



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΝΑΝΟΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία:

Μελέτη του δομικού χαρακτηρισμού και της αντιοξειδωτικής δράσης συμπλόκων εγκλεισμού νέων πυραζολινών σε β-κυκλοδεξτρίνη με χρήση Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (ΗΠΣ).

Κουρτέση Χρυσούλα

Επιβλέποντες:

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση (ΕΜΠ)
Μεταδιδάκτωρ Μαρία Χατζηδάκη (ΕΙΕ)**

Σεπτέμβριος 2021

Περιεχόμενα

| | |
|---|-----------|
| Κατάλογος Εικόνων | 4 |
| Κατάλογος Πινάκων | 5 |
| Πρόλογος..... | 6 |
| Περίληψη..... | 7 |
| Abstract | 9 |
| 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 11 |
| 1.1 Κυκλοδεξτρίνες..... | 11 |
| 1.1.1 Γενικά..... | 11 |
| 1.1.2 Ιστορική Αναδρομή | 12 |
| 1.1.3 Δομή κυκλοδεξτρινών | 13 |
| 1.1.4 Ιδιότητες β-κυκλοδεξτρίνης | 14 |
| 1.1.5 Τοξικολογικές εκτιμήσεις | 15 |
| 1.1.6 Σχηματισμός συμπλόκου εγκλεισμού | 16 |
| 1.1.7 Πλεονεκτήματα της συμπλοκοποίησης με κυκλοδεξτρίνες | 18 |
| 1.1.8 Τρόφιμα και βελτιωτικά γεύσης | 18 |
| 1.1.9 Φαρμακευτικά προϊόντα..... | 20 |
| 1.1.10 Γεωργικές και χημικές βιομηχανίες | 22 |
| 1.1.11 Κόλλες, επιστρώσεις και άλλα πολυμερή | 23 |
| 1.1.12 Τεχνικές σχηματισμού μοριακών συμπλόκων | 24 |
| 1.2 Πυραζολίνες | 29 |
| 1.2.1 Γενικά..... | 29 |
| 1.2.2 Εφαρμογές..... | 29 |
| 1.2.3 Πυραζολίνες προς διερεύνηση | 31 |
| 1.3 Αντιοξειδωτικά | 32 |
| 1.3.1 Γενικά..... | 32 |
| 1.3.2 Εφαρμογές..... | 32 |
| 1.3.3 Ελεύθερες ρίζες..... | 34 |
| 1.3.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα | 37 |
| 1.3.5 Μέθοδοι μελέτης αντιοξειδωτικής ικανότητας | 39 |
| 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 43 |
| 2.1 Υλικά | 43 |
| 2.2 Όργανα | 43 |
| 2.3 Μέθοδοι | 45 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.3.1 | Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός (EPR)..... | 45 |
| 2.4 | Πειραματική διαδικασία | 52 |
| 2.4.1 | Προετοιμασία δειγμάτων-δομικός χαρακτηρισμός..... | 52 |
| 2.4.2 | Προετοιμασία δειγμάτων – αντιοξειδωτική δράση..... | 52 |
| 3 | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 54 |
| 3.1 | Δομικός χαρακτηρισμός | 54 |
| 3.2 | Μέθοδος ελέγχου αντιοξειδωτικής δράσης των συμπλόκων 1 και 2 | 60 |
| 4 | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 63 |
| 5 | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 65 |

Κατάλογος Εικόνων

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1-1 Χημική δομή της β-κυκλοδεξτρίνης (Α) και τρισδιάστατη απεικόνιση της γεωμετρικής δομής της (Β)..... | 14 |
| Εικόνα 1-2. Τρισδιάστατη σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού ενός τυπικού συμπλόκου εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης. (Mura, 2014) | 16 |
| Εικόνα 1-3. Δομή 2-πυραζολίνης..... | 29 |
| Εικόνα 1-4. Δομή του 2,2'-Azobis (2-aminidino-propane) dihydrochloride (AAPH)..... | 41 |
| Εικόνα 1-5. Δομή του fluorescein..... | 41 |
| Εικόνα 1-6. Δομή του Trolox..... | 41 |
| Εικόνα 1-7. Δομή του DPPH..... | 42 |
| Εικόνα 2-1.Φασματόμετρο ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού EPR..... | 43 |
| Εικόνα 2-2. Πεπλατυσμένη κυψελίδα για υγρά δείγματα τύπου WG-813-Q της εταιρίας Wildmand για EPR..... | 44 |
| Εικόνα 2-3. Ενεργειακή κατάσταση ενός ηλεκτρονίου παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου..... | 45 |
| Εικόνα 2-4. Ενδεικτική εικόνα φάσματος νιτροξειδίου στο EPR. Τα μεγέθη που φαίνονται στην εικόνα αξιοποιούνται στις αντίστοιχες εξισώσεις ώστε να βρεθούν τα μεγέθη τ_R , S και πολικότητα..... | 48 |
| Εικόνα 2-5. Χημική δομή 5-DSA..... | 49 |
| Εικόνα 2-6. Χημική δομή 16-DSA..... | 49 |
| Εικόνα 2-7. Χημική δομή της ρίζας 4-hydroxy-TEMPO (Tempol). | 50 |
| Εικόνα 2-8. Φάσμα EPR της σταθερής ρίζας 4-Hydroxy-tempo σε υπερκαθαρό νερό.... | 51 |
| Εικόνα 3-1Φάσμα νιτροξειδίου διαλύματος $10^{-4}M$ 16-DSA σε υπερκαθαρό H_2O | 54 |
| Εικόνα 3-2. Φάσματα νιτροξειδίου 5-DSA (Α) και 16-DSA (Β) διαλυμάτων $10^{-4} M$ σε μέσο DMSO..... | 55 |
| Εικόνα 3-3. Σύγκριση φασμάτων νιτροξειδίου διαλυμάτων $10^{-4} M$ 5-DSA (Α) και 16-DSA (Β) και $10mg/mL$ β-CD σε υπερκαθαρό H_2O | 55 |
| Εικόνα 3-4. Φάσματα νιτροξειδίου διαλυμάτων $10^{-5}M$ (Α) και $10^{-6}M$ (Β) 16-DSA και $1mg/mL$ β-CD σε υπερκαθαρό H_2O | 56 |
| Εικόνα 3-5. Σύγκριση φασμάτων νιτροξειδίου διαλυμάτων $10^{-4} M$ 5-DSA (Α) και διαλύματος $10^{-4} M$ 16-DSA (Β) και $1mg/mL$ συμπλόκου 1 σε υπερκαθαρό H_2O | 56 |
| Εικόνα 3-6. Σύγκριση φασμάτων νιτροξειδίου διαλυμάτων $10^{-4} M$ 5-DSA (Α) και διαλύματος $10^{-4} M$ 16-DSA (Β) και $1mg/mL$ συμπλόκου 2 σε υπερκαθαρό H_2O | 57 |
| Εικόνα 3-7. Σύγκριση φασμάτων νιτροξειδίου διαλυμάτων $10^{-5} M$ (Α) και διαλύματος $10^{-6} M$ 16-DSA (Β) και $1mg/mL$ συμπλόκου 1 σε υπερκαθαρό H_2O | 57 |
| Εικόνα 3-8. Σύγκριση φασμάτων νιτροξειδίου διαλυμάτων $10^{-5} M$ (Α) και διαλύματος $10^{-6} M$ 16-DSA (Β) και $1mg/mL$ συμπλόκου 2 σε υπερκαθαρό H_2O | 57 |
| Εικόνα 3-9. Αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος 1% v/v του συμπλόκου 1 εντός και εκτός συντήρησης στη διάρκεια μίας εβδομάδας. | 60 |
| Εικόνα 3-10. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των συμπλόκου 1 και 2 σε 5% v/v αναλογία με το TEMPOL (την Ημέρα 0 που φτιαχτήκαν)..... | 61 |
| Εικόνα 3-11. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του συμπλόκου 2 σε διαφορετικές αναλογίες 5% v/v, 10% v/v and 20% v/v, την Ημέρα 0 που παρασκευάστηκαν..... | 62 |

Κατάλογος Πινάκων

| | |
|---|----|
| Πίνακας 1-1. Ιδιότητες β-κυκλοδεξτρίνης..... | 14 |
| Πίνακας 1-2. Δομή των Πυραζολινών 1 και 2, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. | 31 |
| Πίνακας 2-1. Παράμετροι ρύθμισης του οργάνου EPR..... | 48 |
| Πίνακας 2-2. Παράμετροι ρύθμισης του οργάνου EPR για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας..... | 50 |
| Πίνακας 3-1. Τιμές του τ_R (ns) σε υδατικά διαλύματα 5-DSA και 16-DSA απουσία και παρουσία β-CD, με το σύμπλοκο 1 και με το σύμπλοκο 2..... | 58 |
| Πίνακας 3-2. Τιμές του S σε υδατικά διαλύματα 5-DSA και 16-DSA απουσία και παρουσία β-CD, με το σύμπλοκο 1 και με το σύμπλοκο 2..... | 58 |
| Πίνακας 3-3. Τιμές του a_0 σε υδατικά διαλύματα 5-DSA και 16-DSA απουσία και παρουσία β-CD, με το σύμπλοκο 1 και με το σύμπλοκο 2..... | 58 |

Πρόλογος

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής και Νανοβιοτεχνολογίας στο Ινστιτούτο Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν κοινά εργαστηριακά όργανα και διατάξεις φασματοσκοπικής ανάλυσης Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR).

Θα ήθελα, πρωτίστως, να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Δρ.Αναστασία Δέτση, Αναπλ. Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την ανάθεση της εργασίας, καθώς και για τη βοήθεια και συμβολή της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην Δρ.Μαρία Χατζηδάκη, Μεταδιδάκτορα του ΕΙΕ, για τη διαρκή βοήθεια και την καθοδήγησή της καθ' όλη αυτήν την περίοδο, όπως και για την υπομονή και επιμονή της, που με βοήθησε να ολοκληρώσω τη διπλωματική μου εργασία.

Επίσης, για την βοήθεια της και σημαντική συμβολή της θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υπ. Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ιωάννα Κωστοπούλου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ.Αριστοτέλη Ξενάκη, Ερευνητή Α' του ΕΙΕ για την εμπιστοσύνη του κατά την εκπόνηση των πειραμάτων μου στο ΕΙΕ, καθώς και τον Δρ.Σπυρίδων Αβραμιώτη, Μεταδιδάκτορα του ΕΙΕ, για τις γνώσεις που μου παρείχε στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την καθηγήτρια κα.Ε.Παυλάτου και τον καθηγητή κ.Λ.Ζουμπουλάκη για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην παρουσίαση της διπλωματικής μου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αδερφή μου για την υπομονή τους και τη συμπαράσταση, που μου παρείχαν σε όλη αυτή τη διαδικασία, αλλά και τους φίλους μου που με στήριξαν τα τελευταία χρόνια κατά τη φοίτησή μου στη Σχολή Χημικών Μηχανικών,

Περίληψη

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο δομικός χαρακτηρισμός και η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας δύο συμπλόκων εγκλεισμού β-κυκλοδεξτρίνης με δύο νέες πυραζολίνες, που συντέθηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Η κύρια χρήση των αντιοξειδωτικών είναι η παράταση της διάρκειας ζωής και η διατήρηση της ποιότητας των τροφίμων που περιέχουν λιπίδια, καθώς και η ρύθμιση των συνεπειών της οξειδωτικής βλάβης στο ανθρώπινο σώμα.

Όσον αφορά τα αντιοξειδωτικά, που χρησιμοποιήθηκαν στα 2 σύμπλοκα αυτής της μελέτης, πρόκειται για υβριδικά μόρια πυραζολινών-κινολινονών. Από προηγούμενη μελέτη η αντιοξειδωτική ικανότητά τους βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα υψηλή.

Το κύριο εμπόδιο, όμως, στο χειρισμό αυτών των ενώσεων είναι ότι έχουν πολύ χαμηλή διαλυτότητα σε κοινούς οργανικούς διαλύτες, καθώς και καθόλου διαλυτότητα στο νερό. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, επιλέχθηκε ο σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού πυραζολινών 1 και 2 σε β-CD.

Η β-κυκλοδεξτρίνη αποτελείται από 7 α-1,4-D-γλυκοπυρανοζυλικές μονάδες και είναι η πιο προσβάσιμη, χαμηλότερου κόστους και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη από όλες τις κυκλοδεξτρίνες. Η πιο σημαντική ίσως ιδιότητα των κυκλοδεξτρινών είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού. Κι αυτό, γιατί διαθέτουν μία κοιλότητα με άπολο χαρακτήρα και μία υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια.

Μετά τη συμπλοκοποίηση έγινε δομική μελέτη με χρήση της φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού, για να εξαχθούν συμπεράσματα για την αλληλεπίδραση της β-κυκλοδεξτρίνης με τα αντιοξειδωτικά.

Επίσης, ελέγχθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των συμπλόκων με χρήση της φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού, ώστε να διαπιστωθεί αν διατηρείται και σε τι βαθμό η αντιοξειδωτική δράση των πυραζολινών 1 και 2 μετά τη συμπλοκοποίηση τους με την β-κυκλοδεξτρίνη.

Για το δομικό χαρακτηρισμό των υδατικών διαλυμάτων με τα σύμπλοκα χρησιμοποιήθηκαν 2 αμφίφιλοι ιχνηθέτες το 5-doxyl-στεατικό οξύ (5-DSA) και το 16-doxyl-στεατικό οξύ (16-DSA). Για την αντιοξειδωτική ικανότητα των συμπλόκων στο νερό, χρησιμοποιήθηκε η υδρόφιλη ελεύθερη ρίζα Tempol.

Λέξεις Κλειδιά: κυκλοδεξτρίνες, πυραζολίνες, Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός, δομικός χαρακτηρισμός, 5-DSA, 16-DSA, αντιοξειδωτική δράση, Tempol.

Abstract

The aim of this diploma thesis was the structural characterization and the study of the antioxidant capacity of two β -cyclodextrin inclusion complexes with two novel pyrazoline analogues, synthesized in the Organic Chemistry Laboratory of the School of Chemical Engineering of the National Technical University of Athens.

The main use of antioxidants is to extend the shelf life and maintain the quality of lipid-containing foods, as well as to regulate the effects of oxidative damage on the human body.

Regarding the antioxidants, the ones used in the 2 complexes of this study are hybrid pyrazoline-quinoline molecules, which were found to possess a significant antioxidant activity in a previous study.

The main obstacle, however, in the handling of these compounds is that they have very low solubility in common organic solvents, as well as no solubility in water. In order to overcome this problem, the formation inclusion complexes of pyrazolines 1 and 2 in β -CD was chosen.

Beta-cyclodextrin consists of 7 α -1,4-linked D-glucopyranose subunits and is the most accessible, low cost and most widely used of all cyclodextrins. Perhaps the most important property of cyclodextrins is their ability to form inclusion complexes. This is because of an apolar cavity they have and a hydrophilic outer surface.

After complexation, a structural study was performed using Electronic Paramagnetic Resonance spectroscopy to draw some conclusions about the interaction of β -cyclodextrin with antioxidants.

In addition, the antioxidant capacity of the complexes was tested using Electronic Paramagnetic Resonance spectroscopy, to determine whether or not and to what extent the high antioxidant activity of pyrazolines 1 and 2 was maintained after their complexation with β -cyclodextrin.

Two amphiphilic probes, 5-DSA and 16-DSA, were used for the structural characterization of the aqueous solutions with the complexes. For the antioxidant capacity of the complexes in water, the hydrophilic free radical Tempol was used.

Keywords: cyclodextrins, pyrazolines, Electronic Paramagnetic Resonance, structural characterization, 5-DSA, 16-DSA, antioxidant activity, Tempol.

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Κυκλοδεξτρίνες

1.1.1 Γενικά

Οι κυκλοδεξτρίνες (cyclodextrins, CDs) είναι μη αναγωγικοί κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από μονάδες γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένες με α -(1,4) δεσμούς και προκύπτουν από τη δράση της γλυκοζυλοτρανσφεράσης (CGT) της κυκλοδεξτρίνης σε υδρολυμένο άμυλο. (ΓΕΩΡΓΙΟΥ, 1994) (Szejtli, 1998) (Valle, 2004).

Μελέτες κυκλοδεξτρινών σε διάλυμα υποστηρίζονται από μεγάλο αριθμό μελετών κρυσταλλικής δομής. Οι κυκλοδεξτρίνες κρυσταλλώνονται σε δύο κύριους τύπους κρυσταλλικού στοιβάγματος (crystal packing), δομών καναλιών και δομών «εκ παγίδευσης», ανάλογα με τον τύπο της κυκλοδεξτρίνης και της ένωσης του φιλοξενούμενου μορίου. Αυτές οι κρυσταλλικές δομές δείχνουν ότι οι κυκλοδεξτρίνες στα σύμπλοκα υιοθετούν την αναμενόμενη «στρογγυλή» δομή με όλες τις μονάδες γλυκοπυρανόζης στη διαμόρφωση ανακλίντρου 4C_1 . (Valle, 2004)

Λόγω της ικανότητάς τους να συνδέονται ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά ειδικά με άλλες κυκλοδεξτρίνες, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δομικά στοιχεία για την κατασκευή υπερμοριακών συμπλόκων. Η ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με οργανικά μόρια (φιλοξενούμενα μόρια) προσφέρει τη δυνατότητα κατασκευής υπερμοριακών νημάτων. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να κατασκευαστούν μοριακές αρχιτεκτονικές, όπως κατενάνια, ροταξάνες, πολυροταξάνες και σωλήνες. Τέτοια δομικά στοιχεία, τα οποία δεν μπορούν να παρασκευαστούν με άλλες μεθόδους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για παράδειγμα, για τον διαχωρισμό μιγμάτων συμπλόκων από μόρια και εναντιομερή (Szejtli, 1998).

Κάθε χρόνο οι κυκλοδεξτρίνες αποτελούν το αντικείμενο σχεδόν 1000 ερευνητικών άρθρων και επιστημονικών ερευνών, μεγάλος αριθμός των οποίων αφορά φάρμακα. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί πολυάριθμες εφευρέσεις οι οποίες περιλαμβάνουν κυκλοδεξτρίνες. Έτσι, περισσότερο από έναν αιώνα μετά την ανακάλυψή τους, οι κυκλοδεξτρίνες επιτέλους, αλλά γρήγορα, γίνονται αποδεκτές ως «νέα» φαρμακευτικά έκδοχα. (C. Folch-Cano, 2010) (Fernanda Pérez-Cruz, 2013).

1.1.2 Ιστορική Αναδρομή

Η εποχή των κυκλοδεξτρινών ξεκίνησε στα τέλη του 19ου αιώνα όταν, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μιας μικρής ποσότητας κρυσταλλικού υλικού από τον Γάλλο επιστήμονα Villiers σε απόβλητα αλκοόλης, που απομένουν μετά την παραγωγή δεξτρινών από άμυλο με ακάθαρτη βακτηριακή καλλιέργεια (1891). Ο Villiers ονόμασε το κρυσταλλικό του προϊόν "cellulosine" (ΓΕΩΡΓΙΟΥ, 1994) (Valle, 2004). Το 1903, μια άλλη εξέχουσα προσωπικότητα στην επιστήμη των κυκλοδεξτρινών ο Schardinger απομόνωσε και χαρακτήρισε το στέλεχος των βακτηρίων, *Bacillus macerans*, υπεύθυνο για τη σύνθεση κυκλοδεξτρίνης. Υποστήριξε, δηλαδή, όπως και άλλοι συγγραφείς, ότι ο Villiers χρησιμοποίησε πιθανώς ακάθαρτες καλλιέργειες και οι κυκλοδεξτρίνες παρήχθησαν από μόλυνση από τον *Bacillus macerans*. Ο Schardinger πραγματοποίησε επίσης μια σειρά πειραμάτων με κυκλοδεξτρίνες και κέρδισε τη φήμη ως ιδρυτής της χημείας των κυκλοδεξτρινών (Szejtli, 1998) (Sergey V. Kurkov, 2013).

Συγκεκριμένα το 1904, ο Schardinger απομόνωσε έναν νέο οργανισμό ικανό να παράγει ακετόνη και αιθυλική αλκοόλη από ζάχαρη και φυτικό υλικό που περιέχει άμυλο. Το 1911, περιέγραψε ότι αυτό το στέλεχος, που ονομάζεται *Bacillus macerans*, παράγει επίσης μεγάλες ποσότητες κρυσταλλικών δεξτρινών (25-30%) από το άμυλο. Ο Schardinger ονόμασε τα κρυσταλλικά του προϊόντα «κρυσταλλική δεξτρίνη α» και «κρυσταλλική δεξτρίνη β» (Eastburn SD, 1994). Χρειάστηκε έως το 1935 πριν απομονωθεί η δεξτρίνη γ. Αναπτύχθηκαν επίσης διάφορα σχήματα κλασμάτωσης για την παραγωγή κυκλοδεξτρινών (Stella VJ, 1997) (Matsuda H, 1999) (Mabuchi N, 2001). Εκείνη την εποχή οι δομές αυτών των ενώσεων ήταν ακόμη αβέβαιες, αλλά το 1942 οι δομές της α και β κυκλοδεξτρίνης προσδιορίστηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Buschmann HJ, 2002).

Το 1948, ακολούθησε η δομή ακτίνων X της γ-κυκλοδεξτρίνης και αναγνωρίστηκε ότι οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού. Το 1961 παρασχέθηκαν στοιχεία για τη φυσική ύπαρξη δ-, ζ-, ξ- και η-κυκλοδεξτρίνης. Το κύριο ενδιαφέρον για τις κυκλοδεξτρίνες έγκειται στην ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με διάφορες ενώσεις (Lu X, 2002) (Kumar R, 2001). Από τις δομές ακτίνων-X φαίνεται ότι στις κυκλοδεξτρίνες οι δευτεροταγείς ομάδες υδροξυλίου (C_2 και C_3) βρίσκονται στο μεγαλύτερο άκρο του δακτυλίου και οι πρωτοταγείς ομάδες υδροξυλίου (C_6) στο άλλο άκρο, και ότι τα άπολα υδρογόνα βρίσκονται στους C_3 και C_5 και τα οξυγόνα που μοιάζουν με αιθέρα βρίσκονται στο εσωτερικό των μορίων που μοιάζουν με δακτύλιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα μόριο με υδρόφιλο εξωτερικό, το οποίο μπορεί να διαλυθεί σε νερό, και μια μη-πολική κοιλότητα, η οποία παρέχει μια υδρόφοβη μήτρα, που περιγράφεται ως «μικρο ετερογενές περιβάλλον» (Szejtli, 1989) (Sahar Amiri, 2017).

Ως αποτέλεσμα αυτής της κοιλότητας, οι κυκλοδεξτρίνες είναι σε θέση να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού με μεγάλη ποικιλία υδρόφοβων φιλοξενούμενων μορίων. Ένα ή δύο φιλοξενούμενα μόρια μπορούν να παγιδευτούν από μία, δύο ή τρεις κυκλοδεξτρίνες. (Fernanda Pérez-Cruz, 2013)

1.1.3 Δομή κυκλοδεξτρινών

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι χρήσιμα μοριακά χηλωτικά αντιδραστήρια (Fernanda Pérez-Cruz, 2013). Διαθέτουν μια υπερμοριακρομοριακή δομή τύπου «εκ παγίδευσης» (cage compounds), η οποία είναι η ίδια με τις δομές που σχηματίζονται από κρυπτάνια, καλυξαρένια, κυκλοφάνια, σφαιρίδια και αιθέρες «στέμματα».

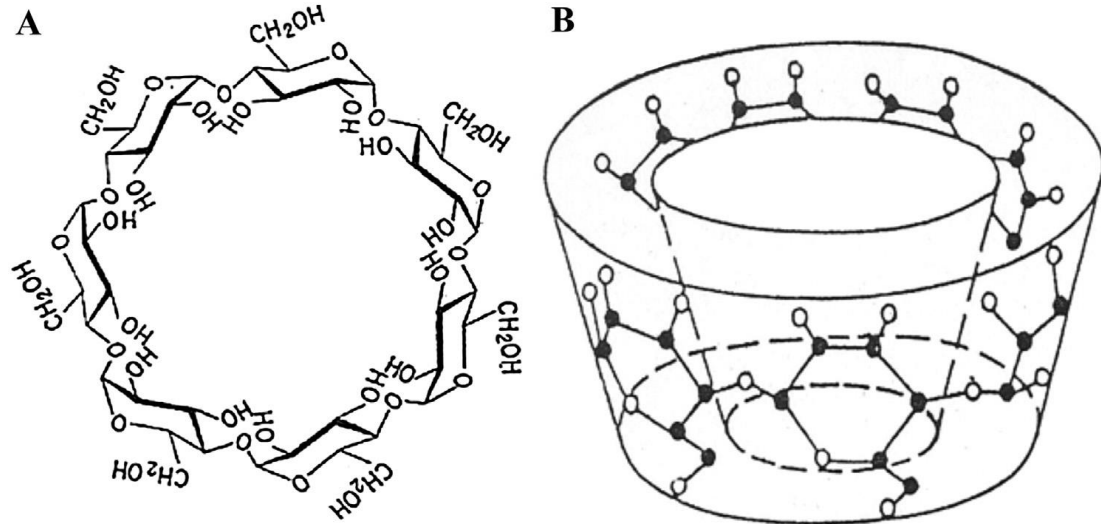
Αυτές οι ενώσεις, που έχουν υπερμοριακές δομές πραγματοποιούν χημικές αντιδράσεις, που περιλαμβάνουν ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις όπου δεν σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ αλληλεπιδρώντων μορίων, ιόντων ή ριζών. Η πλειονότητα όλων αυτών των αντιδράσεων είναι τύπου «ξενιστή-φιλοξενούμενου μορίου». Σε σύγκριση με όλους τους υπερμοριακούς ξενιστές που αναφέρονται παραπάνω, οι κυκλοδεξτρίνες είναι οι πιο σημαντικές. (Valle, 2004) Το σύμπλοκο δημιουργείται, καθώς ένα φιλοξενούμενο μόριο συγκρατείται εντός της λιπόφιλης κοιλότητας ενός μορίου ξενιστή κυκλοδεξτρίνης (Atmane Madene, 2006) (Guangyong Zhu, 2014). Η κοιλότητα κυκλοδεξτρίνης έχει έναν μη πολικό/άπολο χαρακτήρα παρόμοιο με ένα διάλυμα 80% διοξάνης/νερού και παρέχει ένα ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον, επειδή περιβάλλεται από γλυκοσιδικούς αιθέρες.

Η κύρια κινητήρια δύναμη της συμπλοκοποίησης είναι η απελευθέρωση πλούσιων σε ενθαλπία μορίων νερού από την κοιλότητα (R.L. Carrier, 2007) (Szejtli, 1998) (Szejtli, 1994) (C. Jullian, 2007) (H.A. Archontaki, 2002) (Terekhova, 2011). Η αντικατάσταση των μορίων του νερού από τα πιο υδρόφοβα μόρια ξενιστών, που υπάρχουν στο διάλυμα οδηγεί σε σχηματισμό ενός συμπλόκου εγκλεισμού μεταξύ του ξενιστή και του φιλοξενούμενου (S. Brochsztain, 1997). Εξαιτίας της ικανότητας σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού, οι ιδιότητες των υλικών με τα οποία συμπλοκοποιούνται μπορούν να τροποποιηθούν σημαντικά (Simona Rossi, 2007).

Ως αποτέλεσμα φαινομένων μοριακής συμπλοκοποίησης, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλά βιομηχανικά προϊόντα, τεχνολογίες και αναλυτικές μεθόδους. Τα αμελητέα κυτταροτοξικά αποτελέσματα των κυκλοδεξτρινών είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό σε εφαρμογές όπως τρόφιμα και βελτιωτικά γεύσης, καλλυντικά, συσκευασίες, υφάσματα, διαδικασίες διαχωρισμού, προστασία του περιβάλλοντος, ζύμωση και κατάλυση. (Valle, 2004)

1.1.4 Ιδιότητες β-κυκλοδεξτρίνης

Οι πιο χαρακτηριστικές κυκλοδεξτρίνες είναι τριών τύπων: α-κυκλοδεξτρίνη, β-κυκλοδεξτρίνη και γ-κυκλοδεξτρίνη, που αναφέρονται ως πρώτης γενιάς ή μητρικές κυκλοδεξτρίνες και γ-κυκλοδεξτρίνη, και αποτελούνται από 6, 7 και 8 α-1,4-D-γλυκοπυρανοζυλικές μονάδες αντίστοιχα (Dass CR, 2000). Η β-κυκλοδεξτρίνη (Εικόνα 1-1) είναι η πιο προσβάσιμη, με τη χαμηλότερη τιμή και γενικά η πιο χρήσιμη. Οι κύριες ιδιότητες της β-κυκλοδεξτρίνης, την οποία και θα μελετήσουμε στη συνέχεια, δίνεται στον παρακάτω Πίνακα 1.



Εικόνα 1-1 Χημική δομή της β-κυκλοδεξτρίνης (A) και τρισδιάστατη απεικόνιση της γεωμετρικής δομής της (B).

Πίνακας 1-1. Ιδιότητες β-κυκλοδεξτρίνης.

| Ιδιότητες | β-Κυκλοδεξτρίνη |
|--|-----------------|
| Αριθμός μονάδων γλυκοπυρανόζης | 7 |
| Μοριακό βάρος (g/mol) | 1134.12 |
| Διαλυτότητα στο νερό στους 25°C (% w/v) | 1.85 |
| Εξωτερική Διάμετρος (Å) | 15.4 |
| Διάμετρος κοιλότητας (Å) | 6.0-6.5 |
| Υψος (Å) | 7.9 |
| Κοιλότητα (Å ²) | 262 |

1.1.5 Τοξικολογικές εκτιμήσεις

Μια σημαντική πτυχή, που στηρίζεται στη φύση των κυκλοδεξτρινών ως σακχαρίτες είναι η μη τοξικότητά τους για τον άνθρωπο. (Sergey V. Kurkov, 2013). Γενικά, οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες και τα υδρόφιλα παράγωγά τους είναι σε θέση να διαπεράσουν μόνο λιπόφιλες βιολογικές μεμβράνες, όπως ο κερατοειδής του οφθαλμού, με σημαντική δυσκολία. Ακόμη και η κάπως λιπόφιλη τυχαία μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη δεν διαπερνά πρόθυμα τις λιπόφιλες μεμβράνες, αν και αλληλεπιδρά πιο εύκολα με μεμβράνες από ό, τι τα υδρόφιλα παράγωγα κυκλοδεξτρίνης (Totterman AM, 1997).

Όλες οι μελέτες τοξικότητας έχουν δείξει ότι οι κυκλοδεξτρίνες, που χορηγούνται από το στόμα είναι πρακτικά μη τοξικές, λόγω έλλειψης απορρόφησης από το γαστρεντερικό σωλήνα (Irie T, 1997). Ωστόσο, τοξικολογικές μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι οι μητρικές α- και β-κυκλοδεξτρίνες και οι μεθυλιωμένες β-κυκλοδεξτρίνες δεν είναι κατάλληλες για παρεντερική χορήγηση. Ωστόσο, λόγω μιας ατυχούς παρεξήγησης, αυτό το γεγονός δεν αναγνωρίστηκε αμέσως και αναβλήθηκε η χρήση της κυκλοδεξτρίνης για δεκαετίες (Szejtli, 1998).

Παρ' όλα αυτά, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται τώρα ενεργά σε φαρμακευτικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων σκευασμάτων που προορίζονται για ένεση, τα οποία έχουν αυστηρές απαιτήσεις όσον αφορά την ανοχή από τον άνθρωπο. Αρκετές δημοσιεύσεις αναφέρουν πλήρεις καταλόγους φαρμάκων, που περιέχουν κυκλοδεξτρίνη, και έχουν εγκριθεί επιτυχώς από Υπηρεσίες Κανονισμού (regulatory agencies) στις ΗΠΑ, την ΕΕ και την Ιαπωνία (Thorsteinn Loftsson, 2007) (Sergey V. Kurkov, 2013).

Η β-κυκλοδεξτρίνη είναι λιγότερο ερεθιστική από την α-κυκλοδεξτρίνη μέσω ενδομυϊκής ένεσης· δεσμεύει τη χοληστερόλη· πολύ μικρές ποσότητες (1-2%) απορροφώνται στην άνω εντερική οδό μετά τη χορήγηση μέσω στόματος· δεν υπάρχει μεταβολισμός στην άνω εντερική οδό· μεταβολίζεται από βακτήρια στο τυφλό και το κόλον. Επί του παρόντος είναι η πιο κοινή κυκλοδεξτρίνη σε φαρμακευτικά σκευάσματα και, επομένως, πιθανώς η καλύτερα μελετημένη κυκλοδεξτρίνη σε ανθρώπους. Η εφαρμογή υψηλών δόσεων μπορεί να είναι επιβλαβής και δεν συνιστάται· βακτηριακή αποδόμηση και ζύμωση στο παχύ έντερο μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή αερίου και διάρροια, LD₅₀(από το στόμα) για αρουραίους > 5000 mg/kg, LD₅₀(ενδοφλέβια) για αρουραίους: μεταξύ 450 και 790 mg/kg. (Valle, 2004)

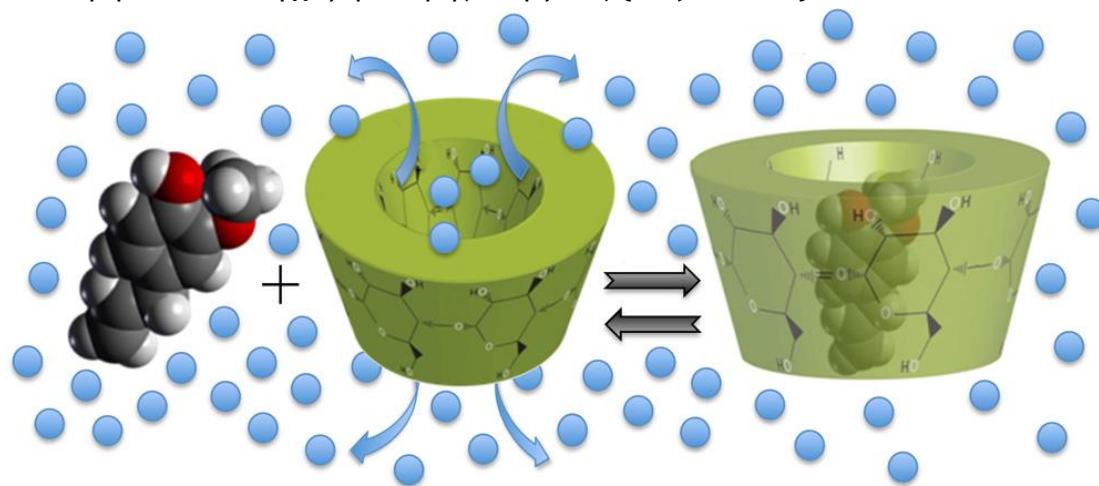
Μελέτες έχουν δείξει ότι οι δια στόματος χορηγούμενες κυκλοδεξτρίνες φαρμακευτικού ενδιαφέροντος είναι πρακτικά μη τοξικές λόγω της έλλειψης απορρόφησης από το γαστρεντερικό σωλήνα (T Irie, 1997). Η παρεντερική χορήγηση β-CD ή μεθυλιωμένη β-CD μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική τοξικότητα,

και έτσι, τόσο η μητρική β -CD όσο και οι μεθυλιωμένες β -CD, όπως το RM β CD, δεν χρησιμοποιούνται σε παρεντερικά σκευάσματα. (Sergey V. Kurkon, 2013)

1.1.6 Σχηματισμός συμπλόκου εγκλεισμού

Το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των κυκλοδεξτρινών είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν στερεά σύμπλοκα εγκλεισμού (σύμπλοκα ξενιστών-φιλοξενούμενων μορίων) με ένα πολύ ευρύ φάσμα στερεών, υγρών και αερίων ενώσεων με μοριακή συμπλοκοποίηση. Σε αυτά τα σύμπλοκα (Εικόνα 1-2), ένα φιλοξενούμενο μόριο συγκρατείται εντός της κοιλότητας του μορίου κυκλοδεξτρίνης (μόριο ξενιστής).

Ο σχηματισμός συμπλόκου είναι μια διαστασιακή προσαρμογή μεταξύ της κοιλότητας του ξενιστή και του φιλοξενούμενου μορίου. Η λιπόφιλη κοιλότητα των μορίων κυκλοδεξτρίνης παρέχει ένα μικροπεριβάλλον, στο οποίο μπορούν να εισέλθουν κατάλληλα μεγέθη μη πολικών τμημάτων για να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού. Κανένας ομοιοπολικός δεσμός δεν σπάει ή σχηματίζεται κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου εγκλεισμού (E Schneiderman, 2000). Η κύρια κινητήρια δύναμη του σχηματισμού συμπλόκου είναι η απελευθέρωση μορίων νερού πλούσιων σε ενθαλπία από την κοιλότητα. Τα μόρια του νερού μετατοπίζονται από πιο υδρόφοβα φιλοξενούμενα μόρια που υπάρχουν στο διάλυμα για να επιτευχθεί μια άπολη-άπολη συσχέτιση και μείωση του ανοίγματος (strain) του δακτυλίου κυκλοδεξτρίνης με αποτέλεσμα μια πιο σταθερή κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας (Szejtli, 1998).



Εικόνα 1-2. Τρισδιάστατη σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού ενός τυπικού συμπλόκου εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης. (Muga, 2014)

Η δέσμευση των φιλοξενούμενων μορίων εντός της κυκλοδεξτρίνης ξενιστή δεν είναι σταθερή ή μόνιμη, αλλά μάλλον είναι μια δυναμική ισορροπία. Η δύναμη σύνδεσης εξαρτάται από το πόσο καλά ταιριάζει το σύμπλοκο «ξενιστής-φιλοξενούμενο μόριο» (Valle, 2004) και κυρίως από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, που αφορούν τον φιλοξενούμενο και τη σχετικά υδρόφοβη

κοιλότητα του ξενιστή, και ως εκ τούτου οδηγείται από την ενθαλπική συνεισφορά.

Η λιπόφιλη εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης παρέχει ένα κατάλληλο μικροπεριβάλλον για έναν άπολο φιλοξενούμενο, εάν αυτό έχει την κατάλληλη διατομή για να χωρέσει μέσα στην κοιλότητα, καθώς οι υδρόφοβες (van der Waals) αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται αυστηρά από τη διαμοριακή απόσταση (Gerhard Wenz 1, 2006). Εάν το φιλοξενούμενο μόριο φέρει πολικά υποκατάστατα, αυτά μπορεί να αλληλεπιδρούν με τα υδροξυλικά χείλη της κυκλοδεξτρίνης και να δημιουργούν, σταθεροποιητικούς δεσμούς υδρογόνου (Liu, Han, & Zhang, 2004). Επιπλέον, η απελευθέρωση νερού από την κοιλότητα κυκλοδεξτρίνης (περίπου 6.5 μόρια νερού/ β -CD δακτύλιο, κατανεμημένα σε οκτώ θέσεις) και από το φιλοξενούμενο μόριο στη μαζική φάση παίζει ευνοϊκό εντροπικό ρόλο στον εγκλεισμό (Fernanda Pérez-Cruz, 2013).

Τα σύμπλοκα μπορούν να σχηματιστούν, είτε σε διάλυμα, είτε σε κρυστάλλινη κατάσταση και το νερό είναι τυπικά ο διαλύτης που επιλέγεται. Η συμπλοκοποίηση εγκλεισμού μπορεί να επιτευχθεί σε ένα σύστημα συνδιαλυτών και παρουσία οποιουδήποτε μη υδατικού διαλύτη. Η αρχιτεκτονική της κυκλοδεξτρίνης αποδίδει σε αυτά τα μόρια ένα ευρύ φάσμα χημικών ιδιοτήτων που είναι σημαντικά διαφορετικές από εκείνες που εμφανίζονται από μη κυκλικούς υδατάνθρακες στο ίδιο εύρος μοριακού βάρους.

Ο εγκλεισμός στις κυκλοδεξτρίνες ασκεί βαθιά επίδραση στις φυσικοχημικές ιδιότητες των φιλοξενούμενων μορίων, καθώς είναι προσωρινά κλειδωμένα ή εγκλωβισμένα μέσα στην κοιλότητα του ξενιστή, προκαλώντας ευεργετικές τροποποιήσεις των φιλοξενούμενων μορίων, οι οποίες δεν είναι εφικτές αλλιώς. Αυτές οι ιδιότητες είναι: η ενίσχυση της διαλυτότητας των εξαιρετικά αδιάλυτων φιλοξενούμενων μορίων, σταθεροποίηση των ασταθών φιλοξενούμενων μορίων έναντι των αποδομητικών επιδράσεων της οξείδωσης, της ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας και της θερμότητας, έλεγχος της πτητικότητας και της εξάχνωσης, φυσική απομόνωση ασυμβίβαστων ενώσεων, χρωματογραφικοί διαχωρισμοί, τροποποίηση της γεύσης καλύπτοντας γεύσεις, δυσάρεστες οσμές και ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων και γεύσεων. Επομένως, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, στα φαρμακευτικά προϊόντα, στα καλλυντικά, στην προστασία του περιβάλλοντος (Minerva Lezcano, 2002), στη βιομετατροπή, στη συσκευασία και στη βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας (Sahar Amiri, 2017).

1.1.7 Πλεονεκτήματα της συμπλοκοποίησης με κυκλοδεξτρίνες

Κατά τη συμπλοκοποίηση το φιλοξενούμενο μόριο μικρο-εγκλείεται από μικροσκοπική άποψη. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε πλεονεκτικές αλλαγές στις χημικές και φυσικές ιδιότητες του. Όπως:

- Αυξημένη σταθεροποίηση ευαίσθητων στο φως ή στο οξυγόνο ουσιών.
- Τροποποίηση της χημικής αντιδραστικότητας των φιλοξενούμενων μορίων.
- Ικανότητα ελέγχου της απελευθέρωσης μορίων (π.χ. πτητικών).
- Βελτίωση της διαλυτότητας των ουσιών
- Προστασία από την αποικοδόμηση ουσιών από μικροοργανισμούς.
- Κάλυψη κακής μυρωδιάς και γεύσης.
- Κάλυψη χρωστικών ουσιών ή το χρώμα των ουσιών.
- Καταλυτική δράση των κυκλοδεξτρινών με φιλοξενούμενα μόρια.

Αυτά τα χαρακτηριστικά των κυκλοδεξτρινών ή των παραγώγων τους τα καθιστούν κατάλληλα για εφαρμογές στην αναλυτική χημεία, τη γεωργία, τον φαρμακευτικό τομέα, σε είδη τροφίμων και τουαλέτας (Mamata Singh, December 2002) (Valle, 2004) (Adrian Matencio, 2020).

1.1.8 Τρόφιμα και βελτιωτικά γεύσης

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται σε σκευάσματα τροφίμων για προστασία γεύσης ή ενίσχυση γεύσης. Μπορούν να ενσωματωθούν σε συσκευασίες τροφίμων (οι λεγόμενες "κενές κυκλοδεξτρίνες") ή να συμπλοκοποιηθούν με βιοδραστικές ενώσεις, που λειτουργούν ως συστήματα μεταφοράς και στοχευμένης αποδέσμευσης (Szente & Fenyvesi, 2018).

Οι κενές κυκλοδεξτρίνες στη συσκευασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εγκλωβίσουν υδρόφοβες ενώσεις είτε από το εσωτερικό της συσκευασίας είτε από έξω. (Adrian Matencio, 2020) Σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με μια ποικιλία μορίων που περιλαμβάνουν λίπη, γεύσεις και χρώματα. Οι περισσότερες φυσικές και τεχνητές γεύσεις είναι πτητικά έλαια ή υγρά και η συμπλοκοποίηση με κυκλοδεξτρίνες παρέχει μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στις συμβατικές τεχνολογίες εγκλεισμού, που χρησιμοποιούνται για την προστασία της γεύσης.

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται επίσης ως πρόσθετα σε διεργασίες τροφίμων. Για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση της χοληστερόλης από γαλακτοκομικά προϊόντα (L'opez -de-Dicastillo et al., 2011) (Adrian Matencio, 2020), το βούτυρο και τα αυγά. Οι κυκλοδεξτρίνες

αναφέρθηκαν ότι έχουν επίδραση βελτίωσης της υφής στη ζύμη και στα προϊόντα κρέατος.

Άλλες εφαρμογές προκύπτουν από την ικανότητά τους να μειώνουν την πικρή γεύση, την άσχημη μυρωδιά και γεύση και να σταθεροποιούν τις γεύσεις, όταν υποβάλλονται σε μακροχρόνια αποθήκευση. Γαλακτώματα όπως μαγιονέζα, μαργαρίνη ή κρέμες βουτύρου μπορούν να σταθεροποιηθούν με α -κυκλοδεξτρίνη. Η χρήση β -κυκλοδεξτρίνης μπορεί να αφαιρέσει τη χοληστερόλη από το γάλα· για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων χαμηλής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη (Szejtli, 1998) (Valle, 2004).

Οι κυκλοδεξτρίνες δρουν ως μόρια ενθυλάκωσης συγκεκριμένων ουσιών, προστατεύοντας τη γεύση σε πολλές αυστηρές μεθόδους επεξεργασίας τροφίμων κατάψυξης, απόψυξης και μικροκυμάτων. Η β -κυκλοδεξτρίνη ως μόριο ενθυλάκωσης επιτρέπει τη διατήρηση της ποιότητας και της ποσότητας της γεύσης σε μεγαλύτερο βαθμό και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με άλλα εγκλωβιστικά και παρέχει μακροβιότητα στο είδος τροφίμων (Valle, 2004).

Διατηρούν και ελέγχουν την απελευθέρωση μιας βιοδραστικής ουσίας στην εσωτερική κοιλότητα, ενεργώντας ως συντηρητικά και ως εκ τούτου μειώνουν τη χρήση προσθέτων τροφίμων ή στην εξωτερική επιφάνεια της συσκευασίας για να παρέχουν προστασία από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Έχει περιγραφεί πώς μια αύξηση των επιπέδων υγρασίας στο χώρο των συσκευασμένων φρέσκων λαχανικών ή φρούτων, η οποία σχετίζεται με την αλλοίωση, μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση της βιοδραστικής ουσίας, όταν χρησιμοποιούνται CD ως φορείς (Adrian Matencio, 2020).

Μεταξύ αυτών των συμπλόκων εγκλεισμού, που χρησιμοποιούνται για τη συσκευασία τροφίμων, τα πιο μελετημένα είναι εκείνα που ενσωματώνουν αντιμικροβιακές βιοδραστικές ενώσεις για να αυξήσουν τη διάρκεια ζωής των συσκευασμένων τροφίμων μειώνοντας την ανάπτυξη βακτηρίων και/ή μυκήτων. Τέτοια σύμπλοκα έχουν αποδείξει την ικανότητά τους να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής και να διατηρούν την ποιότητα του συσκευασμένου κρέατος (Jia XiaoYun, 2018), μανιτάρια (Cheng M, 2019) και φρούτα (Laura Buendía Moreno, 2020) (Adrian Matencio, 2020).

Στην Ιαπωνία, οι κυκλοδεξτρίνες έχουν εγκριθεί ως «τροποποιημένο άμυλο» για εφαρμογές τροφίμων για περισσότερο από δύο δεκαετίες, χρησιμεύοντας στο να καλύψουν τις οσμές στα φρέσκα τρόφιμα και να σταθεροποιήσουν τα ιχθυέλαια. Στην Ευρώπη διάφορες χώρες, έχουν εγκρίνει την κυκλοδεξτρίνη για χρήση σε ορισμένες εφαρμογές λόγω της χαμηλής τοξικότητάς της. (Valle, 2004)

1.1.9 Φαρμακευτικά προϊόντα

Μια φαρμακευτική ουσία πρέπει να έχει ένα ορισμένο βαθμό υδατοδιαλυτότητας για να μεταφερθεί και να αποδεσμευτεί εύκολα στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά πρέπει να είναι αρκετά υδρόφοβη για να μπορέσει να διασχίσει τη μεμβράνη. Μία από τις μοναδικές ιδιότητες των κυκλοδεξτρινών είναι η ικανότητά τους να ενισχύουν την μεταφορά φαρμάκων μέσω βιολογικών μεμβρανών. Γενικά, οι βιολογικές μεμβράνες αποτελούνται από ένα υδρόφιλο εξωτερικό τμήμα και ένα φράγμα λιπόφιλης μεμβράνης (lipophilic membrane barrier). Τα φάρμακα μεταφέρονται κυρίως μέσω μεμβρανών μέσω παθητικής διάχυσης (Sergey V. Kurkov, 2013).

Τα μόρια κυκλοδεξτρίνης είναι σχετικά μεγάλα (μοριακό βάρος που κυμαίνεται από σχεδόν 1000 έως πάνω από 1500), με μια ενυδατωμένη εξωτερική επιφάνεια. Έτσι, υπό κανονικές συνθήκες, τα μόρια της κυκλοδεξτρίνης θα διαπεράσουν μόνο τις βιολογικές μεμβράνες με σημαντική δυσκολία (ΓΕΩΡΓΙΟΥ, 1994).

Γι' αυτό το λόγο ο πιο διαδεδομένος ρόλος τους στη φαρμακευτική επιστήμη είναι η δράση τους ως πραγματικοί φορείς διατηρώντας τα υδρόφοβα μόρια του φαρμάκου σε διάλυμα και μεταφέροντάς τα στην επιφάνεια της λιπόφιλης κυτταρικής μεμβράνης, π.χ. δέρμα, βλεννογόνο ή κερατοειδής οφθαλμού, όπου χωρίζονται μέσα στη μεμβράνη. Η σχετικά λιπόφιλη μεμβράνη έχει χαμηλή συγγένεια με τα υδρόφιλα μόρια κυκλοδεξτρίνης και ως εκ τούτου, παραμένουν στο εξωτερικό της υδατικής μεμβράνης, π.χ. το σύστημα υδατικών φορέων (όπως κρέμα τύπου λάδι σε νερό ή υδρογέλη), σάλιο ή το δακρυϊκό υγρό (Valle, 2004).

Οι συμβατικοί ενισχυτές διείσδυσης, όπως οι αλκοόλες και τα λιπαρά οξέα, διαταράσσουν τα λιπιδικά στρώματα του βιολογικού φραγμού. Οι κυκλοδεξτρίνες, από την άλλη πλευρά, λειτουργούν ως ενισχυτές διείσδυσης αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα των φαρμάκων στην επιφάνεια του βιολογικού φραγμού. Για παράδειγμα, οι κυκλοδεξτρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε υδατικά δερματικά σκευάσματα, υδατικό στοματικό διαλύματος, ρινικά συστήματα παράδοσης φαρμάκων και αρκετά διαλύματα οφθαλμικών σταγόνων.

Η σταθερότητα αυτών των συμπλόκων είναι μία με δύο τάξεις μεγέθους μικρότερη από την αντίστοιχη των πρωτεϊνικών συμπλόκων. Με την κατάλληλη πρωτεΐνη αποδεσμεύεται το εγκλεισμένο φιλοξενούμενο μόριο και μετέπειτα γίνεται η σύνδεσή του με την πρωτεΐνη. Επίσης ισχυρότερη είναι και η σύνδεση φαρμάκων ή ορμονών στους αντίστοιχους υποδοχείς, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η πρόσδεσή τους στην περίπτωση χρήσης φαρμάκων με σύμπλοκα κυκλοδεξτρίνης. (ΓΕΩΡΓΙΟΥ, 1994) Επίσης, το γεγονός ότι η προσθήκη β-κυκλοδεξτρίνης αυξάνει τη διαλυτότητα στο νερό αρκετών μερικώς

υδατοδιαλυτών ουσιών, οδηγεί στη χρήση της σε πολυάριθμες φαρμακευτικές εφαρμογές. Σε ορισμένες περιπτώσεις αυτό οδηγεί σε βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα, αυξάνοντας το φαρμακολογικό αποτέλεσμα και επιτρέποντας μείωση της δόσης του χορηγούμενου φαρμάκου.

Η πλειοψηφία των φαρμακευτικών δραστικών ουσιών δεν έχουν επαρκή διαλυτότητα στο νερό και τα παραδοσιακά συστήματα τυποποίησης για αδιάλυτα φάρμακα περιλαμβάνουν συνδυασμό οργανικών διαλυτών, επιφανειοδραστικών ουσιών και ακραίων συνθηκών pH, που συχνά προκαλούν ερεθισμό ή άλλες ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Οι κυκλοδεξτρίνες δεν είναι ερεθιστικές και προσφέρουν ευδιάκριτα πλεονεκτήματα όπως η σταθεροποίηση των δραστικών ενώσεων, η μείωση της πτητικότητας των μορίων του φαρμάκου και η κάλυψη των δυσάρεστων και πικρών γεύσεων (T Loftsson, 2006).

Τα σύμπλοκα εγκλεισμού μπορούν επίσης να διευκολύνουν τον χειρισμό πτητικών προϊόντων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικό τρόπο χορήγησης φαρμάκων, π.χ. με τη μορφή δισκίων. Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της σταθερότητας των ουσιών για να αυξηθεί η αντοχή τους στην υδρόλυση, την οξειδωση, τη θερμότητα, το φως και τα άλατα μετάλλων. Ο εγκλεισμός προϊόντων, που προκαλούν ερεθισμό, στις κυκλοδεξτρίνες μπορεί επίσης να προστατεύσει τον γαστρικό βλεννογόνο στη δια του στόματος χορήγηση και να μειώσει τη βλάβη του δέρματος για διαδερματική χορήγηση. Επιπλέον, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να εφαρμοστούν για να μειώσουν τις επιδράσεις της πικρής ή ερεθιστικής γεύσης και των δύσοσμων φαρμάκων (Valle, 2004) (Sahar Amiri, 2017).

Οι χορηγούμενες κυκλοδεξτρίνες είναι αρκετά ανθεκτικές στα ένζυμα, που αποικοδομούν το άμυλο, αν και μπορούν να αποδομηθούν σε πολύ χαμηλούς ρυθμούς από α -αμυλάσες. Η αποικοδόμηση δεν πραγματοποιείται από το σάλιο ή τις αμυλάσες του παγκρέατος, αλλά από α -αμυλάσες από μικροοργανισμούς από τη χλωρίδα του παχέος εντέρου. Μελέτες προσρόφησης αποκάλυψαν ότι μόνο το 2-4% των κυκλοδεξτρινών απορροφήθηκαν στο λεπτό έντερο και ότι τα υπόλοιπα αποδομούνται και λαμβάνονται ως γλυκόζη. Αυτό μπορεί να εξηγήσει τη χαμηλή τοξικότητα που βρέθηκε κατά τη χορήγηση κυκλοδεξτρινών από το στόμα (Szetjli, 1989) (Valle, 2004).

1.1.10 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 εφαρμοστούν για να καθυστερήσουν τη βλάστηση του σπόρου. Στους κόκκους που έχουν υποστεί κατεργασία με β-κυκλοδεξτρίνες, κάποιες από τις αμυλάσες, που αποδομούν τις προμήθειες αμύλου των σπόρων, αναστέλλονται. Αρχικά το φυτό αναπτύσσεται πιο αργά, αλλά αργότερα αυτό αντισταθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από μια βελτιωμένη ανάπτυξη του φυτού αποδίδοντας 20-45% μεγαλύτερη συγκομιδή. Μια ακόμη εφαρμογή περιλαμβάνει την έκφραση των ενζύμων της κυκλοδεξτρίνης γλυκοζυλοτρανσφεράσες (CGTases) σε φυτά (Sahar Amiri, 2017).

Στη χημική βιομηχανία, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως για τον διαχωρισμό ισομερών και εναντιομερών, για την κατάλυση αντιδράσεων, για τη βοήθεια σε διάφορες διαδικασίες και για την απομάκρυνση ή αποτοξίνωση αποβλήτων. Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως στον διαχωρισμό εναντιομερών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ή χρωματογραφία αερίου (GC). Οι στάσιμες φάσεις αυτών των στηλών περιέχουν ακινητοποιημένες κυκλοδεξτρίνες ή προερχόμενες υπερμοριακές αρχιτεκτονικές.

Άλλες αναλυτικές εφαρμογές μπορούν να βρεθούν στη φασματοσκοπική (spectroscopic) ανάλυση. Σε μελέτες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) μπορούν να λειτουργήσουν ως χειρομορφικά μετατοπιστικά αντιδραστήρια (chiral shift agents) και στην φασματομετρία κυκλικού διχρωισμού ως εκλεκτικοί (χειρομορφικοί) παράγοντες που μεταβάλλουν φάσματα. Στην ηλεκτροχημεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καλύψουν μολυσματικές ενώσεις, επιτρέποντας ακριβέστερους αναλυτικούς προσδιορισμούς.

Άλλη χρήση των κυκλοδεξτρινών σε καταλυτικές αντιδράσεις είναι η ικανότητά τους να χρησιμεύουν ως μιμητικά ενζύμων. Αυτά σχηματίζονται με τροποποίηση των φυσικώς απαντώμενων κυκλοδεξτρινών μέσω αντικατάστασης διαφόρων λειτουργικών ενώσεων στην κύρια ή δευτερεύουσα όψη του μορίου ή με τη σύνδεση δραστικών ομάδων. Αυτές οι τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες είναι χρήσιμες ως μιμητικά ενζύμων λόγω του φαινομένου της μοριακής αναγνώρισης (Szejtli, 1998), που αποδίδεται στις υποκατεστημένες ομάδες στην κυκλοδεξτρίνη. Αυτή η ικανότητα προκύπτει από τη σύνδεση υποστρωμάτων στην υδρόφοβη κοιλότητα με την επακόλουθη αντίδραση, που ξεκίνησε από καταλυτικές ομάδες συνδεδεμένες με την κυκλοδεξτρίνη. Οι ρυθμοί αντίδρασης ενισχύονται σχεδόν 1000 φορές με τέτοιες τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες έναντι του ελεύθερου διαλύματος λόγω της χηλωτικής επίδρασης των

καταλυτών κυκλοδεξτρίνης (CD catalysts). Η εναντιομερική ειδίκευση (enantiomeric specificity) των κυκλοδεξτρινών σε τέτοιες εφαρμογές υπόσχεται επίσης να είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα. (Valle, 2004)

1.1.11 Κόλλες, επιστρώσεις και άλλα πολυμερή

Οι κυκλοδεξτρίνες αυξάνουν την κολλητικότητα(tackiness) και την πρόσφυση ορισμένων θερμών τηγμάτων και συγκολλητικών. Επίσης, καθιστούν πρόσθετα και διογκωτικά μέσα συμβατά με συστήματα θερμής τήξης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων πολυμερών σε επικαλύψεις τύπου γαλακτώματος, όπως τα χρώματα, τείνει να αυξάνει το ιξώδες και οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αντισταθμίσουν αυτό το ανεπιθύμητο αποτέλεσμα. (Valle, 2004)

1.1.12 Τεχνικές σχηματισμού μοριακών συμπλόκων

1.1.12.1 Συγκαταβύθιση

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των συμπλόκων, τα οποία μελετήθηκαν για την παρούσα εργασία και είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος στο εργαστήριο. Η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται σε νερό και προστίθεται το φιλοξενούμενο μόριο, ενώ αναδεύεται το διάλυμα κυκλοδεξτρίνης. Η συγκέντρωση β-κυκλοδεξτρίνης μπορεί να είναι τόσο υψηλή έως περίπου 20%, εάν το φιλοξενούμενο μόριο μπορεί να ανεχθεί υψηλότερες θερμοκρασίες. Εάν επιλεγεί μια αρκετά υψηλή συγκέντρωση, η διαλυτότητα του συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης-φιλοξενούμενου μορίου θα ξεπεραστεί, καθώς προχωρά η αντίδραση συμπλοκοποίησης ή όταν εφαρμόζεται η ψύξη. Σε πολλές περιπτώσεις, το διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης και του φιλοξενούμενου μορίου πρέπει να ψυχθεί ενώ αναδεύεται, πριν σχηματιστεί ένα ίζημα.

Το ίζημα μπορεί να συλλεχθεί με απόχυση, φυγοκέντρηση ή διήθηση. Το ίζημα μπορεί να εκπλυθεί με μικρή ποσότητα νερού ή άλλου υδατοδιαλυτού διαλύτη όπως αιθυλική αλκοόλη, μεθανόλη ή ακετόνη. Η έκπλυση με διαλύτη μπορεί να είναι επιβλαβής για ορισμένα σύμπλοκα, επομένως αυτό πρέπει να δοκιμαστεί πριν από την κλιμάκωση.

Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου έγκειται στην αύξηση της κλιμάκωσης. Λόγω της περιορισμένης διαλυτότητας της κυκλοδεξτρίνης, πρέπει να χρησιμοποιηθούν μεγάλοι όγκοι νερού. Η χωρητικότητα της δεξαμενής, ο χρόνος και η ενέργεια για θέρμανση και ψύξη μπορεί να γίνουν σημαντικοί παράγοντες κόστους. Η κατεργασία και η απόρριψη του μητρικού υγρού, που λαμβάνεται μετά τη συλλογή του συμπλόκου μπορεί επίσης να αποτελεί μειονέκτημα. Αυτό μπορεί να μειωθεί σε πολλές περιπτώσεις ανακυκλώνοντας το μητρικό υγρό (Loftsson T, 1993) (Pitha J, 1992)

Επιπλέον, έχουν αποδειχθεί ότι οι μη ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες μειώνουν τη συμπλοκοποίηση της κυκλοδεξτρίνης με τη διαζεπάμη και τα συντηρητικά μειώνουν τη συμπλοκοποίηση κυκλοδεξτρίνης με διάφορα στεροειδή (Loftsson T., 1992). Από την άλλη πλευρά, πρόσθετα, όπως η αιθανόλη μπορούν να προωθήσουν το σχηματισμό συμπλόκου σε στερεή ή ημιστερεή κατάσταση (Furuta T, 1993). Τα μη ιοντισμένα φάρμακα σχηματίζουν συνήθως ένα πιο σταθερό σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης από τα ιοντικά ομόλογά τους και, συνεπώς, η αποτελεσματικότητα συμπλοκοποίησης των βασικών φαρμάκων μπορεί να ενισχυθεί με προσθήκη αμμωνίας στα υδατικά μέσα συμπλοκοποίησης. (J J Torres-Labandeira 1, 1991) (Valle, 2004)

1.1.12.2 Συμπλοκοποίηση μέσω πηκτού εναιωρήματος

Δεν είναι απαραίτητο να διαλυθεί πλήρως η κυκλοδεξτρίνη για να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο. Η κυκλοδεξτρίνη μπορεί να προστεθεί σε νερό έως 50-60% στερεά και να αναδεύεται. Η υδατική φάση θα κορεστεί με την κυκλοδεξτρίνη στο διάλυμα. Τα φιλοξενούμενα μόρια θα συμπλοκοποιηθούν με την κυκλοδεξτρίνη σε διάλυμα και, καθώς η υδατική φάση κορεννύεται από το

σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης, το σύμπλοκο θα κρυσταλλωθεί ή θα καθιζάνει έξω από την υδατική φάση. Οι κρύσταλλοι κυκλοδεξτρίνης θα διαλυθούν και θα συνεχίσουν να κορεννύουν την υδατική φάση για να σχηματίσουν το σύμπλοκο και να καθιζάνουν ή να κρυσταλλωθούν εκτός της υδατικής φάσης, και το σύμπλοκο μπορεί να συλλεχθεί με τον ίδιο τρόπο όπως και με τη μέθοδο συγκαταβύθισης.

Ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της συμπλοκοποίησης είναι μεταβλητός και εξαρτάται από το φιλοξενούμενο μόριο. Πρέπει να γίνουν αναλύσεις για να προσδιοριστεί το χρονικό διάστημα που απαιτείται. Γενικά, η συμπλοκοποίηση πηκτού εναιωρήματος πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Με πολλά φιλοξενούμενα μόρια, μπορεί να εφαρμοστεί κάποια θερμότητα για να αυξηθεί ο ρυθμός συμπλοκοποίησης, αλλά πρέπει να εφαρμοστεί με προσοχή, καθώς η υπερβολική θερμότητα μπορεί να αποσταθεροποιήσει το σύμπλοκο και η αντίδραση συμπλοκοποίησης να μην είναι σε θέση να λάβει χώρα πλήρως. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μείωση της ποσότητας νερού που απαιτείται και το μέγεθος του αντιδραστήρα. (Valle, 2004)

1.1.12.3 Μέθοδος ζύμωσης (kneading)

Αυτή είναι μια παραλλαγή της μεθόδου πηκτού εναιωρήματος. Σε αυτήν την τεχνική δεν χρησιμοποιείται καθόλου διαλύτης ή μόνο μια μικρή ποσότητα αιθανόλης προστίθεται για να σχηματιστεί μια πάστα, η οποία αναμιγνύεται με την κυκλοδεξτρίνη χρησιμοποιώντας ένα γουδί και γουδοχέρι, ή σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιώντας ένα ζυμωτήριο. Ο χρόνος που απαιτείται εξαρτάται από το φιλοξενούμενο μόριο. (A. Rajendra Kumar, 2013)

Το προκύπτον σύμπλοκο μπορεί να στεγνώσει απευθείας ή να εκπλυθεί με μικρή ποσότητα νερού και να συλλεχθεί με διήθηση ή φυγοκέντρωση. Οι πάστες μερικές φορές θα στεγνώσουν 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 στεγνώσει καλά και να αλεσθεί για να ληφθεί μια μορφή συμπλόκου σε σκόνη. (Valle, 2004)

1.1.12.4 Υγρή ανάμιξη (Damp mixing) και θέρμανση

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί λίγη ή καθόλου προσθήκη νερού. Η ποσότητα του νερού μπορεί να κυμαίνεται από την ποσότητα νερού, που χρησιμοποιείται για την ενυδάτωση της κυκλοδεξτρίνης και του φιλοξενούμενου μορίου, έως και 20-25% νερό σε ξηρή βάση. Αυτή η ποσότητα νερού τυπικά βρίσκεται σε ένα φίλτρο συσσωματώματος (filter cake) από τις μεθόδους συγκαταβύθισης ή πηκτού εναιωρήματος. Το φιλοξενούμενο μόριο και η κυκλοδεξτρίνη αναμιγνύονται καλά και τοποθετούνται σε σφραγισμένο δοχείο. Το σφραγισμένο δοχείο και το περιεχόμενό του θερμαίνονται στους 100 °C περίπου και στη συνέχεια το περιεχόμενο αφαιρείται και ξηραίνεται. Η ποσότητα του

νερού που προστίθεται, ο βαθμός ανάμιξης και ο χρόνος θέρμανσης πρέπει να βελτιστοποιηθούν για κάθε φιλοξενούμενο μόριο. (Valle, 2004)

1.1.12.5 Εκβολή (Extrusion)

Η εκβολή είναι μια παραλλαγή της μεθόδου θέρμανσης και ανάμιξης και είναι ένα συνεχές σύστημα. Η κυκλοδεξτρίνη, το φιλοξενούμενο μόριο και το νερό μπορούν να προαναμιχθούν ή να αναμιχθούν όπως προστίθενται στον εκβολέα(extruder). Ο βαθμός ανάμιξης, η ποσότητα θέρμανσης και ο χρόνος μπορούν να ελεγχθούν στο κυλινδρικό τμήμα του εκβολέα. Ανάλογα με την ποσότητα νερού, το εκβαλλόμενο σύμπλοκο μπορεί να στεγνώσει, καθώς κρυσταλλώνει ή μπορεί να τοποθετηθεί σε φούρνο για να στεγνώσει.

Η εκβολή έχει τα πλεονεκτήματα ότι είναι μια συνεχής διαδικασία και χρησιμοποιεί πολύ λίγο νερό. Λόγω της θερμότητας που παράγεται, μερικά θερμικά ασταθή φιλοξενούμενα μόρια αποσυντίθενται χρησιμοποιώντας αυτήν τη μέθοδο. (Valle, 2004)

1.1.12.6 Ξηρή ανάμιξη (Dry mixing)

Ορισμένα φιλοξενούμενα μόρια μπορούν να συμπλοκοποιούνται προσθέτοντας απλώς ένα φιλοξενούμενο μόριο στην κυκλοδεξτρίνη και αναμειγνύοντάς τα μαζί. Αυτό λειτουργεί καλύτερα με λάδια ή γενικότερα φιλοξενούμενα μόρια σε υγρή μορφή. Ο απαιτούμενος χρόνος ανάμιξης είναι μεταβλητός και εξαρτάται από το φιλοξενούμενο μόριο. Γενικά, αυτή η μέθοδος εκτελείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και είναι μια παραλλαγή της μεθόδου ζύμωσης.

Το κύριο πλεονέκτημα είναι ότι δεν χρειάζεται να προστεθεί νερό, εκτός εάν χρησιμοποιείται βήμα έκπλυσης. Τα μειονεκτήματά του είναι ο κίνδυνος συσσωμάτωσης στην κλιμάκωση, με αποτέλεσμα η ανάμιξη να μην είναι επαρκής οδηγώντας σε ατελή συμπλοκοποίηση και, με πολλά φιλοξενούμενα μόρια, στο χρονικό διάστημα που απαιτείται. (Valle, 2004)

1.1.12.7 Ξήρανση συμπλόκων

Τα σύμπλοκα μπορούν να στεγνώσουν σε φούρνο, σε ξηραντήρα ρευστής κλίνης(fluid bed dryer) ή άλλο ξηραντήρα. Θέλει προσοχή, ώστε το σύμπλοκο να μην καταστραφεί κατά τη διαδικασία της ξήρανσης.

1.1.12.7.1 Πολύ πτητικά φιλοξενούμενα μόρια

Για φιλοξενούμενα μόρια με θερμοκρασία βρασμού κάτω από 100°C, πρέπει να χρησιμοποιείται χαμηλότερη θερμοκρασία κατά την ξήρανση. Λιγότερα φιλοξενούμενα μόρια θα χαθούν κατά τη διάρκεια της ξήρανσης, όταν μειωθεί η θερμοκρασία μερικούς βαθμούς κάτω από τη θερμοκρασία βρασμού του φιλοξενούμενου μορίου.

1.1.12.7.2 Ξήρανση με ψεκάσμο

Τα σύμπλοκα μπορούν επίσης να στεγνώσουν με ψεκάσμο. Η καθίζηση πρέπει να ελέγχεται προκειμένου να αποφευχθεί τα σωματίδια να γίνουν πολύ μεγάλα και να μπλοκάρουν τον ψεκαστήρα ή το ακροφύσιο ψεκάσμου. Με τα πτητικά φιλοξενούμενα μόρια απαιτείται κάποια βελτιστοποίηση των συνθηκών ξήρανσης προκειμένου να μειωθούν οι απώλειες. Η ξήρανση με ψεκάσμο δεν είναι ένα βιώσιμο μέσο για την ξήρανση των πολύ πτητικών και ευπαθών στη θερμότητα φιλοξενούμενων μορίων.

1.1.12.7.3 Ξήρανση με χαμηλή θερμοκρασία (*Low temperature drying*)

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξηραντήρας ή ξηραντήρας κατάψυξης για την ξήρανση συμπλόκων. Η χαμηλή θερμοκρασία ελαχιστοποιεί την απώλεια εξαιρετικά πτητικών φιλοξενούμενων μορίων. Η ξήρανση με κατάψυξη είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τα θερμικά ασταθή φιλοξενούμενα μόρια και τα διαλυτά σύμπλοκα, όπως τα σύμπλοκα υδροξυπροπυλιωμένης κυκλοδεξτρίνης. (Valle, 2004)

1.1.12.8 Μέθοδος εξουδετέρωσης

Το φάρμακο και η κυκλοδεξτρίνη διαλύονται χωριστά σε 0.1 N υδροξείδιο του νατρίου, αναμιγνύονται και αναδεύονται για περίπου μισή ώρα, καταγράφοντας το pH και προσθέτοντας στάγδην 0.1 N με ανάδευση έως ότου το pH φθάσει το 7.5, όπου τα σύμπλοκα καθιζάνουν. Το υπόλειμμα διηθείται και πλένεται μέχρι να απαλλαγεί από χλώριο, ξηραίνεται στους 250°C για 24 ώρες και αποθηκεύονται σε ξηραντήρα. (A. Rajendra Kumar, 2013)

1.1.12.9 Μέθοδος απελευθέρωσης (*Release*)

Μόλις σχηματιστεί και ξηρανθεί ένα σύμπλοκο, είναι πολύ σταθερό, εμφανίζοντας μεγάλη διάρκεια ζωής σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος υπό ξηρές συνθήκες. Η μετατόπιση του συμπλοκοποιημένου φιλοξενούμενου μορίου από άλλο φιλοξενούμενο μόριο απαιτεί θέρμανση. Σε πολλές περιπτώσεις, το νερό μπορεί να αντικαταστήσει τον φιλοξενούμενο.

Όταν ένα σύμπλοκο τοποθετείται σε νερό, δύο βήματα εμπλέκονται στην απελευθέρωση του συμπλοκοποιημένου φιλοξενούμενου μορίου. Πρώτο βήμα είναι η διάλυση του συμπλόκου. Το δεύτερο βήμα είναι η απελευθέρωση του συμπλοκοποιημένου φιλοξενούμενου μορίου, όταν μετατοπίζεται από μόρια νερού. Έτσι, θα δημιουργηθεί μια ισορροπία μεταξύ ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης κυκλοδεξτρίνης, φιλοξενούμενου μορίου και του διαλυμένου και αδιάλυτου συμπλόκου.

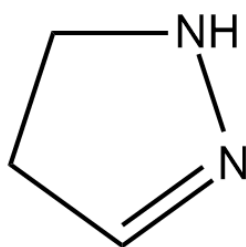
Στην περίπτωση συμπλόκων, που περιέχουν φιλοξενούμενα μόρια πολλαπλών συστατικών ή/και διαφορετικών τύπων κυκλοδεξτρίνης, τα φιλοξενούμενα μόρια δεν απελευθερώνονται απαραίτητα στην ίδια αναλογία, όπως στο αρχικό μείγμα φιλοξενούμενων μορίων. Κάθε σύμπλοκο φιλοξενούμενου μορίου μπορεί να έχει διαφορετική διαλυτότητα και ρυθμό απελευθέρωσης από το σύμπλοκο. Εάν οι ρυθμοί απελευθέρωσης είναι διαφορετικοί για κάθε συστατικό, είναι

δυνατόν να επιτευχθεί ένα προβλεπόμενο μοτίβο απελευθέρωσης, με αλλαγή της σύστασης του φιλοξενούμενου μορίου. (Valle, 2004)

1.2 Πυραζολίνες

1.2.1 Γενικά

Η πυραζολίνη είναι πενταμελής ετεροκυκλική ένωση με δύο παρακείμενα άτομα αζώτου εντός του δακτυλίου. Έχει μόνο έναν ενδοκυκλικό διπλό δεσμό και είναι βασική στη φύση. Μεταξύ των διαφόρων παραγώγων της, οι 2-πυραζολίνες (Εικόνα 1-3) φαίνεται να είναι οι πιο συχνά μελετημένες ενώσεις τύπου πυραζολίνης. Οι 2-πυραζολίνες μπορούν να θεωρηθούν ως ένα τμήμα κυκλικής υδραζίνης. (I. Kostorouli, 2020) Όπως ακολουθεί από ανάλυση με ακτίνες Χ, έχει τη δομή του πενταμελούς δακτυλίου διϋδροπυραζόλης, και έχει διαμόρφωση φακέλου. (Li JT, 2007)



Εικόνα 1-3. Δομή 2-πυραζολίνης.

1.2.2 Εφαρμογές

Οι 2-πυραζολίνες εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα πιθανών φαρμακολογικών δραστηριοτήτων και υπάρχουν σε μια σειρά φαρμακολογικά ενεργών μορίων, που δρουν ως αναλγητικά και αντιπυρετικά, αντιφλεγμονώδη, εντομοκτόνα, κλπ. Η ανακάλυψη αυτής της κατηγορίας φαρμάκων παρέχει ένα εξαιρετικό ιστορικό περιπτώσεων σύγχρονης ανάπτυξης φαρμάκων. Έχει μια ποικιλία φαρμακευτικών εφαρμογών. Τα παράγωγα πυραζολίνης βρέθηκαν να έχουν επίσης πιθανή αντιπυρετική-αναλγητική, ηρεμιστική, μυοχαλαρωτική, ψυχοαναληπτική, αντιεπιληπτική, αντικαταθλιπτική, αντιφλεγμονώδη, εντομοκτόνο, αντιμικροβιακή και αντιυπερτασική δράση. (Md. Azizur Rahman, 2010)

Διάφοροι βιο-εμπνευσμένοι φορείς έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητα των αντιοξειδωτικών. Μεταξύ αυτών, οι κυκλοδεξτρίνες (CD) θεωρούνται ως αποτελεσματικοί φορείς, καθώς είναι υδατοδιαλυτοί ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από διάφορες μονάδες D-γλυκόζης. Η διάταξη των μονομερών μπορεί να προσομοιωθεί με έναν κόλouro κώνο, όπου σχηματίζεται ένα υδρόφιλο εξωτερικό και ένα υδρόφοβο εσωτερικό. Η β-CD είναι ο φορέας, που έχει επιλεχθεί για το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού με μεγάλη ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων, αιθέρια έλαια και εκχυλίσματα για πολλές εφαρμογές όπως είναι τα Generally Regarded As Safe (GRAS).

Όπως, έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, η β-CD προσφέρει τεχνικές προετοιμασίας χαμηλού κόστους και ένα αρκετά ικανοποιητικό

μέγεθος της κοιλότητας εγκλεισμού. Σε σύγκριση με άλλα συστήματα εγκλεισμού ή παγίδευσης, όπως νανο-γαλακτώματα ή SLNs, η β -CD θα μπορούσε να προσφέρει ελεγχόμενη απελευθέρωση των φιλοξενούμενων μορίων και να λειτουργήσει ως σταθεροποιητής για σχετικά μεγαλύτερα μόρια, όπως πρωτεΐνες ή πεπτίδια. Εκτός από τα σύμπλοκα εγκλεισμού, στα οποία το φιλοξενούμενο μόριο βρίσκεται μέσα στην υδρόφοβη κοιλότητα της β -CD, μπορούν επίσης να σχηματιστούν σύμπλοκα μη εγκλεισμού, στα οποία το φιλοξενούμενο μόριο διατηρείται στην εξωτερική επιφάνεια της β -CD.

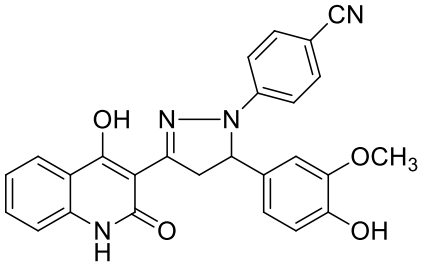
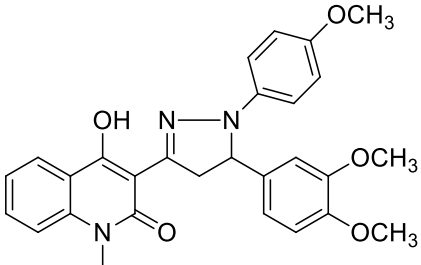
Η πρόσφατη έρευνα, που διεξήχθη στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, για τη σύνθεση νέων υβριδικών αναλόγων κινολινοπυραζολίνης, που συνδυάζει το δομικό πλαίσιο τριών φαρμακοφόρων (κινολιρόνη, χαλκόνη και πυραζολίνη) βοήθησε στον εντοπισμό δύο ενώσεων με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (πυραζολίνες 1 και 2, Πίνακας 1-2). (I. Kostoroulou, 2020)

Η πυραζολίνη 1 είναι ισχυρός ριζικός αδρανοποιητής DPPH (91% μετά από 1 ώρα, σε συγκέντρωση 100 μ M) και ισχυρός αναστολέας υπεροξειδωσής λιπιδίων (100%, σε συγκέντρωση 100 μ M). Η πυραζολίνη 2 δείχνει ανάλογη αντιοξειδωτική ισχύ (95% στον προσδιορισμό DPPH και 83.8% στην ανάλυση υπεροξειδωσής λιπιδίων).

Το κύριο εμπόδιο στο χειρισμό αυτών των ενώσεων είναι ότι έχουν πολύ χαμηλή διαλυτότητα σε κοινούς οργανικούς διαλύτες, καθώς και καθόλου διαλυτότητα στο νερό. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, επιλέχθηκε ο σχηματισμός συμπλοκών εγκλεισμού πυραζολινών 1 και 2 σε β -CD (M. Chatzidaki, 2020).

1.2.3 Πυραζολίνες προς διερεύνηση

Πίνακας 1-2. Δομή των Πυραζολινών 1 και 2, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

| ΟΝΟΜΑΣΙΑ | ΔΟΜΗ | MW | Μετά τη συμπλοκοποίηση |
|--------------|---|----------|------------------------|
| Πυραζολίνη 1 |  | 452.4614 | Σύμπλοκο 1 |
| Πυραζολίνη 2 |  | 485.5311 | Σύμπλοκο 2 |

1.3 Αντιοξειδωτικά

1.3.1 Γενικά

Οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν εξελιχθεί τα τελευταία δύο δισεκατομμύρια χρόνια μέσω της προσαρμοστικότητας, σε μια αυξανόμενη ατμοσφαιρική συγκέντρωση οξυγόνου. Έτσι, δυνητικά επιβλαβή είδη (δραστικό οξυγόνο, άζωτο και είδη χλωρίου) προκύπτουν ως υποπροϊόντα του μεταβολισμού και λειτουργούν επίσης ως φυσιολογικοί διαμεσολαβητές και σηματοδοτικά μόρια.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι σημαντικός παράγοντας σε πολυάριθμες παθολογικές καταστάσεις, δηλαδή μόλυνση, εάν τα μικροθρεπτικά συστατικά είναι ανεπαρκή. Τα επίπεδα αυτών των ειδών ελέγχονται από το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα, το οποίο αποτελείται από αντιοξειδωτικά και προ-αντιοξειδωτικά. Αρκετά συστατικά αυτού του συστήματος είναι μικροθρεπτικά συστατικά (π.χ. βιταμίνες C και E), εξαρτώνται από διαιτητικά μικροθρεπτικά συστατικά (π.χ. CuZn και Mn υπεροξειδίο δισμουτάση) ή παράγονται από συγκεκριμένες ενδογενείς οδούς. (Silvia Vertuani, 2008)

Ακριβώς, επειδή τα μικροθρεπτικά συστατικά μπορεί να είναι ανεπαρκή, τότε θα πρέπει να ενισχύσουμε, είτε ένα ζωντανό οργανισμό, είτε γενικότερα κύτταρα (π.χ. ενός τροφίμου) με χορήγηση εξωγενών αντιοξειδωτικών.

Ένας ευρύς ορισμός ενός αντιοξειδωτικού είναι «κάθε ουσία που, όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με εκείνες ενός οξειδώσιμου υποστρώματος, καθυστερεί ή εμποδίζει σημαντικά την οξείδωση αυτού του υποστρώματος». Ο όρος «οξειδώσιμο υπόστρωμα» περιλαμβάνει σχεδόν οτιδήποτε βρίσκεται στα τρόφιμα και στους ζωντανούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων, των υδατανθράκων και του DNA. Αυτός ο ορισμός τονίζει τη σημασία του επιλεγμένου στόχου και την πηγή της οξείδωσης στο χαρακτηρισμό ενός αντιοξειδωτικού.

1.3.2 Εφαρμογές

Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών στη διατροφή είναι ένας τομέας αυξανόμενου ενδιαφέροντος. Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται:

1. για να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής και να διατηρήσουν τη διατροφική ποιότητα των τροφίμων που περιέχουν λιπίδια. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς εμποδίζουν το τάγγισμα.
2. για να ρυθμίσουν τις συνέπειες της οξειδωτικής βλάβης στο ανθρώπινο σώμα.
 - (a) Τα αντιοξειδωτικά παρουσιάζουν ενδιαφέρον στη βιολογία και την ιατρική, επειδή μπορεί να βοηθήσουν στην προστασία του ανθρώπινου σώματος από οξειδώσεις από τις Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ΔΜΟ) –Reactive Oxygen Species (ROS)-.

Όταν τα ROS δημιουργούνται σε ζωντανά συστήματα, μια μεγάλη ποικιλία αντιοξειδωτικών αναλαμβάνει να τα αδρανοποιήσει (B. HALLIWELL, 1995).

(b) Το RNS είναι ένας συλλογικός όρος, που περιλαμβάνει ρίζες νιτρικού οξειδίου και διοξειδίου του αζώτου, ONOO^- καθώς και μη ρίζες όπως νιτρώδες οξύ, N_2O_3 (Gupta, 2015).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αντιοξειδωτικά είναι μια ετερογενής οικογένεια μορίων και είναι δύσκολο να ταξινομηθούν με κοινές δομικές ιδιότητες. (Silvia Vertuani, The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview, 2004) Η σχετική σημασία αυτών των διαφόρων αντιοξειδωτικών *in vivo* εξαρτάται από το ποιο ROS παράγεται, πώς δημιουργείται, πού δημιουργείται και ποιος είναι ο στόχος προφύλαξης από τις ελεύθερες ρίζες.

Ο σχεδιασμός νέων μορίων που λαμβάνουν υπόψη τις συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών αντιοξειδωτικών (ένα προϊόν τέτοιας συνεργιστικής αλληλεπίδρασης είναι και οι Πυραζολίνες), είναι χρήσιμος, τόσο για την αντιμετώπιση μηχανιστικών μελετών, όσο και για την ανάπτυξη πιθανών θεραπευτικών παραγόντων.

Έχουμε αποκτήσει, λοιπόν, μοριακούς συνδυασμούς αντιοξειδωτικών, σχεδιασμένων με στόχο τη βελτίωση της φαρμακολογίας, της βιοδιαθεσιμότητας και της σταθερότητας των μητρικών ενώσεων. Ο συνδυασμός αντιοξειδωτικών μπορεί να προσφέρει καλύτερη συνολική προστασία από το οξειδωτικό στρες, από αυτή που ασκείται από μεμονωμένα αντιοξειδωτικά. (Silvia Vertuani, 2008)

1.3.3 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες, που μπορούν να βλάψουν το DNA με διαφορετικούς τρόπους και να προκαλέσουν κι άλλες αλλοιώσεις, όπως στα τρόφιμα, χωρίζονται σε δύο γενικά είδη. Αυτά είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS). (Gupta, 2015)

1.3.3.1 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ΔΜΟ)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), που παράγονται *in vivo* σε επίπεδα, που δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν επαρκώς από ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβη λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και νουκλεϊκών οξέων.

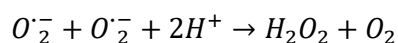
Η οξειδωτική τροποποίηση αυτών των μορίων από τοξικά επίπεδα Δραστικών Μορφών Οξυγόνου αντιπροσωπεύει ένα ακραίο γεγονός, που μπορεί να οδηγήσει σε επιβλαβείς συνέπειες, όπως η απώλεια της κυτταρικής λειτουργίας. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως «οξειδωτικό στρες».

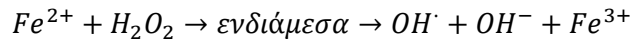
Πιο πρόσφατα, ωστόσο, το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στο σχηματισμό αυτών των ειδών σε υπο-τοξικά επίπεδα, για τη δυνατότητά τους να λειτουργήσουν ως μόρια βιολογικού σήματος. Η υποτοξική παραγωγή ROS μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην κυτταρική και εξωκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση και αυτές οι αλλαγές σηματοδοτούν αλλαγές στις λειτουργίες των κυττάρων. Με τη χρήση ποικιλίας κυτταρικών τύπων έχει αποδειχθεί ότι πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής έκφρασης, μπορούν να ρυθμιστούν με λεπτές αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία (Dejian Huang, 2005).

Παραδείγματα αυτού περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ορισμένων πυρηνικών παραγόντων μεταγραφής και τον προσδιορισμό της κυτταρικής μοίρας με απόπτωση ή νέκρωση. Η ισορροπία οξειδοαναγωγής κυττάρων, υπό φυσιολογικές συνθήκες, πιθανώς υπό γενετικό έλεγχο διατηρείται από μια σειρά ενζυματικών συστημάτων, που διασφαλίζουν ότι επικρατούν συνολικές συνθήκες μείωσης των ROS. (Silvia Vertuani, 2004)

1.3.3.1.1 Τύποι Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$): Ένα μόριο οξυγόνου με ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο που μπορεί να βλάψει μιτοχόνδρια, DNA και άλλα μόρια. Το σουπεροξειδίο παράγεται, τόσο *in vivo*, όσο και σε τρόφιμα και μπορεί να υποστεί αρκετές αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της αυτοοξειδοαναγωγικής για να δώσει H_2O_2 .



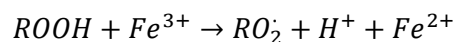


Ρίζα υδροξυλίου (·OH): Ένα πολύ δραστικό μόριο, που σχηματίζεται από τη μείωση ενός μορίου οξυγόνου, ικανό να βλάψει σχεδόν οποιοδήποτε οργανικό μόριο στην περιοχή του, συμπεριλαμβανομένων των υδατανθράκων, των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA. Η ρίζα ·OH δεν μπορεί να εξαλειφθεί με ενζυματική αντίδραση.

Μονήρες οξυγόνο (1O₂): Σχηματίζεται από το ανοσοποιητικό μας σύστημα, το μονό οξυγόνο προκαλεί οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL).

Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂): Δεν είναι η ίδια ελεύθερη ρίζα, αλλά μετατρέπεται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες όπως το OH, οι οποίες στη συνέχεια δρουν ζημιογόνα. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου εξουδετερώνεται από την υπεροξειδάση (ένα ενζυματικό αντιοξειδωτικό). (Gurta, 2015)

Ριζική υπεροξυλίου (ROO·): Ο σχηματισμός ριζών υπεροξυλίου (RO₂·) είναι το κύριο βήμα διάδοσης της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στην αλυσίδα και σε μη λιπιδικά συστήματα, όπως οι πρωτεΐνες. Η αποσύνθεση τόσο των υπεροξειδίων λιπιδίων όσο και των πρωτεϊνών κατά τη θέρμανση ή με την προσθήκη ιόντων μεταβατικών μετάλλων μπορεί να δημιουργήσει ρίζες υπεροξυλίου και αλκοξυλίου (RO·). Οι ρίζες υπεροξυλίου μπορούν εύκολα να δημιουργηθούν επιτρέποντας στο O₂ να προσθέσει ρίζες με επίκεντρο τον άνθρακα.



Η ρίζα υπεροξυλίου είναι πολύ σημαντική σε βιολογικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένης της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, της διάσπασης του DNA, της τροποποίησης της σπονδυλικής στήλης της πρωτεΐνης και επίσης εμπλέκεται στην αλλοίωση των τροφίμων. (Silvia Vertuani, 2004)

Αλκοξυ ρίζα (RO·): Η οξειδωτική αλλοίωση των λιπιδίων ή η υπεροξειδωση των λιπιδίων παράγει αλκοξυλικές ρίζες μη ενζυματικά μέσω αντίδρασης Fenton, μία αναγωγή ενός ηλεκτρονίου ή συνδυασμού δύο ριζών υπεροξυλίου. Οι ρίζες αλκοξυλίου είναι πολύ οξειδωτικές και μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις DNA και απόπτωση στα κύτταρα.

1.3.3.2 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ (RNS):

Το άζωτο υπάρχει στα τρόφιμα ως νιτρικά, αμίνες, νιτρώδη, πεπτίδια, πρωτεΐνες και αμινοξέα, και οι μεταβολίτες του in vino περιλαμβάνουν νιτρικό οξείδιο, υψηλότερα οξείδια του αζώτου και υπεροξυνιτρίτη^{3, 4}. Αυτές οι δραστικές μορφές αζώτου, μπορεί να προκαλέσουν κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου σε ηπατίτιδα ή άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις διεργασίες.^{5,4}

Το τριοξείδιο του αζώτου (N_2O_3), το νιτρικό οξύ (HNO_2) και το υπεροξυνιτρίτη ($ONOO^-$) μπορούν να οδηγήσουν σε απαμίνωση και νίτρωση του DNA. Το ανιόν υπεροξυνιτρίτη ($ONOO^-$) είναι σταθερό σε πολύ αλκαλικό pH, αλλά υφίσταται αντίδραση με CO_2 , πρωτονίωση, ισομερισμό και αποσύνθεση σε φυσιολογικό pH.

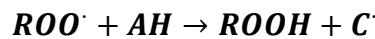
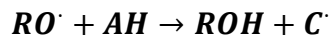
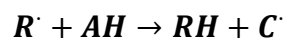
Δίνει επιβλαβή προϊόντα, που εξαντλούν τα αντιοξειδωτικά και οξειδώνουν και νιτρώνουν λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA και έχουν πιθανότητα να προκαλέσουν αλλαγές στην καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων, αλλοιωμένη κυτταροσκελετική οργάνωση και διαταραχή της μεταγωγής του κυτταρικού σήματος (Pacher P, 2007). Αυτά τα επιβλαβή προϊόντα μπορεί να περιλαμβάνουν NO_2^- , NO^{2+} και OH^- . Ο υπεροξυνιτρίτης είναι ένα κυτταροτοξικό είδος, που μπορεί να δημιουργηθεί με διάφορους τρόπους, συνήθως με την ταχεία προσθήκη ριζών υπεροξειδίου και νιτρικού οξειδίου. (Gupta, 2015)

1.3.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα

Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα ή αντιοξειδωτική δραστηριότητα είναι ένας όρος χωρίς νόημα χωρίς το πλαίσιο συγκεκριμένων συνθηκών αντίδρασης όπως θερμοκρασία, πίεση, μέσο αντίδρασης, σημεία αναφοράς, χημική αντιδραστικότητα κ.λπ. «Ικανότητα απορρόφησης υπεροξειδίου», «ικανότητα μείωσης ιόντων σιδήρου» κ.λπ.

Τα αντιοξειδωτικά παραδοσιακά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. πρωτογενή ή αλυσιδωτά αντιοξειδωτικά και δευτερογενή ή προληπτικά αντιοξειδωτικά (Madhavi DL, 1995).

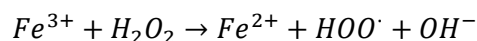
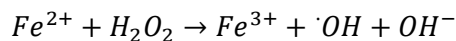
Οι μηχανισμοί θραύσης της αλυσίδας αντιπροσωπεύονται από:



Εδώ, το R σημαίνει λιπιδική ρίζα και το AH σημαίνει αντιοξειδωτικό.

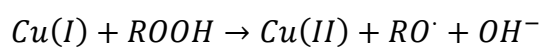
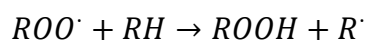
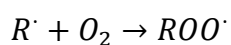
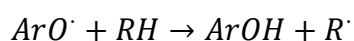
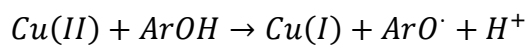
Τα δευτερογενή ή προληπτικά αντιοξειδωτικά επιβραδύνουν τον ρυθμό οξειδωσης. Οξειδωαναγωγικά ενεργά μέταλλα όπως ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), το χρώμιο (Cr), το κοβάλτιο (Co) και άλλα μέταλλα υφίστανται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και έχουν την ικανότητα να παράγουν δραστικές ρίζες, όπως η ρίζα ανιόντων υπεροξειδίου και το νιτρικό οξείδιο στα βιολογικά συστήματα.

Αυτά τα μεταλλικά ιόντα είναι απαραίτητα για πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, ως συστατικά αιμοπρωτεϊνών και συμπαράγοντες διαφόρων ενζύμων στην αντιοξειδωτική άμυνα. Η τυπική αντίδραση τύπου Fenton, που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες περιλαμβάνει την οξείδωση των ιόντων σιδήρου σε ιόντα σιδήρου από υπεροξείδιο του υδρογόνου για να δημιουργήσει μια ρίζα υδροξυλίου και ένα ανιόν υδροξυλίου. Ο σίδηρος (III) στη συνέχεια ανάγεται σε σίδηρο (II), μια ρίζα υπεροξειδίου και ένα πρωτόνιο από το ίδιο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από αυτή τη διαδικασία εμπλέκονται σε έναν αριθμό δευτερογενών αντιδράσεων.



Ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών μπορεί να ανασταλεί με τη μείωση των υδροϋπεροξειδίων και του υπεροξειδίου του υδρογόνου και με την απομόνωση ιόντων μετάλλων μέσω αντιδράσεων συμπλοκοποίησης. (Silvia Vertuani, 2004)

Το προ-οξειδωτικό φαινόμενο των φαινολικών αντιοξειδωτικών (ArOH), που γενικά προκαλείται από ιόντα μεταβατικών μετάλλων, όπως το Cu (II) παρουσία διαλυμένου οξυγόνου, προκαλεί οξειδωτική βλάβη στα λιπίδια, όπως φαίνεται από τις παρακάτω αντιδράσεις. Η προ-οξειδωτική δράση των φλαβονοειδών εξαρτάται γενικά από τη συγκέντρωση καθώς και τον αριθμό και τη θέση των υποκαταστατών -OH στη δομή του βασικού μοριακού σκελετού (Gupta, 2015).



1.3.5 Μέθοδοι μελέτης αντιοξειδωτικής ικανότητας

Με βάση τις χημικές αντιδράσεις που εμπλέκονται, οι κύριες μέθοδοι αντιοξειδωτικής ικανότητας χωρίζονται σε μεθόδους, που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer -HAT-) και σε δοκιμές βασισμένες σε αντιδράσεις απλής μεταφοράς ηλεκτρονίων (electron transfer-ET-).

Οι μέθοδοι, που βασίζονται σε ET περιλαμβάνουν μία οξειδοαναγωγική αντίδραση με το οξειδωτικό ως δείκτη του τελικού σημείου της αντίδρασης. Οι περισσότεροι προσδιορισμοί που βασίζονται σε HAT παρακολουθούν την κινητική της ανταγωνιστικής αντίδρασης και η ποσοτικοποίηση προέρχεται από τις κινητικές καμπύλες.

Οι μέθοδοι που βασίζονται στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου (HAT) αποτελούνται γενικά από μια συνθετική γεννήτρια ελεύθερων ριζών, έναν οξειδώσιμο μοριακό ανιχνευτή και ένα αντιοξειδωτικό.

Οι αναλύσεις, που βασίζονται σε HAT και ET προορίζονται για τη μέτρηση της ικανότητας ριζών (ή οξειδωτικών), αντί της προληπτικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος (Dejian Huang, 2005).

Στη συνέχεια, παρατίθενται ενδεικτικά μερικές από τις πολλές μεθόδους μελέτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αντιοξειδωτικών.

1.3.5.1 Τεχνική ORAC (ικανότητα απορρόφησης ριζών οξυγόνου)

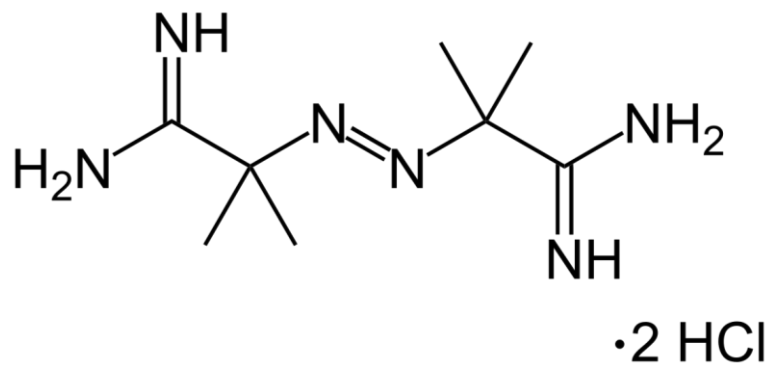
Μία από τις τυποποιημένες μεθόδους για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι η τεχνική ORAC. Βασίζεται στην αναστολή της οξείδωσης, που προκαλείται από υπεροξυλικές ρίζες που ξεκίνησε με θερμική αποσύνθεση αζωενώσεων (δηλαδή ενώσεων $-N=N-$), όπως το AAPH (Εικόνα 1-4) και χρήση της φλουορεσκεΐνης (fluorescein) (Εικόνα 1-5) ως φθορίζουσα ουσία.

Η μέθοδος αυτή εξακολουθεί να είναι μία από τις λίγες εκείνες μεθόδους, που συνδυάζει τόσο το ποσοστό αναστολής όσο και το χρόνο αναστολής των ελεύθερων ριζών από τα αντιοξειδωτικά σε μία μόνο. Ο προσδιορισμός ORAC έχει εφαρμοστεί σε μεγάλο βαθμό στην εκτίμηση της ικανότητας απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών του ανθρώπινου πλάσματος, πρωτεϊνών, DNA, καθαρών αντιοξειδωτικών ενώσεων και αντιοξειδωτικών εκχυλισμάτων φυτών και τροφίμων. (ALBERTO DAÑ VALOS, 2004)

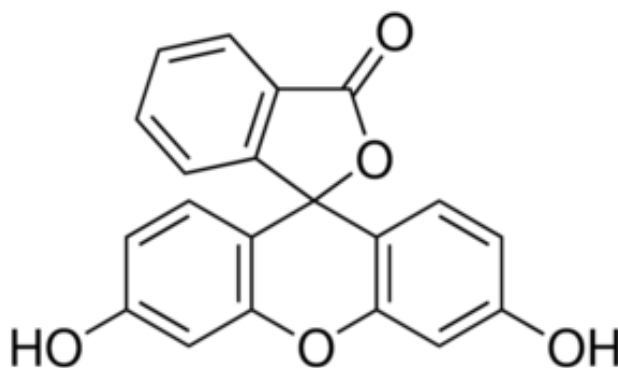
Ο προσδιορισμός μετρά μείωση του φθορισμού φλουορεσκεΐνης (3',6'-dihydroxyspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one) με την πάροδο του χρόνου λόγω σχηματισμού υπεροξυλο-ριζών από τη διάσπαση του εκκινητή AAPH (2, 2'-azobis- 2- methyl- propanimidamide, dihydrochloride) στους 37°C. Η μείωση του φθορισμού ακολουθείται οπτικά και η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζεται με επιβράδυνση της απώλειας φθορισμού παρουσία αντιοξειδωτικού.

Το 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- carboxylic acid (Trolox) (Εικόνα 1-6), ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της α-τοκοφερόλης (βιταμίνης E), χρησιμεύει ως αντιοξειδωτικό, που αναστέλλει την αποσύνθεση της φλουορεσκεΐνης. Η υπεροξυλική ρίζα μπορεί να οξειδώσει τη φλουορεσκεΐνη για να δημιουργήσει ένα προϊόν χωρίς φθορισμό. Τα αντιοξειδωτικά καταστέλλουν αυτήν την αντίδραση με μηχανισμό μεταφοράς ατόμων υδρογόνου, αναστέλλοντας την οξειδωτική αποδόμηση του σήματος φλουορεσκεΐνης. Το σήμα φθορισμού μετριέται σε 30 λεπτά με διέγερση στα 485 nm, εκπομπή στα 538 nm και αποκοπή 530 nm. Η συγκέντρωση αντιοξειδωτικού στο δείγμα δοκιμής είναι ανάλογη με την ένταση φθορισμού κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας και αξιολογείται συγκρίνοντας την καθαρή επιφάνεια κάτω από την καμπύλη με εκείνη ενός γνωστού αντιοξειδωτικού, trolox. (Gupta, 2015)

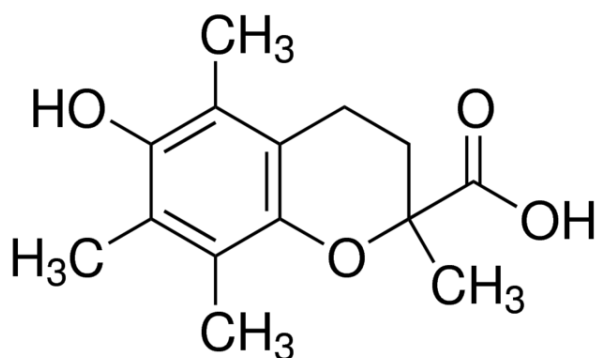
Τα αντιοξειδωτικά αναστέλλουν την οξείδωση της φλουορεσκεΐνης με μεταφορά ατόμου υδρογόνου.



Εικόνα 1-4. Δομή του 2,2'-Azobis (2-aminidino-propane) dihydrochloride (AAPH).



Εικόνα 1-5. Δομή του fluorescein.

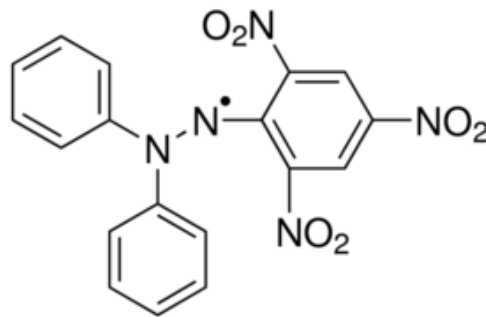


Εικόνα 1-6. Δομή του Trolox.

1.3.5.2 Τεχνική DPPH

Η τεχνική αυτή είναι μια γρήγορη, απλή, οικονομικά αποδοτική και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος, όπου η σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH αντιδρά απευθείας με το αντιοξειδωτικό και αποχρωματίζεται. (I. Kostopoulou, 2020)

Το DPPH (2, 2-διφαινυλο-1-πικρυλοϋδραζύλιο) (Εικόνα 1-7) είναι μια σταθερή ρίζα λόγω της σταθεροποίησης με απεντοπισμό αρωματικών δακτυλίων. Το DPPH· μπορεί να παγιδεύσει εύκολα άλλες ρίζες, αλλά δεν διμερίζει. Εξαιτίας μιας ισχυρής ζώνης απορρόφησης, η οποία επικεντρώνεται στα περίπου 515 nm, το διάλυμα της ρίζας DPPH σχηματίζεται σε βαθύ ιώδες χρώμα και γίνεται άχρωμο έως ανοιχτό κίτρινο, όταν μειώνεται κατά την αντίδραση με δότη υδρογόνου. Η μείωση της απορρόφησης εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών. Αυτό, που χρησιμοποιείται ως τυπικό αντιοξειδωτικό είναι και σε αυτή τη μέθοδο το Trolox. (E. ABUIN, 2002) (Gupta, 2015)



Εικόνα 1-7. Δομή του DPPH.

1.3.5.3 Τεχνική EPR

Το EPR είναι μία από τις κύριες τεχνικές, που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ριζών λόγω της μοναδικής ικανότητάς του να μετρά και να διακρίνει άμεσα τις ήδη υπάρχουσες ρίζες που προκαλούνται από την αντίδραση. (Chatzidaki, 2016)

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής και αναλύεται ενδελεχώς στο Κεφάλαιο 2.

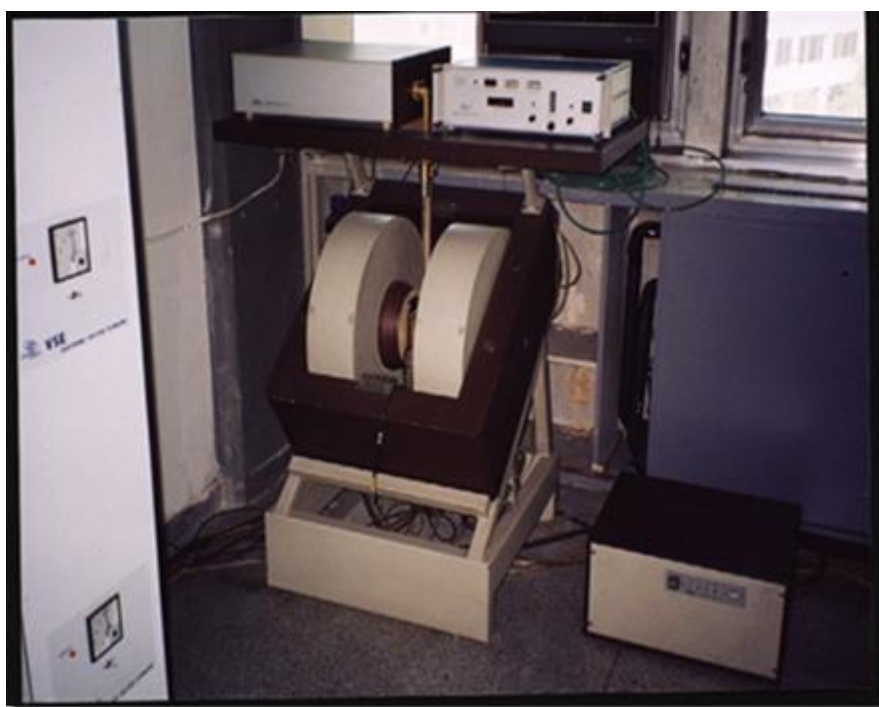
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά

- β-Κυκλοδεξτρίνη (>99% καθαρότητα) MW=1134.98 Fluka
- Πυραζολίνη 1 (έτοιμο και χαρακτηρισμένο απ' το εργαστήριο)
- Πυραζολίνη 2 (έτοιμο και χαρακτηρισμένο απ' το εργαστήριο)
- 5-doxyl-στεατικό οξύ (5-DSA) MW=384.57 Sigma-Aldrich
- 16-doxyl-στεατικό οξύ (16-DSA) MW= 384.57 Sigma-Aldrich
- 4-ύδροξυ-TEMPO (TEMPOL) MW=172.24 Sigma-Aldrich
- Αιθανόλη 98% Sigma-Aldrich
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) Sigma-Aldrich
- Υπερκαθαρό νερό
- Κωνικά σωληνάρια 1.5mL (τύπου erpendorf) με πώμα

2.2 Όργανα

Η καταγραφή των φασμάτων EPR για το δομικό χαρακτηρισμό και την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των συμπλόκων έγινε με το φασματόμετρο Bruker EMXmicro σε συχνότητα 9.75GHz (X-band), το οποίο εκπέμπει μονοχρωματικά μικροκύματα (Εικόνα 2-1).



Εικόνα 2-1. Φασματόμετρο ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού EPR.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα WG-813-Q (Wilmand Glass Company, INC, Buena, NJ), η οποία απεικονίζεται στην Εικόνα 2.2-2.



Εικόνα 2-2. Πεπλατυσμένη κυψελίδα για υγρά δείγματα τύπου WG-813-Q της εταιρίας Wildmand για EPR.

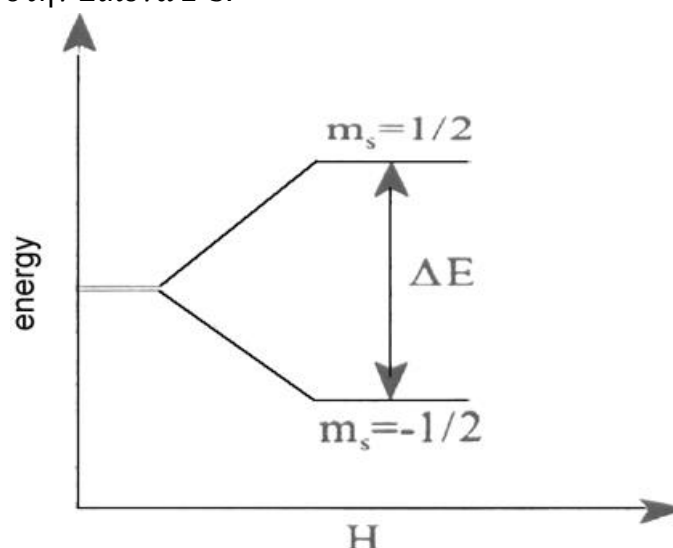
2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός (EPR)

Ο ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός είναι μια φασματοσκοπική τεχνική κατά την οποία παραμαγνητικά μόρια (μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια) απορροφούν την ενέργεια που προέρχεται από ακτινοβολία τους με ακτινοβολία μικροκυμματικής συχνότητας. Κατά τη διαδικασία αυτή τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια συντονίζονται και μέσω του EPR μπορεί κανείς να μετρήσει την ενέργεια διαχωρισμού (splitting) σε μαγνητικό πεδίο. Αυτή η τεχνική θεωρείται κατάλληλη για τη μελέτη της μοριακής κινητικότητας και της μικρο-πολικότητας και της δομής πολύπλοκων φυσικοχημικών συστημάτων. (Jean Marc Di Meglio, 1985) (D. Skoutas, 2001) (Spyridon Avramiotis, 2007)

Πιο συγκεκριμένα, όταν ένα μόριο έχει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων ή όταν στη θεμελιώδη του κατάσταση περιέχει μονήρη ηλεκτρόνια με παράλληλα spin ($\uparrow\uparrow$), το μόριο παρουσιάζει μαγνητική ροπή και ονομάζεται παραμαγνητικό. Σε αυτό το πλαίσιο η τεχνική EPR μπορεί να μελετήσει οποιαδήποτε ένωση με τις παραπάνω ιδιότητες.

Ένα ηλεκτρόνιο υπό κανονικές συνθήκες έχει spin $m_s = \pm 1/2$. Με την παρουσία μαγνητικού πεδίου αυτή η κατάσταση αναλύεται σε μια χαμηλότερη και μια υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση με $m_s = -1/2$ και $m_s = 1/2$ αντίστοιχα όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2-3.



Εικόνα 2-3. Ενεργειακή κατάσταση ενός ηλεκτρονίου παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Η αρχή της τεχνικής EPR βασίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από ένα παραμαγνητικό μόριο υπό μαγνητικό πεδίο. Η κατάσταση συντονισμού δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H_0 \quad (1)$$

όπου, ΔE η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο καταστάσεων, h η σταθερά του Plank, ν η συχνότητα της ακτινοβολίας, β η σταθερά Bohr, H_0 η ένταση του μαγνητικού πεδίου και g ο συντελεστής διαχωρισμού. Για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο είναι $g=2.0023$.

2.3.1.1 Μελέτη δομικού χαρακτηρισμού

Τα φάσματα EPR, λαμβάνονται σε μία σταθερή μικροκυμματική συχνότητα και το κύριο μαγνητικό πεδίο «σαρώνεται» έως ότου επιτευχθεί συντονισμός. Για τη μελέτη της αλλαγής της μοριακής κινητικότητας και της μικρο-πολικότητας των κυκλοδεξτρινών, δηλαδή της πολικότητας στην περιοχή γύρω από τον παραμαγνητικό δακτύλιο, πριν και μετά τη συμπλοκοποίηση χρησιμοποιήθηκαν οι αμφίφιλοι ιχνηθέτες 5- και 16- DSA. Οι ιχνηθέτες αυτοί δίνουν έμμεσα πληροφορίες για το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Η *κινητικότητα των ιχνηθετών* εκφράζεται με τον χρόνο συσχέτισης περιστροφής τ_R (*rotational correlation time*), ενώ η *ελαστικότητα του περιβάλλοντός τους* εκφράζεται μέσω της ελευθερίας κίνησής τους με την παράμετρο S .

Συγκεκριμένα, η παράμετρος τ_R είναι ο χρόνος που απαιτείται για για μια πλήρη περιστροφή του ιχνηθέτη με μονάδα μέτρησης τα nanoseconds. Από την άλλη ο παράγοντας S αποτελεί το βαθμό ελαστικότητας του περιβάλλοντος του ιχνηθέτη με τιμές που κυμαίνονται από το 0 έως το 1. Το 0 αφορά στην απόλυτη αταξία ενώ το 1 στην απόλυτα διευθετημένη κατάσταση. Ο χρόνος τ_R υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\tau_R = (6 \times 10^{-10}) [(h_0/h_{+1})^{1/2} + (h_0/h_{-1})^{1/2} - 2] \Delta H_0 \quad (2)$$

όπου ΔH_0 είναι το πλάτος (mT) της κεντρικής κορυφής και h_{+1} , h_0 , και h_{-1} είναι τα ύψη των κορυφών από το χαμηλό στο υψηλό πεδίο, αντίστοιχα.

Από τα χαρακτηριστικά του φάσματος υπολογίζονται και οι παράμετροι S και η ιστροπική υπέρλεπτη σταθερά διαχωρισμού, a_0 . Η παράμετρος S υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$S = (A_{||} - A_{\perp}) / [A_{zz} - (1/2) \times (A_{xx} + A_{yy})] \times (a_0/a_0') \quad \text{ή } k \quad (3)$$

όπου $A_{||}$ αντιστοιχεί στο μισό της απόστασης του εξωτερικού μέγιστου υπέρλεπτου διαχωρισμού ($2A_{max}$), και το A ορίζεται ως:

$$A_{\perp} = A_{min} + 1.4 * (1 - S^{app}) \quad (4)$$

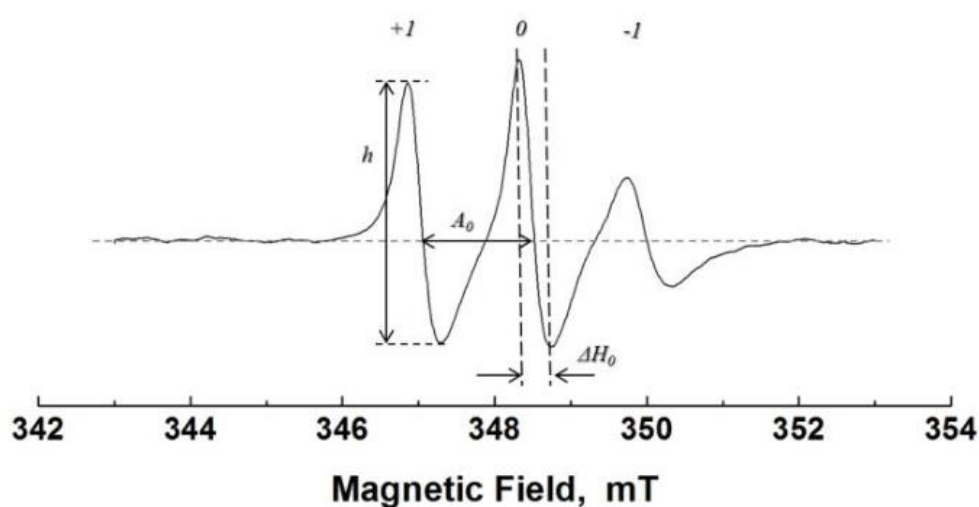
$$S_{app} = (A_{max} - A_{min}) / [A_{zz} - (1/2) * (A_{xx} + A_{yy})] \quad (5)$$

όπου A_{min} είναι ίσο με το μισό της απόστασης του εσωτερικού ελάχιστου υπέρλεπτου διάχωρισμού. Το a_0 είναι η ιστροπική υπέρλεπτη σταθερά διάσπασης για τα μόρια νιτροξειδίου στην κρυσταλλική κατάσταση και a_0' είναι η ιστροπική υπέρλεπτη σταθερά διάσπασης για μόρια στο προς εξέταση περιβάλλον:

$$a_0 = (A_{XX} + A_{YY} + A_{ZZ}) / 3 \quad (6)$$

$$a_0' = (A_{||} + 2A_{\perp})/3 \quad (7)$$

Το a_0' αφορά στην πολικότητα του περιβάλλοντος του ιχνηθέτη και παίρνει τιμές από 14.0mT σε οργανικό διαλύτη μέχρι 17.5mT σε υδατικό περιβάλλον. Οι τιμές A_{XX} , A_{YY} και A_{ZZ} είναι οι τιμές των 5- και 16-DSA στην κρυσταλλική μορφή και ισούνται με $A_{XX}=6.3G$, $A_{YY}=5.8G$, και $A_{ZZ}=33.6G$, αντιστοίχως (C., 1976). Ο λόγος των υπέρλεπτων σταθερών σύζευξης των νιτροξειδίων σε κρυσταλλική μορφή (a_0) και στο περιβάλλον ενδιαφέροντος (a_0'), αναφέρεται και ως συντελεστής $k=a_0/a_0'$ και χρησιμοποιείται ως συντελεστής διόρθωσης πολικότητας. Ένα τυπικό φάσμα νιτροξειδίου στο EPR δίνεται στην Εικόνα 2-4.



Εικόνα 2-4. Ενδεικτική εικόνα φάσματος νιτροξειδίου στο EPR. Τα μεγέθη που φαίνονται στην εικόνα αξιοποιούνται στις αντίστοιχες εξισώσεις ώστε να βρεθούν τα μεγέθη τ_R , S και πολικότητα.

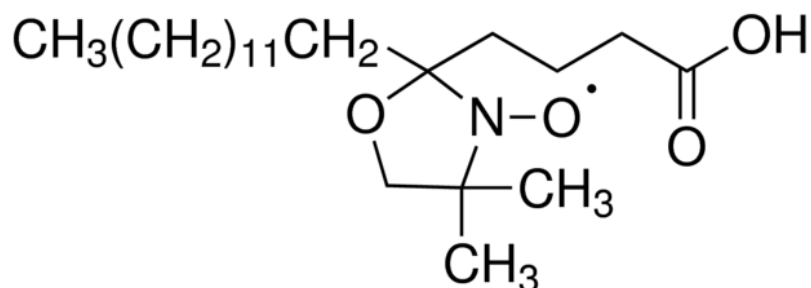
Για τη λήψη των επιθυμητών φασμάτων, οι παράμετροι του οργάνου ρυθμίστηκαν στις εξής τιμές:

Πίνακας 2-1. Παράμετροι ρύθμισης του οργάνου EPR.

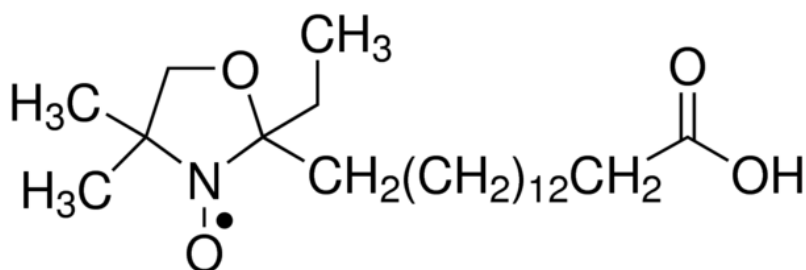
| | |
|----------------------|--------------------|
| Center Field | 0.349 T |
| Receiver gain | 5.02×10^4 |
| Time constant | 10.24 ms |
| Conversion time | 5.00 ms |
| Modulation Amplitude | 0.4 mT |
| Frequency | 9.78 GHz |

Για τη μελέτη της δομής των κυκλοδεξτρινών παρουσία και απουσία αντιοξειδωτικών με τη φασματοσκοπική τεχνική EPR χρησιμοποιήθηκαν τα νιτροξείδια 5- και 16-DSA (5-(1-oxyl-2,2-dimethyl-oxazolidine)-stearic acid) ή (16-(1-oxyl-2,2-dimethyl-oxazolidine)-stearic acid), ως ιχνηθέτης (spin probe).

Το μόριο είναι αμφίφιλο, αποτελούμενο από στεατικό οξύ, το οποίο φέρει στη θέση C5 ή στην C16 αντίστοιχα, την ομάδα doxyl που περιέχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο (Εικόνα 2-5 και 2-6). Τα προϊόντα είναι της εταιρείας Sigma-Aldrich.



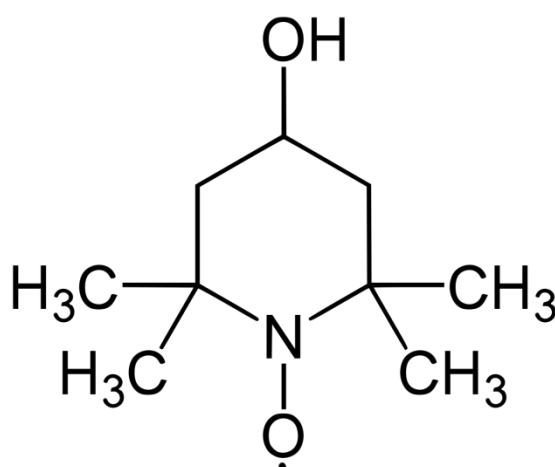
Εικόνα 2-5. Χημική δομή 5-DSA.



Εικόνα 2-6. Χημική δομή 16-DSA.

2.3.1.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα με χρήση Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού σύντονισμού

Η φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Σύντονισμού (EPR) χρησιμοποιείται εκτός από το δομικό χαρακτηρισμό παραμαγνητικών μορίων και για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα, μπορεί να εκτιμηθεί η αντίδραση μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών στο χρόνο. Από τη μείωση της έντασης του φάσματος της ελεύθερης ρίζας στο EPR μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ουσιών ενδιαφέροντος. Μετά την παρασκευή των συμπλόκων μελετήθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με χρήση της ρίζας 4-hydroxy-TEMPO (Εικόνα 2-7).



Εικόνα 2-7. Χημική δομή της ρίζας 4-hydroxy-TEMPO (Tempol).

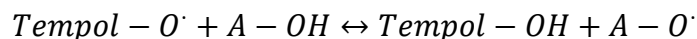
Αρχικά, παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα της ρίζας (1mM) και στο χρόνο 0 αναμείχθηκε με υδατικό διάλυμα συμπλόκου 1 ή 2 συγκεκριμένης συγκέντρωσης (1mg/mL) μέχρι τελική συγκέντρωση 1, 5, 10 και 20% v/v. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν κάθε 5 λεπτά από το χρόνο 0 έως τα 30 λεπτά. Για τη λήψη των επιθυμητών φασμάτων, οι παράμετροι του οργάνου ρυθμίστηκαν στις εξής τιμές:

Πίνακας 2-2. Παράμετροι ρύθμισης του οργάνου EPR για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

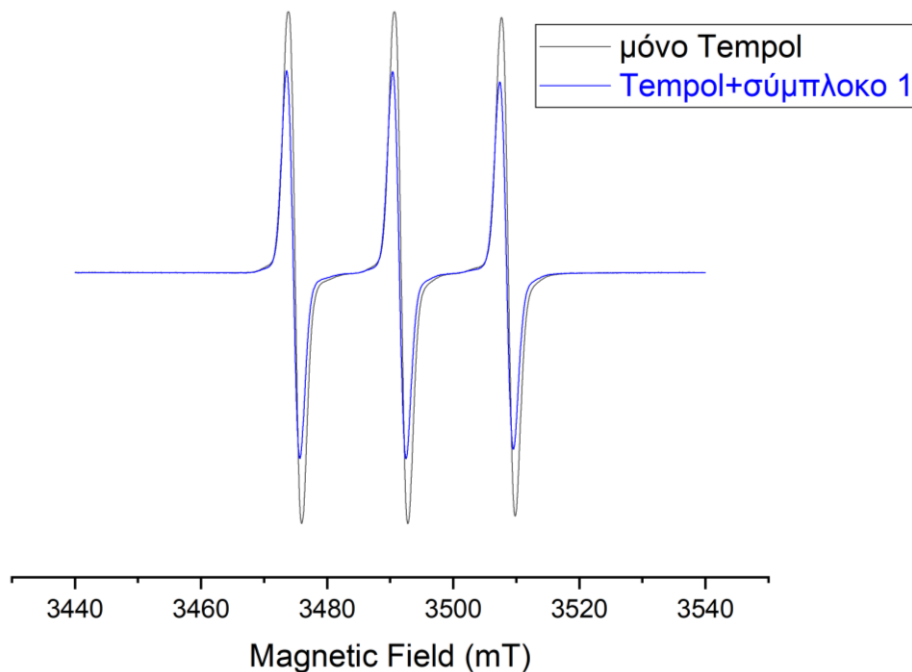
| | |
|----------------------|--------------------|
| Center Field | 0.349 T |
| Receiver gain | 4.48×10^3 |
| Time constant | 1.28 ms |
| Conversion time | 5.00 ms |
| Modulation Amplitude | 0.4 mT |
| Frequency | 9.78 GHz |

Η αδρανοποιητική δράση του συμπλόκου μετρήθηκε και εκφράστηκε ως % αναστολή της ρίζας. Η μέθοδος βασίστηκε στην ικανότητα του αντιοξειδωτικού

του εκάστοτε συμπλόκου να αλληλεπιδρά με τη ρίζα, όπως φαίνεται στην ακόλουθη αντίδραση και να σβήνει το σήμα EPR.



Το σήμα EPR της ελεύθερης ρίζας ελήφθη και αναλύθηκε σε όρους ολοκληρωμένης περιοχής οριοθετημένης από το φάσμα. Παρουσία του συμπλόκου 1 ή του συμπλόκου 2, η ένταση του Tempol μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου όπως παρατηρείται στην Εικόνα ή Εικόνα, αντίστοιχα.



Εικόνα 2-8. Φάσμα EPR της σταθερής ρίζας 4-Hydroxy-tempol σε υπερκαθαρό νερό.

Μαύρη γραμμή: δείγμα απουσία συμπλόκου 1.

Μπλε γραμμή: δείγμα με 5%v/v συμπλόκου 1 στα 30 λεπτά.

Το ποσοστό της αντιοξειδωτικής ικανότητας δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Αντιοξειδωτική ικανότητα} = (A_0 - A) / A_0 \times 100 \quad (8)$$

Το ποσοστό αναστολής της ρίζας δίνεται μέσα από την αντιοξειδωτική ικανότητα των συμπλόκων σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Αναστολή} = 1 - (A_0 - A) / A_0 \times 100 \quad (9)$$

όπου ως A_0 εκφράζεται το εμβαδόν του ολοκληρώματος του φάσματος του διαλύματος της ρίζας TEMPOL στο χρόνο 0 και A το εμβαδόν του ολοκληρώματος του φάσματος που λαμβάνεται παρουσία δείγματος σε κάθε χρονική στιγμή.

2.4 Πειραματική διαδικασία

Τα αντιοξειδωτικά είναι ριζικοί αδρανοποιητές, που έχουν προταθεί ότι εμπλέκονται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, από τη γήρανση έως τις εκφυλιστικές διαταραχές. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο δομικός χαρακτηρισμός και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας των συμπλόκων εγκλεισμού (σύμπλοκο 1 και 2) δύο συνθετικών αντιοξειδωτικών με β -CD. Οι ενώσεις που μελετώνται είναι ετεροκυκλικά υβριδικά μόρια, τα οποία συνδυάζουν το πλαίσιο (framework) κινολίνης και το τμήμα πυραζολίνης σε ένα μοριακό ικρίωμα. Τα σύμπλοκα 1 και 2 διερευνήθηκαν διεξοδικά ως προς τη δομή σε υδατικά διαλύματα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο EPR. Επιπλέον, τα σύμπλοκα εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να αδρανοποιούν ρίζες όπως το 4-υδροξυ-TEMPO σε υπερκαθαρό νερό.

2.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων-δομικός χαρακτηρισμός

Με χρήση των αμφίφιλων ιχνηθετών 5-DSA και 16-DSA εξετάστηκε δομικά η β -CD, αλλά και τα σύμπλοκα της β -CD με τα αντιοξειδωτικά 1 και 2. Επειδή τα σύμπλοκα είχαν μέγιστη διαλυτότητα στο νερό το 1mg κρίθηκε απαραίτητη η χρήση ιχνηθετών σε μικρότερη συγκέντρωση. Γι' αυτό το λόγο, εξετάστηκαν και διαλύματα με συγκεντρώσεις 16-DSA 10^{-4} , 10^{-5} και 10^{-6} M, καθώς δίνει πιο καθαρά φάσματα από το 5-DSA.

Αρχικά, φτιάχνεται διάλυμα 5-DSA ή 16-DSA σε αιθανόλη συγκέντρωσης 10^{-2} M. Από αυτό το διάλυμα συλλέγονται 10 μ L σε ένα κωνικό σωληνάριο, το οποίο αφήνεται ανοιχτό για λίγες ώρες, ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη και να μείνει η στερεή πια ποσότητα 5-DSA ή 16-DSA των 10 μ L. Στη συνέχεια στο φιαλίδιο προστίθεται διάλυμα κυκλοδεξτρίνης («τυφλό») ή συμπλόκου ώστε η τελική συγκέντρωση του ιχνηθέτη να είναι 10^{-4} M. Αντίστοιχο πρωτόκολλο ακολουθήθηκε και για τις συγκεντρώσεις 10^{-5} και 10^{-6} M.

Κάθε δείγμα μετρήθηκε στο EPR τρεις φορές και από τα φάσματα με χρήση των εξισώσεων που δίνονται στο 2.3, υπολογίστηκαν τα τ_R , S, A_0 .

2.4.2 Προετοιμασία δειγμάτων - αντιοξειδωτική δράση

Αρχικά, χρειάζεται να παρασκευαστεί ένα διάλυμα ιχνηθέτη Tempol συγκέντρωσης 1mM όγκου 25mL με διαλύτη το H₂O. Το σκεύος του διαλύματος αυτού φυλάσσεται στο ψυγείο. Την ημέρα 0, που γίνεται ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης, διαλύουμε το σύμπλοκο 1 στο νερό σε συγκέντρωση 1mg/mL και κάνουμε vortex αυστηρά MONO για ένα λεπτό για αποφυγή της πιθανότητας απεγκλωβισμού του αντιοξειδωτικού απ'την β -κυκλοδεξτρίνη. Σε ένα κωνικό σωληνάριο τοποθετείται 1mL απ'το έτοιμο διάλυμα Tempol. Εν συνεχεία αφαιρούνται απ'αυτό 10 μ L και προστίθενται 10 μ L του υδατικού διαλύματος συμπλόκου 1. Απευθείας ξεκινάει να μετράει ένα χρονόμετρο κι αυτό το νέο διάλυμα Tempol με 1%v/v τοποθετείται στην κυψελίδα του EPR, ώστε να επιτευχθεί καλός συντονισμός εντός 2 λεπτών από την ώρα

καταγραφής του χρόνου και να παρθεί η πρώτη μέτρηση. Στα 5',10',15',20', 25' και 30' πραγματοποιείται από μία μέτρηση του δείγματος για να είναι εφικτή η καταγραφή της αναστολής της δράσης της ρίζας TEMPOL και η εύρεση της κινητικής της αντίδρασης.

Στη συνέχεια, το εξεταζόμενο διάλυμα χωρίζεται σε 2 μέρη. Το ένα διατηρείται σε κωνικό σωληνάριο στο ψυγείο και το δεύτερο αποθηκεύτηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος, προκειμένου να μετρηθούν εκ νέου κάθε μέρα για μία εβδομάδα και να παρατηρηθεί αν σε τι συνθήκες γίνεται καλύτερη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης του συμπλόκου 1 με το πέρασμα του χρόνου.

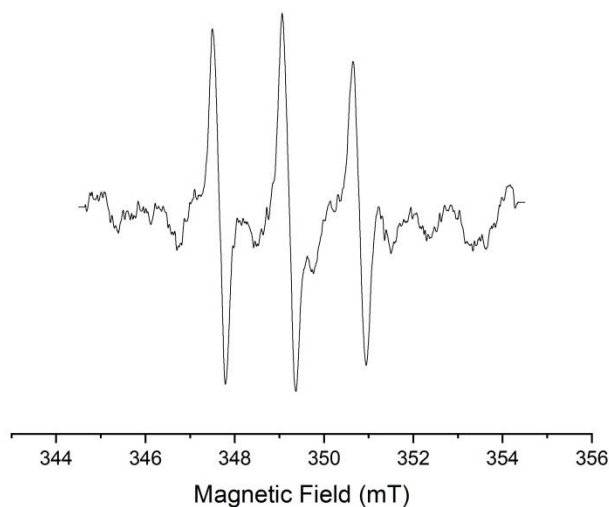
Με την ίδια ακριβώς διαδικασία προετοιμάστηκαν και μελετήθηκαν και διαλύματα Tempol με 5%v/v του εκάστοτε συμπλόκου κάθε μέρα για μία εβδομάδα. Αυτή τη φορά προτιμήθηκε να διατηρηθούν όλα τα διαλύματα στο ψυγείο, μετά από τα λίγο πιο ευνοϊκά αποτελέσματα, που είχαν τα διαλύματα του 1% v/v.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το κύριο εμπόδιο στο χειρισμό των αντιοξειδωτικών ενώσεων 1 και 2 είναι, ότι έχουν πολύ χαμηλή διαλυτότητα σε κοινούς οργανικούς διαλύτες, καθώς και καθόλου διαλυτότητα στο νερό. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, επιλέξαμε το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού πυραζολινών 1 και 2 σε β -CD. Έτσι, παρουσιάζουμε εδώ την προετοιμασία, τον δομικό και φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των συμπλόκων εγκλεισμού. Τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν με χρήση φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR) spectroscopy. Τέλος, τα σύμπλοκα 1 και 2 αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση, εκφραζόμενη ως η ικανότητά τους να καταστρέφουν την ελεύθερη ρίζα 4-Hydroxy-TEMPO χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία EPR.

3.1 Δομικός χαρακτηρισμός

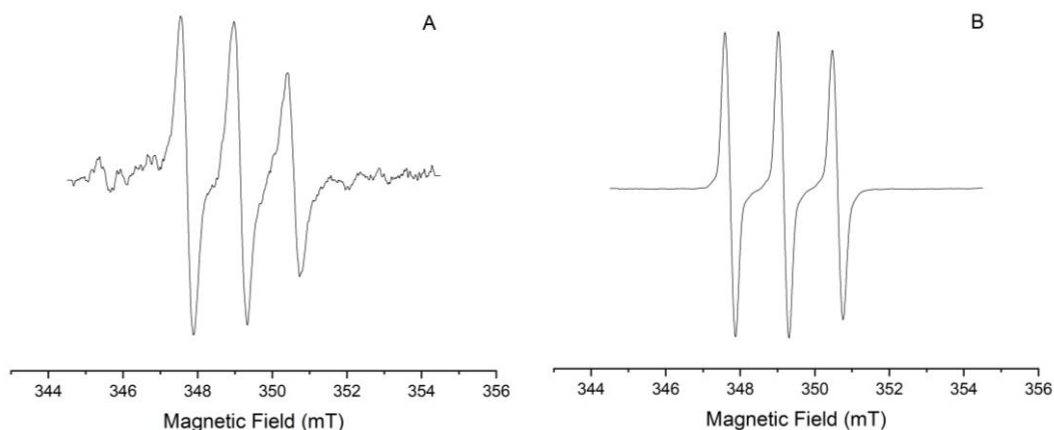
Πρώτα απ' όλα γίνεται εξέταση των τυφλών δειγμάτων, δηλαδή των διαλυμάτων των αμφίφιλων ιχνηθετών 10^{-4} M 5-DSA και 16-DSA (Εικόνα 3-1), σε μέσο δις-απιονισμένου H_2O . Στην περίπτωση του διαλύματος 10^{-4} M 5-DSA σε υπερκαθαρό νερό δεν προέκυψε φάσμα, αλλά είχε μόνο θόρυβο. Αυτό είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στη μικρότερη διαλυτότητα, που έχει στο νερό σε σχέση με τον 16-DSA ιχνηθέτη (Fernanda Pérez-Cruz, 2013).



Εικόνα 3-1 Φάσμα νιτροξειδίου διαλύματος 10^{-4} M 16-DSA σε υπερκαθαρό H_2O .

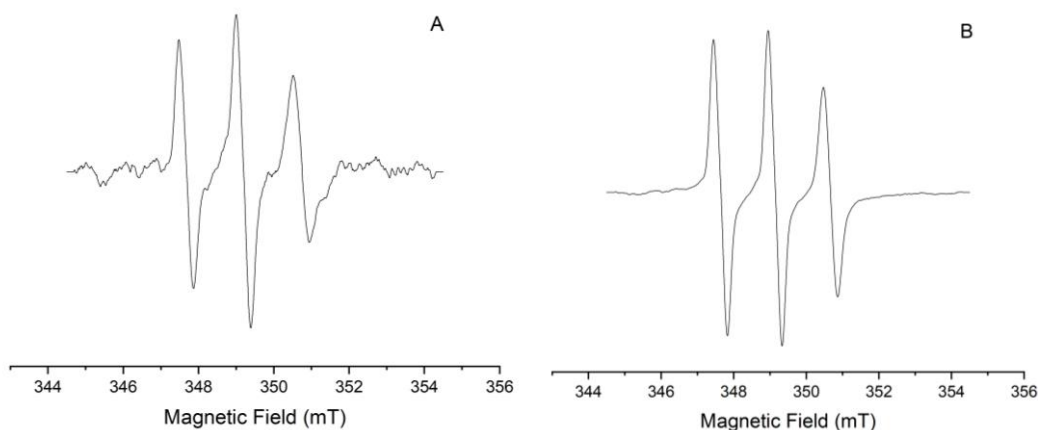
Δεδομένου ότι από το υδατικό διάλυμα του 5-DSA δεν ανιχνεύθηκε σήμα, επιλέχθηκε ένας άλλος διαλύτης, που χρησιμοποιείται σε βιολογικές μεμβράνες, το DMSO για διαλύματα 10^{-4} M 5-DSA και 16-DSA, έτσι ώστε να γίνει έλεγχος της συμπεριφοράς των ιχνηθετών σε δύο διαφορετικούς διαλύτες. Όπως φαίνεται κι από την Εικόνα 3.1.2Α μπόρεσε να προκύψει φάσμα από το διάλυμα 5-DSA σε DMSO. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί απ' το γεγονός ότι το DMSO είναι λιγότερο πολικός διαλύτης από το νερό.

Επίσης, σε σχέση με το 16-DSA ($\tau_R=0.12$) παρατηρείται μεγαλύτερη ακινητοποίηση του 5-DSA ($\tau_R=0.41$)· κάτι που συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες. (Simona Rossi, 2007)



Εικόνα 3-2. Φάσματα νιτροξειδίου 5-DSA (A) και 16-DSA (B) διαλυμάτων 10^{-4} M σε μέσο DMSO.

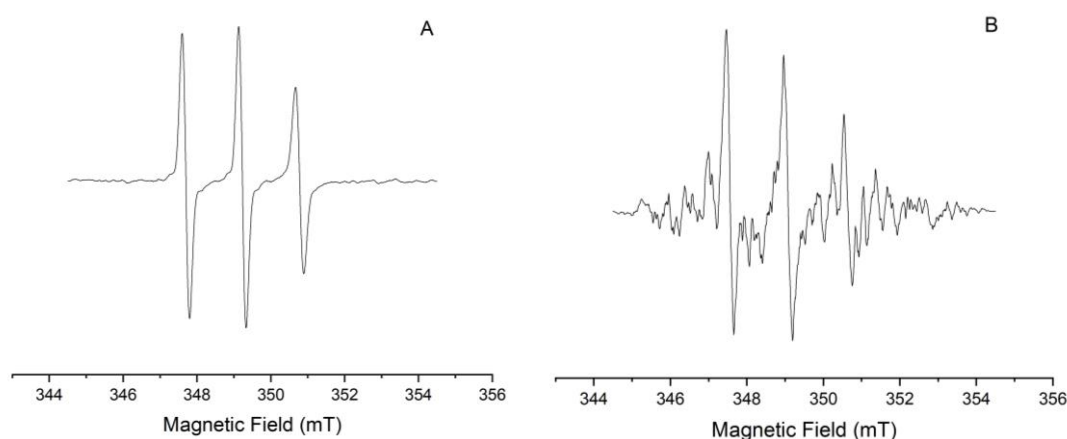
Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε διάλυμα β-κυκλοδεξτρίνης σε υπερκαθαρό νερό με συγκέντρωση 10mg/mL (μέγιστη διαλυτότητα της β-κυκλοδεξτρίνης στο νερό). Σε κωνικό σωληνάριο τοποθετήθηκε 1mL από το διάλυμα κυκλοδεξτρίνης και παρέμεινε σε υδατόλουτρο στους 25°C για μία μέρα. Για αυτή τη συγκέντρωση εξετάστηκαν τρία δείγματα διαλυμάτων. Στη συνέχεια, με χρήση πιπέτας τα διαλύματα τοποθετήθηκαν στην κυψελίδα του EPR χωρητικότητας 1mL και προέκυψαν τα παρακάτω φάσματα Εικόνα 3-2Α και Εικόνα 3-2Β.



Εικόνα 3-3. Σύγκριση φασμάτων νιτροξειδίου διαλυμάτων 10^{-4} M 5-DSA (A) και 16-DSA (B) και 10mg/mL β-CD σε υπερκαθαρό H_2O .

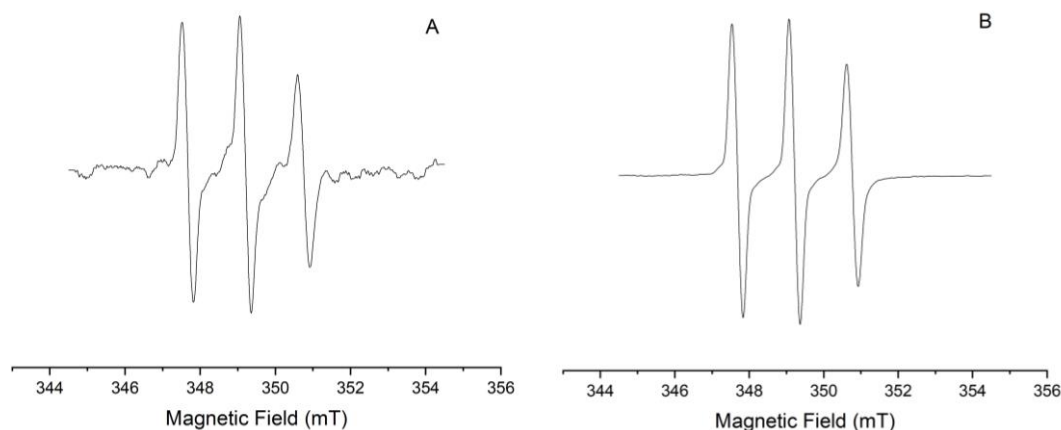
Από την ύπαρξη του φάσματος της Εικόνας 3-3Α είναι ξεκάθαρο ότι η ύπαρξη της κυκλοδεξτρίνης στο διάλυμα έχει βοηθητικό ρόλο στην διαλυτοποίηση του 5-DSA στο νερό. Επίσης, όσον αφορά το 16-DSA, διακρίνεται καλύτερη διαλυτοποίησή του στο H_2O παρουσία της β-κυκλοδεξτρίνης, καθώς στο φάσμα υπήρχε μεγαλύτερη ένταση σήματος και άρα το φάσμα ήταν ευκρινέστερο. Αυτό δικαιολογείται πλήρως από τη δομή των μορίων της β-κυκλοδεξτρίνης, που ευνοεί τον εγκλεισμό των τμημάτων των αμφίφιλων 5-DSA και 16-DSA ιχνηθετών στην -λιπόφιλου χαρακτήρα- κοιλότητά της.

Επειδή τα δυο αυτά σύμπλοκα των αντιοξειδωτικών με την β-κυκλοδεξτρίνη, που θέλουμε να εξετάσουμε, έχουν μικρή διαλυτότητα στο H₂O (1mg/mL), είναι αναγκαία η εξέταση υδατικών διαλυμάτων β-κυκλοδεξτρίνης σε συγκέντρωση 1mg/mL. Στα διαλύματα του 1mg/mL β-κυκλοδεξτρίνης, η μολαρική συγκέντρωση της β-κυκλοδεξτρίνης προκύπτει ότι είναι περίπου 8.8x10⁻⁴M. Γι' αυτό το λόγο κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη διαλυμάτων με μικρότερες συγκεντρώσεις ιχνηθετών εκτός της συγκέντρωσης 10⁻⁴ M. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν διαλύματα με συγκέντρωση 10⁻⁵ M και 10⁻⁶ M ιχνηθετών 5-DSA (δεν προέκυψε φάσμα) και 16-DSA (Εικόνα 3-4).

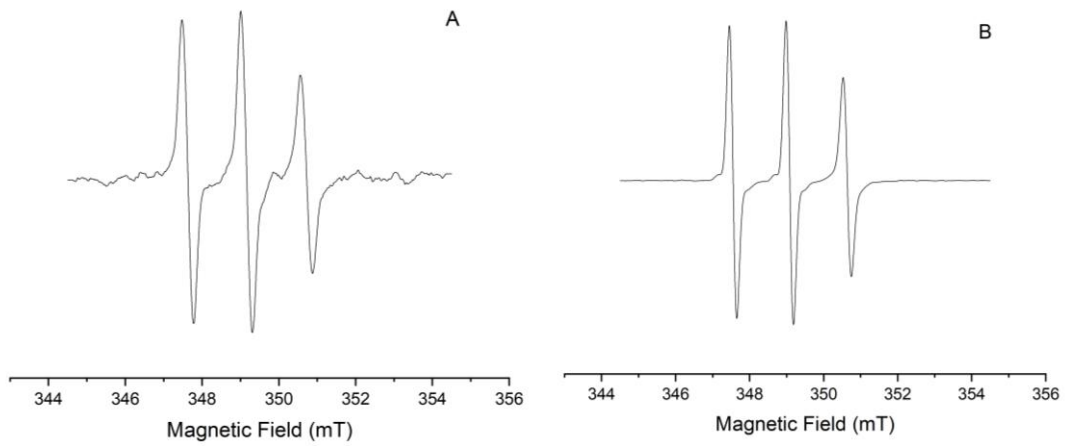


Εικόνα 3-4. Φάσματα νιτροξειδίου διαλυμάτων 10⁻⁵M (A) και 10⁻⁶M (B) 16-DSA και 1mg/mL β-CD σε υπερκαθαρό H₂O.

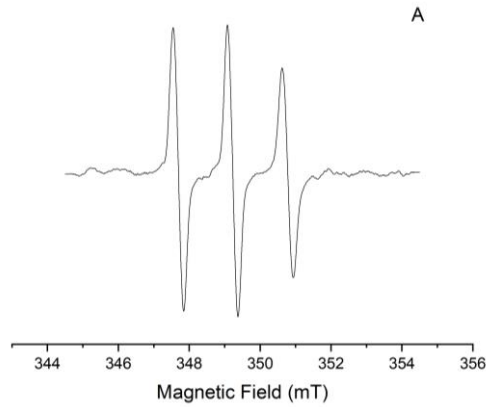
Στις ίδιες συγκεντρώσεις ιχνηθετών μελετήθηκε δομικά το σύμπλοκο του αντιοξειδωτικού 1 (Εικόνα 3-5), όπως και το σύμπλοκο του αντιοξειδωτικού 2 (Εικόνα 3-6). Όσον αφορά το 5-DSA στις συγκεντρώσεις 10⁻⁵ M και 10⁻⁶ M δεν ήταν ανιχνεύσιμο, ούτε στην περίπτωση του διαλύματος μόνο με τη β-κυκλοδεξτρίνη, ούτε στα διαλύματα των συμπλόκων.



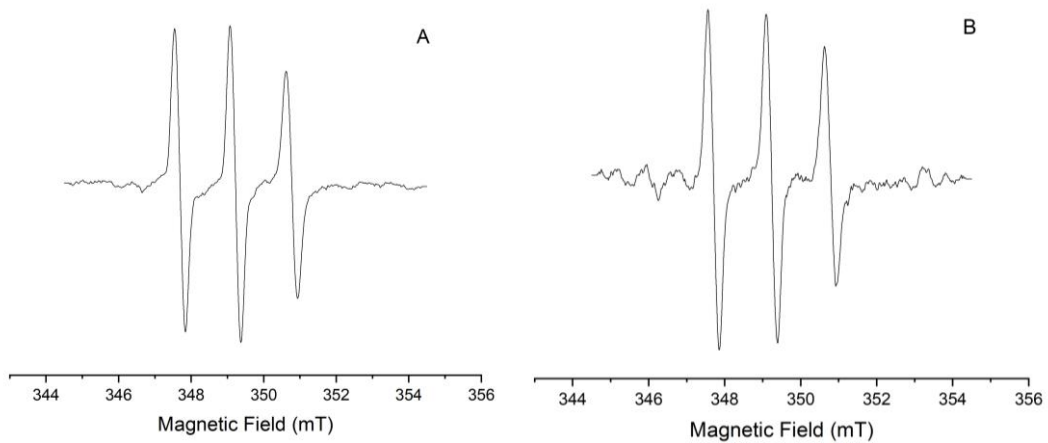
Εικόνα 3-5. Σύγκριση φασμάτων νιτροξειδίου διαλυμάτων 10⁻⁴ M 5-DSA (A) και διαλύματος 10⁻⁴ M 16-DSA (B) και 1mg/mL συμπλόκου 1 σε υπερκαθαρό H₂O.



Εικόνα 3-6. Σύγκριση φασμάτων νιτροξειδίου διαλυμάτων 10^{-4} M 5-DSA (A) και διαλύματος 10^{-4} M 16-DSA (B) και 1mg/mL συμπλόκου 2 σε υπερκαθαρό H_2O .



Εικόνα 3-7. Σύγκριση φασμάτων νιτροξειδίου διαλυμάτων 10^{-5} M (A) και διαλύματος 10^{-6} M 16-DSA (B) και 1mg/mL συμπλόκου 1 σε υπερκαθαρό H_2O .



Εικόνα 3-8. Σύγκριση φασμάτων νιτροξειδίου διαλυμάτων 10^{-5} M (A) και διαλύματος 10^{-6} M 16-DSA (B) και 1mg/mL συμπλόκου 2 σε υπερκαθαρό H_2O .

Από αυτά τα διαγράμματα και με τη βοήθεια των εξισώσεων 2, 3 και 6 υπολογίστηκαν οι τιμές του τ_R (χρόνος ιδιοπεριστροφής του ανιχνευτή spin), του S (order parameter), και του A_0 (ισοτροπική σταθερά υπέρλεπτης σύζευξης), που καταγράφηκαν με τη χρήση των δύο διαφορετικών ιχνηθετών 5-DSA και 16-DSA και παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 3-1. Τιμές του τ_R (ns) σε υδατικά διαλύματα 5-DSA και 16-DSA απουσία και παρουσία β -CD, με το σύμπλοκο 1 και με το σύμπλοκο 2.

| τ_R (ns) | | | | | |
|-----------------------|--------|----------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ | | Μόνο ιχνηθέτης | Μόνο β -CD (1mg/mL) | Σύμπλοκο 1 (1mg/mL) | Σύμπλοκο 2 (1mg/mL) |
| 10 ⁻⁴ M | 5-DSA | - | 0.48 | 0.54 | 0.45 |
| | 16-DSA | 0.20 | 0.32 | 0.32 | 0.30 |
| 10 ⁻⁵ M | 5-DSA | - | - | - | - |
| | 16-DSA | 0.13 | 0.33 | 0.43 | 0.34 |
| 10 ⁻⁶ M | 5-DSA | - | - | - | - |
| | 16-DSA | - | 0.40 | 0.28 | 0.27 |

Πίνακας 3-2. Τιμές του S σε υδατικά διαλύματα 5-DSA και 16-DSA απουσία και παρουσία β -CD, με το σύμπλοκο 1 και με το σύμπλοκο 2.

| S | | | | | |
|-----------------------|--------|----------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ | | Μόνο ιχνηθέτης | Μόνο β -CD (1mg/mL) | Σύμπλοκο 1 (1mg/mL) | Σύμπλοκο 2 (1mg/mL) |
| 10 ⁻⁴ M | 5-DSA | - | 0.05 | 0.07 | 0.05 |
| | 16-DSA | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 10 ⁻⁵ M | 5-DSA | - | - | - | - |
| | 16-DSA | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 10 ⁻⁶ M | 5-DSA | - | - | - | - |
| | 16-DSA | - | 0.05 | 0.05 | 0.05 |

Πίνακας 3-3. Τιμές του a_0 σε υδατικά διαλύματα 5-DSA και 16-DSA απουσία και παρουσία β -CD, με το σύμπλοκο 1 και με το σύμπλοκο 2.

| a_0 (10 ⁻⁴ T) | | | | | |
|----------------------------|--------|----------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ | | Μόνο ιχνηθέτης | Μόνο β -CD (1mg/mL) | Σύμπλοκο 1 (1mg/mL) | Σύμπλοκο 2 (1mg/mL) |
| 10 ⁻⁴ M | 5-DSA | - | 15.88 | 15.62 | 15.87 |
| | 16-DSA | 16.12 | 15.83 | 15.84 | 15.85 |
| 10 ⁻⁵ M | 5-DSA | - | - | - | - |
| | 16-DSA | 16.10 | 15.84 | 15.77 | 15.83 |
| 10 ⁻⁶ M | 5-DSA | - | - | - | - |
| | 16-DSA | - | 15.89 | 15.82 | 15.87 |

Από τους Πίνακες 3-1, 3-2 & 3-3 αυτό που παρατηρείται σε όλα τα δείγματα είναι μείωση του A_0 στα δείγματα παρουσία της β -CD (είτε μόνη της είτε ως σύμπλοκο), το A_0 είναι μικρότερο σε σχέση με δείγματα, που δεν έχουν κυκλοδεξτρίνη. Αυτό συμβαίνει, καθώς μειώνεται η πολικότητα, αφού οι ιχνηθέτες εγκλωβίζονται από τις κυκλοδεξτρίνες. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μόρια ιχνηθετών βρίσκονται στο εσωτερικό της κοιλότητας της β -CD καθιστώντας το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται λιγότερο υδατικό.

Όσον αφορά το μέγεθος S , το οποίο δείχνει την ακαμψία με $S=0$ για τη μεγαλύτερη αταξία και $S=1$ την πιο οργανωμένη κατάσταση, στα δείγματα που μελετήθηκαν είναι 0.05 πολύ κοντά στο 0, άρα υποδηλώνει μεγάλη αταξία και δεν παρατηρείται καμμία μεταβολή της τιμής αυτής σχεδόν σε κανένα απ'τα δείγματα.

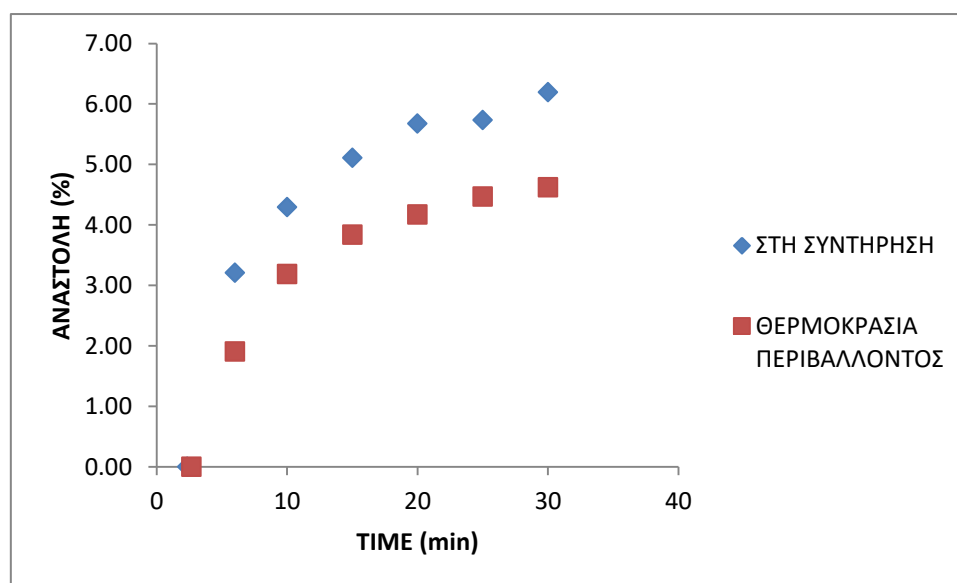
Συγκρίνοντας τις μετρήσεις του χρόνου συσχέτισης περιστροφής τ_R τόσο για το 5-DSA όσο και το 16-DSA, για την συγκέντρωση 10^{-4} M, εμφανίζουν μεγαλύτερη ακινητοποίηση, όταν είναι διαλυτοποιημένα με την β -CD με μεγαλύτερη ακινητοποίηση να εμφανίζει το 5-DSA. Το 5-DSA λόγω και του μη ανιχνεύσιμου σήματος σε χαμηλές συγκεντρώσεις και κυρίως στο νερό, όπου δεν έδωσε φάσμα σε καμμία από τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, προκύπτει το συμπέρασμα ότι έχει αρκετά χαμηλή διαλυτοποίηση, ειδικά σε σχέση με το 16-DSA. Η δομή του 16-DSA μπορεί να εξηγήσει τη διαλυτότητά του στο νερό. Ο παραμαγνητικός δακτύλιος του 16-DSA βρίσκεται στην αρχή του μορίου και τον ακολουθεί μια μακρά αλειφατική αλυσίδα, που του επιτρέπει να κινείται πιο ελεύθερα. (Simona Rossi, 2007)

Αν παρατηρηθεί το Σύμπλοκο 1 φαίνεται απ'την αύξηση του τ_R του 5-DSA ότι ο παραμαγνητικός δακτύλιος του ιχνηθέτη δείχνει πιο ακινητοποιημένος απ'ότι στο διάλυμα που είναι μόνο με τη β -κυκλοδεξτρίνη, ενώ το τ_R του 16-DSA παραμένει σταθερό. Αντίθετα, το Σύμπλοκο 2 έχει μικρότερο τ_R κάτι που δείχνει πως το αντιοξειδωτικό του συμπλόκου μάλλον παραμένει στο εσωτερικό της β -κυκλοδεξτρίνης χωρίς να επιτρέπει στους ιχνηθέτες 5-DSA και 16-DSA να εισέλθουν στην κοιλότητα της, με αποτέλεσμα οι παραμαγνητικοί τους δακτύλιοι να μπορούν να κινηθούν πιο ελεύθερα.

3.2 Μέθοδος ελέγχου αντιοξειδωτικής δράσης των συμπλόκων 1 και 2

Με χρήση του υδρόφιλου ιχνηθέτη 4-υδροξυ-TEMPO (TEMPOL) έγινε μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης και των δύο συμπλόκων. Λόγω των χαμηλών τιμών αναστολής, αλλά κυρίως επειδή τα σύμπλοκα έχουν μέγιστη διαλυτότητα στο νερό το 1mg στο 1mL επιλέχθηκαν για τα υδατικά διαλύματα συγκέντρωση του 1mM TEMPOL.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του παράγοντα της θερμοκρασίας σε χρονικό διάστημα μιας εβδομάδας. Γι'αυτό το εξεταζόμενο διάλυμα 1%v/v συμπλόκου 1, μετά τη λήψη του φάσματός του την ημέρα που παρασκευάστηκε (Ημέρα 0) χωρίστηκε σε 2 μέρη· το ένα διατηρήθηκε εντός ψυγείου και το άλλο εκτός (Εικόνα 3-9). Απ'το φάσμα μπορούμε να διακρίνουμε ότι υπάρχει μια μικρή διαφορά ανάμεσα στις 2 διαφορετικές θερμοκρασίες με την χαμηλότερη θερμοκρασία (θερμοκρασία ψυγείου) να έχει ευνοϊκή επίδραση στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του συμπλόκου 1.



Εικόνα 3-9. Αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος 1% v/v του συμπλόκου 1 εντός και εκτός συντήρησης στη διάρκεια μίας εβδομάδας.

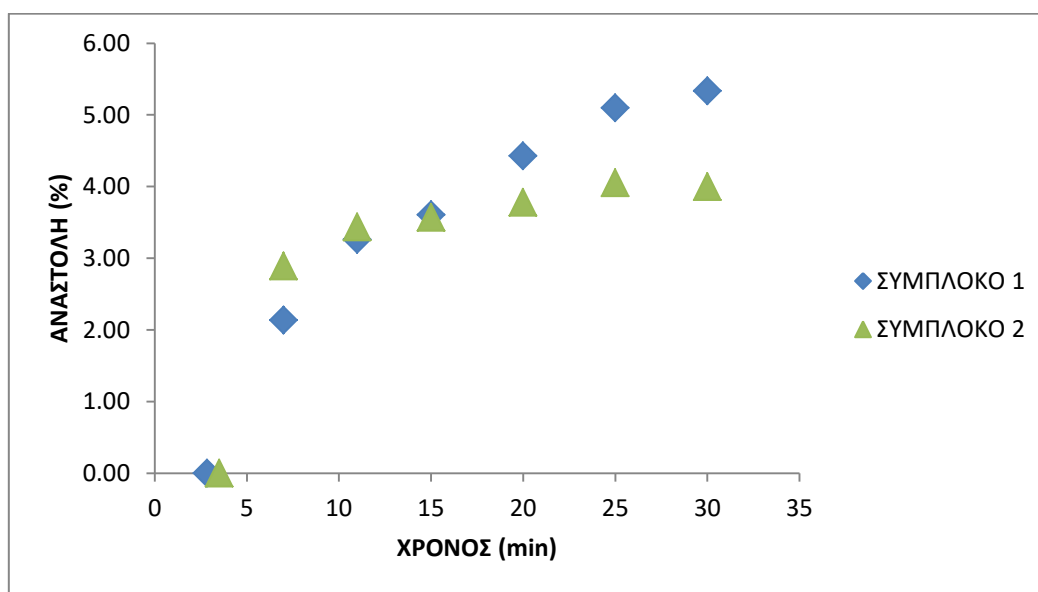
Εξαιτίας της θετικής επίδρασης, που είχε η ψύξη των διαλυμάτων στο ψυγείο για την εξέταση των υπολοίπων διαλυμάτων επιλέχθηκε να αποθηκεύονται μόνο στο ψυγείο.

Δυο ακόμη διαλύματα, που μελετήθηκαν για μια βδομάδα, είναι διαλύματα 5% v/v των συμπλόκων σε 1mM TEMPOL. Παρόλα αυτά δεν έδειξαν να διατηρούν την αντιοξειδωτική τους δράση μέσα στη βδομάδα. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι το γεγονός ότι με μεγαλύτερη συγκέντρωση των συμπλόκων είναι η εφικτή η αδρανοποίηση μεγαλύτερης συγκέντρωσης της ρίζας Tempol από την ημέρα 0 που έγινε και η πρώτη μέτρηση. Επομένως, τις υπόλοιπες μέρες, που

ξαναμετρήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση δεν παρουσιάστηκε κάποια περαιτέρω αδρανοποίηση της ρίζας.

Εξαιτίας της μικρής αντιοξειδωτικής ικανότητας, που παρουσίασαν τα σύμπλοκα, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης της ίδιας της ρίζας Tempol. Το τυφλό διάλυμα Tempol μετρήθηκε μόνο τη πρώτη ημέρα (ΗΜΕΡΑ 0), που παρασκευάστηκε και εμφάνισε μια αντιοξειδωτική δράση της τάξεως του 2%.

Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση της αναστολής της δράσης του Tempol από το σύμπλοκο 1 και σύμπλοκο 2. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι το σύμπλοκο 1 εμφανίζει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση πάνω από 5%, ενώ το σύμπλοκο 2 φτάνει μέχρι το 4% (Εικόνα 3-10). Κάτι, που ενδεχομένως, θα μπορούσε να δικαιολογήσει αυτή τη μικρή διαφορά στην αναστολή της ρίζας ανάμεσα στα δύο σύμπλοκα είναι η δομή τους (Πίνακας 1-2). Το αντιοξειδωτικό 1 (του συμπλόκου 1) διαθέτει δύο υδροξυλομάδες σε σχέση με το αντιοξειδωτικό 2 (του συμπλόκου 2), που διαθέτει δύο. Με αποτέλεσμα το σύμπλοκο 1 να μπορεί να αναστείλει τη ρίζα Tempol σε μεγαλύτερο βαθμό απ'το σύμπλοκο 2.

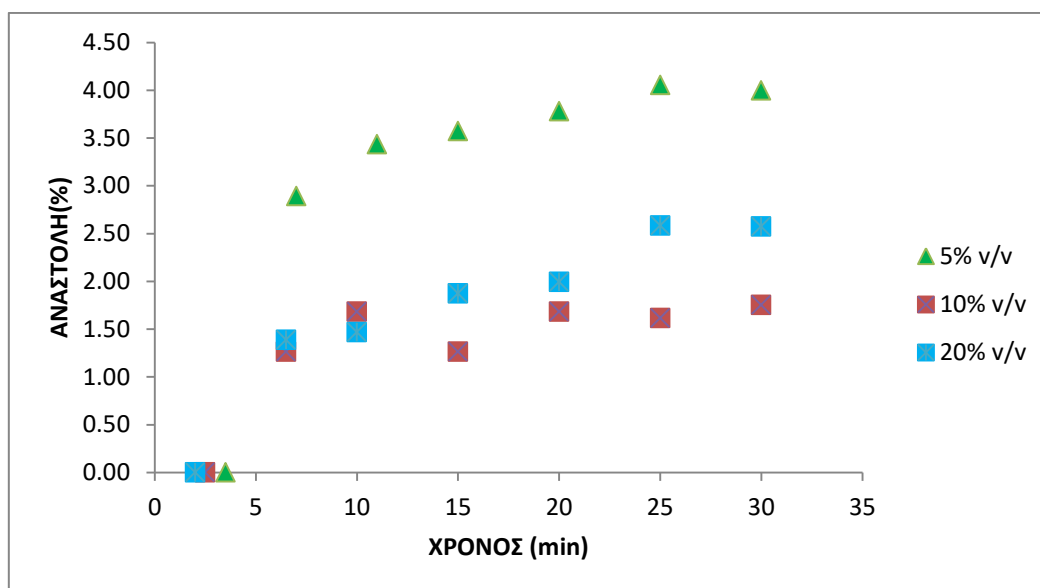


Εικόνα 3-10. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των συμπλόκου 1 και 2 σε 5% v/v αναλογία με το TEMPOL (την Ημέρα 0 που φτιάχτηκαν).

Αν και από όλα τα διαγράμματα διακρίνεται κάποια αντιοξειδωτική δράση, ο βαθμός αναστολής της ρίζας είναι αρκετά μικρός. Αυτή η μικρή συμβολή στην αναστολή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αντιοξειδωτική δράση των συμπλόκων είναι ανεπαρκής, κάτι που είναι πολύ πιθανό οφείλεται στην παρουσία της της β-κυκλοδεξτρίνης.

Αυτό το συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και από την Εικόνα 3-11, όπου συγκρίνονται τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του συμπλόκου εγκλεισμού 2 (5% v/v, 10% v/v και 20% v/v του δείγματος) και παρά τις υψηλές

συγκεντρώσεις των συμπλόκων, καμία αύξηση δεν παρατηρήθηκε στην αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 3-11. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του συμπλόκου 2 σε διαφορετικές αναλογίες 5% v/v, 10% v/v and 20% v/v, την Ημέρα 0 που παρασκευάστηκαν.

Ένας ακόμη σημαντικός λόγος, που μπορεί να εξηγήσει την μη ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση των συμπλόκων 1 και 2 είναι η λιπόφιλη φύση των αντιοξειδωτικών τους. Παρ'ότι η συμπλοκοποίηση με την β-κυκλοδεξτρίνη συμβάλλει στην αύξηση της διαλυτότητας τους στο νερό είναι πολύ πιθανό να μην έγινε απελευθέρωση τους από την κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης. Για να αναστείλουν την οξείδωση του Tempol θα έπρεπε να βγουν στο υδατικό περιβάλλον, αλλά λόγω της υδροφοβικότητάς τους μια αλληλεπίδραση με τα μόρια του νερού δεν θα ήταν επιθυμητή.

Κάτι εξίσου σημαντικό που παρατηρήθηκε ήταν η παραμονή στερεού στα τοιχώματα των κωνικών σωληναρίων. Μια πολύ πιθανή εξήγηση είναι ότι εξαιτίας της λιπόφιλης φύσης του πλαστικού απ' το οποίο αποτελούνται τα κωνικά σωληνάρια κάποια μόρια συμπλόκου ή και του ίδιου του αντιοξειδωτικού ενδέχεται να προσκόλλησαν πάνω στο σκεύος.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συνέχεια παρατίθενται τα συμπεράσματα, που προέκυψαν από τη διεξαγωγή της διπλωματικής εργασίας:

- ❖ Από τη μελέτη του δομικού χαρακτηρισμού:
 - Η β-κυκλοδεξτρίνη βοηθάει εμφανώς στην περαιτέρω διαλυτοποίηση των αμφίφιλων ιχνηθετών 5-DSA και 16-DSA.
 - Το 5-DSA μόνο του δεν διαλύεται στο νερό καθόλου ή ελάχιστα και γι'αυτό δεν ανιχνεύεται σήμα από το EPR,
 - ενώ το 16-DSA διαλύεται και χωρίς τη βοήθεια της κυκλοδεξτρίνης, μόνο που παρουσία της το σήμα είναι ακόμη πιο καθαρό.
 - Επίσης, το 5-DSA δεν έδειξε κάποια διαλυτοποίηση στα διαλύματα μικρότερης συγκέντρωσης β-CD (1mg/mL). Κάτι που επιβεβαιώνει τον βοηθητικό ρόλο της κυκλοδεξτρίνης στη διαλυτοποίηση των αμφίφιλων ιχνηθετών.
 - Τα σύμπλοκα των πυραζολινών 1 και 2 παρουσίασαν διαφορές τόσο μεταξύ τους, όσο και ανάμεσα στις αλληλεπιδράσεις του καθενός με το 5-DSA και με το 16-DSA.
 - Σύμπλοκο 1:
 - είναι πιθανό στο διάλυμα με το 5-DSA να στριμώχνεται το αντιοξειδωτικό μαζί με τον ιχνηθέτη ή και να εκτοπίζεται το αντιοξειδωτικό εντελώς επιτρέποντας στο πιο λιπόφιλο κομμάτι του 5-DSA να εισχωρήσει στην κοιλότητα της β-CD.
 - Αντίθετα, το 16-DSA δε δείχνει να επηρεάζεται από την παρουσία του αντιοξειδωτικού, καθώς δεν παρουσίασε καθόλου μεταβολή στην κινητικότητα του.
 - Σύμπλοκο 2: Το σύμπλοκο αυτό φαίνεται από τις μετρήσεις και των δύο ιχνηθετών ότι μάλλον παραμένει στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης και εμποδίζει στους ιχνηθέτες να εισχωρήσουν σε αυτήν.
- ❖ Από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας:
 - Η θερμοκρασία φάνηκε ότι είναι ένας παράγοντας, που επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των εξεταζόμενων συμπλόκων. Σε μικρότερες θερμοκρασίες προέκυψε καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.
 - Το σύμπλοκο 1 μπόρεσε να αναστείλει την ελεύθερη ρίζα Tempol σε ελαφρώς μεγαλύτερο βαθμό περίπου 1.5% περισσότερο σε σχέση με το σύμπλοκο 2.
 - Η αύξηση της συγκέντρωσης των συμπλόκων δεν έδειξε καμμία σημαντική μεταβολή στην αντιοξειδωτική ικανότητα.
 - Η παρουσία της β-κυκλοδεξτρίνης δείχνει να παρεμποδίζει την αντιοξειδωτική δράση των αντιοξειδωτικών. Αυτό δικαιολογείται από την λιπόφιλη φύση τους, καθώς προτιμούν το λιπόφιλο περιβάλλον της

κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης σε σχέση με το υδατικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται η ελεύθερη ρίζα.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Οι προτάσεις για μελλοντική έρευνα επί του θέματος της διπλωματικής εργασίας συνοψίζονται ως εξής:

- ❖ Δομική μελέτη των συμπλόκων με χρήση EPR σε άλλο μέσο πιο λιπόφιλο από το νερό ή και χρήση παραπάνω διαλυτών.
- ❖ Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας των συμπλόκων στο EPR σε άλλο διαλύτη και με άλλη ελεύθερη ρίζα.
- ❖ Δομική μελέτη υδατικών διαλυμάτων με τα σύμπλοκα με χρήση άλλων μεθόδων, όπως SAXS.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A. Detsi, M. M.-L. (2009). Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorg Med Chem.*, 17(23):8073-85.
- Adrian Matencio, S. N.-O.-C.-N. (2020). Applications of cyclodextrins in food science. A review. *Trends in Food Science & Technology*, 104: 132–143.
- ALBERTO DAÄ VALOS, C. G.-C. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48-54.
- Alberton EH, D. R. (2008). Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. *Chem Biol Interact* , 171:355–362.
- Atmane Madene, M. J. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 1–21.
- B. HALLIWELL, R. A. (1995). The Characterization of Antioxidants. *Fd Chem. Toxic.*, 33, No. 7, pp. 601-617.
- Birari RB, G. S. (2011). Antiobesity and lipid lowering effects of Glycyrrhiza chalcones: experimental and computational studies. *Phytomedicine*, 18:795–801.
- Bruyere C, G. S.-M. (2011). Growth inhibitory activities of oxyprenylated and non-prenylated naturally occurring phenylpropanoids in cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett*, 21:4174–4179.
- Buschmann HJ, S. E. (2002). Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *J Cosmet Sci* 53, 575–92.
- C. Folch-Cano, C. J.-A. (2010). Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with b-cyclodextrins by ORAC assays. *Journal of Photochemistry and Food Research International* 43, 2039–2044.
- C. Jullian, S. M.-T.-A. (2007). Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15 , 3217-3224.
- C., O. H. (1976). Lipid Spin Labels in Biological Membranes. Στο L. J. Berliner, *Spin Labeling: Theory and Applications* (σσ. 454-518). Oregon: Academic Press, Inc.
- Chatzidaki, M. D. (2016). Formulation and characterization of W/O nano-dispersions for bioactive delivery applications. *Örebro University*, 38.
- Cheng M, W. J. (2019). Characterization and application of the microencapsulated carvacrol/sodium alginate films as food packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141:259-267.

- Cheng ZJ, L. C. (2001). Brousochalcone A, a potent antioxidant and effective suppressor of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide activated macrophages. *Biochem Pharmacol*, 61:939–946.
- Chetana B. Patil, S. K. (2009). Chalcone: A Versatile Molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(3), 11-22.
- Cho N, L. K. (2013). Cognitive-enhancing effects of Rhus verniciflua bark extract and its active flavonoids with neuroprotective and anti-inflammatory activities. *Food Chem Toxicol*, 58:355–361.
- Chung CH, C. C. (2013). Butein inhibits angiogenesis of human endothelial progenitor cells via the translation dependent signaling pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:1–10.
- D. Skoutas, D. H. (2001). Virgin olive oil: Free radical production studied with spin-trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Volume 78, Issue 11 p. 1121-1125.
- Daniela Ilieva Batovska, I. T. (2010). Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Curr Clin Pharmacol*, 5(1):1-29.
- Dass CR, J. W.-I. (2000). Cyclodextrins and liposomes as potential drugs for the reversal of atherosclerosis. *J Pharmacy and Pharmacology*, 52:731–61.
- Dejian Huang, B. O. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6, 1841–1856.
- Detsi A, M. M.-L. (2009). Natural and synthetic 20-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorg Med Chem*, 17:8073–8085.
- E Schneiderman, A. M. (2000). Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 745(1):83-102.
- E. ABUIN, E. L. (2002). URIC ACID REACTION WITH DPPH RADICALS. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, 47, 145-149.
- Eastburn SD, T. B. (1994). Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnol Adv*, 12(2):325-39.
- Fernanda Pérez-Cruz, B. A.-V.-S. (2013). Host–guest interaction between new nitrooxoisoporphine and b-cyclodextrins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 102, 226-234.
- Fontenele JB, L. L. (2005). Antiplatelet effect of lonchocarpin and derricin isolated from *Lonchocarpus sericeus*. *Pharm Biol*, 43:726–731.

- Fu Y, H. T. (2004). Licochalcone-A novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Com*, 322:263–270.
- Fukai T, S. K. (2003). Antinephritis and radical scavenging activity of prenylflavonoids. *Fitoterapia*, 74:720–724.
- Furuta T, Y. H. (1993). Effects of water of inclusion complexes of d-limonene and cyclodextrins. *Supramol Chem*, 1:321–5.
- Gerhard Wenz 1, B.-H. H. (2006). Cyclodextrin rotaxanes and polyrotaxanes. *Chem Rev*, 106(3):782-817.
- Guangyong Zhu, Z. X. (2014). Study of production and pyrolysis characteristics of sweet orangeflavor- β -cyclodextrin inclusion complex. *Carbohydrate Polymers* 105, 75–80.
- Gupta D, J. D. (2010). Recent advances in chalcones as antiinfective agents. *Int J Chem Sci*, 8:649–654.
- Gupta, D. (2015). METHODS FOR DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY: A REVIEW. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol. 6(2): 546-566.
- H.A. Archontaki, M. V.-M. (2002). Study on the inclusion complexes of bromazepam with α - and β -hydroxypropylcyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28, 761-769.
- Han AR, K. Y. (2006). Prenylated flavonoids from the heartwood of *Artocarpus communis* with inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production. *J Nat Prod*, 69:719–721.
- Haraguchi H, T. Y. (2004). Monoamine oxidase inhibitors from *Gentiana lutea*. *Phytochemistry*, 65:2255–2260.
- I. Kostopoulou, A. D. (2020). Novel quinolinone–pyrazoline hybrids: synthesis and evaluation of antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Molecular Diversity*, (2):723-740.
- Ioanna Kostopoulou, A. D. (2018). Recent Developments on Tyrosinase Inhibitors based on the Chalcone and Aurone Scaffolds. *Current Enzyme Inhibition*, 14, 3-17.
- Irie T, U. K. (1997). Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. *J Pharm Sci*, 86:147–62.
- Izumi Y, M. A.-T. (2012). Isolation, identification, and biological evaluation of Nrf2-ARE activator from the leaves of green perilla (*Perilla frutescens* var *crispa* f *viridis*). *Free Rad*, 53:669–679.
- J J Torres-Labandeira 1, P. D. (1991). Oversaturated solutions of drug in hydroxypropylcyclodextrins: parenteral preparation of pancratistatin. *J Pharm Sci*, 80(4):384-6.

- Jandial DD, B. C. (2014). Molecular targeted approaches to cancer therapy and prevention using chalcones. *Curr Cancer Drug Targets*, 14:181–200.
- Jean Marc Di Meglio, M. D. (1985). Determination of the rigidity constant of the amphiphilic film in "birefringent microemulsions"; the role of the cosurfactant. *J. Phys. Chem.*, 89, 5, 871–874.
- Jen-Hao Cheng, C.-F. H.-C.-P.-J.-N. (2008). Synthesis and cytotoxic, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities of 2',5'-dialkoxylchalcones as cancer chemopreventive agents. *Bioorg Med Chem*, 16:7270-6.
- Jia XiaoYun, Z. S. (2018). Effect of incorporation of spearmint extract microencapsulated with β -cyclodextrin on properties of polypropylene packaging films and emulsion sausage shelf life. *Shipin Kexue / Food Science*, Vol.39 No.11 pp.241-246.
- Jung JI, C. E. (2006a). Isoliquiritigenin (ISL) inhibits ErbB3 signaling in prostate cancer cells. *BioFactors*, 28:159–168.
- Jung JI, L. S. (2006b). Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem*, 17:689–696.
- K Iwashita, M. K. (2000). Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64(9):1813-20.
- Kang DG, L. A. (2004). Butein ameliorates renal concentrating ability in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Biol Pharm Bull*, 27:366–370.
- Kim SS, L. J. (2012). Licochalcone E activates Nrf2/antioxidant response element signaling pathway in both neuronal and microglial cells: therapeutic relevance to neurodegenerative disease. *J Nutr Biochem*, 10:1314–1323.
- Kumar R, D. J. (2001). Biotransformation of cholesterol using *Lactobacillus bulgaricus* in glucose controlled bioreactor. *Bioresour Technol*, 28:209–11.
- Kuo Y, S. Y. (2010). Flavokawain B, a novel chalcone from *Alpinia pricei* Hayata with potent apoptotic activity: involvement of ROS and GADD153 upstream of mitochondria-dependent apoptosis in HCT116 cells. *Free Rad Biol Med*, 49:214–226.
- L Zhai, J. B. (1995). The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(12):2742–2748.
- Laura Buendía Moreno, M. J. (2020). Active cardboard box with a coating including essential oils entrapped within cyclodextrins and/or halloysite nanotubes. A case study for fresh tomato storage. *Food Control*, 107, 106763.
- Li D, W. Z. (2009). Isoliquiritigenin induces monocytic differentiation of HL-60 cells. *Free Rad Biol Med*, 46:731–736.
- Li JT, Z. X. (2007). An improved synthesis of 1, 3, 5-triaryl-2-pyrazolines in acetic acid aqueous solution under ultrasound irradiation. *B J Org Chem.*, 3:1860-5397.

- Liu, Y., Han, B.-H., & Zhang, H.-Y. (2004). Spectroscopic Studies on Molecular Recognition of Modified Cyclodextrins. *Current Organic Chemistry, Volume 8, Number 1*, 35-46(12).
- Loftsson T, Ó. B. (1993). Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics. *J Pharm Sci*, 1:95–101.
- Loftsson T., S. O. (1992). Interaction between preservatives and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Drug Devel Ind Pharm*, 18(13):1477–84.
- Logendra S, R. D. (2006). Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracunculus*. *Phytochemistry*, 67:1539–1546.
- Lu X, C. Y. (2002). Chiral separation of amino acids derivatized with fluoresceine-5-isothiocyanate by capillary electrophoresis and laser induced fluorescence detection using mixed selectors of beta-cyclodextrin and sodium taurocholate. *J Chromatogr A*, 955:133–40.
- Luyengi L, L. I. (1994). Rotenoids and chalcones from *Mundulea sericea* that inhibit phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity. *Phytochemistry*, 36:1523–1526.
- M Chen 1, S. B. (1993). Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(12):2550-6.
- M L Go, X. W. (2005). Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr Med Chem*, 12(4):481-99.
- M. Chatzidaki, I. K. (2020). β -Cyclodextrin as carrier of novel antioxidants: A structural and efficacy study. *Colloids and Surfaces A*, 603 125262.
- Mabuchi N, N. M. (2001). Controlled release powdered flavour preparations and confectioneries containing preparations. *Japanese Patent JP 128*, 638.
- Madhavi DL, D. S. (1995). *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives*. New York : CRC Press.
- Mamata Singh, R. S. (December 2002). Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, Volume 20 Issues 5–6 Pages 341-359.
- Man Xu, P. W. (2019). Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development. *Bioorganic Chemistry*, Volume 91, 103133.
- Marina Roussaki, B. H. (2013). Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone-chalcone series. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (13)01121-9.
- Matsuda H, A. H. (1999). Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 36:81–99.

- Md. Azizur Rahman, A. A. (2010). Pyrazoline Derivatives: A Worthy Insight into the Recent Advances and. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2(3): 165-175.
- Middleton E Jr, K. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52:673–751.
- Minerva Lezcano, W. A.-S.-N. (2002). Complexation of Several Benzimidazole-Type Fungicides with α - and β -Cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1, 108–112.
- Miranda CL, S. J. (1999). Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human. *Food Chem Toxicol*, 37:271–285.
- Miranda CL, S. J. (2000a). Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenyated chalcones and flavanones in vitro. *J Agric Food Chem*, 48:3876–3884.
- Mojzis J, V. L. (2008). Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol Res*, 57:259–265.
- Mura, P. (2014). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 101 Pages 238-250.
- Nerya O, M. R. (2004). Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*, 65:1389–1395.
- Ogawa H, O. M. (2005). Hypotensive and lipid regulatory actions of 4-hydroxyderricin a chalcone from *Angelica keiskei* in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32:19–23.
- Ogawa H, O. Y. (n.d.). Beneficial effect of xanthoangelol, a chalcone compound from *Angelica keiskei*, on lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34:238–243.
- Pacher P, B. J. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.*, 87: 315-424.
- Pitha J, H. T. (1992). Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl organe. *Int J Pharm*, 80:243–51.
- Qian Wang, Z.-H. D.-K.-T. (2004). Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops *Humulus lupulus*. *Antiviral Res*, 64(3):189-94.
- R.L. Carrier, L. M. (2007). The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release* 123, 78–99.
- Rahman, M. (2011). Chalcone: A Valuable Insight into the Recent Advances and Potential Pharmacological Activities. *Chemical Science*, 29, 1-16.

- Roshan R Kulkarni, S. G. (2014). Antifungal dimeric chalcone derivative kamalachalcone E from *Mallotus philippinensis*. *Nat Prod Res*, 28(4):245-50.
- S B Christensen, C. M. (1994). An antileishmanial chalcone from Chinese licorice roots. *Planta Med*, 60(2):121-3.
- S. Brochsztain, M. R. (1997). Inclusion complexes of naphthalimide derivatives with cyclodextrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry* 107 , 195–200.
- Sahar Amiri, S. A. (2017). *CYCLODEXTRINS: Properties and Industrial Applications*. John Wiley & Sons.
- Sergey V. Kurkov, T. L. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 453 (1), 167-80.
- Silvia Vertuani, A. A. (2004). The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10, 1677-1694.
- Silvia Vertuani, A. A. (2008). The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10, 1677-1694.
- Simona Rossi, M. B. (2007). Self-Assembly of β -Cyclodextrin in Water. 2. Electron Spin Resonance. *Langmuir*, 23, 10959-10967.
- Sonja Frölich, C. S.-S. (2005). In vitro antiplasmodial activity of prenylated chalcone derivatives of hops (*Humulus lupulus*) and their interaction with haemin. *J Antimicrob Chemother*, 55(6):883-7.
- Spyridon Avramiotis, V. P. (2007). Lecithin Organogels Used as Bioactive Compounds Carriers. A Microdomain Properties Investigation. *Langmuir*, 23, 8, 4438–4447.
- Stella VJ, R. R. (1997). Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res* , 14:556–5567.
- Stella VJ, R. R. (1997). Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res* , 14:556–5567.
- Szejtli, J. (1994). Medicinal applications of cyclodextrins. *Medicinal Research Reviews* 14, 353-386.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *ChemInform* 29, 1743–1754.
- Szejtli, J. (1989). Downstream processing using cyclodextrins. *TIBTRCH*, 7:171–4.
- Szliszka E, C. Z. (2010). Chalcones enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Mol Sci*, 11:1–13.

- T Irie, K. U. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci* 86, 147-162.
- T Loftsson, F. K. (2006). Influence of aqueous diffusion layer on passive drug diffusion from aqueous cyclodextrin solutions through biological membranes. *Pharmazie*, 61(2):83-9 .
- Takahashi T, T. N. (2004). Isoliquiritigenin a flavonoid from licorice reduces prostaglandin E2 and nitric oxide causes apoptosis and suppresses aberrant crypt foci development. *Cancer Sci* , 95:448–453.
- Terekhova, I. (2011). Comparative thermodynamic study on complex formation of native and hydroxypropylated cyclodextrins with benzoic acid. *Thermochimica Acta* 526, 118-121.
- Thorsteinn Loftsson, D. D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 329, 1–11.
- Totterman AM, S. N. (1997). Intestinal Safety of Water-soluble β -Cyclodextrins in Paediatric Oral Solutions of Spironolactone: Effects on Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49:43–8.
- V J Ram, A. S. (2000). Oxygenated chalcones and bischalcones as potential antimalarial agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 2;10(19):2159-61.
- Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 39, 1033–1046.
- Yamamoto T, Y. M. (2004). Anti-allergic activity of naringenin chalcone from a tomato skin extract. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68:1706–1711.
- Yamazaki S, M. T. (2002). Isoliquiritigenin suppresses pulmonary metastasis of mouse renal cell carcinoma. *Cancer Lett*, 183:23–30.
- Zhang EH, W. R. (2013a). An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. . *Evid Based Complement Alternat Med* , ID 815621.
- Zhang X, Y. E. (2010). Isoliquiritigenin a natural anti-oxidant selectively inhibits the proliferation of prostate cancer cells. *Clin Exper Pharmacol Physiol*, 37:841–847.
- Zhao F, W. Y. (2005). Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from Hops (*Humulus lupulus*). *J Nat Prod*, 68:43–49.
- Zsuzsanna Rozmer, P. P. (2016). Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochem Rev*, 15: 87–120.
- A. Rajendra Kumar, K. A. (2013). The cyclodextrins: A review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH AND BIOSCIENCE*, Vol. 2.

ΓΕΩΡΓΙΟΥ, Μ. Ε. (1994). ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΑ
(ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ, ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ) ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ.
ΑΘΗΝΑ: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών
Επιστημών. Τμήμα Χημείας.

Z., N. (2007). A review of anti-infective and antiinflammatory chalcones. *Eur J Med Chem*,
42:125–137.