπ. Για πρακτικούς σκοπούς μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής: φορείς (διαλυτοποιητές, σταθεροποιητές)

για βιολογικώς δραστικές ουσίες, ενζυμικά μοντέλα, παράγοντες διαχωρισμού (για χρωματογραφία ή διεργασίες κατά παρτίδες), καταλύτες και πρόσθετα (όπως απορρυπαντικά, τροποποιητές ιξώδους κ.λπ.). [33]

Η πλειοψηφία των τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών περιλαμβάνει περίπλοκη σύνθεση, με αποτέλεσμα την παραγωγή ακριβών προϊόντων και σε ορισμένες περιπτώσεις ο λόγος κόστους/οφέλους αποκλείει την παραγωγή και τη χρησιμοποίησή τους. Μια τροποποιημένη κυκλοδεξτρίνη που παράγεται βιομηχανικά και διατίθεται στο εμπόριο πρέπει να παράγεται με μια απλή αντίδραση και να μην είναι τοξική όταν χρησιμοποιείται. Πρέπει, επίσης, να έχει αποδεκτή τιμή, να διατηρεί την ικανότητα συμμετοχής στη σύνθεση συμπλόκων και να διαθέτει ιδιαιτέρως πλεονεκτικές ιδιότητες για κάποια συγκεκριμένη εφαρμογή. [33]

Από βιομηχανική άποψη, σε τόνους, παράγονται οι εξής τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες: μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες (RAMEB: randomly methylated β -CD), υδροξυαλκυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες (υδροξυπροπυλ- β -CD και υδροξυπροπυλ- γ -CD), ακετυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες (ακετύλ- γ -CD), δραστικές κυκλοδεξτρίνες (χλωροτριαζινυλ- β -CD), και διακλαδισμένες κυκλοδεξτρίνες (γλυκοζυλ- και μαλτοσυλ- β -CD). [33]

Για την επιμήκυνση της πραγματικής κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης, οι υποκαταστάτες συνδέονται με την πρωτεύουσα ή δευτερεύουσα πλευρά. Αυτή η επιμήκυνση μπορεί να είναι υδρόφιλη, όπου στην περίπτωση αυτή οι υδροξυαλκυλομάδες συνδέονται στον δακτύλιο, ή μπορεί να είναι υδρόφοβη. Για παράδειγμα, υποκαθιστώντας τις πρωτοταγείς υδροξυλομάδες με αλυσίδες μακρών λιπαρών οξέων, μπορούν να παρασκευαστούν μόρια τύπου "medusa". Αυτά τα μόρια συμπεριφέρονται ως απορρυπαντικά ενώ διατηρούν την ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα. [33]

2.7. Εφαρμογές Κυκλοδεξτρινών

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται προκειμένου να αποκτηθούν ορισμένα οφέλη που προκύπτουν από τη συμπλοκοποίηση με αυτές. Αυτά περιλαμβάνουν μεταβολή της διαλυτότητας της φιλοξενούμενης ένωσης, σταθεροποίηση έναντι των επιδράσεων του φωτός, της θερμότητας και της οξειδωσης, μείωση των ανεπιθύμητων φυσιολογικών επιδράσεων, μείωση της πτητικότητας και άλλα. Σε μερικές εφαρμογές, περισσότερα από ένα οφέλη επιτυγχάνονται με συμπλοκοποίηση με κυκλοδεξτρίνες. [34]

Από μικροσκοπική άποψη, δεδομένου ότι κάθε φιλοξενούμενο μόριο περιβάλλεται χωριστά από μία κυκλοδεξτρίνη το μόριο είναι μικρο-εγκλεισμένο. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε πλεονεκτικές αλλαγές στις χημικές και φυσικές ιδιότητες των φιλοξενούμενων μορίων όπως [29]:

- Σταθεροποίηση ευαίσθητων στο φως ή στο οξυγόνο ουσιών.
- Τροποποίηση της χημικής δραστηριότητας των φιλοξενούμενων μορίων.
- Προστασία και σταθεροποίηση πολύ πτητικών ουσιών.
- Βελτίωση της διαλυτότητας των ουσιών.
- Τροποποίηση υγρών ουσιών σε σκόνες.
- Προστασία από την υποβάθμιση των ουσιών από μικροοργανισμούς.
- Κάλυψη άσχημης οσμής και γεύσης.
- Προστασία και κάλυψη των χρωστικών ή του χρώματος των ουσιών.

- Καταλυτική δραστικότητα κυκλοδεξτρινών με φιλοξενούμενα μόρια.

Ως αποτέλεσμα των φαινομένων μοριακής συμπλοκοποίησης, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλά βιομηχανικά προϊόντα και τεχνολογίες. Οι αμελητέες κυτταροτοξικές επιδράσεις των κυκλοδεξτρινών αποτελούν σημαντικό χαρακτηριστικό σε εφαρμογές όπως οι φορείς φαρμάκων, τα τρόφιμα και οι γεύσεις, τα καλλυντικά, η προσωπική φροντίδα και τα προϊόντα περιποίησης, η συσκευασία, τα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα, η γεωργία, οι διαδικασίες διαχωρισμού, η προστασία του περιβάλλοντος, η ζύμωση και η κατάλυση. [35]

2.7.1. Εφαρμογές στις Βιομηχανίες Τροφίμων και Ποτών

Οι κυκλοδεξτρίνες ως πολυλειτουργικά συστατικά τροφίμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν κυρίως ως φορείς για μοριακό εγκλεισμό που βελτιώνουν τη σταθερότητα των ευαίσθητων συστατικών (π.χ. γεύσεις, παράγοντες αρωματισμού και άλλα), τόσο από φυσική όσο και από χημική άποψη, κάτι το οποίο οδηγεί σε παρατεταμένη διάρκεια ζωής προϊόντος και μακροπρόθεσμη σταθερότητα κατά την αποθήκευση. Οι βασικοί στόχοι του εγκλεισμού με χρήση κυκλοδεξτρινών είναι οι εξής: να μειωθεί η πτητικότητα ή η αναφλεξιμότητα των υγρών, τα υγρά να συμπεριφέρονται σαν στερεά, να διαχωριστούν τα δραστικά υλικά μεταξύ τους, να μειωθεί η τοξικότητα του υλικού, να παρασχεθεί περιβαλλοντική προστασία στις ευαίσθητες ενώσεις, να τροποποιηθούν οι ιδιότητες επιφάνειας των υλικών, να ελεγχθεί η απελευθέρωση των υλικών και να καλυφθεί η πικρή γεύση ορισμένων ενώσεων. [29, 35]

Η ίδια η κυκλοδεξτρίνη είναι ένα ελπιδοφόρο νέο γλυκαντικό. Η ενίσχυση της γεύσης χρήσει κυκλοδεξτρίνης έχει επίσης προταθεί για αλκοολούχα ποτά όπως το ουίσκι και η μπύρα. Επομένως, οι κυκλοδεξτρίνες, ως παράγοντες μοριακού εγκλεισμού, έχουν πολύ συγκεκριμένη αλληλεπίδραση με πολλά μόρια και μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού με αιθέρια έλαια και πτητικά που υπάρχουν σε τρόφιμα και ποτά, προκειμένου να βελτιώσουν τα χαρακτηριστικά τους. [29, 35]

2.7.2. Εφαρμογές στη Βιομηχανία Καλλυντικών

Ο σχηματισμός συμπλόκου με κυκλοδεξτρίνη έχει χρησιμοποιηθεί στην βιομηχανία καλλυντικών για: [29, 35]

- αποφυγή αλλοίωσης ορισμένων αρωμάτων, χρωμάτων ή βιταμινών που συνδέονται με ορισμένα συστατικά κατά την επεξεργασία ή αποθήκευση,
- αύξηση υδατοδιαλυτότητας των λιπόφιλων υλικών,
- μετατροπή των υγρών ή ελαιωδών υλικών σε μορφή σκόνης,
- αύξηση της φυσικής και χημικής σταθερότητας των φιλοξενούμενων μορίων με προστασία έναντι αποσύνθεσης, οξείδωσης, υδρόλυσης ή απώλειας με εξάτμιση,
- παροχή ελεγχόμενης απελευθέρωσης δραστικών συστατικών,
- μείωση ή πρόληψη ερεθισμού του δέρματος,
- αποτροπή αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συστατικών της φόρμουλας,
- αύξηση ή μείωση της απορρόφησης διαφόρων ενώσεων στο δέρμα,
- σταθεροποίηση γαλακτωμάτων και εναιωρημάτων,
- μείωση ή εξάλειψη των ανεπιθύμητων οσμών.

Οι βασικές λειτουργίες των αρωματικών υλικών είναι να παρέχουν μια ευχάριστη οσμή, να καλύπτουν τη μυρωδιά βάσης του προϊόντος και να δίνουν στο προϊόν μια ταυτότητα. Ωστόσο, επειδή τα αρωματικά υλικά είναι ελάχιστα υδατοδιαλυτά ή αδιάλυτα και συνήθως υπάρχουν σε υγρή

κατάσταση, η διαδικασία αρωματισμού μπορεί να είναι δύσκολη. Τα επιφανειοδραστικά που χρησιμοποιούνται ως παράγοντες διαλυτοποίησης οδηγούν σε διαφορετικά προβλήματα, όπως πρόκληση θολότητας στα διαφανή σκευάσματα, ερεθισμό του δέρματος και είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον, η ποσότητα των αρωματικών υλικών στο προϊόν μειώνεται ταχέως κατά την αποθήκευση λόγω της πτητικότητας και της κακής σταθερότητας. Η συμπλοκοποίηση των αρωματικών υλικών με κυκλοδεξτρίνη αυξάνει τη διαλυτότητά τους και μειώνει ή εμποδίζει την εξάτμισή τους. Η αλληλεπίδραση του φιλοξενούμενου μορίου με την κυκλοδεξτρίνη παράγει ένα υψηλότερο ενεργειακό φράγμα για να ξεπεραστεί η πτητικότητα, παράγοντας έτσι αρώματα μεγάλης διάρκειας. [35]

2.7.3. Εφαρμογές στη Φαρμακευτική Βιομηχανία

Στη φαρμακευτική βιομηχανία, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για [29, 35-37]:

- καταστολή της μεταβλητότητας,
- μετατροπή υγρών ενώσεων σε κρυσταλλική μορφή,
- κάλυψη της δυσάρεστης μυρωδιάς και γεύσης ορισμένων φαρμάκων,
- αποφυγή των ανεπιθύμητων ασυμβατοτήτων,
- αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας,
- αύξηση της σταθερότητας ενός φαρμάκου υπό συνθήκες φωτός, θερμότητας και οξειδωσης

Έτσι, μπορεί να αυξηθεί η διάρκεια ζωής των φαρμάκων καθώς και οι οργανοληπτικές ιδιότητες, όπως η γευστικότητα των δραστικών συστατικών σε δοσολογικές μορφές. Αυτό θα επιτρέψει την παραγωγή και επανεισαγωγή πολυάριθμων δραστικών ουσιών που, λόγω προβλημάτων σταθερότητας, συμβατότητας ή απορρόφησης, δεν χρησιμοποιούνται επί του παρόντος. Η αύξηση της διαλυτότητας, η διάλυση, οι ρυθμοί απελευθέρωσης και η βιοδιαθεσιμότητα, η τροποποίηση της φαρμακοκινητικής, η τροποποίηση της διάθεσης φαρμάκων, η παρατεταμένη απελευθέρωση φαρμάκων και η στοχευμένη θεραπεία είναι επίσης μερικά επιτεύγματα που θα μπορούσαν να είναι δυνατά με κυκλοδεξτρίνες. [29, 35]

Όσον αφορά στην πιθανή εφαρμογή των κυκλοδεξτρινών στην παροχή φαρμάκων, αξίζει να σημειωθεί ότι η συμπλοκοποίηση μπορεί να αυξήσει σημαντικά τη βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα μόνο για φάρμακα Κατηγορίας II (δηλαδή εκείνα με κακή διαλυτότητα και υψηλή διαπερατότητα, σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης βιοφαρμακευτικών προϊόντων). [35]

Ο μοριακός εγκλεισμός φαρμάκων με παράγωγα κυκλοδεξτρινών έχει λάβει μεγάλη προσοχή για την παρατεταμένη απελευθέρωση του φαρμάκου. Μεταξύ αυτών των παραγώγων, στην προσπάθεια να σχεδιαστούν καλύτεροι φορείς φαρμάκων, έχουν παρασκευαστεί αλκυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες και πολυμερή κυκλοδεξτρινών και έχουν πρόσφατα αποκτήσει αποδοχή σε φαρμακευτικές εφαρμογές. Τα μεθυλιωμένα, αιθυλιωμένα, υδροξυπροπυλιωμένα, υδροξυαιθυλιωμένα, ακετυλιωμένα, σουλφοαιθυλικά, σουλφοπροπύλια, σουλφοβουτύλ-CDs κλπ. και οι πολυμερείς β-κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται στον ορθολογικό σχεδιασμό υδατοδιαλυτών ή αδιάλυτων συστημάτων φορέων φαρμάκων όπως απαιτείται, σύμφωνα με τους στόχους. Τα υδρόφιλα παράγωγα κυκλοδεξτρινών είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη βελτίωση της διαλυτότητας και/ή της ταχύτητας διάλυσης των φαρμάκων που είναι ελάχιστα υδατοδιαλυτά μέσω σχηματισμού συμπλόκου εγκλεισμού. Τα υδρόφοβα παράγωγα κυκλοδεξτρινών μπορεί να είναι πιο χρήσιμα για τον έλεγχο του ρυθμού απελευθέρωσης των υδατοδιαλυτών φαρμάκων. Όσο πιο σταθερό είναι ένα σύμπλοκο, τόσο πιο αργή είναι η αρχική

απελευθέρωση και κατά συνέπεια τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος που απαιτείται για την πλήρη απελευθέρωση του φαρμάκου. [29, 35]

Η απελευθέρωση ενός φαρμάκου από έναν φορέα είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-φορέα, διαλυτότητα, συντελεστή κατανομής και μέγεθος σωματιδίων φαρμάκου στον φορέα. Διάφοροι ρυθμοί απελευθέρωσης του φαρμάκου μπορούν να ληφθούν και να ελεγχθούν συνδυάζοντας υδρόφιλα και υδρόφοβα σύμπλοκα β-κυκλοδεξτρίνης σε κατάλληλα διαφορετικές αναλογίες ανάμιξης και μπορεί να προσφέρουν ένα πιο κατάλληλο παρασκεύασμα για δοσολογικές μορφές τροποποιημένης απελευθέρωσης. [29, 35]

Η αυξημένη δραστηριότητα και αποτελεσματικότητα του φαρμάκου (δηλαδή μείωση της δόσης που απαιτείται για τη βέλτιστη θεραπευτική δράση), που προκαλείται από αυξημένη διαλυτότητα του φαρμάκου, μπορεί να μειώσει την τοξικότητά του καθιστώντας το αποτελεσματικό σε χαμηλότερες δόσεις. Η «παγίδευση» των φαρμάκων σε κυκλοδεξτρίνες, σε μοριακό επίπεδο, εμποδίζει την άμεση επαφή τους με βιολογικές μεμβράνες και έτσι μειώνει τις παρενέργειες τους (μειώνοντας την είσοδο φαρμάκου στα κύτταρα μη στοχευμένων ιστών) και τον τοπικό ερεθισμό χωρίς δραστηριότητα απώλεια θεραπευτικού οφέλους. Συμπερασματικά, λόγω της μοναδικής αρχιτεκτονικής και των χηλικών ιδιοτήτων τους, οι κυκλοδεξτρίνες καθίστανται σημαντικές βιοτεχνολογικές επιλογές στη βιοκατάλυση, στον εγκλεισμό και στην ελεγχόμενη απελευθέρωση μορίων και σε πολλές άλλες φαρμακευτικές εφαρμογές. [29, 35]

2.7.4. Εφαρμογές σε Γεωργικές και Χημικές Βιομηχανίες

Οι κυκλοδεξτρίνες σχηματίζουν σύμπλοκα με μια μεγάλη ποικιλία γεωργικών χημικών, συμπεριλαμβανομένων ζιζανιοκτόνων, εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων, απωθητικών, φερομονών και ρυθμιστών ανάπτυξης. Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθυστερήσουν τη βλάστηση των σπόρων. Σε κόκκους κατεργασμένους με β-κυκλοδεξτρίνες, ορισμένες από τις αμυλάσες που αποικοδομούν τις ποσότητες αμύλου των σπόρων αναστέλλονται. Αρχικά το φυτό αναπτύσσεται πιο αργά, αλλά αργότερα αυτό αντισταθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη βελτιωμένη ανάπτυξη των φυτών, αποδίδοντας 20-45% μεγαλύτερη συγκομιδή. Οι πρόσφατες εξελίξεις περιλαμβάνουν την έκφραση γλυκανοτρανσφερασών κυκλοδεξτρίνης (CGTases: glucanotransferases) σε φυτά. [27, 29]

Στη χημική βιομηχανία, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως για να διαχωρίσουν ισομερή και εναντιομερή, να καταλύσουν αντιδράσεις, να βοηθήσουν σε διάφορες διεργασίες και να απομακρύνουν ή να αποτοξινώσουν απόβλητα υλικά. Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως στον διαχωρισμό των εναντιομερών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ή αέρια χρωματογραφία (GC). Οι στατικές φάσεις αυτών των στηλών περιέχουν ακινητοποιημένες κυκλοδεξτρίνες ή υπερμοριακά παράγωγά τους. Άλλες αναλυτικές εφαρμογές σχετίζονται με τη φασματοσκοπική ανάλυση. Στις μελέτες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) μπορούν να δράσουν ως παράγοντες χειρομορφικής μετατόπισης και στον κυκλικό διχρωισμό ως επιλεκτικοί (χειρόμορφοι) παράγοντες που μεταβάλλουν τα φάσματα. Στην ηλεκτροχημεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καλύψουν τις μολυσματικές ενώσεις, επιτρέποντας πιο ακριβείς προσδιορισμούς. [29]

Μια νέα χρήση των κυκλοδεξτρινών σε καταλυτικές αντιδράσεις είναι η ικανότητά τους να χρησιμεύουν ως μιμητικά ενζύμων. Αυτά σχηματίζονται τροποποιώντας φυσικώς ενυπάρχουσες κυκλοδεξτρίνες με υποκατάσταση διάφορων λειτουργικών ενώσεων στην πρωτοταγή ή δευτερεύουσα

όψη του μορίου ή συνδέοντας δραστικές ομάδες. Αυτές οι τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες είναι χρήσιμες ως μιμητικά ενζύμων λόγω του φαινομένου μοριακής αναγνώρισης που αποδίδεται στις υποκατεστημένες ομάδες των κυκλοδεξτρινών. Αυτή η ικανότητα προκύπτει από τη δέσμευση υποστρωμάτων στην υδρόφοβη κοιλότητα με την επακόλουθη αντίδραση που ξεκινά από καταλυτικές ομάδες συνδεδεμένες με την κυκλοδεξτρίνη. Οι ρυθμοί αντίδρασης ενισχύονται σχεδόν κατά 1000 φορές από τέτοιες τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες έναντι του ελεύθερου διαλύματος λόγω του αποτελέσματος χηλώσεως των καταλυτών κυκλοδεξτρινών. [27, 29, 35]

2.7.5. Εφαρμογές σχετικές με Συγκολλητικά, Επικαλύψεις και άλλα Πολυμερή

Οι κυκλοδεξτρίνες αυξάνουν την κολλητικότητα και την προσκόλληση ορισμένων θερμοσυγκολλητικών και συγκολλητικών ουσιών. Παράγουν επίσης πρόσθετα και διογκωτικά με συστήματα θερμοσυγκόλλησης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων πολυμερούς σε υλικά επικαλύψεων τύπου γαλακτώματος, όπως χρώματα, τείνει να αυξάνει το ιξώδες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν κυκλοδεξτρίνες για να εξουδετερώσουν αυτό το ανεπιθύμητο αποτέλεσμα. [29]

3. Σχηματισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού

Τα σύμπλοκα σχηματίζονται εύκολα. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα είναι οι μέθοδοι συγκαταβύθισης, πολτού, πάστας και ξηρής ανάμιξης. Όλες είναι παρόμοιες, με κάθε μέθοδο να χρησιμοποιεί διαδοχικά λιγότερο νερό. Το νερό είναι σημαντικό για το σχηματισμό συμπλόκων. Εκτός του ότι αποτελεί κινητήρια δύναμη για την υδρόφοβη αλληλεπίδραση του φιλοξενούμενου μορίου με την κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, το νερό είναι ένα μέσο για διάλυση τόσο της κυκλοδεξτρίνης όσο και του φιλοξενούμενου μορίου. [34]

Η συμπλοκοποίηση είναι ένα μοριακό φαινόμενο όπου ένα φιλοξενούμενο μόριο και ένα μόριο κυκλοδεξτρίνης έρχονται σε επαφή μεταξύ τους για να αλληλεπιδράσουν και να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο. Σε ορισμένες περιπτώσεις, απαιτείται νερό για να διατηρηθεί η ακεραιότητα του συμπλόκου. Το νερό υπάρχει στους κρυστάλλους του συμπλόκου και μπορεί να σχηματίσει μια γέφυρα μεταξύ των υδροξυλομάδων γειτονικών μορίων κυκλοδεξτρίνης διαμορφώνοντας ένα κλουβί που θα βοηθήσει στην παγίδευση του φιλοξενούμενου μορίου στο σύμπλοκο. [34]

3.1. Μέθοδοι Σχηματισμού Συμπλόκων

Οι βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό συμπλόκων με κυκλοδεξτρίνη είναι οι ακόλουθες:

3.1.1. Μέθοδος Συγκαταβύθισης

Πρόκειται για την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο εργαστηριακά. Η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται σε νερό και το φιλοξενούμενο μόριο προστίθεται ενώ αναδεύεται το διάλυμα κυκλοδεξτρίνης. Η συγκέντρωση της β-κυκλοδεξτρίνης μπορεί να είναι τόσο υψηλή όσο περίπου 20%, εάν το φιλοξενούμενο μόριο αντέχει υψηλότερες θερμοκρασίες. Εάν επιλεγεί επαρκώς υψηλή συγκέντρωση, η διαλυτότητα του συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης-φιλοξενούμενου θα ξεπεραστεί καθώς η αντίδραση συμπλοκοποίησης προχωρά ή καθώς εφαρμόζεται ψύξη. Σε πολλές περιπτώσεις, το διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης και του φιλοξενούμενου μορίου πρέπει να ψύχεται ενώ αναδεύεται πριν σχηματιστεί ένα ίζημα. [29, 34, 35]

Το ίζημα μπορεί να συλλέγεται με απόχυση, φυγοκέντρηση ή διήθηση. Το ίζημα μπορεί να πλυθεί με μια μικρή ποσότητα νερού ή άλλου αναμίξιμου με το νερό διαλύτη όπως αιθυλική αλκοόλη, μεθανόλη ή ακετόνη. Η έκπλυση με διαλύτες μπορεί να είναι επιζήμια για ορισμένα σύμπλοκα, επομένως πρέπει να εξετάζεται πριν τη πραγματοποίηση της μεθόδου σε μεγαλύτερη κλίμακα. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου έγκειται στην ανακλιμάκωση (scale-up). Η περιορισμένη διαλυτότητα της κυκλοδεξτρίνης απαιτεί να χρησιμοποιηθούν μεγάλες ποσότητες νερού. Η χωρητικότητα των δεξαμενών, ο χρόνος και η ενέργεια για θέρμανση και ψύξη δύναται να αποτελέσουν σημαντικούς παράγοντες κόστους. [29, 34]

Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι τα μη ιονικά επιφανειοδραστικά μειώνουν την συμπλοκοποίηση της κυκλοδεξτρίνης με τη διαζεπάμη και τα συντηρητικά μειώνουν τη συμπλοκοποίηση των διαφόρων στεροειδών με την κυκλοδεξτρίνη. Από την άλλη πλευρά, τα πρόσθετα όπως η αιθανόλη μπορούν να ευνοήσουν το σχηματισμό συμπλόκου στη στερεά ή ημιστερεά κατάσταση. [29]

3.1.2. Μέθοδος Δημιουργίας Πολτού

Προκειμένου να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο δεν χρειάζεται να διαλυθεί πλήρως η κυκλοδεξτρίνη. Η κυκλοδεξτρίνη μπορεί να προστεθεί σε νερό που φθάνει μέχρι και το 50-60% σε στερεά, υπό ανάδευση. Η υδατική φάση κορεννύεται σε κυκλοδεξτρίνη που βρίσκεται υπό διάλυση. Τα φιλοξενούμενα μόρια συμπλοκοποιούνται με τη διαλυμένη κυκλοδεξτρίνη και, καθώς το σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης κορεννύει την υδατική φάση, το σύμπλοκο θα κρυσταλλωθεί ή θα καταβυθιστεί εκτός της υδατικής φάσης. Οι κρύσταλλοι κυκλοδεξτρίνης θα διαλυθούν και θα συνεχίσουν να κορεννύουν την υδατική φάση για να σχηματίσουν το σύμπλοκο με αποτέλεσμα να καθιζάνουν ή να κρυσταλλώνονται εκτός της υδατικής φάσης. Το σύμπλοκο μπορεί να συλλεχθεί με τον ίδιο τρόπο όπως με τη μέθοδο συγκαταβύθισης. [29, 34]

Ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η συμπλοκοποίηση είναι μεταβλητός και εξαρτάται από το φιλοξενούμενο μόριο. Πρέπει να γίνουν δοκιμές για να καθοριστεί το χρονικό διάστημα που απαιτείται. Γενικά, η μέθοδος δημιουργίας πολτού πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Με πολλά φιλοξενούμενα μόρια, μπορεί να εφαρμοστεί θέρμανση για να αυξηθεί ο ρυθμός συμπλοκοποίησης αλλά με προσοχή, καθώς η υπερβολική θερμότητα μπορεί να αποσταθεροποιήσει το σύμπλοκο και η συμπλοκοποίηση ενδέχεται να μην μπορεί να γίνει πλήρως. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μείωση της ποσότητας νερού που απαιτείται και κατ' επέκταση του μεγέθους του αντιδραστήρα. [29]

3.1.3. Μέθοδος Δημιουργίας Πάστας

Πρόκειται για μια παραλλαγή της μεθόδου δημιουργίας πολτού. Μόνο μια μικρή ποσότητα νερού προστίθεται για να σχηματίσει η πάστα, η οποία αναμιγνύεται με την κυκλοδεξτρίνη χρησιμοποιώντας γουδί και γουδοχέρι, ή σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιώντας ένα ζυμωτήρα. Ο χρόνος που απαιτείται εξαρτάται από το φιλοξενούμενο μόριο. Το προκύπτον σύμπλοκο μπορεί να ξηραθεί απευθείας ή να πλυθεί με μια μικρή ποσότητα νερού και να συλλεχθεί με διήθηση ή φυγοκέντρηση. Οι πάστες ξηραίνονται μερικές φορές σχηματίζοντας μια σκληρή μάζα αντί για μια λεπτή σκόνη. Αυτό εξαρτάται από το φιλοξενούμενο μόριο και την ποσότητα νερού που χρησιμοποιείται στην πάστα. Γενικά, η σκληρή μάζα μπορεί να ξηραθεί πλήρως και να αλεστεί ώστε να ληφθεί μια κονιοποιημένη μορφή του συμπλόκου. [29, 34]

3.1.4. Μέθοδος Υγρής Ανάμιξης και Θέρμανσης

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται λίγο ή καθόλου νερό. Η ποσότητα του νερού μπορεί να έχει ένα εύρος μεταξύ της ποσότητας νερού ενυδάτωσης στην κυκλοδεξτρίνη και στο προστιθέμενο φιλοξενούμενο μόριο έως 20-25% νερό σε ξηρή βάση. Αυτή η ποσότητα νερού τυπικά προέρχεται από μια κρούστα διήθησης από τις μεθόδους συγκαταβύθισης ή δημιουργίας πολτού. Το φιλοξενούμενο μόριο και η κυκλοδεξτρίνη αναμιγνύονται επαρκώς και τοποθετούνται σε σφραγισμένο δοχείο. Το σφραγισμένο δοχείο και το περιεχόμενό του θερμαίνονται περίπου στους 100 °C και στη συνέχεια τα περιεχόμενα αφαιρούνται και ξηραίνονται. Η ποσότητα νερού που προστίθεται, ο βαθμός ανάμιξης και ο χρόνος θέρμανσης πρέπει να βελτιστοποιούνται για κάθε φιλοξενούμενο μόριο. [29]

3.1.5. Μέθοδος Εξώθησης (Extrusion)

Η εξώθηση είναι μια παραλλαγή της μεθόδου θέρμανσης και ανάμιξης και πρόκειται για ένα συνεχές σύστημα. Η κυκλοδεξτρίνη, το φιλοξενούμενο μόριο και το νερό μπορούν να προαναμιγνύονται ή να αναμιγνύονται καθώς προστίθενται στον εξωθητήρα (extruder). Ο βαθμός ανάμιξης, η ποσότητα θέρμανσης και ο χρόνος μπορούν να ελεγχθούν στον κύλινδρο του εξωθητήρα. Ανάλογα με την ποσότητα

νερού, το παραγόμενο με εξώθηση σύμπλοκο μπορεί να στεγνώσει καθώς ψύχεται ή μπορεί να τοποθετηθεί σε φούρνο για να στεγνώσει. Η εξώθηση έχει τα πλεονεκτήματα ότι είναι μια συνεχής διαδικασία και χρησιμοποιεί πολύ λίγο νερό. Λόγω της παραγόμενης θερμότητας, κάποια θερμικά ασταθή φιλοξενούμενα μόρια αποσυντίθενται με αυτή τη μέθοδο. [29]

3.1.6. Μέθοδος Ξηρής Ανάμιξης

Μερικά φιλοξενούμενα μόρια μπορούν να συμπλοκοποιηθούν προσθέτοντας απλώς το φιλοξενούμενο μόριο στην κυκλοδεξτρίνη και αναμειγνύοντάς τα. Αυτό λειτουργεί καλύτερα με έλαια ή υγρά φιλοξενούμενα μόρια. Ο απαιτούμενος χρόνος ανάμιξης είναι μεταβλητός και εξαρτάται από το φιλοξενούμενο μόριο. Γενικά, αυτή η μέθοδος εκτελείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και είναι μία παραλλαγή της μεθόδου δημιουργίας πάστας. [29, 34]

Το κύριο πλεονέκτημα είναι ότι δεν χρειάζεται να προστεθεί νερό, εκτός εάν χρησιμοποιείται ένα βήμα πλυσίματος. Τα μειονεκτήματα είναι ο κίνδυνος σχηματισμού πήγματος κατά την ανακλιμάκωση, με αποτέλεσμα η ανάμιξη να μην είναι επαρκώς διεξοδική οδηγώντας σε ελλιπή συμπλοκοποίηση και, στην περίπτωση πολλών φιλοξενούμενων μορίων, μειονέκτημα αποτελεί το απαιτούμενο χρονικό διάστημα. [29]

3.1.7. Μέθοδος Λυοφιλοποίησης ή Λυοφιλίωσης–Freeze-Drying

Το φιλοξενούμενο μόριο διαλύεται σε νερό και στη συνέχεια η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται με ανάδευση στην απαιτούμενη αναλογία. Το αναμειγμένο διάλυμα ξηραίνεται με ψύξη-λυοφιλοποιείται και στη συνέχεια πλένεται με διαιθυλαιθέρα και το υπόλειμμα ξηραίνεται υπό κενό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα δύο τελευταία βήματα μπορούν να παραλειφθούν. Αυτή η μέθοδος είναι πιο κατάλληλη για υδατοδιαλυτά φιλοξενούμενα μόρια, αφού οι κυκλοδεξτρίνες και τα φιλοξενούμενα μόρια πρέπει να διαλυθούν στο νερό πριν από την ξήρανση ή για θερμοευαίσθητα φάρμακα. Προκύπτει ένα κονιοποιημένο δείγμα με πολύ καλή απόδοση εγκλεισμού και είναι δυνατό να προχωρήσει η διαδικασία σε μεγαλύτερη κλίμακα. [35]

3.2. Ξήρανση Συμπλόκων

Τα σύμπλοκα μπορούν να ξηρανθούν σε ένα φούρνο, σε ξηραντήρα ρευστής κλίνης ή σε άλλου είδους ξηραντήρα. Ωστόσο, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το σύμπλοκο να μην καταστραφεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ξήρανσης. [29]

3.2.1. Πολύ Ασταθή Φιλοξενούμενα Μόρια

Στην περίπτωση φιλοξενούμενων μορίων με θερμοκρασίες βρασμού χαμηλότερες των 100 °C, πρέπει να χρησιμοποιείται χαμηλότερη θερμοκρασία κατά την ξήρανση. Μειώνοντας τη θερμοκρασία ξήρανσης λίγους βαθμούς κάτω από τη θερμοκρασία βρασμού του φιλοξενούμενου μορίου, μειώνεται ο κίνδυνος απώλειάς του κατά την ξήρανση. [29]

3.2.2. Ξήρανση με Ψεκασμό

Τα σύμπλοκα μπορούν επίσης να ξηρανθούν με ψεκασμό. Η κατακρήμνιση πρέπει να ελέγχεται προκειμένου να αποφευχθεί η υπερβολική μεγέθυνση των σωματιδίων και η παρεμπόδιση του ψεκαστήρα ή του ακροφυσίου ψεκασμού. Με ασταθή φιλοξενούμενα μόρια, απαιτείται κάποια βελτιστοποίηση των συνθηκών ξήρανσης προκειμένου να μειωθούν οι απώλειες. Η ξήρανση με ψεκασμό

δεν είναι ένα βιώσιμο μέσο για την ξήρανση ιδιαίτερα ευμετάβλητων και θερμικά ασταθών φιλοξενούμενων μορίων. [29]

3.2.3. Ξήρανση σε Χαμηλή Θερμοκρασία

Ένας ξηραντήρας ή ένας λυοφιλοποιητής μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν για την ξήρανση συμπλοκών. Η χαμηλή θερμοκρασία ελαχιστοποιεί την απώλεια εξαιρετικά ασταθών φιλοξενούμενων μορίων. Η ξήρανση με κατάψυξη ή λυοφιλοποίηση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για θερμικά ασταθή φιλοξενούμενα μόρια και διαλυτά σύμπλοκα όπως σύμπλοκα υδροξυπροπυλιωμένης κυκλοδεξτρίνης. [29, 38]

3.3. Απελευθέρωση-Release

Μόλις σχηματιστεί και ξηρανθεί ένα σύμπλοκο, είναι πολύ σταθερό, παρουσιάζοντας μεγάλη διάρκεια αποθήκευσης σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος υπό ξηρές συνθήκες. Η απομάκρυνση του συμπλοκοποιημένου φιλοξενούμενου μορίου από άλλο απαιτεί θέρμανση. Σε πολλές περιπτώσεις, το νερό μπορεί να αντικαταστήσει το φιλοξενούμενο μόριο. [29]

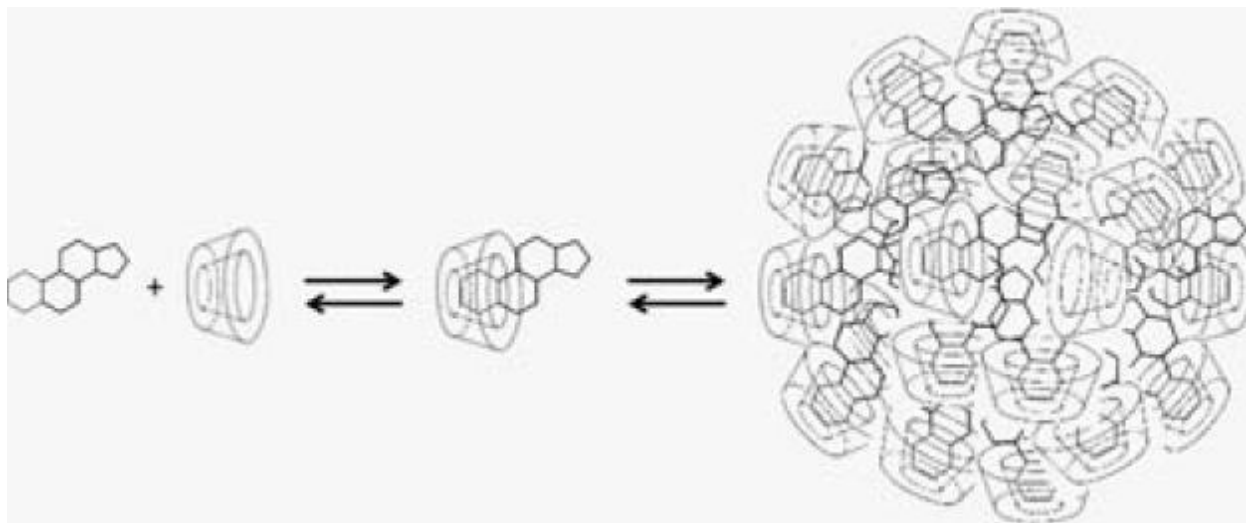
Δύο μηχανισμοί περιλαμβάνονται στην απελευθέρωση του συμπλοκοποιημένου φιλοξενούμενου μορίου, μετά την προσθήκη του συμπλόκου σε κάποιο διαλύτη. Σε πρώτη φάση, το σύμπλοκο διαλύεται. Το δεύτερο βήμα είναι η απελευθέρωση του συμπλοκοποιημένου φιλοξενούμενου μορίου όταν εκτοπίζεται από μόρια νερού. Τελικά, θα επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης κυκλοδεξτρίνης, του φιλοξενούμενου μορίου και του διαλυμένου και αδιάλυτου συμπλόκου. [29]

Όσον αφορά στα σύμπλοκα που περιέχουν πολλαπλά φιλοξενούμενα μόρια ή τύπους κυκλοδεξτρίνης, τα φιλοξενούμενα μόρια δεν απελευθερώνονται απαραίτητως στην ίδια αναλογία όπως στο αρχικό μίγμα φιλοξενούμενων μορίων. Κάθε σύμπλοκο φιλοξενούμενων μπορεί να έχει διαφορετική διαλυτότητα και ρυθμό απελευθέρωσης. Εάν οι ρυθμοί απελευθέρωσης είναι διαφορετικοί για κάθε συστατικό, συνίσταται να διαμορφωθεί ένα εναλλακτικό σχέδιο απελευθέρωσης με τροποποίηση της φόρμουλας παρασκευής αναφορικά με τα φιλοξενούμενα μόρια. [29]

3.4. Σχηματισμός Δομών Μικκυλίων (Non-inclusion Complexes)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σε υδατικά διαλύματα οι κυκλοδεξτρίνες σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού όπου μόρια νερού που βρίσκονται εντός της λιπόφιλης κοιλότητας αντικαθίστανται από ένα λιπόφιλο μόριο-επισκέπτη ή από ένα λιπόφιλο τμήμα, όπως για παράδειγμα, ένα μόριο φαρμάκου. Εντούτοις, οι υδροξυλομάδες στην εξωτερική επιφάνεια του μορίου κυκλοδεξτρίνης είναι ικανές να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με άλλα μόρια και οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν, όπως και οι μη κυκλικές ολιγοσακχαρίτες και οι πολυσακχαρίτες, να σχηματίσουν υδατοδιαλυτά σύμπλοκα με λιπόφιλες αδιάλυτες στο νερό ενώσεις. Έχει αποδειχθεί ότι η κυκλοδεξτρίνη σχηματίζει τόσο σύμπλοκα εγκλεισμού όσο και μη-εγκλεισμού (non-inclusion complexes) με δικαρβοξυλικά οξέα και ότι οι δύο τύποι συμπλοκών συνυπάρχουν σε υδατικά διαλύματα. Σε κορεσμένα υδατικά διαλύματα, σύμπλοκα φιλοξενούμενων μορίων/κυκλοδεξτρίνης συχνά αποτελούνται από ένα μίγμα συμπλοκών εγκλεισμού και μη-εγκλεισμού. [39]

Καθώς αυξάνει η συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης, τα μόρια κυκλοδεξτρίνης και τα σύμπλοκά τους συνενώνονται για να σχηματίσουν συσσωματώματα που συχνά κυμαίνονται σε μέγεθος μεταξύ 20 και 100 nm σε διάμετρο (Εικόνα 9). Η συσσωμάτωση και το μέγεθος των συσσωματωμάτων αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της κυκλοδεξτρίνης. Έκδοχα τα οποία διαλυτοποιούν και σταθεροποιούν συσσωματώματα, όπως μικρά ιονισμένα μόρια (π.χ., άλατα οργανικών οξέων και βάσεων) και υδατοδιαλυτά πολυμερή (π.χ. παράγωγα κυτταρίνης) μπορούν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα συμπλοκοποίησης. [40]



Εικόνα 9: Απεικόνιση σχηματισμού συμπλόκου εγκλεισμού και συνένωση συμπλόκων για σχηματισμό συσσωματωμάτων. [40]

4. Ανίχνευση και Χαρακτηρισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός συμπλοκών, η αλληλεπίδραση μεταξύ ενός φιλοξενούμενου μορίου και της κυκλοδεξτρίνης μπορεί να μελετηθεί με διάφορες μεθόδους. Χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές για την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων εγκλεισμού, όπως αυτές που παρατίθενται στη συνέχεια. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο συνδυασμός των μεθόδων είναι αυτός που επιβεβαιώνει τον επιτυχή εγκλεισμό της ουσίας και το σχηματισμό συμπλόκων. [34, 35]

4.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Το NMR (Nuclear Magnetic Resonance) αποτελεί την πιο ισχυρή ένδειξη ότι σχηματίζεται ένα σύμπλοκο. Μια μεταβολή στις κορυφές μπορεί να παρατηρηθεί τόσο για την κυκλοδεξτρίνη όσο και για το φιλοξενούμενο μόριο. Καθώς το περιβάλλον γύρω από τα άτομα υδρογόνου στην κοιλότητα αλλάζει λόγω σύνδεσης με το φιλοξενούμενο μόριο, μπορεί να παρατηρηθεί μια μετατόπιση στις κορυφές της κυκλοδεξτρίνης. Παρομοίως, μπορούν να παρατηρηθούν μετατοπίσεις για κορυφές που αντιστοιχούν στα άτομα του φιλοξενούμενου μορίου που διεισδύουν στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. [34]

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται από τη δεκαετία του 1970 στο σχηματισμό συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης και περιγράφει μία μέθοδο $^1\text{H-NMR}$ για την εξέταση του τρόπου αλληλεπίδρασης της β -κυκλοδεξτρίνης με μια ποικιλία αρωματικών υποστρωμάτων. Εάν ένα φιλοξενούμενο μόριο ενσωματωθεί στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, τα άτομα υδρογόνου που βρίσκονται στο εσωτερικό της κοιλότητας (C-3-H και C-5-H) θα προστατεύονται σημαντικά από το φιλοξενούμενο μόριο και θα εμφανίζουν σημαντική μετατόπιση προς τα πάνω ενώ τα άτομα υδρογόνου στην εξωτερική επιφάνεια (C-2-H, C-4-H και C-6-H) δεν θα επηρεαστούν ή θα παρουσιάσουν μόνο μια οριακή μετατόπιση. Εκείνα του φιλοξενούμενου μορίου εμφανίζουν αντίστοιχη μετατόπιση προς τα κάτω. [35]

Από τα φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ μπορεί να προσδιοριστεί ποια άτομα του φιλοξενούμενου μορίου εμπλέκονται στη σταθεροποίηση του συμπλέγματος και επίσης πώς αυτά προσανατολίζονται. Μερικά φιλοξενούμενα μόρια στα οποία έχει εφαρμοστεί αυτή η τεχνική είναι αζωχρώματα. Όσο πιο έντονη είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ του φιλοξενούμενου μορίου και του τοιχώματος της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης, τόσο υψηλότερες είναι οι μετατοπίσεις των εμπλεκόμενων ατόμων άνθρακα. [35, 41]

4.2. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS: Dynamic light scattering), γνωστή και ως φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (PCS), είναι ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της συμπεριφοράς διάχυσης των μακρομορίων στο διάλυμα. Το DLS είναι μια μη επεμβατική μέθοδος που παρέχει γρήγορο, ακριβή και αναπαραγώγιμο έλεγχο ποιότητας για να μελετήσει τη συσσωμάτωση σε βιομοριακό παρασκεύασμα που απαιτεί πολύ μικρές ποσότητες δείγματος. Η ανίχνευση της διασποράς του φωτός από την ύλη είναι μια χρήσιμη τεχνική με εφαρμογές σε πολυάριθμους επιστημονικούς κλάδους όπου, ανάλογα με την πηγή φωτός και τον ανιχνευτή, μπορούν να μελετηθούν ειδικές ιδιότητες των μορίων. Το DLS έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα δημοφιλές στον προσδιορισμό της υδροδυναμικής συμπεριφοράς πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων και ιών λόγω της ικανότητάς του να παρέχει πληροφορίες τόσο για το μέγεθος όσο και για την συσσωμάτωση. [42, 43]

Σε ένα τυπικό πείραμα σκέδασης φωτός, το δείγμα εκτίθεται σε μονοχρωματικό κύμα φωτός και ένας κατάλληλος ανιχνευτής ανιχνεύει το σήμα. Όταν μια μονοχρωματική δέσμη φωτός συναντά το διάλυμα που περιέχει μακρομόρια, το φως διασκορπίζεται προς όλες τις κατευθύνσεις ως συνάρτηση του μεγέθους και του σχήματος των μακρομορίων. Η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μια τεχνική που μετράει πρωτίστως την κίνηση Brown των μακρομορίων σε διάλυμα που προκύπτει λόγω βομβαρδισμού από τα μόρια των διαλυτών και συνδέει αυτή την κίνηση με το μέγεθος (ή συντελεστή διάχυσης: D_T) των σωματιδίων. Αυτή η κίνηση μακρομορίων εξαρτάται από το μέγεθος, τη θερμοκρασία και το ιξώδες του διαλύτη τους. Επομένως, η γνώση της ακριβούς θερμοκρασίας είναι απαραίτητη για τις μετρήσεις DLS, καθώς το ιξώδες του διαλύτη εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Όταν παρακολουθείται η κίνηση των σωματιδίων σε μια χρονική κλίμακα, μπορούν να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος των μακρομορίων, καθώς τα μεγάλα σωματίδια διαχέονται αργά, οδηγώντας σε παρόμοιες θέσεις σε διαφορετικά χρονικά σημεία, σε σύγκριση με μικρά σωματίδια (όπως μόρια διαλύτη) και επομένως δεν υιοθετούν μια συγκεκριμένη θέση. [42, 43]

Παρακάτω αναλύονται τα τρία βασικά χαρακτηριστικά μεγέθη (μέγεθος σωματιδίων, δείκτης πολυδιασποράς, ζ-δυναμικό) που μετρώνται χάρη της μεθόδου DLS και χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων εγκλεισμού.

4.2.1. Μέγεθος

Το μέγεθος (size) είναι σημαντικό χαρακτηριστικό των σωματιδίων και εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο εγκλεισμού, τις παραμέτρους της διεργασίας εγκλεισμού, το είδος του φορέα που χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό και την ουσία που εγκλείστηκε. [43, 44]

Τα σωματίδια ανάλογα με το μέγεθός τους κατηγοριοποιούνται σε νανοσωματίδια ή μικροσωματίδια. Στην περίπτωση των νανοσωματιδίων, το μέγεθός (διάμετρος) τους κυμαίνεται από 10 nm έως 1000 nm και ο όρος νανοσωματίδια χρησιμοποιείται για την περιγραφή στερεών κολλοειδών σωματιδίων. Τα σωματίδια με διάμετρο που κυμαίνεται από 1 μm έως 1000 μm ονομάζονται μικροσωματίδια. Ωστόσο, το εύρος διαμέτρου μπορεί να αλλάξει ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε εφαρμογής, όπως για παράδειγμα, στην περίπτωση των φαρμάκων όπου η νανοκλίμακα αφορά σε σωματίδια των οποίων η διάμετρος τους συνήθως κυμαίνεται από 1 έως 100 nm. [44]

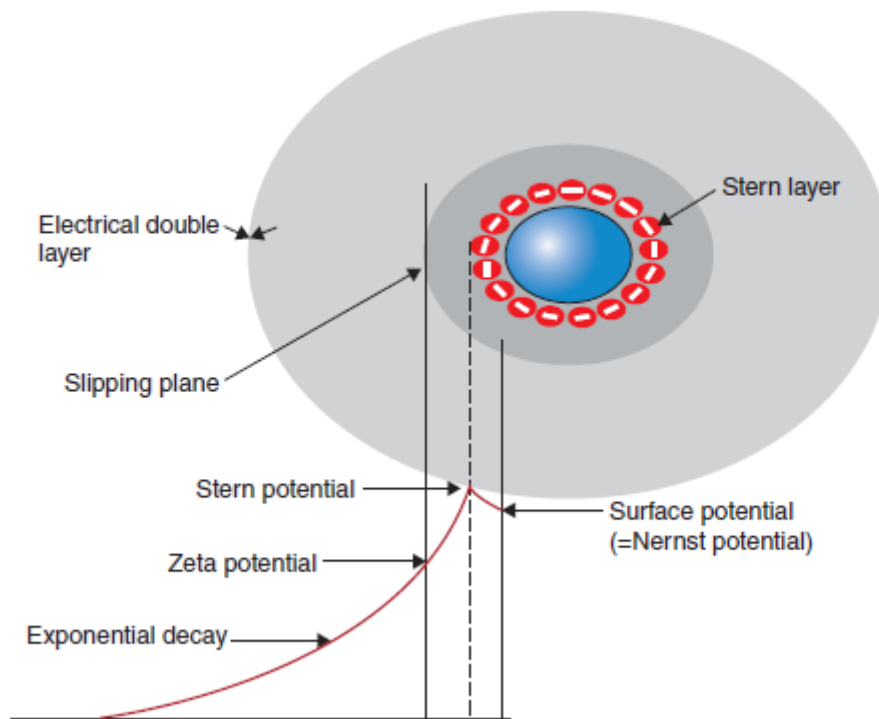
Το μέγεθος επηρεάζει τη σταθερότητα των συμπλόκων και τη δράση του εγκλεισμένου μορίου. Για παράδειγμα, μικρότερου μεγέθους σωματίδια παρουσιάζουν μεγαλύτερη δράση σε σχέση με ίδια σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους ενάντια σε καρκινικά κύτταρα. Φαινόμενα καθίζησης και συσσωμάτωσης μπορούν να μειωθούν όσο μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων. Ακόμη, όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων αυξάνεται το ιξώδες του τελικού προϊόντος. [44]

4.2.2. Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)

Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI: Polydispersity Index) αποτελεί μέτρο της ομοιομορφίας του μεγέθους των σωματιδίων που υπάρχουν σε ένα αιώρημα και λαμβάνει τιμές από 0 έως 1. Μία τιμή κοντά στο μηδέν υποδεικνύει μικρή διακύμανση μεγέθους σωματιδίων (μονοδιασπορά) ενώ τιμές μεγαλύτερες από 0,20 υποδεικνύουν ευρεία κατανομή μεγέθους των σωματιδίων (πολυδιασπορά). Γενικά, ένα σύστημα μονοδιασποράς πλεονεκτεί έναντι ενός μίγματος πολυδιασπαρμένων σωματιδίων, που έχουν διαφορετικές ικανότητες φόρτωσης, λόγω της ικανότητάς του να παρέχει μια σταθερή ποσότητα της ένωσης, σε σύγκριση με ένα μίγμα από πολυδιασπαρμένα σωματίδια. [43, 44]

4.2.3. ζ-δυναμικό

Το ζ-δυναμικό (zeta-potential) υποδεικνύει το φορτίο στην επιφάνεια των σωματιδίων. Σε ένα διάλυμα, τα σωματίδια έχουν δύο στρώματα (στιβάδα Stern και στιβάδα διάχυσης), τα οποία συνήθως ονομάζονται ηλεκτρική διπλοστιβάδα (Εικόνα 10). Η στιβάδα Stern υποδεικνύει ένα στρώμα ιόντων (αντίθετου φορτίου) ισχυρά συνδεδεμένο με την επιφάνεια των σωματιδίων, ενώ η στιβάδα διάχυσης είναι το εξωτερικό στρώμα και περιλαμβάνει χαλαρά συνδεδεμένα ιόντα. [44]



Εικόνα 10: Απεικόνιση ενός σωματιδίου, που έχει ένα αρνητικό επιφανειακό δυναμικό, μια στιβάδα Stern που αποτελείται από αρνητικά ιόντα, μια στιβάδα διάχυσης που περιβάλλει τόσο τα σωματίδια όσο και το μετρούμενο ζ-δυναμικό βρίσκεται στο επίπεδο ολίσθησης. Η πορεία της πιθανής καμπύλης σχεδιάζεται ως συνάρτηση της απόστασης από την επιφάνεια των σωματιδίων. [44]

Το ζ-δυναμικό των σωματιδίων ορίζεται ως το ηλεκτροστατικό δυναμικό στο όριο που διαιρεί τη συμπαγή στιβάδα και τη στιβάδα διάχυσης (το επίπεδο ολίσθησης). Τα κολλοειδή σωματίδια σε διασπορά με ζ-δυναμικό μεταξύ -10 mV και $+10$ mV θεωρούνται περίπου ουδέτερα, ενώ τα κολλοειδή σωματίδια με ζ-δυναμικό μεγαλύτερα από $+30$ mV ή λιγότερο από -30 mV θεωρούνται έντονα κατιονικά και έντονα ανιονικά αντίστοιχα. Για παράδειγμα, ένα υψηλότερο ζ-δυναμικό δίνει την ισχυρότερη απωστική δύναμη (όπως ένα ηλεκτρικό φορτίο) για να αποτρέψει την ένωση δύο σωματιδίων σε ένα μόνο μεγάλο σωματίδιο. Το ζ-δυναμικό με τιμή (θετική ή αρνητική) άνω των 40 mV δείχνει καλή σταθερότητα των σωματιδίων στις διασπορές. Ως αποτέλεσμα, το ζ-δυναμικό έχει αναγνωριστεί ως ένας πολύ καλός δείκτης του μεγέθους της αλληλεπίδρασης μεταξύ των κολλοειδών σωματιδίων και οι μετρήσεις του ζ-δυναμικού χρησιμοποιούνται συνήθως για να εκτιμηθεί η σταθερότητα των κολλοειδών συστημάτων. [43, 44]

4.3. Ορατή και Υπεριώδης Φασματοσκοπία

Μερικές φορές, ο σχηματισμός συμπλόκου με κυκλοδεξτρίνη αλλάζει το αρχικό ορατό ή υπεριώδες (UV) φάσμα απορρόφησης του φιλοξενούμενου μορίου και συνήθως εμφανίζεται μια βαθυχρωμική μετατόπιση και/ή διεύρυνση πλάτους μιας κορυφής. Η μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας στο σύμπλοκο μπορεί να εξηγηθεί από μια μερική θωράκιση των ηλεκτρονίων που προκαλούν διέγερση στην κυτταρική κοιλότητα. Η υψηλή πυκνότητα ηλεκτρονίων στο εσωτερικό της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης κινητοποιεί τα ηλεκτρόνια του παγιδευμένου φιλοξενούμενου μορίου. [35]

Η εξαγωγή του φιλοξενούμενου μορίου από το σύμπλοκο χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό του φορτίου και της ομοιογένειας του συμπλόκου. Μία μικρή ποσότητα συμπλόκου τοποθετείται σε ένα δοχείο με λίγο νερό και μη αναμείξιμο με το νερό διαλύτη και θερμαίνεται και αναμιγνύεται επιμελώς. Η θερμότητα αποσταθεροποιεί το σύμπλοκο. Η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται στο νερό και το φιλοξενούμενο μόριο εκχυλίζεται στην οργανική φάση. Το φιλοξενούμενο μόριο στην οργανική φάση αναλύεται χρησιμοποιώντας τις χρωματογραφικές ή φασματοφωτομετρικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται κανονικά για τον προσδιορισμό του φιλοξενούμενου μορίου. [34]

4.4. Οπτικές Μέθοδοι

Περαιτέρω χρήσιμες μέθοδοι για την διερεύνηση του σχηματισμού συμπλόκου είναι η οπτική περιστροφική διασπορά (ORD: optical rotary dispersion) και ο κυκλικός διχρωσμός (CD: circular dichroism). Σύμπλοκα από χειρόμορφες αλλά μη απορροφητικές κυκλοδεξτρίνες με μη χειρόμορφο μόριο που απορροφά το φως πρέπει να είναι τόσο χειρόμορφα όσο και να απορροφούν το φως. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα νέες κορυφές στα φάσματα CD των κυκλοδεξτρινών και διακριτά χαρακτηριστικά των φάσεων ORD γνωστά ως Cotton effects. Οι παρατηρούμενες μεταβολές στην οπτική περιστροφή οφείλονται κυρίως στην επαγόμενη οπτική δραστηριότητα του φιλοξενούμενου μορίου. Τα φάσματα CD μπορούν να δώσουν οριστική απόδειξη του σχηματισμού συμπλόκου σε υδατικό διάλυμα, παρατηρώντας ένα Cotton effect μόνο όταν το φιλοξενούμενο μόριο συμπεριλαμβάνεται πραγματικά στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Συνεπώς, οι παρατηρούμενες αλλαγές στα φάσματα απορρόφησης παρέχουν ανεπαρκή στοιχεία για σχηματισμό συμπλόκου και μπορούν να υποδείξουν μόνο τη δημιουργία συμπλεγμάτων σύνδεσης. [35]

4.5. Φασματοσκοπία Φθορισμού

Δεδομένου ότι οι φθορίζουσες ιδιότητες πολλών μορίων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον, ο φθορισμός είναι μια δυναμική χρήσιμη μέθοδος για τον προσδιορισμό της γεωμετρίας συμπλοκοποίησης. Για παράδειγμα, η ένταση φθορισμού αυξάνεται σημαντικά (10 φορές) αν προστεθεί κυκλοδεξτρίνη σε υδατικό διάλυμα 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate. Ο σχηματισμός συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα μια υψηλότερη κβαντική απόδοση φθορισμού και το μέγιστο των εκπομπών μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος. [35]

4.6. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία που περιλαμβάνει τα φάσματα IR με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR: Fourier-transform Infrared Spectroscopy) χρησιμοποιείται επίσης για αναλύσεις συμπλόκων. Οι κορυφές που οφείλονται στο τμήμα του φιλοξενούμενου μορίου γενικά μετατοπίζονται ή οι εντάσεις τους αλλάζουν, αλλά επειδή η μάζα του φιλοξενούμενου μορίου δεν υπερβαίνει το 5-15% της μάζας του συμπλόκου, αυτές οι αλλοιώσεις συνήθως καλύπτονται από το φάσμα του ξενιστή. Για τον ίδιο λόγο, δεν μπορούν να ληφθούν χρήσιμα αποτελέσματα στην μακρινή περιοχή IR. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρούνται φασματοσκοπικές αλλαγές που υποδηλώνουν σχηματισμό συμπλόκου, όπως καρβονυλικές ζώνες που εκτείνονται μεταξύ 1650 cm^{-1} και 1700 cm^{-1} , μετατοπίζονται στο σύμπλοκο εγκλεισμού. Για παράδειγμα, οι ζώνες διέγερσης καρβονυλίου (περίπου 1700 cm^{-1}) των εστέρων του *p*-υδροξυβενζοϊκού οξέος μετατοπίζονται 40 cm^{-1} σε υψηλότερο κυματαριθμό στην ένωση εγκλεισμού, αφού διακόπτεται η ενδομοριακή σύνδεση υδρογόνου των φιλοξενούμενων μορίων και είναι μονομοριακά διασκορπισμένα στην κοιλότητα του ξενιστή. Εν γένει, ισχύει ότι μετά τη συμπλοκοποίηση του φιλοξενούμενου μορίου, εμφανίζονται μετατοπίσεις ή αλλαγές στο φάσμα. Υπάρχουν παρεμβολές στα φάσματα από την κυκλοδεξτρίνη και ορισμένες από τις αλλαγές είναι πολύ μικρές, απαιτώντας προσεκτική ερμηνεία του φάσματος. [34, 35, 41]

4.7. Θερμικές Μέθοδοι DSC, TGA και DTA

Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC: Differential Scanning Calorimetry) ή η θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA: Thermogravimetric Analysis). Για ανάλυση με αυτές τις τεχνικές, το φιλοξενούμενο μόριο πρέπει να έχει θερμοκρασία τήξης ή βρασμού κάτω από περίπου $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, θερμοκρασία στην οποία αποσυντίθενται οι κυκλοδεξτρίνες. Χρησιμοποιώντας τη DSC μέθοδο, δεν παρατηρείται απορρόφηση ενέργειας στη θερμοκρασία τήξης του φιλοξενούμενου μορίου όταν το φιλοξενούμενο μόριο συμπλοκοποιείται. Με λίγα λόγια, μπορεί να παρατηρηθεί ενδόθερμη κορυφή για το μόριο (στη θερμοκρασία του σημείου τήξης ή του σημείου βρασμού) και για το φυσικό μείγμα, αλλά θα απουσιάζει για το σύμπλοκο. Δεδομένου ότι το φιλοξενούμενο μόριο περιβάλλεται από την κυκλοδεξτρίνη και δεν αλληλεπιδρά με άλλα φιλοξενούμενα μόρια, δεν υπάρχει κρυσταλλική φιλοξενούμενη δομή για την απορρόφηση της ενέργειας. [34, 35]

Και με τις δύο τεχνικές παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας βρασμού. Η αλληλεπίδραση του φιλοξενούμενου μορίου με την κυκλοδεξτρίνη παρέχει ένα υψηλότερο ενεργειακό φράγμα για να ξεπεραστεί, για εξάχνωση, έτσι ώστε να παρατηρηθεί μια αύξηση της θερμοκρασίας βρασμού περίπου $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Μια εκτίμηση της ποσότητας του μη συμπλοκοποιημένου φιλοξενούμενου μορίου μπορεί να ληφθεί μέσω της DSC μεθόδου, ειδικά αν δεν έχουν συμπλοκοποιηθεί μεγάλες ποσότητες φιλοξενούμενων μορίων. [34, 35]

Η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA: Differential Thermal Analysis) είναι αρκετά παρόμοια με τη DSC. Θεωρείται ότι λόγω ευαισθησίας της τεχνικής, οποιαδήποτε μεταβολή στην κρυσταλλική κατάσταση ενός υλικού θα ανιχνευθεί, συμβάλλοντας έτσι και στην ανίχνευση συμπλόκων εγκλεισμού. [35]

4.8. Μέθοδοι υπό Κενό

Ο απλούστερος τρόπος ανίχνευσης του σχηματισμού συμπλόκου με υλικά εξάχνωσης είναι η υποβολή του υλικού, στην υποθετικά συμπλοκοποιημένη κατάσταση, σε εξάχνωση υπό κενό ή ξήρανση υπό κενό. Το υλικό που δε δεσμεύεται στο σύμπλοκο εξαχνώνεται εύκολα, αλλά το υλικό που είναι μέρος του συμπλόκου δεν αφήνει το σύμπλοκο κάτω από τη θερμοκρασία αποικοδόμησης (περίπου 200 °C) της κυκλοδεξτρίνης. Η πτητικότητα του εγκλεισμένου μορίου μπορεί να είναι μερικές τάξεις μεγέθους μικρότερη από του ελεύθερου μορίου. Αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη εάν το φιλοξενούμενο μόριο είναι υγρό και το σημείο βρασμού δεν είναι πολύ υψηλό, όπως αιθέρια έλαια και πτητικά. [35]

4.9. Περίθλαση με Ακτίνες Χ

Για την ανίχνευση συμπλόκων εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης, σε μορφή σκόνης ή μικροκρυσταλλική μορφή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η περίθλαση με ακτίνες Χ. Το μοτίβο περίθλασης του συμπλόκου εγκλεισμού είναι σαφώς ευκρινέστερο σε σχέση με αυτό που προκύπτει από την υπέρθεση κάθε συστατικού ξεχωριστά. Στην περίπτωση των υγρών φιλοξενούμενων μορίων, όπως για παράδειγμα έλαια και πτητικά, η περίθλαση ακτίνων Χ είναι αρκετά χρήσιμη μέθοδος για την ανίχνευση σχηματισμού συμπλόκου εγκλεισμού. Αυτό συμβαίνει γιατί τα υγρά φιλοξενούμενα μόρια δεν παράγουν καθόλου μοτίβα περίθλασης, και αν το διάγραμμα που προκύπτει διαφέρει από εκείνο της καθαρής κυκλοδεξτρίνης, τότε μπορεί να θεωρηθεί ότι σχηματίζεται κρυσταλλικό πλέγμα νέου τύπου, γεγονός που σημαίνει ότι έχει πραγματοποιηθεί εγκλεισμός. Στην περίπτωση των φιλοξενούμενων μορίων που βρίσκονται σε κρυσταλλική μορφή, το μοτίβο περίθλασης ακτίνων Χ σηματοδοτεί σχηματισμό συμπλόκου μόνο εάν λείπουν μερικές από τις χαρακτηριστικές ζώνες της καθαρής β-κυκλοδεξτρίνης ή εάν εμφανίζονται άλλες χαρακτηριστικές ζώνες ανάκλασης που αρχικά έλειπαν από τα διαγράμματα ακτίνων Χ τόσο της κυκλοδεξτρίνης όσο και του φιλοξενούμενου μορίου. Αυτή η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για το λάδι χαμομηλιού και άλλα αιθέρια έλαια όπως η θυμόλη και για εκχυλίσματα αιθέριων ελαίων. [35]

4.10. Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin-layer Chromatography) μπορεί επίσης να φανεί χρήσιμη για την επιβεβαίωση του σχηματισμού συμπλόκου, καθώς αυτή η διαδικασία μεταβάλλει σημαντικά τις τιμές RF (retardation factor). Συνήθως μειώνονται σημαντικά, υπό την προϋπόθεση ότι το σύμπλοκο είναι επαρκώς σταθερό στο χρησιμοποιούμενο μίγμα διαλυτών. Η τιμή RF που λαμβάνεται από ένα φυσικό μείγμα είναι μεταξύ της τιμής RF του καθαρού φιλοξενούμενου μορίου και εκείνης του συμπλόκου. [35]

Μια άλλη προσέγγιση αφορά στη χρήση TLC σε κυτταρίνη που αναπτύχθηκε με υδατικά διαλύματα έκλουσης κυκλοδεξτρινών για τη μελέτη της συμπλοκοποίησης διαφόρων φλαβονοειδών με κυκλοδεξτρίνες και παράγωγα κυκλοδεξτρινών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εξετασθέντα φλαβονοειδή δεν συμπλοκοποιούνται εύκολα με α-κυκλοδεξτρίνη ή με ηλεκτρυλιωμένη α-κυκλοδεξτρίνη. Ωστόσο, τα φλαβονοειδή σχηματίζουν σύμπλοκα με τη β-κυκλοδεξτρίνη, την ηλεκτρυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη, την ηλεκτρυλιωμένη γ-κυκλοδεξτρίνη και με τα πολυμερή των α-, β- και γ-κυκλοδεξτρινών. Με τη γ-κυκλοδεξτρίνη λαμβάνονται πιο επιμήκη μονοπάτια, υποδηλώνοντας ότι η κινητική σχηματισμού είναι βραδύτερη. [35]

Η αέρια χρωματογραφία (GC: Gas Chromatography) είναι μια ειδική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τις πτητικές ενώσεις. Ο σχηματισμός συμπλόκου μπορεί να επιβεβαιωθεί με τη μείωση της πτητικότητας των ενώσεων όταν βρίσκονται υπό μορφή συμπλόκου. [35]

Στο θερμοανλυτικό σύστημα (TAS: Thermo-analytical System), το δείγμα θερμαίνεται σε σφραγισμένο γυάλινο σωλήνα εξοπλισμένο με τριχοειδή έξοδο. Τα προϊόντα σε ατμώδη ή αέρια κατάσταση, φεύγουν μέσω του τριχοειδούς σωλήνα και κατόπιν συμπυκνώνονται απευθείας πάνω σε πλάκα χρωματογραφίας λεπτού στρώματος. Με τη σταδιακή μετατόπιση της πλάκας, τα πτητικά προϊόντα που απελευθερώνονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες εναποτίθενται σε διαφορετικές θέσεις κατά μήκος της γραμμής εκκίνησης της πλάκας. Κατά την ανάπτυξη της πλάκας μπορεί να προσδιοριστεί ο αριθμός και ο τύπος των συστατικών που εξατμίζονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Στην περίπτωση πτητικών υλικών, αυτή η μέθοδος είναι χρήσιμη για την επιβεβαίωση σχηματισμού συμπλόκου και τη διερεύνηση της σταθερότητάς του. [35]

4.11. Φασματομετρία Μάζας

Μελέτες φασματομετρίας μάζας (MS: Mass Spectrometry) έδειξαν ότι οι χαρακτηριστικές κορυφές ενός μορίου με σημείο βρασμού κάτω από τη θερμοκρασία αποσύνθεσης της κυκλοδεξτρίνης, και το οποίο βρίσκεται υπό μορφή συμπλόκου, εμφανίζονται μόνο με τα προϊόντα αποικοδόμησης της κυκλοδεξτρίνης. Ακόμη, η παρακολούθηση των προϊόντων κατά τον θερμικό κατακερματισμό της μητρικής κυκλοδεξτρίνης και των εγκλεισμένων μορίων, με εφαρμογή της συνδυασμένης θερμοβαρυμετρικής μεθόδου (TG)-MS (Thermogravimetric Analysis–Mass Spectrometry), παρέχει στοιχεία για σχηματισμό συμπλόκων. [35, 41]

5. Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματεύεται τον εγκλεισμό εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και χυμού ροδιού σε β-κυκλοδεξτρίνη, τον πλήρη χαρακτηρισμό τους και τη μετέπειτα ενσωμάτωσή τους σε καλλυντικές κρέμες. Ο εγκλεισμός είναι μια διεργασία απαραίτητη για τη σταθεροποίηση και προστασία σημαντικών ιδιοτήτων των προαναφερθέντων συμβάλλοντας κατά κύριο λόγο στη διατήρηση των θρεπτικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Προς αυτή την κατεύθυνση, κρίθηκε σημαντική η μελέτη διαφορετικών μεθόδων και συνθηκών για τη διεργασία του εγκλεισμού.

Έτσι, σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού μεταξύ εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και β-κυκλοδεξτρίνης αλλά και χυμού ροδιού και β-κυκλοδεξτρίνης. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκαν η μέθοδος της συγκαταβύθισης (CM) και η μέθοδος της λυοφιλοποίησης (FD) με κάποιες τροποποιήσεις που κρίθηκαν απαραίτητες για κάθε περίπτωση.

Στη συνέχεια, έγινε χαρακτηρισμός των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Με τη βοήθεια της φασματοφωτομετρίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) εκτιμήθηκε το ποσοστό ολικού εγκλεισμού και το ποσοστό της επιτυγχανόμενης επιφανειακής πρόσδεσης. Χρήσει της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) τα παραγόμενα σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό. Η λήψη φασμάτων με χρήση της φασματομετρίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), τόσο για τα σύμπλοκα όσο και για τη β-κυκλοδεξτρίνη, το εκχύλισμα φλούδας ροδιού και τον χυμό ροδιού, και η σύγκρισή τους συνέβαλε στην επιβεβαίωση του εγκλεισμού.

Σε επιλεγμένα δείγματα συμπλόκων εγκλεισμού, στη β-κυκλοδεξτρίνη, στο εκχύλισμα φλούδας ροδιού και στον χυμό ροδιού πραγματοποιήθηκαν επιπλέον μετρήσεις αναφορικά με τις θερμικές τους ιδιότητες (DSC, TGA) και μετρήσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις φαινολικών, φλαβονοειδών, συμπυκνωμένων τανινών και αντιοξειδωτικών στα δείγματα αυτά και οι συγκεντρώσεις αυτών συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και του χυμού ροδιού από τα οποία προήλθαν. Ακόμη, για δύο από τα προαναφερθέντα δείγματα συμπλόκων, μελετήθηκε η απελευθέρωση του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού από τη β-κυκλοδεξτρίνη, της μεθόδου λυοφιλοποίησης και η απελευθέρωση του χυμού ροδιού από τη β-κυκλοδεξτρίνη, της μεθόδου συγκαταβύθισης.

Στην περίπτωση του δείγματος εγκλεισμού με τη μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού, με βάση το χυμό ροδιού, πραγματοποιήθηκε επανάληψη του εγκλεισμού για αναγωγή των ποσοτήτων σε μεγαλύτερη κλίμακα για περαιτέρω μελέτη και ενσωμάτωση των προκύπτοντων συμπλόκων σε καλλυντική κρέμα. Το δείγμα που προέκυψε μαζί με το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, τον χυμό ροδιού και το δείγμα που παρασκευάστηκε με μέθοδο λυοφιλοποίησης και πρώτη ύλη τον χυμό ροδιού, ενσωματώθηκαν σε καλλυντικές κρέμες στην ελληνική εταιρεία φυσικών προϊόντων, KORRES A.E., για μελέτες σταθερότητας.

Πειραματικό Μέρος

6. Αναλυτικές Μέθοδοι Χαρακτηρισμού και Ταυτοποίησης Συμπλόκων Εγκλεισμού

Σε διεργασίες που πραγματεύονται εγκλεισμούς πρέπει σε πρώτο στάδιο να επιβεβαιωθεί ότι έχουν σχηματιστεί τα σύμπλοκα εγκλεισμού. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, η δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού διαπιστώθηκε με χρήση των παρακάτω μεθόδων:

- φασματομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού,
- δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) για τη μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού,
- διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) και θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA) για τη μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων,
- πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) και φασματομετρία υπερύθρου (FT-IR) για την ταυτοποίηση των συμπλόκων

Ακολούθως, αναλύονται οι αρχές των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική εργασία.

6.1. Φασματομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Στο σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού, η φασματομετρία υπεριώδους-ορατού μήκους κύματος, ή φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης, συμβάλλει στον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού, μέσω της καμπύλης αναφοράς που έχει δημιουργηθεί. [34, 35] [68]

Στη UV-Vis φασματομετρία απορροφάται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή 190-800 nm, από τα μόρια μιας διαλυμένης ουσίας, που υφίστανται ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Η ζώνη απορρόφησης χωρίζεται σε δύο περιοχές, του εγγύς υπεριώδους από 190 nm μέχρι 400 nm και αυτή του ορατού από 400 nm μέχρι 800 nm. Η απορρόφηση ακτινοβολίας στο εγγύς υπεριώδες οφείλεται στις χρωμοφόρες ή αυξόχρωμες ομάδες⁴ των μορίων, με συνέπεια να παρέχονται πληροφορίες μόνο για συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες του μορίου μιας ένωσης, χωρίς να το χαρακτηρίζουν ως σύνολο. [45] [68]

Η απορρόφηση υπεριώδους και ορατής ακτινοβολίας από ένα μόριο οδηγεί σε μεταπτώσεις με αλλαγές της σταθερής κατάστασής του σε διεγερμένη κατάσταση. Αυτές οι αλλαγές οφείλονται στις μεταπηδήσεις ηλεκτρονίων από τα μοριακά δεσμικά ή μη δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας, στα αντιδεσμικά τροχιακά υψηλότερης ενέργειας. Έτσι, λαμβάνεται ένα φάσμα, στο οποίο απεικονίζονται οι απορροφήσεις των χρωμοφόρων ομάδων του μορίου, ως κορυφές, σε χαρακτηριστικό μήκος κύματος. [45] [68]

Η ποσοτική έκφραση της απορρόφησης δίνεται από το νόμο Lambert-Beer (σχέση 1), ο οποίος ορίζει τη σχέση μεταξύ της ελάττωσης της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και της συγκέντρωσης του αναλύτη, ο οποίος διαπερνάται από την ακτινοβολία. [45] [68]

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T} = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (1)$$

⁴ Πρόκειται για ακόρεστες ομάδες ή ετεροάτομα που περιέχουν μονήρη ηλεκτρόνια.

όπου A είναι η απορρόφηση, I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I η μειωμένη ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας, $T \left(= \frac{I}{I_0} \right)$ η διαπερατότητα, ε η μοριακή απορροφητικότητα ή μοριακός συντελεστής απόσβεσης (L/(mol·cm)), b το πάχος της κυψελίδας (cm), c η συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας (mol/L).

Το υπεριώδες ή ορατό φάσμα μιας ένωσης είναι ουσιαστικά το φάσμα απορρόφησής της έχοντας ως τετμημένη το μήκος κύματος σε (nm) και ως τεταγμένη τη διαπερατότητα (%) ή απορρόφηση. Η διαπερατότητα συνδέεται με την απορρόφηση, όπως παρουσιάζεται στη σχέση 1. Με χρήση της ίδιας σχέσης δύναται να προσδιοριστεί η συγκέντρωση κάποιου άγνωστου δείγματος αφού πρώτα έχει κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς για τιμές απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. [45] [68]

Το όργανο που χρησιμοποιείται στη φασματομετρία υπεριώδους-ορατού μήκους κύματος ονομάζεται φασματόμετρο UV-Vis και στην πλειοψηφία είναι διπλής δέσμης. Τα φασματόμετρα διακρίνονται σε μονής δέσμης, αν το ποσοστό ακτινοβολίας διέρχεται ολοκληρωτικά διαμέσου του δείγματος και σε διπλής δέσμης, αν χωρίζεται σε δύο δέσμες πριν να φτάσει στο δείγμα, όπου στην περίπτωση αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί κυψελίδα αναφοράς. Η οργανολογία του περιλαμβάνει δύο πηγές ακτινοβολίας, ένα μονοχρωμάτορα, για επιλογή της ζώνης μήκους κύματος ακτινοβολίας που εκπέμπεται και έναν ανιχνευτή που λαμβάνει την ένταση της ακτινοβολίας όταν εξέρχεται από το δείγμα. Οι δύο πηγές ακτινοβολίας είναι, ουσιαστικά, μια λάμπα δευτερίου για την περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας και μια λάμπα βολφραμίου για την ορατή πηγή. [45] [68]

6.2. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Με τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης φωτός μπορούν να προσδιοριστούν χαρακτηριστικά των συμπλόκων εγκλεισμού όπως το μέγεθός τους, η κατανομή του μεγέθους τους μέσω του δείκτη πολυδιασποράς αλλά και η σταθερότητά τους μέσω του ζ-δυναμικού. Η εκτίμηση της γεωμετρικής τους δομής και της κατάστασης της κίνησής τους παρέχει σημαντικές πληροφορίες για πιθανές εφαρμογές που ενδέχεται να έχουν.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον προσδιορισμό του συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων. Η μονοχρωματική δέσμη φωτός του οργάνου ακτινοβολεί τα σωματίδια του δείγματος, τα οποία, όντας σε διασπορά, προκαλούν το σκεδασμό τμήματός της προς όλες τις κατευθύνσεις, ως συνάρτηση του μεγέθους και του σχήματός τους. Μεταξύ των ίδιων των μορίων του δείγματος αλλά και των μορίων του διαλύτη πραγματοποιούνται συγκρούσεις, οπότε τα μόρια βρίσκονται σε διασπορά εκτελώντας κινήσεις Brown. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των σωματιδίων βασίζεται στην ταχύτητα κίνησης Brown. Εάν αναλυθούν οι διακυμάνσεις της έντασης (που προκαλούνται λόγω της κίνησης Brown των μορίων στο διάλυμα) της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το χρόνο, από τα δεδομένα έντασης-χρόνου και την αξιοποίηση στατιστικών συναρτήσεων συσχέτισης, μπορεί να ληφθεί ο συντελεστής διάχυσης (D_T) που σχετίζεται με το υδροδυναμικό μέγεθος των μακρομορίων, σύμφωνα με την εξίσωση Stokes-Einstein (σχέση 2). [42, 43]

$$D_T = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_h} \quad (2)$$

όπου D_T είναι ο συντελεστής διάχυσης, k_B η σταθερά Boltzman, T η θερμοκρασία, η το ιξώδες του μέσου διασποράς και d_h η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων.

Αναφορικά με το δείκτη πολυδιασποράς, είναι ένα μέγεθος που σχετίζεται με την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων. Ουσιαστικά, αντιπροσωπεύει το βαθμό ομοιομορφίας των σχηματισμένων συμπλόκων. Λαμβάνει τιμές από 0, όπου υπάρχει πλήρης ομοιομορφία, ή μονοδιασπορά, μέχρι 1, όπου πρόκειται για πλήρη ανομοιογένεια, αντιστοιχώντας σε συστήματα πολυδιασποράς. [42, 43]

Σχετικά με το ζ-δυναμικό, τα σωματίδια υποβάλλονται σε ηλεκτρικό πεδίο το οποίο αναγκάζει τα φορτισμένα σωματίδια να κινηθούν σε αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο και μετράται αυτή τους η κινητικότητα. Το ζ-δυναμικό δεν μπορεί να μετρηθεί άμεσα και συνάγεται από την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των φορτισμένων σωματιδίων κάτω από το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα είναι πρακτικά η ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων σε ηλεκτρικό πεδίο και συσχετίζεται με διάφορους παράγοντες μέσω της εξίσωσης Henry (σχέση 3). [46]

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad (3)$$

όπου μ_e είναι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα, ε_r η σχετική διαπερατότητα/διηλεκτρική σταθερά, ε_0 η διαπερατότητα του κενού, ζ το ζ-δυναμικό, $f(Ka)$ η συνάρτηση Henry που παίρνει τιμή 1,5 για υδατικά διαλύματα (προσέγγιση Smoluchowski) και τιμή 1 για μη πολικούς διαλύτες (προσέγγιση Huckel) και η το ιξώδες στη θερμοκρασία του πειράματος.

Η τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων. Είναι μια εύκολη, απλή, μη επεμβατική τεχνική που απαιτεί συγκριτικά χαμηλές ποσότητες δείγματος και παρέχει γρήγορα αξιόπιστες εκτιμήσεις. Υπάρχει περιορισμός στα μεγέθη των σωματιδίων που μπορούν να μετρηθούν, ο οποίος εξαρτάται από το μηχάνημα που χρησιμοποιείται. [42]

6.3. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Η διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης εντάσσεται στην κατηγορία των ενόργανων τεχνικών θερμικής ανάλυσης. Θεωρείται ποσοτική τεχνική και ότι αποτελεί μια θερμιδομετρική μέθοδο, όπου μετρώνται διαφορές στην ενέργεια. Είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος κυρίως λόγω ταχύτητας, απλότητας και διαθεσιμότητας. Το δείγμα και ένα υλικό αναφοράς τοποθετούνται στους κατάλληλους υποδοχείς του οργάνου. Τα θερμαντικά στοιχεία συμβάλλουν στη γραμμική αύξηση της θερμοκρασίας με καθορισμένο τρόπο ή τη διατηρούν σε μια συγκεκριμένη τιμή. [45, 47]

Το δείγμα υποβάλλεται σε καθορισμένο θερμοκρασιακό πρόγραμμα, όπου σαρώνεται σε μια θερμοκρασιακή περιοχή και ψύχεται ή θερμαίνεται. Με αυτό τον τρόπο παρατηρούνται αλλαγές στη συμπεριφορά του υλικού που αποτελούν τα προς ανάλυση αποτελέσματα. Έτσι, μπορούν να προσδιοριστούν σημεία τήξης, θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης (T_g), θερμοκρασίες και ενθαλπίες κρυστάλλωσης ($T_c, \Delta H_c$), θερμοκρασίες και ενθαλπίες τήξης ($T_m, \Delta H_m$), θερμοκρασίες αποικοδόμησης και τιμές θερμοχωρητικότητας. Η τήξη είναι ενδόθερμη διεργασία και εμφανίζεται ως αρνητική κορυφή, ενώ η κρυστάλλωση είναι εξώθερμη και εμφανίζεται ως θετική κορυφή στο γράφημα DSC. [45, 47]

Η μέθοδος στηρίζεται στην καταγραφή του απαραίτητου ποσού θερμότητας προκειμένου να διατηρηθεί η ίδια θερμοκρασία στο δείγμα και σε αυτό που αποτελεί την αναφορά (συνήθως κενό). Αυτά τα δύο εισάγονται σε κατάλληλα καψίδια, που με τη σειρά τους τοποθετούνται σε θερμαινόμενους υποδοχείς. Έπειτα, αυτά θερμαίνονται από τον θερμικό ελεγκτή, με σταθερό ρυθμό θέρμανσης, ο οποίος καθορίζεται από τον χειριστή. Ως αέριο καθαρισμού χρησιμοποιείται ήλιο ή άζωτο για δημιουργία

αδρανών συνθηκών. Επίσης, υπάρχουν θερμοστοιχεία που βρίσκονται στους δύο υποδοχείς για μέτρηση της θερμοκρασίας. [45, 47]

6.4. Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA)

Η Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση ανήκει, επίσης, στις θερμικές ενόργανες μεθόδους ανάλυσης. Σε αυτή την περίπτωση, πραγματοποιείται συνεχής καταγραφή της μάζας του δείγματος σε μια ελεγχόμενη ατμόσφαιρα, συναρτήσει της θερμοκρασίας ή του χρόνου, ενώ η θερμοκρασία του δείγματος αυξάνει, συνήθως γραμμικά, με το χρόνο. Το όργανο με το οποίο πραγματοποιείται αυτή η καταγραφή ονομάζεται θερμοζυγός. [45]

Στο τμήμα του φούρνου του οργάνου βρίσκεται ο ζυγός, στον οποίο τοποθετείται το δείγμα, και γίνεται καταγραφή των μετρήσεων μάζας του ανά διαστήματα. Ο χειριστής του οργάνου καθορίζει παραμέτρους όπως ο ρυθμός θέρμανσης του δείγματος, η αρχική και τελική θερμοκρασία του φούρνου, ο χρόνος στον οποίο η θερμοκρασία θα είναι σταθερή, η αέρια ατμόσφαιρα του φούρνου (αδρανής με άζωτο/αργό ή οξειδωτική με οξυγόνο/αέρα), καθώς και η ποσότητα του προς ανάλυση δείγματος. [47]

Ως αποτέλεσμα λαμβάνεται το διάγραμμα μάζας ή του ποσοστού μάζας συναρτήσει του χρόνου, το οποίο καλείται θερμογράφημα ή καμπύλη θερμικής διάσπασης. Σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρείται μείωση του βάρους λόγω απώλειας υγρασίας, διαλύτη ή άλλων πτητικών ουσιών του δείγματος, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες παρατηρείται το φαινόμενο διάσπασης του δείγματος που μπορεί να ολοκληρώνεται σε ένα ή περισσότερα στάδια. Η θερμοκρασία όπου παρατηρείται μέγιστη μεταβολή βάρους ονομάζεται θερμοκρασία αποικοδόμησης. Η παράγωγος του θερμογραφήματος της μάζας συναρτήσει της θερμοκρασίας μπορεί να δώσει επιπλέον πληροφορίες που δεν είναι εμφανείς στο αρχικό θερμογράφημα όπως οι θερμοκρασίες απώλειας υγρασίας διαφόρων συστατικών ενός δείγματος. [45, 47]

Οι πληροφορίες που παρέχονται, λοιπόν, είναι ποσοτικές αλλά περιορίζονται στις αντιδράσεις διάσπασης και οξείδωσης αλλά και σε φυσικές διεργασίες όπως η εξάχνωση, η εξάτμιση και η εκρόφιση. Η μέθοδος αυτή δίνει πληροφορίες για τη θερμική διάσπαση και τη θερμική σταθερότητα των υλικών κατά την υποβολή τους σε θερμαινόμενο περιβάλλον, αλλά και στοιχεία για την ύπαρξη υγρασίας, διαλύτη, διάφορων πτητικών ουσιών στο προς μέτρηση δείγμα. Από τις πιο σημαντικές εφαρμογές της μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της σύνθεσης και οι μελέτες αποσύνθεσης μιγμάτων πολλών συστατικών. [45, 47]

6.5. Φασματομετρία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Η φασματομετρία υπερύθρου θεωρείται μια βασική μέθοδος ταυτοποίησης οργανικών κυρίως ενώσεων και χρησιμοποιείται στην οργανική ποσοτική ανάλυση. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης με αποτέλεσμα να διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Οι ενώσεις στις οποίες οι δονήσεις και οι περιστροφές των ατόμων τους παρουσιάζουν μια διαρκή διπολική ροπή ονομάζονται ενεργά υπέρυθρες ενώσεις (IR-active). Η ύπαρξη μεταβολής στο μέγεθος και τη διεύθυνση της διπολικής ροπής του δεσμού μιας ένωσης αποτελεί προϋπόθεση για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί η φασματομετρία υπερύθρου. Η υπέρυθρη

φασματομετρία, ουσιαστικά, σχετίζεται με τις μοριακές δονήσεις (τάσης, κάμψης κλπ.) και όχι τις ηλεκτρονιακές διεγέρσεις και μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για τη δομή μιας ουσίας.

Τα φασματόμετρα που υπάρχουν στο εμπόριο λειτουργούν στην περιοχή του κυρίως IR, 2,5-50 μm ή 4000-200 cm^{-1} . Η περιοχή αυτή χωρίζεται σε δύο επιμέρους περιοχές: των χαρακτηριστικών ομάδων ή περιοχή ταυτοποίησης, 4000-1400 cm^{-1} , όπου οι ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση ομάδων και στην περιοχή «δακτυλικού αποτυπώματος» ή περιοχή αποτύπωσης, 1400-400 cm^{-1} , που οι ζώνες απορρόφησης οφείλονται στις δονήσεις ολόκληρου του μορίου.

Το φάσμα απορρόφησης που λαμβάνεται με όργανο FT-IR είναι ένα διάγραμμα με κορυφές προς τα κάτω, που ως τετμημένη έχει τον κυματριθμό σε cm^{-1} και τεταγμένη τη διαπερατότητα του δείγματος, ως ποσοστό. Ακόμα, υπάρχει η δυνατότητα ημι-ποσοτικής ανάλυσης. Έτσι, με σύγκριση μιας χαρακτηριστικής ζώνης απορρόφησης προς το βάθος της ίδιας ζώνης ενός φάσματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του προς ανάλυση συστατικού, μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες αναφορικά με τη συγκέντρωση του συστατικού. [45] [68]

6.6. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, εύρους περίπου 4-900 MHz. Σε αυτή την περίπτωση μετέχουν οι πυρήνες των ατόμων και όχι τα ηλεκτρόνια. Για να υπάρξει απορρόφηση, απαιτείται η δημιουργία πυρηνικών ενεργειακών καταστάσεων που επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση του αναλύτη εντός ισχυρού μαγνητικού πεδίου. Έτσι, οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων μεταβαίνουν από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αναστροφή του σπιν, οπότε οι πυρήνες συντονίζονται με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία και αυτό το φαινόμενο καλείται συντονισμός. [45] [68]

Η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, λόγω αλληλεπίδρασης με τους πυρήνες του αναλύτη, είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα. Κατά συνέπεια, η φασματοσκοπία NMR συμβάλλει στον προσδιορισμό της δομής χημικών ενώσεων, στον ποσοτικό προσδιορισμό τους αλλά και παρέχει πληροφορίες για το χημικό περιβάλλον των πυρήνων των ατόμων στα μόρια των χημικών ενώσεων. [68]

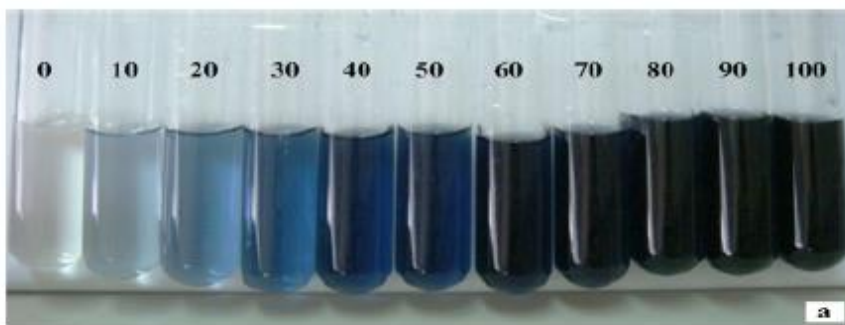
6.7. Προσδιορισμός Ύπαρξης Ολικών Φαινολικών-Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu αποτελεί μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκτίμηση της συνολικής περιεκτικότητας ενός δείγματος σε φαινολικά και βασίζεται σε μια χρωματομετρική αντίδραση, σύμφωνα με τη μελέτη του Waterman. Οι πολυφαινόλες στα φυτικά εκχυλίσματα αντιδρούν με ειδικά αντιδραστήρια οξειδοαναγωγής (αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu) σχηματίζοντας σύμπλοκο μπλε χρώματος, το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μέσω της φασματομετρίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). [48, 49]

Η αντίδραση σχηματίζει ένα μπλε χρωμοφόρο που αποτελείται από ένα σύμπλοκο φωσφοβολφραμικού φωσφορομολυβδαινίου και η μέγιστη απορρόφηση των χρωμοφόρων εξαρτάται από το αλκαλικό διάλυμα και τη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων. Ωστόσο, αυτό το αντιδραστήριο αποσυντίθεται ταχέως σε αλκαλικά διαλύματα, πράγμα που καθιστά αναγκαία τη χρήση μιας τεράστιας

περίσσειας του αντιδραστηρίου για να ληφθεί μια πλήρης αντίδραση. Η εξίσωση που χρησιμοποιείται ως καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μέσω της απορρόφησης που λαμβάνεται από το όργανο UV-Vis, εξάγεται από τη μέτρηση κάποιας ένωσης (οξέος). Έτσι, προκύπτει συγκέντρωση που εκφράζεται ως μάζα σε ισοδύναμα αυτής της ένωσης και συνήθως η ένωση αυτή είναι το γαλλικό οξύ. [49]

Η αντίδραση παρέχει γενικά ακριβή και συγκεκριμένα στοιχεία για διάφορες ομάδες φαινολικών ενώσεων, επειδή πολλές ενώσεις αλλάζουν χρώμα διαφορετικά λόγω διαφορών στη συγκέντρωση και στην κινητική της αντίδρασης (Εικόνα 11). Στην Εικόνα 11 παρατηρείται πιο έντονο χρώμα με αύξηση της συγκέντρωσης σε πρότυπα δείγματα γαλλικού οξέος, συμπέρασμα που μπορεί να επεκταθεί και στην περίπτωση δειγμάτων που ενδιαφέρει να μετρηθούν αφού αυτό που ουσιαστικά προσδιορίζεται στο όργανο UV-Vis ανάγεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, αν αυτό έχει επιλεγεί για την έκφραση σε ισοδύναμα. [49, 50]



Εικόνα 11: Διαβαθμίσεις στα χρώματα πρότυπων δειγμάτων γαλλικού οξέος, συγκέντρωσης από 0-100 µg/mL. [50]

6.8. Προσδιορισμός Ύπαρξης Φλαβονοειδών-Χρωματομετρική Μέθοδος Χλωριούχου Αργιλίου

Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας δειγμάτων σε φλαβονοειδή στηρίζεται, επίσης, σε χρωματομετρική μέθοδο η οποία είναι γνωστή ως χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου. Και σε αυτή την περίπτωση η εκτίμηση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών σε κάποιο δείγμα βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του στο φασματόμετρο UV-Vis. Μια εκτίμηση για την ύπαρξη φλαβονοειδών στο διάλυμα αποτελεί η οπτική παρατήρησή του με αλλαγή χρώματος σε ροζ απόχρωση, λόγω της συμπλοκοποίησης των φλαβονοειδών με το χλωριούχο αργίλιο. [51, 52]

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των φλαβονοειδών στο δείγμα, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με εξίσωση εκφρασμένη σε ισοδύναμα κάποιου είδους φλαβονοειδούς, το οποίο θεωρείται χαρακτηριστικό του συνόλου των φλαβονοειδών στην περιεκτικότητα. Κατά συνέπεια, στο όργανο UV-Vis μετράται η απορρόφηση του συγκεκριμένου φλαβονοειδούς και η συγκέντρωση αναφέρεται σε μάζα ισοδυνάμων αυτού. [51]

6.9. Προσδιορισμός του Συνόλου Συμπυκνωμένων Τανινών-Μέθοδος Βανιλίνης-Υδροχλωρίου

Η μέθοδος βανιλίνης-υδροχλωρίου είναι μια χρωματομετρική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των συμπυκνωμένων τανινών ή αλλιώς προανθοκυανιδίων. Το αντιδραστήριο βανιλίνης αντιδρά με συμπυκνωμένη τανίνη και σχηματίζει ένα έγχρωμο υποκατεστημένο προϊόν ροζ-πορτοκαλί απόχρωσης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με εξίσωση εκφρασμένη σε ισοδύναμα κάποιου είδους συμπυκνωμένης τανίνης, όπου εδώ είναι η κατεχίνη, γιατί θεωρείται χαρακτηριστική του συνόλου στην περιεκτικότητα. Μετράται η απορρόφηση του δείγματος στο φασματόμετρο UV-Vis και από την εξίσωση της καμπύλης προσδιορίζεται η συγκέντρωση σε ισοδύναμα κατεχίνης. [51, 53]

6.10. Μελέτη Αντιοξειδωτικής Δράσης-DPPH

Η 1,1-Διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH), είναι ένα είδος σταθερής οργανικής ρίζας. Η οξειδωτική μέθοδος DPPH χρησιμοποιείται παγκοσμίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ικανότητας δέσμευσης ριζών (RSC: Radical-scavenging Capacity). Η ικανότητα των βιολογικών αντιδραστηρίων να δεσμεύουν τη ρίζα DPPH, μπορεί να εκφραστεί ως το μέγεθος της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο ρυθμός αντίδρασης και η ικανότητα του παράγοντα δέσμευσης ριζών εξαρτώνται από την ταχύτητα και τη μέγιστη τιμή εξαφάνισης του DPPH. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, η DPPH μέθοδος έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως καλή σταθερότητα, αξιόπιστη ευαισθησία, απλότητα και εφικτότητα. [54]

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης DPPH προσδιορίζονται μέσω μετρήσεων απορρόφησης με το φασματόμετρο UV-Vis, στα 515 nm και παρουσιάζονται με πολλούς τρόπους. Συνηθέστερα, χρησιμοποιείται η έκφραση με την τιμή IC₅₀, που ορίζεται ως η ποσότητα αντιοξειδωτικού που είναι απαραίτητη για τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης DPPH κατά 50%. Η τιμή αυτή υπολογίζεται με γραφική παράσταση του ποσοστού αναστολής έναντι της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος. Το ποσοστό αναστολής υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση 4. [31, 51, 54]

$$\text{Αναστολή (\%)} = \left(\frac{\text{Απορρόφηση ελέγχου} - \text{Απορρόφηση δείγματος}}{\text{Απορρόφηση ελέγχου}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

όπου *Απορρόφηση ελέγχου* είναι η απορρόφηση του δείγματος ελέγχου το οποίο έχει υποστεί όλες ακριβώς τις επεξεργασίες όπως και τα υπόλοιπα δείγματα, αλλά δεν περιέχει την υπό εξέταση ουσία.

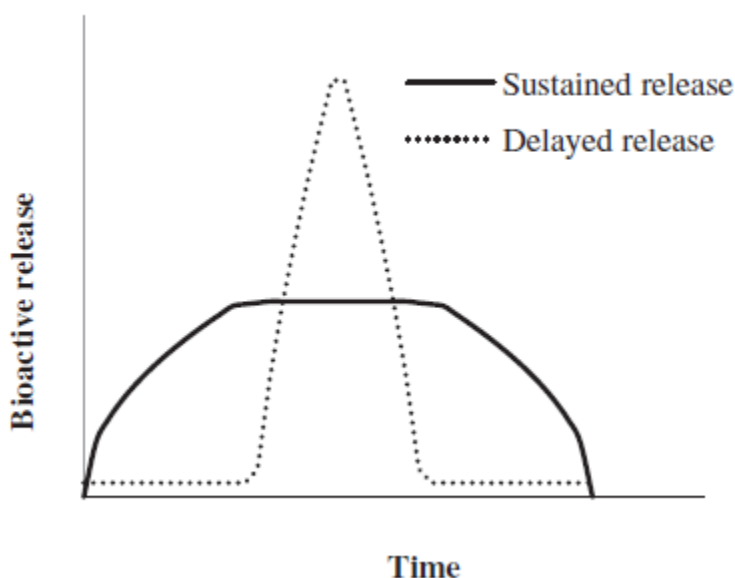
Η εξίσωση της καμπύλης της γραφικής παράστασης που προαναφέρθηκε, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης δείγματος, που μείωσε την αρχική απορρόφηση του DPPH κατά 50%. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή συγκέντρωσης που προσδιορίζεται, τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος, καθώς το ίδιο αποτέλεσμα 50% αναστολής μπορεί να επιτευχθεί με μικρότερη ποσότητα. [51]

6.11. Μελέτη Απελευθέρωσης-Release Study

Πολύ σημαντική, στα πλαίσια της σύνθεσης συμπλόκων, είναι και η μελέτη της απελευθέρωσης της βιοδραστικής ουσίας από το σύμπλοκο. Σκοπός είναι η μαθηματική μοντελοποίηση της συγκεκριμένης διαδικασίας που σχετίζεται με το μηχανισμό και την κινητική της ώστε να μπορέσουν να εξετασθούν διάφορα σενάρια για τη βελτίωση και βελτιστοποίηση του συστήματος.

Εν γένει, υπάρχουν δύο μηχανισμοί ελεγχόμενης απελευθέρωσης (Εικόνα 12): [26, 55]

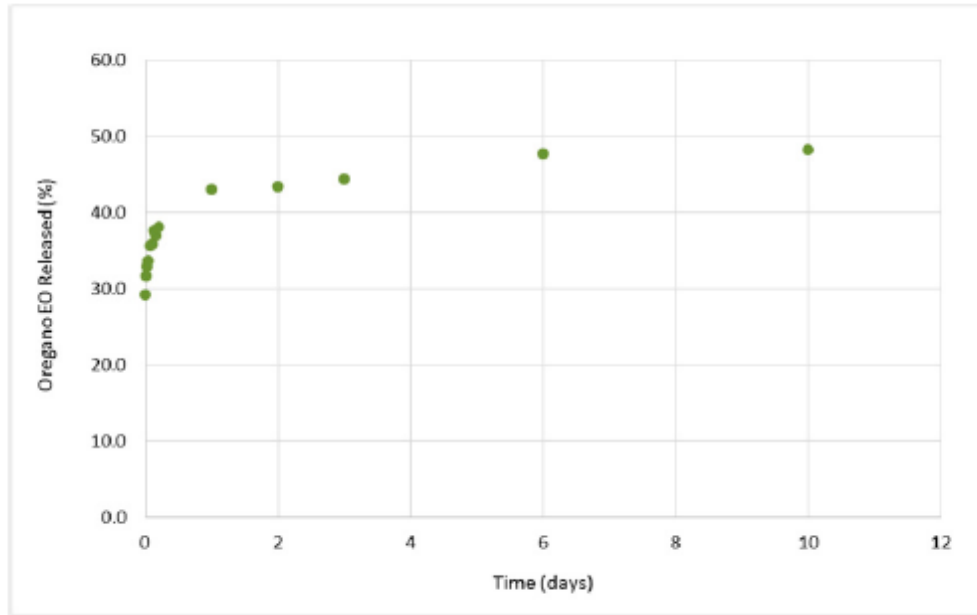
- Η καθυστερημένη απελευθέρωση, όπου καθυστερείται η απελευθέρωση μιας βιοδραστικής ουσίας για ένα ορισμένο "χρονικό διάστημα καθυστέρησης" μέχρις ότου να προτιμάται η απελευθέρωσή της και να μην παρεμποδίζεται πλέον. Παραδείγματα στα οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτός ο μηχανισμός είναι για την απελευθέρωση γεύσης στα έτοιμα φαγητά και την απελευθέρωση χρώματος σε ποτά.
- Η παρατεταμένη απελευθέρωση, η οποία είναι ένας μηχανισμός που έχει κατασκευαστεί για να διατηρεί σταθερή συγκέντρωση ενός βιοδραστικού στο σημείο στόχου του. Αυτό το σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επέκταση της απελευθέρωσης της εγκλεισμένης ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της γεύσης ή ορισμένων φαρμάκων όπως τσίχλα και ινσουλίνη αντίστοιχα.



Εικόνα 12: Μοντέλα βιοδραστικής απελευθέρωσης από νανοσυστήματα. Με συνεχή γραμμή απεικονίζεται το μοντέλο της παρατεταμένης απελευθέρωσης και με διακεκομμένη γραμμή το μοντέλο της καθυστερημένης απελευθέρωσης. [55]

Παράγοντες που επηρεάζουν την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας είναι το σχήμα και οι διαστάσεις του φορέα, η βιοδραστική διάχυση και η διαλυτότητα στο μέσο εγκλεισμού και στο περιβάλλον, ο ρυθμός διάβρωσης, το πορώδες, η βιοδραστική αναλογία μεταξύ φορέα και υδατικού μέσου, το φορτίο εγκλεισμού (αναλογία βάρους εγκλεισμένου προς το μέσο εγκλεισμού), η απόδοση εγκλεισμού (αναλογία βάρους του παγιδευμένου προς το υλικό που παραμένει ελεύθερο) και η τιμή pH του μέσου. [55]

Η τυπική, συνήθης μορφή μιας καμπύλης απελευθέρωσης παρουσιάζεται στην εικόνα 13. Σε αυτή την εικόνα παρουσιάζεται το προφίλ απελευθέρωσης, δηλαδή η μορφή συσχέτισης του ποσοστού απελευθέρωσης ως προς τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης απελευθέρωσης, για το αιθέριο έλαιο ρίγανης *Origanum onites L.* Περιλαμβάνει μια φάση απότομης αύξησης του ποσοστού απελευθέρωσης, η οποία φάση αύξησης συνεχίζεται με μειούμενο ρυθμό μέχρι σταθεροποίησης (πλατό) σε κάποιο ποσοστό απελευθέρωσης. [56]



Εικόνα 13: Προφίλ απελευθέρωσης του εγκλεισμένου, σε β -κυκλοδεξτρίνη, αιθέριου ελαίου ρίγανης στους 37°C και $\text{pH } 5,5$, σε διάστημα 11 ημερών. [56]

7. Πειραματικό Μέρος

7.1. Υλικά και Αντιδραστήρια

Εκχύλισμα φλούδας ροδιού

Για το σκέλος της πειραματικής εργασίας που αφορά σε εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού χρησιμοποιήθηκαν δύο εκχυλίσματα: το πρώτο διαλυμένο σε γλυκερίνη που χορηγήθηκε από την εταιρεία KORRES A.E. και το δεύτερο σε στερεά μορφή με ελάχιστο ποσοστό υγρασίας, το οποίο χορηγήθηκε από το Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών, του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Χυμός ροδιού

Για την παραλαβή χυμού ροδιού, συλλέχθηκαν οι αρίλες των ροδιών και τοποθετήθηκαν σε αποχυμωτή. Με αυτόν τον τρόπο έγινε η παραλαβή του χυμού ροδιού ο οποίος τοποθετήθηκε άμεσα σε σακούλες παγοκυψελών προκειμένου να καταψυχθεί ώστε να διατηρηθούν οι ευεργετικές του ιδιότητες. Στη συνέχεια, τα παγάκια που σχηματίστηκαν (Εικόνα 14, αριστερά), υποβλήθηκαν σε ξήρανση υπό κατάψυξη (freeze-drying), για διάστημα δύο ημερών, προκειμένου να απομακρυνθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η υγρασία. Έτσι, προέκυψε ο χυμός ροδιού σε κολλώδη μορφή (Εικόνα 14, δεξιά).



Εικόνα 14: Παγάκια χυμού ροδιού (αριστερά), χυμός ροδιού (δεξιά).

Στον πίνακα 4 δίνονται πληροφορίες για τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα σχηματισμού αλλά και χαρακτηρισμού των συμπλόκων εγκλεισμού του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και του χυμού ροδιού με τη β-κυκλοδεξτρίνη.

Πίνακας 4: Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

Υλικά και Αντιδραστήρια	Προμηθευτής
Εκχύλισμα ροδιού διαλυμένο σε γλυκερίνη	KORRES A.E. ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ
Εκχύλισμα φλούδας ροδιού	Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών Ε.Μ.Π
Χυμός ροδιού	Παρασκευάστηκε
Β-κυκλοδεξτρίνη 99%	Fluka AG. Buchs SG
Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας κατά ACS, ISO	Sigma-Aldrich
Απιονισμένο νερό	Εργαστήριο Οργανικής Χημείας
Διο-απιονισμένο νερό	Εργαστήριο Γενικής Χημείας Ε.Μ.Π
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d ₆)	Fisher Scientific
KBr-βρωμιούχο κάλιο	Riedel de Haen - Fisher Scientific
Foline-Ciocalteu	Merck Millipore
NaNO ₂	Fluka AG. Buchs SG
NaOH	Panreac
Βανιλίνη	Fluka
Πυκνό HCl	Fisher Scientific

7.2. Συσκευές και Όργανα

Στον πίνακα 5 παρατίθενται οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό και χαρακτηρισμό των συμπλόκων εγκλεισμού.

Πίνακας 5: Συσκευές και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.

Συσκευές και όργανα	Μοντέλο	Κατασκευαστής
Ζυγός ακριβείας	Explorer	OHAUS
Μαγνητικός αναδευτήρας	RCT basic	IKA
Αντλία υψηλού κενού		Edwards
Λουτρό υπερήχων	2210 Ultrasonic Bath	Branson
Σύστημα Freeze-Drying	Freeze dryer Alpha RVC	Christ
Περιστροφικός εξατμιστήρας	Rotavapor R-114/ Waterbath B-480	Buchi
Φασματόμετρο UV-VIS	V-770 UV-Vis/NIR0	Jasco
Φυγόκεντρος	3200	Zentrifuge
Αναδευτήρας τύπου Vortex	ZX4	Velp
Συσκευή DLS	Zetasizer Nano ZS	Malvern
Συσκευή DSC	DSC 1 STAR System	Mettler Toledo
Συσκευή TGA	TGA/DSC 1 STAR System	Mettler Toledo
Φασματόμετρο FT-IR	FT-IR-4200	Jasco
Όργανο NMR	300 MHz	Varian

7.3. Σχηματισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού

7.3.1. Συνοπτική Περιγραφή

Οι πέντε πρώτοι εγκλεισμοί σε β-κυκλοδεξτρίνη (KTZ1-KTZ5) πραγματοποιήθηκαν με εκχύλισμα ροδιού διαλυμένο σε γλυκερίνη, το οποίο χορηγήθηκε από την ελληνική εταιρεία φυσικών προϊόντων KORRES. Για τους εγκλεισμούς, έγιναν δοκιμές τόσο με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης όσο και με τη

μέθοδο της λυοφιλοποίησης. Ωστόσο, κατόπιν έρευνας και δοκιμών δεν βρέθηκε μέθοδος απομόνωσης του εκχυλίσματος από τη γλυκερίνη και συνεπώς δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί η δημιουργία συμπλόκου και ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλεισμού.

Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθούν εγκλεισμοί με εκχύλισμα φλούδας ροδιού αλλά και με χυμό ροδιού σε β-κυκλοδεξτρίνη. Προς αυτή την κατεύθυνση, εξετάστηκαν εγκλεισμοί με διάφορες τροποποιήσεις κατά περίπτωση και προσδιορίστηκε η μέθοδος με τη μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού, που συνεπάγεται και μεγαλύτερη ενίσχυση των ιδιοτήτων του εκχυλίσματος ή του χυμού, ανάλογα με την περίπτωση. Οι τροποποιήσεις στις μεθόδους που εξετάστηκαν, σχετίζονται με διαφορετικές αναλογίες κυκλοδεξτρίνης/εκχυλίσματος ή χυμού, διάρκεια ανάδευσης, και μέθοδο εγκλεισμού: με συγκαταβύθιση (CM) ή με λυοφιλοποίηση (FD). Ουσιαστικά, στις περισσότερες περιπτώσεις, όπου αναφέρεται ότι χρησιμοποιούνται οι προαναφερθείσες μέθοδοι, λόγω των τροποποιήσεων που εφαρμόστηκαν, έχουμε προσεγγίσεις των κλασικών μεθόδων τόσο της συγκαταβύθισης όσο και της λυοφιλοποίησης.

Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκαν επτά εγκλεισμοί χρησιμοποιώντας το εκχύλισμα φλούδας ροδιού (**KTZ6**, **KTZ7**, **KTZ8**, **KTZ9**, **KTZ10**, **KTZ11** (επανάληψη του **KTZ6**), **KTZ15**) και τέσσερις εγκλεισμοί (**KTZ12**, **KTZ13**, **KTZ14**, **KTZ16** (ανακλιμάκωση του **KTZ13**)) χρησιμοποιώντας τον χυμό ροδιού. Στους εγκλεισμούς με το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συγκαταβύθισης με εξαίρεση τους εγκλεισμούς **KTZ9** και **KTZ15** όπου εφαρμόστηκε η μέθοδος της λυοφιλοποίησης. Για τους εγκλεισμούς **KTZ6**, **KTZ7** και **KTZ11** η αναλογία μάζας εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και β-κυκλοδεξτρίνης είναι ίδια και ίση με 1:10, ενώ για τους εγκλεισμούς **KTZ8**, **KTZ9**, **KTZ10** και **KTZ15** η αντίστοιχη αναλογία είναι 1:4. Επίσης, υπάρχουν διαφοροποιήσεις και στη διάρκεια ανάδευσης. Πιο συγκεκριμένα, στους εγκλεισμούς **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ10** εφαρμόστηκε τετράωρη ανάδευση, στους εγκλεισμούς **KTZ7** και **KTZ8** ολονύκτια ανάδευση και στον εγκλεισμό **KTZ15** δίωρη ανάδευση.

Αναφορικά με τους εγκλεισμούς με τον χυμό ροδιού, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συγκαταβύθισης για τους εγκλεισμούς **KTZ12**, **KTZ13** και **KTZ16** και η μέθοδος της λυοφιλοποίησης για τον εγκλεισμό **KTZ14**. Για τους εγκλεισμούς **KTZ13**, **KTZ14** και **KTZ16** η αναλογία μάζας χυμού ροδιού και β-κυκλοδεξτρίνης είναι ίδια και ίση με 1:4, ενώ για τον εγκλεισμό **KTZ12** η αντίστοιχη αναλογία είναι 1:10. Επίσης, υπάρχουν διαφοροποιήσεις και στη διάρκεια ανάδευσης. Πιο συγκεκριμένα, στους εγκλεισμούς **KTZ12**, **KTZ13** και **KTZ16** εφαρμόστηκε τετράωρη ανάδευση ενώ για τον εγκλεισμό **KTZ14** εφαρμόστηκε δίωρη ανάδευση.

Οι εγκλεισμοί **KTZ14** και **KTZ15** πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης, ωστόσο διαφοροποιούνται από τους υπόλοιπους, όπως παρουσιάζεται στη σχετική βιβλιογραφία ([4]). Έτσι, σε αυτούς τους δύο εγκλεισμούς, πέρα από τη διαφορά στη διάρκεια ανάδευσης, η ποσότητα νερού για τη διάλυση της β-κυκλοδεξτρίνης ήταν σε αναλογία 2,5% w/v. Σε όλους τους υπόλοιπους εγκλεισμούς χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών νερό:αιθανόλη σε αναλογία 2:1 για τη διάλυση της β-κυκλοδεξτρίνης. Η αναλογία β-κυκλοδεξτρίνης και συστήματος διαλυτών ήταν 10% w/v.

Η χρησιμοποιούμενη μέθοδος, η διάρκεια ανάδευσης, η αναλογία νερού:αιθανόλης ως σύστημα διαλυτών και η αναλογία εκχυλίσματος ή χυμού:β-κυκλοδεξτρίνης παρουσιάζονται συνοπτικά στους πίνακες 6 και 7, για την περίπτωση διεργασιών εγκλεισμού με εκχύλισμα φλούδας ροδιού και με χυμό ροδιού αντίστοιχα.

7.3.2. Διαδικασία Μεθόδου Συγκαταβύθισης

Γενικά, κατά τη μέθοδο συγκαταβύθισης (CM) ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία [56]:

Κατάλληλη ποσότητα β-κυκλοδεξτρίνης διαλύεται σε σύστημα διαλυτών, αποτελούμενο από απιονισμένο νερό και αιθανόλη σε αναλογία 2:1, αναλογίας 10% w/v β-CD:σύστημα διαλυτών, μέσα σε κωνική φιάλη. Το σύστημα υποβάλλεται σε μαγνητική ανάδευση, στους 50-55 °C, μέχρι διάλυσης της β-κυκλοδεξτρίνης. Η διαδικασία αυτή διαρκεί περίπου περίπου 20 min. Έπειτα, το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην η προκαθορισμένη ποσότητα διαλυμένου ξηρού εκχυλίσματος φλούδας ροδιού ή διαλυμένου κολλώδους χυμού ροδιού. Η διάλυση αυτών των δύο γίνεται με την ελάχιστη δυνατή ποσότητα απιονισμένου νερού.

Με την προσθήκη του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού ή του χυμού ροδιού, το μίγμα παραμένει σε μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου είτε για 4 ώρες είτε ολονύκτια, ανάλογα με την περίπτωση, όπως αναλύθηκε παραπάνω. Το μίγμα με τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού παραμένει στο ψυγείο για 24 ώρες, προκειμένου να καταβυθιστούν τα σύμπλοκα, δημιουργώντας δύο φάσεις. Σε επόμενο βήμα, το δείγμα διηθείται υπό κενό, χρήσει πορώδους ηθμού, στον οποίο συκρατούνται τα παραγόμενα σύμπλοκα. Αυτά στη συνέχεια συλλέγονται σε κατάλληλο προζυγισμένο φιαλίδιο και τοποθετούνται σε ξηραντήρα ενωμένο με αντλία υψηλού κενού Edwards, όπου και παραμένουν συνεχώς.

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης της διεργασίας (σχέση 5), ζυγίζεται το φιαλίδιο που περιέχει τα σύμπλοκα εγκλεισμού, το οποίο έχει παραμείνει τουλάχιστον 3 ώρες στον ξηραντήρα αντλίας υψηλού κενού. Σε τελικό στάδιο πραγματοποιούνται ανίχνευση, ανάλυση και χαρακτηρισμός των σχηματιζόμενων συμπλόκων.

7.3.3. Διαδικασία Μεθόδου Λυοφιλοποίησης - Freeze-Drying

Σε γενικές γραμμές, κατά τη μέθοδο λυοφιλοποίησης (FD) επαναλαμβάνεται η διαδικασία με τη μέθοδο συγκαταβύθισης και μετά το πέρας της τετράωρης μαγνητικής ανάδευσης, ακολουθεί λυοφιλοποίηση του δείγματος ως εξής [57]:

Το μίγμα υποβάλλεται σε εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση (rotary evaporation, ROT), μέχρις ότου απομακρυνθεί η περισσότερη ποσότητα αιθανόλης. Το στάδιο της εξάτμισης είναι απαραίτητο διότι η ποσότητα αιθανόλης πρέπει να είναι η ελάχιστη δυνατή κατά τη διεργασία λυοφιλοποίησης. Το προκύπτον δείγμα αποχύνεται σε προζυγισμένο κρυσταλλωτήριο, το οποίο τοποθετείται σε κατάψυξη για κατάλληλο χρονικό διάστημα και μετά λυοφιλοποιείται για περίπου 2 ημέρες. Οι συνθήκες της διαδικασίας λυοφιλοποίησης είναι: πίεση 0,065 mbar και θερμοκρασία -53 °C.

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης της διεργασίας (σχέση 5), ζυγίζεται το κρυσταλλωτήριο που περιέχει το δείγμα που προκύπτει από τη λυοφιλοποίηση. Η απόδοση της διεργασίας εκφράζει το ποσοστό ανάκτησης ξηρής μάζας σε μορφή συμπλόκων εγκλεισμού και υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\text{Απόδοση διεργασίας (\%)} = \frac{\text{μάζα ξηρών συμπλόκων εγκλεισμού (mg)}}{\text{μάζα β-CD+μάζα ροδιού (mg)}} \cdot 100 \quad (5)$$

όπου η μάζα ροδιού είναι είτε η μάζα ξηρού εκχυλίσματος φλούδας ροδιού είτε η μάζα του κολλώδους χυμού ροδιού, ανάλογα με την περίπτωση.

Σε τελικό στάδιο, όπως και στην περίπτωση της μεθόδου συγκαταβύθισης, πραγματοποιούνται ανίχνευση, ανάλυση και χαρακτηρισμός των σχηματιζόμενων συμπλόκων.

7.3.4. Ανακλιμάκωση της Διεργασίας Συγκαταβύθισης-Δείγμα ΚΤΖ16

Καταρχάς, επιλέχθηκαν οι συνθήκες και οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν για το δείγμα **ΚΤΖ13** διότι, όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια, το δείγμα αυτό παρουσίασε ικανοποιητική απόδοση εγκλεισμού. Έτσι, γίνεται αναγωγή του εγκλεισμού σε μεγαλύτερη κλίμακα προκειμένου να παραχθούν στερεά σύμπλοκα εγκλεισμού της τάξης του γραμμαρίου, για να ενσωματωθούν σε καλλυντική κρέμα.

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2 g β-κυκλοδεξτρίνη σε 20 mL σύστημα διαλυτών απιονισμένο νερό:αιθανόλη αναλογίας 2:1 και 499,7 mg χυμού ροδιού διαλυμένο σε 22 mL απιονισμένο νερό. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με το μικρότερης ποσότητας δείγμα εγκλεισμού της μεθόδου συγκαταβύθισης (**ΚΤΖ13**).

7.3.5. Πειραματικές Συνθήκες και Αποτελέσματα Εγκλεισμών

Στους πίνακες 6 και 7 που ακολουθούν, φαίνονται οι διαφοροποιήσεις στις αναλογίες συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν και στις συνθήκες που εφαρμόστηκαν για τα πειράματα εγκλεισμού. Ο πίνακας 6 αφορά στους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού και ο πίνακας 7 αφορά στους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού.

Πίνακας 6: Στοιχεία πειραμάτων εγκλεισμού με εκχύλισμα φλούδας ροδιού.

Εγκλεισμός	Μέθοδος ⁵	Διαλύτης ή σύστημα διαλυτών για διάλυση β-CD ⁶ (v/v)	Εκχύλισμα φλούδας ροδιού:β-CD (w/w)	Διάρκεια ανάδευσης (h)
ΚΤΖ6	CM	H ₂ O:EtOH=2:1 (5 mL)	1:10	4
ΚΤΖ7	CM	H ₂ O:EtOH=2:1 (5 mL)	1:10	24
ΚΤΖ8	CM	H ₂ O:EtOH=2:1 (5 mL)	1:4	24
ΚΤΖ9	FD	H ₂ O:EtOH=2:1 (5 mL)	1:4	4
ΚΤΖ10	CM	H ₂ O:EtOH=2:1 (5 mL)	1:4	4
ΚΤΖ11	CM	H ₂ O:EtOH=2:1 (5 mL)	1:10	4
ΚΤΖ15	FD	H ₂ O (20 mL)	1:4	2

⁵ CM: μέθοδος συγκαταβύθισης και FD: μέθοδος λυοφιλοποίησης

⁶ Η αναλογία β-κυκλοδεξτρίνης και συστήματος διαλυτών (για τους εγκλεισμούς **ΚΤΖ6-ΚΤΖ11**) είναι 10% w/v (w: μάζα β-κυκλοδεξτρίνης σε g και v: όγκος του συστήματος διαλυτών σε mL). Η αναλογία β-κυκλοδεξτρίνης και διαλύτη απιονισμένο νερό (εγκλεισμός **ΚΤΖ15**) είναι 2,5% w/v (w: μάζα β-κυκλοδεξτρίνης σε g και v: όγκος του διαλύτη σε mL).

Πίνακας 7: Στοιχεία πειραμάτων εγκλεισμού με χυμό ροδιού.

Εγκλεισμός	Μέθοδος	Διαλύτης ή σύστημα διαλυτών για διάλυση β-CD ⁷ (v/v)	Χυμός ροδιού:β-CD (w/w)	Διάρκεια ανάδευσης (h)
KTZ12	CM	H ₂ O:EtOH=2:1 (5 mL)	1:10	4
KTZ13	CM	H ₂ O:EtOH=2:1 (5 mL)	1:4	4
KTZ14	FD	H ₂ O (20 mL)	1:4	2
KTZ16	CM	H ₂ O:EtOH=2:1 (20 mL)	1:4	4

Ο εγκλεισμός **KTZ11** είναι επανάληψη του εγκλεισμού **KTZ6** και ο εγκλεισμός **KTZ16** είναι ανακλιμάκωση του εγκλεισμού **KTZ13**. Οι εγκλεισμοί **KTZ14** και **KTZ15** αποτελούν τροποποίηση της μεθόδου λυοφιλοποίησης, η οποία περιγράφηκε στην ενότητα 7.3.3., κατά τα όσα αναφέρονται στο τέλος της ενότητας 7.3.1..

7.4. Χαρακτηρισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού

Επόμενο στάδιο αποτελεί ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων για τον προσδιορισμό των σχετικών αποδόσεων, μελέτη της συμπεριφοράς τους και διαπίστωση του αν όντως έχει πραγματοποιηθεί εγκλεισμός κι έχουν σχηματιστεί σύμπλοκα

Σε πρώτη φάση, προσδιορίζεται η ποσότητα εκχυλίσματος φλούδας ροδιού ή χυμού ροδιού που εγκλείστηκε ολικά, μέσα στην κοιλότητα, αλλά και επιφανειακά, λόγω αλληλεπιδράσεων με τη β-κυκλοδεξτρίνη. Προς την κατεύθυνση αυτή, πραγματοποιούνται δύο διαφορετικές διαδικασίες, μία που αφορά στον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας εκχυλίσματος φλούδας ροδιού ή χυμού ροδιού που εγκλείεται και μία για τον προσδιορισμό της ποσότητας εκχυλίσματος ή χυμού που προσδένεται επιφανειακά. Για τους προσδιορισμούς αυτούς, γίνονται μετρήσεις με τη χρήση της μεθόδου φασματομετρίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Απομένουν ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων ως προς το μέγεθός τους, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό, η επιβεβαίωση της συμπλοκοποίησης του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και του χυμού ροδιού με τη β-κυκλοδεξτρίνη και ο προσδιορισμός των θερμικών ιδιοτήτων τους, χρήσει των μεθόδων DLS, FT-IR, NMR και DSC/TGA.

7.4.1. Απόδοση Εγκλεισμού και Δημιουργίας Συμπλόκων β-CD-Εκχυλίσματος Φλούδας Ροδιού/Χυμού Ροδιού

Για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας εγκλεισμένου εκχυλίσματος ή χυμού, ακολουθήθηκε η διαδικασία της ολικής εκχύλισης (total extraction) με στόχο την παραλαβή της εγκλεισμένης αλλά και επιφανειακά προσδεδεμένης ουσίας από τη β-κυκλοδεξτρίνη. Σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία, 10 mg συμπλόκων διαλύονται σε 10 mL απιονισμένο νερό, μέσα σε κωνική φιάλη με εσφυρισμένο στόμιο. Το δείγμα εκτίθεται σε υπερήχους για 20 min με χρήση λουτρού υπερήχων (ultrasonic bath) θερμοκρασίας περίπου 65 °C. Οι υπερήχοι σε συνδυασμό με την θέρμανση παρέχουν στο σύστημα ενέργεια τέτοια

⁷ Η αναλογία β-κυκλοδεξτρίνης και συστήματος διαλυτών (για τους εγκλεισμούς **KTZ12**, **KTZ13** και **KTZ16**) είναι 10% w/v (w: μάζα β-κυκλοδεξτρίνης σε g και v: όγκος του συστήματος διαλυτών σε mL). Η αναλογία β-κυκλοδεξτρίνης και διαλύτη απιονισμένο νερό (εγκλεισμός **KTZ14**) είναι 2,5% w/v (w: μάζα β-κυκλοδεξτρίνης σε g και v: όγκος του διαλύτη σε mL).

ώστε να απελευθερωθεί το εκχύλισμα ή ο χυμός στο διάλυμα. Μετά το πέρας των 20 min, το διάλυμα διηθείται υπό κενό για να παραληφθεί το εκχύλισμα ή ο χυμός που απελευθερώθηκε, κάνοντας και εκπλύσεις με απιονισμένο νερό και μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο για να μετρηθεί ο όγκος του δείγματος που συλλέχθηκε. Τέλος, το δείγμα αυτό μεταφέρεται σε φιαλίδιο για τη μέτρηση στο φασματόμετρο UV-Vis διπλής δέσμης, για χρήση κυψελίδας αναφοράς.

Καταρχάς, στις δύο Quartz κυψελίδες προστίθεται ποσότητα απιονισμένου νερού, για να δημιουργηθεί η καμπύλη, σε εύρος φάσματος απορρόφησης 200-500 nm, η οποία αποτελεί τη βάση για τη διεξαγωγή των επόμενων μετρήσεων και υπολογισμών. Το διάλυμα με εκχύλισμα ή χυμό ροδιού γνωστής συγκέντρωσης, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς, η οποία συσχετίζει τη μετρούμενη απορρόφηση με τη γνωστή συγκέντρωση του διαλύματος. Καμπύλη αναφοράς προσδιορίστηκε τόσο για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού όσο και για τον χυμό ροδιού.

Στη μια κυψελίδα είναι τοποθετημένο απιονισμένο νερό και στην άλλη τοποθετούνται περίπου 3 mL του δείγματος από την ολική εκχύλιση και γίνεται μέτρηση στο εύρος φάσματος απορρόφησης 200-500 nm οπότε λαμβάνεται η μέγιστη απορρόφηση σε αναμενόμενη περιοχή μήκους κύματος. Με την τιμή απορρόφησης που προκύπτει και την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, υπολογίζεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού είτε χυμού ροδιού στο διάλυμα. Χρησιμοποιώντας τη σχέση 6, υπολογίζεται η απόδοση εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%) αναφορικά με το συνολικό εγκλεισμό εκχυλίσματος ή χυμού, δηλαδή τον εγκλεισμό μέσα στην κοιλότητα καθώς και αυτόν που σχετίζεται με την επιφανειακή πρόσδεση.

$$\text{Απόδοση Εγκλεισμού (\%)} = \frac{\text{μάζα ροδιού που εγκλείεται ολικά (mg)}}{\text{αρχική ποσότητα ροδιού που χρησιμοποιήθηκε (mg)}} \cdot 100 \quad (6)$$

όπου η μάζα ροδιού που εγκλείεται ολικά και η αρχική ποσότητα εκχυλίσματος ροδιού που χρησιμοποιήθηκε αναφέρονται είτε στη μάζα ξηρού εκχυλίσματος φλούδας ροδιού είτε στη μάζα του κολλώδους χυμού ροδιού, ανάλογα με την περίπτωση.

7.4.2. Προσδιορισμός Ποσότητας Εκχυλίσματος Φλούδας Ροδιού/Χυμού Ροδιού προσδεδεμένου Επιφανειακά στη β-CD

Πέρα από την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ του εκχυλίσματος ή του χυμού και της β-κυκλοδεξτρίνης στην εσωτερική της κοιλότητα, υπάρχει δυνατότητα σύνδεσης του εκχυλίσματος ή του χυμού με την επιφάνεια των συμπλόκων β-κυκλοδεξτρίνης λόγω των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται ανάμεσα σε υδροξύλια της εξωτερικής επιφάνειας της β-κυκλοδεξτρίνης και των μορίων του εκχυλίσματος ή του χυμού. Για τον προσδιορισμό του επιφανειακά προσδεδεμένου εκχυλίσματος ή χυμού πραγματοποιείται η διαδικασία της επιφανειακής εκχύλισης (surface extraction), όπου πρέπει να δοθεί στο σύστημα λιγότερη ενέργεια, προκειμένου να απομακρυνθούν τα επιφανειακά προσδεδεμένα μόρια εκχυλίσματος ή χυμού.

Για το σκοπό αυτό, τοποθετείται για μαγνητική ανάδευση διάλυμα 10 mL απιονισμένου νερού με 10 mg δείγματος, για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό για να απομακρυνθεί η β-κυκλοδεξτρίνη, γίνονται εκπλύσεις με απιονισμένο νερό και συλλέγεται το διήθημα που βρίσκεται στην κωνική της διήθησης υπό κενό. Η ποσότητα διηθήματος που συλλέγεται, τοποθετείται σε ογκομετρικό κύλινδρο για να μετρηθεί ο όγκος της και μεταφέρεται σε κατάλληλο φιαλίδιο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μέσω του UV-Vis.

Με τον ίδιο τρόπο, όπως και για την εκτίμηση του ολικού εγκλεισμού, μετράται η απορρόφηση του παραπάνω διηθήματος και μέσω της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς, βρίσκεται η συγκέντρωση και κατ' επέκταση το ποσοστό του εκχυλίσματος ή του χυμού που προσδένεται στην εξωτερική επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης (σχέση 7).

$$\text{Ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης (\%)} = \frac{\text{μάζα ροδιού που προσδένεται επιφανειακά (mg)}}{\text{αρχική ποσότητα ροδιού που χρησιμοποιήθηκε (mg)}} \cdot 100 \quad (7)$$

όπου η μάζα ροδιού που προσδένεται επιφανειακά και η αρχική ποσότητα ροδιού που χρησιμοποιήθηκε αναφέρονται είτε στη μάζα ξηρού εκχυλίσματος φλούδας ροδιού είτε στη μάζα του κολλώδους χυμού ροδιού, ανάλογα με την περίπτωση.

Εύκολα, λοιπόν, μπορεί να εκτιμηθεί και η ποσότητα εκχυλίσματος ή χυμού που βρίσκεται αποκλειστικά μέσα στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης, όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια από τη σχέση 8.

$$\text{Εσωτερικά εγκλεισμένη ποσότητα εκχυλίσματος ροδιού (mg)} = \text{μάζα ροδιού που εγκλείεται ολικά (mg)} - \text{μάζα ροδιού που προσδένεται επιφανειακά (mg)} \quad (8)$$

7.4.3. Μέγεθος Σωματιδίων, Δείκτης Πολυδιασποράς, ζ-δυναμικό

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του μεγέθους των συμπλόκων, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού είναι η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS). Για την προετοιμασία των δειγμάτων, ζυγίζεται 1 mg ξηρού συμπλόκου εκχυλίσματος ή χυμού με β-κυκλοδεξτρίνη και τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο όπου προστίθενται 4 mL δις-απιονισμένου νερού. Έπειτα, το γυάλινο φιαλίδιο αναδεύεται για 2 min σε αναδευτήρα τύπου Vortex, για καλή διασπορά των συμπλόκων. Το προκύπτον διάλυμα εισάγεται σε ειδική κυψελίδα (DTS1070), χρησιμοποιώντας σύριγγα, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων και η κυψελίδα τοποθετείται στο όργανο Zetasizer.

Στο όργανο αυτό πραγματοποιούνται δύο μετρήσεις, μία για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων και της κατανομής τους ή δείκτη πολυδιασποράς (PDI), και μία για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού. Για καθεμία από τις δύο μετρήσεις γίνονται τρεις επαναλήψεις, οι οποίες περιλαμβάνουν πολλαπλές σαρώσεις εξαρτώμενες από το είδος της μέτρησης αλλά και του δείγματος, δίνοντας μέσο όρο των τιμών των σαρώσεων.

Σε πρώτη φάση, πριν από οποιαδήποτε μέτρηση, τα στοιχεία του δείγματος που πρόκειται να μετρηθεί, αποθηκεύονται σε ένα αρχείο και για κάθε είδος μέτρησης που σχετίζεται με διαφορετικό είδος ή ποσότητα εκχυλίσματος είτε χυμού, στην παρούσα περίπτωση, δημιουργείται ένα ξεχωριστό αρχείο. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (Standard Operating Procedure, SOP). Στο αρχείο αυτό, εισάγονται πληροφορίες σχετικές με το δείγμα, όπως ο δείκτης διάθλασης και η απορρόφησή του στα 633 nm, και με τις συνθήκες κατά τις οποίες γίνεται η μέτρηση όπως το είδος της κυψελίδας, η θερμοκρασία. Επιπλέον, καθορίζονται οι παράμετροι του πρωτόκολλου μέτρησης, όπως ο αριθμός των επιμέρους επαναλήψεων, ο ελάχιστος και ο μέγιστος αριθμός σαρώσεων, ο χρόνος αναμονής σταθεροποίησης.

Για τα δείγματα εγκλεισμού που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά αρχεία SOP, των οποίων η διαφορά σχετίζεται με την αρχική ποσότητα εκχυλίσματος ή χυμού ροδιού που χρησιμοποιήθηκε για να γίνουν οι εγκλεισμοί (50 mg ή 125 mg). Τα επιμέρους στοιχεία παρατίθενται

στον πίνακα 8. Η τιμή απορρόφησης στα 633 nm, δηλαδή στο μήκος κύματος που εκπέμπει το laser του οργάνου, λαμβάνεται μέσω του φασματομέτρου UV-Vis, με τυφλό δείγμα το δις-απιονισμένο νερό.

Πίνακας 8: Στοιχεία αρχείων SOP: KTZ1-1.sop, KTZ1-1 ZETA.sop, KTZ extract 125mg.sop και KTZ extract 125mg zeta.sop.⁸

SOP	pH	Δείκτης Διάθλασης	Απορρόφηση στα 633nm	Θερμοκρασία	Κυψελίδα	Αριθμός Μετρήσεων
KTZ1-1	7	1,330	0,0264	25±1 °C	DTS1070	3
KTZ extract 125 mg	7	1,330	0,2777	25±1 °C	DTS1070	3

7.5. Θερμική Ανάλυση με χρήση Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)

Η μέτρηση και ανάλυση των γραφημάτων Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης πραγματοποιείται σε συνεργασία με τον κ. Κορρέ στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών. Έτσι, αναλύοντας τα γραφήματα DSC, μελετώνται οι θερμικές μεταπτώσεις των συμπλόκων εγκλεισμού και συγκρίνονται με τις αντίστοιχες θερμικές μεταπτώσεις τόσο της καθαρής β-κυκλοδεξτρίνης όσο και του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού ή του χυμού ροδιού.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, ζυγίζεται μικρή ποσότητα από το κάθε δείγμα και τοποθετείται σε ειδικό καψίδιο, ενώ ως αναφορά υπάρχει ένα δεύτερο καψίδιο, το οποίο παραμένει κενό. Τα δύο αυτά καψίδια τοποθετούνται στους θερμοϋποδοχείς του οργάνου DSC και υποβάλλονται σε ένα ορισμένο θερμοκρασιακό πρόγραμμα (πίνακας 9), οπότε λαμβάνονται οι μετρήσεις και τα διαγράμματα.

Πίνακας 9: Στοιχεία θερμοκρασιακού προγράμματος DSC.

Δείγμα	Αρχική Θερμοκρασία (°C)	Τελική Θερμοκρασία (°C)	Ρυθμός θέρμανσης (°C/min)	Ρυθμός ροής αζώτου (mL/min)
β-CD	25	400	10	10
Εκχύλισμα Φλούδας Ροδιού	25	400	10	10
Χυμός Ροδιού	25	400	10	10
Σύμπλοκο	25	400	10	10

7.6. Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA)

Η μέτρηση και ανάλυση TGA πραγματοποιείται και σε αυτή την περίπτωση σε συνεργασία με τον κ. Κορρέ στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών. Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση παρέχει πληροφορίες για τη θερμική σταθερότητα των συμπλόκων εγκλεισμού.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, ζυγίζεται μικρή ποσότητα από το κάθε δείγμα και τοποθετείται σε ειδικό καψίδιο που φυλάσσεται αεροστεγώς. Έπειτα, μεταφέρεται σε ζυγό, στο φούρνο του οργάνου TGA και υποβάλλεται σε ένα ορισμένο θερμοκρασιακό πρόγραμμα, τα στοιχεία του οποίου δίνονται στον

⁸ Το SOP για τα KTZ1-1 αντιπροσωπεύει τα δείγματα που προήλθαν από αρχική ποσότητα εκχυλίσματος ή χυμού 50 mg, ενώ το SOP για τα KTZ extract 125 mg αντιπροσωπεύει τα δείγματα που προήλθαν από αρχική ποσότητα εκχυλίσματος ή χυμού 125 mg. Επίσης, τα KTZ1-1.sop και KTZ extract 125mg.sop αντιπροσωπεύουν τα SOP για το size.

πίνακα 10. Έτσι, λαμβάνονται μετρήσεις και διαγράμματα για τα σύμπλοκα εγκλεισμού, την καθαρή β-κυκλοδεξτρίνη, το εκχύλισμα φλούδας ροδιού και τον χυμό ροδιού.

Πίνακας 10: Στοιχεία θερμοκρασιακού προγράμματος TGA.

Δείγμα	Αρχική Θερμοκρασία (°C)	Τελική Θερμοκρασία (°C)	Ρυθμός θέρμανσης (°C/min)	Ρυθμός ροής αζώτου (mL/min)
β-CD	25	600	10	10
Εκχύλισμα Φλούδας Ροδιού	25	600	10	10
Χυμός Ροδιού	25	600	10	10
Σύμπλοκο	25	600	10	10

Η θερμοκρασία αποικοδόμησης του συμπλόκου και το ποσοστό υπολείμματος μάζας του δείγματος μπορούν να εκτιμηθούν με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων και ανάλυσης TGA. Το ποσοστό υπολείμματος μάζας υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση 9, όπως φαίνεται στη συνέχεια.

$$\text{Υπόλειμμα μάζας (\%)} = \frac{\text{μάζα τελική}}{\text{μάζα αρχική}} \cdot 100 \quad (9)$$

7.7. Ανάλυση μέσω Υπέρυθρης Φασματομετρίας με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Η μέθοδος που ακολουθείται, βασίζεται στην παρασκευή δισκίων (pellets) του επιθυμητού δείγματος με βρωμιούχο κάλιο και μέτρησή τους σε όργανο FT-IR (KBr pellets). Μικρή ποσότητα βρωμιούχου καλίου λειοτριβείται με γουδί και γουδοχέρι μικρών διαστάσεων. Έπειτα, προστίθεται ακόμη μικρότερη ποσότητα του επιθυμητού δείγματος, λειοτριβούνται μαζί και ορισμένη ποσότητα της προκύπτουσας σκόνης τοποθετείται σε ειδική θέση του συστήματος πρέσας. Η ενδεικτική αναλογία μάζας βρωμιούχου καλίου:δείγματος πρέπει να είναι περίπου 40:1. Με την αυξημένη πίεση, στην οποία υπόκειται η σκόνη, δημιουργείται δισκίο, το οποίο τοποθετείται σε κατάλληλη θέση του οργάνου FT-IR, γίνεται μέτρηση και λαμβάνεται το φάσμα.

Λαμβάνονται φάσματα για την καθαρή β-κυκλοδεξτρίνη, το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, τον χυμό ροδιού και για όλα τα δείγματα συμπλόκων εγκλεισμού. Τα φάσματα αυτά συγκρίνονται μεταξύ τους, παρατηρώντας το συνδυασμό και την ύπαρξη μετατοπισμένων κορυφών στο φάσμα του συμπλόκου, οι οποίες οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ εκχυλίσματος ή χυμού και β-κυκλοδεξτρίνης. Έτσι, υπάρχει μια πρώτη ένδειξη αναφορικά με το σχηματισμό συμπλόκων.

7.8. Ανάλυση Συμπλόκου Εγκλεισμού β-κυκλοδεξτρίνης–Εκχυλίσματος Φλούδας Ροδιού/Χυμού Ροδιού μέσω Φασματομετρίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) είναι μία μέθοδος που μπορεί να συμβάλει στην επιβεβαίωση σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, μικρή ποσότητα από το καθένα διαλυτοποιείται σε ειδικό διαλύτη. Συγκεκριμένα, για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, για τον χυμό ροδιού αλλά και για τα δείγματα εγκλεισμού τους, ως

καλύτερος διαλύτης επιλέχθηκε το δευτεριωμένο Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide, DMSO-d₆). Έτσι, 0,8 mL διαλύτη DMSO-d₆ προστίθενται σε 10 mg δείγματος. Για λήψη ευκρινέστερου φάσματος, επιλέγονται οι 64 σαρώσεις. Η λήψη των φασμάτων ¹H NMR πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, χρήσει του οργάνου Varian V600 MHz.

Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων εκφράζονται σε ppm, οι σταθερές σύζευξης, J, δίνονται σε Hz και η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ¹H NMR παρουσιάζεται ως: s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), q (quartet, τετραπλό), m (multiplet, πολλαπλό), br (broad, ευρύ), dd (doublet of doublets, διπλή διπλών), tt (triplet of triplets, τριπλή τριπλών) και td (triplet of doublets, τριπλή διπλών).

Αποτίμηση φάσματος της β-κυκλοδεξτρίνης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 5.72 (d, J=4.2Hz, 1H, OH-2), 5.67 (s, 1H, OH-3), 4.83 (d, J=3.6Hz, 1H, H-1), 4.45 (t, J=6-5.4Hz, 1H, OH-6), 3.63 (m, 3H, H-3 & H-6), 3.56 (d, J=9.6Hz, 1H, H-5), 3.35 (br, 1H, H-2), 3.30 (br, 1H, H-4)

Αποτίμηση φάσματος του συμπλόκου εγκλεισμού **KTZ6**:

¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 5.70 (d, J=33Hz, 2H, OH-2 & OH-3), 4.83 (s, 1H, H-1), 4.45 (s, 1H, OH-6), 3.62 (m, 4H, H-3, H-6 & H-5)

Αποτίμηση φάσματος του συμπλόκου εγκλεισμού **KTZ9**:

¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 5.72 (s, 1H, OH-2), 5.67 (s, 1H, OH-3), 4.83 (d, J=3.6Hz, 1H, H-1), 4.45 (s, 1H, OH-6), 3.63 (m, 3H, H-3 & H-6), 3.56 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5)

Αποτίμηση φάσματος του συμπλόκου εγκλεισμού **KTZ13**:

¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 5.67 (dd, J=4.5-30.9Hz, 1H, OH-3), 4.82 (d, J=3.0Hz, 1H, H-1), 4.45 (t, J=5.4Hz, 1H, OH-6), 3.63 (m, 3H, H-3 & H-6), 3.55 (d, J=12Hz, 1H, H-5), 3.30 (t, J=9.6-10.2Hz, 1H, H-4)

7.9. Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών-Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Σε 100 μL διαλυμένου εκχυλίσματος ή χυμού (διαλύτης: απιονισμένο νερό), προστίθενται 6 mL απιονισμένο νερό και αμέσως μετά 0,5 mL FC (Folin-Ciocalteu), οπότε το διάλυμα γίνεται κίτρινο. Ύστερα από 1 min, προστίθεται ο ρυθμιστής pH, 1,5 mL κορεσμένο Na₂CO₃, κι επιπλέον 1,9 mL απιονισμένο νερό, οπότε το διάλυμα φτάνει σε τελικό όγκο 10 mL. Τέλος, αναδεύεται σε αναδευτήρα τύπου vortex και αφήνεται στο σκοτάδι για μία ώρα.

Στον ίδιο χρόνο, ετοιμάζονται και τα δείγματα εγκλεισμών κι ένα τυφλό δείγμα, με την ίδια μέθοδο. Για το τυφλό δείγμα, στη θέση του δείγματος που ενδιαφέρει να μετρηθεί τοποθετείται μόνο ο διαλύτης του, δηλαδή 100 μL απιονισμένο νερό. Το τυφλό είναι σε όλες τις περιπτώσεις το ίδιο, οπότε παρασκευάζεται μία φορά και γίνεται μία φορά μέτρηση. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται είναι 1 g/L για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, 5 g/L για τον χυμό ροδιού και 5 g/L για τα δείγματα εγκλεισμών.

Μετά το πέρας της μιας ώρας, το δείγμα με το εκχύλισμα φλούδας ροδιού όπως και αυτό με τον χυμό ροδιού έχουν γίνει μπλε, το τυφλό είναι πλέον άχρωμο και τα δείγματα εγκλεισμών έχουν χρώμα ανοιχτό μπλε έως άχρωμο. Το μπλε χρώμα αποτελεί ένδειξη ύπαρξης φαινολικών και για την εκτίμηση

της συγκέντρωσής τους, γίνεται μέτρηση στο φασματοόμετρο UV-Vis στα 755 nm. Η συγκέντρωση λαμβάνεται μέσω της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς που έχει σχηματιστεί με ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

7.10. Προσδιορισμός Φλαβονοειδών-Χρωματομετρική Μέθοδος Χλωριούχου Αργιλίου

Στη συγκεκριμένη μέθοδο, η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: σε 125 μL διαλυμένου εκχυλίσματος ή χυμού (διαλύτης: απιονισμένο νερό), προστίθενται 75 μL NaNO₂ 5% και αφήνεται το σύστημα σε ηρεμία για 6 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 150 μL AlCl₃ 10% και το σύστημα αφήνεται πάλι σε ηρεμία για άλλα 5 min. Τέλος, προστίθενται 750 μL NaOH (1M) ως ρυθμιστής pH, όπου και παρατηρείται μετατροπή του χρώματος από κίτρινο σε ροζ και αμέσως μετά εισάγεται κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού (1400 μL) μέχρι τελικού όγκου 2500 μL. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται σε αναδευτήρα τύπου vortex και αφήνεται στο σκοτάδι σε ηρεμία για 15 min.

Ταυτόχρονα, ετοιμάζονται και τα δείγματα εγκλεισμών κι ένα τυφλό δείγμα, με τον ίδιο τρόπο. Για το τυφλό δείγμα, στη θέση του δείγματος που ενδιαφέρει να μετρηθεί τοποθετείται μόνο ο διαλύτης του, δηλαδή 125 μL απιονισμένο νερό. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται είναι 1 g/L για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, 5 g/L για τον χυμό ροδιού και 5 g/L για τα δείγματα εγκλεισμών. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, γίνεται μέτρηση των δειγμάτων στο UV-Vis στα 510 nm. Η συγκέντρωση λαμβάνεται μέσω της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς που προκύπτει για την κατεχίνη.

7.11. Προσδιορισμός Συνόλου Συμπυκνωμένων Τανινών-Μέθοδος Βανιλίνης-Υδροχλωρίου-Προανθοκυανιδίνες σε ισοδύναμα κατεχίνης

Για τον έλεγχο ύπαρξης και τον προσδιορισμό του συνόλου συμπυκνωμένων τανινών, σε 400 μL διαλυμένου εκχυλίσματος ή χυμού (διαλύτης: απιονισμένο νερό), προστίθενται 3 mL διάλυμα βανιλίνης 4% (διαλύτης: MeOH) και 1,5 mL πυκνό HCl, οπότε το διάλυμα αποκτά ροζ-πορτοκαλί χρώμα. Αυτό αναδεύεται σε αναδευτήρα τύπου vortex και αφήνεται σε ηρεμία στο σκοτάδι για 15 min.

Παράλληλα, ετοιμάζονται και τα δείγματα εγκλεισμών κι ένα τυφλό δείγμα, με την ίδια διαδικασία. Για το τυφλό δείγμα, στη θέση του δείγματος που ενδιαφέρει να μετρηθεί τοποθετείται μόνο ο διαλύτης του, δηλαδή 400 μL απιονισμένο νερό. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται είναι 1 g/L για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, 5 g/L για τον χυμό ροδιού και 5 g/L για τα δείγματα εγκλεισμών. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, μετρώνται οι απορροφήσεις των δειγμάτων στο UV-Vis στα 500 nm και υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις τους μέσω της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς που προκύπτει για την κατεχίνη.

7.12. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης-Ικανότητα Δέσμευσης της Σταθερής Ελεύθερης Ρίζας DPPH

Η διαδικασία στην προκειμένη περίπτωση έχει ως εξής: Αρχικά, ετοιμάζεται το διάλυμα DPPH, διαλύοντας 2,5 mg σε 100 mL EtOH, ενώ έχουν ήδη παρασκευαστεί τα διαλύματα του χυμού ροδιού και του δείγματος εγκλεισμού **KTZ13**. Τα προαναφερθέντα διαλύματα αραιώνονται σε αναλογίες

διαλύματος:αιθανόλης 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80. Σε καθεμιά από αυτές τις ποσότητες, συνολικά 100 μL, προστίθενται 3,9 mL διαλύματος DPPH. Τα προκύπτοντα διαλύματα αναδεύονται σε αναδευτήρα τύπου vortex και αφήνονται στο σκοτάδι σε ηρεμία για 30 min.

Συγχρόνως, ετοιμάζεται κι ένα τυφλό δείγμα, με την ίδια διαδικασία, χωρίς αραιώσεις. Για το τυφλό δείγμα, στη θέση του δείγματος που ενδιαφέρει να μετρηθεί τοποθετείται μόνο ο διαλύτης του, δηλαδή 100 μL απιονισμένο νερό. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται είναι 5 g/L για τον χυμό ροδιού και 5 g/L για το δείγμα εγκλεισμού **KTZ13**. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, μετρώνται οι απορροφήσεις των δειγμάτων στο UV-Vis, στα 515 nm, και γίνονται υπολογισμοί που οδηγούν στην εύρεση των συγκεντρώσεων, οι οποίες μειώνουν την αρχική συγκέντρωση του DPPH κατά 50%, με βάση την καμπύλη αναφοράς με DPPH.

7.13. Μελέτη Απελευθέρωσης-Release Study

Μελέτη απελευθέρωσης πραγματοποιήθηκε τόσο σε δείγμα εγκλεισμού από εκχύλισμα φλούδας ροδιού όσο και από χυμό ροδιού. Έτσι, για αρχή διεξήχθη πείραμα απελευθέρωσης του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού για τον εγκλεισμό **KTZ9**. Οι συνθήκες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να προσομοιάζουν τις φυσιολογικές συνθήκες pH του δέρματος και ήταν οι ακόλουθες: φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα ως μέσο διάλυσης (Buffer), σταθερή θερμοκρασία 37 °C, ελαφρώς όξινη συνθήκη με pH=5,5. Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάστηκε αναμιγνύοντας κατάλληλες ποσότητες υδατικών διαλυμάτων κιτρικού οξέος 100 mM και όξινου φωσφορικού καλίου 100 mM ώστε να προκύψει τελικά pH=5,5. [56, 58]

Για την εκτέλεση του πειράματος, σε 25 mL φωσφορικού διαλύματος διαλύθηκαν 100,7 mg δείγματος **KTZ9**, στις προαναφερθείσες συνθήκες, υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση (250 rpm) για περίπου 6 μέρες. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνεται μικρή ποσότητα από το δείγμα, η οποία αναπληρώνεται με αντίστοιχη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος. Η ποσότητα του δείγματος που λαμβάνεται, φυγοκεντρείται και φυλάσσεται μόνο το αιώρημα προκειμένου να μετρηθεί στο UV-Vis. Από την απορρόφηση που προκύπτει και την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, υπολογίζεται η συγκέντρωση και τελικά το ποσοστό απελευθέρωσης του εκχυλίσματος. Με τα αποτελέσματα που προκύπτουν, κατασκευάζεται το διάγραμμα του ποσοστού απελευθέρωσης συναρτήσει του χρόνου.

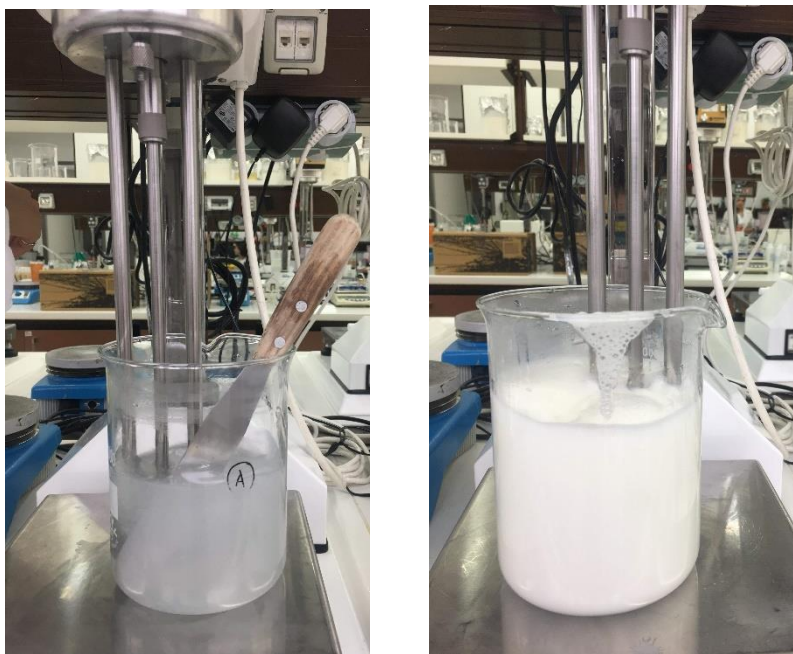
Η μελέτη απελευθέρωσης για εγκλεισμό που πραγματοποιήθηκε με χυμό ροδιού έγινε για το δείγμα **KTZ13**. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή του δείγματος **KTZ9** με τη διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 80,6 mg δείγματος **KTZ13** που διαλύθηκαν σε 20,15 mL φωσφορικού διαλύματος, ενώ η διεργασία διήρκησε περίπου 5 μέρες.

7.14. Πειράματα Ενσωμάτωσης σε Καλλυντική Κρέμα και Μελέτη Σταθερότητας

Τα δείγματα που επιλέχθηκαν να ενσωματωθούν σε καλλυντικές κρέμες ήταν το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, ο χυμός ροδιού, το δείγμα εγκλεισμού **KTZ14** και το δείγμα εγκλεισμού **KTZ16** που αποτελεί ανακλιμάκωση του **KTZ13**, το οποίο είχε ικανοποιητική απόδοση εγκλεισμού. Τόσο το δείγμα **KTZ14** (FD μέθοδος) όσο και το δείγμα **KTZ16** (CM μέθοδος) έχουν παρασκευαστεί με πρώτη ύλη τον χυμό ροδιού.

Το πρωτόκολλο ελέγχου και μελέτης σταθερότητας που ακολουθήθηκε έχει διαμορφωθεί από την εταιρεία KORRES A.E. για τον έλεγχο των προϊόντων της.

Σε γενικές γραμμές, προκειμένου να παρασκευαστεί η βάση καλλυντικής κρέμας δημιουργήθηκαν δύο ξεχωριστές φάσεις, η υδατική (φάση Α) και η λιπαρή (φάση Β), οι οποίες στη συνέχεια αναμίχθηκαν σε ισχυρές στροφές (2800 rpm), για 10 min με χρήση ομογενοποιητή, οδηγώντας στο σχηματισμό γαλακτώματος. Πρόκειται για μια βάση κρέμας που έχει δοκιμαστεί για την σταθερότητά της στις εγκαταστάσεις του τμήματος R&D της εταιρείας, θεωρείται από τις πιο σταθερές βάσεις κι έχει χρησιμοποιηθεί ως εμπορικό προϊόν. Η φάση Α πριν τη γαλακτωματοποίηση φαίνεται στα αριστερά της Εικόνας 15 και η μορφή της βάσης της καλλυντικής κρέμας που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια της γαλακτωματοποίησης είναι αυτή στα δεξιά της Εικόνας 15.



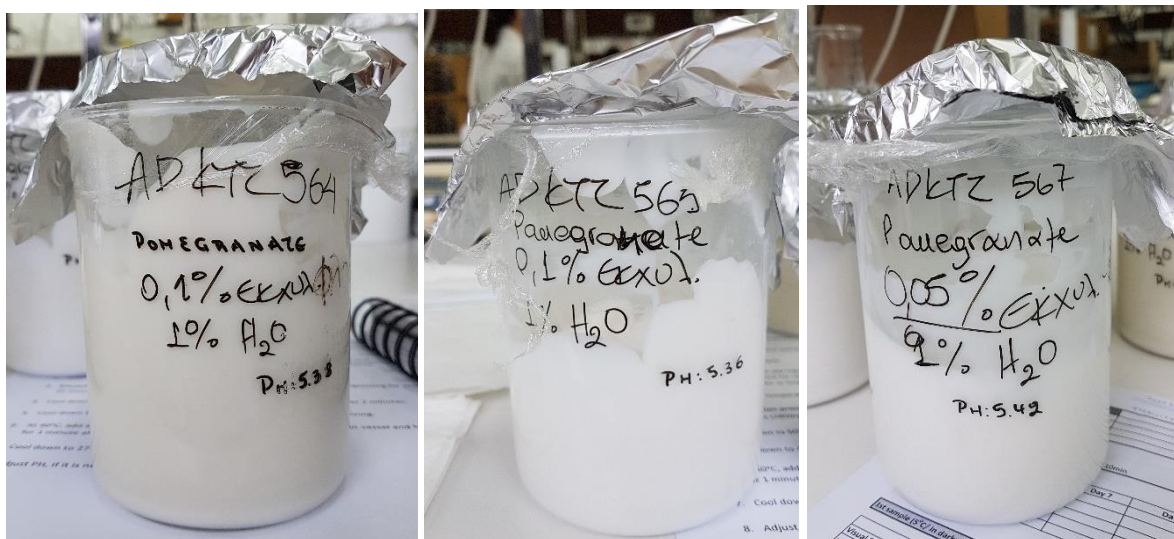
Εικόνα 15: Φάση Α της βάσης της καλλυντικής κρέμας, πριν τη γαλακτωματοποίηση (αριστερά) και η μορφή της κατά τη γαλακτωματοποίηση (δεξιά).

Σε κατάλληλη ποσότητα βάσης κρέμας που παρασκευάστηκε, προστέθηκε ποσότητα διαλυμένου καθαρού εκχυλίσματος φλούδας ροδιού ή χυμού ροδιού ή δείγματος εγκλεισμού στις αναλογίες που δίνονται στον πίνακα 11, ώστε να προκύπτουν συνολικά 300 g κρέμας για κάθε τελικό δείγμα κρέμας. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 11, προστέθηκε αναλογικά περισσότερη ποσότητα νερού στα δείγματα **KTZ14** και **KTZ16** λόγω δυσκολίας διάλυσης τους. Ουσιαστικά, ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε νερό ήταν για να ενσωματωθούν τα δείγματα σε διαλυμένη μορφή στη βάση της κρέμας. Επίσης, για τα ίδια δείγματα εγκλεισμού, **KTZ14** και **KTZ16**, χρησιμοποιήθηκε αναλογικά λιγότερη ποσότητα δείγματος, δηλαδή $0,05\% \frac{w_{\text{δείγματος}}}{w_{\text{κρέμας}}}$ αντί για $0,1\% \frac{w_{\text{δείγματος}}}{w_{\text{κρέμας}}}$, διότι δεν υπήρχε αρκετή ποσότητα από αυτά. Γενικά, όμως, οι αναλογίες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι αυτές που χρησιμοποιήθηκαν και για το εκχύλισμα και τον χυμό (Πίνακας 11). Τέλος, για τις μετρήσεις σταθερότητας, χρησιμοποιήθηκε και μια κρέμα 300 g ως τυφλό, δηλαδή δεν προστέθηκε εκχύλισμα ή χυμός ή δείγμα εγκλεισμού.

Πίνακας 11: Αναλογίες μάζας νερού και δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν για τελική ποσότητα καλλυντικής κρέμας 300 g, για το κάθε δείγμα.

Δείγμα	% $W_{H_2O}/W_{κρέμας}$ (g/g)	% $W_{δείγματος}/W_{κρέμας}$ (g/g)
Εκχύλισμα Φλούδας Ροδιού	1	0,1
Χυμός Ροδιού	1	0,1
KTZ14	2	0,05
KTZ16	4	0,05

Η ενσωμάτωση πραγματοποιήθηκε με απλή απόχυση των διαλυμένων δειγμάτων στη βάση της κρέμας και ομογενοποίηση της εκάστοτε κρέμας με το δείγμα, χειρωνακτικά. Για συντομία, η καλλυντική κρέμα με εκχύλισμα φλούδας ροδιού θα συμβολίζεται ως 564, με χυμό ροδιού ως 565, με δείγμα εγκλεισμού **KTZ16** ως 566 και με δείγμα εγκλεισμού **KTZ14** ως 567. Στην Εικόνα 16 παρουσιάζονται τρεις από τις καλλυντικές κρέμες που παρασκευάστηκαν, με εκχύλισμα φλούδας ροδιού (αριστερά), με χυμό ροδιού (κέντρο) και με το δείγμα εγκλεισμού **KTZ14** (δεξιά). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ιξώδους με ιξωδόμετρο Brookfield, μετρήσεις pH, φυγοκέντρηση στα 5000 rpm για 10 min και στα 7400 rpm για άλλα 10 min ώστε να διαπιστωθεί η σταθερότητά τους και ο μη διαχωρισμός φάσεων, ενώ ελέγχθηκαν και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των κρεμών (εμφάνιση, υφή, άρωμα, χρώμα).



Εικόνα 16: Καλλυντική κρέμα με: εκχύλισμα φλούδας ροδιού (αριστερά), με χυμό ροδιού (κέντρο) και με δείγμα **KTZ14** εγκλεισμού (δεξιά).

7.14.1. Έλεγχος Σταθερότητας σε Συνθήκες Σταθερής Θερμοκρασίας

Οι καλλυντικές κρέμες που παρασκευάστηκαν όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, χωρίστηκαν σε επιμέρους δείγματα και τοποθετήθηκαν σε κλιβάνους, σε σκοτάδι, στους 5 °C, 25 °C, 40 °C και 50 °C, για διάστημα ενός μήνα (1 κύκλος ελέγχου).

Στο τέλος του μήνα, τα δείγματα αυτά υποβλήθηκαν σε διάφορες μετρήσεις (Preliminary Stability test). Καταρχάς, μελετήθηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (εμφάνιση, χρώμα, άρωμα, υφή). Έπειτα, μετρήθηκε το pH αλλά και το ιξώδες καθενός από αυτά σε ιξωδόμετρο Brookfield. Προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα των γαλακτωμάτων των δειγμάτων αυτών, πραγματοποιήθηκαν δυο φυγοκεντρήσεις, μία στα 5000 rpm για 10min και μία στα 7400 rpm για 10min.

7.14.2. Έλεγχος Σταθερότητας σε Συνθήκες Εναλλασσόμενης Θερμοκρασίας

Στην περίπτωση αυτή, δείγματα από τις κρέμες που έχουν παρασκευαστεί παρέμειναν σε κλίβανο για διάστημα ενός μήνα, με τέτοιο τρόπο ώστε τις Παρασκευές να τίθεται η θερμοκρασία στους 5 °C και τις Δευτέρες να μεταβάλλεται στους 45 °C. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν κυκλικά εναλλαγές θερμοκρασίας από τους 5 °C στους 45 °C. Στο τέλος κάθε εβδομάδας (Παρασκευές), πραγματοποιούνταν μετρήσεις στα δείγματα παρόμοιες με αυτές του ελέγχου σταθερότητας σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, pH, ιζώδες, φυγοκεντρήσεις).

8. Αποτελέσματα-Σχολιασμός Αποτελεσμάτων

8.1. Απόδοση Διεργασίας

Το ποσοστό μάζας που ανακτάται μετά την πειραματική διαδικασία σύνθεσης των συμπλόκων σε σχέση με την αρχική μάζα β-κυκλοδεξτρίνης και εκχυλίσματος ή χυμού που χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό τους, αποτελούν την απόδοση διεργασίας (σχέση 10). Ουσιαστικά, πρόκειται για μια σχέση που εκφράζει την πειραματικά λαμβανόμενη ποσότητα προς την θεωρητικά αναμενόμενη. Για τον προσδιορισμό αυτής της απόδοσης είναι απαραίτητη η ξήρανση των στερεών συμπλόκων που λαμβάνονται, σε αντλία υψηλού κενού, μέχρις ότου η μάζα τους να παραμένει σταθερή, ενδεικτικά για τρεις διαφορετικές ζυγίσεις.

$$\text{Απόδοση διεργασίας (\%)} = \frac{\text{μάζα ξηρών συμπλόκων (mg)}}{\text{αρχική μάζα β-CD+ροδιού (mg)}} \cdot 100 \quad (10)$$

όπου η αρχική μάζα ροδιού που χρησιμοποιήθηκε είναι είτε η μάζα ξηρού εκχυλίσματος φλούδας ροδιού είτε η μάζα του κολλώδους χυμού ροδιού, ανάλογα με την περίπτωση.

Τα σύμπλοκα που παράγονται με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης είναι λευκής απόχρωσης ενώ με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης, όπου χρησιμοποιείται εκχύλισμα φλούδας ροδιού το χρώμα είναι κιτρινωπό έως πορτοκαλί (Εικόνα 17, αριστερά) και όπου χρησιμοποιείται χυμός ροδιού το χρώμα είναι ροζ (Εικόνα 17, δεξιά). Επίσης, τα παραγόμενα με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης σύμπλοκα έχουν τη μορφή ξηρής σκόνης ενώ στην περίπτωση της μεθόδου λυοφιλοποίησης, η σκόνη έχει μικρότερη κοκκομετρία και πρόκειται για στερεά πιο ελαφριάς μορφής.



Εικόνα 17: Δείγματα εγκλεισμού με την τροποποιημένη μέθοδο λυοφιλοποίησης. **KTZ15** (αριστερά) και **KTZ14** (δεξιά).

Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται οι αρχικές ποσότητες β-κυκλοδεξτρίνης, εκχυλίσματος φλούδας ροδιού, ξηρού συμπλόκου που σχηματίστηκε καθώς και η απόδοση της διεργασίας. Τα αντίστοιχα στοιχεία δίνονται και στον πίνακα 13 με τη διαφορά ότι αφορούν στον χυμό ροδιού.

Πίνακας 12: Δεδομένα και αποτελέσματα απόδοσης διεργασίας με πρώτη ύλη το εκχύλισμα φλούδας ροδιού.

Εγκλεισμός	Αρχική ποσότητα β-CD (mg)	Αρχική ποσότητα εκχυλίσματος φλούδας ροδιού (mg)	Ποσότητα ξηρού συμπλόκου (mg)	Απόδοση διεργασίας (%)
KTZ6	499,8	50,7	154,6	28,1
KTZ7	499,7	49,9	175,2	31,9
KTZ8	499,9	125	167	26,7
KTZ9	501,7	124,5	571,9	91,3
KTZ10	500,3	125,3	160,3	25,6
KTZ11	500,5	50	241	43,8
KTZ15	500	125,6	570,4	91,2

Πίνακας 13: Δεδομένα και αποτελέσματα απόδοσης διεργασίας με πρώτη ύλη τον χυμό ροδιού.

Εγκλεισμός	Αρχική ποσότητα β-CD (mg)	Αρχική ποσότητα χυμού ροδιού (mg)	Ποσότητα ξηρού συμπλόκου (mg)	Απόδοση διεργασίας (%)
KTZ12	500,9	50,4	244,5	44,3
KTZ13	500,5	125,6	157,6	25,2
KTZ14	500,4	125,2	592,9	94,8
KTZ16	2000	499,7	551,9	22,1

Αρχικά, είναι εύκολα παρατηρήσιμο ότι τις υψηλότερες αποδόσεις διεργασίας έχουν οι εγκλεισμοί **KTZ9**, **KTZ14** και **KTZ15** που πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης. Αυτό συμβαίνει κατά κύριο λόγο γιατί στη διαδικασία της μεθόδου λυοφιλοποίησης δεν υπάρχουν τα στάδια της διήθησης υπό κενό και της συλλογής του στερεού από τον ηθμό, που υπάρχουν στη μέθοδο συγκαταβύθισης. Πρόκειται για στάδια με μεγάλες απώλειες στερεού που συμβαίνουν είτε λόγω διάλυσης ποσότητας του στερεού με τις εκπλύσεις και μεταφορά της στο διήθημα είτε επειδή υπάρχει δυσκολία κατά τη συλλογή του στερεού από τον ηθμό και μεταφορά του σε φιαλίδιο αποθήκευσης, αφού το στερεό συνήθως ηλεκτρίζεται. Ωστόσο, και για τα δείγματα που προέκυψαν με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης, πρέπει να παρατηρηθεί ότι η έστω και μικρή απόκλιση μεταξύ της εργαστηριακά μετρούμενης ποσότητας συμπλόκων από την θεωρητικά αναμενόμενη, μπορεί να οφείλεται σε απώλειες κατά την απόχυση του διαλύματος στο κρυσταλλωτήρι και τη μεταφορά του ή και σε απώλειες πτητικών συστατικών του ροδιού ή υγρασίας που πιθανόν υπήρχε στο εκχύλισμα ή στον χυμό ή στη β-κυκλοδεξτρίνη. [5]

Γενικότερα, οι απώλειες πτητικών συστατικών του ροδιού λόγω εξάτμισης μπορεί να υπάρχουν όχι μόνο στη διεργασία της μεθόδου λυοφιλοποίησης αλλά και στην μεθόδο συγκαταβύθισης. Έτσι, μπορεί να υποθεθεί ότι και κατά την παραμονή του στερεού στην αντλία υψηλού κενού, επιφανειακά προσδεδεμένη ποσότητα πτητικών συστατικών του εκχυλίσματος ή του ροδιού στη β-κυκλοδεξτρίνη, εξατμίζεται. Η σημαντικότερη, όμως, απώλεια της μεθόδου συγκαταβύθισης οφείλεται στο ότι τόσο το εκχύλισμα φλούδας ροδιού όσο και ο χυμός ροδιού είναι υδατοδιαλυτά, με αποτέλεσμα μέρος αυτών να παραμένει στο διάλυμα χωρίς να καταβυθίζεται ως ίζημα. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι το διάλυμα έχει κιτρινωπό έως πορτοκαλί χρώμα για τους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού, ενώ για τους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού το διάλυμα είναι ροζ απόχρωσης. [5]

Παρατηρώντας τον πίνακα 12, για τη μέθοδο συγκαταβύθισης, εξάγεται το συμπέρασμα ότι για μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος φλούδας ροδιού που προστίθεται και για την ίδια ποσότητα β-

κυκλοδεξτρίνης, η απόδοση διεργασίας είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται περισσότερη ποσότητα εκχυλίσματος φλούδας ροδιού. Το ίδιο ισχύει και για την περίπτωση που ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται χυμός ροδιού, σύμφωνα με τον πίνακα 13. Αυτό θεωρείται επικερδές αφού με λιγότερη ποσότητα πρώτης ύλης επιτυγχάνονται υψηλότερες αποδόσεις διεργασίας.

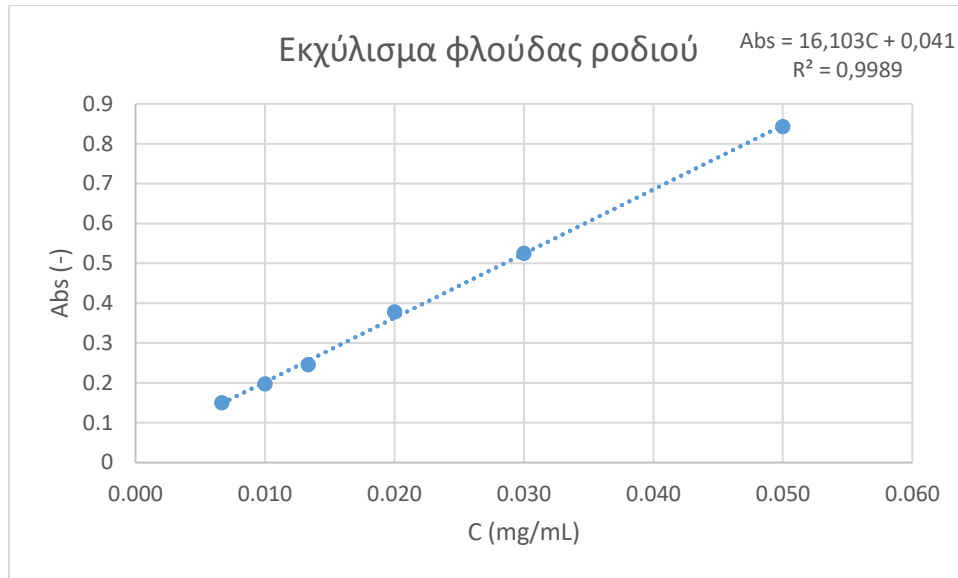
Κατά συνέπεια, η βελτιστοποίηση της απόδοσης της διεργασίας βασίζεται στη μελέτη και εξέταση διαφόρων παραμέτρων. Οι κυριότερες είναι οι αρχικές ποσότητες β-κυκλοδεξτρίνης, εκχυλίσματος φλούδας ροδιού, χυμού ροδιού καθώς και η αναλογία μάζας τους. Βέβαια, σημαντικό ρόλο παίζουν και οι λειτουργικές συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι εγκλεισμοί με σημαντικότερη τη διάρκεια ανάδευσης, συνθήκη η οποία πρέπει πάντα να εξετάζεται.

8.2. Απόδοση Εγκλεισμού-Ποσοστό Ολικού Εγκλεισμού και Επιφανειακής Πρόσδεσης Εκχυλίσματος/Χυμού Ροδιού σε β-κυκλοδεξτρίνη

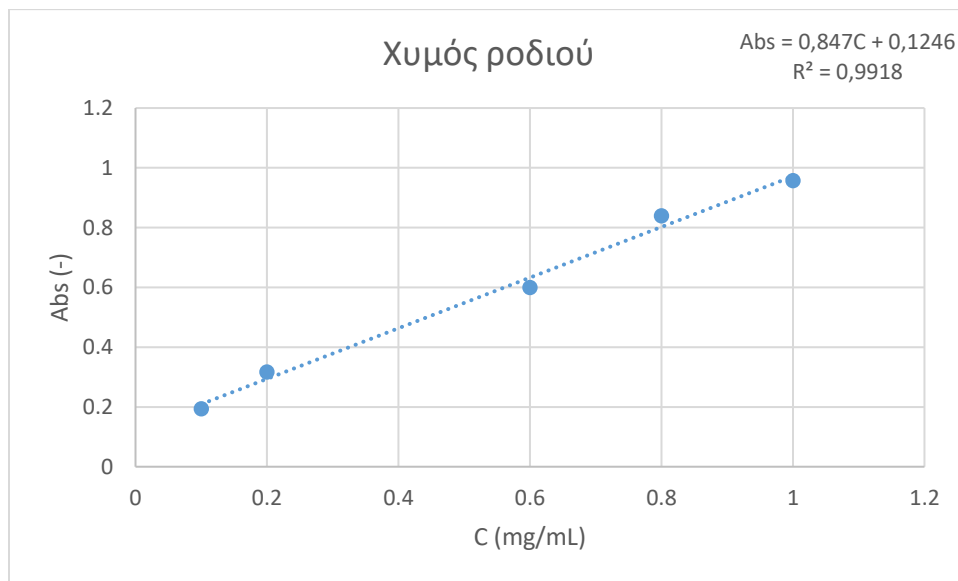
Καταρχάς, για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού μετράται στο φασματόμετρο UV-Vis η απορρόφηση των δειγμάτων που προέκυψαν μετά τις εκχυλίσεις, για παραλαβή της εγκλεισμένης ουσίας από το φορέα, σύμφωνα με τη διαδικασία που αναλύθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Έπειτα, η απορρόφηση αυτή μετατρέπεται σε συγκέντρωση μέσω της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς.

Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με μέτρηση της απορρόφησης προτύπων διαλυμάτων εκχυλίσματος ή χυμού ροδιού, με αραιώσεις ενός αρχικού διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης. Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν με απιονισμένο νερό. Οι απορροφήσεις που λαμβάνονται ανήκουν στο διάστημα 0,1-1, για συγκεντρώσεις εκχυλίσματος φλούδας ροδιού 0,007-0,050 mg/mL και για συγκεντρώσεις χυμού ροδιού 0,1-1 mg/mL. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού λαμβάνεται κορυφή γύρω στα 260 nm ενώ για τον χυμό ροδιού η κορυφή είναι γύρω στα 272 nm.

Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς και η εξίσωση που συσχετίζει απορρόφηση με συγκέντρωση για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού και τα αντίστοιχα στο διάγραμμα 2 για τον χυμό ροδιού. Στους άξονες, με Abs (-) συμβολίζεται η απορρόφηση του διαλύματος και με C (mg/mL) η συγκέντρωση του εκχυλίσματος/χυμού στο διάλυμα.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς και εξίσωση εκχυλίσματος φλούδας ροδιού.



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς και εξίσωση χυμού ροδιού.

Οι εξισώσεις αυτές χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης εκχυλίσματος ή χυμού που εγκλείεται συνολικά αλλά και αυτής που αφορά στα μόρια που προσδένονται στην εξωτερική επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης. Έπειτα, η συγκέντρωση μετατρέπεται σε ποσότητα εκχυλίσματος ή χυμού (mg) και σε επόμενο στάδιο υπολογίζονται η απόδοση εγκλεισμού και το ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης μέσω των σχέσεων 11 και 12.

$$\text{Απόδοση εγκλεισμού (\%)} = \frac{\text{μάζα ροδιού που εγκλείεται (mg)}}{\text{αρχική μάζα ροδιού (mg)}} \cdot 100 \quad (11)$$

$$\text{Ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης (\%)} = \frac{\text{μάζα ροδιού που εγκλείεται επιφανειακά (mg)}}{\text{αρχική μάζα ροδιού (mg)}} \cdot 100 \quad (12)$$

Οι σχέσεις αυτές αναφέρονται τόσο στο εκχύλισμα φλούδας ροδιού όσο και στον χυμό ροδιού και εφαρμόζονται αντιστοίχως, ανάλογα με το αν χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα φλούδας ή χυμός ροδιού για τον εγκλεισμό. Τα αποτελέσματα των παραπάνω ποσοστών παρουσιάζονται στους πίνακες 14 και 15.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα απόδοσης εγκλεισμού και ποσοστού επιφανειακής πρόσδεσης με βάση το εκχύλισμα φλούδας ροδιού.

Εγκλεισμός	Απόδοση εγκλεισμού (ολικά) (%)	Ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης (%)
KTZ6	2,4	1,1
KTZ7	0,6	3,3
KTZ8	3,8	0
KTZ9	100	100
KTZ10	1,7	1,4
KTZ11	2,6	0
KTZ15	100	80,4

Πίνακας 15: Αποτελέσματα απόδοσης εγκλεισμού και ποσοστού επιφανειακής πρόσδεσης με βάση τον χυμό ροδιού.

Εγκλεισμός	Απόδοση εγκλεισμού (ολικά) (%)	Ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης (%)
KTZ12	0	0
KTZ13	22,2	0
KTZ14	16,0	16,4
KTZ16	7,0	0

Σύμφωνα με τα όσα παρουσιάζονται στους πίνακες 14 και 15 είναι εμφανές ότι τα ποσοστά εγκλεισμού, ολικά και επιφανειακά, είναι μεγαλύτερα για τους εγκλεισμούς που πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης. Αυτό συμβαίνει γιατί δεν πραγματοποιείται το στάδιο της διήθησης υπό κενό της μεθόδου της συγκαταβύθισης. Συνεπώς, όλα τα χαλαρά προσδεμένα μόρια στην εξωτερική επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης αλλά και τα υδατοδιαλυτά συστατικά λαμβάνονται στο τελικό στερεό προϊόν.

Σε γενικές γραμμές, παρατηρούνται αρκετά χαμηλές αποδόσεις εγκλεισμού και αντιστοίχως χαμηλά ποσοστά επιφανειακής πρόσδεσης για τους εγκλεισμούς με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, με εκχύλισμα φλούδας ροδιού. Στην περίπτωση των εγκλεισμών με τον χυμό ροδιού, οι αποδόσεις αυτές τόσο με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης όσο και με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα και είναι λίγο υψηλότερες σε σχέση με αυτές που αφορούν στο εκχύλισμα φλούδας ροδιού. Οι χαμηλές αποδόσεις εγκλεισμού και τα χαμηλά ποσοστά επιφανειακής πρόσδεσης αποδίδονται στο γεγονός ότι τα εκχυλίσματα αυτά περιέχουν κυρίως υδατοδιαλυτά συστατικά, τα περισσότερα από τα οποία περνάνε στο διήθημα κατά τη διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του στερεού δείγματος.

Αρχικά, για το δείγμα **KTZ6** που σχηματίστηκε με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, παρατηρείται χαμηλή απόδοση εγκλεισμού, 2,4%, και σχεδόν το μισό από αυτό, 1,1%, αντιστοιχεί σε επιφανειακά προσδεμένα στη β-κυκλοδεξτρίνη μόρια. Το υπόλοιπο 1,3% είναι εκχύλισμα φλούδας ροδιού που έχει εγκλειστεί στην εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης.

Έπειτα, για το δείγμα **KTZ7** που παράχθηκε με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, δεν έχει πραγματοποιηθεί εγκλεισμός. Αυτό συμβαίνει γιατί η απόδοση εγκλεισμού που προέκυψε είναι πολύ

μικρή και το ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης μεγαλύτερο της. Αυτό δεν έχει κάποια φυσική σημασία διότι το ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης αποτελεί ουσιαστικά μέρος της απόδοσης εγκλεισμού. Η απόδοση εγκλεισμού αναφέρεται στον ολικό εγκλεισμό, δηλαδή τόσο στα μόρια που εγκλείονται στην εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης όσο και σε αυτά που προσδένονται στην εξωτερική επιφάνειά της. Το **KTZ7** παρασκευάστηκε όπως και το **KTZ6** με τη διαφορά ότι το **KTZ7** αφέθηκε σε ολονύκτια ανάδευση αντί για τετράωρη που εφαρμόστηκε για το **KTZ6**. Η μεγαλύτερης διάρκειας ανάδευση προσφέρει στο σύστημα περισσότερη ενέργεια οδηγώντας πιθανώς σε απομάκρυνση των επιφανειακά, κυρίως, συνδεδεμένων μορίων εκχυλίσματος με τη β-κυκλοδεξτρίνη.

Το δείγμα **KTZ8** που σχηματίστηκε με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, έχει χαμηλή απόδοση εγκλεισμού, 3,8%, ενώ φαίνεται να μην υπάρχουν μόρια επιφανειακά προσδεδεμένα στη β-κυκλοδεξτρίνη. Επομένως, όλη η ποσότητα εκχυλίσματος βρίσκεται στην εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης. Το δείγμα αυτό σχηματίστηκε όπως το **KTZ6** με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε αναλογία μάζας εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και β-κυκλοδεξτρίνης 1:4 και ολονύκτια ανάδευση ενώ για το **KTZ6** τα αντίστοιχα είναι 1:10 και τετράωρη ανάδευση. Η απουσία μορίων επιφανειακά προσδεδεμένων στη β-κυκλοδεξτρίνη πιθανώς οφείλεται στην περισσότερη ενέργεια που δίνεται στο σύστημα λόγω ολονύκτιας ανάδευσης, με αποτέλεσμα να απομακρύνονται τα μόρια αυτά. Επίσης, η αναλογικά περισσότερη ποσότητα εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε για το **KTZ8** φαίνεται να οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού. Εξάγεται, λοιπόν, το συμπέρασμα ότι υπήρχαν διαθέσιμες θέσεις στη β-κυκλοδεξτρίνη για εγκλεισμό επιπλέον ποσότητας εκχυλίσματος.

Το δείγμα **KTZ9** παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης. Παρατηρείται ότι η απόδοση εγκλεισμού και το ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης είναι περίπου 100%, γεγονός που σημαίνει ότι το εκχύλισμα απλά αλληλεπιδρά με τη β-κυκλοδεξτρίνη και προσδένεται στην εξωτερική της επιφάνεια. Στην περίπτωση αυτή δε σχηματίζονται σύμπλοκα εγκλεισμού αλλά σύμπλοκα μη-εγκλεισμού (non-inclusion complexes). Πρόκειται ουσιαστικά για μια «συνύπαρξη» των συστατικών του εκχυλίσματος επιφανειακά προσδεδεμένων με τα μόρια της β-κυκλοδεξτρίνης. Εδώ χρησιμοποιήθηκε αναλογία μάζας εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και β-κυκλοδεξτρίνης 1:4 και τετράωρη ανάδευση.

Στη συνέχεια, για το δείγμα **KTZ10** που παράχθηκε με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης παρατηρείται χαμηλή απόδοση εγκλεισμού, 1,7%, το περισσότερο από το οποίο, 1,4%, βρίσκεται προσδεδεμένο στην εξωτερική επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτή του δείγματος **KTZ6** με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε αναλογία μάζας εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και β-κυκλοδεξτρίνης 1:4. Εδώ φαίνεται ότι η περισσότερη ποσότητα εκχυλίσματος δε συνέβαλε θετικά στην απόδοση εγκλεισμού κάτι που πιθανόν οφείλεται στον κορεσμό της β-κυκλοδεξτρίνης υπό αυτές τις συνθήκες, κοντά σε αυτή την αναλογία μάζας.

Το δείγμα **KTZ11** αποτελεί επανάληψη του **KTZ6**. Η απόδοση εγκλεισμού εδώ βρέθηκε λίγο μεγαλύτερη από αυτή του **KTZ6** και ανέρχεται σε 2,6% ενώ δεν προσδιορίστηκε κάποιο ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης. Εύκολα, λοιπόν, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα μόρια βρίσκονται εγκλεισμένα, κυρίως, στην εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης.

Τέλος, το δείγμα **KTZ15** παρασκευάστηκε με τροποποιημένη μέθοδο λυοφιλοποίησης, σύμφωνα με όσα αναφέρονται στο τέλος της ενότητας 7.3.1. Η απόδοση εγκλεισμού εκτιμάται και σε αυτή την περίπτωση ότι είναι περίπου 100% ενώ το ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης ανέρχεται σε 80,4%. Επομένως, το 20% περίπου βρίσκεται εγκλεισμένο στην εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης.

Το δείγμα **KTZ11** επιλέγεται ως βέλτιστος εγκλεισμός της μεθόδου συγκαταβύθισης, για τα δείγματα με το εκχύλισμα φλούδας ροδιού. Παρόλο που υπάρχει δείγμα με υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού (**KTZ8**), στην περίπτωση του **KTZ11** χρησιμοποιήθηκε μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος και εφαρμόστηκε μικρότερη διάρκεια ανάδευσης. Οπότε μπορεί να υποθεθεί ότι ήταν η λιγότερο χρονοβόρα διεργασία εγκλεισμού και η πιο οικονομική από την άποψη ότι χρησιμοποιήθηκε η μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.

Όσον αφορά στους εγκλεισμούς της μεθόδου λυοφιλοποίησης τα δείγματα **KTZ9** και **KTZ15** έχουν εξίσου υψηλή απόδοση εγκλεισμού για την ίδια αναλογία μάζας εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και β-κυκλοδεξτρίνης (1:4). Όμως, ο εγκλεισμός για το δείγμα **KTZ15** επιλέγεται ως βέλτιστος επειδή δεν υπάρχει σύστημα διαλυτών αφού δε χρησιμοποιείται αιθανόλη αλλά μόνο απιονισμένο νερό κι έτσι αποφεύγεται το χρονοβόρο στάδιο της εξάτμισης για την απομάκρυνση της αιθανόλης. Επίσης, η διαδικασία εγκλεισμού για το δείγμα **KTZ9** θεωρείται επιπλέον χρονοβόρα λόγω εφαρμογής τετράωρης ανάδευσης αντί για δίωρης, που εφαρμόζεται στο δείγμα **KTZ15**.

Για το δείγμα **KTZ12** που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, δεν μπόρεσε να προσδιοριστεί απόδοση εγκλεισμού και ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης. Πιθανότατα, η αναλογικά μικρότερη ποσότητα χυμού ροδιού που χρησιμοποιήθηκε, δεν κατάφερε να εγκλειστεί ή προσδεθεί επιφανειακά στη β-κυκλοδεξτρίνη. Κατά συνέπεια, τα υδατοδιαλυτά συστατικά του χυμού πέρασαν στο διήθημα με τις εκπλύσεις κατά τη διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του στερεού. Ακόμη, υπάρχει πιθανότητα να έχει πραγματοποιηθεί εγκλεισμός αλλά να μην κατάφερε να γίνει ανίχνευση στο όργανο UV-Vis λόγω μικρής ποσότητας χυμού, μη ανιχνεύσιμης, που προστέθηκε για τη διαδικασία του εγκλεισμού.

Ωστόσο, προσδιορίστηκε απόδοση εγκλεισμού 22,2% για το δείγμα **KTZ13**, η οποία είναι αρκετά ικανοποιητική. Η μόνη διαφορά που υπάρχει μεταξύ αυτού του δείγματος και του **KTZ12** είναι η αναλογία μάζας χυμού ροδιού και β-κυκλοδεξτρίνης όπου για το **KTZ13** είναι 1:4 και για το **KTZ12** 1:10, δηλαδή στο **KTZ13** χρησιμοποιήθηκε περισσότερη ποσότητα χυμού. Η μεγαλύτερη ποσότητα χυμού ροδιού φαίνεται να οδηγεί σε υψηλά ποσοστά εγκλεισμένου χυμού μέσα στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης. Δεν προσδιορίστηκε ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης, επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα μόρια χυμού ροδιού βρίσκονται εγκλεισμένα στην εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης.

Το δείγμα **KTZ14** παράχθηκε όπως και το δείγμα **KTZ15**, δηλαδή με την τροποποιημένη μέθοδο λυοφιλοποίησης. Η απόδοση εγκλεισμού είναι χαμηλή για δείγμα που έχει παρασκευαστεί με μέθοδο λυοφιλοποίησης και είναι περίπου ίση με το ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης, κοντά στο 16%.

Τέλος, το δείγμα **KTZ16** αποτελεί ανακλιμάκωση της διεργασίας για το δείγμα **KTZ13**, το οποίο επιλέχθηκε ως το καλύτερο για τα πειράματα με τον χυμό ροδιού, λόγω υψηλότερου ποσοστού εγκλεισμού. Και στην περίπτωση του **KTZ16** δεν μπόρεσε να προσδιοριστεί το ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης, οπότε συμπεραίνεται ότι το 7% περίπου στο οποίο ανέρχεται η απόδοση εγκλεισμού, αντιστοιχεί στα εγκλεισμένα, στην εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης, μόρια.

Σε γενικές γραμμές, διαπιστώνεται ότι για τα πειράματα που έγιναν με τον χυμό ροδιού, οι αποδόσεις εγκλεισμού είναι καλύτερες σε σχέση με αυτές των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν με εκχύλισμα φλούδας ροδιού. Επίσης, η διάρκεια ανάδευσης είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τα επιφανειακά προσδεμένα στη β-κυκλοδεξτρίνη μόρια και κατ' επέκταση το ποσοστό

επιφανειακής πρόσδεσης. Εν γένει, μεγαλύτερη διάρκεια ανάδευσης οδηγεί σε μείωση του ποσοστού επιφανειακής πρόσδεσης λόγω περισσότερης ενέργειας που προσφέρεται στο σύστημα, απομακρύνοντας τα μόρια που είναι συνδεδεμένα στην εξωτερική επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης. Ακόμη, σημαντικό ρόλο παίζει και η αναλογία μάζας εκχύλισματος φλούδας ή χυμού ροδιού και β-κυκλοδεξτρίνης, η οποία παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά και πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση. Τέλος, η δομή και η πολικότητα των μορίων είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες καθώς τόσο για τον χυμό ροδιού όσο και για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού γίνεται λόγος για υδατοδιαλυτά μόρια ενώ το περιβάλλον της εσωτερικής κοιλότητας της β-κυκλοδεξτρίνης είναι υδρόφοβο, γεγονός που δυσκολεύει την επίτευξη ικανοποιητικών ποσοστών εγκλεισμού.

8.3. Μέγεθος Σωματιδίων, Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τους χαρακτηρισμούς μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού, ονομάζεται Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS) και το όργανο που χρησιμοποιείται είναι το Zetasizer Nano ZS. Η μέθοδος εγκλεισμού, οι παράμετροι και οι συνθήκες της διεργασίας εγκλεισμού, το είδος του χρησιμοποιούμενου φορέα και η προς εγκλεισμό δραστική ουσία είναι οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τις τιμές των τριών αυτών μεγεθών. Στους πίνακες 16 και 17 παρατίθενται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τις μετρήσεις του οργάνου για τους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού και με χυμό ροδιού αντίστοιχα και παρουσιάζονται ως μέσοι όροι τριών μετρήσεων που γίνονται για κάθε δείγμα.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα μετρήσεων μεγέθους σωματιδίων, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού για τους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού.

Εγκλεισμός	Μέγεθος (nm)	Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
KTZ6	600,4	0,641	-30,0
KTZ7	657,6	0,659	-30,6
KTZ8	752,1	0,634	-16,5
KTZ9	790,8	0,596	-22,8
KTZ10	938,9	0,693	-15,2
KTZ11	666,9	0,588	-19,9
KTZ15	780,6	0,658	-21,5

Πίνακας 17: Αποτελέσματα μετρήσεων μεγέθους σωματιδίων, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού για τους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού.

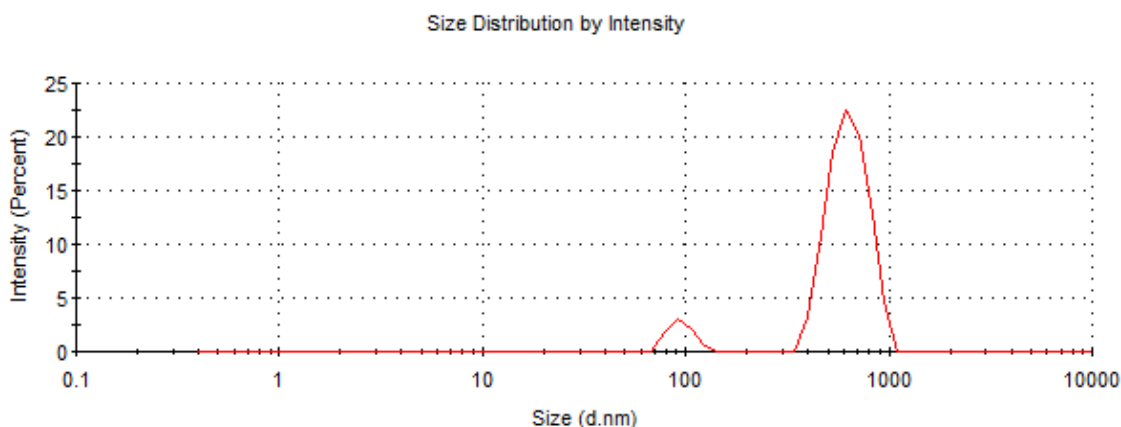
Εγκλεισμός	Μέγεθος (nm)	Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
KTZ12	738,9	0,524	-13,5
KTZ13	1254	0,865	-18,2
KTZ14	836,2	0,655	-7,69
KTZ16	956,2	0,694	-27,8

Σε γενικές γραμμές, προκύπτουν μεγάλα μεγέθη σωματιδίων, εύρους 600,4-938,9 nm, για τα δείγματα με εκχύλισμα φλούδας ροδιού και ακόμη μεγαλύτερα, εύρους 738,9-1254 nm, για εκείνα στα οποία χρησιμοποιήθηκε χυμός ροδιού. Τα διαλύματα των δειγμάτων **KTZ13** και **KTZ16** υποβλήθηκαν σε

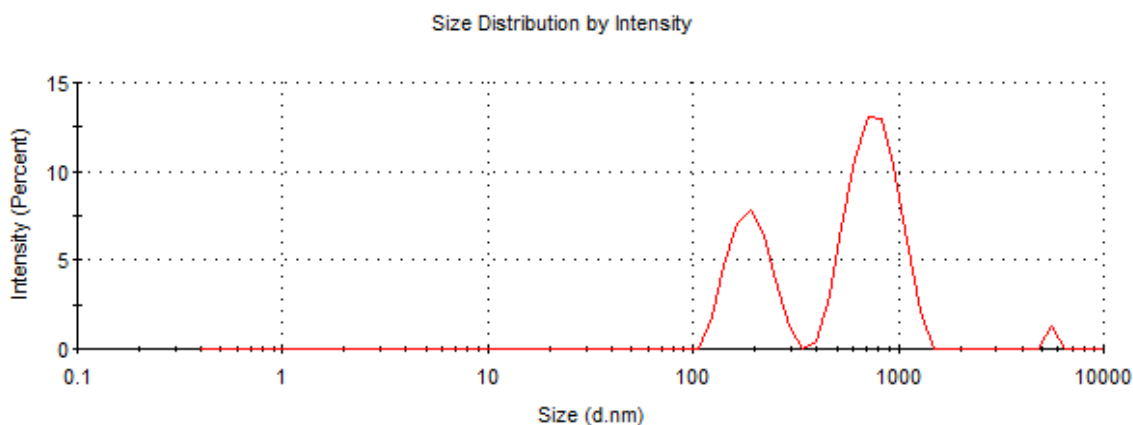
4 λεπτά ανάδευση στη συσκευή τύπου vortex διότι σε προηγούμενες μετρήσεις προέκυψαν μεγάθη σωματιδίων κοντά στα 3 μm και δείκτης πολυδιασποράς περίπου 1, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα σωματίδια είχαν συσσωματωθεί.

Χαρακτηριστικό όλων των δειγμάτων είναι ότι δεν παρατηρείται μόνο μια οικογένεια μεγέθους σωματιδίων ενώ πάντα υπάρχει μια μικρή οικογένεια, δηλαδή ένα μικρό ποσοστό κοντά στα 5 μm , το οποίο παρατηρείται γενικά σε περιπτώσεις εγκλεισμών με φορέα τη β -κυκλοδεξτρίνη. Έτσι, σε όλα τα δείγματα εγκλεισμών προκύπτουν τρεις οικογένειες μεγέθους σωματιδίων, με εξαίρεση το δείγμα **KTZ8** στο οποίο παρατηρούνται δύο οικογένειες, μία κοντά στα 200 nm και μία γύρω στα 700 nm (Εικόνα 18). Στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχει κάποιο ποσοστό σε μικρές διαστάσεις, περίπου 200 nm, ένα ποσοστό σε μεγαλύτερες γύρω στα 700 nm και το ποσοστό κοντά στα 5 μm , όπως προαναφέρθηκε (Εικόνα 19). Στους εγκλεισμούς που πραγματοποιήθηκαν με χυμό ροδιού, η οικογένεια κοντά στα 5 μm ανέρχεται σε μεγάλο ποσοστό.

Ο δείκτης πολυδιασποράς, ο οποίος ουσιαστικά αποτελεί μέτρο της ομοιομορφίας του μεγέθους των σωματιδίων, σε όλες τις περιπτώσεις λαμβάνει τιμές μεγαλύτερες από 0,5. Επομένως, υπάρχει ευρεία κατανομή μεγέθους σωματιδίων ή αλλιώς πολυδιασπορά. Το ζ-δυναμικό είναι σε όλες τις περιπτώσεις αρνητικό, κυμαίνεται από -7,69 έως -30,6 mV και για τις υψηλότερες, κατά απόλυτη τιμή, τιμές γίνεται λόγος για σταθερές διασπορές με μικρότερη πιθανότητα συσσωμάτωσης. [59, 60]



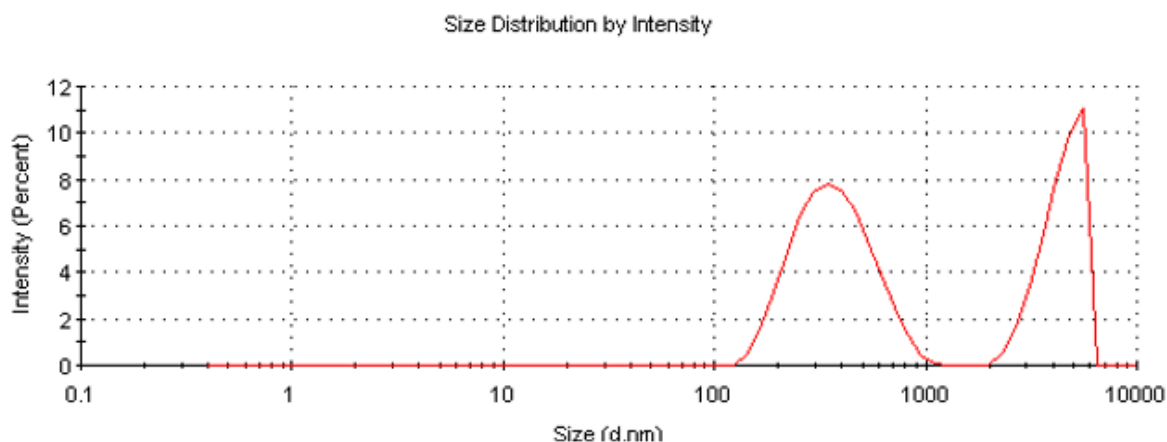
Εικόνα 18: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού **KTZ8**.



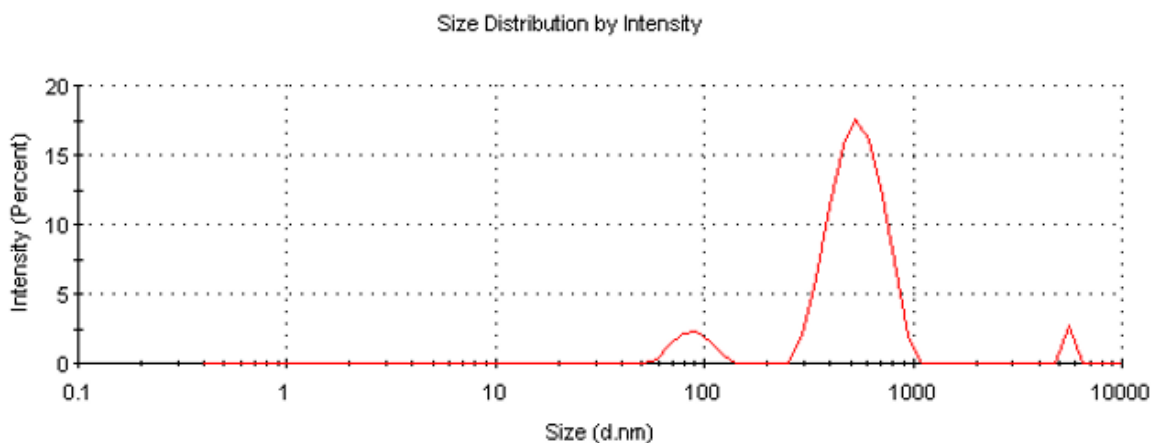
Εικόνα 19: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού **KTZ6**.

Το μοτίβο αυτό της κατανομής μεγέθους σωματιδίων, των τριών οικογενειών της εικόνας 19, παρατηρείται, εκτός από το δείγμα **KTZ6**, και στα δείγματα **KTZ7**, **KTZ11** και **KTZ12**. Ο μέσος όρος μεγέθους σωματιδίων για τα δείγματα αυτά είναι παραπλήσιος, γύρω στα 600 nm με 700 nm. Και τα τέσσερα δείγματα έχουν παρασκευαστεί με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, έχοντας αναλογία μάζας εκχυλίσματος φλούδας ροδιού (**KTZ6**, **KTZ7**, **KTZ11**) ή χυμού ροδιού (**KTZ12**) με τη β-κυκλοδεξτρίνη 1:10. Σε όλα τα δείγματα εφαρμόστηκε τετράωρη ανάδευση εκτός από το **KTZ7** όπου η ανάδευση ήταν ολονύκτια. Για τα δείγματα **KTZ6** και **KTZ11** ήταν αναμενόμενο να προκύψουν παρόμοια αποτελέσματα γιατί το **KTZ11** είναι επανάληψη του **KTZ6**.

Τα δείγματα **KTZ9**, **KTZ15** και **KTZ14** παράχθηκαν με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης και μάλιστα τα 2 τελευταία με την ελαφρώς τροποποιημένη μέθοδο λυοφιλοποίησης που έχει ήδη αναλυθεί. Ο μέσος όρος μεγέθους σωματιδίων για τα δείγματα αυτά είναι λίγο μεγαλύτερος από τα προαναφερθέντα δείγματα, περίπου 800 nm. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί η ίδια αναλογία μάζας εκχυλίσματος φλούδας ροδιού (**KTZ9**, **KTZ15**) ή χυμού ροδιού (**KTZ14**) με τη β-κυκλοδεξτρίνη, 1:4. Στο δείγμα **KTZ14** εμφανίζονται δύο οικογένειες, μία κοντά στα 400 nm και αυτή κοντά στα 5 μm αλλά σε μεγαλύτερο ποσοστό σε αυτή την περίπτωση (Εικόνα 20). Στο δείγμα **KTZ15** εμφανίζονται τρεις οικογένειες, μία λίγο πιο κάτω από τα 100 nm, μια κοντά στα 600 nm και αυτή κοντά στα 5 μm (Εικόνα 21).

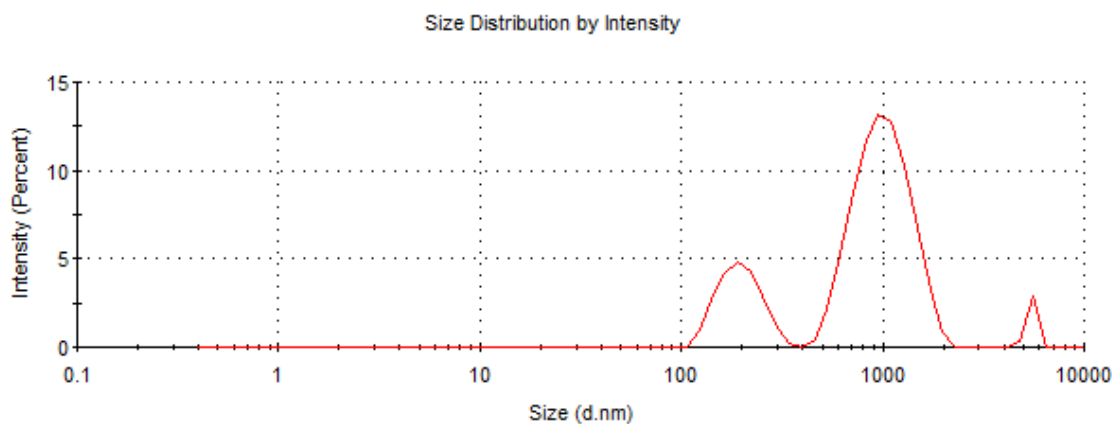


Εικόνα 20: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού **KTZ14**.



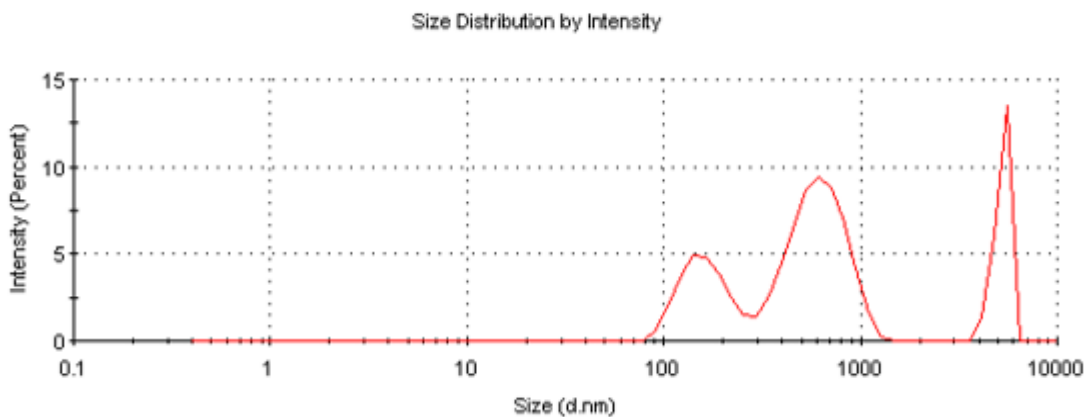
Εικόνα 21: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού **KTZ15**.

Το δείγμα **KTZ10** παρουσιάζει παρόμοια κατανομή μεγέθους σωματιδίων με το **KTZ9** (Εικόνα 22), με την έννοια ότι και για τα δύο δείγματα εμφανίζεται μια κορυφή κοντά στα 200 nm, μια κοντά στο 1 μm και αυτή στα 5 μm αλλά σε μικρό ποσοστό, ενώ τα σωματίδια του **KTZ10** προέκυψαν ελαφρώς μεγαλύτερα από αυτά του **KTZ9**. Τα δείγματα αυτά παρασκευάστηκαν με διαφορετική μέθοδο, το **KTZ10** με τη μέθοδο συγκαταβύθισης και το **KTZ9** με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης, αλλά χρησιμοποιήθηκε η ίδια αναλογία μάζας εκχυλίσματος φλούδας ροδιού με τη β-κυκλοδεξτρίνη, 1:4, και εφαρμόστηκε τετράωρη διάρκεια ανάδευσης.



Εικόνα 22: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού **KTZ9**.

Τέλος, τα δείγματα **KTZ13** και **KTZ16** παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα μεγέθη σωματιδίων, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι έχει επέλθει συσσωμάτωση. Η μορφή της κατανομής μεγέθους σωματιδίων είναι παρόμοια και στις 2 περιπτώσεις, δηλαδή εμφανίζεται μια οικογένεια κοντά στα 100 nm, μια γύρω στα 700 nm και μια περίπου στα 5 μm, όπως φαίνεται στην εικόνα 23 για το δείγμα **KTZ16**. Αναμένονταν παραπλήσια αποτελέσματα διότι το **KTZ16** αποτελεί ανακλιμάκωση της διεργασίας για το δείγμα **KTZ13**.



Εικόνα 23: Κατανομή μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα συμπλόκων εγκλεισμού **KTZ16**.

Η αναλογία μάζας μεταξύ β-κυκλοδεξτρίνης και εκχυλίσματος ή χυμού δε φαίνεται να παρουσιάζει συγκεκριμένη επιρροή στα μεγέθη των σωματιδίων. Το ίδιο ισχύει και για τη διάρκεια ανάδευσης, καθώς δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές. Ωστόσο, μπορεί εύκολα να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η μορφή του ροδιού (εκχύλισμα ή χυμός) επηρεάζει το μέγεθος των σωματιδίων και μάλιστα όπου έχει

χρησιμοποιηθεί χυμός ροδιού τα μεγέθη των σωματιδίων είναι μεγαλύτερα. Επίσης, ούτε η μέθοδος εγκλεισμού που χρησιμοποιείται φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα τα αποτελέσματα των μεγεθών των σωματιδίων.

Ο δείκτης πολυδιασποράς εμφανίζει αρκετά μεγάλες τιμές με μέσο όρο μετρήσεων που ανήκουν στο εύρος 0,524-0,865. Η ύπαρξη τριών διαφορετικών πληθυσμών στην κατανομή μεγέθους σχεδόν όλων των δειγμάτων σχετίζεται με την ομοιομορφία των σωματιδίων των δειγμάτων αυτών. Τα αποτελέσματα έχουν παραπλήσιες τιμές, δεδομένου ότι οι τρεις οικογένειες εμφανίζονται σε όλα τα δείγματα, εκτός από το **KTZ8** και το **KTZ14**, ανεξάρτητα από τη διεργασία που πραγματοποιείται και τις επιμέρους εφαρμοζόμενες συνθήκες. Θεωρητικά, τιμές μεγαλύτερες από 0,20 υποδεικνύουν ευρεία κατανομή μεγέθους σωματιδίων, δηλαδή πολυδιασπορά. Ωστόσο, παρά τις υψηλές τιμές PDI, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η ομοιομορφία των τριων επιμέρους οικογενειών είναι σχετικά καλή γιατί το εύρος των καμπυλών κατανομής κάθε μεγέθους είναι σχετικά μικρό, λόγω μη πεπλατυσμένων καμπυλών.

Το ζ-δυναμικό σε όλες τις περιπτώσεις παρουσιάζει αρνητικές τιμές, οι οποίες ανήκουν στο εύρος από -7,69 έως -30,6 mV. Οι χαμηλότερες κατά απόλυτη τιμή τιμές αφορούν στα δείγματα **KTZ14**, **KTZ12** και **KTZ10**, στα οποία η τάση συσσωμάτωσης συμπεραίνεται πως είναι μεγαλύτερη. Επομένως, τα σωματίδια αυτών των δειγμάτων εγκλεισμού δεν είναι σταθερά και η δημιουργία συσσωματωμάτων μπορεί να δυσκολέψει την εφαρμογή τους σε προϊόντα. Στα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρά αρνητικές τιμές (ενδεικτικά **KTZ16**, **KTZ6**, **KTZ7**) γίνεται αντιληπτό ότι οι απωστικές δυνάμεις είναι μεγαλύτερες από τις ελκτικές. Σαν αποτέλεσμα, υπάρχει μικρότερη πιθανότητα συσσωμάτωσης οπότε η σταθερότητα των σωματιδίων μεγαλύτερη.

Τα δείγματα **KTZ6** και **KTZ7** παρασκευάστηκαν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο με τη διαφορά ότι στο δεύτερο εφαρμόστηκε ολονύκτια ανάδευση, κάτι το οποίο δεν επηρέασε το ζ-δυναμικό. Στα δείγματα **KTZ9** και **KTZ10** εφαρμόστηκαν οι ίδιες συνθήκες και αναλογίες αλλά το πρώτο πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης και το δεύτερο με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, με αποτέλεσμα το **KTZ9** να παρουσιάζει πολύ καλύτερα αποτελέσματα αναφορικά με το ζ-δυναμικό. Στο δείγμα **KTZ6** χρησιμοποιήθηκε μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος σε σχέση με το **KTZ10** και αυτή η μικρότερη ποσότητα επηρέασε θετικά το ζ-δυναμικό δίνοντάς του ισχυρότερη αρνητική τιμή. Η τροποποιημένη μέθοδος λυοφιλοποίησης φαίνεται να δίνει επιθυμητά αποτελέσματα ζ-δυναμικού μόνο για το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα φλούδας ροδιού, **KTZ15**, και όχι για εκείνο που χρησιμοποιήθηκε χυμός ροδιού, **KTZ14**. Έτσι, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι το ζ-δυναμικό επηρεάζεται από τη μέθοδο εγκλεισμού, την αναλογία μάζας β-κυκλοδεξτρίνης και εκχυλίσματος ή χυμού καθώς και από τη μορφή του ροδιού (εκχύλισμα ή χυμός) που χρησιμοποιείται.

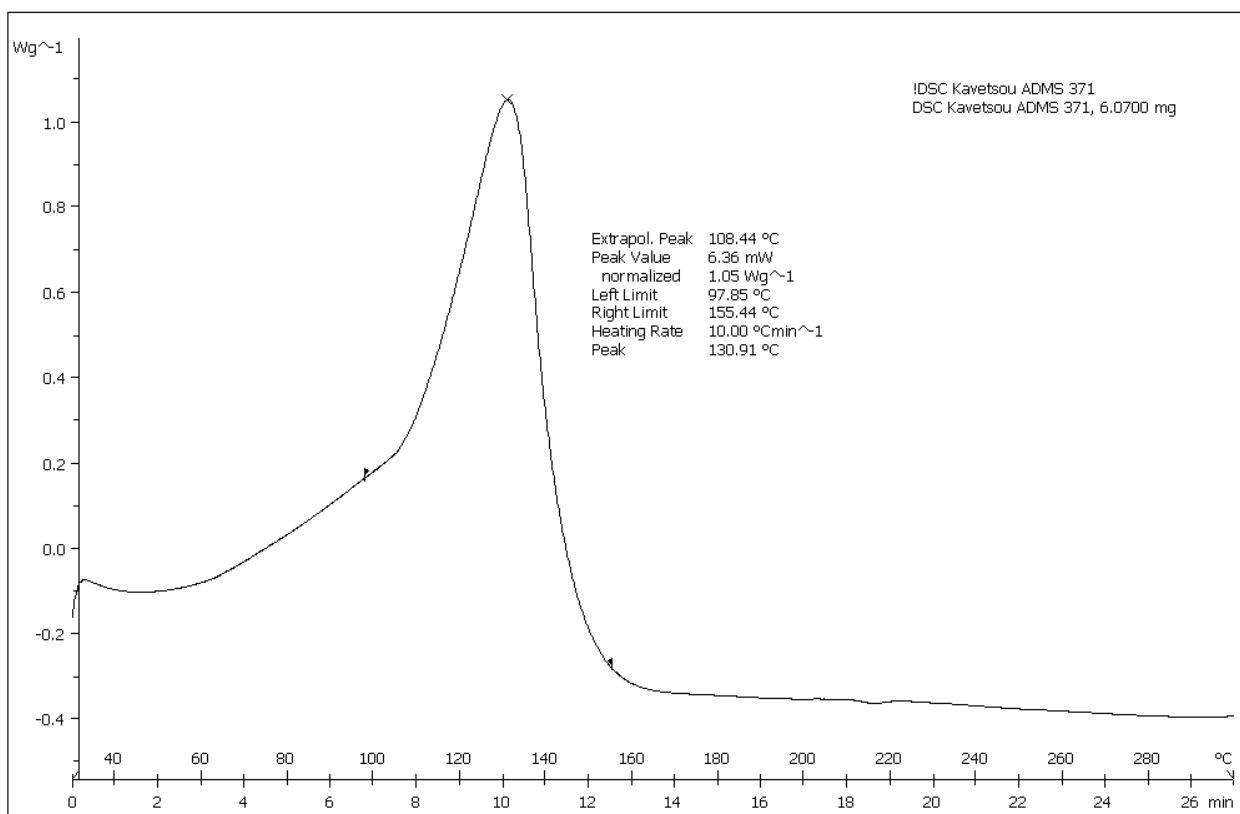
Οι αναλύσεις και οι σχολιασμοί που γίνονται στις επόμενες υποενότητες αφορούν στη β-κυκλοδεξτρίνη, στο εκχύλισμα φλούδας ροδιού, στον χυμό ροδιού καθώς επίσης και στα δείγματα εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**. Επιλέχθηκαν τα τρία αυτά δείγματα γιατί, καταρχάς, το δείγμα **KTZ13** θεωρείται ως ο καλύτερος εγκλεισμός με πρώτη ύλη τον χυμό ροδιού, λόγω υψηλής απόδοσης εγκλεισμού. Έπειτα, το δείγμα **KTZ9** αποτελεί ένα από τα δείγματα με την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης και πρώτη ύλη το εκχύλισμα φλούδας ροδιού. Τέλος, επιλέχθηκε και το δείγμα **KTZ6** διότι, παρόλο που υπάρχουν δείγματα (**KTZ8** και **KTZ11**) με ελαφρώς υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού, παρασκευασμένα και αυτά με τη μέθοδο συγκαταβύθισης και πρώτη ύλη το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, το **KTZ6** έχει πρώτον κοντινή με αυτά, αν

και χαμηλότερη, απόδοση εγκλεισμού αλλά έχει βρεθεί, επιπλέον, γι' αυτό, ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης που δεν προσδιορίστηκε στα δείγματα **KTZ8** και **KTZ11**. Έτσι, αποφασίστηκε να εξεταστεί ως μια γενική περίπτωση εγκλεισμού, εσωτερικού και επιφανειακού, με μέθοδο συγκαταβύθισης και πρώτη ύλη εκχύλιμα φλούδας ροδιού.

8.4. Θερμική ανάλυση μέσω Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) και Θερμοβαρουμετρικής Ανάλυσης (TGA)

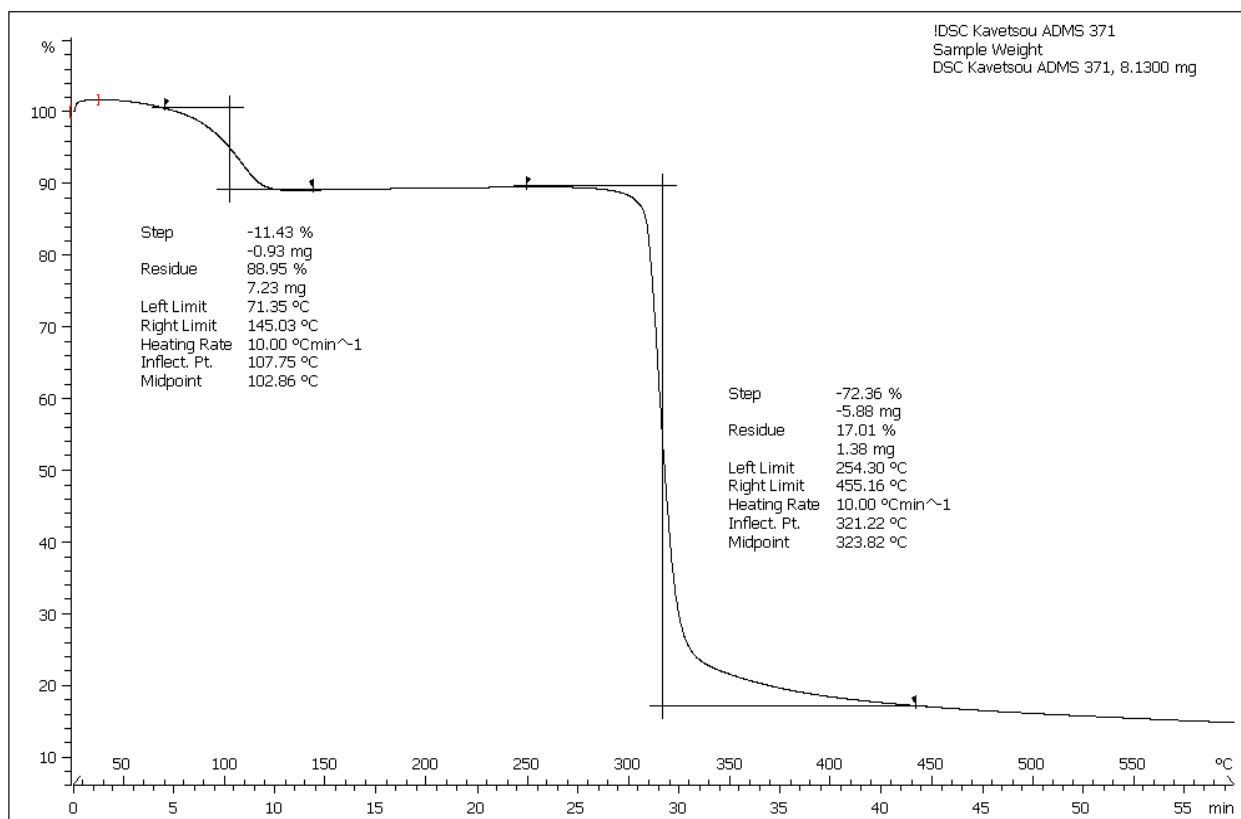
Η β-κυκλοδεξτρίνη, το εκχύλιμα φλούδας ροδιού, ο χυμός ροδιού και τα σύμπλοκα εγκλεισμού των δειγμάτων **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13** μελετήθηκαν ως προς τη θερμική συμπεριφορά τους, με τη χρήση των οργάνων DSC 1STAR^e System και TGA/DSC 1STAR^e System. Με αυτό τον τρόπο, λαμβάνονται πληροφορίες αναφορικά με τη θερμική σταθερότητα, τις θερμικές μεταπτώσεις των δειγμάτων ενώ από τα γραφήματα δύναται να υπάρξει επιβεβαίωση σχετικά με τον εγκλεισμό του εκχυλίσματος ή του χυμού στη β-κυκλοδεξτρίνη. Στη συνέχεια, παρατίθενται τα γραφήματα TGA/DSC των παραπάνω δειγμάτων και μια υποτυπώδης ανάλυση για το καθένα.

Όπως έχει, ήδη, αναφερθεί, η τήξη είναι ενδόθερμη διεργασία και εμφανίζεται ως αρνητική κορυφή, ενώ η κρυστάλλωση είναι εξώθερμη και εμφανίζεται ως θετική κορυφή στο γράφημα DSC, σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία ([45, 47]). Ωστόσο, στα γραφήματα DSC και TGA που παρατίθενται στην παρούσα διπλωματική εργασία, η φορά των ενδόθερμων ορίζεται προς τα πάνω και, συνεπώς, των εξώθερμων προς τα κάτω και η ανάλυση που γίνεται βασίζεται σε αυτή τη φορά.



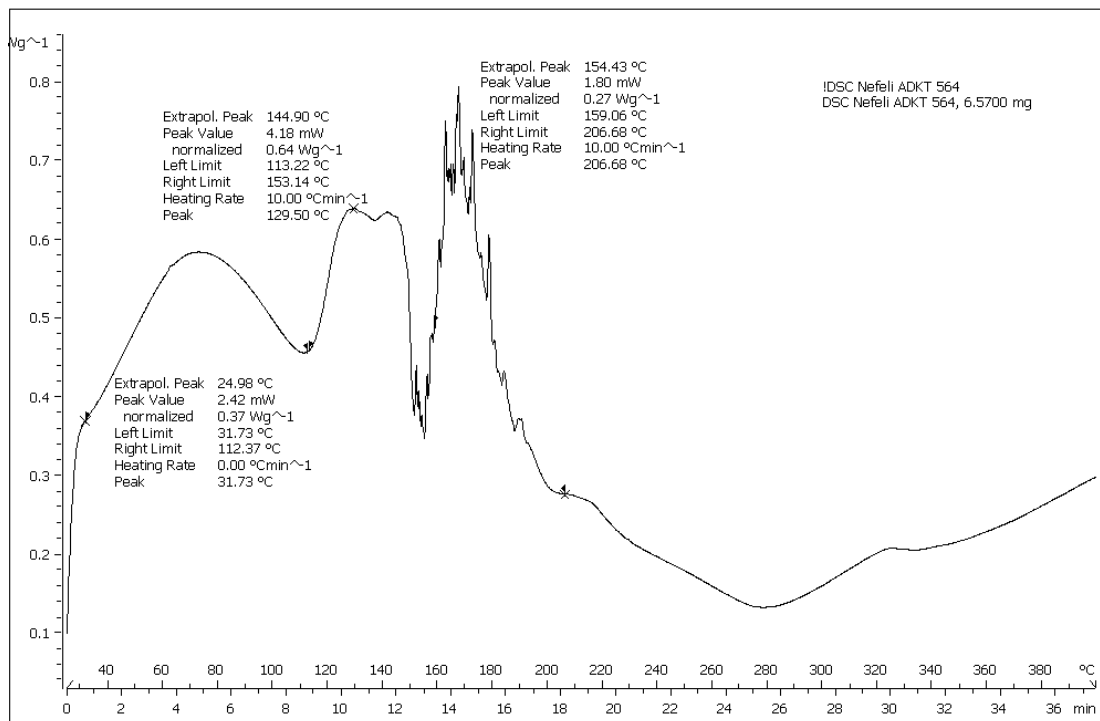
Εικόνα 24: Το γράφημα DSC της β-κυκλοδεξτρίνης.

Στην εικόνα 24 παρουσιάζεται το γράφημα DSC της β-κυκλοδεξτρίνης. Παρατηρείται μια ενδόθερμη κορυφή στους 130,9 °C που αντιστοιχεί στο σημείο τήξης της β-κυκλοδεξτρίνης. Η ενθαλπία τήξης (ΔH_m) της β-CD μπορεί να υπολογιστεί από το εμβαδό της επιφάνειας που οριοθετείται από την καμπύλη της συγκεκριμένης κορυφής και κάτω. Ήδη η κορυφή ξεκινάει περίπου από τους 60 °C, όπου σιγά-σιγά αρχίζει να παρατηρείται και η πρώτη απώλεια μάζας στο γράφημα TGA, η οποία αποδίδεται, πιθανότατα, σε απώλεια υγρασίας-νερού. Η κορυφή αυτή καλύπτει ένα εύρος περίπου από τους 60 °C μέχρι τους 160 °C. [61, 62]



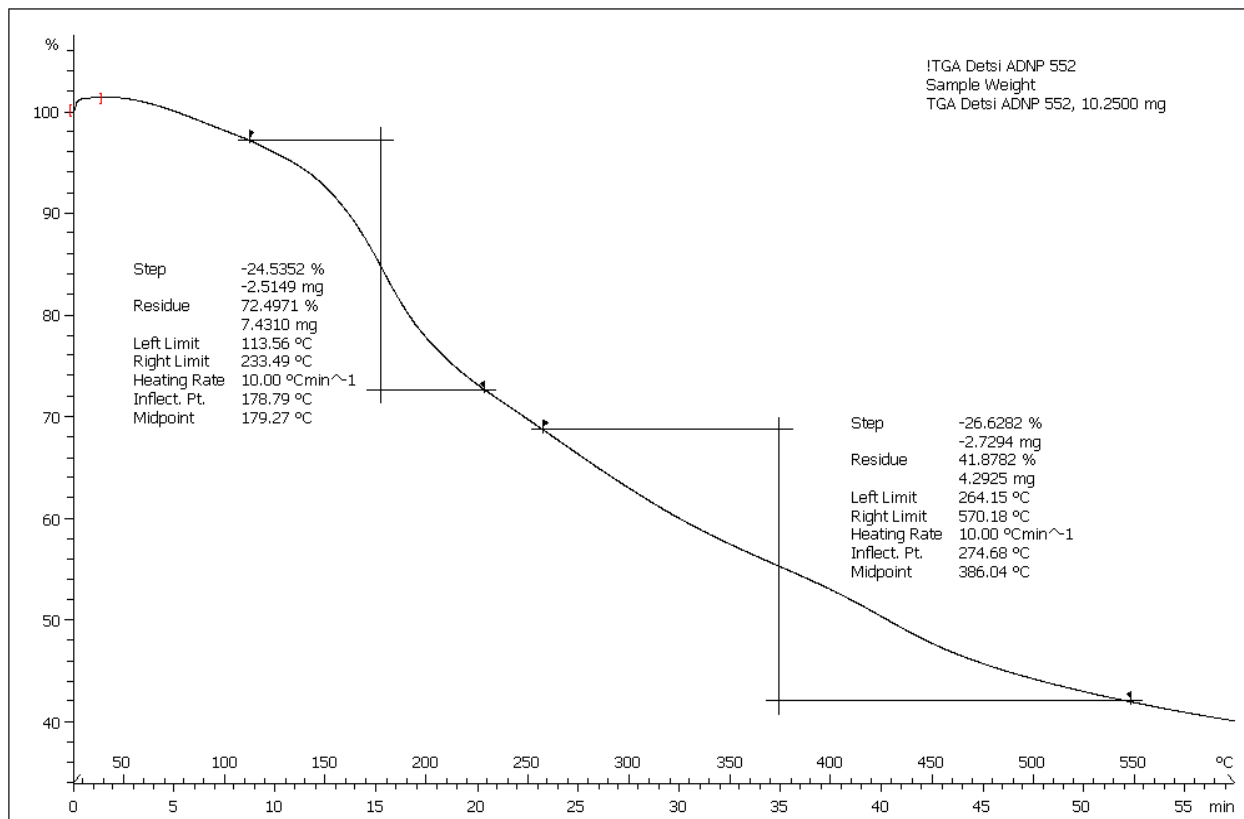
Εικόνα 25: Το γράφημα TGA της β-κυκλοδεξτρίνης.

Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από το παραπάνω γράφημα TGA της β-κυκλοδεξτρίνης (Εικόνα 25) σχετίζονται με δύο απώλειες μάζας. Η πρώτη απώλεια μάζας ανέρχεται σε ποσοστό 11,43% περίπου στους 102,9 °C και συμβαίνει λόγω απώλειας νερού-υγρασίας. Η δεύτερη απώλεια μάζας είναι εμφανώς μεγαλύτερη και σχετίζεται με την απώλεια μάζας της ίδιας της ένωσης και πρόκειται, ουσιαστικά, για την περιοχή αποικοδόμησης της β-κυκλοδεξτρίνης, μεταξύ των θερμοκρασιών 254,3 °C και 445,2 °C. Η θερμοκρασία μέγιστου ρυθμού αποικοδόμησης είναι 323,8 °C και ονομάζεται θερμοκρασία αποικοδόμησης (T_d). Από το γράφημα λαμβάνεται ότι το στερεό υπόλειμμα της β-κυκλοδεξτρίνης είναι ίσο με 17,01%.



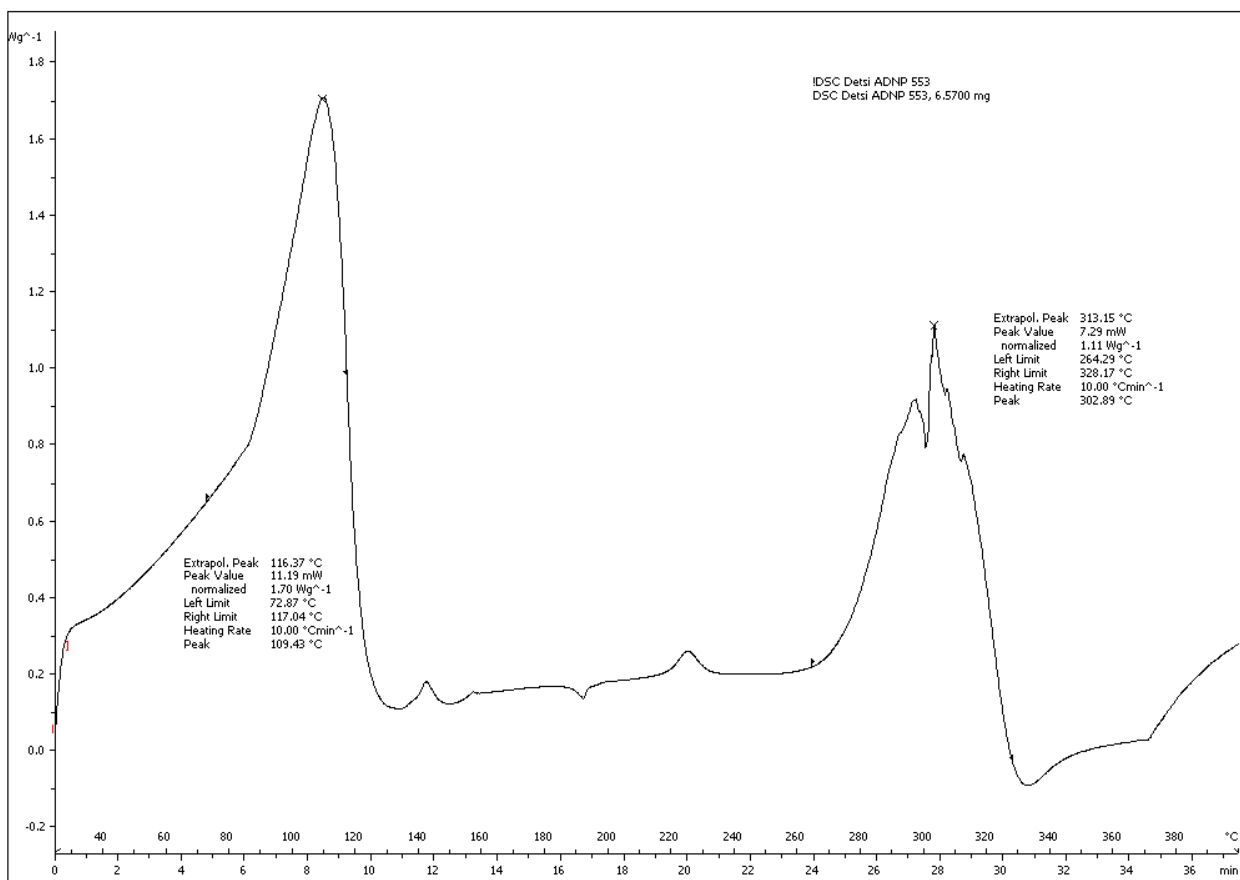
Εικόνα 26: Το γράφημα DSC του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού.

Από το παραπάνω γράφημα DSC (Εικόνα 26) του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού, παρατηρούνται τρεις ενδόθερμες κορυφές στους 31,7 °C, στους 129,5 °C και στους 206,7 °C. Οι μεταβολές αυτές πιθανόν οφείλονται, καταρχάς στις μικρότερες θερμοκρασίες, σε απώλεια πτητικών συστατικών κι έπειτα σε απώλειες νερού και υγρασίας, όπως φαίνεται και στο γράφημα TGA του εκχυλίσματος αυτού.



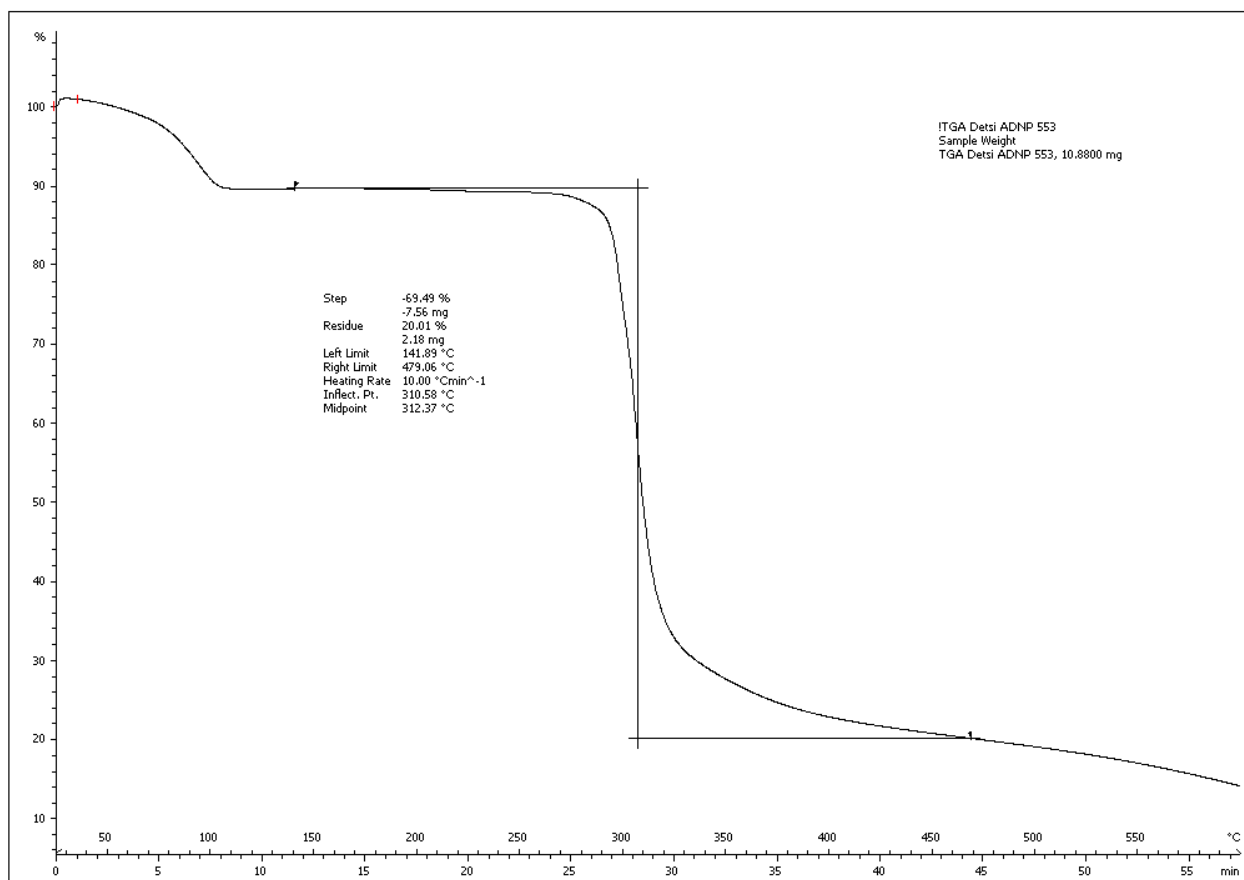
Εικόνα 27: Το γράφημα TGA του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού.

Καταρχάς, στο γράφημα TGA του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού (Εικόνα 27) παρατηρείται μια πρώτη απώλεια μάζας της τάξης του 24,5%. Η απώλεια αυτή ξεκινάει από τους 113,6 °C, όπου περιλαμβάνεται και απώλεια νερού-υγρασίας, τα οποία υπάρχουν σε μικρά ποσοστά στο εκχύλισμα, με μέγιστο ρυθμό απώλειας στους 179,3 °C, και καταλήγει στους 233,5 °C. Η δεύτερη μεταβολή μάζας καλύπτει μεγαλύτερο εύρος, 264,2-570,2 °C, και πρόκειται ουσιαστικά για την περιοχή αποικοδόμησης του εκχυλίσματος με θερμοκρασία αποικοδόμησης 386 °C. Τέλος, από το γράφημα TGA προσδιορίζεται ότι το στερεό υπόλειμμα του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού ανέρχεται σε ποσοστό 41,9%.



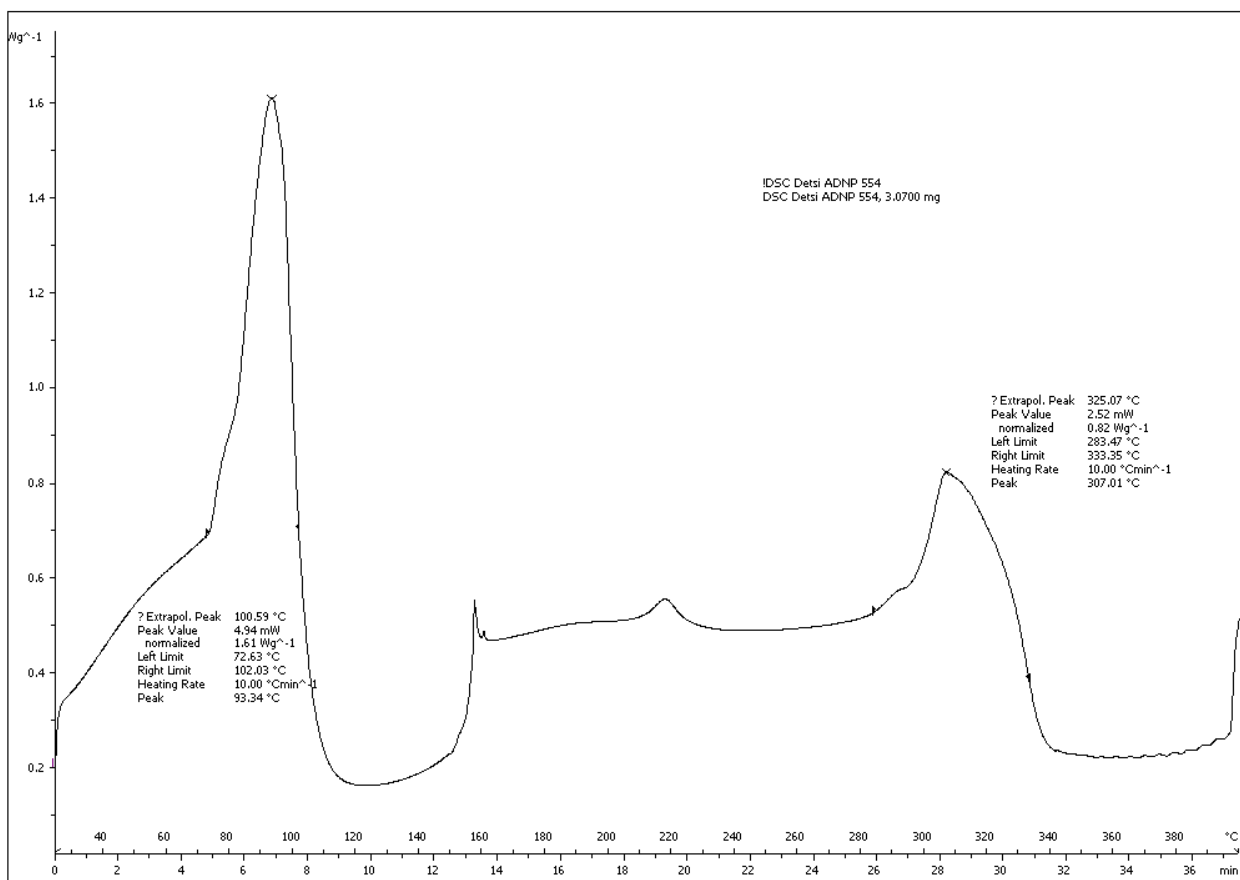
Εικόνα 28: Το γράφημα DSC του δείγματος εγκλεισμού **KTZ6**.

Το γράφημα DSC του δείγματος εγκλεισμού **KTZ6** (Εικόνα 28) παρουσιάζει κάποια ομοιότητα στις αρχικές θερμοκρασίες με το γράφημα DSC της β-κυκλοδεξτρίνης, για το εύρος 40-130 °C. Εκεί παρατηρείται μια ενδόθερμη κορυφή γύρω στους 109,4 °C που μπορεί να αποδοθεί στην απώλεια νερού. Ακολουθεί δεύτερη ενδόθερμη κορυφή κόντα στους 302,9 °C που ξεκινάει από τους 264,3 °C και καταλήγει στους 328,2 °C. Η δεύτερη αυτή κορυφή δεν παρατηρείται ούτε στο γράφημα DSC της β-κυκλοδεξτρίνης ούτε του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού. Ωστόσο, σύμφωνα με το γράφημα TGA της β-κυκλοδεξτρίνης εκεί παρατηρείται η αποικοδόμησή της. Παρατηρώντας, επίσης, και το γράφημα TGA του δείγματος **KTZ6**, σε παραπλήσια θερμοκρασία, λαμβάνει χώρα μέγιστος ρυθμός απώλειας μάζας. Συνεπώς, μπορεί να υποθεθεί ότι η θερμοκρασία 302,9 °C είναι η θερμοκρασία αποδόμησης του σχηματιζόμενου συμπλόκου.



Εικόνα 29: Το γράφημα TGA του δείγματος εγκλεισμού **KTZ6**.

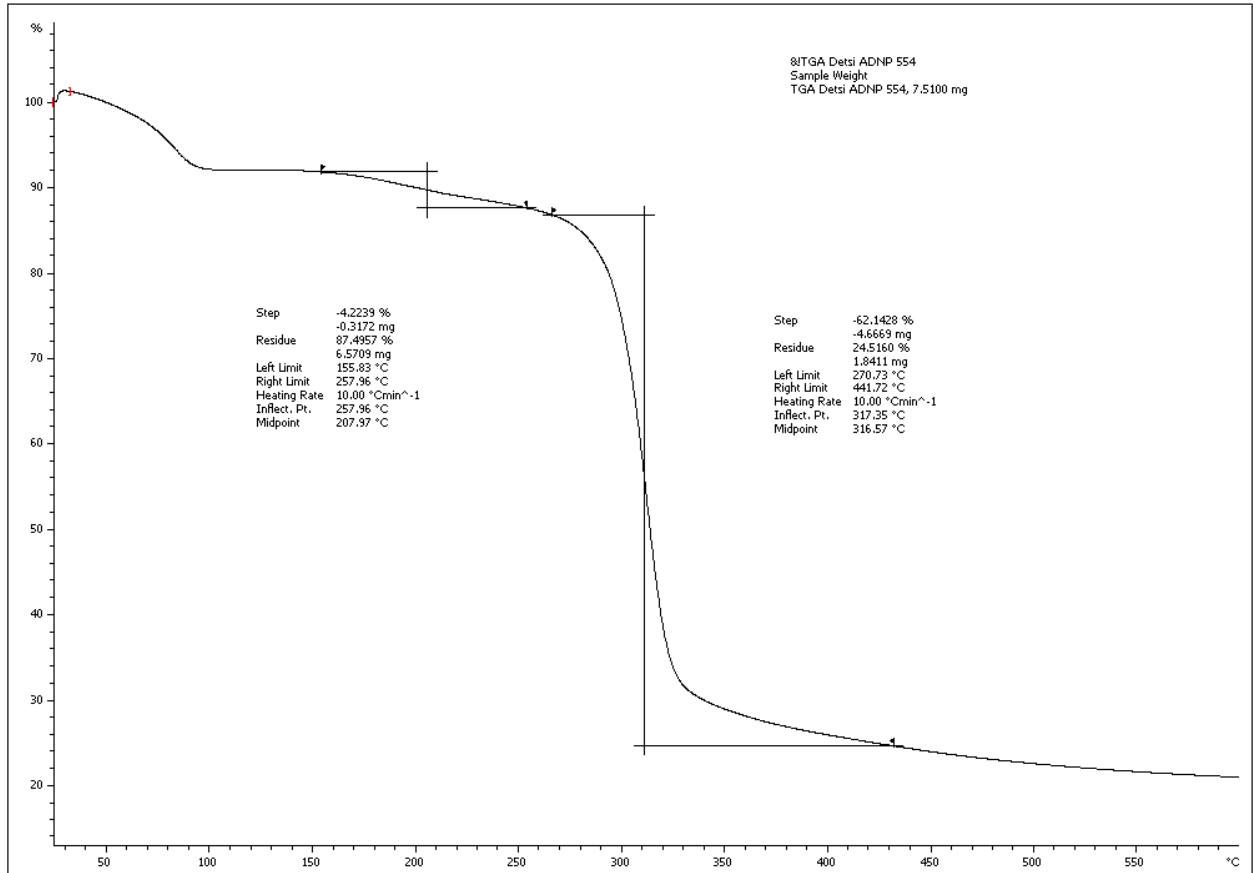
Στην εικόνα 29 παρουσιάζεται το γράφημα TGA του δείγματος εγκλεισμού **KTZ6**. Στην αρχή παρατηρείται μια μικρή απώλεια μάζας κοντά στους 100 °C, η οποία συμβαίνει λόγω απώλειας υγρασίας-νερού της β-κυκλοδεξτρίνης και είναι μικρότερη από την αντίστοιχη που απεικονίζεται στο γράφημα της καθαρής β-κυκλοδεξτρίνης, πιθανότατα επειδή μέρος του νερού που υπήρχε στην κοιλότητα, έχει αντικατασταθεί από το εκχύλισμα που έχει εγκλειστεί. Ακόμη, εμφανίζεται και δεύτερη, μεγαλύτερη απώλεια μάζας, από τους 141,9 °C έως τους 479,1 °C, με μέγιστο ρυθμό απώλειας στους 312,4 °C. Σύμφωνα με το γράφημα TGA της καθαρής β-κυκλοδεξτρίνης (Εικόνα 25), η θερμοκρασία αυτή είναι κοντά στη θερμοκρασία αποικοδόμησης της β-κυκλοδεξτρίνης, $T_d = 323,8$ °C. Ωστόσο, στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών παρουσιάζει μεταβολές μάζας και το εκχύλισμα φλούδας ροδιού αλλά και πέρα από τους 479,1 °C (Εικόνα 27). Κατά συνέπεια, μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι το εκχύλισμα φλούδας ροδιού προστατεύεται εν μέρει μέσω του σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού με τη β-κυκλοδεξτρίνη, με τη μέθοδο συγκαταβύθισης.



Εικόνα 30: Το γράφημα DSC του δείγματος εγκλεισμού **KT29**.

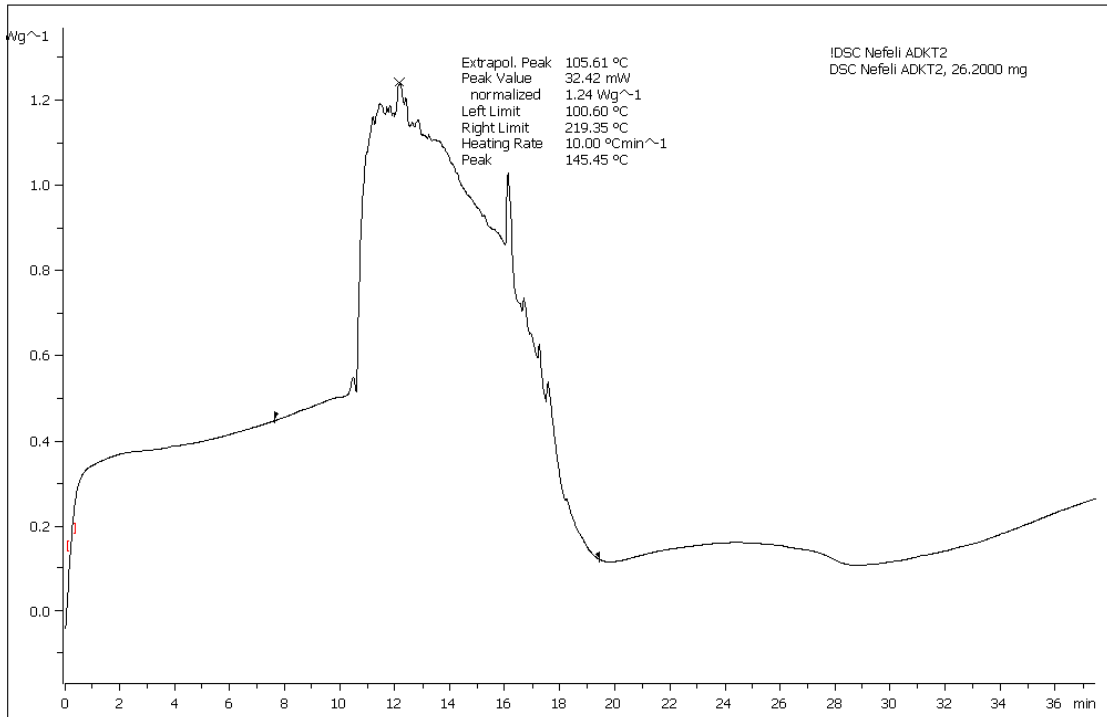
Το γράφημα DSC του δείγματος εγκλεισμού **KT29** (Εικόνα 30) είναι ελαφρώς διαφοροποιημένο από το αντίστοιχο του δείγματος **KT26** ενώ παρουσιάζει κάποια ομοιότητα στις αρχικές θερμοκρασίες με το γράφημα DSC της β-κυκλοδεξτρίνης. Έτσι, παρατηρείται μια έντονα ενδόθερμη κορυφή στους 93,3 °C, περίπου, και σχετίζεται με μεταβολή μάζας λόγω απώλειας υγρασίας, όπως φαίνεται και στο γράφημα της Εικόνας 31. Παρατηρείται, επίσης, και δεύτερη ενδόθερμη κορυφή στους 307 °C, η θερμοκρασία της οποίας πλησιάζει τη θερμοκρασία αποικοδόμησης της β-κυκλοδεξτρίνης. Σε κοντινή θερμοκρασία, στο γράφημα TGA του δείγματος **KT29** (Εικόνα 31), συμβαίνει ο μέγιστος ρυθμός απώλειας μάζας. Άρα, μπορεί να θεωρηθεί ότι η θερμοκρασία 307 °C είναι η θερμοκρασία αποδόμησης του σχηματιζόμενου συμπλόκου.

Η μορφή και των δύο γραφημάτων DSC των δειγμάτων εγκλεισμού **KT26** και **KT29** μπορεί να οφείλεται στις αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη δημιουργία του συστήματος των συμπλόκων λόγω αλληλεπίδρασης της β-κυκλοδεξτρίνης και των μορίων εκχυλίσματος. Κατά συνέπεια, δύναται να επιβεβαιωθεί με κάποιο τρόπο η ύπαρξη συμπλόκων εγκλεισμού.



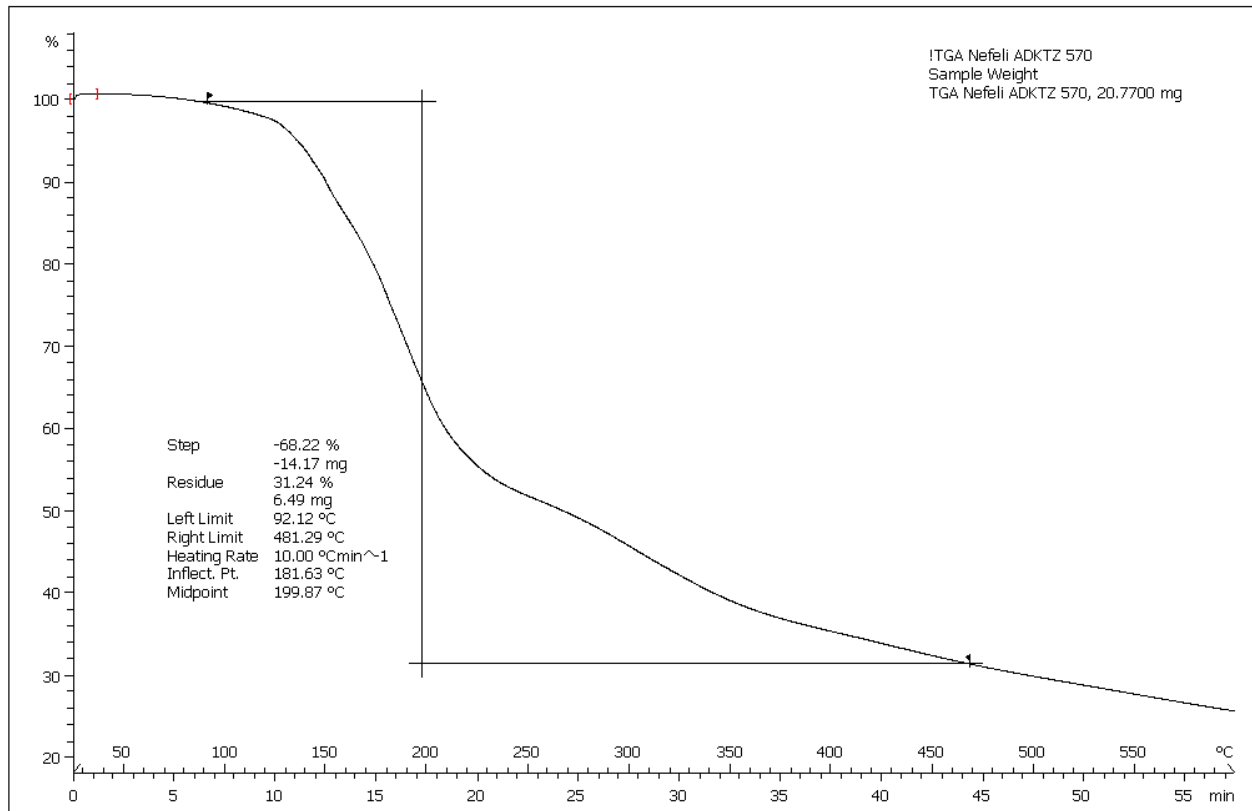
Εικόνα 31: Το γράφημα TGA του δείγματος εγκλεισμού **KTZ9**.

Από το γράφημα TGA του δείγματος **KTZ9** της εικόνας 31 παρατηρούνται τρεις μεταβολές μάζας. Η πρώτη λαμβάνει χώρα κοντά στους 100 °C και οφείλεται στην απώλεια υγρασίας-νερού του δείγματος. Η δεύτερη απώλεια μάζας συμβαίνει μεταξύ των 155,8 °C και 258,0 °C, με μέγιστο ρυθμό απώλειας στους 208,0 °C, προσομοιάζοντας την αντίστοιχη απώλεια που παρατηρείται στο εκχύλισμα φλούδας ροδιού. Η τρίτη απώλεια μάζας εντοπίζεται στο θερμοκρασιακό εύρος 270,7-441,7 °C, με μέγιστο ρυθμό απώλειας στους 316,6 °C, θερμοκρασία κοντά στη θερμοκρασία αποικοδόμησης της β-κυκλοδεξτρίνης (Εικόνα 25). Βέβαια, στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών παρουσιάζει μεταβολές μάζας και το εκχύλισμα φλούδας ροδιού αλλά και πέρα από τους 441,7 °C (Εικόνα 27). Σαν αποτέλεσμα, μπορεί να υποθεθεί ότι το εκχύλισμα φλούδας ροδιού προστατεύεται σε μικρό βαθμό μέσω του σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού με τη β-κυκλοδεξτρίνη, με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης.



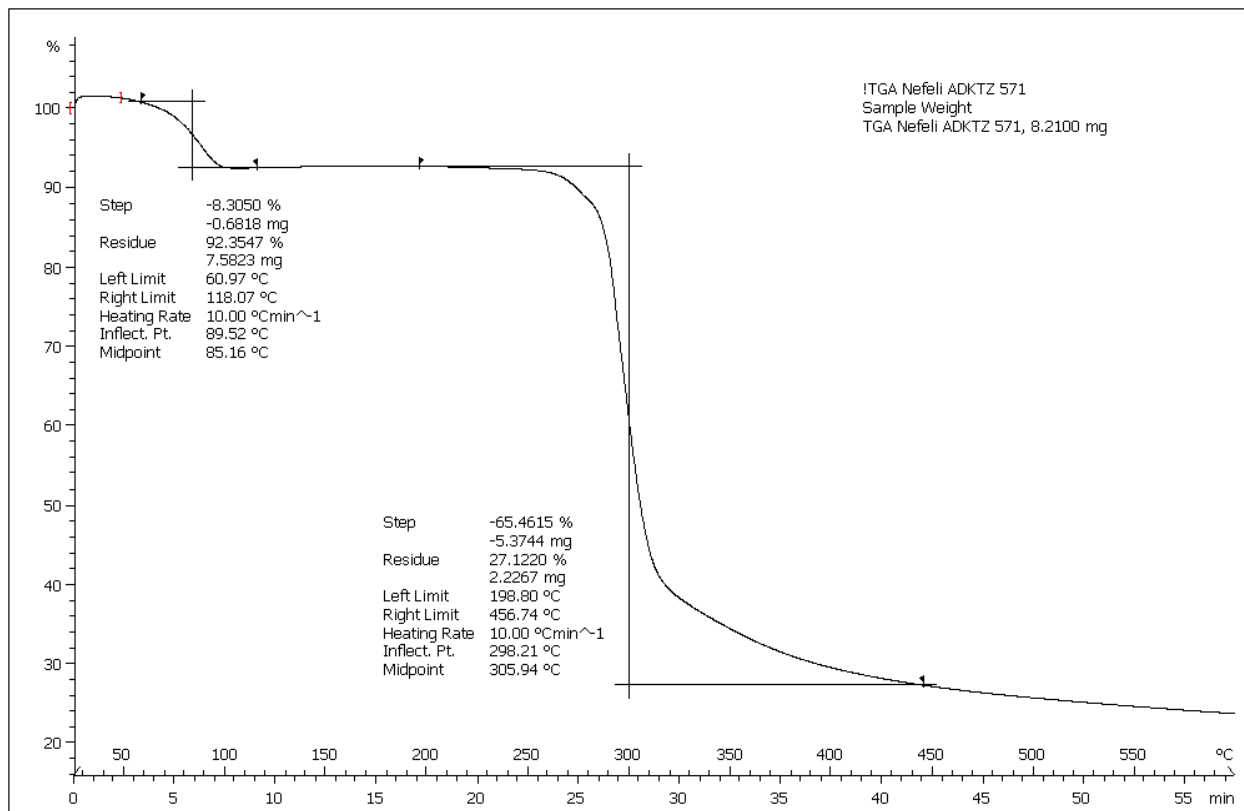
Εικόνα 32: Το γράφημα DSC του χυμού ροδιού.

Στην εικόνα 32 απεικονίζεται το γράφημα DSC του χυμού ροδιού. Έχει μια ευρεία ενδόθερμη κορυφή στους 145,5 °C που μπορεί να αποδοθεί στο σημείο τήξης του χυμού ροδιού. Η κορυφή ξεκινάει από τους 100 °C περίπου, όπου ξεκινάει και η πρώτη απώλεια μάζας στο γράφημα TGA, η οποία μπορεί να αποδοθεί σε απώλεια υγρασίας-νερού. Η κορυφή αυτή καλύπτει ένα εύρος περίπου από τους 100 °C μέχρι τους 220 °C.



Εικόνα 33: Το γράφημα TGA του χυμού ροδιού.

Στην εικόνα 33 παρουσιάζεται το γράφημα TGA του χυμού ροδιού. Παρατηρείται απώλεια μάζας, η οποία ξεκινάει κοντά στην περιοχή των 100 °C, και αντιστοιχεί σε απώλεια νερού, ενώ η απώλεια αυτή συνεχίζεται μέχρι, περίπου, και τους 250 °C, με απότομη κλίση. Η απώλεια μάζας συνεχίζεται, αλλά με πιο αργό ρυθμό, φτάνοντας σε 14,2% υπόλειμμα κοντά στη θερμοκρασία των 480 °C. Τελικά, η συνολική απώλεια μάζας που παρατηρείται ανέρχεται σε ποσοστό ίσο με 68,2% επί της αρχικής μάζας.

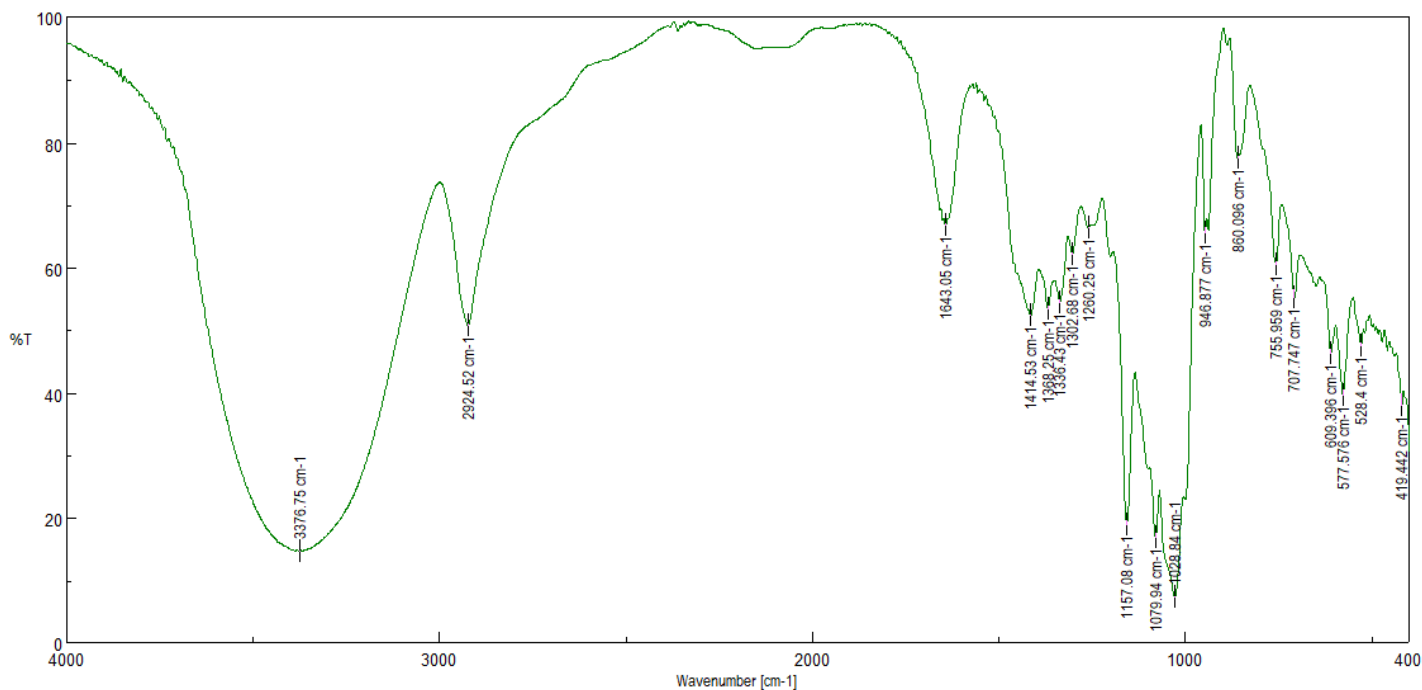


Εικόνα 34: Το γράφημα TGA του δείγματος εγκλεισμού **KTZ13**.

Στο γράφημα TGA του δείγματος **KTZ13** (Εικόνα 34), παρατηρούνται δύο μεταβολές μάζας. Η πρώτη σχετίζεται με την απώλεια νερού κοντά στους 100 °C, η οποία είναι ελαφρώς μικρότερη από την αντίστοιχη που απεικονίζεται στο γράφημα της καθαρής β-κυκλοδεξτρίνης, ενδεχομένως επειδή μέρος του νερού που υπήρχε στην κοιλότητα, έχει αντικατασταθεί από τον χυμό που έχει εγκλειστεί. Η δεύτερη απώλεια μάζας πραγματοποιείται κοντά στους 300 °C. Κοντά στη θερμοκρασία αυτή, και σύμφωνα με το γράφημα TGA της β-κυκλοδεξτρίνης, λαμβάνει χώρα η αποικοδόμηση της β-κυκλοδεξτρίνης. Ωστόσο, παρατηρώντας την εικόνα 33, στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών, 200-450 °C, παρουσιάζει μεταβολές μάζας και ο χυμός ροδιού που συνεχίζονται και μετά τους 450 °C. Το γράφημα TGA του δείγματος **KTZ13** παρουσιάζει ομοιότητες με τα γραφήματα των δειγμάτων εγκλεισμών **KTZ6** και **KTZ9**.

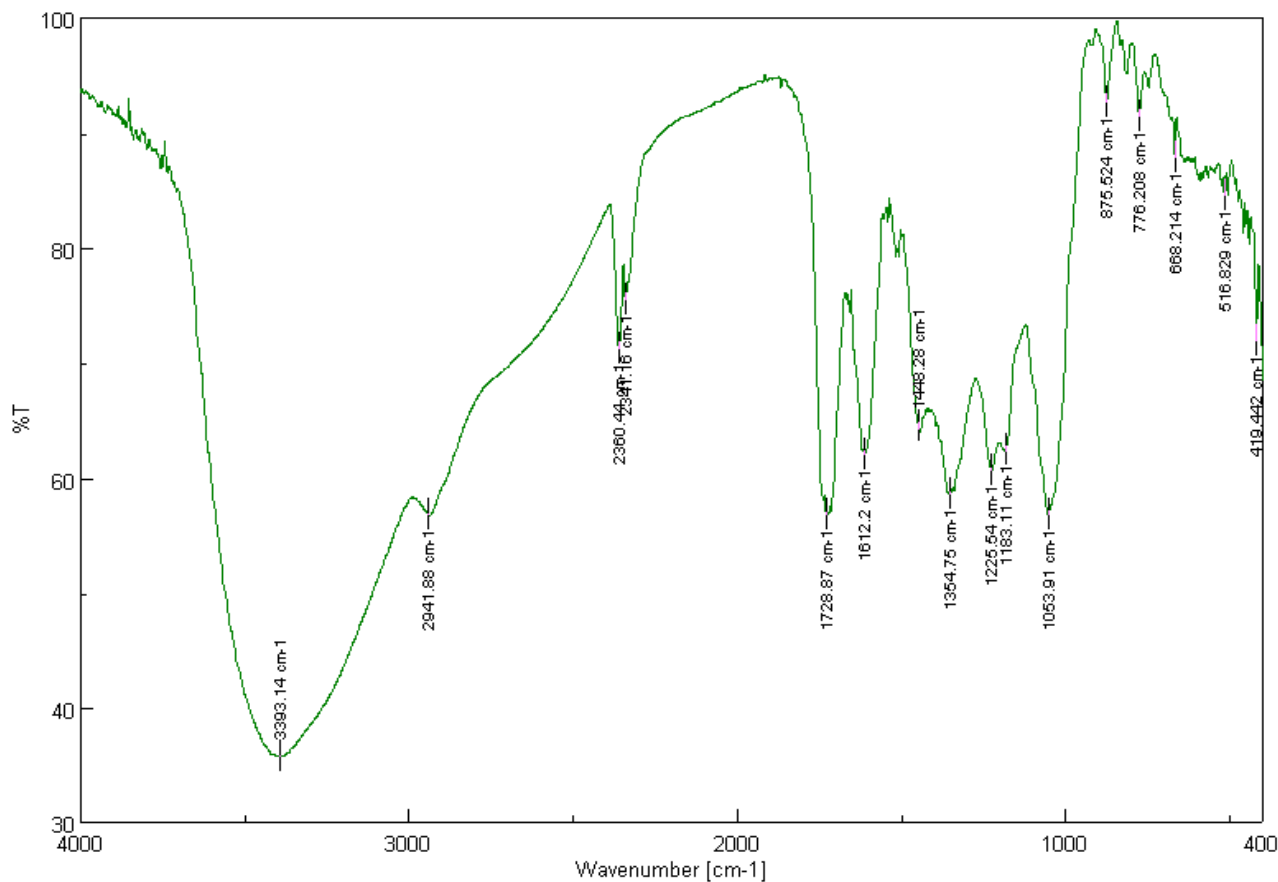
8.5. Ανάλυση μέσω Υπέρυθρης Φασματομετρίας Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Μετρήσεις των δειγμάτων υπό μορφή δισκίων με KBr για τη λήψη φασμάτων FT-IR πραγματοποιήθηκαν για όλους τους εγκλεισμούς καθώς και για τη β-κυκλοδεξτρίνη, το εκχύλισμα φλούδας ροδιού και τον χυμό ροδιού. Τα φάσματα λήφθηκαν με τη χρήση του οργάνου FT-IR-4200. Επιλέγεται ο σχολιασμός και η ανάλυση των δειγμάτων εγκλεισμών, **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**, καθώς και της β-κυκλοδεξτρίνης, του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και του χυμού ροδιού. Υπενθυμίζεται ότι τα δείγματα **KTZ6** και **KTZ9** παράχθηκαν με εκχύλισμα φλούδας ροδιού και το **KTZ13** με χυμό ροδιού. Τα υπόλοιπα φάσματα παρατίθενται στο παράρτημα.



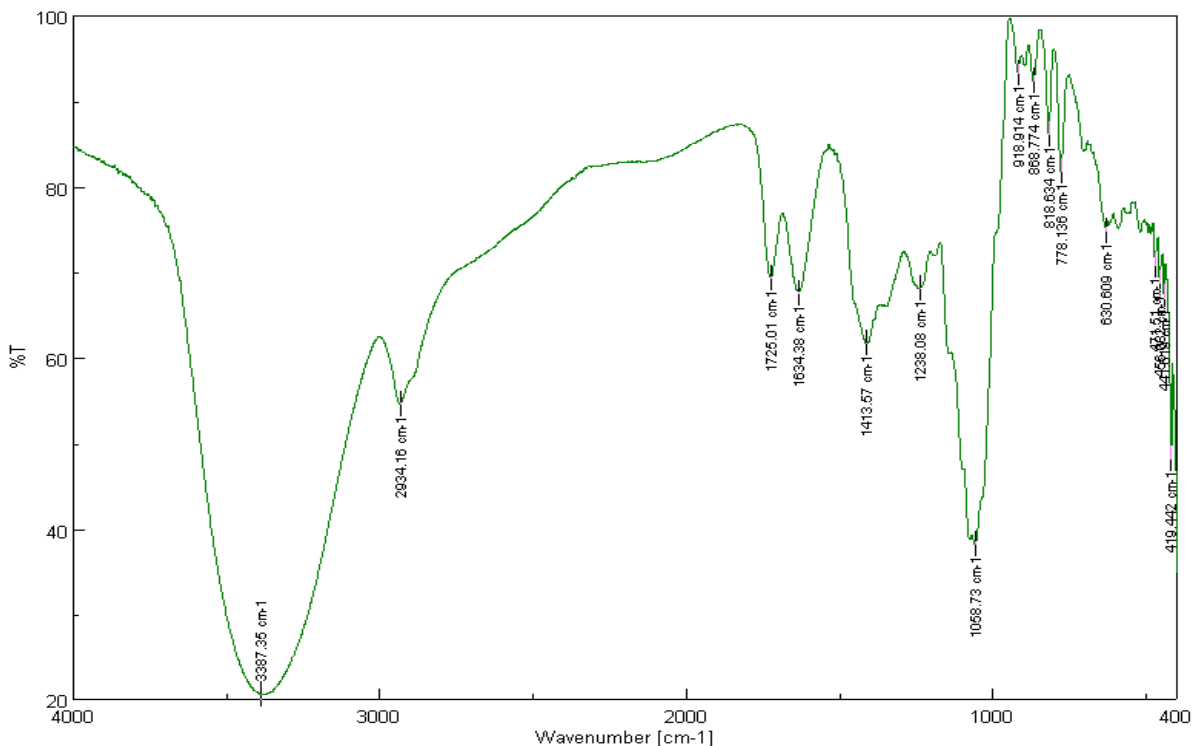
Εικόνα 35 Φάσμα FT-IR (KBr) της β-κυκλοδεξτρίνης.

Σύμφωνα με την εικόνα 35 παρατηρούνται οι ακόλουθες χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα FT-IR της β-κυκλοδεξτρίνης. Καταρχάς, η πιο χαρακτηριστική κορυφή είναι στα $3376,75 \text{ cm}^{-1}$ και αποδίδεται στη συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση τάσης των ομάδων -OH. Η επόμενη βρίσκεται στα $2924,52 \text{ cm}^{-1}$ λόγω δόνησης τάσης του δεσμού C-H και στα $1643,05 \text{ cm}^{-1}$ εμφανίζεται κορυφή η οποία αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης του δεσμού C-H των ομάδων $-\text{CH}_2-$. Επόμενη χαρακτηριστική κορυφή παρατηρείται στα $1414,53 \text{ cm}^{-1}$ λόγω δόνησης κάμψης του δεσμού O-H κι έπειτα στα $1157,08 \text{ cm}^{-1}$ που αποδίδεται στη δόνηση τάσης των C-C. Τέλος, εμφανίζεται κορυφή στα $1028,84 \text{ cm}^{-1}$ λόγω δόνησης κάμψης του δεσμού C-O των δευτεροταγών αλκοολών, οι οποίες υπάρχουν στο μόριο της β-κυκλοδεξτρίνης.



Εικόνα 36: Φάσμα FT-IR (KBr) του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού.

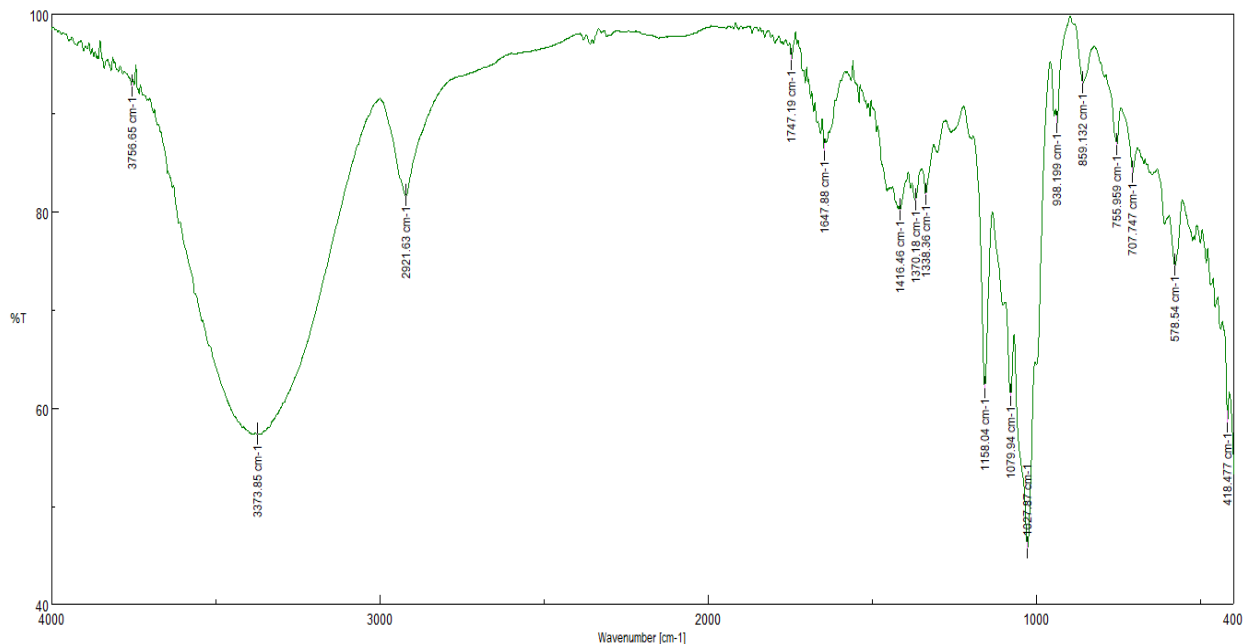
Με βάση την εικόνα 36, το φάσμα του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού έχει χαρακτηριστική κορυφή στα $3393,14 \text{ cm}^{-1}$ και αποδίδεται στη συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση τάσης των ομάδων -OH της ένωσης *runicalagin*, της κύριας ένωσης του εκχυλίσματος αυτού. Η επόμενη κορυφή βρίσκεται στα $2941,88 \text{ cm}^{-1}$, η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-H . Επίσης, στα $1728,87 \text{ cm}^{-1}$ εμφανίζεται κορυφή λόγω δόνησης τάσης του δεσμού C=O και μετά στα $1612,2 \text{ cm}^{-1}$ που αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-H . Οι δύο κορυφές στα $1448,28 \text{ cm}^{-1}$ και στα $1354,75 \text{ cm}^{-1}$ αποδίδονται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-C των αρωματικών δακτυλίων που υπάρχουν στο μόριο της ένωσης *runicalagin*. Στα $1225,54 \text{ cm}^{-1}$ η κορυφή οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-O , ενώ στα $1053,91 \text{ cm}^{-1}$ στη δόνηση κάμψης του δεσμού C-H .



Εικόνα 37: Φάσμα FT-IR (KBr) του χυμού ροδιού.

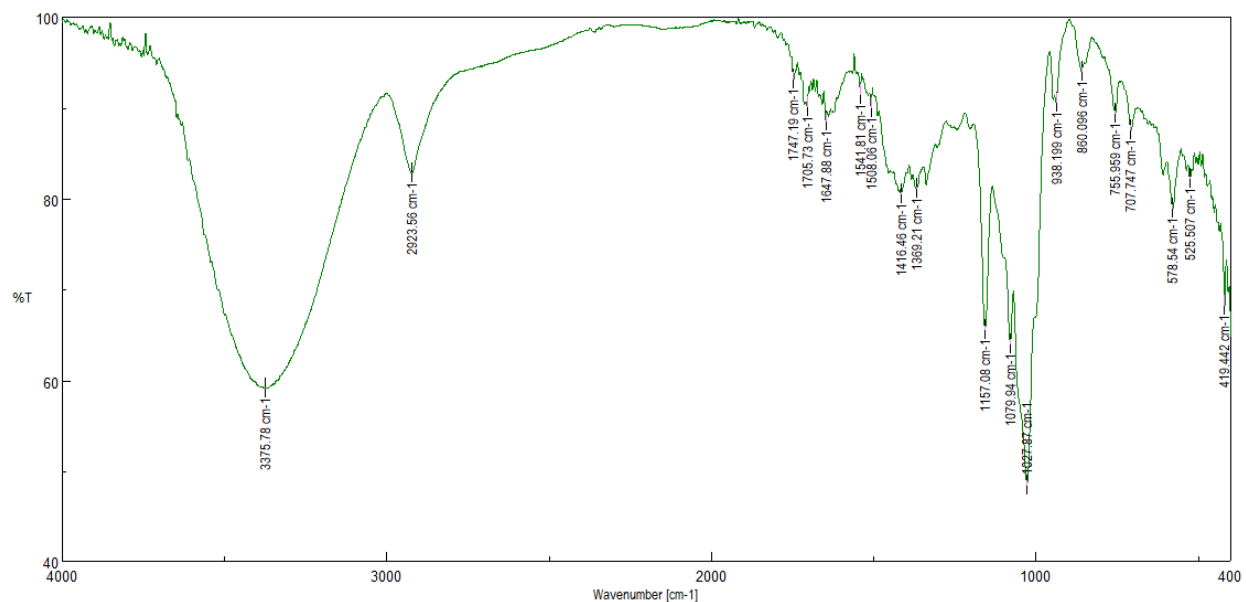
Σύμφωνα με την εικόνα 37 παρατηρούνται οι επόμενες χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα FT-IR του χυμού ροδιού. Αρχικά, η πιο χαρακτηριστική κορυφή είναι στα $3387,35 \text{ cm}^{-1}$ και αποδίδεται στη συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση τάσης των ομάδων -OH. Ακολουθεί κορυφή στα $2934,16 \text{ cm}^{-1}$, η οποία οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-H κι έπειτα στα $1725,01 \text{ cm}^{-1}$ εμφανίζεται κορυφή λόγω δόνησης τάσης του δεσμού C=O. Η επόμενη χαρακτηριστική κορυφή παρατηρείται στα $1634,38 \text{ cm}^{-1}$, η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-H. Έπειτα, η κορυφή στα $1413,57 \text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-C των αρωματικών δακτυλίων που υπάρχουν τόσο στο μόριο της λουτεολίνης όσο και του ελλαγικού οξέος, τα οποία θεωρούνται κύρια συστατικά του χυμού ροδιού. Στα $1238,08 \text{ cm}^{-1}$ παρατηρείται χαρακτηριστική κορυφή λόγω δόνησης τάσης του δεσμού C-O, ενώ στα $1058,73 \text{ cm}^{-1}$ λόγω δόνησης κάμψης του δεσμού C-H.

Στα φάσματα των δειγμάτων εγκλεισμού που ακολουθούν, παρατηρούνται κυρίως κορυφές από τη β-κυκλοδεξτρίνη και όχι τόσο από το εκχύλισμα φλούδας ροδιού ή τον χυμό ροδιού, ανάλογα με την εξεταζόμενη περίπτωση.



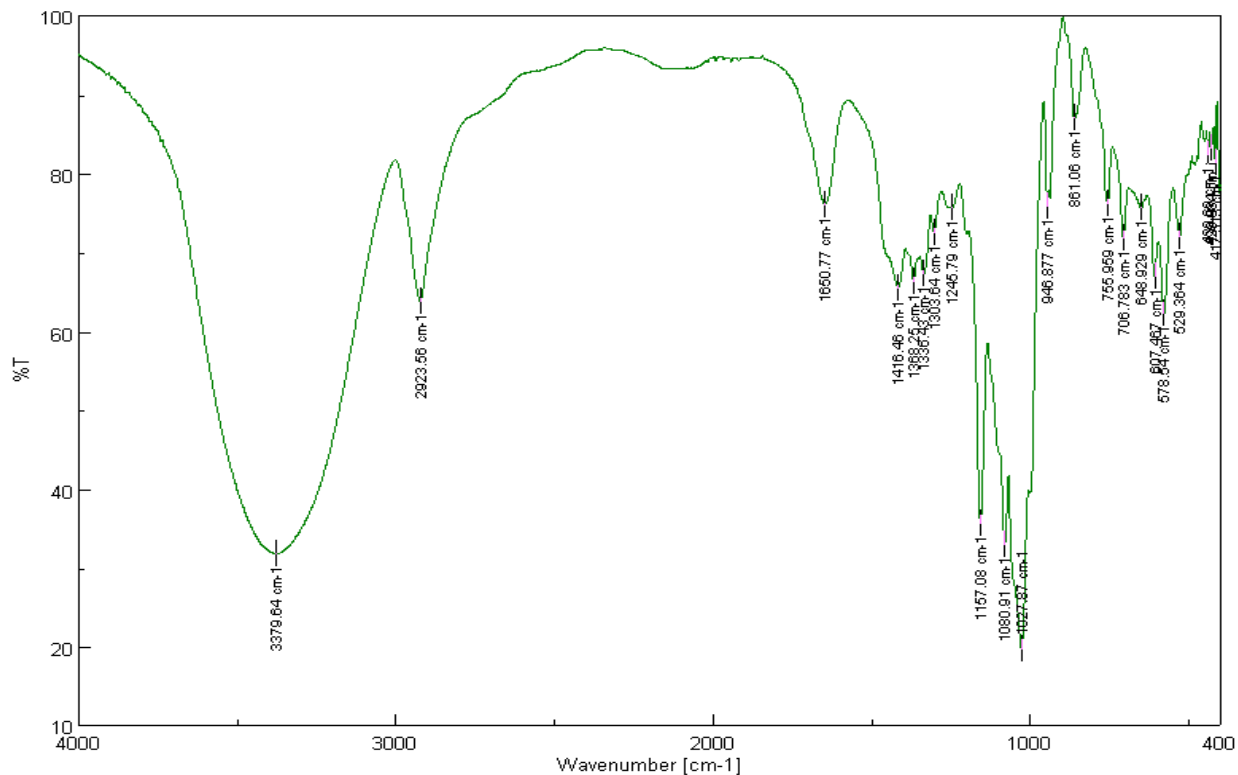
Εικόνα 38: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ6**.

Πιο αναλυτικά, το φάσμα του δείγματος **KTZ6** (Εικόνα 38), εμφανίζει μετατοπισμένες τις κορυφές $3376,75\text{ cm}^{-1}$, $2924,52\text{ cm}^{-1}$, $1643,05\text{ cm}^{-1}$, $1414,53\text{ cm}^{-1}$, $1157,08\text{ cm}^{-1}$ και $1028,84\text{ cm}^{-1}$ της β-κυκλοδεξτρίνης στα $3373,85\text{ cm}^{-1}$, $2921,63\text{ cm}^{-1}$, $1647,88\text{ cm}^{-1}$, $1416,46\text{ cm}^{-1}$, $1158,04\text{ cm}^{-1}$ και $1027,87\text{ cm}^{-1}$. Επίσης, εμφανίζονται μετατοπισμένες οι κορυφές $1728,87\text{ cm}^{-1}$ και $1354,75\text{ cm}^{-1}$ του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού στα $1747,19\text{ cm}^{-1}$ και $1370,18\text{ cm}^{-1}$, αντίστοιχα. Η εμφάνιση έστω και ελάχιστων κορυφών είναι αναμενόμενη σε αυτό το δείγμα εγκλεισμού διότι σημαντικό ποσοστό του εκχυλίσματος δεν έχει εγκλειστεί στην εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης και παραμένει στην επιφάνειά της.



Εικόνα 39: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ9**.

Αναφορικά με το φάσμα του δείγματος εγκλεισμού **KTZ9** (Εικόνα 39), οι κορυφές $3376,75\text{ cm}^{-1}$, $2924,52\text{ cm}^{-1}$, $1643,05\text{ cm}^{-1}$, $1414,53\text{ cm}^{-1}$, και $1028,84\text{ cm}^{-1}$ της β-κυκλοδεξτρίνης εμφανίζονται μετατοπισμένες στα $3375,78\text{ cm}^{-1}$, $2923,56\text{ cm}^{-1}$, $1647,88\text{ cm}^{-1}$, $1416,46\text{ cm}^{-1}$, και $1027,87\text{ cm}^{-1}$, αντίστοιχα, ενώ η κορυφή στα $1157,08\text{ cm}^{-1}$ δε μετατοπίζεται καθόλου. Επίσης, εμφανίζονται μετατοπισμένες οι κορυφές $1728,87\text{ cm}^{-1}$ και $1354,75\text{ cm}^{-1}$ του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού στα $1747,19\text{ cm}^{-1}$ και $1369,21\text{ cm}^{-1}$, αντίστοιχα. Γενικά, σε δείγματα εγκλεισμών με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης αναμένεται η εμφάνιση έστω και λίγων κορυφών, αφού μέρος του εκχυλίσματος δεν έχει εγκλειστεί και παραμένει στην επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης.



Εικόνα 40: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ13**.

Όσον αφορά στο φάσμα του δείγματος εγκλεισμού **KTZ13** (Εικόνα 40), εμφανίζει μετατοπισμένες τις κορυφές $3376,75\text{ cm}^{-1}$, $2924,52\text{ cm}^{-1}$, $1643,05\text{ cm}^{-1}$, $1414,53\text{ cm}^{-1}$, και $1028,84\text{ cm}^{-1}$ της β-κυκλοδεξτρίνης στα $3379,64\text{ cm}^{-1}$, $2923,56\text{ cm}^{-1}$, $1650,77\text{ cm}^{-1}$, $1416,46\text{ cm}^{-1}$, και $1027,87\text{ cm}^{-1}$, αντίστοιχα, ενώ η κορυφή στα $1157,08\text{ cm}^{-1}$ δε μετατοπίζεται καθόλου. Σε αυτήν την περίπτωση, με τη μέθοδο συγκαταβύθισης, δεν παρατηρείται κορυφή του χυμού ροδιού. Αυτό συμβαίνει γιατί η ποσότητα χυμού που δε συνδέεται, είτε επιφανειακά είτε στο εσωτερικό της κοιλότητας της β-κυκλοδεξτρίνης, απομακρύνεται κατά τη διάρκεια της διήθησης υπό κενό.

Γενικά, οι μετατοπισμένες κορυφές οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίου-φορέα, εδώ β-κυκλοδεξτρίνης, και φιλοξενουμένου μορίου, υποδηλώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού. Παράλληλα, η μη εύρεση χαρακτηριστικών κορυφών εκχυλίσματος/χυμού στα φάσματα των δειγμάτων εγκλεισμού, αποτελεί ένδειξη που μπορεί να επιβεβαιώσει τον εγκλεισμό τους στη β-κυκλοδεξτρίνη. Στον πίνακα 18 παρουσιάζονται οι μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών

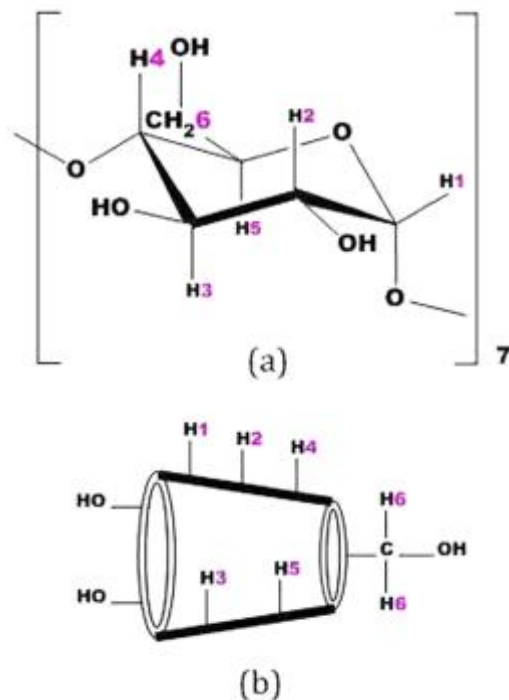
της β-κυκλοδεξτρίνης στα τρία δείγματα συμπλόκων εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13** που αναλύθηκαν παραπάνω.

Πίνακας 18: Μετατοπίσεις χαρακτηριστικών κορυφών της β-κυκλοδεξτρίνης στα φάσματα FT-IR των δειγμάτων εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**.

Χαρακτηριστική Ομάδα	β-CD (cm ⁻¹)	KTZ6 (cm ⁻¹)	KTZ9 (cm ⁻¹)	KTZ13 (cm ⁻¹)
-OH	3376,75	3373,85	3375,78	3379,64
C-H	2924,52	2921,63	2923,56	2923,56
-CH ₂	1643,05	1647,88	1647,88	1650,77
O-H	1414,53	1416,46	1416,46	1416,46
C-C	1157,08	1158,04	1157,08	1157,08
C-O	1028,84	1027,87	1027,87	1027,87

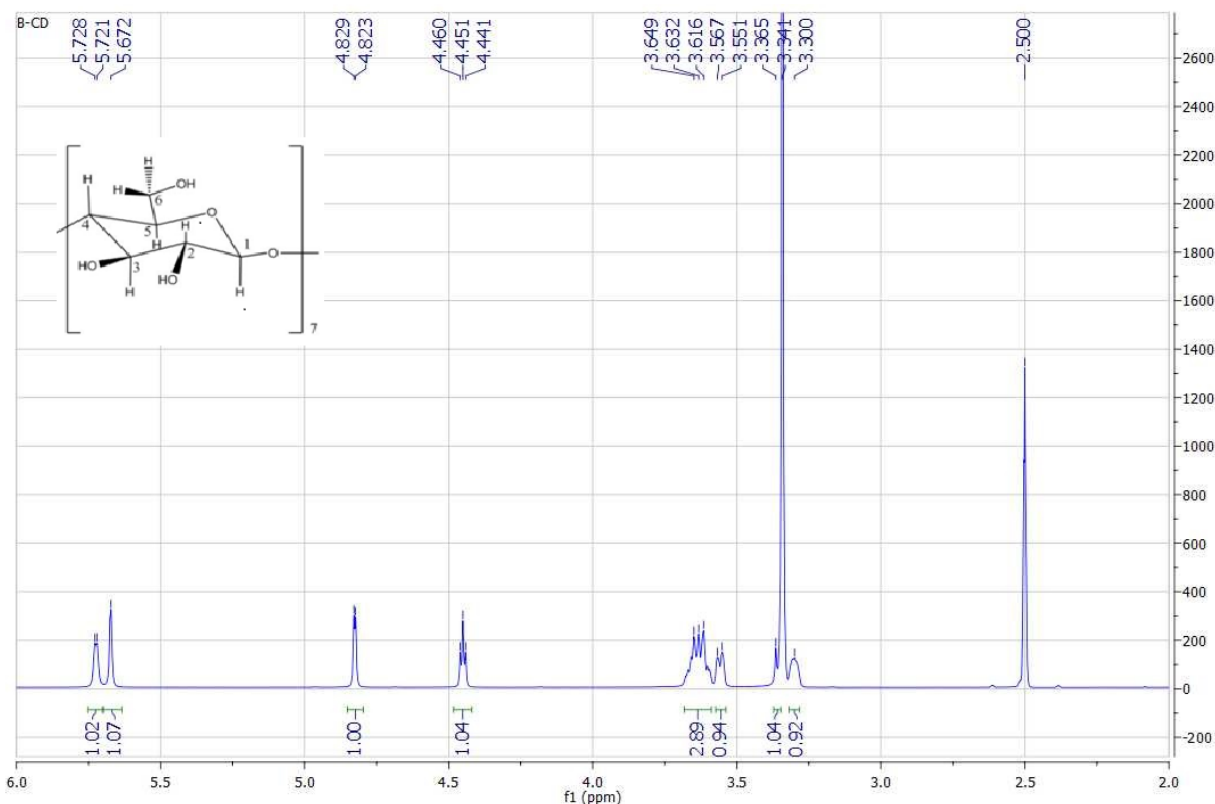
8.6. Ανάλυση μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Πραγματοποιείται συγκριτική μελέτη των φασμάτων ¹H NMR της β-κυκλοδεξτρίνης και επιλεγμένων δειγμάτων των συμπλόκων. Για το σκοπό αυτό, υπολογίζεται η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων των κορυφών των πρωτονίων της β-κυκλοδεξτρίνης μεταξύ των φασμάτων ¹H NMR της καθαρής β-κυκλοδεξτρίνης και των συμπλόκων εγκλεισμού. Η αξιολόγηση των μετατοπίσεων αυτών συμβάλλει στην κατανόηση των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων του εκχυλίσματος/χυμού και της β-κυκλοδεξτρίνης και κατ' επέκταση στην επιβεβαίωση του εγκλεισμού. Ο σχολιασμός που θα ακολουθήσει, γίνεται βάσει της αρίθμησης των πρωτονίων της β-κυκλοδεξτρίνης που παρουσιάζεται στην Εικόνα 41.



Εικόνα 41: (a) Στερεοχημική διαμόρφωση της β-κυκλοδεξτρίνης, (b) κωνική δομή της β-κυκλοδεξτρίνης με αριθμημένα εσωτερικά και εξωτερικά πρωτόνια. [63]

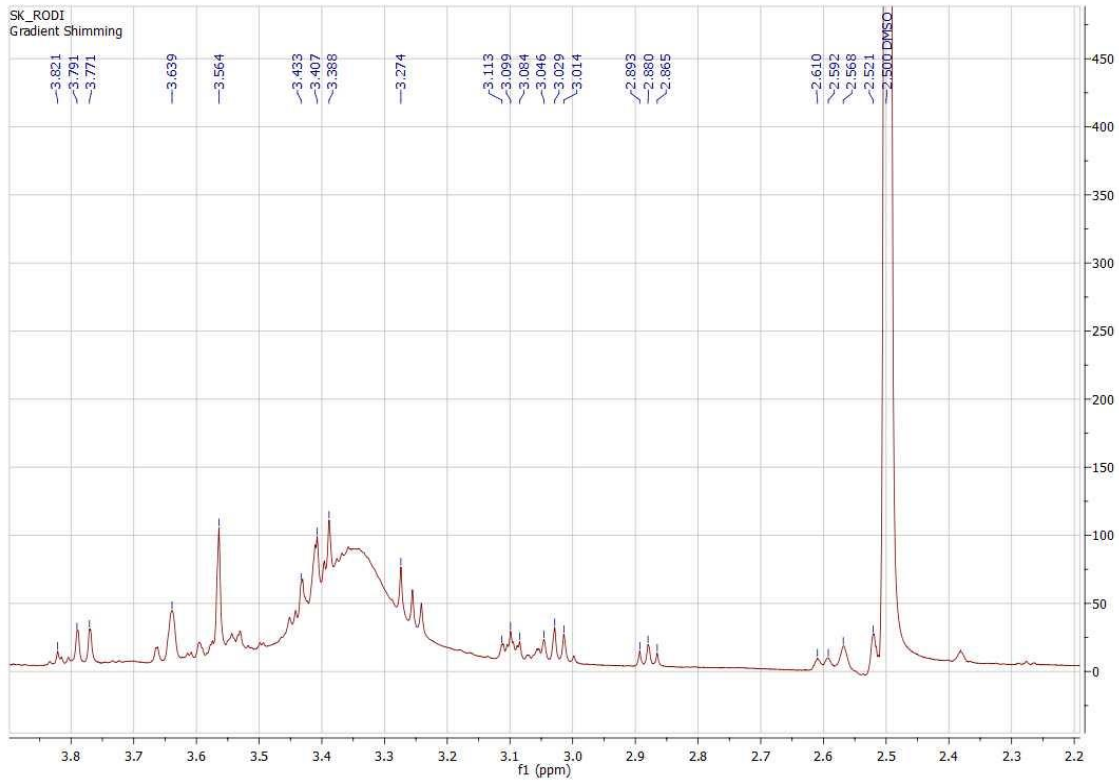
Σε καθένα από τα παρακάτω φάσματα (Εικόνες 42-47), στα 2.50 ppm εμφανίζεται η κορυφή του διαλύτη διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO-d₆).



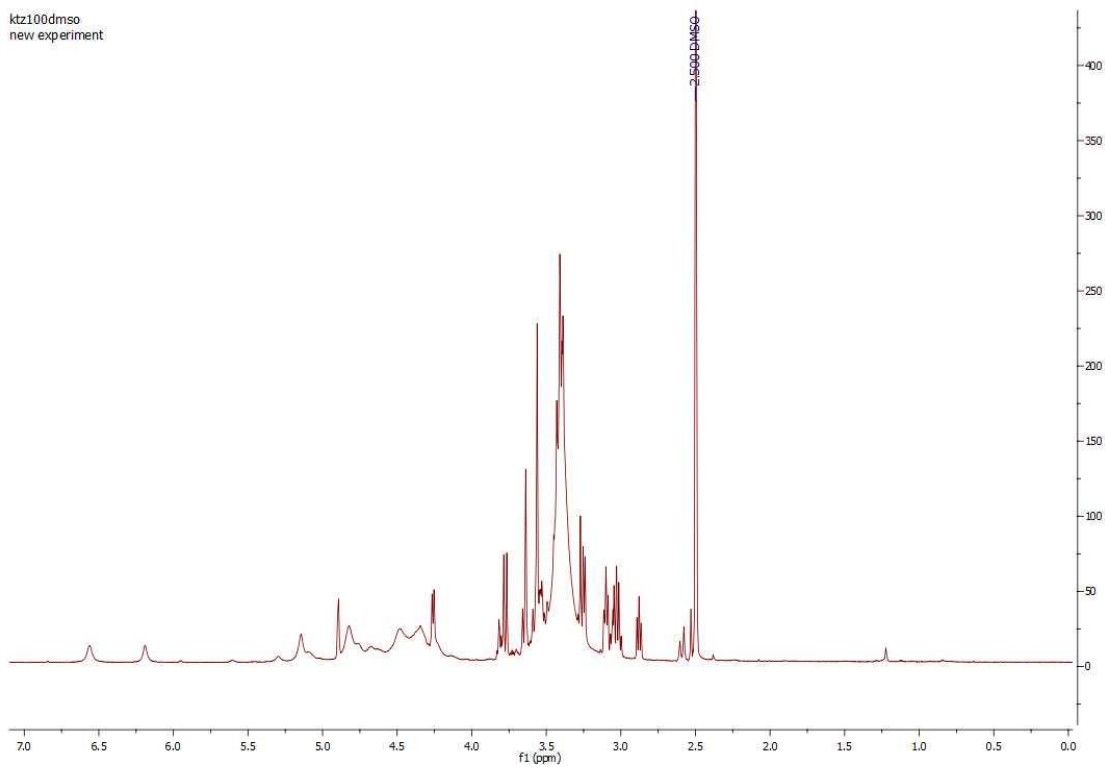
Εικόνα 42: Φάσμα ¹H NMR (DMSO-d₆, 600MHz) και χημική δομή (πάνω αριστερά) της β-κυκλοδεξτρίνης.

Το φάσμα ¹H NMR της β-κυκλοδεξτρίνης δίνεται στην εικόνα 42. Παρατηρείται μία διπλή κορυφή στα 5.72 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, και αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 2, (OH-2). Στα 5.67 ppm εμφανίζεται απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αφορά στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 3, (OH-3). Στη συνέχεια, στα 4.83 ppm παρατηρείται διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 1, (H-1). Στα 4.45 ppm εμφανίζεται τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 6, (OH-6). Έπειτα, στα 3.63 ppm παρατηρείται πολλαπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια, και αποδίδεται στα πρωτόνια της θέσης 3 και 6, (H-3 και H-6). Ακολουθεί διπλή κορυφή στα 3.56 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 5 (H-5). Στα 3.35 ppm υπάρχει μία ευρεία κορυφή, που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 2, (H-2). Τέλος, στα 3.30 ppm παρατηρείται ευρεία κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 4 (H-4).

Στις εικόνες 43 και 44 παρουσιάζονται τα φάσματα ¹H NMR του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και του χυμού ροδιού, αντίστοιχα.

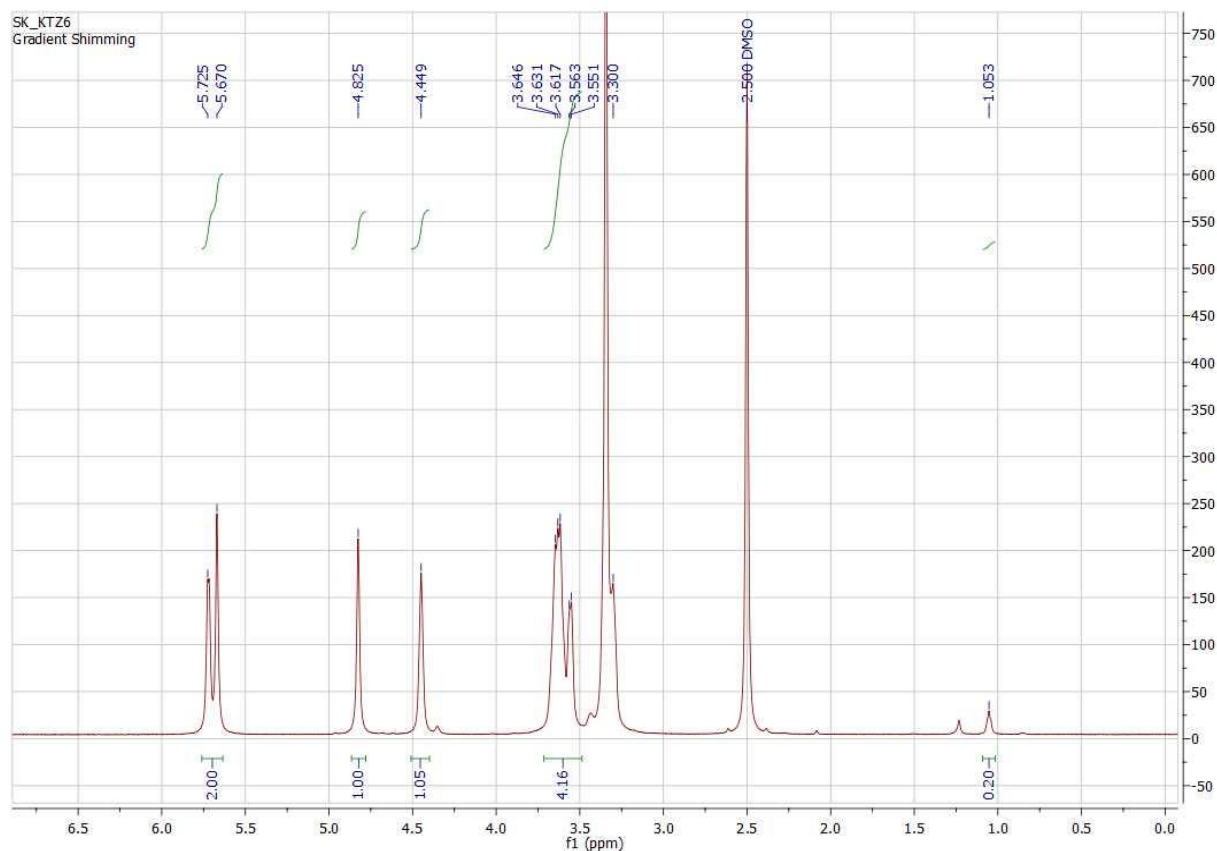


Εικόνα 43: Φάσμα ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600MHz) του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού.



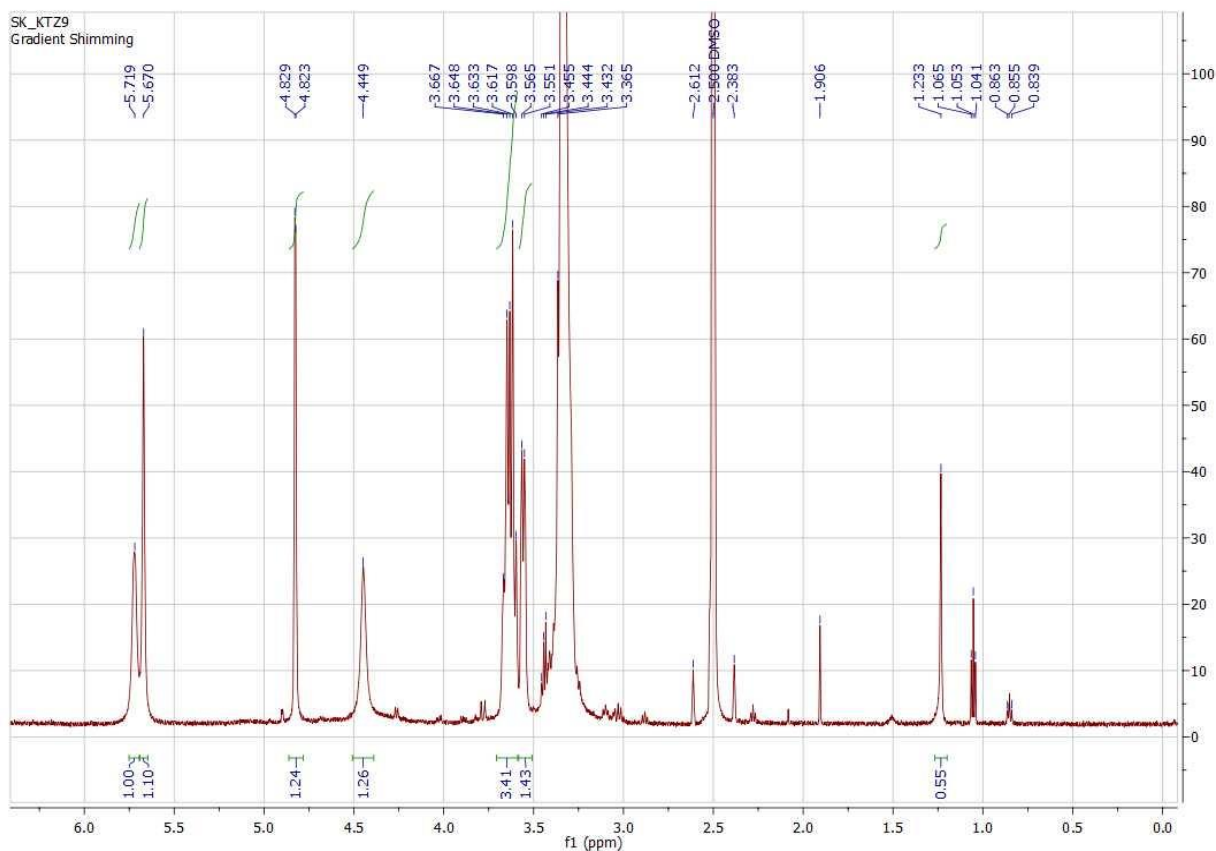
Εικόνα 44: Φάσμα ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600MHz) του χυμού ροδιού.

Στις εικόνες 45-47 δίνονται τα φάσματα ^1H NMR των δειγμάτων εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**.



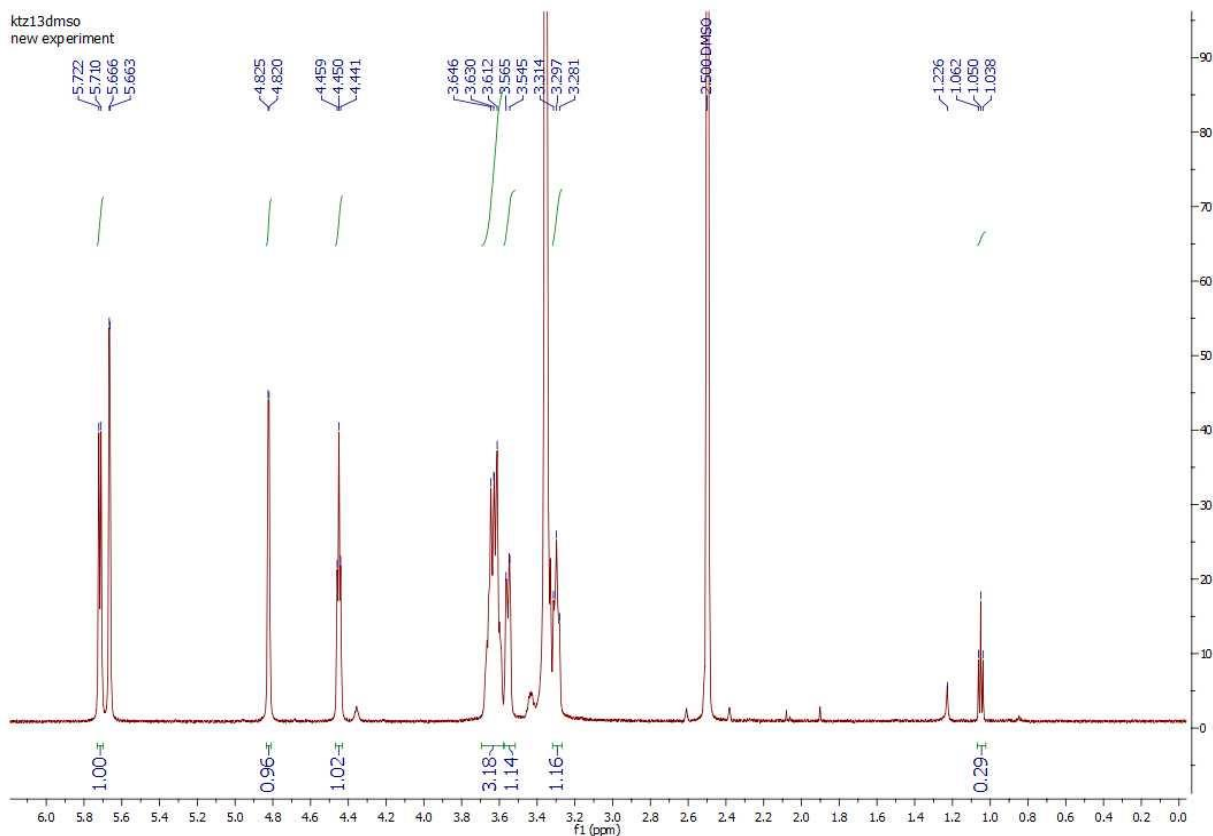
Εικόνα 45: Φάσμα ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600MHz) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ6**.

Στην εικόνα 45 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR του δείγματος εγκλεισμού **KTZ6**. Παρατηρείται μία διπλή κορυφή στα 5.70 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, και αποδίδεται στα πρωτόνια των υδροξυλίων των θέσεων 2 και 3, (OH-2 και OH-3). Στα 4,83 ppm παρατηρείται απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 1, (H-1). Στα 4.45 ppm εμφανίζεται απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 6, (OH-6). Έπειτα, στα 3.62 ppm παρατηρείται πολλαπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για τέσσερα πρωτόνια, και αποδίδεται στα πρωτόνια των θέσεων 3, 6, 5 (H-3, H-6 και H-5).



Εικόνα 46: Φάσμα ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 600MHz) του δείγματος εγκλεισμού **KT29**.

Το φάσμα ^1H NMR του δείγματος εγκλεισμού **KT29** παρατίθεται στην εικόνα 46. Παρατηρείται μία απλή κορυφή στα 5.72 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, και αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 2, (OH-2). Στα 5.67 ppm εμφανίζεται απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αφορά στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 3, (OH-3). Έπειτα, στα 4,83 ppm παρατηρείται διπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 1, (H-1). Στα 4.45 ppm εμφανίζεται απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 6, (OH-6). Στη συνέχεια, στα 3.63 ppm παρατηρείται πολλαπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια, και αποδίδεται στα πρωτόνια της θέσης 3 και 6, (H-3 και H-6). Ακολουθεί διπλή κορυφή στα 3.56 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 5 (H-5).



Εικόνα 47: Φάσμα ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600MHz) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ13**.

Στην εικόνα 47 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR του δείγματος εγκλεισμού **KTZ13**. Παρατηρείται μία διπλή διπλών κορυφή στα 5.67 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, και αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 2, (OH-2). Στη συνέχεια, στα 4,82 ppm παρατηρείται διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 1, (H-1). Στα 4.45 ppm εμφανίζεται τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 6, (OH-6). Έπειτα, στα 3.63 ppm παρατηρείται πολλαπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια, και αποδίδεται στα πρωτόνια της θέσης 3 και 6, (H-3 και H-6). Ακολουθεί διπλή κορυφή στα 3.55 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 5 (H-5). Στα 3.30 ppm παρατηρείται τριπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 4 (H-4).

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται ο πίνακας 19 όπου παρατίθενται οι τιμές χημικών μετατοπίσεων της β -κυκλοδεξτρίνης και οι διαφορές χημικών μετατοπίσεων μεταξύ της β -κυκλοδεξτρίνης σε ελεύθερη μορφή και στα δείγματα εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9**, **KTZ13**, αντίστοιχα.

Πίνακας 19: Χημικές μετατοπίσεις (δ) της β -κυκλοδεξτρίνης και διαφορά χημικών μετατοπίσεων μεταξύ αυτής σε ελεύθερη μορφή και στα δείγματα εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**.

Πρωτόνια	Χημικές Μετατοπίσεις (δ) των H της β -CD (ppm)	Διαφορά χημικών μετατοπίσεων ($\delta_{\beta\text{-CD}}-\delta_{\text{KTZ6}}$)	Διαφορά χημικών μετατοπίσεων ($\delta_{\beta\text{-CD}}-\delta_{\text{KTZ9}}$)	Διαφορά χημικών μετατοπίσεων ($\delta_{\beta\text{-CD}}-\delta_{\text{KTZ13}}$)
H-1	4,826	0,001	0,000	0,003
H-2	3,365	---	---	---
H-3	3,632	0,015	-0,001	0,002
H-4	3,300	---	---	0,003
H-5	3,559	-0,058	0,001	0,014
H-6	3,632	0,015	-0,001	0,002
OH-2	5,725	0,027	0,006	---
OH-3	5,672	-0,026	0,002	0,004
OH-6	4,451	0,002	0,002	0,001

Από τις τιμές που δίνονται στον πίνακα 19, συμπεραίνεται ότι οι μεγαλύτερες διαφορές χημικών μετατοπίσεων υφίστανται μεταξύ β -κυκλοδεξτρίνης σε ελεύθερη και στο δείγμα εγκλεισμού **KTZ6**. Οι υψηλές μεταβολές στα εσωτερικά πρωτόνια των θέσεων 3 και 5 οδηγούν στο συμπέρασμα ύπαρξης εγκλεισμού εκχυλίσματος φλούδας ροδιού στην εσωτερική κοιλότητα της β -κυκλοδεξτρίνης. Οι, επίσης, υψηλές διαφορές μετατοπίσεων στα πρωτόνια των υδροξυλίων των θέσεων 2 και 3 σχετίζονται με δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ κατάλληλα προσανατολισμένων μορίων του εκχυλίσματος και των υδροξυλίων της β -κυκλοδεξτρίνης.

Αναφορικά με το δείγμα εγκλεισμού **KTZ9**, δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές μετατοπίσεων. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο δείγμα αυτό δεν έχει συμβεί εγκλεισμός εσωτερικά της κοιλότητας της β -κυκλοδεξτρίνης, ενώ γίνεται λόγος μόνο για επιφανειακή πρόσδεση στην εξωτερική της επιφάνεια.

Τέλος, σχετικά με το δείγμα εγκλεισμού **KTZ13**, δεν παρατηρούνται, και σε αυτή την περίπτωση, μεγάλες διαφορές μετατοπίσεων μεταξύ της β -κυκλοδεξτρίνης σε ελεύθερη μορφή και στο δείγμα **KTZ13**. Ωστόσο, σημειώνεται υψηλή μεταβολή στο εσωτερικό πρωτόνιο της θέσης 5. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι μπορεί να υπάρχει εγκλεισμός χυμού ροδιού στην εσωτερική κοιλότητα της β -κυκλοδεξτρίνης, κάτι το οποίο προσδιορίστηκε και πειραματικά.

8.7. Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών-Αποτελέσματα της μεθόδου Folin–Ciocalteu

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin–Ciocalteu βασίστηκαν στη μέτρηση της απορρόφησης των παρασκευασθέντων διαλυμάτων στο φασματόμετρο UV-Vis, στα 755 nm, και παρατίθενται στον πίνακα 19. Σε αυτόν τον πίνακα δίνονται τα αποτελέσματα αναφορικά με την απορρόφηση, τη συγκέντρωση φαινολικών, την αναλογία μιλιγραμμάρων ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο δείγματος (**C'**) αλλά και, με αναγωγή, ανά γραμμάριο εκχυλίσματος ή χυμού (**C''**), καθενός από τα: εκχύλισμα φλούδας ροδιού, χυμός ροδιού, δείγματα εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13** αλλά και τυφλό δείγμα που απαιτείται για τους υπολογισμούς. Χρησιμοποιώντας τη σχέση 13 γίνεται η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση, ως εξής:

$$C = 43,589Abs - 1,1804 \quad (13)$$

όπου C είναι η συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$) σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και $Abs (-)$ η τιμή απορρόφησης που λαμβάνεται από το όργανο UV-Vis.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης και προσδιορισμός ολικών φαινολικών του εκχυλίσματος, του χυμού και των δειγμάτων **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**.

Δείγμα	Abs (-)	C ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	C' = mg/g δείγματος	C'' = mg/g εκχυλίσματος ή χυμού
Εκχύλισμα Φλούδας Ροδιού	0,2822	10,1	1000	1000
Χυμός Ροδιού	0,0676	0,7	14,3	14,3
KTZ6	0,0264	-1,1	0	0
KTZ9	0,1870	5,9	296,2	1000
KTZ13	0,0289	0,1	1,6	9,0
Τυφλό	0,0241			

Αρχικά, υπενθυμίζεται ότι τα δείγματα εγκλεισμού **KTZ6** και **KTZ9** σχηματίστηκαν με το εκχύλισμα φλούδας ροδιού και το δείγμα **KTZ13** με τον χυμό ροδιού. Όπως αναλύθηκε και στο θεωρητικό κομμάτι, στη φλούδα του ροδιού υπάρχει αρκετά μεγάλο ποσοστό φαινολικών, πράγμα το οποίο επαληθεύεται και από αυτό το πείραμα. Έτσι, στο 1 g εκχυλίσματος φλούδας ροδιού, περίπου 1000 mg αντιστοιχούν στην ποσότητα ολικών φαινολικών.

Στο δείγμα εγκλεισμού **KTZ6**, της μεθόδου συγκαταβύθισης, δεν κατέστη εφικτή η ανίχνευση ολικών φαινολικών. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι στο συγκεκριμένο δείγμα, η απόδοση εγκλεισμού είναι πολύ χαμηλή. Αυτό σημαίνει ότι από την αρχική ποσότητα εκχυλίσματος φλούδας ροδιού που προστέθηκε, ένα πολύ μικρό μέρος της κατάφερε να εγκλειστεί, εμποδίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο την ανίχνευση των ολικών φαινολικών. Ακόμη, ποσότητα φαινολικών μπορεί να μην έχει εγκλειστεί και να υπήρξαν απώλειες κατά τη διαδικασία.

Αντιθέτως, στο δείγμα εγκλεισμού **KTZ9** προσδιορίστηκε ότι στο 1 g εκχυλίσματος φλούδας ροδιού που έχει εγκλειστεί, περίπου 1000 mg αντιστοιχούν στην ποσότητα ολικών φαινολικών. Με λίγα λόγια, η παρασκευή αυτού του δείγματος εγκλεισμού ήταν επωφελής για τη διατήρηση και προστασία των ολικών φαινολικών του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο διότι, με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης που παρασκευάστηκε το συγκεκριμένο δείγμα, όλη η ποσότητα εκχυλίσματος φλούδας ροδιού κατάφερε να παραμείνει υπό τη μορφή συμπλόκων μη εγκλεισμού.

Για τον χυμό ροδιού προσδιορίστηκε εμφανώς λιγότερη ποσότητα ολικών φαινολικών και συγκεκριμένα 14,3 mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος στο 1 g χυμού ροδιού. Για το δείγμα **KTZ13** που παρασκευάστηκε με τη μέθοδο συγκαταβύθισης, η ποσότητα ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανέρχεται σε 9,0 mg στο 1 g χυμού ροδιού του δείγματος εγκλεισμού. Η ποσότητα αυτή είναι ικανοποιητική και σημαίνει ότι ο εγκλεισμός αυτός συνέβαλε, εν μέρει, θετικά στη διαφύλαξη των φαινολικών συστατικών του χυμού ροδιού.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ολικών φαινολικών και για τη β -κυκλοδεξτρίνη, για την οποία μετρήθηκε απορρόφηση 0,0267 ενώ η απορρόφηση που λήφθηκε για το τυφλό ήταν 0,0264. Σύμφωνα με τη σχέση 13 η συγκέντρωση που υπολογίστηκε ανέρχεται σε -1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιήθηκε η μέτρηση αυτή ήταν να επιβεβαιωθεί ότι η β-κυκλοδεξτρίνη, αν και προφανώς δεν είναι φαινολική ένωση, δε δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω αλληλεπίδρασης με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.

8.8. Προσδιορισμός Φλαβονοειδών-Αποτελέσματα της Χρωματομετρικής Μεθόδου Χλωριούχου Αργιλίου

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα φλαβονοειδή του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού, του χυμού ροδιού και των δειγμάτων εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις απορρόφησης των παρασκευασθέντων διαλυμάτων των προαναφερθέντων στο φασματόμετρο UV-Vis, στα 510 nm. Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη σχέση 14 ως εξής:

$$C = 719,92Abs - 5,0682 \quad (14)$$

όπου C είναι η συγκέντρωση (μg/mL) σε ισοδύναμα κατεχίνης και Abs (-) η τιμή απορρόφησης που λαμβάνεται από το όργανο UV-Vis.

Στον πίνακα 21 που ακολουθεί, δίνονται τα αποτελέσματα αναφορικά με την απορρόφηση, τη συγκέντρωση φλαβονοειδών, την αναλογία μιλιγραμμάτων ισοδύναμων κατεχίνης ανά γραμμάριο δείγματος (C') αλλά και, με αναγωγή, ανά γραμμάριο εκχυλίσματος ή χυμού (C''), καθενός από τα: εκχύλισμα φλούδας ροδιού, χυμός ροδιού, δείγματα εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13** αλλά και τυφλό δείγμα που απαιτείται για τους υπολογισμούς.

Πίνακας 21: Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης και προσδιορισμός φλαβονοειδών του εκχυλίσματος, του χυμού και των δειγμάτων **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**.

Δείγμα	Abs (-)	C (μg/mL)	C' = mg/g δείγματος	C'' = mg/g εκχυλίσματος ή χυμού
Εκχύλισμα Φλούδας Ροδιού	0,1370	49,1	981,3	981,3
Χυμός Ροδιού	0,1208	37,4	149,6	149,6
KTZ6	0,0698	0,7	2,8	357,8
KTZ9	0,1087	28,7	287,2	1000
KTZ13	0,1229	38,9	155,7	878,4
Τυφλό	0,0618			

Υπενθυμίζεται, πάλι, ότι τα δείγματα εγκλεισμού **KTZ6** και **KTZ9** παράχθηκαν με πρώτη ύλη το εκχύλισμα φλούδας ροδιού και το δείγμα **KTZ13** με τον χυμό ροδιού. Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στο θεωρητικό μέρος, το ρόδι γενικά είναι πλούσια πηγή φλαβονοειδών και συγκεκριμένα στη φλούδα του ροδιού, τα φλαβονοειδή είναι από τα κύρια συστατικά της. Το γεγονός αυτό επαληθεύεται και στο συγκεκριμένο πείραμα αφού στο 1 g εκχυλίσματος φλούδας ροδιού, περίπου 981 mg αντιστοιχούν στην ποσότητα φλαβονοειδών.

Στο δείγμα εγκλεισμού **KTZ6**, της μεθόδου συγκαταβύθισης, προσδιορίστηκε λιγότερη ποσότητα. Αυτό οφείλεται στο ότι στο συγκεκριμένο δείγμα, η απόδοση εγκλεισμού είναι πολύ χαμηλή, αφού από την αρχική ποσότητα εκχυλίσματος φλούδας ροδιού που προστέθηκε, πολύ λίγη ποσότητα κατάφερε να εγκλειστεί. Σαν αποτέλεσμα, ο εγκλεισμός αυτός δεν κατάφερε να διατηρήσει την ποσότητα των

φλαβονοειδών αφού μόνο 357 mg ισοδύναμων κατεχίνης ανιχνεύθηκαν στο 1 g εκχυλίσματος φλούδας ροδιού του εγκλεισμού.

Εν αντιθέσει, το δείγμα εγκλεισμού **KTZ9** κατάφερε να διατηρήσει και, μάλιστα, να ενισχύσει την ποσότητα των φλαβονοειδών στα σύμπλοκα σε σχέση με αυτά στο εκχύλισμα. Προσδιορίστηκε ότι στο 1 g εκχυλίσματος φλούδας ροδιού που έχει εγκλειστεί, περίπου 1000 mg αντιστοιχούν στην ποσότητα φλαβονοειδών, αποτέλεσμα αναμενόμενο καθώς όλη η ποσότητα εκχυλίσματος φλούδας ροδιού κατάφερε να παραμείνει, λόγω της μεθόδου λυοφιλοποίησης. Δηλαδή, το δείγμα **KTZ9** είχε ωφέλιμη δράση αναφορικά με τη διατήρηση και προστασία των φλαβονοειδών του εκχυλίσματος αυτού. Η αύξηση της ποσότητας των φλαβονοειδών μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της διαλυτότητας τους στο νερό λόγω σχηματισμού συμπλόκων μη εγκλεισμού με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης, και, παράλληλα, στη μείωση της απώλειας λόγω εξάτμισης ή επιρροής από το περιβάλλον. [64]

Η ποσότητα φλαβονοειδών που βρέθηκε για τον χυμό ροδιού ήταν λιγότερη και συγκεκριμένα 149,6 mg ισοδύναμων κατεχίνης στο 1 g χυμού ροδιού. Αναφορικά με το δείγμα **KTZ13** που παρασκευάστηκε με τη μέθοδο συγκαταβύθισης, η ποσότητα ισοδύναμων κατεχίνης υπολογίστηκε 878,4 mg στο 1 g χυμού ροδιού του δείγματος εγκλεισμού. Και σε αυτή την περίπτωση ο εγκλεισμός κατάφερε να επιφέρει θετικά αποτελέσματα στη διατήρηση των φλαβονοειδών του χυμού ροδιού. Μια εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί για τη συγκεκριμένη αύξηση του ποσού των φλαβονοειδών μέσω του εγκλεισμού είναι ότι ενδεχομένως η β-κυκλοδεξτρίνη λειτουργεί σαν φίλτρο που συγκρατεί τα συστατικά αυτά.

Μετρήσεις φλαβονοειδών διεξήχθησαν και στη β-κυκλοδεξτρίνη, για την οποία μετρήθηκε απορρόφηση 0,0622 στα 510 nm και η απορρόφηση που λήφθηκε για το τυφλό ήταν 0,0675. Από τη σχέση 14 προσδιορίστηκε συγκέντρωση ίση με -8,88 μg/mL σε ισοδύναμα κατεχίνης. Η αρνητική συγκέντρωση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η β-κυκλοδεξτρίνη δεν αλληλεπιδρά με τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών.

8.9. Προσδιορισμός Συμπυκνωμένων Τανινών-Προανθοκυανιδινών σε Ισοδύναμα Κατεχίνης -Αποτελέσματα της Μεθόδου Βανιλίνης-Υδροχλωρίου

Πραγματοποιήθηκε, επίσης, προσδιορισμός συμπυκνωμένων τανινών στο εκχύλισμα φλούδας ροδιού, στον χυμό ροδιού και στα δείγματα εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**. Για το σκοπό αυτό, έγιναν μετρήσεις απορρόφησης των παρασκευασθέντων διαλυμάτων των προαναφερθέντων στο όργανο UV-Vis, στα 500 nm. Η σχέση 15 χρησιμοποιήθηκε για τη μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση ως εξής:

$$C = 51,421Abs - 0,6873 \quad (15)$$

όπου C είναι η συγκέντρωση (μg/mL) σε ισοδύναμα κατεχίνης και Abs (-) η τιμή απορρόφησης που λαμβάνεται από το φασματόμετρο UV-Vis.

Ο πίνακας 22 συνοψίζει τα αποτελέσματα σχετικά με την απορρόφηση, τη συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών, την αναλογία μιλιγραμμάτων ισοδύναμων κατεχίνης ανά γραμμάριο δείγματος (C') αλλά και, με αναγωγή, ανά γραμμάριο εκχυλίσματος ή χυμού (C''), καθενός από τα: εκχύλισμα φλούδας ροδιού, χυμός ροδιού, δείγματα εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13** αλλά και τυφλό δείγμα που απαιτείται για τους υπολογισμούς.

Πίνακας 22: Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης και προσδιορισμός συμπυκνωμένων τανινών του εκχυλίσματος, του χυμού και των δειγμάτων **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**.

Δείγμα	Abs (-)	C (μg/mL)	C' = mg/g δείγματος	C'' = mg/g εκχυλίσματος ή χυμού
Εκχύλισμα Φλούδας Ροδιού	0,1131	-0,1	0	0
Χυμός Ροδιού	0,1976	3,2	7,8	7,8
KTZ6	0,1253	-0,5	0	0
KTZ9	0,1335	-0,1	0	0
KTZ13	0,1324	-0,1	0	0
Τυφλό	0,1217			

Όπως παρατηρείται από τον πίνακα 22, δεν ανιχνεύθηκαν συμπυκνωμένες τανίνες σε κανένα δείγμα εκτός από τον χυμό ροδιού στον οποίο, μάλιστα, φαίνεται ότι η συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών είναι πολύ χαμηλή. Με βάση τα όσα αναλύθηκαν στο θεωρητικό μέρος, το ρόδι περιέχει υψηλά ποσοστά τανινών, τόσο η φλούδα όσο και ο χυμός του. Οι τανίνες αυτές, όμως, είναι υδρολύομενες και δε δύναται να προσδιοριστούν με τη μέθοδο βανιλίνης-υδροχλωρίου.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις συμπυκνωμένων τανινών και για τη β-κυκλοδεξτρίνη. Η απορρόφηση μετρήθηκε 0,1221 στα 500 nm ενώ η απορρόφηση που λήφθηκε για το τυφλό ήταν 0,1217. Σύμφωνα με τη σχέση 15 η υπολογιζόμενη συγκέντρωση ανέρχεται σε -0,8 μg/mL σε ισοδύναμα κατεχίνης. Κατά συνέπεια, λόγω αρνητικής συγκέντρωσης, διαπιστώνεται, όπως αναμενόταν, ότι η β-κυκλοδεξτρίνη δεν περιέχει συμπυκνωμένες τανίνες.

8.10. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης-Ικανότητα Δέσμευσης της Σταθερής Ελεύθερης Ρίζας DPPH

Η μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε στον χυμό ροδιού και στο δείγμα εγκλεισμού **KTZ13**. Έτσι, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης μετρήθηκε η απορρόφηση των διαλυμάτων των προαναφερθέντων στα 515 nm. Η καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε από πρότυπα διαλύματα DPPH δίνεται από τη σχέση 16:

$$C = 0,046Abs - 0,0022 \quad (16)$$

όπου C είναι η συγκέντρωση σε μg/mL και $Abs (-)$ η τιμή απορρόφησης που λαμβάνεται από το όργανο UV-Vis.

Οι τιμές απορρόφησης που λήφθηκαν για τις αντίστοιχες αραιώσεις των δειγμάτων, παρουσιάζονται στον πίνακα 23, ενώ έχουν πραγματοποιηθεί υπολογισμοί και για τη β-κυκλοδεξτρίνη.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής του χυμού ροδιού, του δείγματος εγκλεισμού **KTZ13** και της β-κυκλοδεξτρίνης.

μL δείγματος	Abs (-)		
	Χυμός Ροδιού	KTZ13	β-CD
100	0,4000	0,6299	0,6767
80	0,4446	0,6340	0,6734
60	0,4871	0,6420	0,6746
40	0,5366	0,6496	0,6717
20	0,5935	0,6501	0,6712
Τυφλό	0,6675	0,6675	0,6723

Οι παραπάνω τιμές απορρόφησης χρησιμοποιούνται για την κατασκευή καμπυλών από τις οποίες προκύπτουν εξισώσεις συγκέντρωσης για το εκάστοτε δείγμα ως προς τη διαφορά συγκέντρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Από την εξίσωση που προκύπτει για το κάθε δείγμα, υπολογίζεται η τιμή IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση που ανάγει το 50% της ελεύθερης ρίζας. Στον πίνακα 24 παρατίθενται τα αποτελέσματα των τιμών αυτών των συγκεντρώσεων.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα συγκέντρωσης IC₅₀ του χυμού ροδιού και του δείγματος εγκλεισμού **KTZ13**.

Δείγμα	IC ₅₀ (μg/mL)
Χυμός Ροδιού	145,0
KTZ13	1117

Το δείγμα εγκλεισμού **KTZ13**, δεν παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα αναφορικά με την αντιοξειδωτική συμπεριφορά των συμπλόκων. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι για το δείγμα **KTZ13**, η συγκέντρωση που χρειάζεται για να μειωθεί κατά 50% το DPPH είναι μεγαλύτερη από αυτή του χυμού ροδιού. Άρα, η αντιοξειδωτική δράση του χυμού ροδιού είναι καλύτερη από αυτή του συμπλοκοποιημένου χυμού ροδιού (**KTZ13**).

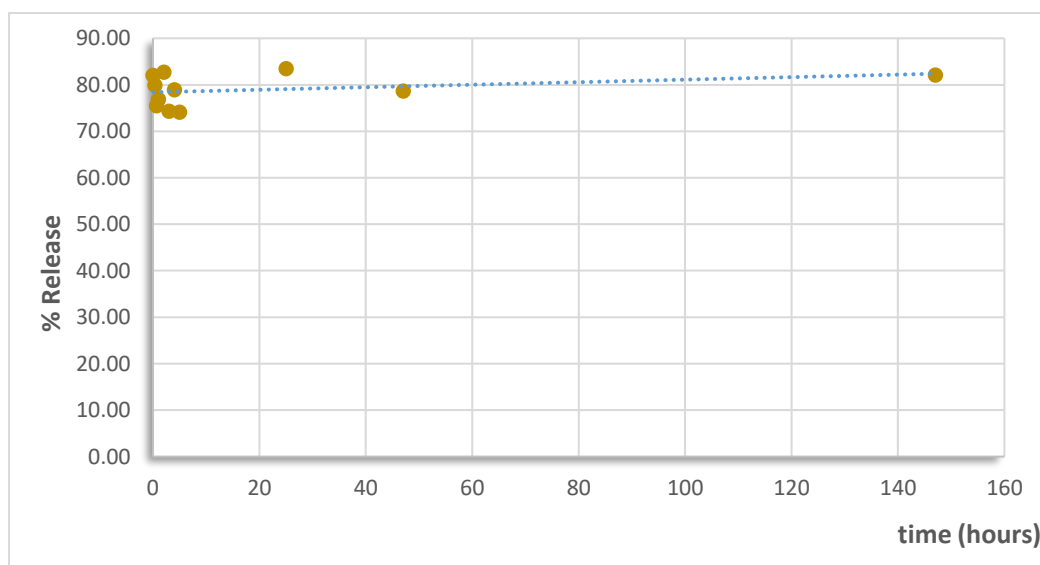
Στην περίπτωση της β-κυκλοδεξτρίνης, οι τιμές απορρόφησης είναι πολύ κοντά σε αυτή του τυφλού διαλύματος και η διαφορά συγκέντρωσης είναι κοντά στο μηδέν. Επομένως, φαίνεται να μην παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, καθώς δεν μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση δέσμησης του 50% του ελεύθερου ριζικού DPPH, αφού η καμπύλη που προκύπτει δεν είναι στην επιθυμητή μορφή, δηλαδή ευθεία γραμμή.

8.11. Μελέτη Απελευθέρωσης-Release Study

Ως προς το προφίλ απελευθέρωσης, διεξήχθησαν πειράματα μελέτης απελευθέρωσης για τα δείγματα **KTZ9** και **KTZ13**. Το δείγμα **KTZ9** παρασκευάστηκε με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης και πρώτη ύλη το εκχύλισμα φλούδας ροδιού και το δείγμα **KTZ13** με τη μέθοδο συγκαταβύθισης και πρώτη ύλη τον χυμό ροδιού. Τα διαγράμματα 3 και 4, τα οποία δημιουργήθηκαν με βάση το ποσοστό απελευθέρωσης ως συνάρτηση του χρόνου, παρατίθενται στη συνέχεια, για τα δείγματα **KTZ9** και **KTZ13** αντίστοιχα.

Θεωρητικά, δύο στάδια περιλαμβάνονται στην απελευθέρωση του συμπλοκοποιημένου φιλοξενούμενου μορίου από ένα σύστημα. Σε πρώτη φάση, και για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, λαμβάνει χώρα η φάση της ταχείας απελευθέρωσης. Η φάση αυτή σχετίζεται με τα μόρια που είναι επιφανειακά προσδεσμένα με τον φορέα. Στη δεύτερη φάση, ο ρυθμός απελευθέρωσης σιγά-σιγά επιβραδύνεται και τελικά σταθεροποιείται σχηματίζοντας ένα πλατό. Η απελευθέρωση, σε αυτή τη φάση, αφορά στη διάχυση των μορίων που βρίσκονται στο εσωτερικό της κοιλότητας του φορέα. [26, 56, 65, 66]

Αναφορικά με το δείγμα **KTZ9**, δεν παρατηρείται η συμπεριφορά απελευθέρωσης που είχε παρατηρηθεί σε προηγούμενη εργασία στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και αφορούσε σύμπλοκα εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε β -CD (Εικόνα 13). Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3, παρατηρείται μόνο μία φάση, αφού τα σημεία είναι με τέτοιο τρόπο διασκορπισμένα, ώστε η καμπύλη που σχηματίζεται είναι σχετικά σταθερή, υπό τη μορφή νοητής ευθείας. Επίσης, το ποσοστό απελευθέρωσης που προκύπτει είναι πολύ υψηλό, γύρω στο 82%.

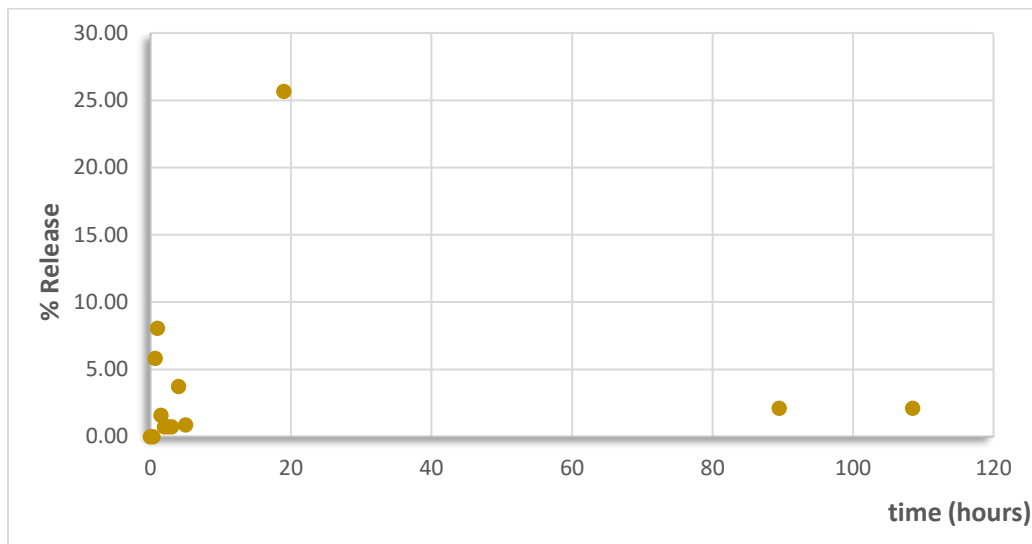


Διάγραμμα 3: Τα σημεία ποσοστού απελευθέρωσης που προκύπτουν από πειραματικές μετρήσεις απορρόφησης για το δείγμα **KTZ9**, συναρτήσει του χρόνου (σε ώρες).

Παρατηρώντας το προφίλ απελευθέρωσης του διαγράμματος 3 συμπεραίνεται ότι το εκχύλισμα φλούδας ροδιού απελευθερώνεται, ήδη, από την αρχή της πειραματικής διαδικασίας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το δείγμα **KTZ9** παρασκευάστηκε με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης και με βάση την απόδοση εγκλεισμού και το ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης, τα μόρια του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού είναι προσδεσμένα στην επιφάνεια της β -κυκλοδεξτρίνης. Σαν αποτέλεσμα, μπορούν εύκολα να απελευθερωθούν από τη στιγμή που το δείγμα τοποθετείται στο ρυθμιστικό διάλυμα. Εξάλλου, το εκχύλισμα φλούδας ροδιού είναι υδατοδιαλυτό και επηρεάζεται εύκολα η αλληλεπίδρασή του με τη β -κυκλοδεξτρίνη σε αυτό το περιβάλλον.

Στην περίπτωση του δείγματος **KTZ13** παρατηρείται, και πάλι, διαφορετική συμπεριφορά, τόσο από αυτή του αιθέριου ελαίου ρίγανης όσο και από αυτή του δείγματος **KTZ9**, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4. Η μορφή του διαγράμματος φαίνεται να παρουσιάζει τρεις φάσεις, μια απότομης αύξησης μέχρι το πρώτο εικοσάωρο, μία φάση μείωσης μέχρι τη φάση σταθεροποίησης γύρω στις 90 ώρες. Το ποσοστό

απελευθέρωσης που προκύπτει, φτάνει μέχρι το 26% και μετά φαίνεται να μειώνεται σταθεροποιούμενο κοντά στο 2%, σαν να μην απελευθερώνεται καθόλου χυμός.



Διάγραμμα 4: Τα σημεία ποσοστού απελευθέρωσης που προκύπτουν από πειραματικές μετρήσεις απορρόφησης για το δείγμα *KTZ13*, συναρτήσει του χρόνου (σε ώρες).

Μια πιθανή εξήγηση για τη λήψη του παραπάνω προφίλ απελευθέρωσης (διάγραμμα 4) μπορεί να δοθεί λαμβάνοντας υπόψη τον τρόπο διεκπεραίωσης της πειραματικής διαδικασίας. Με την πάροδο του χρόνου, το δείγμα που λαμβάνεται κάθε φορά για μέτρηση απορρόφησης στο φασματοόμετρο UV-Vis, αντικαθίσταται από αντίστοιχη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σύστημα να αραιώνεται όλο και περισσότερο. Συνεπώς, ο χυμός ροδιού δεν μπορεί να ανιχνευθεί στο όργανο UV-Vis.

Εν γένει, παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό απελευθέρωσης κάποιας δραστικής ουσίας είναι οι συντελεστές διάχυσης και διαχωρισμού των δραστικών ενώσεων, αλλά και η συγγένεια, η αναλογία και η αλληλεπίδρασή τους με τον φορέα, το πάχος τοιχώματος του συστήματος εγκλεισμού, το σχήμα των σωματιδίων και η διαλυτότητα τους, οι ιδιότητες του μέσου απελευθέρωσης και η διαδικασία εγκλεισμού. Όσον αφορά στα μέγιστα ποσοστά απελευθέρωσης μπορεί να κυμαίνονται από 28% έως και 98%. [55, 64]

8.12. Αποτελέσματα Ελέγχου Σταθερότητας Καλλυντικών Κρεμών

Οι παράμετροι σταθερότητας μελετήθηκαν και στις πέντε κρέμες που παρασκευάστηκαν, όπου η μια εξ αυτών αποτελεί το τυφλό. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι κρέμες αυτές χωρίστηκαν σε ίσες ποσότητες και αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες (5 °C, 25 °C (Εικόνα 48), 40 °C, 50 °C και σε κύκλους ψύξης-θέρμανσης 5-45 °C). Τα αποτελέσματα οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, pH, ιξώδους και φυγοκέντρησης παρατίθενται στη συνέχεια.



Εικόνα 48: Δείγματα καλλυντικών κρεμών μετά τον έλεγχο σταθερότητας, διάρκειας ενός μήνα, στους 25 °C: τυφλό (πάνω αριστερά), 564 (πάνω κεντρικά), 565 (πάνω δεξιά), 566 (κάτω αριστερά), 567 (κάτω δεξιά).

8.12.1. Οργανοληπτικά Χαρακτηριστικά

Η υφή όλων των δειγμάτων ήταν η επιθυμητή υφή που πρέπει να έχει μια καλλυντική κρέμα. Αναφορικά με την εμφάνιση, δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητα φαινόμενα «σβολιάσματος» ενώ και κατά το άπλωμα της κάθε κρέμας πάνω σε σπάτουλα δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός, με την έννοια του να «σπάει» η κρέμα.

Κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων ελέγχου σταθερότητας, σε όλες τις θερμοκρασιακές συνθήκες, τα τυφλά δείγματα καλλυντικής κρέμας παρέμειναν λευκά, χωρίς διαφοροποίηση στην οσμή. Η κρέμα που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό είχε χαρακτηριστεί εξ αρχής ως λευκή. Επίσης, σε όλα τα δείγματα καλλυντικών κρεμών και για όλους τους ελέγχους στους οποίους υποβλήθηκαν, το άρωμα παρέμεινε αναλλοίωτο.

Οι κρέμες που προέκυψαν από τα δείγματα εγκλεισμού **KTZ14** και **KTZ16** χαρακτηρίστηκαν ως λευκές. Καθ' όλη τη διάρκεια των ελέγχων που πραγματοποιήθηκαν, οι κρέμες αυτές κατάφεραν να διατηρήσουν τη λευκή τους απόχρωση.

Η καλλυντική κρέμα που προέκυψε από τον χυμό ροδιού είχε υπόλευκη απόχρωση, την οποία διατήρησε στα πειράματα ελέγχου σταθερότητας σε συνθήκες εναλλασσόμενης θερμοκρασίας αλλά και σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας. Εξάιρεση αποτέλεσε το δείγμα από τα πειράματα ελέγχου σταθερότητας στη σταθερή θερμοκρασία των 40 °C, όπου το δείγμα σκούρυνε κατά μισό τόνο.

Τέλος, η καλλυντική κρέμα με το εκχύλισμα φλούδας ροδιού χαρακτηρίστηκε εξ αρχής ως μπεζ-κιτρινωπή. Κατά τη διεξαγωγή των ελέγχων σταθερότητας σε συνθήκες εναλλασσόμενης θερμοκρασίας, τα δείγματά της διατήρησαν την απόχρωσή τους. Ωστόσο, κατά τον έλεγχο σταθερότητας σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας, παρατηρήθηκε να έχει σκουρύνει επιπλέον το χρώμα κατά ένα τόνο, για τους 5 °C και 50 °C.

8.12.2. pH στους 25 °C

Σχεδόν όλα τα δείγματα είχαν αρχική τιμή pH που ανήκει στο εύρος 5,36-5,38 και μόνο το δείγμα κρέμας που προέκυψε από το δείγμα εγκλεισμού **KTZ14**, παρουσίασε ελαφρώς διαφοροποιημένη τιμή, 5,42. Από τον πίνακα 25 παρατηρείται ότι τα δείγματα παρουσίασαν σε γενικές γραμμές παρόμοια συμπεριφορά, με εξαίρεση τα δείγματα του 564 και αυτά που υποβλήθηκαν στους 50 °C. Σε αυτή τη θερμοκρασία παρατηρείται μείωση του pH.

Πίνακας 25: Πειραματικά δεδομένα μέτρησης του pH στους 25 °C κατά τους ελέγχους σταθερότητας.

Δείγμα ⁹	Αρχικά Αποτελέσματα	Freeze-Thaw Cycles 5-45 °C				Preliminary Stability test			
		Ημέρα 7	Ημέρα 15	Ημέρα 21	Ημέρα 29	5 °C	25 °C	40 °C	50 °C
Τυφλό	5,38	5,41	5,39	5,38	5,35	5,44	5,40	5,38	5,35
564	5,38	5,36	5,33	5,27	5,28	5,29	5,30	5,25	5,26
565	5,36	5,38	5,31	5,37	5,31	5,37	5,35	5,32	5,29
566	5,37	5,40	5,37	5,39	5,38	5,39	5,39	5,38	5,31
567	5,42	5,38	5,40	5,38	5,36	5,39	5,38	5,38	5,32

8.12.3. Ιξώδες

Γενικά, το ιξώδες όλων των δειγμάτων κυμαίνεται στις ίδιες τιμές. Ειδικότερα, όμως, για τους ελέγχους σταθερότητας σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 5 °C λαμβάνει συγκριτικά υψηλότερες τιμές, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στη χαμηλή θερμοκρασία στην οποία είχαν υποβληθεί τα δείγματα αυτά.

Πίνακας 26: Πειραματικά δεδομένα μέτρησης ιξώδους (cSt) κατά τους ελέγχους σταθερότητας.

Δείγμα	Αρχικά Αποτελέσματα	Freeze-Thaw Cycles 5-45 °C				Preliminary Stability test			
		Ημέρα 7	Ημέρα 15	Ημέρα 21	Ημέρα 29	5 °C	25 °C	40 °C	50 °C
Τυφλό	59050	54582	52645	53348	54970	214·10 ³	63112	59861	46650
564	52567	51239	50067	46553	49599	227·10 ³	48861	43168	49629
565	51770	53270	56629	54051	53660	220·10 ³	53370	58816	46240
566	48818	53348	53036	47568	52879	224·10 ³	58816	57086	53400
567	51630	47490	45069	53114	54910	117·10 ³	47802	41007	44522

8.12.4. Φυγοκεντρήσεις

Καθ' όλη τη διάρκεια των ελέγχων σταθερότητας, σε συνθήκες τόσο σταθερής όσο και εναλλασσόμενης θερμοκρασίας, δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός των φάσεων των γαλακτωμάτων με τη φυγοκέντρηση. Οι φάσεις των γαλακτωμάτων, δηλαδή, παρέμειναν αναμεμιγμένες σε όλες τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν.

Συμπερασματικά, παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των καλλυντικών κρεμών 564, 565, 566 και 567, η αλλαγή του χρώματος του 564 και 565 και η μείωση του

⁹ 564: καλλυντική κρέμα με εκχύλισμα φλούδας ροδιού, 565: καλλυντική κρέμα με χυμό ροδιού, 566: καλλυντική κρέμα με δείγμα εγκλεισμού **KTZ16** και 567: καλλυντική κρέμα με δείγμα εγκλεισμού **KTZ14**.

pH της καλλυντικής κρέμας 564 αποτελούν ενδείξεις πιθανών αλλοιώσεων. Σαν αποτέλεσμα, υπάρχει κίνδυνος να προκύψει μη σταθερό προϊόν. Ακόμη, προκύπτει ότι οι καλλυντικές κρέμες που παρασκευάστηκαν με δείγματα εγκλεισμών δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα μετρήσεων ελέγχου σταθερότητας και επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Οι εγκλεισμοί αυτοί πραγματοποιήθηκαν με χυμό ροδιού, ο οποίος με την εισαγωγή του ως διάλυμα στη βάση της κρέμας, δημιουργεί καλλυντικό προϊόν με υπόλευκη απόχρωση.

Γενικά, καλλυντικές κρέμες λευκής απόχρωσης είναι περισσότερο επιθυμητές και, όπως διαπιστώθηκε, οι εγκλεισμοί κατάφεραν να διασφαλίσουν αυτό το λευκό χρώμα αλλά και να αποτρέψουν την αλλοίωσή του. Επομένως, ένας τρόπος μη αλλοίωσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών καλλυντικών προϊόντων είναι η ενσωμάτωση σε αυτά, της δραστικής ουσίας που ενδιαφέρει υπό τη μορφή συμπλόκων εγκλεισμού.

9. Συμπεράσματα και Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

9.1. Συμπεράσματα

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκε ο εγκλεισμός εκχυλίσματος φλούδας ροδιού και ο εγκλεισμός χυμού ροδιού, σε β-κυκλοδεξτρίνη. Κύριος σκοπός των εγκλεισμών είναι, ουσιαστικά, η προστασία των ευεργετικών συστατικών και ιδιοτήτων του εκχυλίσματος ή του χυμού από περιβαλλοντικούς παράγοντες και η ελεγχόμενη απελευθέρωση των συστατικών τους.

Προς την κατεύθυνση αυτή μελετήθηκε η διεργασία εγκλεισμού σε β-κυκλοδεξτρίνη τόσο για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού όσο και για τον χυμό ροδιού, μέσω των μεθόδων συγκαταβύθισης και λυοφιλοποίησης. Στα πλαίσια του πειραματικού σκέλους της παρούσας διπλωματικής εργασίας, εξετάστηκαν διάφορες παραλλαγές στις συνθήκες των μεθόδων αυτών. Έτσι, τροποποιήθηκαν η αναλογία μάζας β-κυκλοδεξτρίνης:εκχυλίσματος/χυμού, η διάρκεια ανάδευσης, η ποσότητα και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την τροποποιημένη μέθοδο λυοφιλοποίησης. Όλα τα δείγματα συμπλόκων εγκλεισμού που παράχθηκαν, υποβλήθηκαν σε μετρήσεις απαραίτητες για το χαρακτηρισμό τους μέσω των τεχνικών φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), και φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).

Επιπρόσθετα, επιλεγμένα δείγματα χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω μέσω των τεχνικών θερμικής ανάλυσης (TGA, DSC) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Ακόμη, προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους σε φαινολικά, φλαβονοειδή, συμπυκνωμένες τανίνες και η αντιοξειδωτική τους δράση. Σε τελευταίο στάδιο, μελετήθηκε η απελευθέρωση του καλύτερου δείγματος που προέκυψε από εκχύλισμα φλούδας ροδιού και, αντίστοιχα, του καλύτερου δείγματος από χυμό ροδιού.

Στις παραμέτρους που εξετάστηκαν, ο εγκλεισμός του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα κυρίως για τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης ενώ οι δοκιμές σε χρόνο και αναλογίες στη μέθοδο της συγκαταβύθισης δεν φάνηκε να επηρεάζουν ουσιαστικά τα αποτελέσματα. Οι αποδόσεις διεργασίας της μεθόδου συγκαταβύθισης κυμαίνονται στο εύρος 25,6%-43,8% ενώ της μεθόδου λυοφιλοποίησης ανέρχονται περίπου σε 91%. Επιπλέον, για τη μέθοδο συγκαταβύθισης οι αποδόσεις εγκλεισμού ανήκουν στο διάστημα 1,7%-3,8% και τα ποσοστά επιφανειακής πρόσδεσης στο διάστημα 1,1%-1,4%. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα αναφορικά με τη μέθοδο λυοφιλοποίησης είναι περίπου 100% για την απόδοση εγκλεισμού και 80,4%-100% για τα ποσοστά επιφανειακής πρόσδεσης. Η μέθοδος λυοφιλοποίησης, εδώ, πλεονεκτεί έναντι της συγκαταβύθισης γιατί παραλείπονται στάδια που σχετίζονται με αρκετές απώλειες.

Ωστόσο, οι εγκλεισμοί που πραγματοποιήθηκαν με πρώτη ύλη τον χυμό ροδιού παρουσίασαν περισσότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα. Οι αποδόσεις διεργασίας της μεθόδου συγκαταβύθισης κυμαίνονται στο εύρος 22,1%-44,3% ενώ της μεθόδου λυοφιλοποίησης ανέρχονται περίπου σε 95%. Οι αποδόσεις εγκλεισμού της μεθόδου συγκαταβύθισης ανήκουν στο διάστημα 7,0%-22,2% ενώ της μεθόδου λυοφιλοποίησης είναι περίπου 16%. Ποσοστό επιφανειακής πρόσδεσης κατάφερε να προσδιοριστεί μόνο για το δείγμα της μεθόδου λυοφιλοποίησης και είναι κοντά στο 16%.

Από την τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός μετρήθηκαν μεγέθη σωματιδίων της τάξης 600,4-938,9 nm για τους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού και 738,9-1254 nm για τους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού. Παρατηρείται ευρεία κατανομή μεγέθους και, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, ύπαρξη

τριών πληθυσμών μεγέθους. Ειδικότερα, υπάρχει μια οικογένεια στην κλίμακα των μικρομέτρων, η οποία, όμως, ανέρχεται σε μικρό ποσοστό, χωρίς να επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό το κάθε δείγμα. Σαν αποτέλεσμα, ο δείκτης πολυδιασποράς παρουσιάζει μεγάλες τιμές, μεταξύ 0,588-0,693 για τους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού και, αντίστοιχα, για τους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού 0,524-0,865. Το ζ-δυναμικό έχει, κατά κύριο λόγο, υψηλές, αρνητικές τιμές, δηλαδή -15,2 mV μέχρι -30,6 mV για τους εγκλεισμούς με εκχύλισμα φλούδας ροδιού και -7,69 mV μέχρι -27,8 mV για τους εγκλεισμούς με χυμό ροδιού. Έτσι, για τις μεγαλύτερες, κατά απόλυτη τιμή, τιμές οι διασπορές των συμπλόκων θεωρούνται σταθερές.

Με χρήση της τεχνικής της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, λαμβάνονται τα φάσματα FT-IR όλων των δειγμάτων. Εστιάζοντας στα δείγματα που σχολιάστηκαν στο αντίστοιχο κεφάλαιο, παρατηρούνται μετατοπισμένες κορυφές της β-κυκλοδεξτρίνης λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτής και των φιλοξενούμενων μορίων του εκχυλίσματος ή του χυμού. Ακόμη, δεν μπορούν να ανιχνευθούν χαρακτηριστικές κορυφές εκχυλίσματος/χυμού στα δείγματα εγκλεισμού που εξετάστηκαν. Συνεπώς, υπάρχει εγκλεισμένο εκχύλισμα στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης, οπότε έχουν σχηματιστεί σύμπλοκα εγκλεισμού.

Για τον χυμό ροδιού και το δείγμα εγκλεισμού **KTZ13** λήφθηκαν μόνο τα TGA και ειδικά το γράφημα TGA του **KTZ13** παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με αυτά των δειγμάτων **KTZ6** και **KTZ9**. Από τη θερμική ανάλυση των δειγμάτων των εγκλεισμών **KTZ6** και **KTZ9** παρατηρούνται παρόμοια γραφήματα DSC και TGA. Ωστόσο, καθένα από τα γραφήματα είναι διαφορετικό από τα αντίστοιχα της β-κυκλοδεξτρίνης και του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ύπαρξης εγκλεισμού. Η διαφορά που παρατηρείται στα γραφήματα έγκειται στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ β-κυκλοδεξτρίνης και εκχυλίσματος/χυμού.

Γενικά, η τεχνική NMR συνέβαλε στην επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προσδιορίστηκαν πειραματικά για τα δείγματα εγκλεισμού **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13**. Ο επιτυχής εγκλεισμός εκχυλίσματος ή χυμού, είτε εσωτερικά στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης, είτε εξωτερικά μέσω αλληλεπίδρασης, δύναται να επιβεβαιωθεί από την παρατήρηση υψηλών μεταβολών των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων της σε ελεύθερη μορφή και στο σύμπλοκο. Έτσι, για το **KTZ13** επιβεβαιώθηκε ο εσωτερικός εγκλεισμός, για το **KTZ9** η επιφανειακή πρόσδεση, ενώ για το **KTZ6** επιβεβαιώθηκε τόσο ο εσωτερικός εγκλεισμός όσο και η επιφανειακή πρόσδεση.

Το εκχύλισμα φλούδας ροδιού χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών σύμφωνα με τις μετρήσεις που έγιναν με τη δοκιμή Folin Ciocalteu, τα οποία καταφέρνει να διατηρήσει το δείγμα εγκλεισμού **KTZ9**, σε αντίθεση με το **KTZ6**. Στο τελευταίο δεν μπορούν να ανιχνευθούν ολικά φαινολικά, πιθανότατα, λόγω πολύ χαμηλής ποσότητας εγκλεισμένου εκχυλίσματος. Ο χυμός ροδιού έχει αρκετά λιγότερη ποσότητα ολικών φαινολικών σε σχέση με το εκχύλισμα φλούδας ροδιού. Τα ολικά φαινολικά του χυμού ροδιού μπόρεσαν εν μέρει να διατηρηθούν μέσω του δείγματος εγκλεισμού **KTZ13**.

Αντίστοιχα αποτελέσματα για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού και το δείγμα **KTZ9** προκύπτουν και για την περίπτωση προσδιορισμού των φλαβονοειδών μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου χλωριούχου αργιλίου, όπου, μάλιστα, το δείγμα **KTZ9** ενισχύει τη συγκέντρωση των φλαβονοειδών. Αναφορικά με το δείγμα εγκλεισμού **KTZ6**, της μεθόδου συγκαταβύθισης, προσδιορίστηκε λιγότερη ποσότητα φλαβονοειδών, γεγονός που σημαίνει ότι ο εγκλεισμός δεν ήταν επωφελής για τη διατήρηση και προστασία τους. Στην περίπτωση του χυμού ροδιού, η ποσότητα φλαβονοειδών ήταν, συγκριτικά με το εκχύλισμα φλούδας ροδιού, πολύ μικρότερη. Ωστόσο το δείγμα **KTZ13** κατάφερε να επιφέρει θετικά

αποτελέσματα στη διατήρηση των φλαβονοειδών του χυμού ροδιού, αυξάνοντας κατά πολύ την ποσότητά τους ανά γραμμάριο χυμού ροδιού.

Συμπυκνωμένες τανίνες μπόρεσαν να βρεθούν μόνο για τον χυμό ροδιού μέσω της μεθόδου βανιλίνης-υδροχλωρίου αλλά και εκεί ανιχνεύθηκαν σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Γενικά, το ρόδι και τα εκχυλίσματά του περιέχουν, κυρίως, υδρολυόμενες τανίνες, για τις οποίες, στα πλαίσια του πειραματικού μέρους της παρούσας διπλωματικής, δεν υπήρξε δυνατότητα να μετρηθούν.

Καλύτερη αντιοξειδωτική δράση, όπως αυτή μετρήθηκε με τη μέθοδο DPPH, παρουσιάζει ο χυμός ροδιού. Το δείγμα εγκλεισμού **KTZ13**, παρασκευασμένο με τη μέθοδο συγκαταβύθισης, δεν αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση του χυμού ροδιού καθώς απαιτείται περισσότερη ποσότητα από αυτό για τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης της ρίζας DPPH κατά 50%.

Η μελέτη απελευθέρωσης που πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα εγκλεισμού **KTZ9** και **KTZ13**, έδωσε διαφορετικά προφίλ απελευθέρωσης σε σχέση με την τυπική μορφή των βιβλιογραφικά αναμενόμενων. Στην περίπτωση του **KTZ9**, η μορφή του προφίλ ποσοστού απελευθέρωσης συναρτήσει του χρόνου παραμένει περίπου σταθερή για όλο το χρονικό διάστημα των 6 ημερών του πειράματος και το ποσοστό απελευθέρωσης είναι περίπου 82%. Η άμεση απελευθέρωση του εκχυλίσματος φλούδας ροδιού μπορεί να αποδοθεί στην υδατοδιαλυτότητα των μορίων του εκχυλίσματος, τα οποία είναι προσδεμένα στην επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης κι έτσι εύκολα επηρεάζεται η αλληλεπίδρασή τους με τη β-κυκλοδεξτρίνη στο υδατικό περιβάλλον που δημιουργεί το ρυθμιστικό διάλυμα.

Το προφίλ απελευθέρωσης του δείγματος εγκλεισμού **KTZ13** είναι, επίσης, διαφορετικό παρουσιάζοντας, σε γενικές γραμμές και για διάστημα περίπου 5 ημερών, αύξηση με μέγιστο ποσοστό απελευθέρωσης 26%, μείωση και τελικά σταθεροποίηση του ποσοστού απελευθέρωσης γύρω στο 2%. Μια πρώτη εκτίμηση αυτής της συμπεριφοράς μπορεί να βασιστεί στη συνεχόμενη αραίωση που υφίσταται το δείγμα για τη διεκπεραίωση του πειράματος, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ανιχνευθεί ο χυμός ροδιού στο όργανο UV-Vis. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μελέτη απελευθέρωσης, όπως και αυτή του δείγματος **KTZ9**, αποτελούν προκαταρκτικές μελέτες και απαιτείται διεξαγωγή επαναληπτικών πειραμάτων.

Σε γενικές γραμμές, οι καλλυντικές κρέμες που προέκυψαν με την ενσωμάτωση των δειγμάτων εγκλεισμού, είχαν επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και ικανοποιητικά αποτελέσματα μετρήσεων ελέγχου σταθερότητας. Αντιθέτως, οι καλλυντικές κρέμες που παρασκευάστηκαν με προσθήκη εκχυλίσματος και χυμού ροδιού, παρουσίασαν μη επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αναφορικά με το χρώμα ενώ και το pH της κρέμας με εκχύλισμα φλούδας ροδιού παρουσίαζε συνεχώς μείωση σύμφωνα με τη διεξαγωγή των ελέγχων σταθερότητας.

9.2. Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Γενικά, η διατήρηση και προστασία βιοδραστικών ουσιών, από φυσικές πηγές, έχουν αποτελέσει και συνεχίζουν να αποτελούν αντικείμενο έρευνας σε διάφορους τομείς της επιστήμης, αφού τέτοιες ουσίες έχουν σημαντικά οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό. Κατά συνέπεια, χρησιμοποιούνται σε αρκετούς κλάδους, όπως η βιομηχανία τροφίμων, η βιομηχανία φαρμάκων και η βιομηχανία καλλυντικών. Προκειμένου να επιτευχθεί και να εξασφαλιστεί η προστασία των βιοδραστικών συστατικών και των

ιδιοτήτων τους δύναται να χρησιμοποιηθεί η διεργασία του εγκλεισμού, όπως έγινε και στα πλαίσια διεκπεραίωσης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Καταρχάς, όσον αφορά στα πειράματα των εγκλεισμών, θα μπορούσαν να εξεταστούν περαιτέρω οι συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγονται, με την πραγματοποίηση παραπάνω πειραμάτων, προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι μέθοδοι εγκλεισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Προς αυτή την κατεύθυνση, θα μπορούσαν να διεξαχθούν πειράματα και με άλλες μεθόδους εγκλεισμού, πέρα από τη μέθοδο συγκαταβύθισης και λυοφιλοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν εδώ. Ακόμη, καλό θα ήταν να εξεταστεί και η περίπτωση κατά την οποία επιδιώκεται ο σχηματισμός διαφορετικών συστημάτων εγκλεισμού με αλλαγή του φορέα, για παράδειγμα μέσω της χρήσης παραγώγων β-κυκλοδεξτρίνης ή και διαφορετικών τύπων κυκλοδεξτρίνης.

Στα πλαίσια του εργαστηριακού μέρους θα μπορούσε να προστεθεί και ο αναλυτικός προσδιορισμός των συστατικών του εκχυλίσματος φλούδας και του χυμού ροδιού μέσω της τεχνικής συνδυασμένης αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (GC-MS), ώστε να βρεθούν και εργαστηριακά τα όσα είναι ήδη γνωστά από τη βιβλιογραφία. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να γίνει πιο αναλυτικός προσδιορισμός των συστατικών εκείνων που εγκλείονται στην εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης και εκείνων που προσδένονται στην εξωτερική επιφάνειά της.

Επιπλέον, εκτός από τη γνώση του μεγέθους τους, καλό θα ήταν να προστεθεί και η πιο λεπτομερής ανάλυση της δομής των σχηματιζόμενων συμπλόκων μέσω άλλων ενόργανων τεχνικών, όπως η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Ακόμη, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) προκειμένου να ληφθούν περισσότερες πληροφορίες για τη μορφολογία της επιφάνειας των συμπλόκων εγκλεισμού.

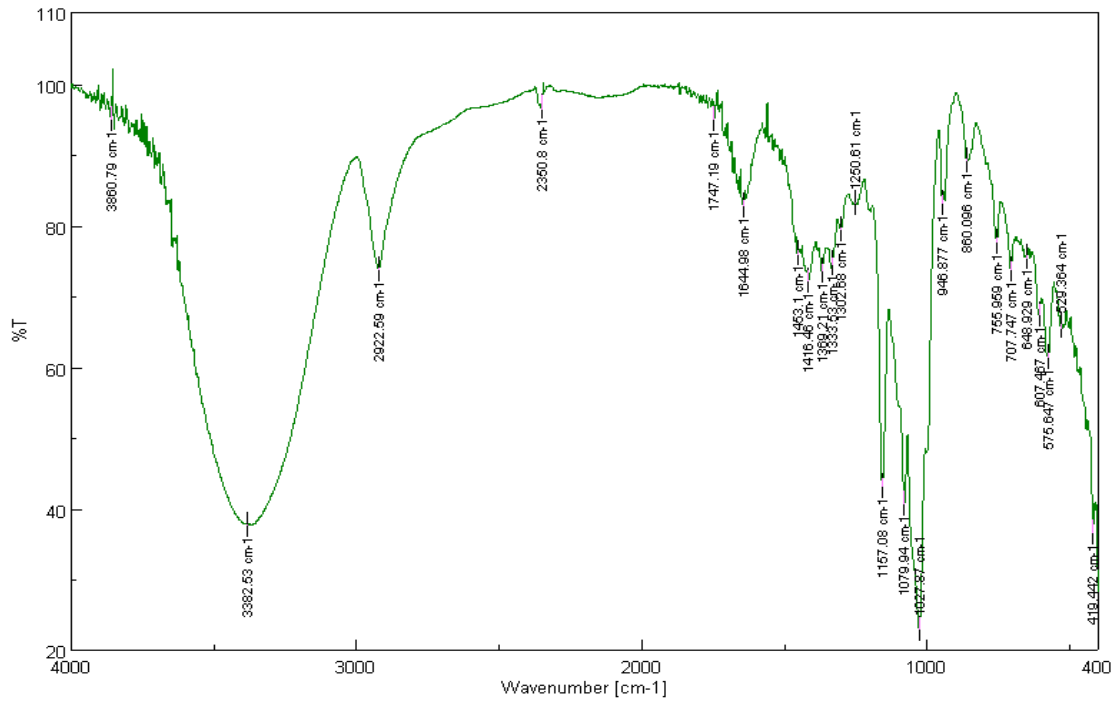
Αναφορικά με τον προσδιορισμό των υδρολυόμενων τανινών, είναι γνωστό ότι οι υδρολυόμενες τανίνες είναι δυσκολότερο να αναλυθούν σε σχέση με τις συμπυκνωμένες τανίνες. Ωστόσο, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν συγκεκριμένες χρωματομετρικές δοκιμές, οι οποίες, αν και δεν παρέχουν ακριβή ποσοτικά δεδομένα, στην καλύτερη περίπτωση, παρέχουν δεδομένα για συγκριτικούς σκοπούς. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη διαλογή δειγμάτων για τους διαφορετικούς τύπους τανινών, υδρολυόμενων ή συμπυκνωμένων τανινών. [67]

Σχετικά με τη μελέτη απελευθέρωσης, τα όσα αναλύθηκαν στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία αποτελούν προκαταρκτικά στάδια της μελέτης της συμπεριφοράς απελευθέρωσης των συγκεκριμένων συμπλόκων εγκλεισμού. Για την εξαγωγή επιπλέον συμπερασμάτων κρίνεται αναγκαίο να πραγματοποιηθούν επαναληπτικά πειράματα και να γίνουν επιπλέον δοκιμές.

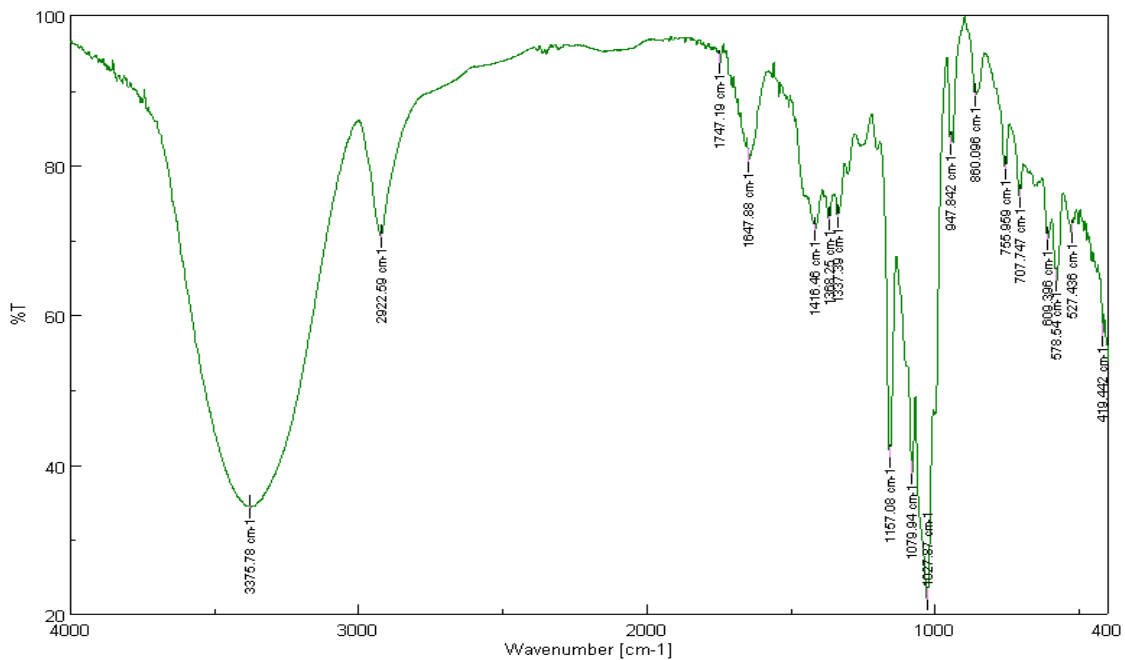
Τέλος, αναφορικά με τις καλλυντικές κρέμες, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν μελέτες απελευθέρωσης τόσο του εκχυλίσματος και του χυμού που έχουν προστεθεί σε αυτές ως έχουν αλλά και του χυμού που έχει ενσωματωθεί σε αυτές υπό τη μορφή συμπλόκων εγκλεισμού. Ακόμη, καλό θα ήταν να μελετηθεί και η αντιοξειδωτική δράση των κρεμών που έχουν προκύψει από ενσωμάτωση εγκλεισμένου χυμού. Στόχος είναι η εξακρίβωση της προστασίας της αντιοξειδωτικής δράσης του χυμού, η οποία υποτίθεται ότι επιτυγχάνεται λόγω εισαγωγής του χυμού, εγκλεισμένου, μέχρι τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή με το ανθρώπινο δέρμα.

Παράρτημα

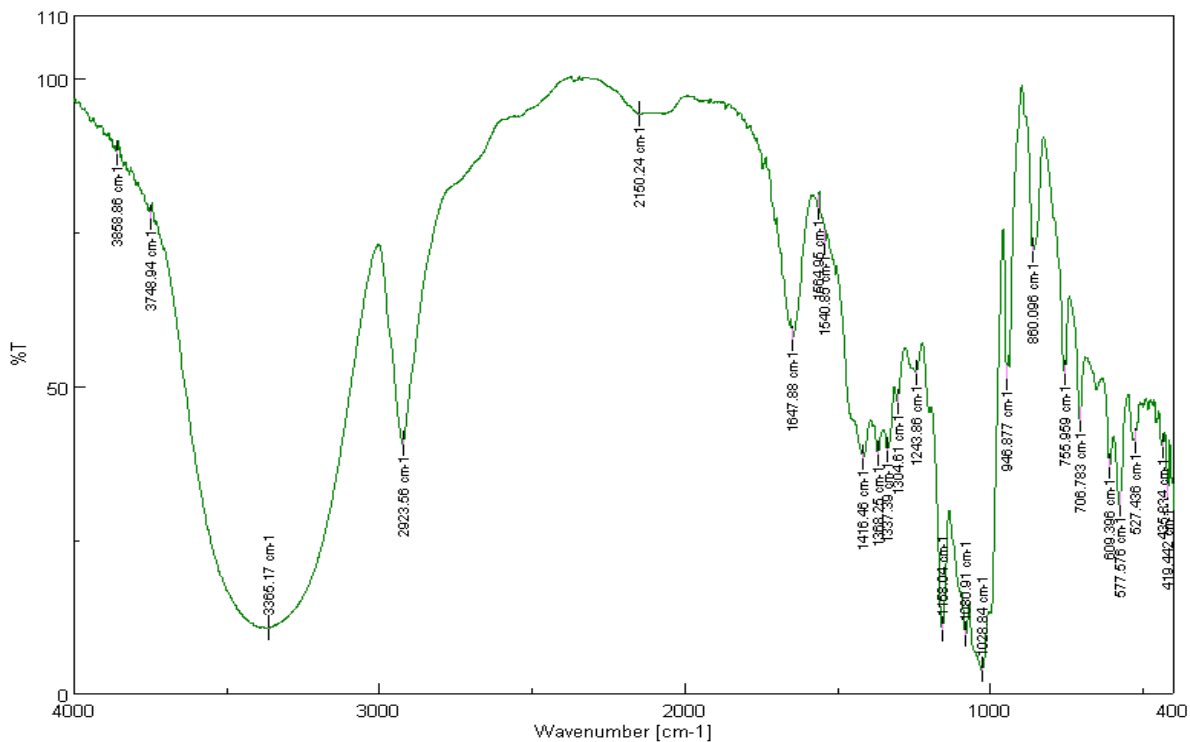
Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα FT-IR των υπόλοιπων δειγμάτων. Τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων **KTZ6**, **KTZ9** και **KTZ13** παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 8.5., όπου γίνεται και ο σχολιασμός τους.



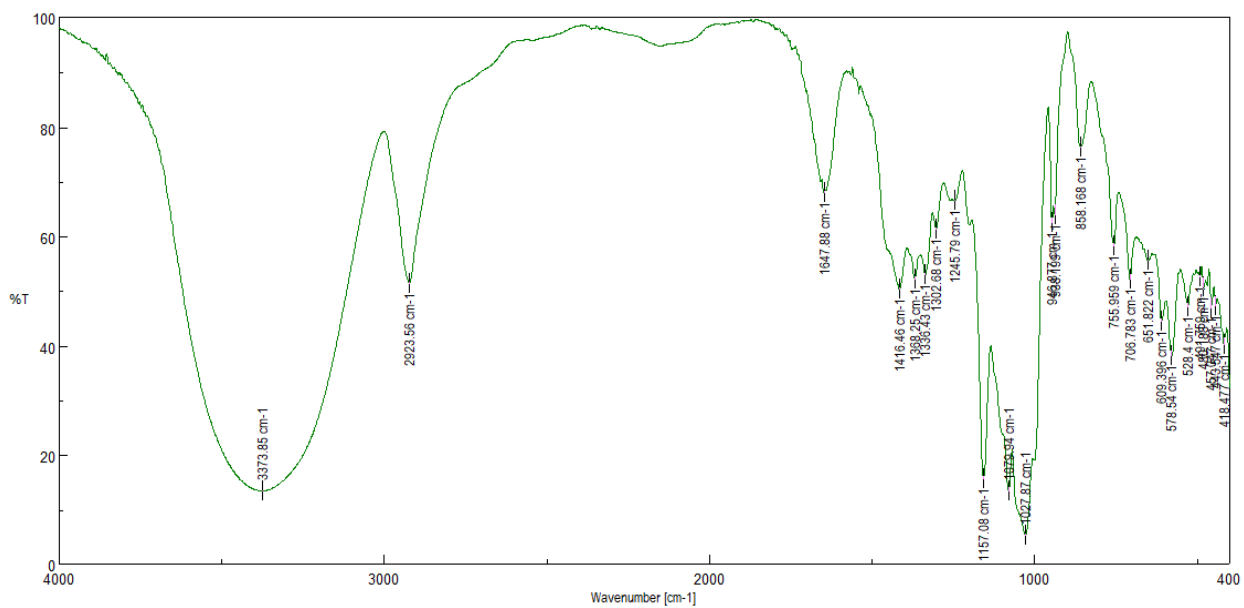
Εικόνα 49: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος **KTZ7**.



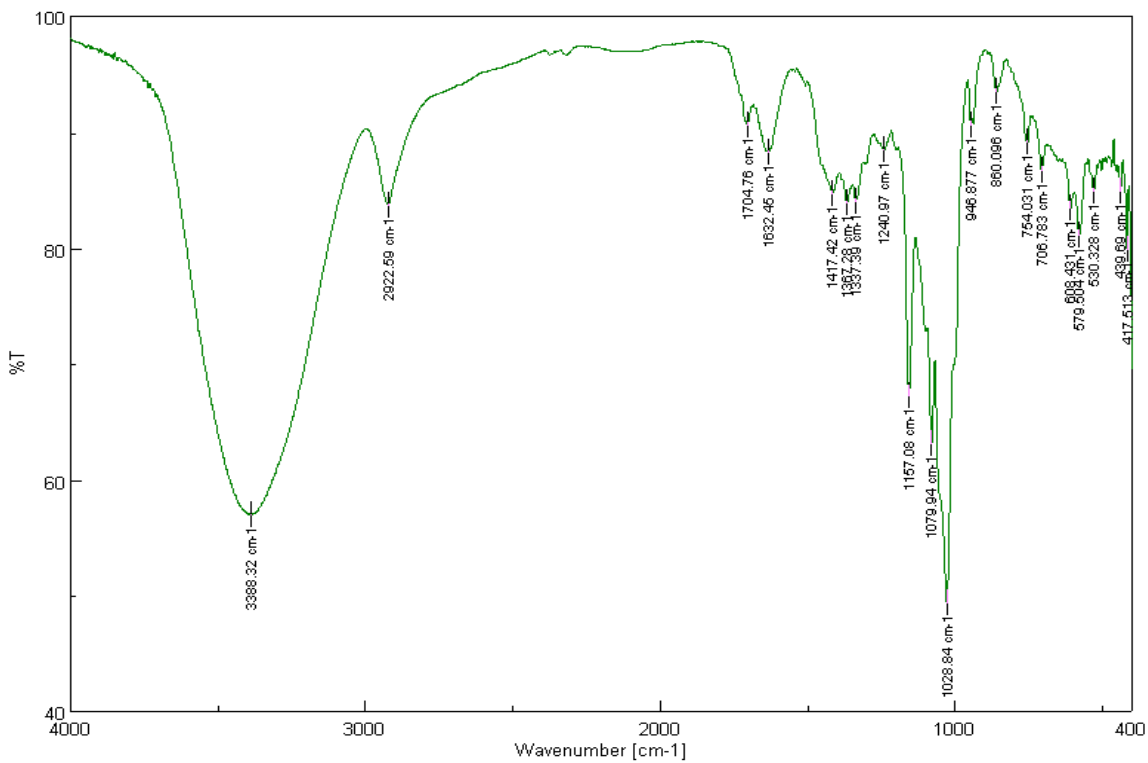
Εικόνα 50: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ8**.



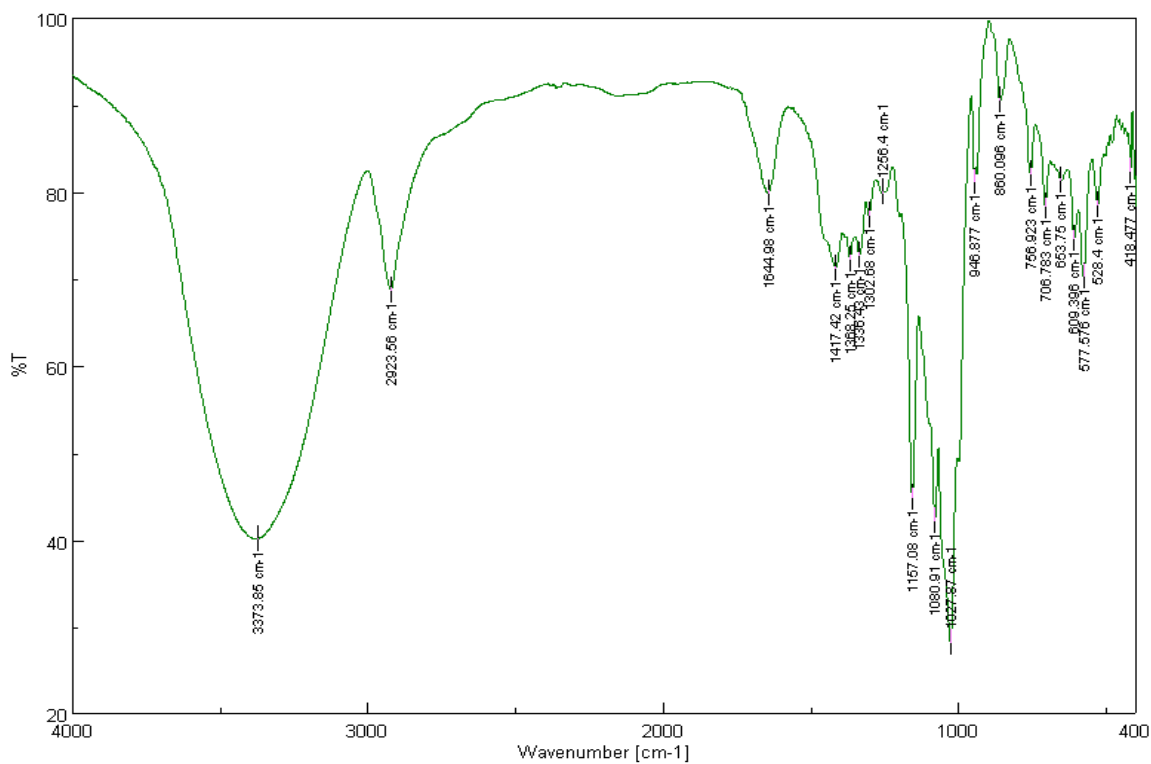
Εικόνα 51: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ10**.



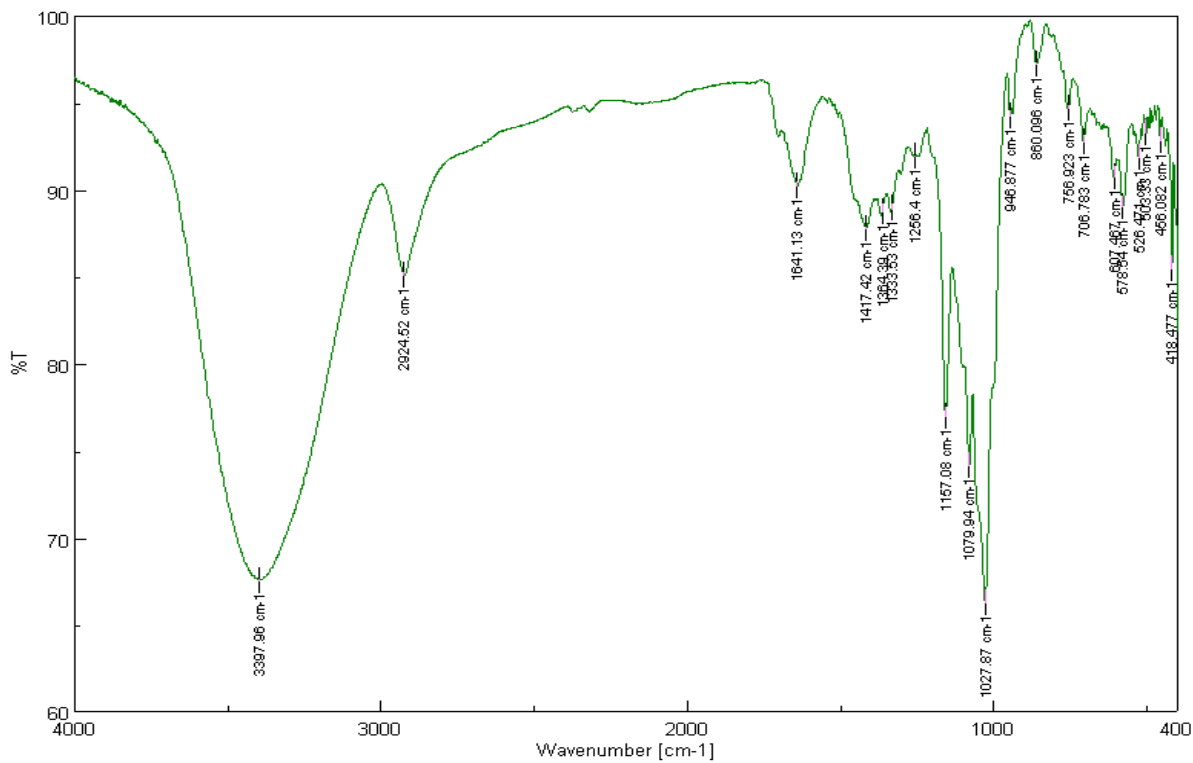
Εικόνα 52: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ11**.



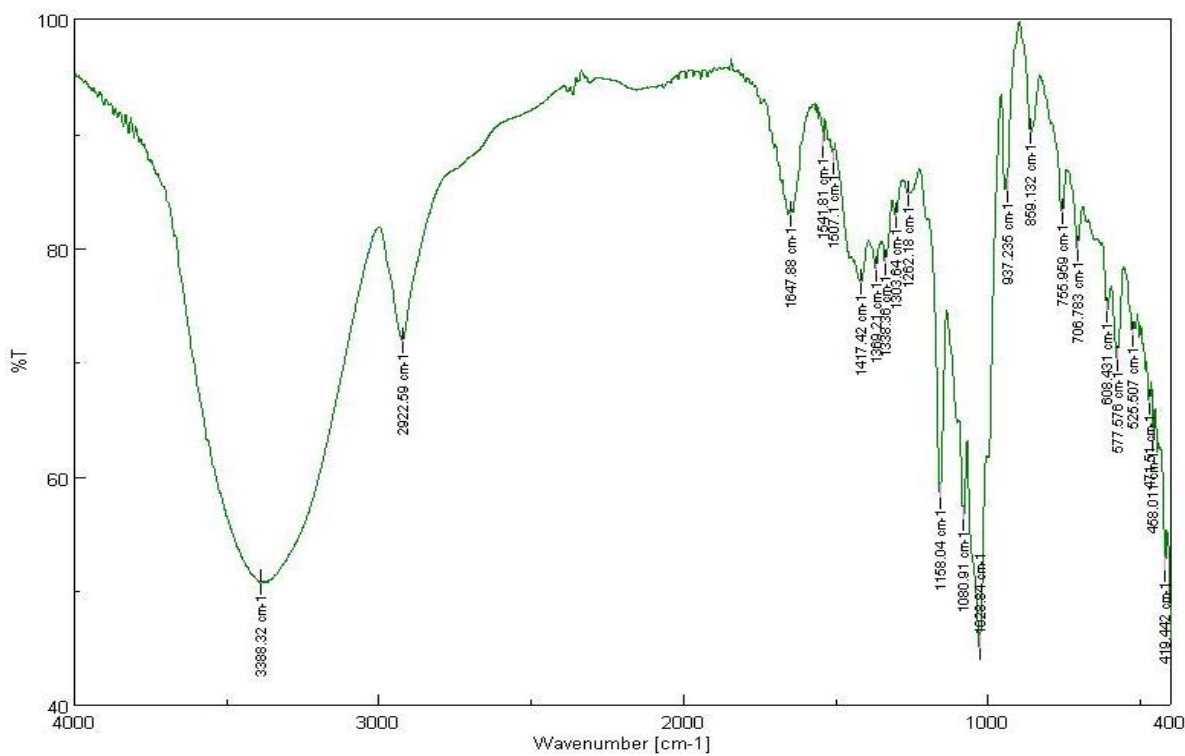
Εικόνα 53: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ15**.



Εικόνα 54: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος **KTZ12**.



Εικόνα 55: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ14**.



Εικόνα 56: Φάσμα FT-IR (KBr) του δείγματος εγκλεισμού **KTZ16**.

10. Βιβλιογραφία

1. Heber, D., R.N. Schulman, and N.P. Seeram, *Pomegranates: ancient roots to modern medicine*. 2006: CRC press.
2. Viuda-Martos, M., J. Fernández-López, and J. Pérez-Álvarez, *Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010. **9**(6): p. 635-654.
3. Miguel, M.G., M.A. Neves, and M.D. Antunes, *Pomegranate (Punica granatum L.): A medicinal plant with myriad biological properties-A short review*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010. **4**(25): p. 2836-2847.
4. Wang, H., et al., *Preparation of β -CD-Ellagic Acid Microspheres and Their Effects on HepG2 Cell Proliferation*. *Molecules*, 2017. **22**(12): p. 2175.
5. Güler, Z. and E. Gül, *Volatile organic compounds in the aril juices and seeds from selected five pomegranate (Punica granatum L.) cultivars*. *International Journal of Food Properties*, 2017. **20**(2): p. 281-293.
6. Akhtar, S., et al., *Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features*. *Food chemistry*, 2015. **174**: p. 417-425.
7. Goertz, A. and K.A. Ahmad, *Biological activity of phytochemical compounds in pomegranate-a review*. *EC Nutri-tion*, 2015. **1**: p. 115-127.
8. Aqil, F., M.V. Vadhanam, and R.C. Gupta, *Enhanced activity of punicalagin delivered via polymeric implants against benzo [a] pyrene-induced DNA adducts*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2012. **743**(1): p. 59-66.
9. Galiano, F., et al., *Functional Properties of Punica granatum L. Juice Clarified by Hollow Fiber Membranes*. *Processes*, 2016. **4**(3): p. 21.
10. Zarfeshany, A., S. Asgary, and S.H. Javanmard, *Potent health effects of pomegranate*. *Advanced biomedical research*, 2014. **3**.
11. Farag, R., et al., *Phytochemical screening and polyphenol constituents of pomegranate peels and leave juices*. *Agr Soil Sci*. 2014; **1** (6): 86, 2014. **93**.
12. Foss, S.R., et al., *Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 2014. **13**(1): p. 32.
13. Basu, A. and K. Penugonda, *Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice*. *Nutrition reviews*, 2009. **67**(1): p. 49-56.
14. Cerdá, B., et al., *The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans*. *European journal of nutrition*, 2004. **43**(4): p. 205-220.
15. Shiner, M., B. Fuhrman, and M. Aviram, *Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR γ and AP-1 pathway activation*. *Atherosclerosis*, 2007. **195**(2): p. 313-321.
16. Wang, L. and M. Martins-Green, *Pomegranate and its components as alternative treatment for prostate cancer*. *International journal of molecular sciences*, 2014. **15**(9): p. 14949-14966.
17. Liu, H., et al., *Main components of pomegranate, ellagic acid and luteolin, inhibit metastasis of ovarian cancer by down-regulating MMP2 and MMP9*. *Cancer biology & therapy*, 2017. **18**(12): p. 990-999.
18. Vidal, A., et al., *Studies on the toxicity of Punica granatum L.(Punicaceae) whole fruit extracts*. *Journal of ethnopharmacology*, 2003. **89**(2-3): p. 295-300.

19. Sánchez-Lamar, A., et al., *Assessment of the genotoxic risk of Punica granatum L.(Punicaceae) whole fruit extracts*. Journal of Ethnopharmacology, 2008. **115**(3): p. 416-422.
20. Nishigaki, I., et al., *Effect of extract of pomegranate (Punica granatum L.) on glycosylated protein-iron chelate-induced toxicity: An in vitro study on human umbilical-vein endothelial cells*. Journal of health science, 2008. **54**(4): p. 441-449.
21. Patel, C., et al., *Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**(8): p. 2728-2735.
22. Tayel, A.A., et al., *Exploration of Islamic medicine plant extracts as powerful antifungals for the prevention of mycotoxigenic Aspergilli growth in organic silage*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011. **91**(12): p. 2160-2165.
23. Cerdá, B., et al., *Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic*. Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(11): p. 3493-3501.
24. Meerts, I., et al., *Toxicological evaluation of pomegranate seed oil*. Food and Chemical Toxicology, 2009. **47**(6): p. 1085-1092.
25. Park, C., et al., *Controlled release of guest molecules from mesoporous silica particles based on a pH-responsive polypseudorotaxane motif*. Angewandte Chemie International Edition, 2007. **46**(9): p. 1455-1457.
26. Hirayama, F. and K. Uekama, *Cyclodextrin-based controlled drug release system*. Advanced drug delivery reviews, 1999. **36**(1): p. 125-141.
27. Saenger, W., *Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1980. **19**(5): p. 344-362.
28. Watson, M.A., J.M. Lea, and K.L. Bett-Garber, *Spray drying of pomegranate juice using maltodextrin/cyclodextrin blends as the wall material*. Food science & nutrition, 2017. **5**(3): p. 820-826.
29. Del Valle, E.M., *Cyclodextrins and their uses: a review*. Process biochemistry, 2004. **39**(9): p. 1033-1046.
30. Fenyvesi, E., M. Vikmon, and L. Szente, *Cyclodextrins in food technology and human nutrition: benefits and limitations*. Critical reviews in food science and nutrition, 2016. **56**(12): p. 1981-2004.
31. Ozdemir, N., et al., *Preparation of black pepper oleoresin inclusion complexes based on beta-cyclodextrin for antioxidant and antimicrobial delivery applications using kneading and freeze drying methods: A comparative study*. LWT, 2018. **91**: p. 439-445.
32. Lauro, M.R., et al., *An Alginate/Cyclodextrin Spray Drying Matrix to Improve Shelf Life and Antioxidant Efficiency of a Blood Orange By-Product Extract Rich in Polyphenols: MMPs Inhibition and Antiglycation Activity in Dysmetabolic Diseases*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017. **2017**.
33. Szejtli, J., *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*. Chemical reviews, 1998. **98**(5): p. 1743-1754.
34. Hedges, A.R., *Industrial applications of cyclodextrins*. Chemical reviews, 1998. **98**(5): p. 2035-2044.
35. Marques, H.M.C., *A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles*. Flavour and fragrance journal, 2010. **25**(5): p. 313-326.
36. Menard, F., M. Dedhiy, and C. Rhodes, *Potential pharmaceutical applications of a new beta cyclodextrin derivative*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1988. **14**(11): p. 1529-1547.
37. Loftsson, T. and M.E. Brewster, *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization*. Journal of pharmaceutical sciences, 1996. **85**(10): p. 1017-1025.
38. Abdelwahed, W., et al., *Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations*. Advanced drug delivery reviews, 2006. **58**(15): p. 1688-1713.

39. Loftsson, T. and D. Duchêne, *Cyclodextrins and their pharmaceutical applications*. International journal of pharmaceutics, 2007. **329**(1-2): p. 1-11.
40. Loftsson, T. and M.E. Brewster, *Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency*. Journal of pharmaceutical sciences, 2012. **101**(9): p. 3019-3032.
41. Silverstein, R.M., et al., *Spectrometric identification of organic compounds*. 2014: John Wiley & sons.
42. Stetefeld, J., S.A. McKenna, and T.R. Patel, *Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences*. Biophysical reviews, 2016. **8**(4): p. 409-427.
43. Goldburg, W., *Dynamic light scattering*. American Journal of Physics, 1999. **67**(12): p. 1152-1160.
44. Kwak, H.-S., *Nano-and Microencapsulation for Foods*. 2014: John Wiley & Sons.
45. Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*. 2017: Cengage learning.
46. Bhattacharjee, S., *DLS and zeta potential—What they are and what they are not?* Journal of Controlled Release, 2016. **235**: p. 337-351.
47. Παππά, Α., *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης: Χρωματογραφικές, Θερμικές, Ηλεκτρομετρικές Μέθοδοι, Φασματομετρία Μάζας*. Εκδ. ΕΜΠ, Αθήνα, 2004.
48. Waterman, P.G. and S. Mole, *Analysis of phenolic plant metabolites*. Vol. 83. 1994: Blackwell Scientific Oxford.
49. Blainski, A., G.C. Lopes, and J.C.P. De Mello, *Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from Limonium brasiliense L*. Molecules, 2013. **18**(6): p. 6852-6865.
50. Theppakorn, T. and K. Ploysri, *Development of a visual test kit for estimation of total polyphenols in tea*. International Food Research Journal, 2014. **21**(2): p. 501.
51. Rebaya, A., et al., *Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of Halimium halimifolium (Cistaceae)*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2014. **5**(1): p. 52-57.
52. Tohidi, B., M. Rahimmalek, and A. Arzani, *Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran*. Food Chemistry, 2017. **220**: p. 153-161.
53. Butler, L.G., M.L. Price, and J.E. Brotherton, *Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1982. **30**(6): p. 1087-1089.
54. Deng, J., W. Cheng, and G. Yang, *A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay*. Food Chemistry, 2011. **125**(4): p. 1430-1435.
55. Fathi, M., M.-R. Mozafari, and M. Mohebbi, *Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems*. Trends in food science & technology, 2012. **23**(1): p. 13-27.
56. Kotronia, M., et al., *Encapsulation of Oregano (Origanum onites L.) essential oil in β-cyclodextrin (β-CD): Synthesis and characterization of the inclusion complexes*. Bioengineering, 2017. **4**(3): p. 74.
57. Sanchez, V., et al., *Freeze-drying encapsulation of red wine polyphenols in an amorphous matrix of maltodextrin*. Food and Bioprocess Technology, 2013. **6**(5): p. 1350-1354.
58. Kesente, M., et al., *Encapsulation of Olive Leaves Extracts in Biodegradable PLA Nanoparticles for Use in Cosmetic Formulation*. Bioengineering, 2017. **4**(3): p. 75.
59. Zigoneanu, I.G., C.E. Astete, and C.M. Sabliov, *Nanoparticles with entrapped α-tocopherol: synthesis, characterization, and controlled release*. Nanotechnology, 2008. **19**(10): p. 105606.
60. Choi, M.-J., et al., *Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion–diffusion method*. Food Research International, 2009. **42**(1): p. 148-156.

61. Karathanos, V.T., et al., *Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin*. Food Chemistry, 2007. **101**(2): p. 652-658.
62. Gomes, C., R.G. Moreira, and E. Castell-Perez, *Microencapsulated antimicrobial compounds as a means to enhance electron beam irradiation treatment for inactivation of pathogens on fresh spinach leaves*. Journal of food science, 2011. **76**(6): p. E479-E488.
63. Saha, S., et al., *Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of β -cyclodextrin with vitamin molecules*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 35764.
64. Cetin Babaoglu, H., et al., *Encapsulation of clove essential oil in hydroxypropyl beta-cyclodextrin for characterization, controlled release, and antioxidant activity*. Journal of Food Processing and Preservation, 2017. **41**(5): p. e13202.
65. Banchemo, M., S. Ronchetti, and L. Manna, *Characterization of ketoprofen/methyl- β -cyclodextrin complexes prepared using supercritical carbon dioxide*. Journal of Chemistry, 2013. **2013**.
66. Abreu, F.O., et al., *Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation*. Carbohydrate polymers, 2012. **89**(4): p. 1277-1282.
67. Mueller-Harvey, I., *Analysis of hydrolysable tannins*. Animal feed science and technology, 2001. **91**(1-2): p. 3-20.
68. Πετροπούλου, Μ.Ο., *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης. Φασματομετρικές Μέθοδοι*. 2006: p. 68-69, 77-78, 293-308, 322-344, 383-411.