



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εγκλωβισμός αιθερίων ελαίων σε βιοδιασπώμενους φορείς για την
ανάπτυξη εντομοαπωθητικών προϊόντων

ΣΚΡΙΚΑ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Δρ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ,
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Μ.Π.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2022

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. Δρ. Αναστασίας Δέτση.

Δεδομένης της πολύπλευρης βοήθειας που απαιτήθηκε για την επιτυχημένη ολοκλήρωση της εν λόγω εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην διαδικασία αυτή.

Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Δρ. Αναστασία Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτοντας μου αυτό το αντικείμενο έρευνας, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγησή της καθ' όλη την διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας. Η προθυμία και οι συμβουλές της κατείχαν καθοριστικό ρόλο για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας επιτυχώς.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Σταματίνα Βουγιούκα και την Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Μαγδαληνή Κροκίδα για την συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και για τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην Ελένη Καβέτσου, Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., για την εξαιρετική συνεργασία και υποστήριξη. Το γνωστικό υπόβαθρο και η εργαστηριακή της εμπειρία αποτέλεσαν εξαιρετική βοήθεια στην κατανόηση του συγκεκριμένου θέματος καθώς και στην διεκπεραίωσή του. Ακόμη, δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στον χρόνο που αφιέρωσε καθοδηγώντας με και στην αισιοδοξία που μου μετέφερε σε κάθε δυσκολία.

Επίσης, ευχαριστώ τους συνεργάτες από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την προσφορά των αιθερίων ελαίων και για την αξιολόγηση της εντομοκτόνου δράσης των νέων νανο/μικρο-συστημάτων.

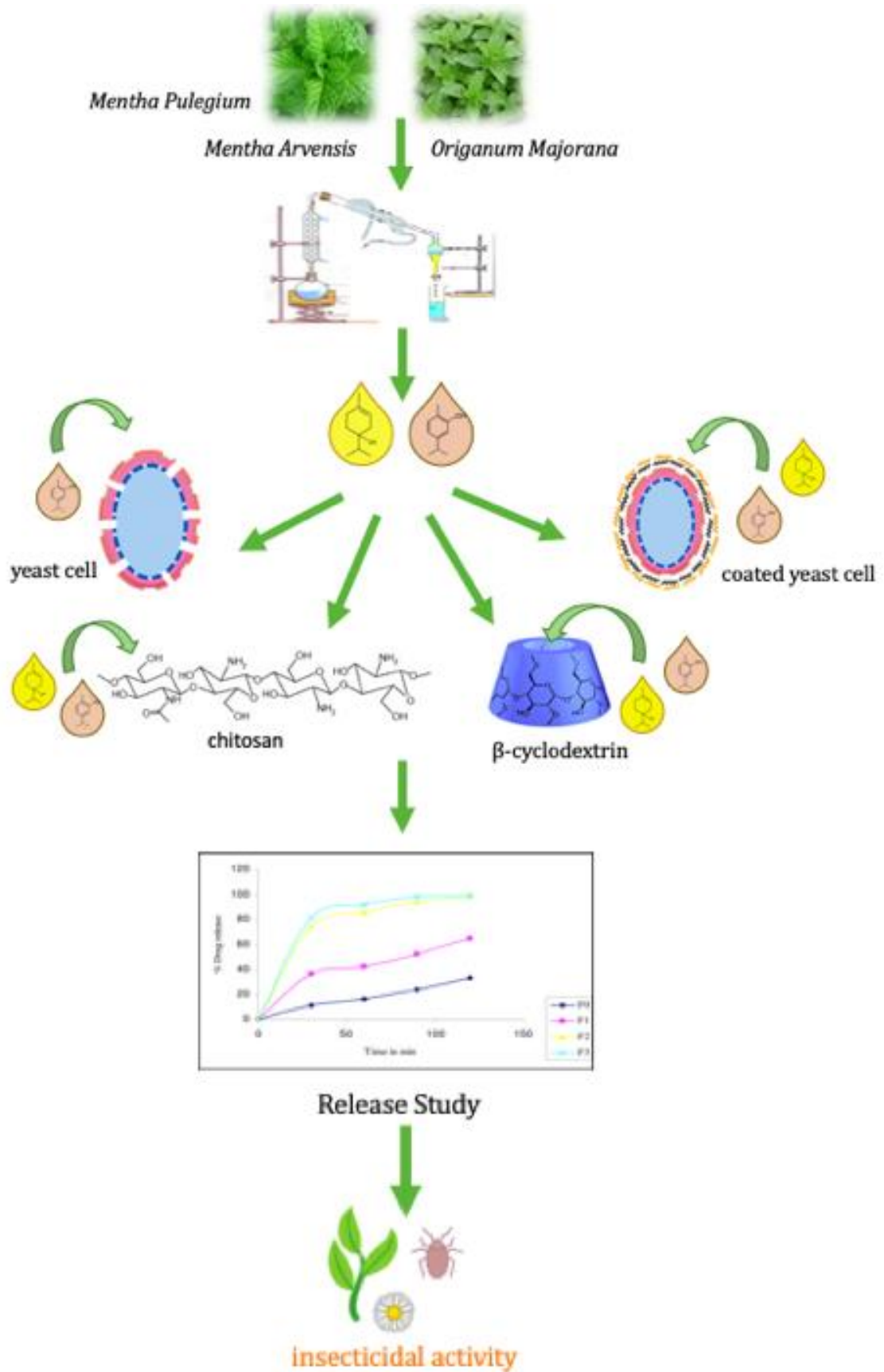
Ευχαριστώ, το Εργαστήριο των Πολυμερών για την λήψη των φασμάτων υπέρυθρης φασματοσκοπίας FT-IR.

Επιπροσθέτως, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., για την αρμονική συνεργασία, την προθυμία και το ευχάριστο κλίμα.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την ατέρμονη υποστήριξη και ενθάρρυνσή τους. Μάλιστα, ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω και στο φιλικό μου περιβάλλον για την κατανόησή του, την δύναμη που μου έδινε απλόχερα σε όλα τα φοιτητικά μου χρόνια και τις απίστευτες στιγμές που μου χάρισε.

Κατερίνα Σκρίκα,
Ιούνιος 2022

ΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ



Εικόνα 1: Γραφική Περίληψη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αιθέρια έλαια είναι πολυσυστατικά μείγματα πτητικών ενώσεων που αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και είναι γνωστά από την αρχαιότητα για την βιολογική τους δράση. Το άρωμα και η χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φυτού από το οποίο απομονώνονται, την γεωκλιματική τοποθεσία και τις συνθήκες ανάπτυξης, την εποχή συγκομιδής και την μέθοδο εκχύλισης αυτών. Στα φυτά, συναντώνται σε ειδικές εκκριτικές δομές ενώ οι συνηθέστερες μέθοδοι παραλαβής τους είναι η υδροαπόσταξη ή η απόσταξη με ατμό. Ακόμη, δεδομένης της περιεκτικότητάς τους κυρίως σε τερπένια, τερπενοειδή και φαινυλοπροπανοειδή διακρίνονται για τις βιολογικές τους δράσεις, όπως η αντιοξειδωτική, η κυτταροτοξική, η αντιφλεγμονώδης, η αντικαρκινική, η αλληλοπαθητική καθώς και η εντομοκτόνος δράση.

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες ενζυματικά επεξεργασμένου αμύλου και αποτελούνται από έξι, εφτά ή οχτώ μονάδες γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους μέσω α -1,4 γλυκοσιδικών δεσμών. Είναι μη τοξικές, με βιοδιασπώμενο χαρακτήρα, αναγνωρισμένες ως GRAS («γενικά αναγνωρίζονται ως ασφαλείς»), με εσωτερική λιπόφιλη κοιλότητα και εξωτερική υδρόφιλη επιφάνεια, διαμόρφωση που τους επιτρέπει να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με μη υδατοδιαλυτά μόρια.

Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας μονοκύτταρος μύκητας που είναι ευρέως γνωστός, κυρίως λόγω της οικονομικής του σημασίας σε τομείς όπως η ζυθοποιία και η αρτοποιία. Τα μηχανικά και δομικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού τοιχώματος και της εσωτερικής κυτταρικής μεμβράνης του ζυμομύκητα τον καθιστούν ιδανικό για τον εγκλεισμό λιπόφιλων μορίων.

Η χιτοζάνη είναι το δεύτερο πιο πολυάριθμο βιοπολυμερές και είναι ένας γραμμικός πολυκατιονικός, βιοαποικοδομήσιμος, μη τοξικός και βιοσυμβατός πολυσακχαρίτης που απομονώνεται μέσω της N-απακετυλίωσης της χιτίνης. Στην τεχνολογία εγκλεισμού, η χιτοζάνη χρησιμοποιείται ως πολυμερές είτε για τον εγκλεισμό δραστικών συστατικών είτε για την επικάλυψη επιφανειών άλλων σωματιδίων.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν οι διεργασίες εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων *Origanum Majorana* (αιθέρια έλαια OM2 και OM3, τα οποία συλλέχθηκαν από την ίδια περιοχή σε διαφορετικές χρονικές περιόδους), *Mentha Arvensis* και *Mentha Pulegium* στους βιοδιασπώμενους φορείς β -κυκλοδεξτρίνη, πλασμολυμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, χιτοζάνη καθώς και σε επικαλυμμένα με χιτοζάνη κύτταρα ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Σκοπός των διεργασιών εγκλεισμού ήταν η προστασία των πτητικών αιθερίων ελαίων από υψηλές θερμοκρασίες και οξειδωτικούς παράγοντες, όπως το φως και η υγρασία, για την πιθανή ενίσχυση της εντομοαπωθητικής δράσης των αιθερίων ελαίων προκειμένου να διατηρηθεί ή να ενισχυθεί η βιοδραστικότητά τους. Τελικός στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη της εντομοκτόνου δράσης των νανο/μικρο-συστημάτων εγκλεισμού, έναντι του

Tetranychus urticae, με σκοπό την μελλοντική αξιοποίησή τους ως καινοτόμα και φιλικότερα προς το περιβάλλον εντομοκτόνα.

Η ανάλυση της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματομέτρο μάζας (GC-MS). Για τα αιθέρια έλαια *Origanum Majorana*, που εξετάστηκαν, κύρια συστατικά προέκυψαν το α-τερπινένιο, το γ-τερπινένιο, η τερπινεν-4-όλη και η α-τερπινεόλη σε διαφορετικά ποσοστά. Το *Mentha Arvensis* βρέθηκε να έχει ως κύριο συστατικό την μενθόλη ενώ το *Mentha Pulegium* την πουλεγόνη και την πιπεριτενόνη.

Για τον επιτυχή εγκλεισμό στα κύτταρα ζυμομύκητα, προηγήθηκε πλασμólυση των κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* με διάλυμα NaCl 10% προς απομάκρυνση του περιεχόμενου νερού και των υδατοδιαλυτών σε αυτό μορίων. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός των αιθερίων ελαίων *Origanum Majorana*, *Mentha Arvensis* και *Mentha Pulegium* στα πλασμολυμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* καθώς και στην β-κυκλοδεξτρίνη με την μέθοδο της συγκαταβύθισης. Τα συστήματα εγκλεισμού με φορέα τα κύτταρα ζυμομύκητα επικαλύφθηκαν με χιτοζάνη, στην περίπτωση των αιθερίων ελαίων *Origanum Majorana* και *Mentha Arvensis*, ενώ για το αιθέριο έλαιο *Mentha Arvensis* πραγματοποιήθηκε, επιπλέον, και ο εγκλεισμός σε χιτοζάνη με την μέθοδο της ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης.

Ο υπολογισμός των αποδόσεων εγκλεισμού για τα παραπάνω συστήματα έγινε μέσω αέριου χρωματογράφου μάζας συζευγμένου με φασματομέτρο μάζας (GC-MS). Εν συνεχεία, τα συστήματα εγκλεισμού χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος και το ζ δυναμικό μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός και δομικά μέσω φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR). Από τις παραπάνω μεθόδους χαρακτηρισμού των συστημάτων εγκλεισμού επιβεβαιώθηκε ο επιτυχής εγκλεισμός των αιθερίων ελαίων στους φορείς εγκλεισμού και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Τα διάφορα συστήματα εγκλεισμού εξετάστηκαν ως προς το προφίλ αποδέσμευσης των συστατικών των αιθερίων ελαίων από τον εκάστοτε φορέα εγκλεισμού.

Από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης που ακολούθησε για τα αιθέρια έλαια *Origanum Majorana* (OM3) και *Mentha Arvensis* με φορέα την β-κυκλοδεξτρίνη διαπιστώθηκε ότι το κινητικό μοντέλο που περιγράφει καλύτερα την απελευθέρωση είναι το μοντέλο Higuchi ενώ ο εκθέτης n της εξίσωσης Krosmeier-Perppas υπέδειξε ως μηχανισμό απελευθέρωσης την διάβρωση του φορέα και την διάχυση. Ανάλογα αποτελέσματα για το κινητικό μοντέλο και τον μηχανισμό απελευθέρωσης διαπιστώθηκαν στη περίπτωση της απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου *Mentha Arvensis* από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης.

Ακόμη, από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης των αιθερίων ελαίων *Origanum Majorana* (OM3) και *Mentha Arvensis* από τα συστήματα εγκλεισμού με φορέα τα κύτταρα ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* βρέθηκε ότι το κινητικό μοντέλο που περιγράφει καλύτερα την απελευθέρωση είναι το μοντέλο Higuchi ενώ ο μηχανισμός απελευθέρωσης είναι η διάχυση κατά Fick.

Η μελέτη της απελευθέρωσης των αιθερίων ελαίων *Origanum Majorana* (OM3) και *Mentha Arvensis* από τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη κύτταρα ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* υπέδειξε την επιβράδυνση της απελευθέρωσης των αιθερίων ελαίων.

Τέλος, από την μελέτη βιοδραστικότητας έναντι νυμφών του *Tetranychus urticae* πάνω σε φύλλα φασολιού διαπιστώθηκε η αύξηση της θνησιμότητας αυτών κατά 16% όταν το έλαιο *Origanum Majorana* (OM2) χρησιμοποιείται εγκλεισμένο σε κύτταρα ζυμομύκητα σε σχέση με την απευθείας χρήση του. Αντίστοιχα, βρέθηκε ότι ο ψεκασμός των νυμφών με το αιθέριο έλαιο *Mentha Pulegium* (MP) εγκλεισμένο σε β-CD διπλασιάζει το ποσοστό θνησιμότητας σε σχέση με τον ψεκασμό του καθαρού αιθερίου ελαίου.

Επιστημονική ενότητα: Οργανική Χημεία, Νανοτεχνολογία

Λέξεις κλειδιά: αιθέρια έλαια, βιοδραστικότητα, β-κυκλοδεξτρίνη, *Saccharomyces cerevisiae*, χιτοζάνη, εγκλεισμός, μελέτη απελευθέρωσης

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

Δ. ΠΕΡΔΙΚΗΣ, Σ. ΔΕΡΒΙΣΟΓΛΟΥ, Χ. ΤΡΑΚΑ, Α. ΡΟΥΣΣΟΣ, Χ. ΜΙΣΑΗΛΙΔΟΥ, Π. ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ, Μ. ΠΟΛΥΣΙΟΥ, Δ. ΔΑΦΕΡΕΡΑ, Χ. ΚΑΝΑΚΗΣ, Π.-Κ. ΡΕΒΕΛΟΥ, Ε. ΚΑΚΟΥΡΗ, Ε. ΚΑΠΑΡΑΚΟΥ, Α. ΔΕΤΣΗ, Ε. ΚΑΒΕΤΣΟΥ, Ι. ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ, Ι. ΠΙΤΤΕΡΟΥ, Α. ΚΑΛΟΣΠΥΡΟΣ, **Κ. ΣΚΡΙΚΑ**, Α. ΚΑΛΑΜΑΡΑΚΗ, Μ. ΠΑΪΣΙΟΥ, Ν. ΜΑΛΤΑΜΠΕΣ, Μελέτη της αποτελεσματικότητας αιθερίων ελαίων ματζουράνας (*Origanum majorana*) και φλισκουνιού (*Mentha pulegium*) επί του ακάρεως *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) μέσω του εγκλεισμού τους σε βιοδιασπώμενους και βιοσυμβατούς φορείς, 19^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, 23-27 Μαΐου **2022**, Αγρίνιο, Ελλάδα.

Abstract

Essential oils (EOs) are complex mixtures of volatile compounds that are secondary metabolites of plants and have been known for their biological activity. The aroma and chemical composition of essential oils vary depending on the species of plant from which they are isolated, the geoclimatic location and growing conditions, the harvest season and the method of extraction. In plants, they are found in special secretory structures. The most common methods to obtain essential oils from plant material are water distillation or steam distillation. Also, given that they consist mainly of terpenes, terpenoids and phenylpropanoids, essential oils possess a wide variety of biological actions, such as antioxidant, cytotoxic, anti-inflammatory, anti-cancer, allelopathic and insecticidal activity.

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides of enzymatically treated starch and consist of six, seven or eight glucose units linked by α -1.4 glycosidic bonds. They are non-toxic, biodegradable, known as GRAS ("generally recognized as safe"), having an internal lipophilic cavity and an external hydrophilic surface. This configuration allows them to form inclusion complexes with water-insoluble molecules.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a single-celled fungus that is well known, mainly due to its economic importance in sectors such as brewing and baking. The mechanical and structural characteristics of the cell wall and the inner cell membrane of the yeast, make it ideal for the encapsulation of lipophilic molecules.

Chitosan is the second most abundant biopolymer and is a linear polycationic, biodegradable, non-toxic and biocompatible polysaccharide synthesized via the N-deacetylation of chitin. In the encapsulation technology, chitosan is used as a polymer either to encapsulate active ingredients or to coat the surfaces of other particles.

In the present thesis, the encapsulation processes of the essential oils *Origanum Majorana* (OM2 and OM3 essential oils, collected from the same area in different time periods), *Mentha Arvensis* and *Mentha Pulegium* in the biodegradable carriers β -cyclodextrin, plasmolyzed cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and chitosan were studied. The purpose of the encapsulation process was to protect volatile essential oils from high temperatures and oxidizing factors, such as light and moisture, to potentially enhance the insect repellent activity of essential oils in order to maintain or enhance their bioactivity. The final goal of the current work was to study the insecticidal activity of nano/micro-inclusion systems against *Tetranychus urticae*, with the aim of their future use as innovative and more environmentally friendly insecticides.

The analysis of the chemical composition of the essential oils was performed by a Gas Chromatograph coupled to a Mass Spectrometer (GC-MS). For the *Origanum Majorana* essential oils tested, the main constituents were α -terpinene, γ -terpinene, terpinen-4-ol and α -terpineol in different percentages. *Mentha Arvensis* was found to have menthol as its main ingredient while *Mentha Pulegium* found to have pulegon and piperitenone.

For the successful encapsulation of EOs in yeast cells, plasmolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells was performed with 10% NaCl solution in order to remove water and water-soluble molecules. Subsequently, the essential oils of *Origanum Majorana*, *Mentha Arvensis* and *Mentha Pulegium* were encapsulated in the plasmolyzed cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as well as in β -cyclodextrin by the co-precipitation method. The yeast cells loaded with EOs were coated with chitosan, in the case of *Origanum Majorana* and *Mentha Arvensis* essential oils, while for the *Mentha Arvensis* essential oil, the encapsulation in chitosan by the ionotropic gelation method was also performed.

The determination of the inclusion efficiencies for the above inclusion systems was performed by means of Gas Chromatograph coupled to Mass Spectrometer (GC-MS). The encapsulation systems were then characterized for their size and z potential via Dynamic Light Scattering and structurally by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The above methods of characterizing the nano and micro-systems confirmed the successful encapsulation of the essential oils in the various carriers and the interactions between them. The various systems were examined for the release profile of the essential oil components.

The kinetic modeling of the release for the essential oils *Origanum Majorana* (OM3) and *Mentha Arvensis* encapsulated in β -cyclodextrin showed that the kinetic model best describing the release was the Higuchi model while the exponent n of the Krosmeier-Peppas equation suggested carrier's corrosion and diffusion as release mechanism. Similar results for the kinetic model and the release mechanism were observed in the case of the release of *Mentha Arvensis* essential oil from chitosan nanoparticles.

Furthermore, from the kinetic modeling of the release of *Origanum Majorana* (OM3) and *Mentha Arvensis* essential oils from the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell carrier, it was found that the kinetic model that best describes the release is the Higuchi model while the release mechanism is Fickian diffusion.

The study of the release of *Origanum Majorana* (OM3) and *Mentha Arvensis* essential oils from the chitosan-coated yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* showed a deceleration in the release of essential oils.

Finally, from the bioactivity study against *Tetranychus urticae* nymphs on bean leaves found a 16% increase in mortality when *Origanum Majorana* (OM2) essential oil is used encapsulated in yeast cells relative to its direct use. In addition, it was found that the spraying of the nymphs with the essential oil *Mentha Pulegium* (MP) encapsulated in β -CD doubles the mortality rate compared to the spraying of the pure essential oil.

Scientific area: Organic Chemistry, Nanotechnology

Keywords: essential oils, bioactivity, β -cyclodextrin, *Saccharomyces cerevisiae*, chitosan, inclusion, release study

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	6
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1.1 Αιθέρια έλαια.....	10
1.1.1 Εισαγωγικά στοιχεία	10
1.1.2 Χημική σύσταση.....	12
1.1.2.1 Τερπένια και τερπενοειδή	13
1.1.2.2 Ενώσεις ευθείας αλιδίδας	18
1.1.2.3 Φαινυλοπροπένια.....	18
1.1.2.4 Διάφορη ομάδα, ενώσεις θείου και αζώτου	18
1.1.3 Βιοδραστικότητα αιθερίων ελαίων.....	19
1.1.3.1 Αντιοξειδωτική δραστηριότητα	19
1.1.3.2 Κυτταροτοξικότητα	20
1.1.3.2.1 Αντιβακτηριδιακή δράση	21
1.1.3.2.2 Αντιμυκητιακή δράση	22
1.1.3.2.3 Αντική δράση	23
1.1.3.3 Αντιφλεγμονώδης δράση	23
1.1.3.4 Χημειοπροστατευτική δραστηριότητα καρκίνου	24
1.1.3.5 Αλληλοπαθητική δραστηριότητα.....	25
1.1.3.6 Απωθητική και εντομοκτόνος δράση	26
1.1.4 Μέθοδοι εκχύλισης αιθερίων ελαίων	27
1.1.4.1 Συμβατικές και κλασικές μέθοδοι εκχύλισης.....	27
1.1.4.1.1 Υδροαπόσταξη.....	28
1.1.4.1.2 Εκχύλιση με ατμό	28
1.1.4.1.3 Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη.....	30
1.1.4.1.4 Ψυχρή έκθλιψη.....	30
1.1.4.2 Καινοτόμες τεχνικές εκχύλισης	30
1.1.4.2.1 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό	30
1.1.4.2.2 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό υποβοηθούμενη από ψυχρή πίεση	31
1.1.4.2.3 Υποκρίσιμα υγρά εκχύλισης	31
1.1.4.2.4 Υποβοηθούμενη εκχύλιση αιθερίου ελαίου με υπερήχους.....	31
1.1.4.2.5 Υποβοηθούμενη εκχύλιση αιθερίου ελαίου με μικροκύματα	32
1.1.4.2.6 Στιγμαία ελεγχόμενη πτώση πίεσης.....	35
1.2 Εγκλεισμός	35
1.2.1 Εισαγωγικά στοιχεία.....	35
1.2.2 Φορείς εγκλεισμού	38
1.2.2.1 Κυκλοδεξτρίνη	38
1.2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
1.2.2.2.1 Γενικά στοιχεία.....	40
1.2.2.2.2 Ικανότητα εγκλεισμού δραστικών ουσιών.....	42
1.2.2.3 Χιτοζάνη.....	43
1.2.3 Μελέτη και εφαρμογή των αιθερίων ελαίων ως παρασιτοκτόνα και εντομοκτόνα	45
1.2.4 Μελέτη απελευθέρωσης	50
1.2.4.1 Προφίλ απελευθέρωσης δραστικής ουσίας	50
1.2.4.2 Φαινόμενο απότομης απελευθέρωσης.....	51
1.2.4.3 Μαθηματική Μοντελοποίηση.....	52
1.2.4.3.1 Κινητική απελευθέρωσης μηδενικής τάξης	52
1.2.4.3.2 Κινητική απελευθέρωσης πρώτης τάξης	53
1.2.4.3.3 Μοντέλο Higuchi	53
1.2.4.3.4 Νόμος κυβικής ρίζας Hixon-Crowell.....	54

1.2.4.3.5 Μοντέλο Korsmeyer-Peppas	55
1.2.4.3.6 Μοντέλο Weibull	56
1.3 Σκοπός εργασίας	56
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	58
2.1 Υλικά	58
2.2 Μέθοδοι.....	58
2.2.1 Εγκλεισμός αιθερίου ελαίου σε β-κυκλοδεξτρίνη	58
2.2.2 Εγκλεισμός αιθερίου ελαίου σε κύτταρα ζυμομύκητα.....	59
2.2.2.1 Πλασμόλυση κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
2.2.2.2 Εγκλεισμός αιθέριου ελαίου σε κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
2.2.3 Εγκλεισμός αιθερίου ελαίου σε χιτοζάνη	61
2.2.4 Επικάλυψη εγκλεισμένων με αιθέριο έλαιο κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i> με χιτοζάνη.....	62
2.3 Ανάλυση χημικής σύστασης αιθερίων ελαίων.....	63
2.4 Απόδοση εγκλεισμού.....	64
2.5 Χαρακτηρισμός παραγόμενων νανο- και μικρο- συστημάτων	65
2.5.1 Μέγεθος σωματιδίων και ζ-δυναμικό	65
2.5.2 Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).....	65
2.5.3 Απελευθέρωση αιθερίου ελαίου από τα συστήματα εγκλεισμού.....	66
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
3.1 Ανάλυση χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων GC-MS.....	67
3.2 Αποδόσεις των διεργασιών εγκλεισμού	71
3.2.1 Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού	71
3.2.2 Απόδοση εγκλεισμού	73
3.3 Μέγεθος και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού.....	77
3.4 Ανάλυση φασματοσκοπίας FTIR.....	82
3.5 Μελέτη απελευθέρωσης <i>in vitro</i>	93
3.6 Μελέτη βιοδραστικότητας.....	100
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	101
5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	104
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	105
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	111
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	115
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	117
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	119

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Αιθέρια έλαια

1.1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Από την αρχαιότητα, τα αιθέρια έλαια (Essential Oils, EOs) αναγνωρίζονται για τη φαρμακευτική τους αξία και είναι πολύ ενδιαφέροντα και ισχυρά φυσικά φυτικά προϊόντα. Συνεχίζουν να έχουν ύψιστη σημασία μέχρι και σήμερα.

Τα αιθέρια έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί ως αρώματα, γεύσεις για τρόφιμα και ποτά ή για να θεραπεύσουν τόσο το σώμα όσο και το μυαλό για χιλιάδες χρόνια. Καταγραφή ευρημάτων στη Μεσοποταμία, την Κίνα, την Ινδία, την Περσία και την αρχαία Αίγυπτο δείχνουν τις χρήσεις τους για πολλές θεραπείες σε διάφορες μορφές. Έλληνες και Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν την απόσταξη και έτσι έδιναν στα αρωματικά φυτά μια επιπλέον αξία.

Τα αιθέρια έλαια (ονομάζονται επίσης πτητικά έλαια, επειδή εξατμίζονται όταν εκτίθενται στη θερμότητα σε αντίθεση με τα σταθερά έλαια) είναι οσμές και πτητικές ενώσεις που βρίσκονται μόνο στο 10% του φυτικού βασιλείου και αποθηκεύονται σε φυτά σε ειδικές εύθραυστες εκκριτικές δομές, όπως π.χ. αδένες, εκκριτικές τρίχες, εκκριτικούς πόρους, εκκριτικές κοιλότητες ή αγωγούς ρητίνης. Η συνολική περιεκτικότητα των φυτών σε αιθέρια έλαια είναι γενικά πολύ χαμηλή και σπάνια ξεπερνά το 1%, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις, για παράδειγμα στο γαρύφαλλο (*Syzygium aromaticum*) και στο μοσχοκάρυδο (*Myristica fragrans*), φτάνει περισσότερο από 10%. Τα αιθέρια έλαια είναι υδρόφοβα, είναι διαλυτά σε αλκοόλη, μη πολικούς ή ασθενώς πολικούς διαλύτες, κεριά και έλαια, αλλά ελάχιστα διαλυτά στο νερό. Τα περισσότερα είναι άχρωμα ή υποκίτρινα, με εξαίρεση το μπλε αιθέριο έλαιο χαμομηλιού (*Matricaria chamomilla*) και τα περισσότερα είναι υγρά και χαμηλότερης πυκνότητας από το νερό (εξαιρούνται τα αιθέρια έλαια *Sassafras*, βετιβέρ, κανέλα και γαρύφαλλο).^[1]

Δεν συμμορφώνονται όλα τα εκχυλίσματα αιθέριων ελαίων με τον ορισμό του Διεθνούς Οργανισμού Προτύπων (ISO) για το «Αιθέριο Έλαιο». Ένα αιθέριο έλαιο όπως ορίζεται από το ISO στο λεξιλόγιο του εγγράφου ISO 9235.2—αρωματικές φυσικές πρώτες ύλες—είναι το εξής: «Προϊόν που λαμβάνεται από φυτική πρώτη ύλη—είτε με απόσταξη με νερό ή ατμό είτε—από το επικάρπιο εσπεριδοειδών με μηχανική διαδικασία ή—με ξηρή απόσταξη» (ISO/DIS 9235.2, 1997, σελ. 2). Η απόσταξη με ατμό μπορεί να πραγματοποιηθεί με ή χωρίς προσθήκη νερού σε αποστακτήρα. Αντίθετα, η ξηρή απόσταξη φυτικού υλικού πραγματοποιείται χωρίς την προσθήκη νερού ή ατμού στον αποστακτήρα (ISO 9235, 1997). Η σημείωση 2 στην Ενότητα 3.1.1 του ISO/DIS 9235.2 είναι σημαντική. Αναφέρει ότι «Τα αιθέρια έλαια μπορούν να υποβληθούν σε φυσικές επεξεργασίες (π.χ. επανααπόσταξη, αερισμός) που δεν συνεπάγονται σημαντικές αλλαγές στη σύνθεσή τους» (ISO/DIS 9235.2, 1997, σ. 2).

Προϊόντα που λαμβάνονται με άλλες μεθόδους εκχύλισης, όπως εκχυλίσματα διαλυτών, συμπεριλαμβανομένων εκχυλισμάτων υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, σκυροδέματος ή πομάδες, απόλυτες ουσίες καθώς και ρητινοειδή και

ελαιορητίνες δεν είναι αιθέρια έλαια καθώς δεν συμμορφώνονται με τον προαναφερθέντα ορισμό. Ομοίως, τα προϊόντα που λαμβάνονται με ενζυμική επεξεργασία φυτικού υλικού δεν πληρούν τις απαιτήσεις του ορισμού του αιθερίου ελαίου. Υπάρχει, ωστόσο, τουλάχιστον μια εξαίρεση που πρέπει να αναφερθεί. Το γνωστό «αιθέριο έλαιο» της μαγιάς κρασιού, ένα σημαντικό γευστικό και αρωματικό συστατικό, προέρχεται από μικροοργανισμό και όχι από φυτό.

Τα αιθέρια έλαια είναι πολύπλοκα μείγματα πτητικών ενώσεων που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς και απομονώνονται από ολόκληρο φυτό ή μέρος φυτού γνωστής ταξινομικής προέλευσης. Πολλές από αυτές τις πτητικές ουσίες έχουν διαφορετικές οικολογικές λειτουργίες. Μπορούν να λειτουργήσουν ως εσωτερικοί αγγελιοφόροι, ως αμυντικές ουσίες κατά των φυτοφάγων ή ως πτητικές ουσίες που κατευθύνουν όχι μόνο φυσικούς εχθρούς σε αυτά τα φυτοφάγα αλλά και προσελκύοντας έντομα επικονίασης στον ξενιστή τους.^[2]

Η ποιότητα, η φρεσκάδα και η μοναδικότητα του αιθερίου ελαίου είναι βασικά στοιχεία που σχετίζονται με την αξία του.^[3] Λόγω των μοριακών τους δομών (παρουσία ολεφενικών διπλών δεσμών και λειτουργικών ομάδων όπως υδροξύλιο, αλδεΐδη, εστέρας), τα αιθέρια έλαια οξειδώνονται εύκολα από το φως, τη θερμότητα, τον αέρα^[1] (και την υγρασία).^[3] Ο σχηματισμός οξειγονωμένων τερπενίων, οι χημικοί μετασχηματισμοί ή ο πολυμερισμός είναι χαρακτηριστικά των διαδικασιών γήρανσης που οδηγούν σε απώλεια ποιότητας.^[3]

Το άρωμα και η χημική σύνθεση των αιθερίων ελαίων μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη γεωκλιματική τοποθεσία και τις συνθήκες ανάπτυξης (τύπος εδάφους, κλίμα, υψόμετρο και ποσότητα νερού), την εποχή (για παράδειγμα πριν ή μετά την ανθοφορία), την ώρα της ημέρας κατά την οποία επιτυγχάνεται η συγκομιδή κ.λπ.^[2] καθώς και τις μεθόδους ξήρανσης και μεθόδους εκχύλισης.^[3] Επιπλέον, υπάρχει ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων, η γενετική σύνθεση του φυτού. Επομένως, όλοι αυτοί οι βιολογικοί παράγοντες (γενετικοί και επιγενετικοί) επηρεάζουν τη βιοχημική σύνθεση των αιθερίων ελαίων σε ένα δεδομένο φυτό. Έτσι, το ίδιο είδος φυτού μπορεί να παράγει ένα παρόμοιο αιθέριο έλαιο, ωστόσο με διαφορετική χημική σύσταση, με αποτέλεσμα διαφορετικές θεραπευτικές δραστηριότητες. Αυτές οι παραλλαγές στη χημική σύνθεση οδήγησαν στην έννοια των χημειοτύπων. Ο χημειότυπος ορίζεται γενικά ως ένας ξεχωριστός πληθυσμός στο ίδιο είδος (φυτό ή μικροοργανισμός) που παράγει διαφορετικά χημικά προφίλ για μια συγκεκριμένη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών.^[2] Μερικά παραδείγματα διαφόρων χημειοτύπων δίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Κύριοι χημειότυποι μερικών αρωματικών φυτών.^[2]

Plant	Chemotype 1	Chemotype 2	Chemotype 3
Thyme (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	Thymol	Thujanol	Linalool
Peppermint (<i>Mentha piperita</i> L.)	Menthol	Carvone	Limonene.
Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	Camphor	1,8 cineole	Verbenone
Dill (<i>Anethum graveolens</i> L.)	Carvone	Limonene	Phellandrene
Lavender (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.)	Linalool	Linalyl acetate	β-Caryophyllene

Η συνολική δραστηριότητα ενός αιθέριου ελαίου δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο σε ένα από τα κύρια συστατικά. Οι ανενεργές ενώσεις μπορεί να επηρεάσουν την απορρόφηση, τον ρυθμό των αντιδράσεων και τη βιολογική δραστηριότητα των δραστικών ενώσεων. Ο συνδυασμός του κυρίου και του δευτερεύοντος συστατικού τροποποιεί τη δραστηριότητα για να ασκήσει σημαντική συνεργιστική ή ανταγωνιστική επίδραση.^[3]

Η παραγωγή αιθέριου ελαίου είτε από άγρια καλλιέργεια είτε από καλλιεργούμενα φυτά είναι δυνατή σχεδόν οπουδήποτε, με εξαίρεση τις πιο ψυχρές, μόνιμα χιονισμένες περιοχές του κόσμου.^[2]

Τα τελευταία χρόνια, η σημασία των αιθέριων ελαίων ως βιοκτόνων και εντομοαπωθητικών έχει οδηγήσει σε μια πιο λεπτομερή μελέτη των αντιμικροβιακών τους δυνατοτήτων. Τα περισσότερα αιθέρια έλαια περιέχουν ενώσεις με αντιμικροβιακές ιδιότητες, δραστικές ενώσεις ενάντια σε ιούς, βακτήρια και μύκητες. Συχνά, διαφορετικά μέρη του ίδιου φυτού, όπως φύλλα, ρίζες, άνθη και ούτω καθεξής μπορεί να περιέχουν πτητικά έλαια διαφορετικής χημικής σύστασης. Ακόμη και το ύψος του φυτού μπορεί να παίζει ρόλο. Μερικά αιθέρια έλαια μπορεί να δράσουν όχι μόνο ως εντομοαπωθητικά αλλά ακόμη και να εμποδίσουν την αναπαραγωγή τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, έχει αποδειχθεί ότι τα φυτά προσελκύουν έντομα που με τη σειρά τους βοηθούν στην επικονίαση του φυτού. Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι ορισμένα φυτά επικοινωνούν μέσω της αντιπροσωπείας των αιθέριων ελαίων τους. Κάποιες φορές τα αιθέρια έλαια θεωρούνται απλώς μεταβολικά απόβλητα. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα αιθέρια έλαια δρουν ως αναστολείς της βλάστησης μειώνοντας έτσι τον ανταγωνισμό από άλλα φυτά.^[2]

1.1.2 Χημική Σύσταση

Τα αιθέρια έλαια είναι ένα σύνθετο μείγμα πολικών και μη πολικών ενώσεων.^[3] Αυτά τα μείγματα μπορεί να περιέχουν περισσότερες από τριακόσιες διαφορετικές ενώσεις. Αποτελούνται από οργανικές πτητικές ενώσεις, γενικά χαμηλού μοριακού βάρους κάτω από τριακόσια. Η τάση ατμών τους σε ατμοσφαιρική πίεση και σε θερμοκρασία δωματίου είναι αρκετά υψηλή, ώστε να βρίσκονται εν μέρει σε κατάσταση ατμού.^[4] Η σύνθεση του αιθέριου ελαίου εξαρτάται από το είδος του εξαγόμενου φυτού, τη γεωγραφική θέση αυτού του φυτού, τον χρόνο συγκομιδής και την τεχνική εξαγωγής.^[3]

Τα αιθέρια έλαια μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κύριες ομάδες:

1. Τερπένια, που σχετίζονται με το ισοπρένιο
2. Ενώσεις ευθείας αλυσίδας, που δεν περιέχουν καμία πλευρική αλυσίδα

3. Φαινυλοπροπανοειδή (παράγωγα βενζολίου)

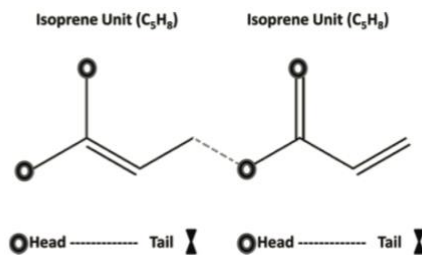
4. Διάφορη ομάδα με ποικίλες δομές που δεν περιλαμβάνονται στις πρώτες τρεις ομάδες (ενώσεις που περιέχουν θείο ή άζωτο)^[3]

1.1.2.1 Τερπένια και τερπενοειδή

Τα τερπένια ορίζονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες με μοριακές δομές που περιέχουν ανθρακικές ραχοκοκαλιές μονάδων ισοπρενίου (2-μεθυλβουτα-1,3-διένιο). Τα τερπένια συντίθενται στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος. Η βιοχημική τροποποίηση όπως η οξείδωση ή η αναδιάταξη των τερπενίων παράγει τα σχετικά τερπενοειδή. Τα τερπενοειδή είναι τότε οξυγονωμένα παράγωγα τερπενίων υδρογονανθράκων όπως αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, οξέα, αιθέρες και εστέρες. Τα τερπενοειδή είναι οι μεγαλύτερες κατηγορίες φυσικών προϊόντων φυτών που αντιπροσωπεύουν περισσότερες από σαράντα χιλιάδες μεμονωμένες ενώσεις τόσο του πρωτογενούς όσο και του δευτερογενούς μεταβολισμού. Μέχρι σήμερα, νέα τερπενοειδή ανακαλύπτονται κάθε χρόνο.

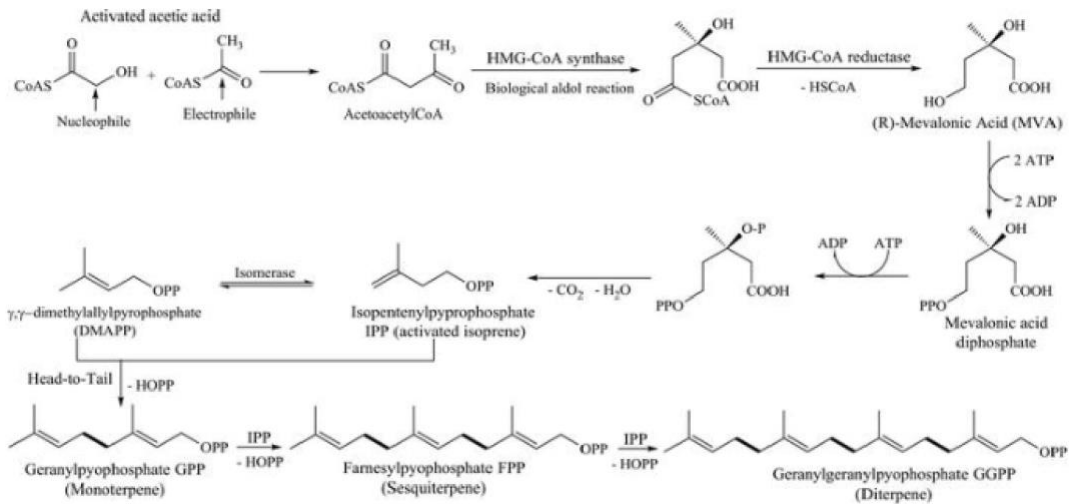
Αυτοί οι τύποι φυσικών λιπιδίων μπορούν να βρεθούν σε κάθε κατηγορία έμβιων όντων, κυρίως στα φυτά ως συστατικά των ΕOs, και επομένως θεωρούνται ως η μεγαλύτερη και δομικά ποικιλόμορφη ομάδα φυσικών προϊόντων. Γενικά, μόνο τα ημιτερπενοειδή, τα μονοτερπενοειδή και τα σεσκιτερπενοειδή είναι αρκετά πτητικά ώστε να είναι συστατικά των ΕOs. Όπως ευρέως αναγνωρίζεται, η σύνθεση των ΕOs αντιπροσωπεύεται κυρίως από μονο-, σεσκι-, ακόμη και δι-τερπενικούς υδρογονάνθρακες και τα αντίστοιχα οξυγονωμένα παράγωγά τους.^[5]

Κάθε ομάδα τερπενίων προκύπτει από τη συμπύκνωση κεφαλής προς ουρά ενός μεταβλητού αριθμού μονάδων ισοπρενίου. Οι παραλλαγές στον αριθμό των επαναλήψεων της μονάδας ισοπρενίου, οι αντιδράσεις κυκλοποίησης και οι αναδιατάξεις είναι κυρίως υπεύθυνες για τη χημική και δομική τους ποικιλομορφία.^[5]



Εικόνα 2: Ένωση μορίων ισοπρενίων.^[3]

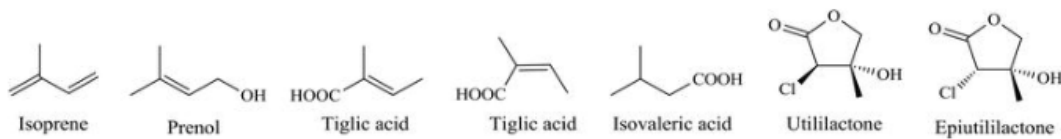
Τα ΕOs αποτελούνται κυρίως από μονοτερπένια (C10) και σεσκιτερπένια (C15), αλλά έχουν επίσης διτερπένια (C20), τριτερπένια (C30) και τετρατερπένια (C40) σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση με τα οξυγονωμένα παράγωγά τους, αντίστοιχα.^[5]



Εικόνα 3: Μονοπάτια βιοσύνθεσης μονοτερπενίων, σεσκιτερπενίων και διτερπενίων.^[5]

Ημιτερπένια

Τα ημιτερπένια αποτελούν μέρος των δευτερευόντων τερπενίων των ΕOs. Συνήθως είναι αλκοόλες, αλδεΐδες και εστέρες με σκελετό 2-μεθυλοβουτανίου.



Εικόνα 4: Δομή μεμονωμένων ημιτερπενίων και ημιτερπενοειδών.^[5]

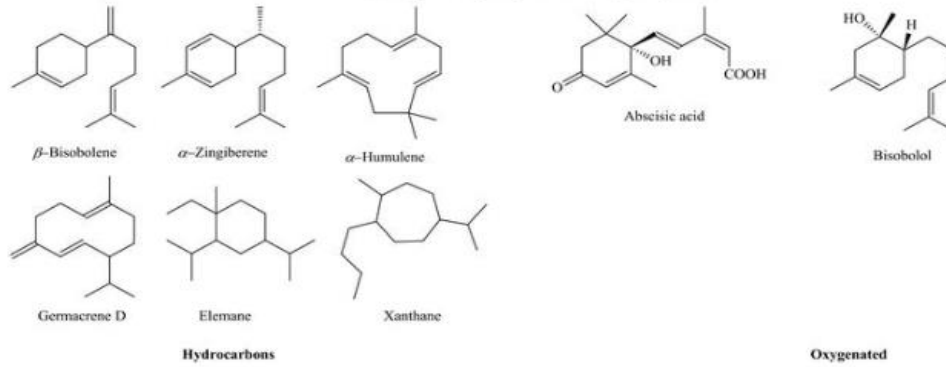
Μονοτερπένια

Τα κανονικά μονοτερπένια κατασκευάζονται από το συνδυασμό δύο μονάδων ισοπρενίου (C₁₀) που συνδέονται με τη σύνδεση κεφαλής-ουράς. Είναι τα κύρια μόρια που αποτελούν το 90% σε (ορισμένα) αιθέρια έλαια. Ως εκ τούτου, συμβάλλουν στη χαρακτηριστική οσμή των φυτών. Τα μονοτερπένια βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα ΕOs και συνήθως διαθέτουν έναν διπλό δεσμό στις δομές τους. Στη φύση, εμπλέκονται ως επί το πλείστον σε αλληλεπιδράσεις φυτού-ζώου και φυτών-φυτών, όπως η επικονίαση, η διάδοση των σπόρων και των καρπών και οι αλληλοπαθητικοί παράγοντες. Τα μονοτερπένια απαντώνται σε περισσότερους από τριάντα γνωστούς σκελετούς και μπορούν να χωριστούν σε τρεις υποομάδες: ακυκλικά, μονοκυκλικά και δικυκλικά. Ένας αριθμός μονοτερπενίων οξυγονώνεται.^[5]

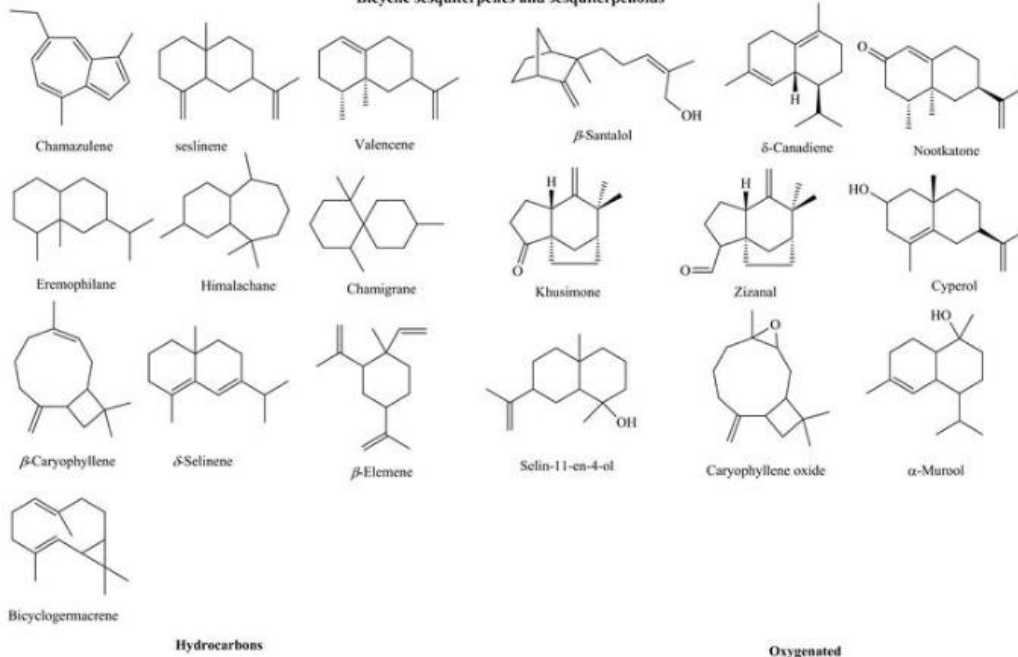
Acylic sesquiterpenes and sesquiterpenoids



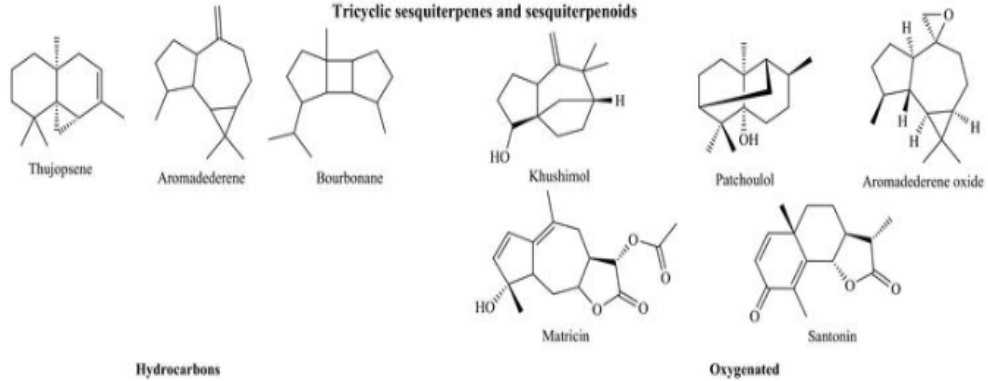
Monoicyclic sesquiterpenes and sesquiterpenoids



Bicyclic sesquiterpenes and sesquiterpenoids



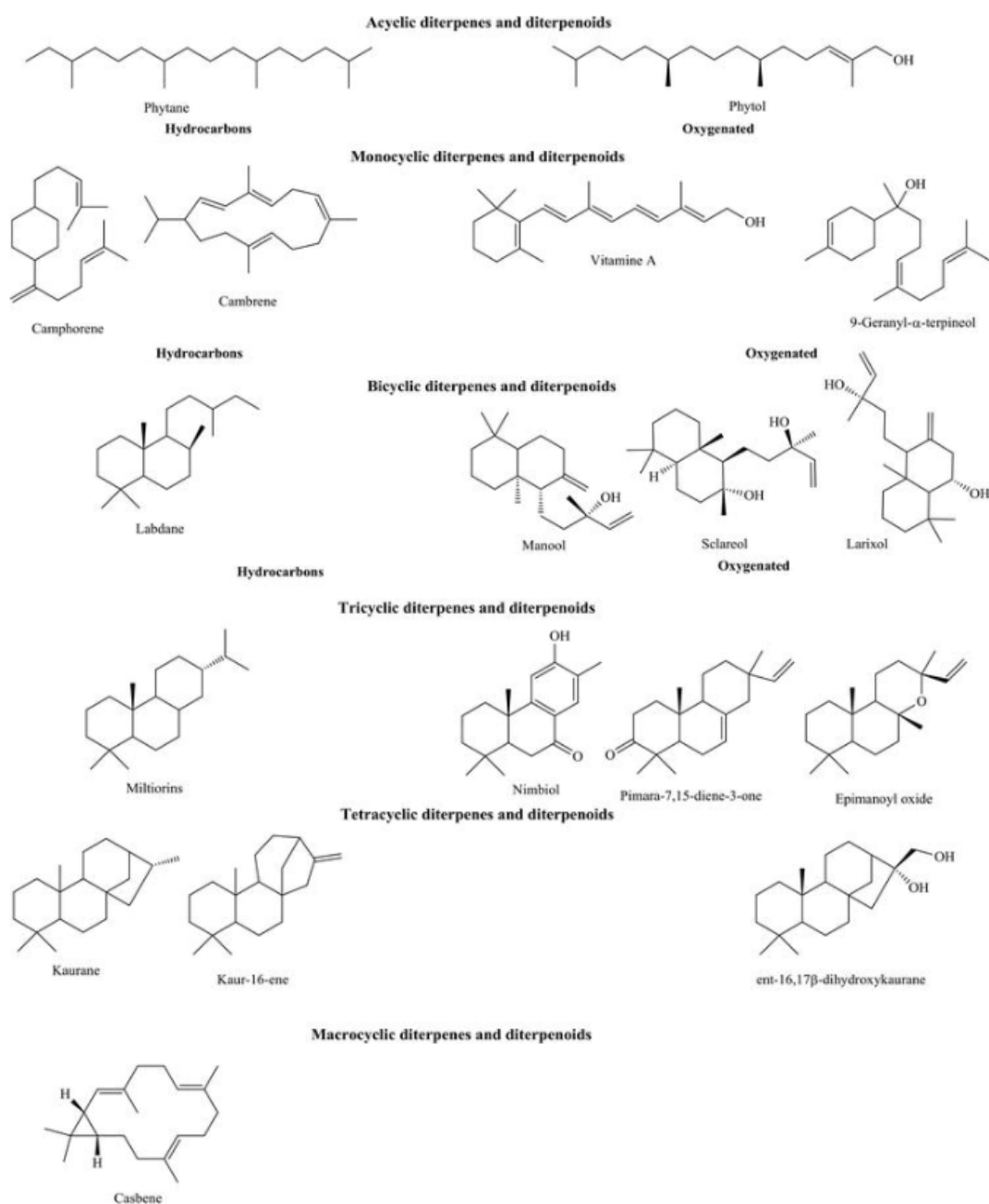
Tricyclic sesquiterpenes and sesquiterpenoids



Εικόνα 6: Δομή μεμονωμένων σεσκιτερπενίων και σεσκιτερπενοειδών.^[5]

Διτερπένια

Είναι πολύπλοκα χημικά και συνήθως είναι συστατικά φυτικών ρητινών, αλλά ορισμένες φορές συναντώνται ως υποπροϊόντα στην απομόνωση των ΕOs. Τα διτερπένια είναι λιγότερο πτητικά λόγω των υψηλών μοριακών βαρών τους και λιγότερο πολυάριθμα από τα μονο- και σεσκι-τερπένια. Κατά συνέπεια, είναι δύσκολο να εξαχθούν με απόσταξη με ατμό και συνεπώς εμφανίζονται σπάνια σε απεσταγμένα ΕOs. Όταν υπάρχουν, βρίσκονται σε ΕOs σε πολύ χαμηλές ποσότητες. Τα διτερπένια που βρίσκονται συνήθως στα ΕOs περιλαμβάνουν την καμφορίνη, την καφεστόλη, την καμπρένη και την ταξιδέμη.^[5]



Εικόνα 7: Δομή μεμονωμένων διτερπενίων και διτερπενοειδών.^[5]

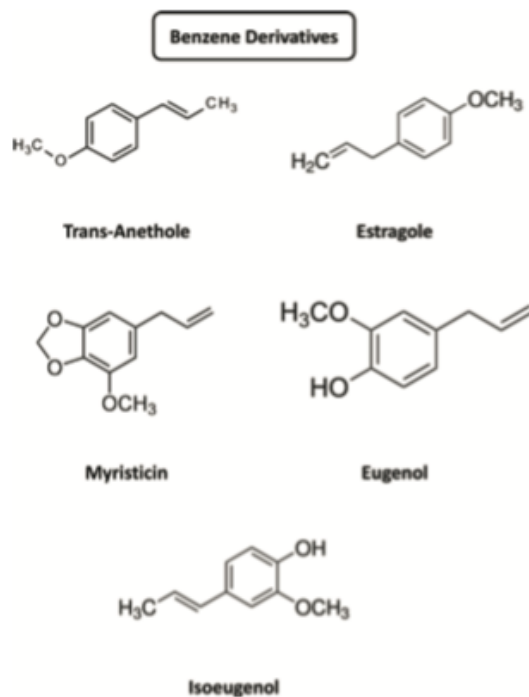
1.1.2.2 Ενώσεις ευθείας αλυσίδας

Αυτή η ομάδα περιέχει μόνο ευθείας αλυσίδας μη τερπενοειδείς υδρογονάνθρακες και τα οξυγονωμένα παράγωγά τους: αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, αιθέρες και εστέρες. Αυτοί οι υδρογονάνθρακες κυμαίνονται από n-επτάνιο έως ενώσεις με 35 άτομα άνθρακα.^[3]

1.1.2.3 Φαινυλοπροπένια

Αυτή η μη τερπενοειδής ομάδα αποτελείται από συστατικά που προέρχονται από το n-προπυλοβενζόλιο. Ο αρωματικός δακτύλιος μπορεί να φέρει υδρόξυ-, μεθόξυ- και μεθυλενοδιόξυ- ομάδες. Η πλευρική αλυσίδα προπυλίου μπορεί να περιέχει υδροξυλική ή καρβοξυλική ομάδα.

Τα φαινυλοπροπένια αποτελούν μια υποοικογένεια φαινυλοπροπανοειδών που συντίθενται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη και l-τυροσίνη μέσω της οδού σικιμικού οξέος. Παραδείγματα αυτής της ομάδας περιλαμβάνουν την trans-ανηθόλη, μεθυλγαβικόλη, ευγενόλη, ισοευγενόλη, βανιλίνη, σαφρόλη, μυριστικήνη και κινναμαλδεΐδη.^[3]

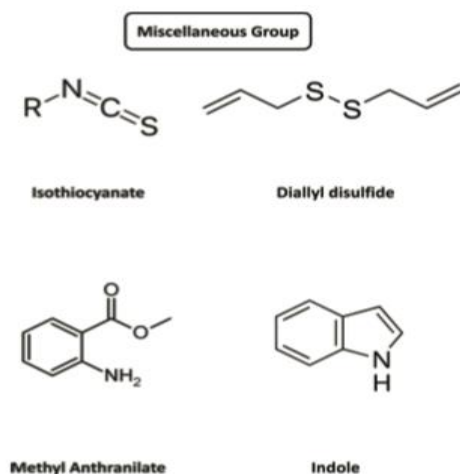


Εικόνα 8: Χημικές δομές φαινυλοπροπενίων.^[3]

1.1.2.4 Διάφορη ομάδα, ενώσεις που περιέχουν θείο και άζωτο

Οι εκπρόσωποι αυτής της ομάδας είναι οι ενώσεις, οι οποίες δεν περιλαμβάνονται στις προαναφερθείσες τρεις ομάδες. Είναι διαφορετικά προϊόντα αποικοδόμησης που προέρχονται από ακόρεστα λιπαρά οξέα, λακτόνες, τερπένια, γλυκοσίδες και ενώσεις που περιέχουν θείο και άζωτο.

Οι ενώσεις που περιέχουν θείο και άζωτο εμφανίζονται κυρίως ως αγλυκόνες ή γλυκοζινολικές ενώσεις ή ως προϊόντα διάσπασής τους, που περιλαμβάνουν ισοθειοκυανικά. Οι ενώσεις του θείου είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό άρωμα και τη γεύση. Ενώσεις που περιέχουν άζωτο βρίσκονται μόνο σε λίγα αιθέρια έλαια. Παραδείγματα αυτών περιλαμβάνουν: ανθρανιλικό μεθυλεστέρα, ινδόλη, πυριδίνη και πυραζίνη.^[3]



Εικόνα 9: Χημικές δομές ενώσεων που περιέχουν θείο και άζωτο.^[3]

1.1.3 Βιοδραστικότητα αιθέρων ελαίων

1.1.3.1 Αντιοξειδωτική Δραστηριότητα

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αιθέρων ελαίων. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό ενός αιθερίου ελαίου εξαρτάται από τη σύνθεσή του. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι οι φαινολικές ουσίες και οι δευτερογενείς μεταβολίτες με συζευγμένους διπλούς δεσμούς συνήθως εμφανίζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τα περισσότερα από τα αιθέρια έλαια κυριαρχούνται από οξυγονωμένα μονοτερπένια όπως αλκοόλες (*Achillea filipendulina*), αλδεΐδες (*Galagania fragrantissima*) και κετόνες (*Anethum graveolens*, *Artemisia rutifolia*, *Hyssopus seravschanicus*, *Mentha longifolia*, *Ziziphoraepora* και *Ziziphoraesterial*).

Τα αιθέρια έλαια της κανέλας, του μοσχοκάρυδου, του γαρύφαλλου, του βασιλικού, του μαϊντανού, της ρίγανης και του θυμαριού χαρακτηρίζονται από τις πιο σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η θυμόλη και η καρβακρόλη είναι οι πιο δραστικές ενώσεις. Η δραστηριότητά τους σχετίζεται με τη φαινολική τους δομή. Αυτές οι φαινολικές ενώσεις έχουν οξειδοαναγωγικές ιδιότητες και για αυτό παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών και επίσης στην αποσύνθεση υπεροξειδίου. Η αντιοξειδωτική δράση των αιθέρων ελαίων οφείλεται, επίσης, σε ορισμένες αλκοόλες, αιθέρες, κετόνες, αλδεΐδες, όπως: λιναλοόλη, 1,8-Cineole, geranial/neral, κιτρονελλάλη, ισομενθόνη, μενθόνη και μερικά μονοτερπένια: α-τερπινένιο, β-τερπινένιο και α-τερπινολένιο.

Τα αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν ουσίες οι οποίες, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, καθυστερούν ή αναστέλλουν σημαντικά την οξείδωση του υποστρώματος. Οι πτητικές ενώσεις των ΕOs, εκτός από την προστατευτική αντιοξειδωτική τους δράση, μπορούν, επίσης, να δράσουν ως προοξειδωτικά, επηρεάζοντας την κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση και καταστρέφοντας τα κυτταρικά βιομόρια, σε πρώτη φάση, τις πρωτεΐνες και το DNA. Όλα αυτά πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν γίνεται αναφορά στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ΕOs.^[4]

Αν και οι φαινολικές ενώσεις αναγνωρίζονται ως υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική ικανότητα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα πτητικά συστατικά θα μπορούσαν, μεμονωμένα ή/και σε μείγμα (αιθέριο έλαιο), να συμβάλλουν στην συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα.^[5]

Τα αιθέρια έλαια με σημαντική ικανότητα σάρωσης των ελεύθερων ριζών μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη ορισμένων ασθενειών, όπως η δυσλειτουργία του εγκεφάλου, ο καρκίνος, οι καρδιακές παθήσεις και η εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Στην πραγματικότητα, αυτές οι ασθένειες μπορεί να προκύψουν από κυτταρική βλάβη που προκαλείται από ελεύθερες ρίζες.^[4]

1.1.3.2 Κυτταροτοξικότητα

Λόγω της πολύπλοκης χημικής τους σύστασης, τα αιθέρια έλαια δεν έχουν συγκεκριμένους κυτταρικούς συνδέτες. Ως λιπόφιλα μείγματα, είναι σε θέση να διασχίσουν την κυτταρική μεμβράνη, να αποικοδομήσουν τα στρώματα των πολυσακχαριτών, των φωσφολιπιδίων και των λιπαρών οξέων και να διαπεράσουν. Αυτή η κυτταροτοξικότητα φαίνεται να περιλαμβάνει τέτοιου είδους βλάβη της μεμβράνης. Στα βακτήρια, η διαπερατότητα της μεμβράνης σχετίζεται με την απώλεια ιόντων και τη μείωση του δυναμικού της μεμβράνης, την κατάρρευση της αντλίας πρωτονίων και την εξάντληση της δεξαμενής ATP. Τα αιθέρια έλαια μπορεί να πήξουν το κυτταρόπλασμα και να βλάψουν τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Η βλάβη στο τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη μπορεί να οδηγήσει σε διαρροή μακρομορίων και λύση.

Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια αλλάζουν τη ρευστότητα της μεμβράνης, η οποία γίνεται ασυνήθιστα διαπερατή, με αποτέλεσμα τη διαρροή ριζών, κυτοχρώματος C, ιόντων Ca^{2+} και πρωτεϊνών, όπως στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες. Αυτή η διαπερατότητα των εξωτερικών και εσωτερικών μεμβρανών προκαλεί κυτταρικό θάνατο με απόπτωση και νέκρωση. Η υπερδομική αλλοίωση του κυττάρου μπορεί να παρατηρηθεί σε μια πληθώρα διαμερισμάτων.

Γενικά, η κυτταροτοξικότητα των αιθερίων ελαίων σχετίζεται κυρίως με την παρουσία φαινολών, αλκοολών και μονοτερπεναλδεϋδών. Οι κυτταροτοξικές ιδιότητες των αιθερίων ελαίων είναι μεγάλης σημασίας γιατί προϋποθέτουν τη χρήση τους όχι μόνο κατά ορισμένων ανθρωπίνων παθογόνων και ζωικών παρασίτων, αλλά και στη διατήρηση γεωργικών και θαλασσίων προϊόντων έναντι μικροβιακής προσβολής. Πράγματι, ορισμένα συστατικά των αιθερίων

ελαίων είναι αποτελεσματικά ενάντια σε μια ποικιλία μικροοργανισμών όπως βακτήρια, ιούς, μύκητες, πρωτόζωα, καθώς και σε παράσιτα, ακάρεα και άλλα.^[4]

Λόγω στις μεταβλητότητας των ποσοτήτων και των προφίλ των συστατικών των αιθερίων ελαίων, είναι πιθανό η αντιμικροβιακή τους δράση να μην οφείλεται σε έναν μόνο μηχανισμό, αλλά σε πολλές θέσεις δράσης σε κυτταρικό επίπεδο.^[1]

Η αντιμικροβιακή τους δράση εξαρτάται όχι μόνο από την παρουσία των κύριων δραστικών ενώσεων αλλά και από την αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών συστατικών που μπορεί να έχουν συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές δράσεις. Εξαρτάται, επίσης, από το περιεχόμενο, τη συγκέντρωση, την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυρίων δραστικών συστατικών και την ευαισθησία των μικροοργανισμών. Οι ανενεργές ενώσεις μπορεί να επηρεάσουν την απορρόφηση, τον ρυθμό των αντιδράσεων, καθώς και τις βιολογικές δραστηριότητες των δραστικών ενώσεων. Ο συνδυασμός και των δύο, βασικών και δευτερευόντων συστατικών, μπορεί επομένως να τροποποιήσει τη δραστηριότητα για να ασκήσει σημαντική συνεργιστική ή ανταγωνιστική επίδραση.

Γενικά, τα EOs με φθίνουσα σειρά αντιμικροβιακής δράσης αναφέρονται ως εξής: ρίγανη (*Origanum vulgare*) > γαρύφαλλο (*Syzygium aromaticum*) > κόλιανδρος (*Coriandrum sativum*) > κανέλα (*Cinnamomum cassia*) > θυμάρι (*Thymus vulgaris*) > μέντα (*Mentha*) > δεντρολίβανο (*Salvia rosmarinus*) > λευκή μουστάρδα (*Sinapis alba*) > φασκόμηλο (*Salvia officinalis*).^[5]

1.1.3.2.1 Αντιβακτηριδιακή δράση

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθερίων ελαίων και των συστατικών τους έχουν ληφθεί υπόψη και ο μηχανισμός δράσης έχει μελετηθεί λεπτομερώς. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αιθερίων ελαίων κατά την υδροαπόσταξη σε ένα βήμα χρησιμοποιώντας σύστημα απόσταξης κλειστού κυκλώματος είναι η υδροφοβικότητά τους, η οποία τους επιτρέπει να διαχωρίζονται σε λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, διαταράσσοντας τη δομή και καθιστώντας την πιο διαπερατή. Αυτό μπορεί στη συνέχεια να προκαλέσει διαρροή ιόντων και άλλων κυτταρικών μορίων. Αν και μια ορισμένη ποσότητα διαρροής βακτηριακών κυττάρων μπορεί να γίνει ανεκτή χωρίς απώλεια βιωσιμότητας, μεγαλύτερη απώλεια περιεχομένων κυττάρων ή κρίσιμης παραγωγής μορίων και ιόντων μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο.

Τα EOs ή/και τα συστατικά τους στοιχεία μπορούν να έχουν έναν μόνο στόχο ή πολλαπλούς στόχους της δραστηριότητάς τους.

Τα EOs που περιέχουν κυρίως αλδεΐδες ή φαινόλες, όπως κινναμαλδεΐδη, κιτράλη, καρβακρόλη, ευγενόλη ή θυμόλη, χαρακτηρίζονται από την υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση, ακολουθούμενα από EOs που περιέχουν τερπενικές αλκοόλες. Άλλα EOs, που περιέχουν κετόνες ή εστέρες, όπως το β-μυρκενίο, την α-θουγιόνη ή τον οξικό γερανυλεστέρα, έχουν πολύ πιο αδύναμη δράση, ενώ τα πτητικά έλαια που περιέχουν υδρογονάνθρακες τερπενίου είναι συνήθως ανενεργά.

Γενικά, τα αιθέρια έλαια που χαρακτηρίζονται από υψηλό επίπεδο φαινολικών ενώσεων, όπως η καρβακρόλη, η ευγενόλη και η θυμόλη, έχουν σημαντική αντιβακτηριδιακή δράση. Αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για τη διάσπαση στις κυτταροπλασματικής μεμβράνης, την κινητήρια δύναμη των πρωτονίων, τη ροή ηλεκτρονίων, την ενεργό μεταφορά και επίσης την πήξη των περιεχομένων των κυττάρων.

Η χημική δομή των αιθέρων ελαίων επηρεάζει τον τρόπο δράσης τους όσον αφορά την αντιβακτηριδιακή τους δράση. Σημασία έχει η παρουσία της ομάδας υδροξυλίου στις φαινολικές ενώσεις, όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη. Ωστόσο, η σχετική θέση της ομάδας φαινολικού υδροξυλίου στον δακτύλιο δεν επηρεάζει την ένταση της αντιβακτηριδιακής δράσης.

Σημαντικό είναι ότι τα αιθέρια έλαια είναι πιο δραστικά έναντι των Gram-θετικών από τα Gram-αρνητικά βακτήρια. Τα τελευταία είναι λιγότερο ευαίσθητα στη δράση των αιθέρων ελαίων με την εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα να περιορίζει τη διάχυση των υδρόφοβων ενώσεων μέσω του λιποπολυσακχαριδικού φιλμ. Επιπλέον, η αντιβακτηριδιακή δράση των αιθέρων ελαίων σχετίζεται με τη χημική τους σύνθεση, τις αναλογίες των πτητικών μορίων και τις αλληλεπιδράσεις τους.

Μια αθροιστική επίδραση παρατηρείται όταν ο συνδυασμός είναι ίσος με το άθροισμα των επιμέρους επιδράσεων. Ανταγωνισμός παρατηρείται όταν η επίδραση μιας ή και των δύο ενώσεων είναι λιγότερο σημαντική όταν δοκιμάζονται μαζί παρά όταν χρησιμοποιούνται μεμονωμένα. Μια συνεργιστική επίδραση παρατηρείται όταν ο συνδυασμός των ουσιών είναι μεγαλύτερος από το άθροισμα των επιμέρους επιδράσεων. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση ολόκληρου του αιθέρου ελαίου παρέχει ένα αποτέλεσμα που είναι μεγαλύτερο από αυτό των κύριων συστατικών που χρησιμοποιούνται μαζί. Αυτό υποδηλώνει ότι τα δευτερεύοντα συστατικά είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα και μπορεί να έχουν συνεργιστική δράση.

Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια είναι αποτελεσματικά στην αναστολή της ανάπτυξης και στη μείωση του αριθμού των πιο σοβαρών τροφιογενών παθογόνων, όπως *Salmonella spp.*, *E. Coli O157:H7* και *Listeria monocytogenes*.^[4]

1.1.3.2.2 Αντιμυκητιασική δράση

Οι μύκητες είναι σημαντικές αιτίες ανθρώπινων λοιμώξεων. Αρκετές καλλιέργειες είναι επιρρεπείς σε προσβολή από μύκητες είτε στο χωράφι είτε κατά την αποθήκευση. Τα υπολείμματα μυκητοκτόνων αποτελούν προβλήματα για τη βιομηχανία τροφίμων. Η πρόληψη της ανάπτυξης μυκήτων είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος παρεμπόδισης της συσσώρευσης μυκοτοξινών. Τα αιθέρια έλαια έχουν την ικανότητα να επιτίθενται στον κύκλο ζωής των καλουπιών.^[4]

Οι αντιμυκητιακές δράσεις είναι αρκετά παρόμοιες με αυτές που περιγράφονται για τα βακτήρια. Ωστόσο, δύο πρόσθετα φαινόμενα που αναστέλλουν τη δράση της ζύμης είναι άξια αναφοράς: η δημιουργία βαθμίδας pH κατά μήκος της

κυτταροπλασματικής μεμβράνης και η παρεμπόδιση της παραγωγής ενέργειας των ζυμών που συνεπάγεται τη διάσπαση της μεμβράνης.^[1]

Το υψηλό κόστος παραγωγής αιθερίων ελαίων και η χαμηλή συγκέντρωση ενεργών συστατικών περιορίζουν την άμεση χρήση τους στον έλεγχο μυκητιασικών ασθενειών των φυτών και των ζώων. Ως εκ τούτου, η διερεύνηση των αντιμυκητιασικών ενώσεων των αιθερίων ελαίων θεωρείται σημαντική λόγω της δυνατότητας σύνθεσης αυτών των ενώσεων για χρήση στον έλεγχο μυκητιασικών ασθενειών.^[4]

1.1.3.2.3 Αντική δράση

Νέοι παράγοντες που είναι αποτελεσματικοί έναντι κοινών παθογόνων είναι απαραίτητοι ιδιαίτερα για αυτούς που είναι ανθεκτικοί σε συμβατικούς αντιμυκητιασικούς παράγοντες. Η ικανότητα των ιών να επιμένουν σε φρέσκα προϊόντα, καθώς και η χαμηλή μολυσματική δόση τους, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε σοβαρά τροφιμογενή προβλήματα. Τα φυτά και τα φυσικά προϊόντα φυτικής προέλευσης παρέχουν απεριόριστες ευκαιρίες για νέα αντιμυκητιασικά φάρμακα. Πολλά ΕOs έχουν διερευνηθεί τα τελευταία χρόνια ως προς την αντική τους δράση. Ως ολοκλήρωση της εργασίας τους, ο Reichling και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι συγκεκριμένοι ελεύθεροι ιοί είναι πολύ ευαίσθητοι στα ΕOs.^[5]

Το σύνθετο μείγμα αιθερίων ελαίων συνήθως εμφανίζει υψηλότερη αντική δράση από μεμονωμένες ενώσεις (λόγω πιθανών φαινομένων συνέργιας) με εξαίρεση το καρυοφυλλένιο που είναι η πιο διάσημη αντική ένωση που βρίσκεται σε πολλά διαφορετικά αιθέρια έλαια από διαφορετικές οικογένειες φυτών. Υπάρχουν διαφορετικοί μηχανισμοί αντικής δράσης διαφορετικών αιθερίων ελαίων και των συστατικών τους. Η αντική δράση του αιθερίου ελαίου οφείλεται κυρίως σε άμεσες ιοκτόνες επιδράσεις (με τη μετουσίωση των δομικών πρωτεϊνών ή των γλυκοπρωτεϊνών του ιού). Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί υποδεικνύουν ότι τα αιθέρια έλαια παρεμβαίνουν στο περιβάλλον του ιού αναστέλλοντας συγκεκριμένες διεργασίες στον κύκλο αντιγραφής του ιού ή καλύπτοντας ιικά συστατικά, τα οποία είναι απαραίτητα για την προσρόφηση ή την είσοδο στα κύτταρα ξενιστές, και έτσι εμποδίζουν τη διάχυση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο.^[1]

1.1.3.3 Αντιφλεγμονώδης Δραστηριότητα

Η φλεγμονή είναι μια φυσιολογική προστατευτική απόκριση που προκαλείται από τραυματισμό ή μόλυνση ιστού και λειτουργεί για την καταπολέμηση εισβολέων στο σώμα (μικροοργανισμούς και μη αυτοκύτταρα) καθώς και την αφαίρεση νεκρών ή κατεστραμμένων κυττάρων ξενιστών. Η φλεγμονώδης απόκριση προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων και εισροές λευκοκυττάρων του αίματος στο διάμεσο, οξειδωτική έκκριση και απελευθέρωση κυτοκινών, όπως οι ιντερλευκίνες και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α). Διεγείρει, επίσης, τη δραστηριότητα πολλών ενζύμων (οξυγενάσες, συνθάσες μονοξειδίου του αζώτου, υπεροξειδάσες κ.λπ.), καθώς και τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Πρόσφατα, τα αιθέρια έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικά περιβάλλοντα για τη θεραπεία φλεγμονωδών

ασθενειών, όπως οι ρευματισμοί, οι αλλεργίες ή η αρθρίτιδα. Το *Melaleuca alternifolia* EO έχει αναφερθεί ότι έχει σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση. Αυτή η δραστηριότητα συσχετίζεται με την κύρια ένωσή του: την α-τερπινεδόλη. Οι δραστικές ενώσεις δρουν αναστέλλοντας την απελευθέρωση ισταμίνης ή μειώνοντας την παραγωγή μεσολαβητών φλεγμονής.

Η αντιφλεγμονώδης δράση των αιθερίων ελαίων μπορεί να αποδοθεί όχι μόνο στις αντιοξειδωτικές τους δραστηριότητες αλλά και στις αλληλεπιδράσεις τους με καταρράκτες σηματοδότησης που περιλαμβάνουν κυτοκίνες και ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και στην έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων. Τα αιθέρια έλαια, λοιπόν, αντιπροσωπεύουν μια νέα επιλογή στη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών.^[4]

1.1.3.4 Χημειοπροστατευτική δραστηριότητα καρκίνου

Οι ποικίλες θεραπευτικές δυνατότητες των αιθερίων ελαίων προσελκύουν, τα τελευταία χρόνια, την προσοχή των ερευνητών για την πιθανή δράση τους κατά του καρκίνου. Αυτοί στοχεύουν στην ανακάλυψη νέων αντικαρκινικών φυσικών προϊόντων. Τα αιθέρια έλαια θα δρούσαν στην πρόληψη του καρκίνου, καθώς και στην αφαίρεσή του. Είναι ευρέως γνωστό ότι ορισμένα τρόφιμα, όπως το σκόρδο και ο κOURKΟΥΜΑΣ, είναι καλές πηγές αντικαρκινικών παραγόντων. Το αιθέριο έλαιο σκόρδου είναι μια πηγή θειούχων ενώσεων που αναγνωρίζονται για την προληπτική τους δράση κατά του καρκίνου. Το διαλλυλσουλφίδιο, το διαλλυλδισουλφίδιο και το διαλλυλτρισουλφίδιο είναι παραδείγματα.

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι η μυριστίνη προκαλεί απόπτωση στο νευροβλάστωμα (SK-N-SH) στους ανθρώπους. Υπάρχουν και άλλες πτητικές ενώσεις που έδειξαν κυτταροτοξική δράση ενάντια σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η γερανιόλη μειώνει την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (TC118) στην 5-φθοροουρακίλη, έναν αντικαρκινικό παράγοντα. Επομένως, η γερανιόλη ενισχύει αυτό το ανασταλτικό αποτέλεσμα της ανάπτυξης όγκου 5-φθοροουρακίλη. Το αιθέριο έλαιο ελάτης και βαλσαμόχορτου καθώς και το α-χουμουλένιου, παρουσιάζουν σημαντική αντικαρκινική δράση σε αρκετές κυτταρικές σειρές και χαμηλή τοξικότητα στα υγιή κύτταρα.

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί η αντικαρκινική δράση του D-limonene, του κύριου συστατικού του αιθερίου ελαίου εσπεριδοειδών, ειδικά σε επίπεδο καρκίνου του στομάχου και του ήπατος. Η α-Bisabolol, μια άφθονη σεσκιτερπενική αλκοόλη στο αιθέριο έλαιο χαμομηλιού (*Matricaria*), έχει αντιγλοιομική δράση. Πολλά αιθέρια έλαια έχουν κυτταροτοξική δράση και συγκεκριμένα τα *Melissa officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, *Artemisia annua* και *Comptonia peregrina*.^[4]

Τα EOs είναι γνωστά για την αντιφλεγμονώδη δράση τους. Ως εκ τούτου, φάνηκε ότι τα EOs θα μπορούσαν να έχουν αντικαρκινικά αποτελέσματα, καθώς υπάρχει σχέση μεταξύ της παραγωγής αντιδραστικών ειδών οξυγόνου με την προέλευση της οξειδωσης και της φλεγμονής που μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο. Περισσότερα από εκατό EOs από περισσότερες από είκοσι οικογένειες

φυτών έχουν δοκιμαστεί σε περισσότερους από είκοσι διαφορετικούς τύπους καρκίνου τα τελευταία δέκα χρόνια.^[5]

1.1.3.5 Αλληλοπαθητική Δραστηριότητα

Σύμφωνα με την International Allelopathy Society (IAS), η αλληλοπάθεια ορίστηκε το 1996 ως «η επιστήμη που μελετά κάθε διαδικασία που περιλαμβάνει δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από φυτά, φύκια, βακτήρια και μύκητες που επηρεάζει την ανάπτυξη και την εξέλιξη γεωργικών και βιολογικών συστημάτων». Οι αλληλοπαθητικές αλληλεπιδράσεις προέρχονται από την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες συντίθενται για ένα ευρύ φάσμα άμυνας από τα φυτά και τους μικροοργανισμούς. Μάλιστα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες που εμπλέκονται ονομάζονται αλληλοχημικά.

Τα πτητικά έλαια και τα συστατικά τους διερευνώνται για τη διαχείριση ζιζανίων και παρασίτων και θεωρούνται σημαντικά στη γεωργία. Τα βιοενεργά τερπενοειδή αποτελούν σημαντικό μέρος των αμυντικών μηχανισμών ενός μεγάλου αριθμού οργανισμών και αντιπροσωπεύουν μια αρκετά αναξιοποίητη πηγή ενεργών ενώσεων πιθανής χρήσης και στον γεωργικό τομέα. Στην πραγματικότητα, ένας μεγάλος αριθμός υψηλά φυτοτοξικών αλληλοχημικών προέρχεται από την τερπενοειδή οδό και η φυτοτοξικότητα των αιθερίων ελαίων έχει διερευνηθεί.

Τα αποτελέσματα της έρευνας των Saad και Abdelgaleil παρουσίασε μια συσχέτιση μεταξύ της χημικής σύνθεσης των ΕOs και των επιπτώσεών τους στη βλάστηση και την ανάπτυξη των φυταρίων. Αναφέρθηκε ότι οι πιο δραστικές ενώσεις ανήκαν στις ομάδες των κετονών και των αλκοολών και ακολουθήθηκαν από την ομάδα των αλδεϋδων και των φαινολών. Επιπλέον, ο Kotan et al. πρότεινε ότι, γενικά, μια ισχυρή φυτοτοξική δράση των φυτικών ΕOs συσχετίζεται με υψηλή ποσότητα οξυγονωμένων μονοτερπενίων. Σχεδόν όλα τα αποτελεσματικά έλαια είχαν υψηλά ποσοστά οξυγονωμένων μονοτερπενίων και αυτό συμφωνούσε με την προηγούμενη εργασία των de Almeida et al. και Vokou et al.

Ο Dudai et al. ανέφερε ότι τα μονοτερπένια δρουν στους σπόρους σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Επιπλέον, είναι ευρέως γνωστό ότι τα μονοτερπένια στα αιθέρια έλαια έχουν φυτοτοξικές επιδράσεις που μπορεί να προκαλέσουν ανατομικές και φυσιολογικές αλλαγές στα σπορόφυτα των φυτών που οδηγούν σε συσσώρευση λιπιδικών σφαιριδίων στο κυτταρόπλασμα, μείωση ορισμένων οργανιδίων όπως τα μιτοχόνδρια, πιθανώς λόγω αναστολής της σύνθεσης DNA ή διάσπαση των μεμβρανών που περιβάλλουν τα μιτοχόνδρια και στις πυρήνες. Δεδομένου ότι η συνεχής χρήση συνθετικών ζιζανιοκτόνων μπορεί να απειλήσει τη βιώσιμη γεωργική παραγωγή και να οδηγήσει σε σοβαρά οικολογικά και περιβαλλοντικά προβλήματα, τα αιθέρια έλαια με αλληλοπαθητικές ιδιότητες θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως εναλλακτικές στρατηγικές που οδηγούν στην ανάπτυξη βιοαποδομήσιμων και μη τοξικών ενώσεων.^[4]

1.1.3.6 Απωθητική και εντομοκτόνος δράση

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν μια πλούσια πηγή δομικά ποικίλων ενώσεων με ποικιλία εντομοκτόνων και απωθητικών μηχανισμών. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές οι ενώσεις, καθώς και τα μητρικά τους μείγματα, διαθέτουν βιολογική δραστηριότητα ικανή να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στα παράσιτα των αρθροπόδων. Διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την εμπορευματοποίηση εκχυλισμάτων φυτικών αιθέριων ελαίων ως απωθητικών περιλαμβάνουν κανονιστικές απαιτήσεις, αξία πνευματικής ιδιοκτησίας, βιολογική δραστηριότητα, απόδοση προϊόντος και ποιότητα προϊόντος.

Η τοξική δράση των αιθέριων ελαίων δεν είναι μόνο κατάλληλη για έντομα σιτοβολών αλλά και για ιπτάμενα έντομα: τα έλαια *Gaultheria* (*Ericaceae*) και ευκάλυπτος (*Myrtaceae*) παρουσιάζουν πολύ υψηλή θανάτωση σε έντομα, όπως ο ρυζοκίσκος *Sitophilus oryzae*, τα σκαθάρια *Coleoptera: Bruchidae* και *S. Paniceum*, καθώς και στο *M. Domestica*. Στην πραγματικότητα, οι δραστηριότητες των αιθέριων ελαίων στα είδη είναι πολλαπλές. Τα αιθέρια έλαια *Mentha*, *Lavandula* (*Lamiaceae*) ή *Pinus* (*Pinaceae*) σημειώνονται για την τοξικότητά στις κατά του *Myzus persicae* (*Homoptera: Aphididae*), της λευκής μύγας του θερμοκηπίου *Trialeurodes vaporariorum* (*Homoptera: Aleyrodidae*), του *Colorado* (*beetleoplinetatar: Chrysomelidae*) και του τίγρη στις αχλαδιάς *Stephanitis pyri* (*Hymenoptera: Stephanidae*).

Συνήθως, τα αιθέρια έλαια μπορούν να εισπνευστούν, να καταποθούν ή να απορροφηθούν από το δέρμα των εντόμων. Η καπνιστική τοξικότητα των αιθέριων ελαίων και των κύριων συστατικών τους, τα πτητικά μονοτερπένια, είναι γνωστή. Τα έντομα είναι επίσης πολύ ευαίσθητα σε τοπικές εφαρμογές.

Τα αιθέρια έλαια που ανήκουν σε φυτά του γένους *Citronella* (*Poaceae*) χρησιμοποιούνται συνήθως ως συστατικά φυτικών αντικουνουπικών, κυρίως το *Cymbopogon nardus*, το οποίο πωλείται στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική σε εμπορικά παρασκευάσματα.^[4]

Πίνακας 2: Διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων αιθέριων ελαίων και οι βιοδραστηκότητές τους.

Κατηγορία συστατικών	Συστατικά (αντιπροσωπευτικά)	Βιοδραστηκότητα
Υδρογονάνθρακες	Λεμονένιο, μυρσένιο, πινένιο,σαβινένιο,κυμένιο, φελλανδρένιο	Διεγερτική, αντική, αντικαρκινική, αποσυμφορητική, αντιβακτηριδιακή, ηπατοπροστατευτική ^{[6]-[13]}
Εστέρες	Οξικός λινανυλεστέρας, οξική γερανιόλη, οξική ευγενόλη, οξικός βορνυλεστέρας	Σπασμολυτική, ηρεμιστική, αντιμυκητιστακή, αναισθητική, αντιφλεγμονώδη ^{[7],[14]-[15]}

Οξείδια	Οξείδιο της βισαβολόνης, οξείδιο της λιναλοόλης, οξείδιο σκλαρεόλης, ασκαριδόλη	Αντιφλεγμονώδη, αποχρεμπτική, διεγερτική ^{[7], [14], [17]}
Λακτόνες	Νεπεταλακτόνη, περγαπτένιο, κουστουλακτόνη, διυδρονεπεταλακτόνη, αλαντρολακτόνη	Αντιμικροβιακή, αντιική, αντιπυρετικό, ηρεμιστική, υποτασική, αναλγητική ^{[7], [14], [18], [19]}
Αλκοόλες	Λιναλόλη, μενθόλη, βορνεόλη, σανταλόλη, νερόλη, σιτρονελλόλη, γερανιόλη	Αντιμικροβιακό, αντισηπτικό, τονωτικό, εξισορροπητικό, σπασμολυτικό, αναισθητικό. Αντιφλεγμονώδη ^{[7], [14]-[17]}
Φαινόλες	Θυμόλη, ευγενόλη, καρβακρόλη, σαβικόλη	Αντιμικροβιακή, σπασμολυτική, αναισθητική, ερεθιστική, ανοσοδιεγερτική ^{[7], [14], [17]}
Αλδεύδες	Κιτράλη, μυρτενάλη, κουμιναλδεΰδη, κιτρονελλάλη, κινναμαλδεΰδη, βενζαλδεΰδη	Αντιική, αντιμικροβιακή, τονωτική, αγγειοδιασταλτική, υποτασικό, ηρεμιστική, αντιπυρετική, ηρεμιστική, σπασμολυτική ^{[7], [20]}
Κετόνες	Καρβόνη, μενθόνη, πουλεγκόνη, φεντσόνη, καμφορά, θουγιόνη, βερμπενόνη	Βλεννολυτική, αναγεννητική δράση κυττάρων, ηρεμιστική, αντιική, νευροτοξική, αναλγητική, χωνευτική, σπασμολυτική ^{[7], [14], [21], [22]}

1.1.4 Μέθοδοι απομόνωσης αιθέριων ελαίων

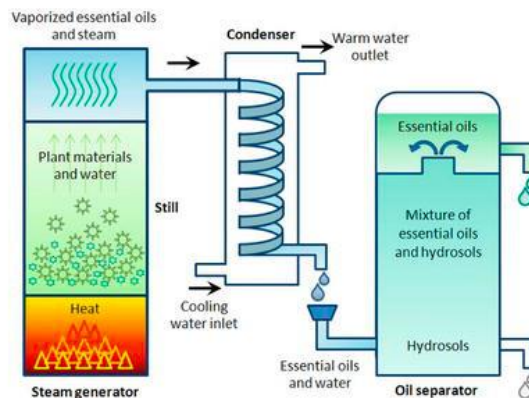
Τα ΕOs λαμβάνονται από φυτικές πρώτες ύλες με διάφορες μεθόδους εκχύλισης. Τέτοιες μέθοδοι θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: συμβατικές/κλασικές μέθοδοι και προηγμένες/καινοτόμες μέθοδοι. Η διερεύνηση νέων τεχνολογιών (υπέρηχοι, μικροκύματα) τις τελευταίες δεκαετίες οδήγησε στην εμφάνιση νέων καινοτόμων και πιο αποτελεσματικών διεργασιών εκχύλισης (μείωση χρόνου εκχύλισης και κατανάλωση ενέργειας, αύξηση απόδοσης εκχύλισης, βελτίωση ποιότητας των ΕOs).

1.1.4.1 Συμβατικές και κλασικές μέθοδοι

Αυτές είναι συμβατικές μέθοδοι που βασίζονται στην απόσταξη νερού με θέρμανση για την ανάκτηση των ΕOs από τη μήτρα των φυτών.

1.1.4.1.1 Υδροαπόσταξη

Αυτή η μέθοδος είναι η πιο απλή και παλιά που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση EOs. Το φυτικό υλικό βυθίζεται απευθείας στο νερό μέσα στο αποσταλακτήριο και το σύνολο φέρεται σε βρασμό. Η συσκευή εξαγωγής περιλαμβάνει μια πηγή θέρμανσης που επικαλύπτεται από ένα δοχείο στο οποίο θα μπορούσε να τοποθετηθεί φυτικό υλικό και νερό. Η διάταξη περιλαμβάνει επίσης έναν συμπυκνωτή και έναν αποχυτήρα για τη συλλογή του συμπυκνώματος και τον διαχωρισμό των EOs από το νερό, αντίστοιχα.^[23] Το έλαιο που περιέχεται στα ελαιόκυτταρα διαχέεται μέσω των κυτταρικών τοιχωμάτων μέσω όσμωσης.^[5]



Εικόνα 10: Διαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου της υδροαπόσταξης.^[5]

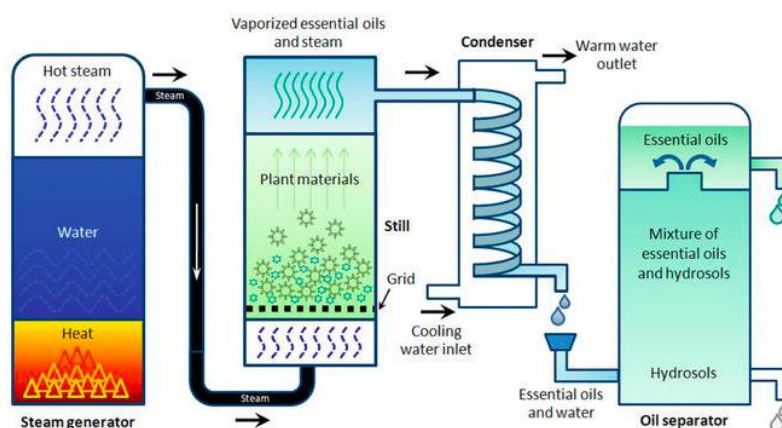
Η αρχή της εκχύλισης βασίζεται στην αζεοτροπική απόσταξη. Στην πραγματικότητα, σε ατμοσφαιρική πίεση και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης (θέρμανση), τα μόρια του νερού και των EOs σχηματίζουν ένα ετερογενές μείγμα που φτάνει τη θερμοκρασία βρασμού του σε χαμηλότερο σημείο, κοντά στους 100 °C, ενώ για τα συστατικά των EOs αυτό το σημείο είναι πολύ υψηλό. Το μίγμα EOs/νερό αποστάζεται, στη συνέχεια, ταυτόχρονα σαν να είναι μια ενιαία ένωση. Αυτό αναφέρεται ως συναπόσταξη παρουσία ατμών νερού ως κινητή φάση διαλύτη (solvent drive). Το πλεονέκτημα του νερού είναι ότι δεν αναμιγνύεται με την πλειονότητα των τερπενικών μορίων των EOs και έτσι, μετά τη συμπύκνωση, τα EOs μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από το νερό με απλή απόχυση.

Η υδροαπόσταξη με σύστημα Clevenger συνιστάται από την Τρίτη Έκδοση της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας για τον προσδιορισμό των αποδόσεων EOs. Επιτρέπει την ανακύκλωση των συμπυκνωμάτων μέσω του συστήματος cohobage. Αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για την εκχύλιση πετάλων και λουλουδιών (δηλαδή πετάλων τριαντάφυλλου) καθώς αποφεύγει τη συμπίεση και τη συσσώρευση φυτικού υλικού κατά την εκχύλιση.^[23]

1.1.4.1.2 Εκχύλιση με υδρατμό

Είναι μια από τις επίσημες μεθόδους για την απόκτηση EO. Είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την εκχύλιση EOs. Βασίζεται στην ίδια αρχή με

την υδροαπόσταξη με τη διαφορά ότι δεν υπάρχει άμεση επαφή φυτού και νερού. Η διάρκεια της εκχύλισης μειώνεται με αποτέλεσμα να μειώνονται οι χημικές αλλοιώσεις.^[23]



Εικόνα 11: Διαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου απόσταξης με ατμό.^[5]

Υπάρχουν οι εξής παραλλαγές:

1) Υδροαπόσταξη ατμού

Η εκχύλιση πραγματοποιείται εντός του αποσταλακτηρίου εκτός από το ότι υπάρχει ένα σύστημα διάτρητης πλάκας ή πλέγματος που διατηρεί το φυτό αιωρούμενο πάνω από τη βάση του νερού που περιέχει ακόμη νερό, το οποίο αποφεύγει την άμεση επαφή τους. Η εκχύλιση γίνεται με έγχυση υδρατμών που διασχίζουν τη φυτική ύλη από κάτω προς τα πάνω και μεταφέρουν τα πτητικά υλικά. Τα τεχνουργήματα ελαχιστοποιούνται. Ο χρόνος εκχύλισης μειώνεται καθώς και η απώλεια πολικών μορίων.^[23]

2) Απόσταξη ατμού

Αυτή η μέθοδος έχει τις ίδιες αρχές και πλεονεκτήματα με την υδροαπόσταξη με ατμό, αλλά η παραγωγή ατμών συμβαίνει εκτός του αποσταλακτηρίου της απόσταξης. Ο ατμός μπορεί στη συνέχεια να κορεσθεί ή να υπερθερμανθεί. Σε λίγο πάνω από την ατμοσφαιρική πίεση, ο ατμός εισάγεται στο κάτω μέρος του εξαγωγέα και επομένως διέρχεται από το φορτίο της πρώτης ύλης. Αυτή η τεχνική αποφεύγει ορισμένα τεχνουργήματα σε σύγκριση με την υδροαπόσταξη.^[23]

3) Υδροδιάχυση

Αυτή είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση απόσταξης ατμών όπου η ροή των ατμών εμφανίζεται προς τα κάτω. Ονομάζεται επίσης υδροδιάχυση και βαρύτητα.^[23]

1.1.4.1.3 Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη

Γνωστό και ως διαχωρισμός υγρού-υγρού, η αρχή του βασίζεται στη διαλυτότητα σε έναν οργανικό διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με το νερό. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται σε ευαίσθητα φυτά για την παραγωγή υψηλότερων ποσοτήτων ΕOs με χαμηλότερο κόστος. Η μέθοδος περιορίζεται από τη διαλυτότητα της ένωσης στον συγκεκριμένο διαλύτη που χρησιμοποιείται, τον μεγάλο χρόνο εκχύλισης, τη σχετικά υψηλή κατανάλωση διαλύτη και συχνά μη ικανοποιητική αναπαραγωγιμότητα και καθαρότητα.^[5]

1.1.4.1.4 Ψυχρή έκθλιψη

Η ψυχρή έκθλιψη είναι η παραδοσιακή μέθοδος εξαγωγής ΕOs από το ξύσμα εσπεριδοειδών. Κατά την εκχύλιση, οι σάκοι ελαίου σπάνε και απελευθερώνουν πτητικά έλαια που εντοπίζονται στο εξωτερικό μέρος του μεσοκαρπίου (έλαια σακουλών ή αδένες ελαίου). Αυτό το έλαιο αφαιρείται μηχανικά με ψυχρή πίεση δίνοντας ένα υδαρές γαλάκτωμα. Το έλαιο ανακτάται στη συνέχεια με φυγοκέντριση.^[23] Αυτή η διαδικασία διασφαλίζει ότι το έλαιο που προκύπτει είναι 100% καθαρό και διατηρεί όλες τις ιδιότητες του φυτού.^[5]

1.1.4.2 Καινοτόμες τεχνικές εκχύλισης αιθέριων ελαίων

Ένα από τα μειονεκτήματα των συμβατικών τεχνικών σχετίζεται με τη θερμική ευαισθησία των συστατικών των ΕOs να υφίστανται χημικές αλλοιώσεις (υδρόλυση, ισομερισμός, οξειδωση) λόγω των υψηλών εφαρμοζόμενων θερμοκρασιών. Η ποιότητα των εξαγόμενων ΕOs είναι επομένως εξαιρετικά υποβαθμισμένη, ιδιαίτερα εάν ο χρόνος εκχύλισης είναι μεγάλος. Είναι σημαντικό οι μέθοδοι εκχύλισης να μπορούν να διατηρήσουν τη χημική σύνθεση και τη φυσική αναλογία των ΕOs στην αρχική τους κατάσταση. Οι νέες τεχνικές εκχύλισης πρέπει, επίσης, να μειώσουν τους χρόνους εκχύλισης, την κατανάλωση ενέργειας, τη χρήση διαλυτών και τις εκπομπές CO₂.^[23]

1.1.4.2.1 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (SFE)

Είναι μια διαδικασία διαχωρισμού ενός συστατικού (το εκχυλιστικό) από ένα άλλο (τη μήτρα) χρησιμοποιώντας υπερκρίσιμο υγρό ως διαλύτη εκχύλισης.^[5] Το διοξείδιο του άνθρακα είναι γενικά ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης για την εξαγωγή ΕOs λόγω των πολυάριθμων πλεονεκτημάτων του: κρίσιμο σημείο που επιτυγχάνεται εύκολα (χαμηλή κρίσιμη πίεση, P_c: 72,9 atm και θερμοκρασία, T_c: 31,2 °C), είναι μη επιθετικό για θερμοευαίσθητα μόρια της φυτικής ουσίας, είναι χημικά αδρανές και μη τοξικό, μη εύφλεκτο, διαθέσιμο σε υψηλή καθαρότητα με σχετικά χαμηλό κόστος, πραγματοποιείται εύκολη εξάλειψη των ιχνών του από το λαμβανόμενο εκχύλισμα με απλή κατάθλιψη και η πολικότητα του παρόμοια με του πεντανίου που το καθιστά κατάλληλο για εκχύλιση λιπόφιλων ενώσεων. Το SFE χρησιμοποιείται για την εκχύλιση αρκετών ΕOs. Η αρχή του βασίζεται στη χρήση και την ανακύκλωση του υγρού σε επαναλαμβανόμενα στάδια συμπίεσης/κατάθλιψης. Με υψηλή συμπίεση και θέρμανση, το CO₂ φτάνει στην υπερκρίσιμη κατάσταση. Διέρχεται από την πρώτη φυτική ύλη και φορτώνεται πτητική ύλη και φυτικά εκχυλίσματα. Αυτό

ακολουθείται από ένα βήμα κατάθλιψης: το εκχύλισμα δρομολογείται σε έναν ή περισσότερους διαχωριστές, όπου το CO₂ αποσυμπιέζεται σταδιακά (χάνοντας έτσι την ισχύ του διαλύτη) για να διαχωριστεί το λαμβανόμενο εκχύλισμα από το ρευστό. Το τελευταίο θα μπορούσε να μετατραπεί σε απελευθερωμένο αέριο και στη συνέχεια θα μπορούσε να ανακυκλωθεί. Η χρήση αυτής της τεχνικής για την εξαγωγή ΕOs έχει αυξηθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Τα υπερκρίσιμα εκχυλίσματα αποδείχθηκαν ανώτερης ποιότητας, με καλύτερες λειτουργικές και βιολογικές δράσεις σε σύγκριση με εκχυλίσματα που παράγονται με υδροαπόσταξη ή με υγρούς διαλύτες. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες έδειξαν καλύτερες αντιβακτηριδιακές και αντιμυκητιασικές ιδιότητες για το εν λόγω προϊόν.^[23]

1.1.4.2.2 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (SFE) υποβοηθούμενη από ψυχρή πίεση (SFEAP)

Το SFEAP είναι μια νέα τεχνική εκχύλισης που αναπτύχθηκε πρόσφατα από τον Johner και τους συνεργάτες του. Ενσωμάτωσε τόσο τη μέθοδο εκχύλισης με ψυχρή έκθλιψη όσο και την τεχνική SFE. Εδώ, η στερεή πρώτη ύλη φορτώνεται μέσα στο δοχείο εκχύλισης και παρέχεται ψυχρή πίεση με τη συστολή ενός εμβόλου υπό πίεση με την πρώτη ύλη.^[5]

1.1.4.2.3 Υποκρίσιμα υγρά εκχύλισης

Ορισμένες ερευνητικές εργασίες υπέδειξαν τη χρήση του νερού στην υποκρίσιμη κατάσταση του για την εξαγωγή ΕOs. Η υποκρίσιμη κατάσταση επιτυγχάνεται όταν η πίεση είναι υψηλότερη από την κρίσιμη πίεση (P_c) αλλά η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από την κρίσιμη θερμοκρασία (T_c), ή αντίστροφα. Σε αυτή την κατάσταση, το νερό και το CO₂ είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα υγρά για την εξαγωγή ΕOs. Τα εν λόγω ρευστά έχουν πολύ ενδιαφέρουσες ιδιότητες: χαμηλό ιξώδες, πυκνότητα κοντά σε αυτή των υγρών και διαχυτικότητα μεταξύ αυτής του αερίου και των υγρών. Οι Soto Ayala και Luque de Castro (2001) καθώς και Ronio et al., (1999) έχουν αναφέρει ότι η εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό (SWE) των ΕOs είναι μια ισχυρή εναλλακτική λύση, επειδή επιτρέπει την ταχεία εξαγωγή και τη χρήση χαμηλών θερμοκρασιών εργασίας. Αυτό αποφεύγει την απώλεια και την αποικοδόμηση πτητικών και θερμοευαίσθητων ενώσεων. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης είναι ο μικρότερος χρόνος εκχύλισης, η υψηλότερη ποιότητα του εκχυλίσματος, το χαμηλότερο κόστος του παράγοντα εκχύλισης, το γεγονός ότι είναι μια περιβαλλοντικά συμβατή τεχνική και η χαμηλή κατανάλωση διαλύτη. Η τεχνική χαρακτηρίζεται για την μεγάλη της αποτελεσματικότητα και ποιότητα ΕOs.^[6]

1.1.4.2.4 Εκχύλιση αιθερίου ελαίου υποβοηθούμενη με υπερήχους (HAE)

Αυτή η τεχνική αναπτύχθηκε το 1950 σε εξοπλισμό εργαστηριακής κλίμακας. Ο υπέρηχος επιτρέπει την εντατικοποίηση και την εκλεκτική εκχύλιση των ΕOs επιταχύνοντας την απελευθέρωσή τους από το φυτικό υλικό όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές (υδροαπόσταξη και εκχύλιση με διαλύτη). Η φυτική πρώτη ύλη βυθίζεται σε νερό ή διαλύτη και ταυτόχρονα

υποβάλλεται στη δράση υπερήχων. Αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση πολλών ΕΟs ιδιαίτερα από σπόρους. Ωστόσο, έχει αναπτυχθεί ειδικά για την εκχύλιση ορισμένων μορίων θεραπευτικού ενδιαφέροντος. Τα χρησιμοποιούμενα υπερηχητικά κύματα έχουν συχνότητα 20 kHz – 1 ΜΗ. Αυτό προκαλεί μηχανική δόνηση των τοιχωμάτων και των μεμβρανών του φυτικού εκχυλίσματος προκαλώντας ταχεία απελευθέρωση σταγονιδίων ΕΟs. Ο μηχανισμός εκχύλισης περιλαμβάνει δύο τύπους φαινομένων: διάχυση μέσα στα κυτταρικά τοιχώματα και έκπλυση του περιεχομένου των κυττάρων μόλις σπάσουν τα τοιχώματα.^[23] Έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση πολλών ΕΟs ειδικά από άνθη, φύλλα ή σπόρους. Ως γνωστά μειονεκτήματα, απαιτεί στάδια διήθησης και εμφανίζεται πιθανή αποικοδόμηση των ενώσεων σε υψηλές συχνότητες.^[5]

Σε σύγκριση με στις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης, η ΗΑΕ βελτιώνει την απόδοση και το ρυθμό εκχύλισης, μειώνει τη θερμοκρασία εκχύλισης και αυξάνει τα εύρη επιλογής των διαλυτών. Ο εξοπλισμός είναι σχετικά απλός και φθηνός σε σύγκριση με τις τεχνικές όπως η SFE ή η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (ΜΑΕ). Επιπλέον, η ΗΑΕ είναι ευεργετική για βοτανικά υλικά που είναι ευαίσθητα στη θερμοκρασία. Τα άλλα πλεονεκτήματα του υπερήχου είναι η εντατικοποίηση της μεταφοράς μάζας, η διάσπαση των κυττάρων και η βελτίωση της διείσδυσης του διαλύτη.^[23]

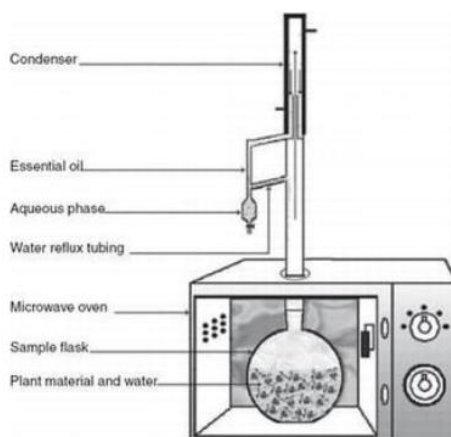
1.1.4.2.5 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (ΜΑΕ)

Η εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (ΜΑΕ) είναι μια διαδικασία χρήσης της ενέργειας μικροκυμάτων για τη θέρμανση του διαλύτη σε επαφή με ένα δείγμα προκειμένου να κατανεμηθούν οι αναλυόμενες ουσίες από το δείγμα στον διαλύτη. Η ικανότητα ταχείας θέρμανσης του μίγματος διαλυτών δείγματος είναι εγγενής στη ΜΑΕ και είναι το κύριο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής. Είναι μια πρόσφατη πράσινη τεχνολογία που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκχύλιση διαφόρων ΕΟs από φυτά. Έχει καθιερωθεί ως εναλλακτική μέθοδος έναντι της συμβατικής θέρμανσης επειδή επιτρέπει κέρδος χρόνου, όγκου χρησιμοποιούμενου διαλύτη και ποσότητας βιομάζας που απαιτείται ενώ αυξάνει την απόδοση εκχύλισης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι ανακτήσεις των αναλυτών και η αναπαραγωγικότητα βελτιώνονται σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές.^[5]

Ξεκινώντας από την απόσταξη μικροκυμάτων με πεπιεσμένο αέρα (CAMD) και την υδροαπόσταξη μικροκυμάτων κενού (VMHD), η καινοτομία στην υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (ΜΑΕ) οδήγησε στην ανάπτυξη ενός μεγάλου αριθμού παραλλαγών όπως η υδροαπόσταξη με τη βοήθεια μικροκυμάτων, εκχύλιση μικροκυμάτων χωρίς διαλύτη (SFME), απόσταξη ατμού με επιτάχυνση μικροκυμάτων (MASD), μικροκυματική υδροδιάχυση και βαρύτητα (MHG) και φορητή εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (PMAE).^[23] Διακρίνονται οι εξής παραλλαγές:

- 1) Υδροαπόσταξη με τη βοήθεια μικροκυμάτων

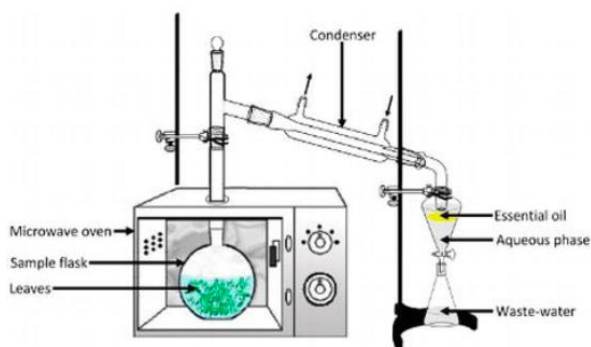
Η αρχή της υποβοηθούμενης από μικροκύματα υδροαπόσταξης (MAHD) βασίζεται στην άμεση πρόσκρουσή της με πολικά υλικά/διαλύτες και διέπεται από δύο φαινόμενα: την ιοντική αγωγιμότητα και την περιστροφή του διπόλου, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις συμβαίνει ταυτόχρονα. Το MAHD έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τόσο τον χρόνο εκχύλισης όσο και τον όγκο του απαιτούμενου διαλύτη, ελαχιστοποιώντας τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις εκπέμποντας λιγότερο CO₂ στην ατμόσφαιρα. Στις πρόσφατα αναφερόμενες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει με επιτυχία έναν φούρνο μικροκυμάτων για την εκχύλιση πτητικών ενεργών συστατικών από φυτά. Έχει θεωρηθεί ως μια σημαντική εναλλακτική στις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης λόγω των πλεονεκτημάτων της που είναι κυρίως η μείωση του χρόνου εκχύλισης και των διαλυτών, η αύξηση της εκλεκτικότητας και η ελεγχόμενη διαδικασία θέρμανσης.^[5]



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής MAHD.^[5]

2) Εκχύλιση μικροκυμάτων χωρίς διαλύτες (SFME)

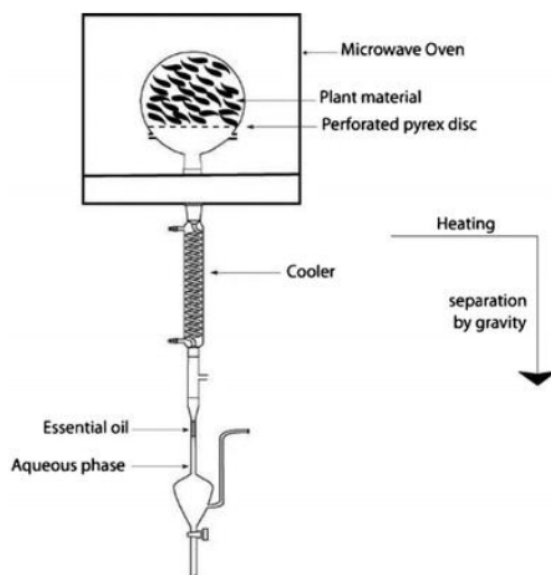
Με βάση τον συνδυασμό της ενέργειας θέρμανσης μικροκυμάτων και της ξηρής απόσταξης, συνίσταται η ξηρή απόσταξη μικροκυμάτων σε ατμοσφαιρική πίεση ενός φρέσκου φυτού χωρίς προσθήκη νερού ή οποιουδήποτε οργανικού διαλύτη. Η επιλεκτική θέρμανση της *in situ* περιεκτικότητας σε νερό του φυτικού υλικού προκαλεί τη διόγκωση των ιστών και την έκρηξη των αδένων και των ελαιοφόρων δοχείων. Αυτή η διαδικασία απελευθερώνει έτσι τα ΕOs, τα οποία εξατμίζονται αυθόρμητα με αζεοτροπική απόσταξη με το νερό που υπάρχει στο φυτικό υλικό.^[6]



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση χωρίς διαλύτη συσκευής εκχύλισης μικροκυμάτων.^[5]

3) Υδροδιάχυση μικροκυμάτων και βαρύτητα (MHG)

Η MHG σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Chemat και τους συνεργάτες του. Ο Vian et al. (2008) ανέπτυξε έναν συνδυασμό θέρμανσης με μικροκύματα αντίστροφου αποσταλακτηρίου και γήινης βαρύτητας σε ατμοσφαιρική πίεση. Το φυτικό υλικό τοποθετείται σε ανεστραμμένο αντιδραστήρα μικροκυμάτων χωρίς προσθήκη διαλύτη ή νερού. Η εσωτερική θέρμανση του νερού του φυτικού διαστέλλει τα φυτικά κύτταρα και οδηγεί σε ρήξη αδένων και ελαιοφόρων δοχείων (με θερμαντική δράση μικροκυμάτων) και έτσι απελευθερώνει EOs και φυτικό νερό έξω από το φυτικό υλικό. Υπό τη βαρύτητα, τα εκχυλίσματα οδηγούνται από πάνω προς τα κάτω, έξω από τον αντιδραστήρα μικροκυμάτων, στο σύστημα ψύξης. Η υδροδιάχυση μικροκυμάτων και η βαρύτητα (MHG) έχουν αναφερθεί από τους Chemat και Lucchesi ως αποτελεσματική, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση. Σχεδιάστηκε για την εξαγωγή πτητικών ενώσεων από φρέσκα φυτικά υλικά με τουλάχιστον 60% αρχική υγρασία.^[23]



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της μικροκυματικής υδροδιάχυσης και βαρύτητας.^[5]

4) Απόσταξη ατμού μικροκυμάτων (MSD) και διάχυση ατμού μικροκυμάτων (MSDf)

Η MSD έχει διερευνηθεί από τους Sahraoui et al. (2008) και Naima Sahraoui (2011) για την εκχύλιση EOs φλοιού πορτοκαλιού και ξηρού άνθους λεβάντας. Σε σύγκριση με τη συμβατική απόσταξη με ατμό, αυτή η καινοτόμος μέθοδος αποδεικνύεται πιο αποτελεσματική προσφέροντας σημαντικά πλεονεκτήματα όπως πολύ μικρότερο χρόνο εκχύλισης και καθαρότερα χαρακτηριστικά. Παρέχει, επίσης, στα EOs καλύτερες αισθητηριακές ιδιότητες (καλύτερη αναπαραγωγή του φυσικού αρώματος φρέσκων φρούτων του αιθέριου ελαίου εσπεριδοειδών) χωρίς να προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση του πτητικού ελαίου.

Η διάχυση ατμού μικροκυμάτων (MSDF) διερευνήθηκε για την εξαγωγή των ΕOs πολλών φυτών στις το *Lavender* (Farhat et al., 2009) και η φλούδα πορτοκαλιού (Asma Farhat, 2011). Βασίζεται στην ίδια αρχή όπως και το MSD εκτός από το ότι οι ατμοί ρέουν μέσω του φυτικού υλικού προς τα κάτω. Σε σύγκριση με τις μεθόδους εκχύλισης *Lavandin EO* (Périno-Issartier et al., 2013) αυτή η μέθοδος αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική όσον αφορά την κινητική εξαγωγής, την εξοικονόμηση ενέργειας και την καθαριότητα, την ποιότητα των εκχυλισμάτων και τη μείωση των λυμάτων.^[23]

1.1.4.2.6 Στιγμαία ελεγχόμενη πτώση πίεσης (DIC)

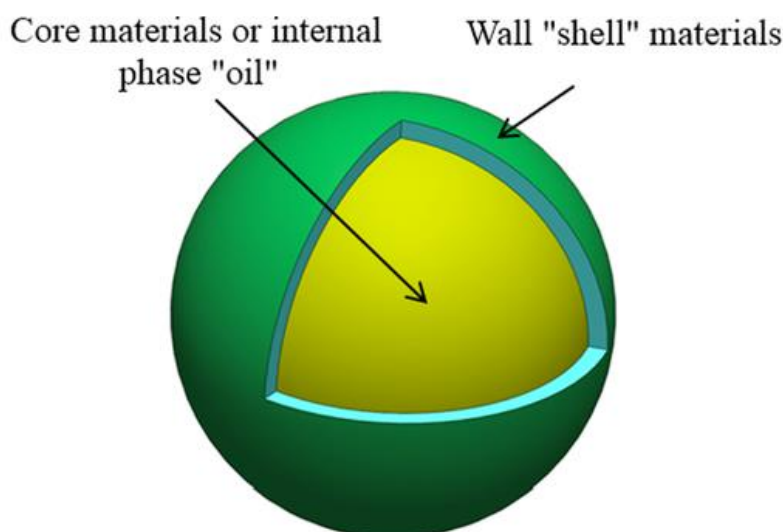
Αυτή η μέθοδος διερευνήθηκε ιδιαίτερα από τον K. Allaf και τους συνεργάτες του για την εκχύλιση ΕOs καθώς και ΕOs και αντιοξειδωτικών από μήτρες λαχανικών. Αυτό δοκιμάστηκε σε εργαστηριακή συσκευή καθώς και σε πιλοτική μονάδα. Σε σύγκριση με τη συμβατική υδροαπόσταξη, το DIC δίνει, για το αιθέριο έλαιο *Lavandin*, βελτίωση στις απόδοσης εκχύλισης (4,25 έναντι 2,30 g/100 g πρώτης ύλης), μείωση του χρόνου εκχύλισης (480 s έναντι 4 h για HD) και κατά συνέπεια μεγάλη μείωση κατανάλωσης ενέργειας και νερού (662 kWh/t και 42 kg νερό/τόνο πρώτης ύλης). Το DIC χαρακτηρίζεται κυρίως από απότομη πτώση στις πίεσης στο κενό, μετά από επεξεργασία τύπου HTST (υψηλή θερμοκρασία/υψηλή πίεση – βραχυπρόθεσμη). Τα φαινόμενα της απότομης αυτόματης εξάτμισης επιτρέπουν την εξάτμιση μεγαλύτερης ποσότητας πτητικών μορίων (σε σύγκριση με την προοδευτική αυτόματη εξάτμιση) και της πολύ γρήγορης επίτευξης χαμηλότερου επιπέδου θερμοκρασίας. Η επεξεργασία DIC αποτελείται γενικά από τέσσερα στάδια: (1) θέση υπό αρχικό κενό, (2) εφαρμογή ατμόλουτρου, υπό καθορισμένη πίεση και θερμοκρασία, (3) στιγμιαία εκτόνωση στο κενό και (4) επεξεργασία των κυττάρων σε ατμοσφαιρική πίεση. Ο αντιδραστήρας (δοχείο επεξεργασίας 7 L με χιτώνιο θέρμανσης) υφίσταται θερμική επεξεργασία με χρήση κορεσμένου ατμού με πίεση που ποικίλλει από 5 kPa έως 1 Mpa. Μια πνευματική βαλβίδα εξασφαλίζει μια «άμεση» σύνδεση μεταξύ της δεξαμενής κενού (διατηρείται στα 5 kPa) και του δοχείου επεξεργασίας. Τα ΕOs ανακτώνται ως σταθερά έλαια σε γαλάκτωμα νερού. Στη συνέχεια, η φυτική πρώτη ύλη θα μπορούσε να ανακτηθεί και να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να αποθηκευτεί για τις εκχυλίσεις.^[23]

1.2 Εγκλεισμός

1.2.1 Εισαγωγικά στοιχεία

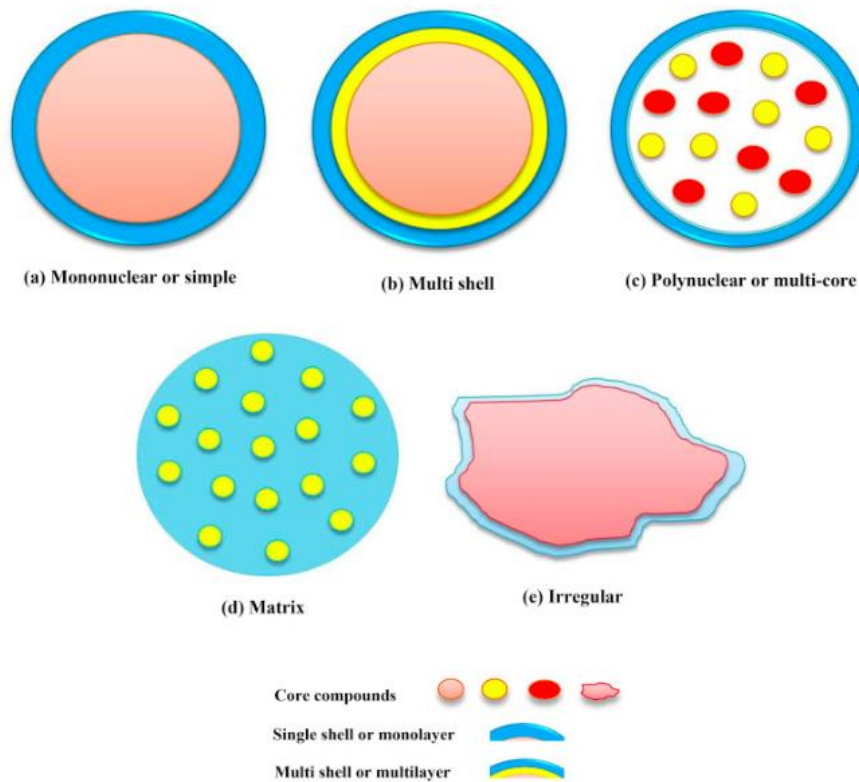
Ο εγκλεισμός είναι μια κοινή τεχνική για τη δημιουργία μιας εξωτερικής μεμβράνης ή επικάλυψης ενός υλικού πάνω σε άλλο υλικό, ο οποίος εφαρμόζεται για την προστασία ή/και τη διατήρηση βιοδραστικών, πτητικών και εύκολα αποικοδομήσιμων ενώσεων από βιοχημική και θερμική φθορά. Χρησιμοποιείται, επίσης, για την κάλυψη ανεπιθύμητων γεύσεων και αρωμάτων. Ο εγκλεισμός αναπτύχθηκε για πρώτη φορά πριν από περίπου 60 χρόνια ως τεχνολογία για την επικάλυψη στερεών, υγρών και αέριων ενώσεων. Η επικάλυψη επιτρέπει την ελεγχόμενη απελευθέρωση των ενώσεων με συγκεκριμένο ρυθμό υπό ορισμένες συνθήκες. Τα εγκλεισμένα υλικά μπορεί να είναι καθαρές ουσίες ή μείγμα, τα οποία ονομάζονται επίσης επικαλυμμένο υλικό, υλικό πυρήνα, δραστικά,

πλήρωση, εσωτερική φάση ή ωφέλιμο φορτίο. Από την άλλη πλευρά, τα υλικά επικάλυψης είναι γνωστά ως υλικό συσκευασίας, κάψουλα, υλικό τοίχου, φιλμ, μεμβράνη, φορέας ή εξωτερικό κέλυφος. Τα υλικά επικάλυψης κατασκευάζονται συνήθως από φυσικούς ή τροποποιημένους πολυσακχαρίτες, κόμμεα, πρωτεΐνες, λιπίδια και συνθετικά πολυμερή. Η επιλογή του υλικού επίστρωσης εξαρτάται από τη φύση του υλικού πυρήνα, τη διαδικασία εγκλεισμού και την τελική χρήση του προϊόντος.^[24]



Εικόνα 15: Σύνθεση μικροκάψουλας ελαίου σε απλοποιημένη μορφή.^[25]

Η μορφολογία στις προκύπτουσες μικροκάψουλας εξαρτάται από τη διάταξη του υλικού πυρήνα και τη διαδικασία εναπόθεσης του υλικού επικάλυψης, η οποία μπορεί να χωριστεί σε μονοπύρηνα, πολυπύρηνα και μήτρα. Οι μονοπυρηνικές κάψουλες περιέχουν ένα εξωτερικό κέλυφος γύρω από τον πυρήνα, ενώ οι πολυπυρηνικές κάψουλες έχουν πολλούς πυρήνες που είναι παγιδευμένοι σε ένα κέλυφος και οι κάψουλες μήτρας έχουν το υλικό του πυρήνα ομοιόμορφα κατανεμημένο μέσα στο υλικό του κελύφους. Επιπλέον, είναι δυνατό να έχουμε μια πολυπυρηνική κάψουλα με πολλά κελύφη ή μια κάψουλα με μη σφαιρικό, ακανόνιστο σχήμα. Η Εικόνα 16 παρουσιάζει διαφορετικές μορφές καψουλών.



Εικόνα 16: Διάφορες μορφές καψουλών: (α) Μονοπύρηνες ή απλές, (β) Πολυκέλυφος, (γ) Πολυπύρηνες ή πολυπύρηνες, (δ) Μητρικές, (ε) Ακανόνιστες.^[24]

Οι νανοκάψουλες και οι μικροκάψουλες είναι το πιο λειτουργικό και επιθυμητό μέγεθος στην επεξεργασία εγκλεισμού. Παρόλο που, η νανοκλίμακα και η μικροκλίμακα αναφέρονται σε 1–1000 nm και 1–1000 μm αντίστοιχα, ο νανο-εγκλεισμός κυμαίνεται από το μέγεθος της κάψουλας από 1 nm έως αρκετές εκατοντάδες νανόμετρα σε διάμετρο και ο μικρο-εγκλεισμός κυμαίνεται από 1 μm έως αρκετές εκατοντάδες μικρόμετρα σε διάμετρο. Επιπλέον, το μέγεθος των σωματιδίων μεταξύ του εύρους νανο- και μικρο-εγκλεισμού ονομάζεται σωματίδια υπομικρών, ενώ το μέγεθος σωματιδίων πάνω από το εύρος μικρο-εγκλεισμού αναφέρεται ως μακροσωματίδια.^[24]

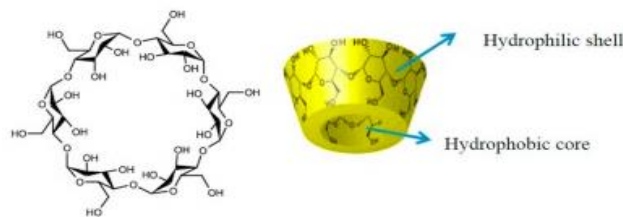
Το ποσοστό παγίδευσης του υλικού πυρήνα μέσα σε μια κάψουλα σε σύγκριση με το αρχικό περιεχόμενο πυρήνα που προστέθηκε σε ένα σύστημα εγκλεισμού είναι η λεγόμενη απόδοση εγκλεισμού.^[26]

Ο εγκλεισμός των ΕOs εμποδίζει την οξειδωτική φθορά και την απώλεια πτητικών ενώσεων, προκειμένου να διατηρηθούν οι βιολογικές τους δραστηριότητες (π.χ. αντιβακτηριδιακές, αντιικές, αντιμυκητιασικές, αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιπρωτοζωικές και εντομοαπωθητικές) και οι συνθέσεις τους μετά από έκθεση στο φως, την υγρασία, το οξυγόνο και την υψηλή θερμοκρασία ενώ συμβάλλει στον ευκολότερο χειρισμό και την βιομηχανική επεξεργασία.^[27]

1.2.2 Φορείς εγκλεισμού

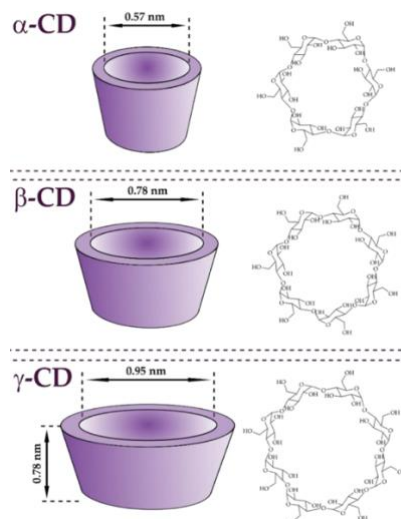
1.2.2.1 Κυκλοδεξτρίνη

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι παράγωγα σε σχήμα τόρου καταλυτικά χωνευμένου αμύλου που αποτελούνται από 6, 7 ή 8 (α, β και γ κυκλοδεξτρίνες, αντίστοιχα) μονάδες γλυκόζης που συνδέονται μέσω α (1-4) γλυκοσιδικών δεσμών.^[28] Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αυτές οι ενώσεις, οι κυκλοδεξτρίνες (α-, β- και γ- CD), «γενικά αναγνωρίζονται ως ασφαλείς» (GRAS) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA, ΗΠΑ).^[29]



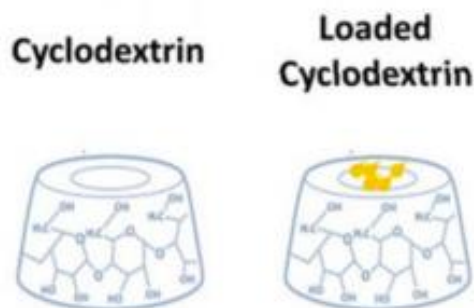
Εικόνα 17: Δομή α - κυκλοδεξτρίνης.^[30]

Είναι μη τοξικά, βιοδιασπώμενα και οικονομικά αποδοτικά μόρια με εσωτερική λιπόφιλη κοιλότητα (που σχηματίζεται από δακτύλιο πυρανόζης) και εξωτερική υδρόφιλη επιφάνεια (που σχηματίζεται από ομάδες 1° και 2° -OH από μονάδες γλυκόζης). Αυτή η διαμόρφωση επιτρέπει στις κυκλοδεξτρίνες να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού με τα κακώς υδατοδιαλυτά μόρια, όπως τα EOs, και τα βιοενεργά συστατικά τους στην κεντρική κοιλότητα.^[28] Η πρωτογενής και δευτερογενής υδροξυλομάδα τοποθετούνται στο στενό και στο ευρύτερο χείλος, αντίστοιχα. Υπό αυτή την έννοια και όπως αναφέρουν οι Przybyla, Yilmaz και Remzi Becer (2020), τα πρωτογενή υδροξύλια μπορούν να περιστρέφονται και να μειώνουν τη διάμετρο στις κυκλοδεξτρίνες ενώ τα δευτερεύοντα υδροξύλια σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου και παρέχουν ακαμψία στην κυκλοδεξτρίνη. Λόγω αυτής της ιδιαίτερης δομής, οι CDs μπορούν να εγκλείσουν μόρια οδηγώντας στη δημιουργία συμπλεγμάτων εγκλεισμού. Όπως αναφέρθηκε από τους Cheirslip και Rakmai (2016), η συμπλοκοποίηση υδρόφοβων ενώσεων συμβαίνει κυρίως με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τοιχωμάτων της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης και των εγκλεισμένων μορίων. Επιπλέον, άλλες δυνάμεις, όπως οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και οι van der Waals, μπορούν να εμπλέκονται στη δέσμευση μορίων. Οι CDs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενσωμάτωση μη πολικών μορίων με κατάλληλη διάσταση στην κοιλότητα αυξάνοντας την υδατοδιαλυτότητά τους. Σύμφωνα με τους Liu, Zhang και Tian (2020a), αυτό το χαρακτηριστικό εγκλεισμού είναι πολύ χρήσιμο για χρήση σε διάφορες βιομηχανίες όπως η ιατρική ή η αγροχημεία, μεταξύ άλλων.^[29]



Εικόνα 18: Διαστάσεις α -CD, β -CD και γ -CD..^[29]

Τα συμπλέγματα ΕOs/βιοδραστικών συστατικών με κυκλοδεξτρίνες μπορούν: α) να βελτιώσουν την υδατική διαλυτότητα, τη βιοδιαθεσιμότητα και τη σταθερότητά τους, β) να βοηθήσουν στην προστασία τους από παράγοντες στρες και γ) να επιτρέψουν την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους και ως εκ τούτου να καλύπτουν την ανεπιθύμητη γεύση κατά την εφαρμογή των τροφίμων. Περαιτέρω, οι κυκλοδεξτρίνες είναι αδρανείς, και επομένως, δεν εμποδίζουν τα πραγματικά χαρακτηριστικά των ΕOs/βιοδραστικών συστατικών.^[28]



Εικόνα 19: Δομή κυκλοδεξτρίνης για ενθυλάκωση βιοδραστικού ελαίου.^[27]

Ακόμη, οι κυκλοδεξτρίνες αποτελούν κατάλληλο φορέα για ελεγχόμενη απελευθέρωση και ο νανο-εγκλεισμός τους μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε στερεά όσο και σε υγρή κατάσταση. Εκτός από τα πολλά πλεονεκτήματα, ένας σημαντικός περιορισμός στη χρήση φυσικών κυκλοδεξτρινών είναι η περιορισμένη υδατοδιαλυτότητά τους, που προσδίδει τοξικότητα διότι καθιστά δυνατή την απορρόφησή τους από την βιολογική μεμβράνη. Η σημαντική αύξηση της υδατοδιαλυτότητας μπορεί να επιτευχθεί μέσω στίς αντικατάστασης του ατόμου H από την ομάδα -OH σε φυσικές κυκλοδεξτρίνες. Αυτή η αυξημένη υδατική διαλυτότητα τα συγκρατεί εξωκυτταρικά και εμποδίζει την απορρόφησή τους μέσω της μεμβράνης, καθιστώντας τα έτσι μη τοξικά. Με βάση τις αξιολογήσεις ασφάλειας, οι κυκλοδεξτρίνες έχουν ήδη λάβει το καθεστώς «GRAS»

από το US-FDA, επιτρέποντας τη χρησιμοποίησή τους στη βιομηχανία τροφίμων.^[28]

Οι ιδιότητες των φυσικών κυκλοδεξτρινών μπορούν να βελτιωθούν μέσω της σύνθεσης παραγώγων για αύξηση στις διαλυτότητας στο νερό, αύξηση της ικανότητας εγκλεισμού ή παρουσία λιγότερης τοξικότητας. Αυτό συμβαίνει σε μια εποχή που οι εγγενείς CDs δεν είναι κατάλληλες για την εκτέλεση μιας συγκεκριμένης εφαρμογής και τα παράγωγά τους πρέπει να τεθούν σε εφαρμογή. Όπως αναφέρθηκε από τον Crini (2014), διαφορετικά παράγωγα CDs περιγράφηκαν από τη δεκαετία του '80 του περασμένου αιώνα, ωστόσο, πολλά από αυτά τα παράγωγα δεν μπόρεσαν ποτέ να έχουν πρακτική εφαρμογή, πολλές φορές λόγω του κόστους παραγωγής ή λόγω της μακροχρόνιας και δύσκολης σύνθεσης.

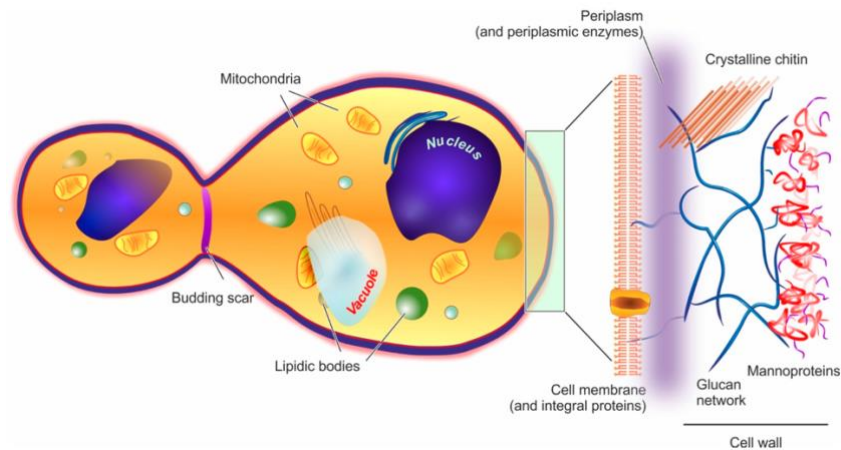
Σύμφωνα με τον Řezanka (2019), ο αριθμός των παραγώγων κυκλοδεξτρίνης είναι πολύ μεγάλος, στην πραγματικότητα, μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον συγγραφέα αποκάλυψε ότι υπάρχουν περισσότερα από έντεκα χιλιάδες παράγωγα α-, β- και γ- CD. Επί του παρόντος, οι CDs μπορούν να προσαρμοστούν για να βελτιώσουν τις ιδιότητές τους, όπως, για παράδειγμα, οι β-CDs τύπου σουλφοβουτυλαιθέρα, υδροξυπροπυλο- και καρβοξυ- μεθυλίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποκτήσουν καλύτερες ιδιότητες των συμπλεγμάτων CD-δραστικής ουσίας (σταθερότητα, διαλυτότητα και φυσικές ιδιότητες). Διαφορετικές ερευνητικές εργασίες, όπου χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα CDs, μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία. Επιπλέον, σύμφωνα με τον Arserim-Uçar (2020), διαφορετικά νανοσυστήματα μπορούν να περιέχουν νανοκυκλοδεξτρίνες για να βελτιώσουν διαφορετικές ιδιότητες όπως διαλυτότητα ή σταθεροποίηση μεταξύ άλλων.

Από την άλλη πλευρά, πρέπει να ληφθεί υπόψη, όπως ανέφεραν οι Das, Nath, Singh και Chattopadhyay (2020), ότι είναι επαρκώς αποδεδειγμένο ότι ανάλογα με το μέγεθος της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης, αυτές μπορούν να εγκλείσουν μόρια ποικίλων μεγεθών με διαφορετική στοιχειομετρία.^[29]

1.2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.2.2.1 Γενικά στοιχεία

Οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι μύκητες που έχουν χαρακτηριστικά υπερδομής παρόμοια με αυτή των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων. Δηλαδή, περιλαμβάνουν ένα κυτταρικό τοίχωμα, πυρήνα, μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), συσκευή Golgi, κενοτόπια, μικροσώματα και εκκριτικά κυστίδια μαζί με ένα σύνθετο εξωκυτταρικό και ενδοκυτταρικό δίκτυο μεμβράνης.^[31] Ο *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) είναι ένας μονοκύτταρος μύκητας, που διαθέτει πυρηνικό γονιδιωματικό DNA 12068 κιλοβάσεων (kb) οργανωμένο σε 16 χρωμοσώματα.^[32] Έχει γενικά ελλειψοειδές σχήμα με μεγάλη διάμετρο 5–10 μm και μικρότερη διάμετρο περίπου 5 μm.^[31]



Εικόνα 20: Στη δομή ενός κυττάρου ζυμομύκητα (εδώ αντιπροσωπεύεται σε κατάσταση μετά την εκβλάστηση), τα στοιχεία που δυνητικά λειτουργούν ως φραγμοί στην ενθυλάκωση (κυτταρικό τοίχωμα και κυτταρική μεμβράνη) απεικονίζονται με μεγεθυντικό τρόπο στη δεξιά πλευρά του σχήματος.^[33]

Αναπαράγεται με εκβλάστηση από ένα προϋπάρχον κύτταρο και παρουσιάζει τα κύρια συστατικά ενός τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από ένα ινώδες υλικό που εναποτίθεται σε ομόκεντρα στρώματα, καθιστώντας το μια σχετικά άκαμπτη αλλά δυναμική δομή. Παρέχει προστασία των κυττάρων, οσμωτική υποστήριξη και καθορίζει το σχήμα των κυττάρων, καθώς και συμμετέχει σε αρκετές σημαντικές διεργασίες, όπως η αναπαραγωγή, η κυτταρική σηματοδότηση και η προσκόλληση.^[34]

Τα μυκητιακά κυτταρικά τοιχώματα αποτελούνται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, συμπεριλαμβανομένης της γλυκάνης και της χιτίνης. Η σύσταση υπόκειται σε αλλαγές και διακυμάνσεις ανάλογα με τις συνθήκες και το στάδιο ανάπτυξης. Η χιτίνη έχει τεράστια αντοχή σε εφελκυσμό και παίζει σημαντικό ρόλο στη δομική ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Η γλυκάνη είναι ο πιο σημαντικός δομικός πολυσακχαρίτης του μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος, ο οποίος περίπου στο 50-60% του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος σχετίζεται με αυτή την ένωση. Τα συστατικά της γλυκοπρωτεΐνης είναι στενά ενσωματωμένα στους δομικούς πολυσακχαρίτες. Αυτές οι δομικές πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για ζωτικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η διατήρηση του σχήματος του κυττάρου, η προστασία του κυττάρου από ξένες ουσίες, η μετάδοση ενδοκυτταρικών σημάτων και επίσης η σύνθεση και η αναδιαμόρφωση των άλλων συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Πιστεύεται ότι το κυτταρικό τοίχωμα είναι κυρίως υδρόφιλο (στο εξωτερικό του) και έτσι περιορίζει τη διάχυση υδρόφοβων μορίων στα κύτταρα.

Το κύτταρο παρέχει επαρκή μηχανική αντοχή για να αντισταθεί στις αλλαγές της οσμωτικής πίεσης που προκαλούνται από το περιβάλλον. Αυτό το στρώμα στο μυκητιακό κύτταρο προστατεύει το σχήμα και την ακεραιότητα του κυττάρου απέναντι στο περιβαλλοντικό στρες. Η δομή επιτρέπει στα κύτταρα των μυκήτων να αλληλεπιδρούν με τα περιβάλλοντα μέσα τους.

Η εσωτερική κυτταρική μεμβράνη αποτελείται κυρίως από φωσφολιπίδια τα οποία είναι διατεταγμένα σε λιπιδικές διπλές στοιβάδες, εκτός από στις στερόλες και τις μεμβρανικές πρωτεΐνες.^[35]

Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος εξαρτάται από τον τύπο του μύκητα. Σε ζυμομύκητες όπως ο *S. cerevisiae*, αυτό οργανώνεται σε δύο στοιβάδες που αποτελούνται από τρία κύρια μακρομόρια: γλυκάνη, ένα πολυμερές β-1,3 και β-1,6 γλυκόζης, πρωτεΐνες μαννάνης, πολυμερή μαννόζης με δεσμούς α-1,2, α-1,3 και α-1,6, που συνδέονται ομοιοπολικά με πεπτίδια που σχηματίζουν γλυκοπεπτίδια και χιτίνη, ένα πολυμερές β-1,4-N-ακετυλογλυκοζαμίνης.

Ο *S. cerevisiae* είναι ένας πολύ γνωστός μύκητας, κυρίως λόγω της οικονομικής του σημασίας στους τομείς της ζάχαρης/αλκοόλ, της ζυθοποιίας και της αρτοποιίας. Είναι μια καλή πηγή πρωτεϊνών, βιταμινών Β, νουκλειικών οξέων και μετάλλων, συμπεριλαμβανομένης μιας βιολογικά ενεργής μορφής χρωμίου που είναι γνωστή ως παράγοντας ανοχής γλυκόζης. Αυτά τα συμπυκνώματα μπορούν να βρεθούν με τη μορφή σκόνης, νιφάδων ή δισκίων, τα οποία μπορούν να αναμειχθούν με στερεά ή υγρά τρόφιμα.^[34]

1.2.2.2.2 Ικανότητα εγκλεισμού δραστικών ουσιών

Το άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα και η εσωτερική κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων ζύμης είναι τα κύρια κυτταρικά μέρη που είναι υπεύθυνα για τις ιδιότητες εγκλεισμού τους.

Τα μηχανικά χαρακτηριστικά της δομής των κυττάρων ζυμομύκητα τα καθιστούν επιθυμητά για τη φόρτωση διαφορετικών μορίων. Το μηχανικά ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα οδηγεί στην πρόληψη της ρήξης του κυττάρου σε υψηλά ωφέλιμα φορτία. Η απλότητα των διαδικασιών είναι ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα του εγκλεισμού σε κύτταρα ζυμομύκητα. Επιπλέον, αυτές οι διαδικασίες δεν είναι δαπανηρές ή δεν χρειάζονται τοξικούς διαλύτες. Τα μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά προκαλούν παρατεταμένη και ελεγχόμενη απελευθέρωση του ενεργού υλικού.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα νεκρά κύτταρα του *S.cerevisiae* εμφανίζουν θετικές επιδράσεις στις καρκινικές κυτταρικές σειρές, χωρίς καμία αρνητική επίδραση. Οι πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης, ιδιαίτερα οι υδατοδιαλυτές β-1,3 και β-1,6 D-γλυκάνες, ασκούν σημαντικές αντιβακτηριακές, επουλωτικές, αντιοξειδωτικές, αντιμεταλλαξιογόνες και αντιγονοτοξικές δράσεις.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με μικρο-εγκλεισμό σε κύτταρα ζυμομύκητα η σταθερότητα των δραστικών συστατικών έχει βελτιωθεί σημαντικά. Ο κύριος λόγος για αυτό έγκειται στο ιδιαίτερα ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων του ζυμομύκητα. Το κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου ζυμομύκητα δείχνει το δικτυωτό δίκτυο των μαννοπρωτεϊνών και ινωδών β-1,3-γλυκανών, μαζί με τη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Αυτή η δομή μπορεί να προστατεύσει τις εγκλεισμένες ενώσεις από τις καταστροφικές επιδράσεις της υγρασίας, της θερμότητας, του φωτός και του οξυγόνου. Επιπλέον, η κάψουλα διπλού τοιχώματος

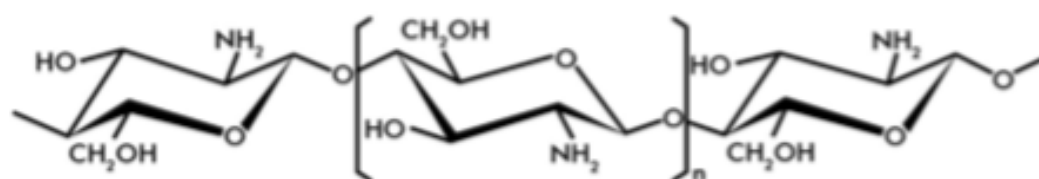
υδατανθράκων/μεμβράνης λιπιδίων προστατεύει τις πτητικές ενώσεις από την εξάτμιση, επομένως, παρέχει ένα εξαιρετικά σταθερό προϊόν με παρατεταμένη διάρκεια ζωής. Ο εγκλεισμός σε κύτταρα ζυμομύκητα μπορεί επίσης να μειώσει την οξειδωτική αποικοδόμηση ασταθών ενώσεων σε αυξημένη RH.

Μηχανιστικά, το κύριο εμπόδιο στη διείσδυση των υδρόφοβων ενώσεων είναι το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ως μια υδρόφιλη και διασταυρούμενη μεμβράνη. Το τοίχωμα έχει πάχος περίπου 100-200 nm, αποτελώντας το 15-25% στις ξηρής μάζας του κυττάρου.

Για επαρκή εγκλεισμό εμπλέκονται διάφορες παράμετροι, συμπεριλαμβανομένης της αναλογίας βάρους των καψουλών κυττάρων ζυμομύκητα, της σύνθεσης του μέσου καλλιέργειας, των συνθηκών προετοιμασίας και του τύπου του δραστικού συστατικού.^[35]

1.2.2.3 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη, CS, ως το δεύτερο πιο πολυάριθμο φυσικό βιοπολυμερές μετά την κυτταρίνη, είναι ένας γραμμικός πολυκατιονικός, βιοαποδομήσιμος, μη τοξικός και βιοσυμβατός πολυσακχαρίτης που απομονώνεται μέσω στις N-αποακετυλίωσης της χιτίνης που αποτελείται από συμπολυμερή αποακετυλιωμένων μονάδων D-γλυκοζαμίνης και ακετυλιωμένων μονάδων N-D-γλυκοζαμίνης που συνδέεται με β (1,4) γλυκοσιδικούς δεσμούς. Η χιτίνη απομονώνεται από την επιδερμίδα των τοιχωμάτων των μυκήτων, των εντόμων και των εξωσκελετών των θαλάσσιων αρθρόποδων. Κατά τη μετατροπή της χιτίνης σε χιτοζάνη, η αναλογία γλυκοζαμίνης/N-ακετυλ- γλυκοζαμίνης αυξάνεται, η οποία γενικά ορίζεται ως ο βαθμός αποακετυλίωσης. Επομένως, σε υψηλότερο ποσοστό N-ακετυλογλυκοζαμίνης, το βιοπολυμερές ονομάζεται χιτίνη και σε υψηλότερο βαθμό γλυκοζαμίνης, το βιοπολυμερές ονομάζεται χιτοζάνη.



Εικόνα 21: Δομή χιτοζάνης.^[36]

Επιπλέον, η μοναδική ιδιότητα της χιτοζάνης, λόγω των θετικών φορτίων στις αμινομάδες της, την καθιστά το μόνο εμπορικά διαθέσιμο υδατοδιαλυτό κατιονικό βιοπολυμερές. Η ύπαρξη της D-γλυκοζαμίνης στη δομή της χιτοζάνης προκαλεί την ευαισθησία της στο pH καθώς είναι διαλυτή σε αραιά οξέα ($\text{pH} < 6.0 - 6.5$), ωστόσο είναι αδιάλυτη σε ουδέτερα και αλκαλικά pH. Η πρωτονίωση των αμινομάδων με χρήση οξέων είναι ο λόγος για την ενίσχυση της διαλυτότητας που αυξάνει τον βαθμό ηλεκτροστατικής απώθησης και την πολικότητα κατά μήκος στις αλυσίδας της χιτοζάνης.

Δύο βασικά χαρακτηριστικά της χιτοζάνης, που υπαγορεύουν τη χρήση της για διάφορες εφαρμογές, που μπορούν σίγουρα να επηρεάσουν τα χαρακτηριστικά της είναι το ποσοστό αποακετυλίωσης (40%–98%) και το μοριακό βάρος (3,8–2000 kDa). Μερικές άλλες αποκλειστικές ιδιότητες της χιτοζάνης είναι η μεγάλη προσρόφηση και η βλεννοσυγκολλητική φύση, η ικανότητα σχηματισμού φιλμ, η αντιμυκητιασική δράση, η προώθηση μεταβολικών αλλαγών και η ανάπτυξη μικρο/νανο-σωματιδίων.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα προαναφερθέντα, η χιτοζάνη είναι κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στους τομείς των φαρμάκων, της ιατρικής, των καλλυντικών, του περιβάλλοντος, της γεωργίας και των τροφίμων.

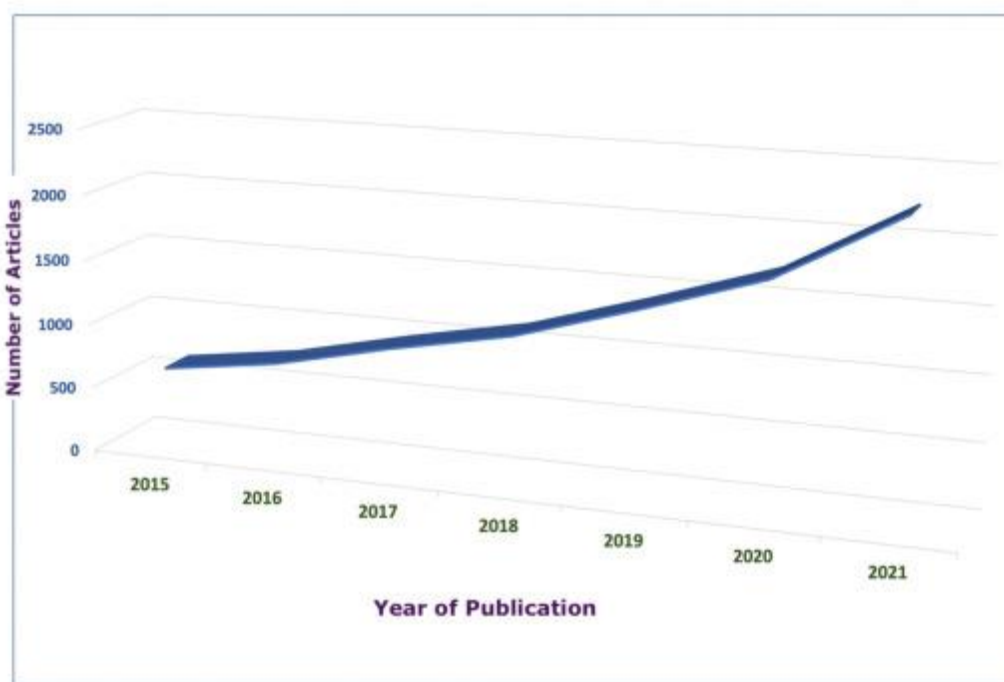
Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι τα κριτήρια για την κατάλληλη επιλογή μιας τεχνικής νανο-εγκλεισμού εξαρτώνται από ορισμένους παράγοντες, όπως η μεθοδολογία παράδοσης, η φυσική και χημική φύση των υλικών του πυρήνα και του κελύφους, το επιθυμητό μέγεθος σωματιδίων, ο μηχανισμός απελευθέρωσης και το κόστος διεργασίας. Οι νανοφορείς μπορούν να απελευθερώσουν το υλικό του πυρήνα με ελεγχόμενο τρόπο ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, το pH, η ηλεκτροστατική κατάσταση κ.λπ.

Οι νανοφορείς που βασίζονται σε πολυσακχαρίτες είναι η καλύτερη επιλογή για τις βιομηχανικές εφαρμογές, καθώς είναι βιοδιασπώμενοι, βιοσυμβατοί, σταθεροί έναντι αγχωτικών συνθηκών επεξεργασίας όπως οι θερμικές επεξεργασίες και διαθέτουν υψηλή δυνατότητα τροποποίησης για την απόκτηση των απαιτούμενων ιδιοτήτων. Οι πολυσακχαρίτες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ένα ευρύ φάσμα βιοδραστικών συστατικών μέσω των διαφόρων λειτουργικών τους ομάδων, γεγονός που τους καθιστά αποκλειστικούς φορείς για τη σύνδεση ή την παγίδευση διαφορετικών υδρόφιλων και υδρόφοβων συστατικών. Μεταξύ των φυσικών πολυσακχαριτών, η χιτοζάνη έχει διερευνηθεί ευρέως λόγω της βλεννοσυγκολλητικής της φύσης που προκαλεί αύξηση του ρυθμού απελευθέρωσης του εγκλεισμένου (βιοενεργού συστατικού) στο γαστρεντερικό σωλήνα και προάγει την αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, η ευαισθησία στις χιτοζάνης στο pH θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη καθώς διαλύεται εύκολα σε όξινες τιμές pH ($\text{pH} < 6.5$) αλλά δεν αποικοδομείται σε υψηλότερα εύρη pH.^[36]

Η χιτοζάνη μπορεί σίγουρα να χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικές βιομηχανίες, καθώς είναι βιοσυμβατή, βιοαποικοδομήσιμη και μη τοξική ένωση με πολλά βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως αντιμικροβιακά, γαλακτωματοποιητικά, διαιτητικά, χηλικά, αντιοξειδωτικά και κροκιδωτικά χαρακτηριστικά καθώς και πρεβιοτικές ιδιότητες. Επιπλέον, οι βιολογικές ιδιότητες αυτού του πολυμερούς έχουν οδηγήσει σε εύκολη χρήση, κυρίως για εφαρμογές τροφίμων και προϊόντων. Έχει αναφερθεί ότι η χιτοζάνη θεωρείται καλή υποψήφια για επίδεση τραυμάτων λόγω των αιμοστατικών της ιδιοτήτων. Λόγω της αντιβακτηριδιακής της ιδιότητας, η χιτοζάνη βοηθά στον περιορισμό του κινδύνου τοπικής μόλυνσης.

Στην τεχνολογία εγκλεισμού, η χιτοζάνη χρησιμοποιείται τόσο ως πολυμερές που σχηματίζει μήτρα για τον εγκλεισμό δραστικών συστατικών όσο και ως ουσία

επικάλυψης επιφανειών. Οι επικαλυμμένοι με χιτοζάνη νανοφορείς (CCN) είναι συνήθως πολυμερή νανοσωματίδια, κυρίως λιποσώματα και αλγινικά. Αυτά τα νανοσωματίδια πολλαπλών χρήσεων έχουν αναπτυχθεί για να φέρουν πολλές εφαρμογές. Τα CCN παρέχουν πολλά πλεονεκτήματα στις βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων (ιξώδες και υδατοδιαλυτότητα), βελτιωμένες ιδιότητες διείσδυσης στους ιστούς και βλεννοσυγκόλληση, παρατεταμένη απελευθέρωση θρεπτικών ουσιών και υψηλότερη αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση. Ως αποτέλεσμα των μοναδικών χαρακτήρων της χιτοζάνης, ιδιαίτερα για τον εγλεισμό βιοδραστικού παράγοντα, το ενδιαφέρον για τη χρήση της τεχνολογίας χιτοζάνης στην έρευνα και ανάπτυξη έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 22.^[37]



Εικόνα 22: Ερευνητικά άρθρα που δημοσιεύθηκαν για συστήματα χιτοζάνης ως φορέα.^[37]

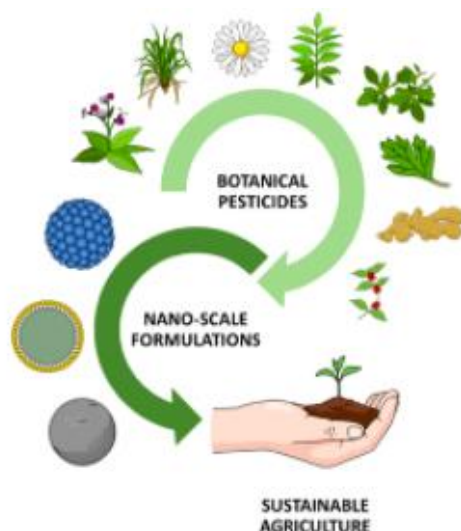
1.2.3 Εφαρμογές αιθέριων ελαίων ως παρασιτοκτόνα και εντομοκτόνα

Τα παράσιτα είναι ένα συχνό πρόβλημα που επηρεάζει τη γεωργία και τη βιομηχανία τροφίμων. Τα φυτά, τα ζώα, π.χ. έντομα ή μικροοργανισμοί, όπως μύκητες, ζυμομύκητες και βακτήρια είναι οι κύριοι οργανισμοί που επηρεάζουν αρνητικά τις καλλιέργειες και την τροφή. Τα παράσιτα μπορούν να έχουν σοβαρό αντίκτυπο στην οικονομία και στη διαθεσιμότητα τροφής. Ως αποτέλεσμα, τα συνθετικά φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται συχνά ως στρατηγική για την πρόληψη ή την ελαχιστοποίηση των επιπτώσεων των παρασίτων. Ωστόσο, τα περισσότερα συνθετικά φυτοφάρμακα είναι γνωστό ότι είναι τοξικά για τον άνθρωπο και τα ζώα και μπορεί να είναι επικίνδυνα για το περιβάλλον. Η επίδρασή τους μπορεί να είναι μακροχρόνια, αφού λόγω της χαμηλής βιοδιασπασιμότητάς τους μπορούν να στραγγίσουν στα εδάφη και να καταλήξουν στα υδατικά συστήματα. Επιπλέον, δεν αφαιρούνται όλα

αποτελεσματικά στους σταθμούς επεξεργασίας νερού, οδηγώντας σε πιθανή κατανάλωση από ανθρώπους και ζώα.

Τα βιοκτόνα έχουν τις ίδιες ιδιότητες με τα συνθετικά φυτοφάρμακα, αλλά είναι φυσικής προέλευσης, π.χ. φυτά, μύκητες και βακτήρια, και είναι είτε θανατηφόρα είτε απωθητικά για τα παράσιτα. Τα αιθέρια έλαια ως βιοκτόνα έχουν τα πρόσθετα πλεονεκτήματα της υψηλής εξειδίκευσης δράσης, παρουσιάζοντας κυρίως χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά και σε ορισμένες περιπτώσεις παράγονται ήδη σε μεγάλες ποσότητες και σε ανταγωνιστικές τιμές.^[38]

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση ουσιών φυσικής προέλευσης, όπως τα βοτανικά φυτοφάρμακα, έχει αναδειχθεί ως προτιμώμενη εναλλακτική λύση στη χρήση συνθετικών φυτοφαρμάκων, η υπερβολική χρήση των οποίων έχει εγείρει τις ανησυχίες για την ασφάλεια στην υγεία του ανθρώπου, των ζώων και του περιβάλλοντος. Οι πρόσφατες εξελίξεις στη νανοτεχνολογία έχουν ανοίξει μια νέα οδό για την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών σκευασμάτων που μπορούν να ξεπεράσουν πολλά από τα εμπόδια που αντιμετωπίζονται γενικά στη χρήση τους στον τομέα, στις απώλεια δραστηριότητας λόγω υποβάθμισης, αστάθειας, εξάτμισης κ.ά.^[39]



Εικόνα 23: Πράσινη τεχνολογία βοτανικών φυτοφαρμάκων σε συνδυασμό με την νανοτεχνολογία. ^[39]

Μελέτες σχετικά με την επιτυχημένη εφαρμογή της νανοτεχνολογίας σε συστήματα εγκλεισμού ως βιοκτόνα και την παρασιτοκτόνο ή/και εντομοκτόνο δράση τους

Ο Ahmadi et al. (2018) αξιολόγησε την ακαρεοκτόνο δράση νανοσωματιδίων χιτοζάνης που περιέχουν αιθέριο έλαιο *Achillea millefolium* κατά του *Tetranychus urticae*. Τα νανοσωματίδια παρουσίασαν σφαιρική μορφολογία και μέσες διαμέτρους μεταξύ 85 και 145 nm. Σε δοκιμές απωθητικότητας και τοξικότητας επαφής, τα νανοσωματίδια έδειξαν αργή απελευθέρωση και επιμονή του ελαίου στο φύλλο, με καλύτερα αποτελέσματα από το μη εγκλεισμένο έλαιο. Αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι ο εγκλεισμός βελτίωσε την αποτελεσματικότητα του

αιθέριου ελαίου στον έλεγχο των παρασίτων. Ο Campos et al. (2018) παρασκεύασε νανοσωματίδια χιτοζάνης που ενεργοποιήθηκαν με β-κυκλοδεξτρίνη για τον εγκλεισμό της καρβακρόλης και της λιναλοόλης. Τα νανοσωματίδια που περιέχουν καρβακρόλη και λιναλοόλη είχαν μέση διάμετρο 175.2 και 245.8 nm, αντίστοιχα, και παρουσίασαν υψηλή απόδοση εγκλεισμού (περίπου 90%). Βιολογικές αναλύσεις με τα ακάρια *Tetranychus urticae* έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια είχαν απωθητική, ακαρεοκτόνο και κατά της ωοτοκίας δράση και ήταν πιο αποτελεσματικά από τις μη εγκλεισμένες ενώσεις. Το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας, US9480656B1 23 περιγράφει μια μέθοδο για την παρασκευή νανοσωματιδίων χιτοζάνης για εγκλεισμό αιθερίου ελαίου δεντρολίβανου. Τα παραγόμενα νανοσωματίδια είχαν μέσο μέγεθος από 69 έως 99 nm και υψηλή απόδοση ενθυλάκωσης (>90%), κάτι που δείχνει πολλά υποσχόμενο για χρήση στη γεωργία.^[39] Ποικίλες ακόμη μελέτες σχετικά με την παρασιτοκτόνο ή/και εντομοκτόνο δράση νανο/μικρο-συστημάτων εγκλεισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Φυσικά υλικά για παραγωγή μικρο/νανο σκευασμάτων παρασιτοκτόνου.^[39]

Chitosan	Nanocapsules	Nanoparticles loaded with AEO had sizes ranging from 82 to 165 nm, depending on the pH used. All the nanoparticles were spherical.	<i>Achillea millefolium</i> L. essential oil (AEO)	Higher pH during the synthesis resulted in a greater mean diameter of the nanoparticles, while the encapsulation efficiency decreased. In terms of fumigant activity against <i>Tetranychus urticae</i> , the LC ₅₀ for the free essential oil (5.05 μL/L) was 3.74 times lower than observed for the nanoencapsulated oil (18.90 μL/L), at pH 3.5. However, increase of the pH value resulted in decreased effectiveness of the formulation, as demonstrated by increases of the LC ₅₀ values. For contact toxicity against <i>T. urticae</i> , the LC ₅₀ values were 5.51, 4.23, 1.88, and 1.56 μL/cm for free AEO and the encapsulated oil prepared at pH 3.5, 4.5, and 5.5, respectively. Both assays with mites showed that the sustained release of AEO increased the effectiveness of this oil.
Chitosan	Nanoparticles	The nanoparticles showed mean sizes ranging from 30 to 80 nm and were spherical in shape.	<i>Carum copticum</i> essential oil (CEO)	The best formulation was achieved with a ratio of chitosan to CEO of 1:1, using 0.5% (w/v) TPP as crosslinking agent. The nanoparticles released the CEO faster at acid pH, followed by basic and neutral conditions. In all cases, there was an initial burst release, followed by sustained release over time. The encapsulation of CEO could maintain the antioxidant activity, protect the phenolic compounds of CEO, and improve the antimicrobial activity.
Chitosan	Nanoparticles	The nanoparticles presented a size range from 100 to 190 nm, loading capacity below 4%, and encapsulation efficiency below 17%.	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> essential oil (CEO)	A higher CEO concentration resulted in greater mean nanoparticle diameter, while the encapsulation and drug loading efficiencies decreased. The nanoparticles showed an initial burst release, followed by sustained release over time. After 40 days, only 31.65% of the oil was released from the nanoparticles. CEO nanoencapsulated at 1.5 g/L significantly decreased disease incidence and severity in cucumbers inoculated with <i>Phytophthora drechsleri</i> , during storage at 4 °C.

Chitosan	Nanoparticles	The chitosan nanoparticles had spherical shapes and sizes in the range from 135.52 to 237.40 nm. The zeta potential was between -7.54 and -21.12 mV.	<i>Satureja hortensis</i> L. essential oil	Average nanoparticle diameter increased significantly at higher pH, due to aggregation. The encapsulation efficiency increased proportionally to the oil concentration. However, use of concentrations higher than 1.4% resulted in decreased encapsulation efficiency, due to supersaturation. The nanoencapsulated oil exhibited strong concentration-dependent antibacterial activity and DPPH scavenging activity.
Chitosan	Nanoparticles	The nanoparticles had spherical shapes and sizes in the range 50-100 nm. The zeta potential was higher than +50 mV.	Cardamom essential oil (CEO)	The nanoparticles loaded with CEO were able to control the growth of multidrug-resistant <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i> for up to 7 days, while no control was observed using empty nanoparticles or free CEO. The nanoencapsulated CEO did not show hemolytic or cytotoxic behavior in human corneal epithelial cells and the HepG2 cell line.
Chitosan	Nanoparticles and nanocapsules	The average size of the nanoparticles was 6.4 ± 0.5 nm, while the nanocapsules were larger (9.1 ± 1.6 nm). Both were spherical in shape.	Thyme essential oil	The encapsulation efficiency was higher for carvacrol than for thymol, in both the nanoparticles and the nanocapsules. For the nanoparticles, 100% release of carvacrol and thymol was observed in 390 and 360 min, respectively. The release from the nanocapsules was slower for both compounds, with 100% release of carvacrol and thymol in 540 and 630 min, respectively. The nanoparticles loaded with thyme essential oil showed greater antimicrobial activity against <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. dysenteriae</i> , and <i>E. coli</i> , compared to the nanocapsules.
Chitosan	Nanoparticles	The nanoparticles were spherical in shape and had a size of 235.6 nm, zeta potential of around 25.1 mV, and polydispersity index of 0.33.	Cinnamon essential oil (CEO)	The encapsulation efficiency of CEO was 37.87%. Sustained release tests were performed at pH 5.0 (the pH of beef patties). There was an initial burst release, followed by a more gradual increase in the cumulative release, finally reaching a plateau without additional CEO release after 56 h, when 61.7% of the oil had been released. Both free and encapsulated CEO decreased the microbial population of the patties, compared to the control ($p < 0.05$), throughout the experiment. However,
Chitosan- β -cyclodextrin and TPP	Nanoparticles	The nanoparticles loaded with carvacrol had a mean diameter of 175.2 ± 2.97 nm. For linalool, the mean diameter was 245.8 ± 29.5 nm. The zeta potential was positive and the polydispersity index was below 0.3. The nanoparticles were spherical in shape.	Carvacrol and linalool	The nanoparticles showed mean diameters that differed according to the compound nanoencapsulated. However, both carvacrol and linalool nanoformulations were stable over time during storage. Biological assays with mites (<i>Tetranychus urticae</i>) showed that the nanoparticles possessed repellency, acaricidal, and anti-oviposition activities against this organism. Nanoencapsulated carvacrol and linalool were significantly more effective in terms of acaricidal and anti-oviposition activities, while the unencapsulated compounds showed better repellency activity.
Chitosan	Nanoparticles	The nanoparticles had a size range from 154.9 to 340.8 nm, depending on the CO concentration used. The polydispersity index was below 0.3 and the zeta potential was higher than 30 mV.	Clove oil (CO)	The best performing formulation was produced using 2.50 mg/mL of CO. The nanoparticles showed high antibacterial activity against <i>E. coli</i> biofilms, with a reduction of 99.98% in the bacterial population after 8 h. Incorporation of the nanoparticles into gelatin nanofibers reduced the <i>E. coli</i> population by 99%.

Βοτανικά φυτοφάρμακα του εμπορίου

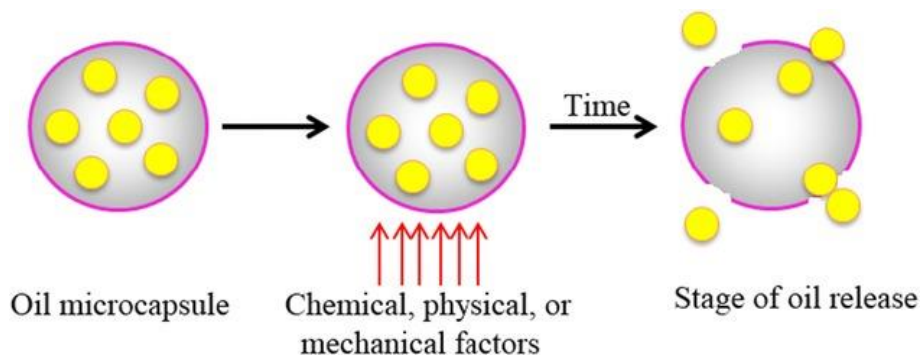
Πίνακας 4: Βοτανικά φυτοφάρμακα που παράγονται στο εμπόριο με βάση την τεχνολογία νανο/μικρο εγκλειμού.^[39]

Active compounds	Commercial products	Formulation characteristics	Applications	Manufacturer's claims	Manufacturers
Eugenol, geraniol, and thymol	Melavone CS® 3Logy® Hawk™	Yeast cells as matrix with neutral pH and diameter < 500 nm. Active ingredient releases in contact with water	Botrytis in grapes, field and greenhouse aubergines, kiwis, pomegranates, and fresh onions.	Eden's encapsulation technology platform provides slow release of active ingredients. This environmentally friendly solution enables terpenes to be used as effective low-risk agrochemicals.	Eden Research (UK)
Botanical compounds	eShield™ Technology	No details provides	Microencapsulation of botanical compounds as biopesticides for pest control.	EcoPesticides offers a technology that protects biopesticides from harmful solar UV radiation, preserving potency and substantially increasing lethality.	Ecopesticide International (USA)
Pyrethrin	Microcare 3%®	Liquid capsule suspension prepared with polymer matrix and diameter > 1µm	Ants, Asian lady beetles, box elder bugs, clover mites, cockroaches, confused flour beetles, crickets, dermestid beetles, dried fruit beetles, drugstore beetles, firebrats, fleas, flies, and gnats, moths, scorpions, silverfish, sowbugs, spiders, ticks, trogoderma, wasps, weevils, and yellowjackets.	Microcare 3% is the only microencapsulated pyrethrum product that provides fast knockdown and residual control. The technology creates a shell around the active ingredient that increases residual control by protecting it from ultraviolet rays, weather, porous and greasy surfaces, and absorption into soil or organic matter.	Whitmire Micro-Gen Research Laboratories Inc. (USA)
Botanical extracts	Tag Folder® Tag Combo® Tag Poly® Gama Flo® Eco® Agro Clean®	Nanoemulsions that promotes better penetration in plants	Recommended for all crops. Broad-spectrum action against a wide range of sucking insect pests, mites, and early instar leaf folder caterpillars.	Nanoscale size allows better penetration and effect of the active compounds.	Tropical Agrosystem Ltda. (India)
Extracts of <i>Cinnamomum verum</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> , and <i>Cinnamomum camphor</i>	NanoGuard®	Nanoemulsion with diameter < 200nm and stabilized with surfactants	Protectant bactericide and fungicide.	The nanotechnological formulation improves the stability of the active compound and protects against premature degradation.	Vision Mark Biotech (India)
Botanical extract of <i>Pongamia Pinnata</i> Shakti	Shakti Falcon® BotanoFresh™ OrGranular™ PotatoFresh™	Nanoemulsion stabilized with non-ionic surfactant Polymer Matrix that controlled the active ingredient by diffusion.	All kinds of mites; sucking insects such as thrips, jassids, and aphids; whitefly; others. BotanoCap produces biopesticides for crop protection during growth. These products include insecticides and repellants, fungicides, bactericides, and nematocide.	Slow release of the active compound and long-lasting effects on pests. BotanoCap's technology consists of proprietary nano/micro-encapsulation that enables the slow release of volatile compounds, such as essential oils. BotanoCap has full control over the particle size and the release profile of the encapsulated compound.	Nivshakti Bionergy Ltda. (India) BotanoCap (Israel)
Botanical compounds	Organocide™ DeccoTab™ NanoHMO® Mealynok®				

1.2.4 Μελέτη απελευθέρωσης (Release)

Το υλικό του πυρήνα διαχέεται σταδιακά μέσω των τοιχωμάτων της κάψουλας, προσφέροντας έτσι ιδιότητες ελεγχόμενης απελευθέρωσης υπό επιθυμητές συνθήκες. Ως εκ τούτου, η τεχνολογία μικρο-εγκλεισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παροχή βιοδραστικών συστατικών, βελτιώνοντας τις ιδιότητες χειρισμού τους. Για παράδειγμα, ο φυσικός εγκλεισμός ευαίσθητων ελαίων σε μικρο-κάψουλες θα μπορούσε να αποτρέψει την οξείδωση που προκαλείται από την υγρασία, τα μεταλλικά ιόντα, το οξυγόνο και τη θερμότητα. Εν συντομία, ο μικρο-εγκλεισμός μπορεί να οριστεί ως μια διαδικασία κατασκευής ενός λειτουργικού φραγμού μεταξύ του πυρήνα και του υλικού του τοιχώματος για την αποφυγή χημικών και φυσικών αντιδράσεων και τη διατήρηση των βιολογικών, λειτουργικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των υλικών του πυρήνα.

Η ελεγχόμενη απελευθέρωση έχει οριστεί σύμφωνα με στις Pothakamury και Barbosa-Cánovas (1995) ως μέθοδος με την οποία ένας ή περισσότεροι δραστικοί παράγοντες ή συστατικά καθίστανται διαθέσιμα σε μια επιθυμητή θέση και χρόνο με συγκεκριμένο ρυθμό. Η τεχνολογία ελεγχόμενης αποδέσμευσης χρησιμοποιείται για την παροχή διαφόρων ενώσεων όπως φάρμακα, φυτοφάρμακα, αρώματα ή γεύσεις σε συνιστώμενες τιμές, μαζί με βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια. Η Εικόνα 24 δείχνει τη σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού ελεγχόμενης απελευθέρωσης ελαίου.^[25]



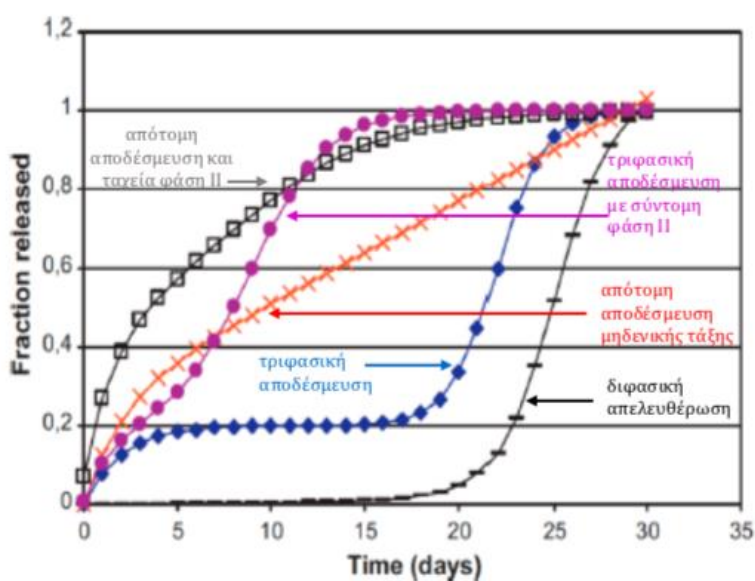
Εικόνα 24: Σχηματικό διάγραμμα μηχανισμού ελεγχόμενης απελευθέρωσης ελαίου.^[25]

Η κινητική απελευθέρωσης δραστικής ουσίας κατευθύνεται από έναν ή περισσότερους μηχανισμούς που εξαρτώνται από τη σύνθεση στις μήτρας, τη γεωμετρία, τη μέθοδο παρασκευής και τα μέσα διάλυσης της απελευθερώμενης ουσίας. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με μαθηματικά μοντέλα σύμφωνα με την επιθυμητή ή απαιτούμενη προγνωστική ικανότητα και ακρίβεια του μοντέλου.

1.2.4.1 Προφίλ απελευθέρωσης δραστικής ουσίας

Το κλασικό προφίλ απελευθέρωσης δραστικής ουσίας είναι ένα καλό σημείο εκκίνησης μελέτης σχετικά με τους μηχανισμούς ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Τα προφίλ απελευθέρωσης μηδενικής τάξης είναι εξιδανικευμένες καταστάσεις απελευθέρωσης δραστικής ουσίας. Το πιο κοινό προφίλ απελευθέρωσης δραστικής ουσίας από συστήματα χορήγησης πολυμερούς-δραστικής ουσίας

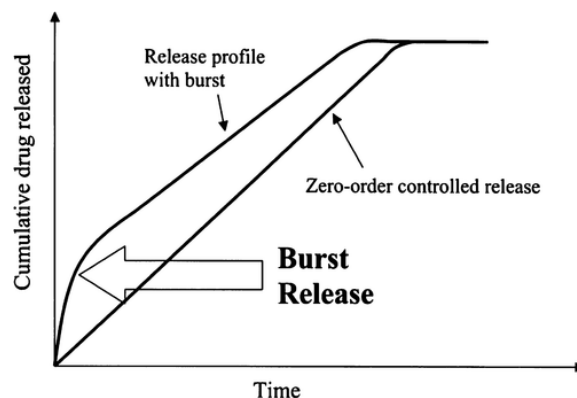
είναι στην πραγματικότητα ένα τριφασικό προφίλ και τυπικά παρατηρείται για μακρομοριακά συστήματα με ετερογενή συμπεριφορά αποδόμησης. Ο ρυθμός απελευθέρωσης μπορεί μερικές φορές να είναι επίσης διφασικός όταν τα σωματίδια είναι μικρότερα. Η φάση I ενός προφίλ τριφασικής απελευθέρωσης αναφέρεται ως το φαινόμενο της απελευθέρωσης «έκρηξης» και είναι η ταχεία απελευθέρωση μορίων δραστικής ουσίας κοντά στην επιφάνεια ή κοντά στο στρώμα νερού. Η φάση II του προφίλ απελευθέρωσης είναι μια φάση βραδείας απελευθέρωσης που διέπεται από αργή διάχυση δραστικής ουσίας μέσω της πολυμερικής μήτρας ή μέσω των υπαρχόντων πόρων και είναι ταυτόχρονη με την υδρόλυση και την αποικοδόμηση του πολυμερούς. Η φάση III μπορεί να είναι μια πιο γρήγορη φάση απελευθέρωσης, καθώς αρχίζει η διάβρωση.^[38]



Εικόνα 25: Μοντέλα προφίλ απελευθέρωσης δραστικής ουσίας.^[38]

1.2.4.2 Φαινόμενο απότομης απελευθέρωσης

Στα συστήματα χορήγησης πολυμερών-δραστικών ουσιών ελεγχόμενης αποδέσμευσης, όταν το σύστημα χορήγησης βυθίζεται για πρώτη φορά στο μέσο απελευθέρωσης, παρατηρείται μια ταχεία και σύντομη απελευθέρωση της δραστικής ουσίας, ακολουθούμενη από ένα σταθερό προφίλ «πλατώ».^[38] Η «έκρηξη» απελευθέρωσης αναφέρεται στο φαινόμενο στο οποίο λαμβάνει χώρα μια αρχική ταχεία απελευθέρωση δραστικού συστατικού πριν από την αργή απελευθέρωση, και μπορεί να είναι ανεπιθύμητη εάν μια αρχικά υψηλή συγκέντρωση δραστικού συστατικού δεν είναι ανεκτή για την εφαρμογή που μας ενδιαφέρει. Ένα φαινόμενο απελευθέρωσης «έκρηξης» («burst effect») θα υποδηλώνει υψηλότερη συγκέντρωση δραστικού συστατικού που βρίσκεται πάνω ή κοντά στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων μετά τη σύνθεση, με μικρότερα νανοσωματίδια (μεγαλύτερη αναλογία επιφάνειας στις όγκο) να επιδεικνύουν πιο σημαντικές απελευθερώσεις «έκρηξης». Η χρήση μιας δομής νανοκάψουλας ή μιας επικάλυψης γύρω από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων έχει προταθεί για την καταστολή της ταχείας αρχικής απελευθέρωσης «έκρηξης» που παρατηρείται συχνά για στις νανοσφαίρες.^[40]



Εικόνα 26: Φαινόμενο απότομης απελευθέρωσης.^[38]

1.2.4.3 Μαθηματική Μοντελοποίηση

Τα μοντέλα βασίζονται στους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας, όπως η κατανομή μεγέθους σωματιδίων, η φυσική κατάσταση και το προφίλ συγκέντρωσης της ουσίας μέσα στα πολυμερή σωματίδια, οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες του συστήματος πολυμερούς - διεισδυτικού και οι ιδιότητες διάλυσης - διάχυσης της εγκλεισμένης δραστικής ουσίας. Η μαθηματική μοντελοποίηση της παροχής της ουσίας έχει σημαντική δυνατότητα να διευκολύνει την ανάπτυξη του προϊόντος και να βοηθήσει στην κατανόηση της συμπεριφοράς απελευθέρωσης πολύπλοκων μορφών. Η μαθηματική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης δραστικών ουσιών αναμένεται να γίνει αναπόσπαστο μέρος της ανάπτυξης του προϊόντος. Οποιαδήποτε συγκεκριμένη θεωρία δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιοδήποτε σύστημα απελευθέρωσης, καθώς τα συστήματα μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν συνδυασμό μοντέλων.^[41]

Μαθηματικά Μοντέλα

1.2.4.3.1 Κινητική απελευθέρωσης μηδενικής τάξης

Αναφέρεται στη διαδικασία σταθερής απελευθέρωσης δραστικής ουσίας από ένα σύστημα ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση. Στην απλούστερη μορφή της, η απελευθέρωση μηδενικής τάξης μπορεί να αναπαρασταθεί ως:

$$Q = Q_0 + K_0 * t \quad (1)$$

όπου Q είναι η ποσότητα της ουσίας που απελευθερώνεται ή διαλύεται, το Q_0 είναι η αρχική ποσότητα της ουσίας σε διάλυμα (συνήθως είναι μηδέν) και το K_0 είναι η σταθερά απελευθέρωσης μηδενικής τάξης. Η γραφική παράσταση που κατασκευάζεται: αθροιστική απελευθέρωση δραστικής ουσίας συναρτήσει του χρόνου. Η γραφική αναπαράσταση του κλάσματος της διαλυμένης ουσίας σε συνάρτηση με τον χρόνο θα είναι γραμμική. Η κλίση στις καμπύλης δίνει την τιμή του K σε κινητική απελευθέρωσης μηδενικής τάξης.^[41]

1.2.4.3.2 Κινητική απελευθέρωσης πρώτης τάξης

Η εξίσωση πρώτης τάξης περιγράφει την απελευθέρωση από ένα σύστημα όπου ο ρυθμός απελευθέρωσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση, εκφραζόμενη από την εξίσωση:

$$\frac{dC}{dt} = -K * t$$

όπου K είναι σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξης εκφρασμένη σε μονάδες χρόνου⁻¹.

Η παραπάνω εξίσωση μπορεί να εκφραστεί ως:

$$\log C_t = \log C_0 - k * t / 2,303 \quad (2)$$

όπου, C₀ είναι η αρχική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας και C_t είναι η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο διάλυμα τη χρονική στιγμή t. Η εξίσωση προβλέπει μια εξάρτηση πρώτης τάξης από τη βαθμίδα συγκέντρωσης (C₀ - C_t) μεταξύ του στατικού υγρού στρώματος δίπλα στη στερεά επιφάνεια και του υγρού όγκου. Η γραφική παράσταση που κατασκευάζεται: αθροιστική καταγραφή της % υπολειπόμενης ουσίας έναντι του χρόνου που θα έδινε μια ευθεία γραμμή με κλίση -K/2,303.^[41]

1.2.4.3.3 Μοντέλο Higuchi

Το πρώτο παράδειγμα μαθηματικού μοντέλου που στόχευε να περιγράψει την απελευθέρωση δραστικής ουσίας από ένα σύστημα μήτρας προτάθηκε από τον Higuchi το 1963. Αυτό το μοντέλο μπορεί να εφαρμοστεί στη μελέτη της απελευθέρωσης υδατοδιαλυτών και χαμηλά διαλυτών ουσιών που ενσωματώνονται σε ημιστερεές και στερεές μήτρες. Η έκφραση του μοντέλου δίνεται από την εξίσωση:

$$Q = A * [D * (2 * C - C_s) * C_s * t]^{\frac{1}{2}}$$

όπου Q είναι η ποσότητα της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται σε χρόνο t ανά μονάδα επιφάνειας A, C είναι η αρχική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας, C_s είναι η διαλυτότητα της ουσίας στα μέσα και D είναι η διαχυτικότητα των μορίων της ουσίας (συντελεστής διάχυσης) στη μήτρα.

Το απλοποιημένο μοντέλο Higuchi περιγράφει την απελευθέρωση δραστικών ουσιών από αδιάλυτη μήτρα ως τετραγωνική ρίζα της διαδικασίας που εξαρτάται από το χρόνο με βάση την εξίσωση διάχυσης Fick.

$$Q = KH * t^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Τα δεδομένα που λαμβάνονται σχεδιάζονται ως αθροιστικό ποσοστό απελευθέρωσης ουσίας σε συνάρτηση με την τετραγωνική ρίζα του χρόνου. Η κλίση στις γραφικές παράστασης δίνει τη σταθερά διάλυσης Higuchi KH.

Παρά την πολυπλοκότητα των εμπλεκόμενων διαδικασιών μαζικής μεταφοράς, ο Higuchi εξήγαγε μια πολύ απλή εξίσωση, η οποία είναι εύκολη στη χρήση. Με βάση μια προσέγγιση ψευδο-σταθερής κατάστασης, μπορεί να αποδειχθεί μια άμεση αναλογία μεταξύ της σωρευτικής ποσότητας της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται και της τετραγωνικής ρίζας του χρόνου. Σε αντίθεση με διάφορες άλλες κινητικές απελευθέρωσης της «τετραγωνικής ρίζας του χρόνου», η σταθερά αναλογίας στην κλασική εξίσωση Higuchi έχει μια συγκεκριμένη, φυσικά ρεαλιστική σημασία. Τα κύρια οφέλη αυτής της εξίσωσης περιλαμβάνουν τη δυνατότητα: (i) να διευκολυνθεί η βελτιστοποίηση του συστήματος και (ii) να κατανοηθούν καλύτερα οι υποκείμενοι μηχανισμοί απελευθέρωσης ουσίας.

Τα μοντέλα Higuchi και μηδενικής τάξης χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τα όρια μεταφοράς και απελευθέρωσης ουσίας.^[41]

1.2.4.3.4 Νόμος της κυβικής ρίζας Hixson-Crowell

Ο νόμος της κυβικής ρίζας προτάθηκε για πρώτη φορά από τις Hixson και Crowell (1931a) ως μέσο αναπαράστασης του ρυθμού διάλυσης, που κανονικοποιείται για τη μείωση του εμβαδού της στερεάς επιφάνειας, ως συνάρτηση του χρόνου. Ο νόμος της κυβικής ρίζας Hixson-Crowell περιγράφει την απελευθέρωση από συστήματα όπου υπάρχει αλλαγή στην επιφάνεια και τη διάμετρο σωματιδίων ή ταμπλετών. Εφόσον δεν υπάρχει αλλαγή στο σχήμα καθώς διαλύεται ένα αιωρούμενο στερεό, η επιφάνειά του μειώνεται όσο τα δύο τρίτα του βάρους του. Αυτή η σχέση έχει χρησιμοποιηθεί από τους Hixson και Crowell για την παραγωγή του νόμου της κυβικής ρίζας. Για μια σκόνη ουσίας που αποτελείται από σωματίδια ομοιόμορφου μεγέθους, είναι δυνατό να εξαχθεί μια εξίσωση που εκφράζει το ρυθμό διάλυσης με βάση την κυβική ρίζα των σωματιδίων. Όταν εφαρμόζονται οι συνθήκες βύθισης, ο νόμος στις ρίζες του κύβου μπορεί να γραφτεί ως:

$$Q_t^{\frac{1}{3}} = Q_0^{\frac{1}{3}} - K_{HC} * t \Rightarrow Q_0^{\frac{1}{3}} - Q_t^{\frac{1}{3}} = K_{HC} * t \quad (4)$$

όπου Q_t υποδηλώνει την υπόλοιπη μάζα της δραστικής ουσίας τη στιγμή t , Q_0 είναι η αρχική μάζα της δραστικής ουσίας τη στιγμή $t = 0$, και το K_{HC} αντιπροσωπεύει τη σταθερά του ρυθμού διάλυσης. Η γραφική παράσταση της κυβικής ρίζας του μη απελευθερωμένου κλάσματος της δραστικής ουσίας συναρτήσει του χρόνου θα πρέπει να δίνει μια ευθεία γραμμή εάν δεν επιτυγχάνονται οι συνθήκες ισορροπίας και εάν το γεωμετρικό σχήμα του συστήματος απελευθέρωσης μειώνεται αναλογικά με τον χρόνο. Αυτό το μοντέλο χρησιμοποιείται υποθέτοντας ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης περιορίζεται από τον ρυθμό διάλυσης των σωματιδίων της ουσίας και όχι από τη διάχυση. Οι υποθέσεις που έγιναν για την εγκυρότητα του νόμου από τις Hixson και Crowell μπορούν να συνοψιστούν ως εξής: (1) Ο νόμος υποστηρίζεται ότι είναι πιο κατάλληλος για μονοδισπαρμένα, κυρίως σφαιροειδή υλικά, δηλαδή το στερεό έχει τη μορφή

μιας ενιαίας μονάδας ή όλων των μονάδων που έχουν ίδιες ιδιότητες όσον αφορά το μέγεθος, το σχήμα, την επιφάνεια και τα χαρακτηριστικά όγκου, (2) Η διάλυση γίνεται κάθετα στις την επιφάνεια. Η διαφορά στους ρυθμούς σε διαφορετικές όψεις κρυστάλλου είναι σημαντικά μικρότερη και η επίδραση της ανάδευσης του υγρού σε όλα τα μέρη στις επιφάνειες παραμένει ίδια και (3) Το υγρό αναδεύεται έντονα για να αποτραπεί η στασιμότητα στα πλησιέστερα σημεία του διαλυόμενου σωματιδίου με αποτέλεσμα έναν αργό ρυθμό διάχυσης.^[41]

1.2.4.3.5 Μοντέλο Korsmeyer – Peppas

Ο Korsmeyer et al. (1983) εξήγαγαν μια απλή σχέση που περιέγραφε την απελευθέρωση ουσίας από ένα πολυμερικό σύστημα. Οι Ritger και Peppas και Korsmeyer και Peppas ανέπτυξαν μια εμπειρική εξίσωση για να αναλύσουν τόσο Fickian όσο και non-Fickian απελευθέρωση δραστικής ουσίας από διογκωτικά καθώς και μη διογκωτικά πολυμερικά συστήματα.

Για να βρεθεί ο μηχανισμός απελευθέρωσης δραστικής ουσίας, τα πρώτα δεδομένα απελευθέρωσης φαρμάκου, 60%, τοποθετήθηκαν στο μοντέλο Korsmeyer – Peppas:

$$\frac{M_t}{M_a} = K * t^n \quad (5)$$

όπου το M_t/M_a είναι κλάσμα της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται τη στιγμή t , το K είναι η σταθερά του ρυθμού (που έχει μονάδες t^n) που ενσωματώνει δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του συστήματος, n είναι ο εκθέτης απελευθέρωσης, ενδεικτικός του μηχανισμού μεταφοράς της δραστικής ουσίας μέσω του πολυμερούς. Η τιμή n χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό διαφορετικών μηχανισμοί απελευθέρωσης.

Πίνακας 5. Χαρακτηρισμός μηχανισμού απελευθέρωσης με βάση την τιμή του εκθέτη n .^[41]

Εκθέτης απελευθέρωσης (n)	Μηχανισμός μεταφοράς δραστικής ουσίας	Ρυθμός συναρτήσεως του χρόνου	Μηχανισμός απελευθέρωσης δραστικής ουσίας
$n < 0.5$	Ψευδο-Fickian διάχυση	t^n	Διάχυση από μη διογκωτική μήτρα
0.5	Διάχυση Fickian	$t^{0.5}$	
$0.5 < n < 1.0$	Ανώμαλη Μεταφορά (μη Fickian μεταφορά)	t^{n-1}	Διάχυση και χαλάρωση (διάβρωση)
1.0	Case II μεταφορά	Ανεξάρτητος χρόνου	Απελευθέρωση μηδενικής τάξης
$n > 1.0$	Case II ταχεία μεταφορά	t^{n-1}	Χαλάρωση/ διάβρωση

Σύμφωνα με τα μοντέλα Ritger-Peppas, $0.45 < n < 0.89$ για μη διογκώσιμη απελευθέρωση (ανώμαλη) από κυλίνδρους (μη διογκώσιμη μήτρα) και $0.43 < n <$

0.85 για μη διογκώσιμη απελευθέρωση (ανώμαλη) από μη διογκώσιμα σφαιρικά δείγματα. Για να βρεθεί ο εκθέτης, n , θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο το τμήμα στις καμπύλης απελευθέρωσης $Mt / M\alpha < 0.6$. Το μοντέλο σχεδιάζεται ως λογαριθμικό αθροιστικό ποσοστό απελευθέρωσης δραστικής ουσίας σε σχέση με το χρόνο. Η απελευθέρωση διάχυσης Fickian συμβαίνει με τη συνήθη μοριακή διάχυση της δραστικής ουσίας λόγω μιας χημικής βαθμίδας δυναμικού. Η χαλαρωτική απελευθέρωση Case-II είναι ο μηχανισμός μεταφοράς ουσίας που σχετίζεται με τάσεις και μετάβαση κατάστασης σε υδρόφιλα υαλώδη πολυμερή που διογκώνονται σε νερό ή βιολογικά υγρά. Αυτός ο όρος περιλαμβάνει επίσης την αποσύμπλεξη και τη διάβρωση του πολυμερούς.^[41]

1.2.4.3.6 Μοντέλο Weibull

Μια γενική εμπειρική εξίσωση που περιγράφηκε από τον Weibull το 1951 προσαρμόστηκε στη διαδικασία διάλυσης/απελευθέρωσης από τον Langenbucher. Όταν η εξίσωση Weibull εφαρμόζεται στη διάλυση και την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας από συστήματα, εκφράζει το συσσωρευμένο κλάσμα της ουσίας 'm' σε διάλυση σε χρόνο 't' ως:

$$m = 1 - \exp\left[-\frac{(t-T_i)^b}{\alpha}\right] \quad (6)$$

όπου α είναι η παράμετρος κλίμακας και ορίζει τη χρονική κλίμακα της διαδικασίας, δηλαδή τη χρονική εξάρτηση. Το T_i είναι η παράμετρος θέσης, αντιπροσωπεύει το χρόνο καθυστέρησης πριν από την έναρξη της διαδικασίας διάλυσης ή απελευθέρωσης και στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μηδέν. Η παράμετρος σχήματος b περιγράφει το σχήμα της προσαρμογής στην καμπύλη διάλυσης. Όταν $b = 1$, το σχήμα της καμπύλης είναι ένα εκθετικό προφίλ όπου η σταθερά $K = 1/\alpha$. Όταν το b είναι μεγαλύτερο από 1, το σχήμα της καμπύλης γίνεται σιγμοειδές με σημείο καμπής. Όταν το b είναι μικρότερο από 1, το σχήμα δείχνει μια παραβολική καμπύλη που δείχνει πιο απότομες αντιδράσεις χρησιμοποιώντας δεδομένα που προέρχονται από το σύνθετο προφίλ, το οποίο ουσιαστικά εμφανίζει ειδικές κινητικές διαφορικής απελευθέρωσης.^[41]

1.3 Σκοπός εργασίας

Ο σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι ο εγκλεισμός αιθέριων ελαίων γένους *Majorana* και *Mentha* σε νανο- και μικρο -φορείς προκειμένου να διατηρηθούν οι επιθυμητές τους ιδιότητες και η μελέτη της εντομοκτόνου δράσης αυτών των συστημάτων εγκλεισμού. Τα αιθέρια έλαια που αξιοποιήθηκαν για αυτό τον σκοπό είναι: *Origanum Majorana*, *Mentha Pulegium* και *Mentha Arvensis*. Μάλιστα, γίνεται χρήση δυο ελαίων *Origanum Majorana*, *OM2* και *OM3*, τα οποία διαφοροποιούνται ως προς τον χρόνο συγκομιδής του φυτού από το οποίο απομονώνονται. Όσον αφορά τους φορείς εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκαν η β-κυκλοδεξτρίνη, η χιτοχάνη, ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* και κύτταρα του *Saccharomyces Cerevisiae* επικαλυμμένα με χιτοζάνη.

Τα αιθέρια έλαια λόγω της αλληλοπαθητικής ιδιότητά τους και της χημική τους σύστασης αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη για εντομοκτόνο δράση.

Μάλιστα, αποτελούν μια φιλικότερη προς το περιβάλλον προσέγγιση έναντι των συμβατικών επιβλαβών εντομοκτόνων.

Οι φορείς εγκλεισμού χρησιμοποιούνται ως μέσα διατήρησης των επιθυμητών βιολογικών ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων στο βέλτιστο δυνατό επίπεδο προστατεύοντάς τα από οξειδωτικούς και άλλους παράγοντες όπως η υγρασία και το ηλιακό φως. Επιπρόσθετα, τα διαμορφωμένα συστήματα εγκλεισμού βελτιώνουν την βιοδιαθεσιμότητα των αιθέριων ελαίων ενώ επιτρέπουν την ελεγχόμενη αποδέσμευσή τους στο εκάστοτε σύστημα απελευθέρωσης.

Για την υλοποίηση του σκοπού αυτού, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση κατάλληλων διεργασιών εγκλεισμού στους επιλεγμένους φορείς. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός σε β-κυκλοδεξτρίνη με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης. Για τον εγκλεισμό των αιθέριων ελαίων σε κύτταρα ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* απαιτείται πρώτα η πλασμόλυση αυτών προκειμένου να απομακρυνθεί το περιεχόμενο σε αυτά νερό μαζί με τις υδατοδιαλυτές ουσίες και να δημιουργηθεί ο κατάλληλος χώρος προς εγκλεισμό. Τα πλασμολυμένα κύτταρα αξιοποιήθηκαν μετέπειτα για τον εγκλεισμό των αιθέριων ελαίων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός με χιτοζάνη μέσω ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης καθώς και επικάλυψη με χιτοζάνη κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*. Για το τελευταίο, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* με εγκλεισμένο το αιθέριο έλαιο που έχουν παραχθεί και μελετηθεί πρώτα ως απλό σύστημα *Saccharomyces Cerevisiae:EO*.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των νανο- και μικρο-συστημάτων εγκλεισμού σχετικά με την δομή και τις ιδιότητές τους. Πιο συγκεκριμένα, μετρήθηκε η υδροδυναμική διάμετρος των σχηματισμένων σωματιδίων και το ζ δυναμικό τους μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και έγινε δομικός χαρακτηρισμός των σωματιδίων μέσω Φασματοσκοπίας Υπερύθρου (FT-IR).

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε *in vitro* μελέτη της απελευθέρωσης των αιθερίων ελαίων *Origanum Majorana (OM3)* και *Mentha Arvensis* από συγκεκριμένα συστήματα εγκλεισμού καθώς και κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσής τους. Τέλος, επιλεγμένα συστήματα εγκλεισμού, οι φορείς εγκλεισμού και τα αντίστοιχα αιθέρια έλαια σε ελεύθερη μορφή εξετάζονται για την εντομοκτόνο τους δράση *in vitro* έναντι των νυμφών του *Tetranychus urticae*.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά

- Αιθέριο έλαιο *Origanum Majorana* (OM2) και (OM3)
- Αιθέριο έλαιο *Mentha Arvensis* και *Mentha Pulegium*
- Υπερκάθαρο νερό
- β-κυκλοδεξτρίνη (β-cyclodextrin)
- Αιθανόλη (EtOH)
- Κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Χιτοζάνη εξαιρετικά χαμηλού μοριακού βάρους (ULMW)
- Οξικό οξύ (CH₃COOH)
- Υδροξείδιο του καλίου (KOH)
- Τριπολυφωσφορικό νάτριο (TPP)
- Όξινο φωσφορικό δικάλιο (K₂HPO₄) και δίοξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄)

Τα αιθέρια έλαια *Origanum Majorana* (OM2, OM3 διαφορετικής χρονικής περιόδου) και *Mentha Pulegium* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρασχέθηκαν από το Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, Σχολή Επιστημών Τροφίμων & Διατροφής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών ενώ το *Mentha Arvensis* ήταν εμπορικά διαθέσιμο. Η β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) με καθαρότητα >99% αγοράστηκε από την εταιρεία Fluka (Gillingham, England) ενώ η αιθανόλη υψηλής καθαρότητας αγοράστηκε από την εταιρεία Fisher Scientific. Τα κύτταρα ζυμομύκητα που αξιοποιήθηκαν είναι η κοινή μαγιά του εμπορίου και το χλωριούχο νάτριο αγοράστηκε από PanReac. Η χιτοζάνη εξαιρετικά χαμηλού μοριακού βάρους (5 cps) αγοράστηκε από την εταιρεία Glentham, ενώ το οξικό οξύ από την CARLO ERBA. Το τριπολυφωσφορικό νάτριο προμηθεύτηκε από την εταιρεία ACROS ORGANICS και το υδροξείδιο του καλίου, το όξινο φωσφορικό δικάλιο και το δίοξινο φωσφορικό κάλιο από την εταιρεία Penta (CHEMICALS UNLIMITED).

Για την παρασκευή των διαλυμάτων και των διασπορών χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό. Τα προαναφερθέντα υλικά χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

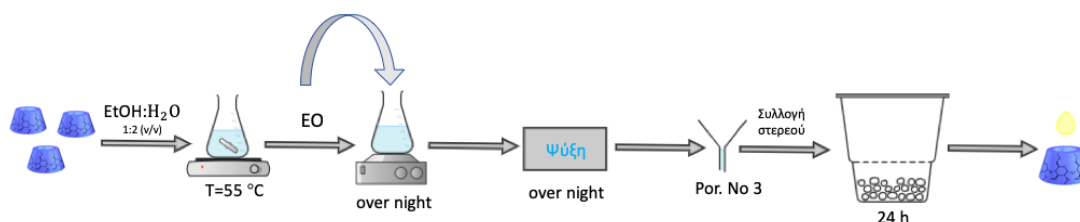
2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Εγκλεισμός αιθερίου ελαίου σε β-κυκλοδεξτρίνη

Αρχικά, ζυγίζεται ποσότητα β-κυκλοδεξτρίνης (β-cyclodextrin, β-CD) και μεταφέρεται σε σμυρισμένη σφαιρική φιάλη. Παρασκευάζεται μίγμα EtOH:H₂O, με υπερκάθαρο νερό, αναλογίας 1:2 (v/v), ώστε να δημιουργηθεί συγκέντρωση β-CD ίση με 100 mg/mL, και τοποθετείται στην σφαιρική φιάλη με την β-CD. Η β-CD και το μίγμα EtOH:H₂O αφήνονται προς ήπια ανάδευση σε ελαιόλουτρο, σε θερμοκρασία 55 °C έως ότου το μίγμα γίνει διαυγές.

Στην συνέχεια, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα ΕΟ, οπότε η αναλογία b-CD:ΕΟ να είναι ίση με 80:20 (w/w) και τοποθετείται στην σφαιρική φιάλη του παραπάνω μίγματος μέχρι να σχηματιστεί γαλάκτωμα.

Πραγματοποιείται over night ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα over night ψύξη του γαλακτώματος. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό με porosity No 3 και παραλαβή της στερεής μάζας, η οποία τοποθετείται σε ξηραντήρα με αντλία υψηλού κενού τύπου Edwards προς απομάκρυνση της παραμένουσας υγρασίας, για 24 h.



Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε β-κυκλοεξτρίνη.

2.2.2 Εγκλεισμός αιθερίου ελαίου σε κύτταρα ζυμομύκητα

2.2.2.1 Πλασμόλυση κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*

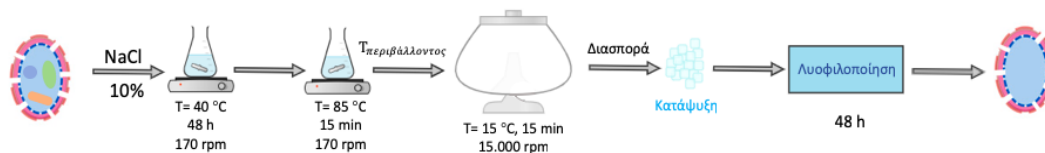
Η πλασμόλυση των κυττάρων του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* πραγματοποιείται προκειμένου να αξιοποιηθεί η κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων ως φορέας εγκλεισμού. Μέσω της πλασμόλυσης, το περιεχόμενο νερό των κυττάρων απομακρύνεται και μαζί με αυτό συμπαρασύρονται και διάφορες υδατοδιαλυτές ουσίες όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, σακχαρίτες και ένζυμα. Έτσι, δημιουργείται περισσότερος χώρος για φόρτωση υλικού στον πυρήνα εγκλεισμού.

Η διαδικασία της πλασμόλυσης πραγματοποιείται με πλασμολύτη NaCl 10%. Αρχικά, ζυγίζονται 5 g NaCl και προστίθενται σε 50 mL υπερκάθαρο νερό. Αφού ομογενοποιηθεί το διάλυμα του πλασμολύτη, αυτό τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη μαζί με 2 g κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*.

Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος σε 170 rpm και θερμοκρασία 40 °C για 48 h. Έπειτα, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 85 °C και το μίγμα αφήνεται στις ίδιες συνθήκες ανάδευσης για 15 min. Μετά το πέρας των 15 min, το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τοποθετείται σε πλαστικά φιαλίδια προς φυγοκέντρωση.

Η φυγοκέντρωση (SORVALL LYNX 6000) πραγματοποιείται για 15 min, σε 15.000 rpm και θερμοκρασία 15 °C. Τα υπερκείμενα αποχύνονται και τα κύτταρα που έχουν καθιζάνει επαναδιασπείρονται με την ελάχιστη δυνατή ποσότητα υπερκάθαρου νερού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τέσσερις φορές.

Το στερεό που λαμβάνεται στο πέρας της φυγοκέντρισης, επαναδιαπείρεται στην ελάχιστη δυνατή ποσότητα υπερκάθαρου νερού, καταψύχεται και ακολουθεί λυοφιλοποίηση (Frozen in Time, Lablyo Mini) για 48 h. Τα πλασμολυμένα κύτταρα παραλαμβάνονται σε ξηρή μορφή. Η απόδοση της διεργασίας κυμαίνεται από 25-40 %.



Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας πλασμόλυσης κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*.

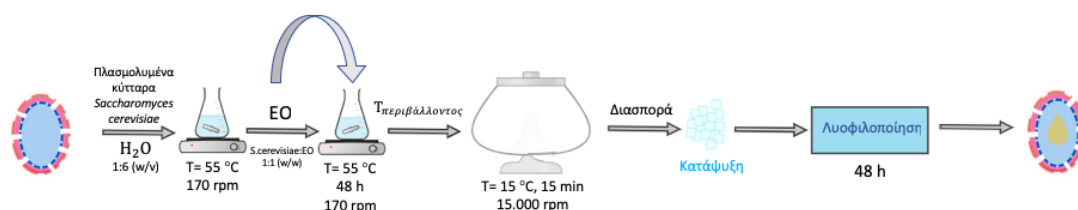
2.2.2.2 Εγκλεισμός αιθέριου ελαίου σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*

Για τον εγκλεισμό ΕΟ σε κύτταρα ζυμομύκητα, χρησιμοποιούνται τα πλασμολυμένα κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae*, όπως αυτά παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την διαδικασία που αναφέρθηκε. Έτσι, δημιουργείται μίγμα πλασμολυμένων κυττάρων, υπερκάθαρου νερού σε αναλογία 1:6 (w/v) και τοποθετείται σε σμυρισμένη σφαιρική φιάλη προς ανάδευση. Αφού το μίγμα γίνει ομοιογενές, προστίθεται το ΕΟ το οποίο βρίσκεται σε αναλογία 1:1 (w/w) με τα πλασμολυμένα κύτταρα.

Στην συνέχεια, πραγματοποιείται ανάδευση του ελαιώδους μίγματος σε 170 rpm, σε ελαιόλουτρο και θερμοκρασία 55 °C για 48 h. Μετά το πέρας της ανάδευσης, το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μεταφέρεται σε πλαστικά φιαλίδια προς φυγοκέντριση.

Η φυγοκέντριση πραγματοποιείται για 15 min, σε 15.000 rpm και θερμοκρασία 15 °C. Τα υπερκείμενα συλλέγονται και τα κύτταρα με το εγκλεισμένο ΕΟ που έχουν καθιζάνει επαναδιασπείρονται με την ελάχιστη δυνατή ποσότητα υπερκάθαρου νερού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τέσσερις φορές, όπου και τα υπερκείμενα που συλλέγονται είναι διαυγή και αξιολογούνται για την απόδοση εγκλεισμού μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

Το στερεό που λαμβάνεται στο πέρας της φυγοκέντρισης, επαναδιαπείρεται στην ελάχιστη ποσότητα υπερκάθαρου νερού, καταψύχεται και ακολουθεί λυοφιλοποίηση για 48 h. Το σύστημα εγκλεισμού παραλαμβάνεται σε ξηρή μορφή για τους περαιτέρω χαρακτηρισμούς.



Εικόνα 29: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας εγκλεισμού αιθέριου ελαίου σε πλασμολυμένα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.3 Εγκλεισμός αιθερίου ελαίου σε χιτοζάνη

Αρχικά, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 1% (v/v). Ζυγίζονται 300 mg χιτοζάνης, CS, χαμηλού μοριακού βάρους και τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη με το διάλυμα του οξικού οξέος. Το μίγμα τοποθετείται προς ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έως ότου γίνει διαυγές.

Έπειτα, ρυθμίζεται το pH στο διάλυμα της χιτοζάνης ίσο με 5.8. Πρώτα, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα KOH 20%, με υπερκάθαρο νερό. Με την βοήθεια πεχάμετρου και στάγδην προσθήκη διαλύματος KOH στο διάλυμα της χιτοζάνης επιτυγχάνεται το επιθυμητό pH. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό του παραπάνω μίγματος, με porosity No 3, προκειμένου να ληφθεί η διαλυμένη στο υδατικό διάλυμα οξικού οξέος χιτοζάνη και να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείναντα στερεά.

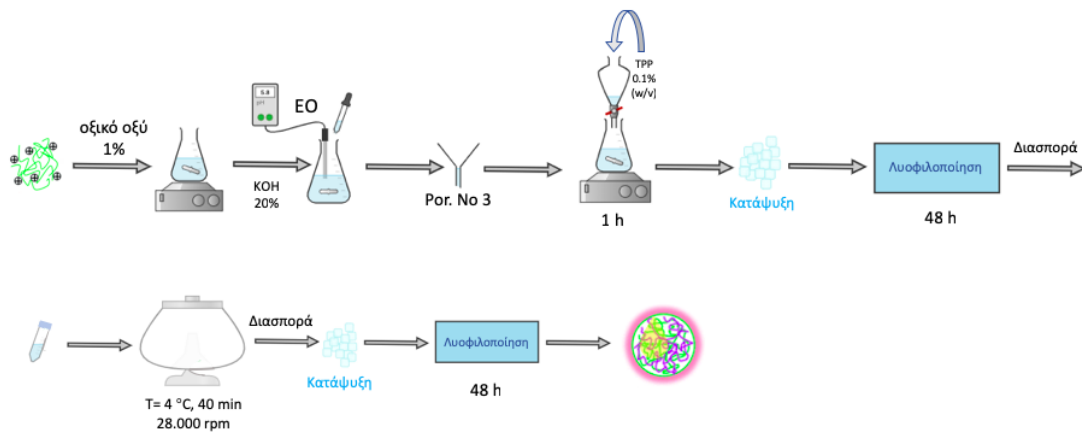
Στην συνέχεια, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα TPP 0.1% (w/v) και ζυγίζονται 120 mg ΕΟ.

Το διήθημα με την διαλυμένη χιτοζάνη τοποθετείται σε συμυρισμένη σφαιρική φιάλη. Στην σφαιρική φιάλη προστίθεται και το ΕΟ και το μίγμα ποματίζεται και οδηγείται προς ανάδευση απουσία θέρμανσης.

Όσο το μίγμα αναδεύεται, προστίθεται στάγδην το υδατικό διάλυμα του TPP και αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία το τελικό μείγμα αφήνεται για ανάδευση απουσία θέρμανσης για 1 h. Μετά το πέρας της 1 h, το τελικό διάλυμα καταψύχεται και ακολουθεί λυοφιλοποίηση (Frozen in Time, Lablyo Mini) για 48 h.

Το στερεό εγκλεισμού που λαμβάνεται μετά την λυοφιλοποίηση επαναδιασπείρεται στην ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα υπερκάθαρου νερού. Η διασπορά τοποθετείται σε πλαστικά φιαλίδια προς φυγοκέντριση (SORVALL LYNX 6000).

Η φυγοκέντριση πραγματοποιείται για 40 min, σε 28.000 rpm και θερμοκρασία 4 °C. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δυο φορές. Τα υπερκείμενα υγρά συλλέγονται και αξιολογούνται για την απόδοση εγκλεισμού μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Το καθισμένο στερεό επαναδιασπείρεται σε υπερκάθαρο νερό. Η διασπορά καταψύχεται και οδηγείται προς λυοφιλοποίηση για 48 h. Το σύστημα εγκλεισμού παραλαμβάνεται σε ξηρή μορφή για τους περαιτέρω χαρακτηρισμούς.



Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε χιτοζάνη.

2.2.4 Επικάλυψη εγκλεισμένων με αιθέριο έλαιο κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* με χιτοζάνη

Για την επικάλυψη των κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*, τα οποία περιέχουν εγκλεισμένο ΕΟ, ζυγίζεται ποσότητα χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους. Στην συνέχεια, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 1% (v/v) και τοποθετείται μαζί με την προζυγισμένη χιτοζάνη σε συμρισμένη σφαιρική φιάλη. Το τελικό διάλυμα οδηγείται προς ανάδευση έως ότου παρατηρηθεί διάλυση της χιτοζάνης.

Έπειτα, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα κυττάρων ζυμομήκυτα με το εγκλεισμένο ΕΟ ώστε η αναλογία με την χιτοζάνη να είναι 1:2 (w/w), αντίστοιχα. Ακολουθεί διασπορά σε ελάχιστη δυνατή ποσότητα υπερκάθρου νερού και υπέρηχοι για 2 min προς βέλτιστη ομογενοποίησή της.

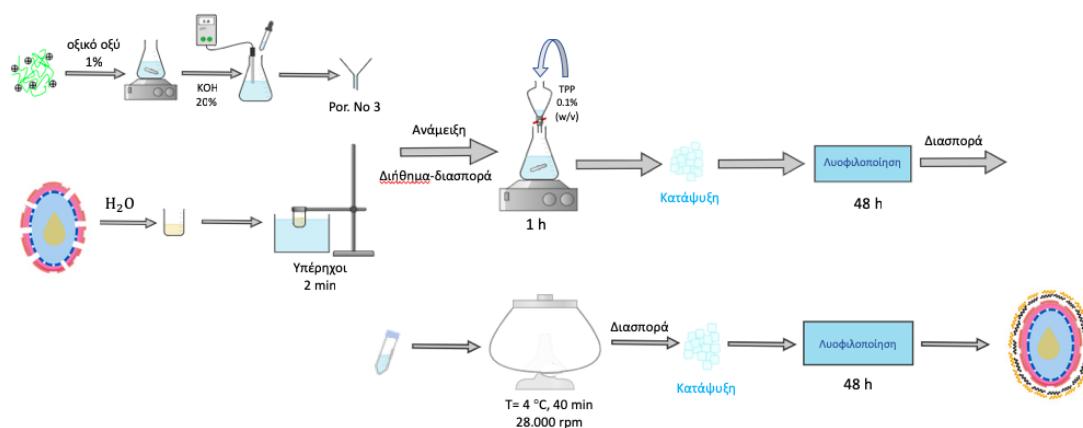
Έπειτα, ρυθμίζεται το pH στο διάλυμα της χιτοζάνης ίσο με 5.8. Πρώτα, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα KOH 20%, με υπερκάθαρο νερό. Με την βοήθεια πεχάμετρου και στάγδην προσθήκη διαλύματος KOH στο διάλυμα της χιτοζάνης επιτυγχάνεται το επιθυμητό pH. Το διάλυμα στις χιτοζάνης διηθείται υπό κενό με porosity No 3 και παραλαμβάνεται το διήθημα, απαλλαγμένο από τυχόν εναπομείναντα στερεά.

Το διήθημα με την διαλυμένη χιτοζάνη και η διασπορά των κυττάρων ζυμομήκυτα αναμειγνύονται σε συμρισμένη σφαιρική φιάλη και τοποθετούνται προς ανάδευση.

Ταυτόχρονα, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα TPP 0.1% (w/v) και προστίθεται στάγδην στο μίγμα χιτοζάνης-κυττάρων ζυμομήκυτα που αναδεύεται. Μετά την προσθήκη του διαλύματος TPP το τελικό μίγμα αφήνεται προς ανάδευση για 1 h και αφού καταψυχθεί ακολουθεί λυοφιλοποίηση (Frozen in Time, Lablyo Mini) για 48 h. Μετά την λυοφιλοποίηση, παραλαμβάνεται η ξηρή μάζα των επικαλυμμένων σωματιδίων και ακολουθεί έκπλυση αυτών με υπερκάθαρο νερό.

Τα σωματίδια διασπείρονται στην ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα υπερκάρου νερού. Η διασπορά τοποθετείται σε πλαστικά φιαλίδια προς φυγοκέντριση (SORVALL LYNX 6000).

Η φυγοκέντριση πραγματοποιείται για 40 min, σε 28.000 rpm και θερμοκρασία 4 °C. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δυο φορές. Τα υπερκείμενα υγρά συλλέγονται και αξιολογούνται για την απόδοση εγκλεισμού μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Το καθισμένο στερεό επαναδιασπείρεται σε υπερκάρου νερό. Η διασπορά καταψύχεται και οδηγείται προς λυοφιλοποίηση για 48 h. Το σύστημα εγκλεισμού παραλαμβάνεται σε ξηρή μορφή για τους περαιτέρω χαρακτηρισμούς.



Εικόνα 31: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας επικάλυψης κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* εγκλεισμένων με αιθέριο έλαιο με χιτοζάνη.

2.3 Ανάλυση χημικής σύστασης αιθέρων ελαίων GC-MS

Για την ανάλυση της χημικής σύστασης των αιθέρων ελαίων χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματομέτρο μάζας. Εγχύθηκε 1 μL δείγματος, διαλυμένο σε εξάνιο υψηλής καθαρότητας, στο χρωματογράφο και πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός ροής. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η VF-5ms της Varian με διαστάσεις 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm. Ως φέρον αέριο επιλέχθηκε το ήλιο (He) με παροχή 1 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που επιλέχθηκε ήταν το εξής: αρχική θερμοκρασία 36 °C για 3 min, 190 °C με ρυθμό 3 °C/min. Ο συνολικός χρόνος παραμονής ήταν 54.33 min. Για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε Mass Spectrometer Varian 220-MS με παγίδα ιόντων (Ion Trap).



Εικόνα 32. Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματόμετρο μάζας, Mass Spectrometer Varian 220-MS.

2.4 Απόδοση εγκλεισμού

Ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE) του εκάστοτε αιθερίου ελαίου στους διαφορετικούς φορείς και στα αντίστοιχα συστήματα εγκλεισμού προσδιορίζεται είτε άμεσα (direct EE%) είτε έμμεσα (Indirect EE%).

Στην άμεση απόδοση εγκλεισμού, μετράται η ποσότητα αιθερίου ελαίου που έχει εγκλειστεί στο σύστημα μέσω απελευθέρωσης αυτής ενώ στον έμμεσο προσδιορισμό βρίσκεται η ποσότητα που δεν έχει εγκλειστεί και με βάση την ολική αρχική ποσότητα υπολογίζεται η απόδοση, αντίστοιχα.

Για τον άμεσο προσδιορισμό, 20 mg συστήματος εγκλεισμού διασπείρονται σε 20 mL εξανίου και αφήνονται προς ανάδευση για 24 h. Μετά το πέρας της ανάδευσης, λαμβάνεται ποσότητα από την φάση του εξανίου και η ποσότητα αιθερίου ελαίου σε αυτή προσδιορίζεται μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματόμετρο μάζας (GC-MS). Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα που έχουν ως φορέα την β-κυκλοδεξτρίνη.

Ο έμμεσος τρόπος υπολογισμού της απόδοσης εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε μέσω ποσοτικοποίησης της συγκέντρωσης αιθέριου ελαίου στα υπερκείμενα υγρά των δειγμάτων, που έχουν ως φορέα εγκλεισμού κύτταρα *S. cerevisiae* και χιτοζάνη καθώς και στα κύτταρα *S. cerevisiae* με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο στα οποία έχει πραγματοποιηθεί επικάλυψη με χιτοζάνη, μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματόμετρο μάζας (GC-MS). Ποσότητα λαμβάνεται από τα υπερκείμενα υγρά και αναμιγνύεται με κατάλληλη ποσότητα εξανίου ώστε η ποσότητα του αιθερίου ελαίου να περάσει από την υδατική φάση σε αυτή του εξανίου και να ακολουθήσει έγχυση στο GC-MS.

Και στις δυο περιπτώσεις ποσοτικοποίησης του εκάστοτε αιθερίου ελαίου, συγκεκριμένα των συστατικών του, αυτή έγινε μέσω καμπυλών αναφοράς οι οποίες κατασκευάστηκαν από διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (ppm) για το κάθε αιθέριο έλαιο ξεχωριστά. Οι καμπύλες αναφοράς του εκάστοτε ελαίου αναφέρονται σε κάθε ένα από τα κύρια συστατικά του, όπως αυτά έχουν προσδιορισθεί. Συνεπώς, οι μάζες ΕΟ, είτε του εγκλεισμένου είτε του μη

εγκλεισμένου ΕΟ, όπως αναφέρονται παρακάτω, αποτελούν το άθροισμα των επιμέρους κύριων συστατικών.

2.5 Χαρακτηρισμός παραγόμενων μικρο- και νάνο- συστημάτων

2.5.1 Μέγεθος σωματιδίων και ζ-δυναμικό

Η μέτρηση στις υδροδυναμικής διαμέτρου των συστημάτων εγκλεισμού, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού πραγματοποιείται μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS, ZetaSizer Nano ZS) μετά από κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος. Κατά την προετοιμασία, 1 mg δείγματος διασπείρεται σε 20 mL υπερκάθαρο νερό και ακολουθούν υπέρηχοι για 2 min.

Στην συνέχεια, λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα από την διασπορά και εισάγεται σε κυψελίδα τύπου Y (DTS1070).

Από το όργανο λαμβάνονται τρεις μετρήσεις για την υδροδυναμική διάμετρο, τρεις για τον δείκτη πολυδιασποράς και τρεις για το ζ-δυναμικό.



Εικόνα 33. Συσκευή ZetaSizer Nano ZS, για τις μετρήσεις DLS.

2.5.2 Φασματομετρία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Για την λήψη φασμάτων υπέρυθρης ακτινοβολίας με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) χρησιμοποιείται το όργανο Buker Alpha II, με την μέθοδο ATR. Το δείγμα δεν απαιτεί κάποια προεργασία.

Φάσματα λαμβάνονται τόσο για τα συστήματα εγκλεισμού και του φορείς εγκλεισμού σε στερεή μορφή καθώς και για τα αιθέρια έλαια, ΕΟs, με την ίδια διαδικασία.

Με χρήση κατάλληλου λογισμικού λαμβάνονται τα απαραίτητα φάσματα για την περαιτέρω μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φορέα και ΕΟ.



Εικόνα 34. Συσκευή Bruker, Alpha II για την λήψη φασμάτων FTIR.

2.5.3 Απελευθέρωση αιθερίου ελαίου από το σύστημα εγκλεισμού

Για την μελέτη απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου απαιτείται κατάλληλη προετοιμασία δείγματος. Αρχικά, ρυθμίζεται το pH της υδατικής φάσης υπερκάθαρου νερού όγκου 100 mL, η οποία θα αποτελέσει το μέσο διασποράς του συστήματος εγκλεισμού, με ρυθμιστικό διάλυμα K_2HPO_4 - KH_2PO_4 ίσο με 7.4. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 προκειμένου να προσομοιάζει το φυσιολογικό pH για εφαρμογή της διασποράς των συστημάτων εγκλεισμού ως εντομοκτόνα. Στην συνέχεια, ζυγίζονται 100 mg ξηρής μάζας συστήματος εγκλεισμού και διασπείρονται στην παραπάνω υδατική φάση.

Η διασπορά τοποθετείται προς ήπια ανάδευση, 200 rpm, σε θερμοκρασία 35 °C. Οι συνθήκες επιλέγονται έτσι ώστε να προσομοιάζουν το περιβάλλον εφαρμογής. Σε συγκριμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνεται ποσότητα 1 mL από την διασπορά, τοποθετείται σε Eppendorf tubes και ακολουθεί φυγοκέντρωση.

Η φυγοκέντρωση (SORVALL LYNX 6000) πραγματοποιείται για 15 min, σε 15.000 rpm και θερμοκρασία 15 °C για τα συστήματα με β-κυκλοδεξτρίνη και κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* ως φορείς εγκλεισμού. Για τον εγκλεισμό με χιτοζάνη ως φορέα ή ως μέσο επικάλυψης οι στροφές που χρησιμοποιούνται είναι 28.000 rpm. Τα υπερκείμενα υγρά συλλέγονται και αξιοποιούνται, μετά την ανάμειξή τους με την φάση του εξανίου, για μέτρηση του απελευθερωμένου ΕΟ μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Το στερεό, που μένει από την φυγοκέντρωση, επαναδιασπείρεται σε 1 mL υπερκάθαρο νερό και επανατοποθετείται στην υπόλοιπη διασπορά που αναδεύεται. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για κάθε χρονική στιγμή.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

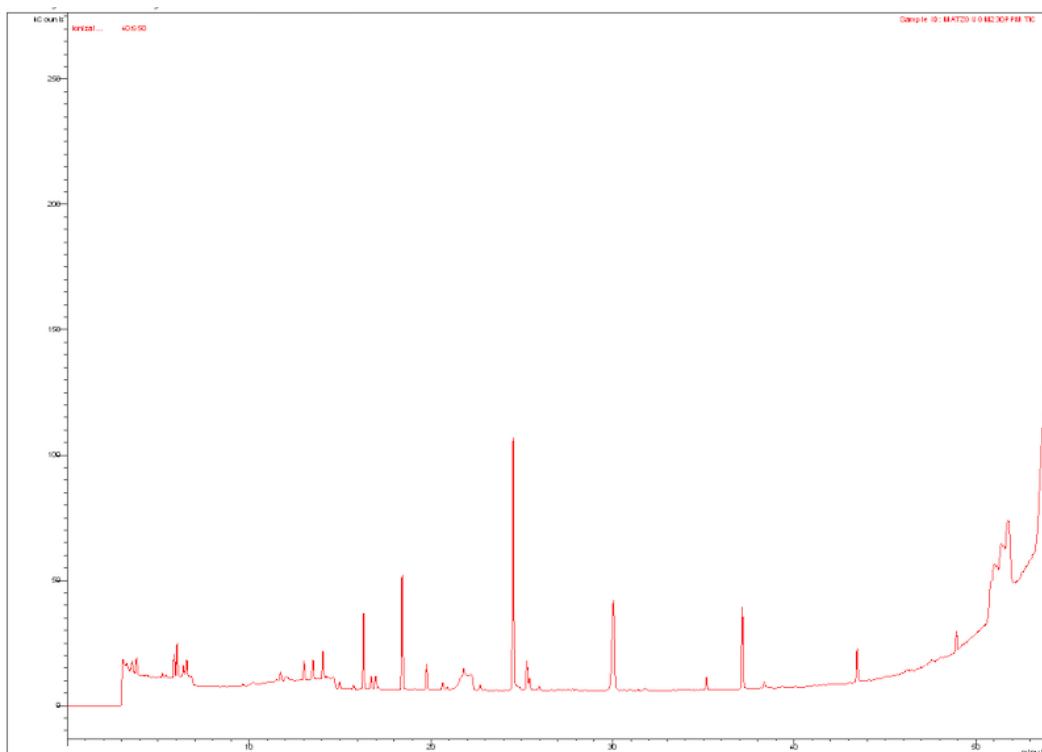
3.1 Ανάλυση χημικής σύστασης αιθέριων ελαίων GC-MS

Origanum Majorana (OM2)

Η ανάλυση της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (OM2) υποδεικνύει ότι τα κύρια συστατικά του, με βάση την περιεκτικότητά του σε αυτά, είναι το α-τερπινένιο, το γ-τερπινένιο, η τερπινεν-4-όλη και η α-τερπινεόλη. Οι χρόνοι ανάσχεσης είναι 8.4 min, 9.8 min, 14.7 min και 15.3 min, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα διασταυρώνονται τόσο από την βιβλιογραφία όσο και από την βιβλιοθήκη του οργάνου συζευγμένης χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται.

Πίνακας 6. Ανάλυση χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (OM2).

Compound	Rt (min)	Composition %
α-Thujene	5.7	1.3
Sabinene	7.0	4.4
β-Myrcene	7.5	1.2
α-Terpinene	8.4	10.7
p-Cymene	8.6	1.4
p-Mentha-1(7),2-diene	8.8	3.1
γ-Terpinene	9.8	17.3
Terpinolene	10.9	3.6
Linalool(+trans-sabinene hydrate)	11.4	1.2
cis-p-Menth-2-en-1-ol	12.4	1.2
Terpinen-4-ol	14.7	40.6
α-Terpineol	15.3	5.3
β-Caryophyllene	24.8	2.0
Elixene	27.9	1.1
Σύνολο		94.4



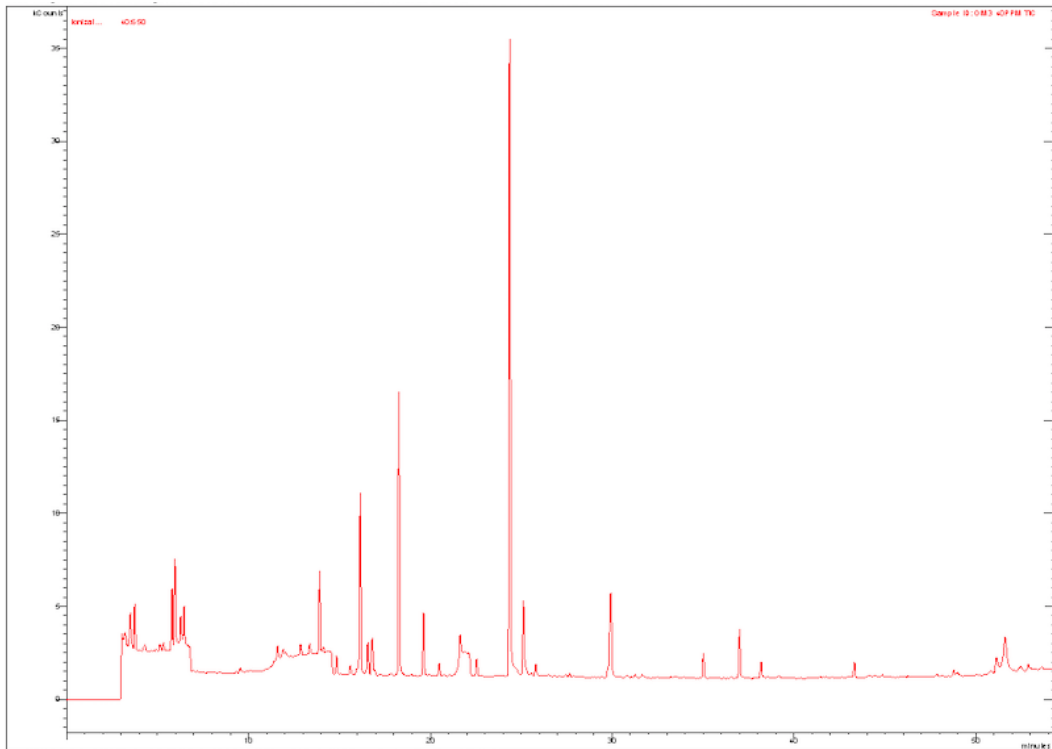
Εικόνα 35: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (OM2).

Origanum Majorana (OM3)

Αντίστοιχα, η ανάλυση της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (OM3) υποδεικνύει ότι τα κύρια συστατικά του, με βάση την περιεκτικότητά του σε αυτά, είναι τα ίδια με το *Origanum Majorana* (OM2). Μάλιστα αυτά εμφανίζουν και τους ίδιους χρόνους ανάσχεσης. Η διαφορά των δύο ελαίων, OM2 και OM3, βρίσκεται στην διαφορετική περιεκτικότητα των κυρίων συστατικών τους, με το OM2 να περιέχει υψηλότερη αναλογία σύνθεσης σε γ-τερπινένιο και α-τερπινεόλη, χαμηλότερη σε τερπινεν-4-όλη και ίδια σε α-τερπινένιο.

Πίνακας 7. Ανάλυση χημικής σύστασης αιθέριου ελαίου *Origanum Majorana* (OM3).

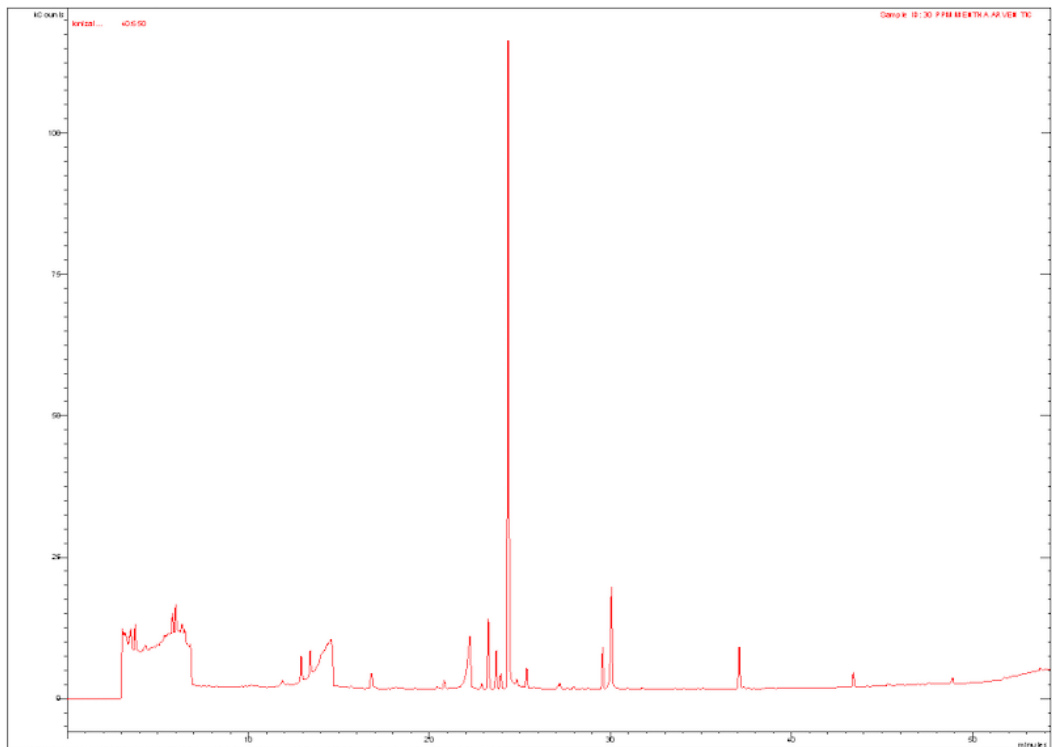
Compound	Rt (min)	Composition %
Sabinene	7.0	5.2
β-Myrcene	7.5	1.2
α-Terpinene	8.4	10.7
p-Mentha-1(7),2-diene	8.8	2.8
γ-Terpinene	9.8	16.8
Terpinolene	10.9	3.4
cis-p-Menth-2-en-1-ol	12.4	1.4
Trans-p-Menth-2-en-1-ol	13.1	1.2
Terpinen-4-ol	14.7	44.2
α-Terpineol	15.3	5.1
β-Caryophyllene	24.8	1.4
Σύνολο		93.4



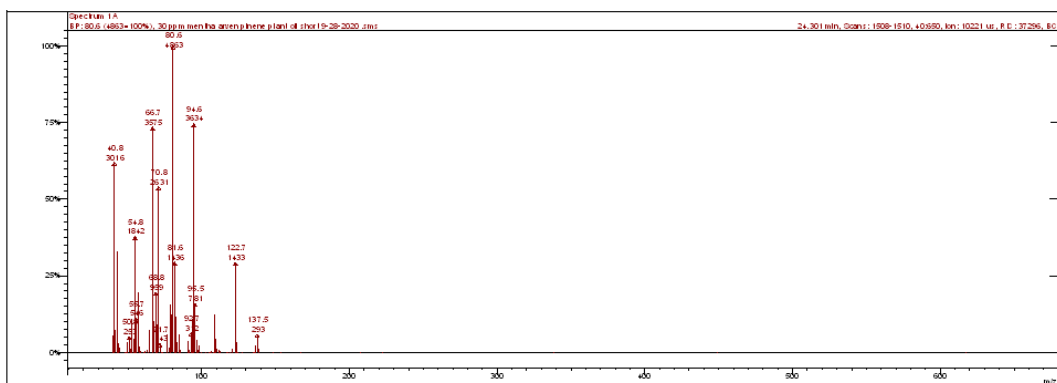
Εικόνα 36: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (OM3).

Mentha Arvensis

Το αιθέριο έλαιο *Mentha Arvensis* έχει ως κύριο συστατικό την μενθόλη, η οποία βρίσκεται σε περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 50% στο έλαιο και ο χρόνος ανάσχεσής της είναι 24.4 min.



Εικόνα 37: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου *Mentha Arvensis* (MA).



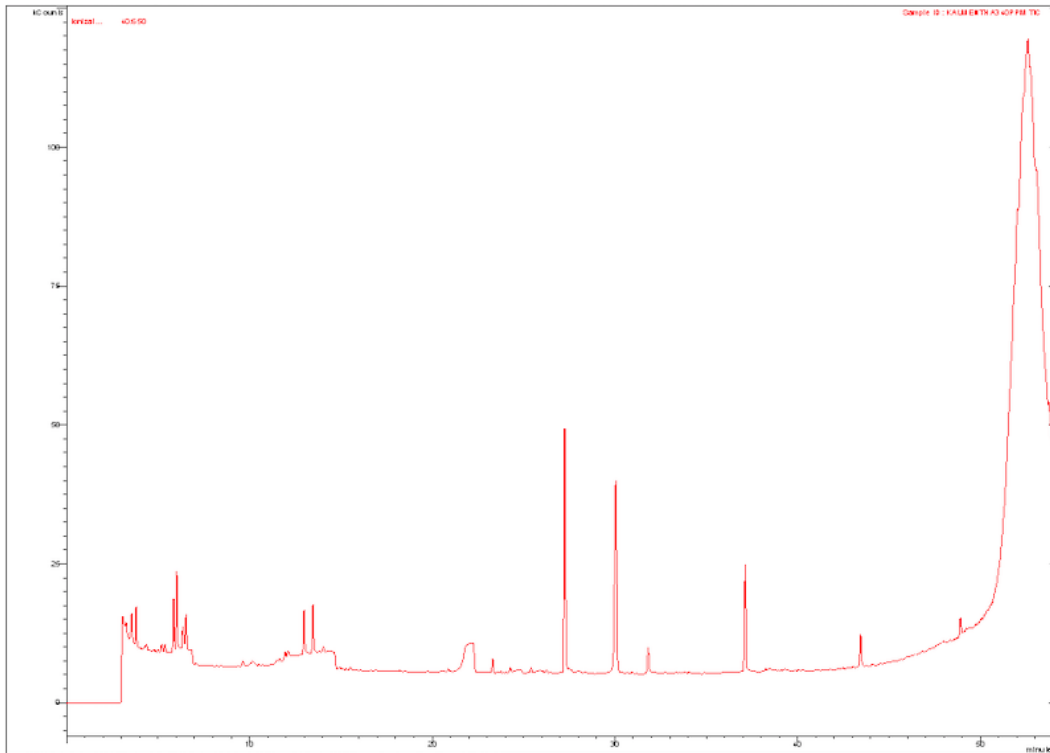
Εικόνα 38: Φάσμα MS της μενθόλης.

Mentha Pulegium

Η ανάλυση της χημικής σύστασης του αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium* υποδεικνύει ότι τα κύρια συστατικά του, με βάση την περιεκτικότητά του σε αυτά, είναι η πουλεγόνη και η πιπεριτενόνη. Οι χρόνοι ανάσχεσης είναι 17.2 min και 21.4 min, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα διασταυρώνονται τόσο από την βιβλιογραφία όσο και από την βιβλιοθήκη του οργάνου συζευγμένης χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται.

Πίνακας 8. Ανάλυση χημικής σύστασης αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium*.

Compound	Rt (min)	Composition %
3-Octanol	7.7	1.1
Isomenthone	13.7	3.8
Isopulegone	14.5	1.8
cis-Pulegone Oxide	16.2	1.4
Pulegone	17.2	73.9
Piperitenone	21.4	14.0
Σύνολο		96



Εικόνα 39: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium* (MP).

3.2 Αποδόσεις των διεργασιών εγκλεισμού

3.2.1 Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού

Για τον υπολογισμό της απόδοσης διεργασίας εγκλεισμού στο εκάστοτε σύστημα λαμβάνονται οι παρακάτω εξισώσεις:

Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε β-κυκλοδεξτρίνη

$$\text{Απόδοση}_{\beta\text{-CD:EO}} = \frac{\text{μάζα ανακτώμενων σωματιδίων}}{\text{μάζα } \beta\text{-CD} + \text{μάζα EO}} * 100\% \quad (7)$$

Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*

$$\text{Απόδοση}_{S.cerevisiae:EO} = \frac{\text{μάζα ανακτώμενων σωματιδίων}}{\text{μάζα πλασμολυμένων κυττάρων } S.cerevisiae + \text{μάζα EO}} * 100\% \quad (8)$$

Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε χιτοζάνη

$$\text{Απόδοση}_{CS:EO} = \frac{\text{μάζα ανακτώμενων σωματιδίων}}{\text{μάζα CS} + \text{μάζα EO} + \text{μάζα TPP}} * 100\% \quad (9)$$

Απόδοση διεργασίας επικάλυψης με χιτοζάνη κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο

$$\text{Απόδοση}_{CS:S.cerevisiae:EO} = \frac{\text{μάζα ανακτώμενων σωματιδίων}}{\text{μάζα CS} + \text{μάζα TPP} + \text{μάζα S.cerevisiae:EO}} * 100\% \quad (10)$$

Οι αποδόσεις διεργασίας υπολογίζονται ξεχωριστά για κάθε σύστημα με αναφορά το εκάστοτε αιθέριο έλαιο.

Origanum Majorana (OM2)

Πίνακας 9. Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana (OM2)*.

Σύστημα Εγκλεισμού	Μάζα β-CD (mg)	Μάζα <i>S.cerevisiae</i> (mg)	Μάζα ULMW (mg)	Μάζα TPP (mg)	Μάζα EO (mg)	Μάζα <i>S.cerevisiae:EO</i> (mg)	Απόδοση διεργασίας
β-CD:OM2	250.0	-	-	-	62.5	-	79%
<i>S.cerevisiae:OM2</i>	-	351.3	-	-	351.3	-	54%
CS: <i>S.cerevisiae:OM2</i>	-	-	300.0	42.0	-	150.0	44%

Origanum Majorana (OM3)

Πίνακας 10. Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana (OM3)*.

Σύστημα εγκλεισμού	Μάζα β-CD (mg)	Μάζα <i>S.cerevisiae</i> (mg)	Μάζα ULMW (mg)	Μάζα TPP (mg)	Μάζα EO (mg)	Μάζα <i>S.cerevisiae:EO</i> (mg)	Απόδοση διεργασίας
β-CD:OM3	500.0	-	-	-	125.0	-	73%
<i>S.cerevisiae:OM3</i>	-	301.0	-	-	301.0	-	61%
CS: <i>S.cerevisiae:OM3</i>	-	-	280.0	39.2	-	140.0	36%

Mentha Arvensis (MA)

Πίνακας 11. Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου *Mentha Arvensis (MA)*.

Σύστημα εγκλεισμού	Μάζα β-CD (mg)	Μάζα <i>S.cerevisiae</i> (mg)	Μάζα ULMW (mg)	Μάζα TPP (mg)	Μάζα EO (mg)	Μάζα <i>S.cerevisiae:EO</i> (mg)	Απόδοση διεργασίας
β-CD:MA	800.0	-	-	-	200.0	-	93%
<i>S.cerevisiae:MA</i>	-	500.0	-	-	500.0	-	52%
CS:MA	-	-	300.0	42.0	120.0	-	28%
CS: <i>S.cerevisiae:MA</i>	-	-	300.0	42.0	-	150.0	44%

Mentha Pulegium (MP)

Πίνακας 12. Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium (MP)*.

Σύστημα εγκλεισμού	Μάζα β-CD (mg)	Μάζα <i>S.cerevisiae</i> (mg)	Μάζα ULMW (mg)	Μάζα TPP (mg)	Μάζα EO (mg)	Μάζα <i>S.cerevisiae:EO</i> (mg)	Απόδοση διεργασίας
β-CD:MP	800.0	-	-	-	200.0	-	66%
<i>S.cerevisiae:MP</i>	-	673.5	-	-	673.5	-	66%

Με βάση τα αποτελέσματα των Πινάκων 9-12, διαπιστώνεται πως οι υψηλότερες αποδόσεις επιτυγχάνονται στα συστήματα εγκλεισμού που έχουν ως φορέα την β-κυκλοδεξτρίνη ενώ οι χαμηλότερες στα συστήματα εγκλεισμού με φορέα την χιτοζάνη και την επικάλυψη με αυτή των κυττάρων ζυμομύκητα με εγκλεισμένο το αιθέριο έλαιο. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην πειραματική διαδικασία που απαιτείται για την δημιουργία του κάθε συστήματος εγκλεισμού καθώς αυτά με τις υψηλότερες αποδόσεις, δηλαδή τα β-CD:EO, αποτελούνται από λιγότερα στάδια καθώς και από λιγότερο απαιτούμενο πειραματικό εξοπλισμό, κατά την χρήση του οποίου παρατηρούνται απώλειες.

Επιπλέον, τόσο στην περίπτωση των νανοσωματιδίων χιτοζάνης όσο και των μικροσωματιδίων των κυττάρων *S. cerevisiae* με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο τα οποία επικαλύπτονται με χιτοζάνη, η απόδοση είναι μικρότερη. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην δυσκολία επαναδιασποράς των συστημάτων με χιτοζάνη και στη τάση αυτής για προσκόλληση σε επιφάνειες .

3.2.2 Απόδοση εγκλεισμού

Όπως έχει αναφερθεί, στην απόδοση εγκλεισμού υπολογίζεται η ποσότητα του αιθερίου ελαίου που τελικά έχει εγκλειστεί στο σύστημα εγκλεισμού σε σχέση με την αρχική ποσότητα που προστέθηκε στον φορέα και συνεπώς στο σύστημα. Η κατάλληλη απόδοση εγκλεισμού, άμεση είτε έμμεση, που χρησιμοποιείται για το εκάστοτε σύστημα εγκλεισμού έχει αναφερθεί παραπάνω.

Η άμεση απόδοση, τελικά, υπολογίζεται από την εξίσωση 11:

$$Direct EE\% = \frac{\text{μάζα EO που εγκλείστηκε}}{\text{αρχική μάζα EO}} * 100\% \quad (11)$$

Η έμμεση απόδοση υπολογίζεται από την εξίσωση 12:

$$Indirect EE\% = \frac{\text{αρχική μάζα EO} - \text{μάζα EO που δεν εγκλείστηκε}}{\text{αρχική μάζα EO}} * 100\% \quad (12)$$

Έτσι, ποσοτικοποιείται η ζητούμενη ποσότητα αιθερίου ελαίου σε κάθε σύστημα και υπολογίζονται οι αντίστοιχες αποδόσεις, όπως παρουσιάζονται στους Πίνακες 13-20.

Origanum Majorana (OM2)

Πίνακας 13. Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana (OM2)*.

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα EO (mg)	Μάζα EO που εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού
β-CD:OM2	62.5	24.5	39%

Στο εν λόγω σύστημα εγκλεισμού, υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού παρουσιάζουν η τερπινεν-4-όλη και η α-τερπινεόλη, οι οποίες αποτελούν περισσότερο από 50% του εγκλεισμένου ελαίου.

Πίνακας 14. Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Origanum Majorana* (OM2).

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που δεν εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού
<i>S.cerevisiae:OM2</i>	351.3	194.1	45%
CS: <i>S.cerevisiae:OM2</i>	67.0	2.3	96%

Στην περίπτωση χρήσης ως φορέα εγκλεισμού τον ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, φαίνεται ότι τα συστατικά α-τερπινένιο και γ-τερπινένιο είναι αυτά που παρουσιάζουν υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού, με αποδόσεις εγκλεισμού μεγαλύτερες από 90%.

Origanum Majorana (OM3)

Πίνακας 15. Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Origanum Majorana* (OM3).

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού
β-CD:OM3	125.0	21.8	18%

Στην περίπτωση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου OM3 σε β-κυκλοδεξτρίνη, τα συστατικά α-τερπινεόλη και α-τερπινένιο παρουσιάζουν τις υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού.

Πίνακας 16. Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Origanum Majorana* (OM3).

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που δεν εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού
<i>S.cerevisiae:OM3</i>	301.0	6.3	98%
CS: <i>S.cerevisiae:OM3</i>	68.5	2.5	98%

Στην περίπτωση εγκλεισμού σε ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, τα κύρια συστατικά παρουσιάζουν πολύ υψηλές αποδόσεις εγκλεισμού, με την α-τερπινεόλη να παρουσιάζει την χαμηλότερη απόδοση, η οποία ωστόσο είναι μεγαλύτερη από 80%.

Mentha Arvensis (MA)

Πίνακας 17. Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Mentha Aevensis* (MA).

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού
β-CD:MA	200.0	165.0	83%

Πίνακας 18. Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Mentha Aevensis* (MA).

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που δεν εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού
<i>S.cerevisiae:MA</i>	500.0	7.2	99%
CS:MA	120.0	62.4	48%
CS: <i>S.cerevisiae:MA</i>	73.9	0.7	99%

Με βάση τους Πίνακες 17 και 18, προκύπτει ότι ο η μενθόλη, που αποτελεί το βασικό συστατικό του ελαίου *Mentha Arvensis*, εγκλείεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα κύτταρα ζυμομύκητα *S. cerevisiae* και καθώς και στην επικάλυψη αυτών με χιτοζάνη. Το χαμηλότερο ποσοστό εγκλεισμού διαπιστώνεται στον εγκλεισμό της σε νανοσωματίδια χιτοζάνης.

Mentha Pulegium (MP)

Πίνακας 19. Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium* (MP).

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού
β-CD:MP	150.0	116.3	78%

Στην περίπτωση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium* σε β-κυκλοδεξτρίνη η πιπεριτενόνη εμφανίζει σχεδόν διπλάσια απόδοση εγκλεισμού από την πουλεγόνη, παρά την υψηλότερη περιεκτικότητα της τελευταίας στο αιθέριο έλαιο, όπως αυτή βρέθηκε από τις μελέτες στο GC-MS που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 20. Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium* (MP).

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που δεν εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού
<i>S.cerevisiae:MP</i>	673.5	239.5	64%

Από τους Πίνακες 13-20, παρατηρείται ότι τα συστήματα εγκλεισμού που φέρουν ως φορέα εγκλεισμού κύτταρα ζυμομύκητα *S. cerevisiae* έχουν υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού συγκριτικά με αυτά που έχουν φορέα εγκλεισμού την β-κυκλοδεξτρίνη, σε τρία από τα τέσσερα αιθέρια έλαια που αξιοποιούνται ως ουσίες εγκλεισμού (εξάιρεση αποτελεί το *Mentha Pulegium*).

Πιο συγκεκριμένα, από τα έλαια του γένους *Majorana*, το *Origanum Majorana* (OM2) εμφανίζει υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού στην β-κυκλοδεξτρίνη και χαμηλότερες στον ζυμομύκητα *S. cerevisiae* καθώς και στην επικάλυψη αυτού, σε σχέση με το *Origanum Majorana* (OM3).

Από τα έλαια του γένους *Mentha*, το *Mentha Arvensis* εμφανίζει υψηλότερες αποδόσεις από το *Mentha Pulegium* στους φορείς εγκλεισμού β-CD και τα κύτταρα ζυμομύκητα *S.cerevisiae*.

Μάλιστα, το έλαιο *Mentha Arvensis* παρουσιάζει τις υψηλότερες αποδόσεις από όλα τα υπόλοιπα έλαια σε κάθε φορέα εγκλεισμού, με τιμές που ξεπερνάνε το 90%.

Επιπλέον, όπως διαπιστώθηκε προηγουμένως, τα συστατικά α-τερπινεόλη και τερπινεν-4-όλη εμφανίζουν υψηλότερη αλληλεπίδραση με τα μόρια της β-κυκλοδεξτρίνης από ότι με τα κύτταρα ζυμομύκητα. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην χημική δομή και στις φυσικοχημικές ιδιότητες των εν λόγω μορίων καθώς και στον τύπο αλληλεπίδρασής τους με τον φορέα β-CD. Έτσι εξηγείται η διαφορετική συγκράτηση των διαφορετικών κύριων συστατικών στην β-CD και στους άλλους φορείς εγκλεισμού.

Ακόμη, η εργασία των Lawtrakul, Inthajak, & Toochinda, 2014, περιγράφει ένα μοριακό μοντέλο συμπλόκου εγκλεισμού β-CD με ένα παράγωγο αιθέριου ελαίου, ως δίπολο-δίπολο, van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Αυτή η τεχνική μας επέτρεψε να προσδιοριστούν οι ενέργειες δέσμησης των β-CD/αιθέριων ελαίων που ήταν με την ακόλουθη σειρά: ευγενόλη – β-CD > μεθυλ ευγενόλη – β-CD > λιναλοόλη – β-CD > οιστραγόλη – β-CD > ευκαλυπτόλη – β-CD. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις μεταξύ β-CD και μορίων με αρωματικές και -OH ομάδες.^[42] Συνεπώς, η ευνοϊκότερη αλληλεπίδραση των συστατικών της α-τερπινεόλης και τερπινεν-4-όλης μπορεί να αποδοθεί στην χημική τους δομή και στην παρουσία της ομάδας -OH στο μόριό τους. Αντίστοιχα, η υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού της πιπεριτενόνης στην β-CD από την πουλεγόνη μπορεί να δικαιολογηθεί στον περισσότερο αρωματικό της χαρακτήρα.

Αντίστοιχα, το α-τερπινένιο και το γ-τερπινένιο εμφανίζουν υψηλότερες αποδόσεις όταν εγκλείονται σε κύτταρα ζυμομύκητα το οποίο με βάση την χημική τους δομή μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη λιποφιλία τους σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά.

Επιπροσθέτως, οι υψηλότερες αποδόσεις των εγκλεισμών των αιθερίων ελαίων σε κύτταρα ζυμομύκητα *S. cerevisiae* έναντι της β-CD μπορεί, πιθανότατα, να αποδοθεί στον διαφορετικό μηχανισμό εγκλεισμού των ΕOs σε κάθε περίπτωση, δηλαδή στην παθητική διάχυση έναντι της στοιχειομετρικής μοριακής αντίδρασης των μορίων β-CD με το εκάστοτε μόριο προς εγκλεισμό.^[42]

Η χημική δομή της μενθόλης καθώς και η υψηλή της παρουσία στο έλαιο εξηγεί, αντίστοιχα, την υψηλή της απόδοση στον εγκλεισμό σε β-CD αλλά και στα κύτταρα ζυμομύκητα. Όσο για τις διαφορές ανάμεσα στα αιθέρια έλαια ίδιου γένους αλλά και συγκριτικά για όλα τα αιθέρια έλαια, όποιες άλλες διαφορές στις αποδόσεις εγκλεισμού ίσως οφείλονται και στα δευτερεύοντα συστατικά τα οποία δεν εξετάζονται περαιτέρω.

Τέλος, οι αποδόσεις εγκλεισμού στην περίπτωση της επικάλυψης των συστημάτων *S. cerevisiae*:ΕΟ με χιτοζάνη αυξάνονται σε σχέση με τα μη επικαλυμμένα συστήματα *S. cerevisiae*: ΕΟ, ενώ φτάνουν τιμές που πλησιάζουν το 100%. Αυτό υποδηλώνει ότι το στρώμα χιτοζάνης καλύπτει τους πόρους των κυττάρων ζυμομύκητα και περιορίζει την διαρροή του αιθερίου ελαίου και των κύριων συστατικών του από τα διάφορα συστήματα εγκλεισμού. Όμοια συμπεράσματα παρατηρούνται και στην έρευνα του Chen Tan και των συνεργατών του (2021).^[43]

3.3 Μέγεθος και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού

Το μέγεθος των νανο- και μικρο- σωματιδίων καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητά τους να αξιοποιούνται στις διάφορες εφαρμογές. Είναι μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους των συστημάτων εγκλεισμού καθώς επηρεάζει την φύση και τα χαρακτηριστικά τους, όπως τα επιφανειακά χαρακτηριστικά, την φυσικοχημική τους σταθερότητα, την φόρτωση και την στοχευμένη απελευθέρωση του δραστικού συστατικού με το αντίστοιχο προφίλ απελευθέρωσής του.^{[44]-[48]} Επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό των συστημάτων εγκλεισμού αποτελεί το ζ δυναμικό των νανο- και μικρο- σωματιδίων καθώς αυτό απεικονίζει το δυναμικό της διασποράς στην επιφάνεια των σωματιδίων και κατά συνέπεια καθορίζει την μακροπρόθεσμη σταθερότητά του. Καθώς η απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού αυξάνεται, τόσο μεγαλύτερες είναι οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ τους, μειώνοντας την τάση τους να συσσωματώνονται.^[49]

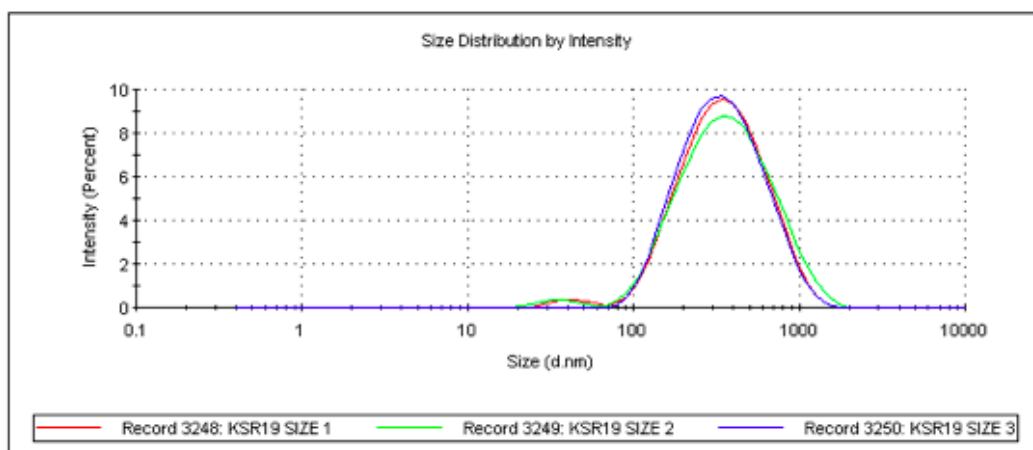
Ο δείκτης πολυδιασποράς αντιπροσωπεύει την διακύμανση του μεγέθους των νανοσωματιδίων και πρέπει να λαμβάνει τιμές μικρότερες από 0.5 ώστε το σύστημα εγκλεισμού να θεωρείται αποδεκτό.^[50]

Ο χαρακτηρισμός των κύριων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων, δηλαδή του μεγέθους τους και του ζ-δυναμικού, πραγματοποιείται μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Ως αποτελέσματα λαμβάνονται τρεις μετρήσεις για κάθε ένα από τα μεγέθη: υδροδυναμική διάμετρος των νανοσωματιδίων (Size), δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό (Zeta Potential). Οι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων αυτών και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις παρουσιάζονται στους Πίνακες 21-24.

Origanum Majorana (OM2)

Πίνακας 21. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο *Origanum Majorana* (OM2).

Σύστημα εγκλεισμού	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
β-CD:OM2	278.5 ± 34.4	0.338 ± 0.041	-31.1 ± 7.2
S.cerevisiae:OM2	2109.0 ± 584.1	-	-14.9 ± 1.6
CS:S.cerevisiae:OM2	431.0 ± 83.2 3551.3 ± 177.6	0.438 ± 0.011	26.8 ± 10.3

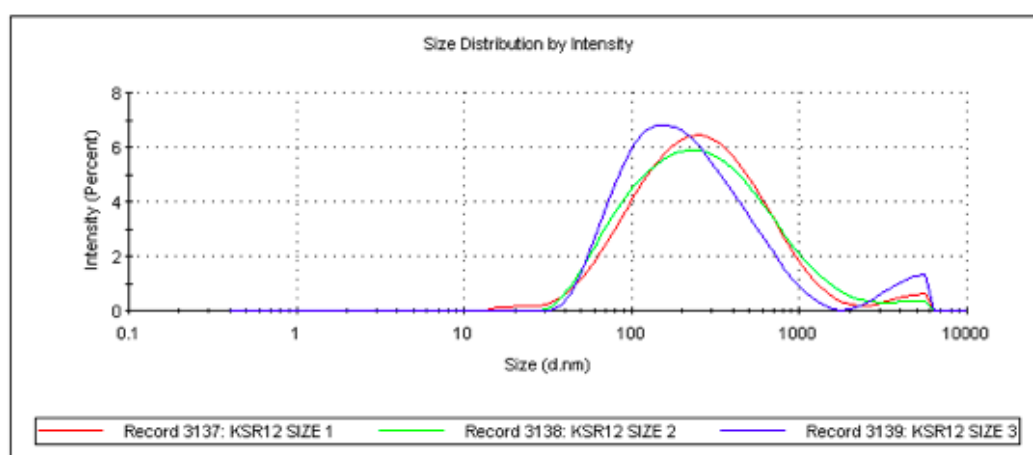


Εικόνα 40: Κατανομή μεγέθους συστήματος εγκλεισμού *S. cerevisiae:OM2*.

Origanum Majorana (OM3)

Πίνακας 22. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο *Origanum Majorana (OM3)*.

Σύστημα εγκλεισμού	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
β -CD:OM3	174.9 ± 16.7	0.498 ± 0.032	-21.4 ± 2.8
<i>S.cerevisiae:OM3</i>	1422.0 ± 472.6	-	-18.1 ± 2.7
CS: <i>S.cerevisiae:OM3</i>	379.2 ± 1.7 3233.7 ± 14.0	0.487 ± 0.080	15.8 ± 0.1



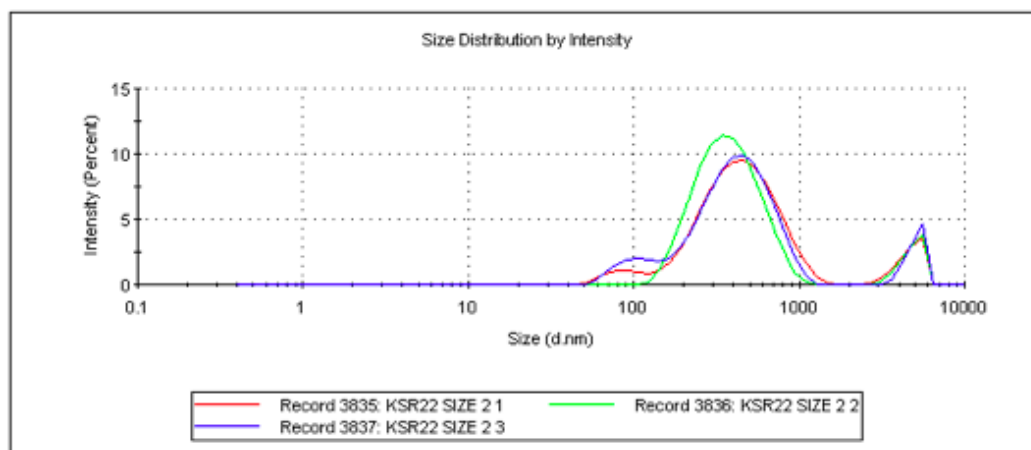
Εικόνα 41: Κατανομή μεγέθους συστήματος εγκλεισμού β -CD:OM3.

Mentha Arvensis (MA)

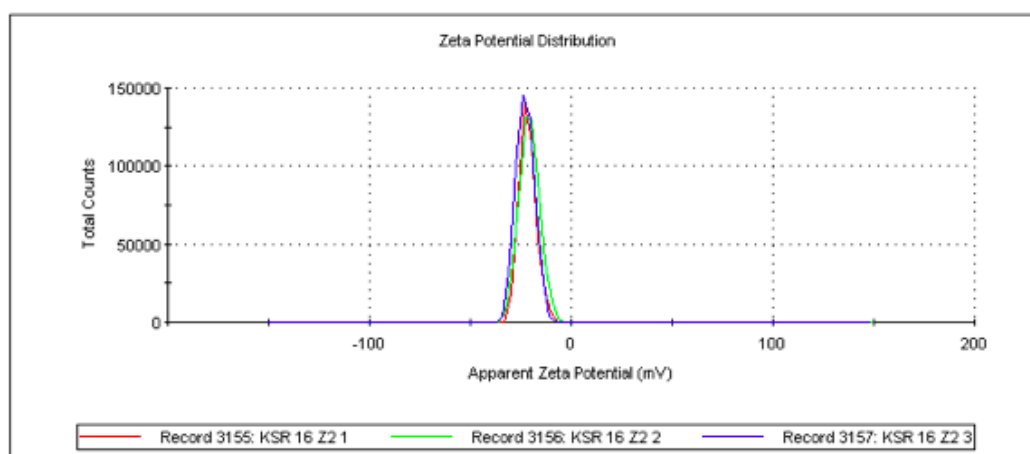
Πίνακας 23. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο *Mentha Arvensis (MA)*.

Σύστημα εγκλεισμού	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
β -CD:MA	378.7 ± 11.3	0.353 ± 0.005	-29.5 ± 2.0

<i>S.cerevisiae:MA</i>	1171 ± 260.0	-	-23.7 ± 1.7
CS:MA	276.6 ± 58.3	0.360 ± 0.133	19.7 ± 9.0
CS: <i>S.cerevisiae:MA</i>	407.7 ± 12.9 4832.7 ± 170.5	0.390 ± 0.089	23.0 ± 4.5



Εικόνα 42: Κατανομή μεγέθους συστήματος εγκλεισμού CS:*S. cerevisiae:MA*.

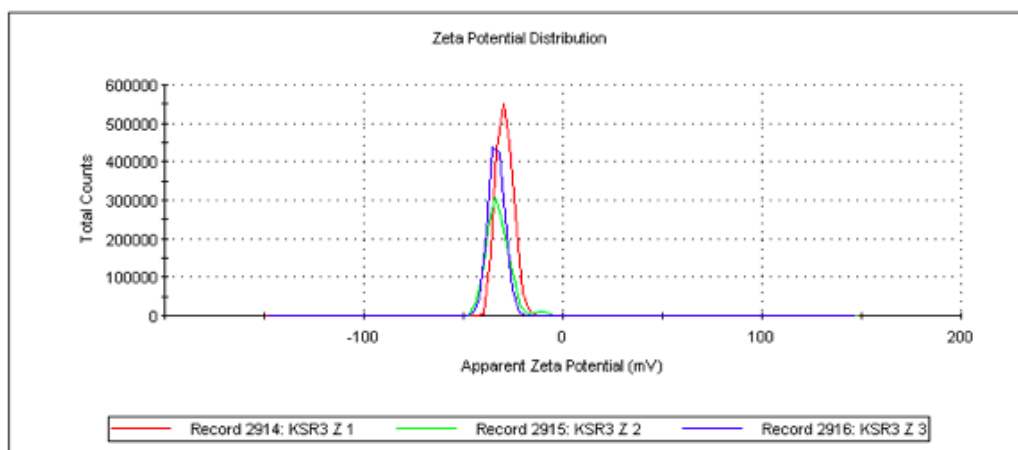


Εικόνα 43: Κατανομή ζ-δυναμικού του συστήματος εγκλεισμού *S. cerevisiae:MA*.

Mentha Pulegium (MP)

Πίνακας 24. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο *Mentha Pulegium (MP)*.

Σύστημα εγκλεισμού	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
β-CD:MP	623.8 ± 37.5	0.512 ± 0.023	-21.0 ± 2.5
<i>S.cerevisiae:MP</i>	4858.0 ± 445.5	-	-12.9 ± 1.2



Εικόνα 44: Κατανομή ζ-δυναμικού του συστήματος εγκλεισμού β-CD:MP.

Όπως παρατηρείται, τα νανοσωματίδια με φορέα εγκλεισμού την β-κυκλοδεξτρίνη εμφανίζουν μέση διάμετρο στο εύρος $174.9 \pm 16.7 \text{ nm} - 623.8 \pm 37.5 \text{ nm}$ με τιμές PDI να κυμαίνονται από $0.338 \pm 0.041 - 0.512 \pm 0.023$.

Η μεταβλητότητα στο PDI θα μπορούσε να οφείλεται στην τάση των συμπλόκων εγκλεισμού β-CD να συσσωματώνονται. Η ισχυρή τάση για συσσωμάτωση είναι συνέπεια της αυτοσυναρμολόγησης της β-CD στο νερό λόγω της έλλειψης σημαντικού καθαρού φορτίου στα σύμπλοκα εγκλεισμού, πράγμα που σημαίνει ότι δεν υπάρχουν απωστικές δυνάμεις για την πρόληψη της συσσωμάτωσής τους.^[51] Ωστόσο, οι λαμβανόμενες τιμές μεγέθους ήταν πολύ μικρότερες από αυτές που βρέθηκαν από την Hill L.E. et al. (2013) για διαφορετικά συστήματα εγκλεισμού, με την περίπτωση εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium* να πλησιάζει περισσότερο τις πειραματικές τιμές της Hill L.E. et al. (2013).^[51] Σε κάθε περίπτωση, όμως, για τιμές ζ δυναμικού να κυμαίνονται από $-21.0 \pm 2.5 \text{ mV} - -31.1 \pm 7.2 \text{ mV}$ φαίνεται τα συστήματα εγκλεισμού να παρουσιάζουν ικανοποιητική σταθερότητα, με χαμηλή τάση συσσωμάτωσης, βάση των βιβλιογραφικών δεδομένων κατά τα οποία διασπορές με ζ δυναμικό με τιμή μεγαλύτερη από 30 mV ή μικρότερη από -30 mV θεωρούνται σταθερές.^[52]

Τα μικροσωματίδια με φορέα εγκλεισμού τα κύτταρα ζυμομύκητα *S. cerevisiae* εμφανίζουν μέση διάμετρο στο εύρος $1171 \pm 260.0 \text{ nm} - 4858.0 \pm 445.5 \text{ nm}$. Η τάξη μεγέθους των συστημάτων εγκλεισμού με φορέα τον ζυμομύκητα *S. cerevisiae* συμφωνεί με αυτή που βρέθηκε σε ανάλογο σύστημα με εγκλεισμένη ουσία την κουρκουμίνη^[53]. Οι τιμές του ζ δυναμικού έχουν ένα εύρος από $-12.9 \pm 1.2 \text{ mV} - -23.7 \pm 1.7 \text{ mV}$ με αποτέλεσμα την ύπαρξη ικανοποιητικής σταθερότητας για τα μικροσωματίδια, με αυτά με την μικρότερη διάμετρο να λαμβάνουν και τις υψηλότερες τιμές (πιο αρνητικές) του ζ δυναμικού από το προαναφερθέν εύρος. Τα αποτελέσματα της συσχέτισης μεταξύ διαμέτρου σωματιδίων και τιμή ζ δυναμικού συμφωνεί με την εργασία της Elenis Kaventsou και των συνεργατών της (2019), όπου φαίνεται πως τα μικροσωματίδια με μεγαλύτερη διάμετρο έχουν μεγαλύτερη τάση συσσωμάτωσης και μικρότερες τιμές ζ δυναμικού.^[54] Μάλιστα, τα συστήματα με την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού εμφανίζουν και τις μικρότερες διαμέτρους και ταυτόχρονα την υψηλότερη τιμή (αρνητικού) δυναμικού. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με την παραδοχή ότι το εγκλεισμένο έλαιο

αλληλοεπιδρά έντονα με τα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης του ζυμομύκητα, το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία.^[54]

Σχετικά με τα νανοσωματίδια με φορέα εγκλεισμού την χιτοζάνη, αυτά μελετήθηκαν για το έλαιο *Mentha Arvensis*. Η μέση διάμετρος των νανοσωματιδίων βρέθηκε 276.6 ± 58.3 nm με δείκτη πολυδιασποράς 0.360 ± 0.133 . Στην προκειμένη περίπτωση, το ζ δυναμικό είναι θετικό και ίσο με 19.7 ± 9.0 mV, γεγονός που αποδίδεται την παρουσία των αμινομάδων της χιτοζάνης. Στην εργασία του Milal Hadidi και των συνεργατών του (2020), κατά τον εγκλεισμό αιθερίου ελαίου γαρυφάλλου σε νανοσωματίδια χιτοζάνης, τα προκύπτοντα συστήματα είχαν μέση διάμετρο ίδιας τάξης μεγέθους με αυτά της εν λόγω εργασίας και ζ δυναμικό με θετικό πρόσημο. Σε μια μελέτη της Hasani et al. (2018), οι τιμές του ζ δυναμικού για τις νανοκάψουλες χιτοζάνης-Hicap που περιέχουν ΕΟ λεμονιού κυμαίνονταν από 10,58 έως 44,23 mV. Σε άλλη έρευνα, τα NP χιτοζάνης και τα NP χιτοζάνης με ΕΟ κανέλας έχουν θετικά φορτισμένες επιφάνειες λόγω της παρουσίας των αμινομάδων. Οι τιμές ζ δυναμικού ήταν 24,0 mV και 26 έως 30,5 mV, αντίστοιχα (Matshetshe et al., 2018). Αντίθετα, τα NP χιτοζάνης φορτωμένα με διαφορετικά επίπεδα αιθερίου ελαίου *Satureja hortensis* είχαν αρνητικές τιμές ζ δυναμικού που κυμαίνονταν από -7,54 mV έως -21,12 mV. Σημαντική μείωση στην τιμή του ζ δυναμικού παρατηρήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του ΕΟ (Feyzioglu & Tornuk, 2016). Οι Lertsutthiwong, Rojsitthisak και Nimmannit (2009), επίσης, μέτρησαν αρνητικές τιμές ζ δυναμικού που κυμαίνονται από -21,8 mV έως -23,1 mV για ΕΟ κουρκουμά που έχει φορτωθεί σε νανοκάψουλες χιτοζάνης. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΕΟ και NPs επηρεάζουν τη δομή και το φορτίο αυτών των νανοφορέων.^[55]

Τέλος, τα συστήματα εγκλεισμού τα οποία είναι μικροσωματίδια κυττάρων ζυμομύκητα, με ήδη εγκλεισμένο σε αυτά έλαιο, με επικάλυψη χιτοζάνης εμφανίζουν μέση διάμετρο στο εύρος 3233.7 ± 14.0 nm - 4832.7 ± 170.5 nm με τιμές ζ δυναμικού να κυμαίνονται από 15.8 ± 0.1 mV - 23.1 ± 4.5 mV.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση των συστημάτων εγκλεισμού με επικάλυψη χιτοζάνης των μικροσωματιδίων *S. cerevisiae*: ΕΟ, καταγράφονται δύο τιμές μέσων διαμέτρων καθώς τα επικαλυμμένα σωματίδια με την μεγαλύτερη διάμετρο υπάρχουν στην διασπορά σε ποσοστά από 20-35%. Τα σωματίδια με την μικρότερη διάμετρο δεν είναι επικαλυμμένα συστήματα και πιθανώς αποτελούν σωματίδια χιτοζάνης τα οποία σχηματίστηκαν κατά την διεργασία της επικάλυψης.

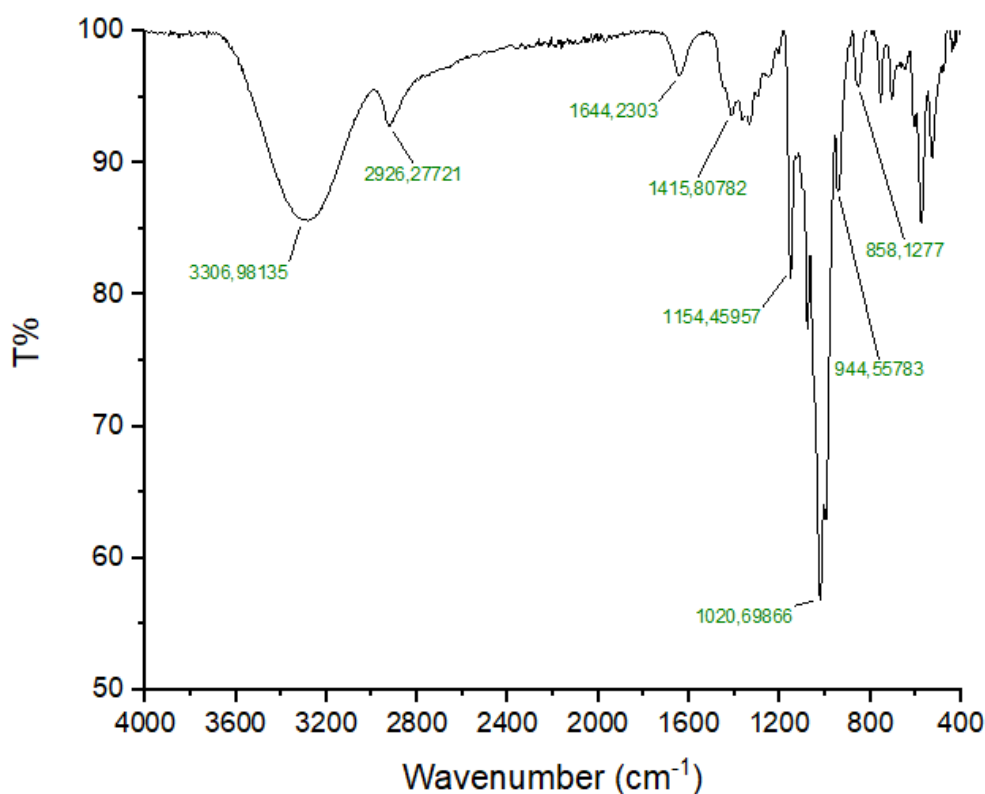
Σε κάθε περίπτωση επικάλυψης με χιτοζάνη κυττάρων ζυμομύκητα με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο, το μέγεθος των μικροσωματιδίων αυξάνεται, γεγονός που αποδίδεται στην προσθήκη του επιπλέον στρώματος της χιτοζάνης. Όσον αφορά το ζ δυναμικό αυτό από αρνητικό μετατρέπεται σε θετικό σε κάθε περίπτωση επικάλυψης που αποδίδεται στην ύπαρξη των θετικά φορτισμένων αμινομάδων της χιτοζάνης. Αυτή η αναστροφή φορτίου αποδίδεται στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων αλυσίδων της χιτοζάνης με τις αρνητικές περιοχές των κυττάρων ζυμομύκητα. Η παρατήρηση

αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με την εργασία του Chen Tan και των συνεργατών του (2021).^[43]

3.4 Ανάλυση Φασματοσκοπίας FT-IR

Η φασματοσκοπία υπερέυθρου είναι μια τεχνική ποιοτικής ανάλυσης για τη μελέτη της δομής των διαφόρων οργανικών ενώσεων και της αλληλεπίδρασης αυτών με άλλα μόρια και χημικές ομάδες. Τα φάσματα υπερέυθρου που λαμβάνονται στην συγκεκριμένη ανάλυση αφορούν την περιοχή του θεμελιώδους υπερέυθρου, περιοχή εύρους 4000-400 cm^{-1} , και οφείλονται σε διεγέρσεις δόνησης (τάσης και κάμψης ή παραμόρφωσης) των δεσμών του μορίου και σε διεγέρσεις περιστροφής αυτών. Μάλιστα, ένα μόριο για να απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία, ώστε να προκληθεί μια ενεργειακή μετάπτωση, πρέπει να υποστεί περιοδική μεταβολή στην διπολική ροπή του.

β-κυκλοδεξτρίνη

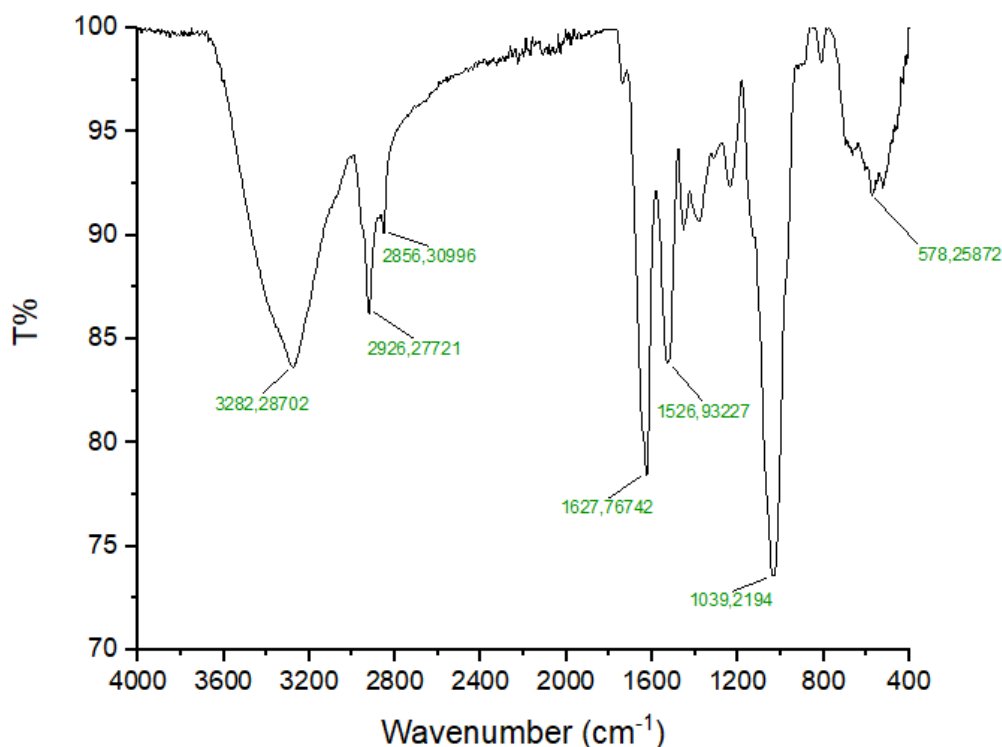


Εικόνα 45: Φάσμα FT-IR β-κυκλοδεξτρίνης.

Στο φάσμα FT-IR της β-κυκλοδεξτρίνης εμφανίζονται χαρακτηριστικές κορυφές στους κυματαριθμούς 3306 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} , 1415 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} , 1018 cm^{-1} , 944 cm^{-1} και 858 cm^{-1} . Ειδικότερα, η κορυφή στα 3306 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης της ομάδας -OH ενώ στα 2926 cm^{-1} εμφανίζεται λόγω δόνησης τάσης του -CH. Η κορυφή στα 1644 cm^{-1} ανήκει στην ασύμμετρη τάση του -CH₂ και αυτή στα 1415 cm^{-1} στην δόνηση κάμψης του δεσμού -OH. Οι κορυφές στα 1154 cm^{-1} και 1018 cm^{-1} είναι αποτέλεσμα των δονήσεων τάσεων των δεσμών -CO (των δευτεροταγών ομάδων αλκοολών που βρίσκονται στο

μόριο της β -CD) και -COC, αντίστοιχα. Τέλος, στις κορυφές στα 944 cm^{-1} και 858 cm^{-1} αποδίδονται οι δονήσεις κάμψης των δεσμών -CH και -CH₂.

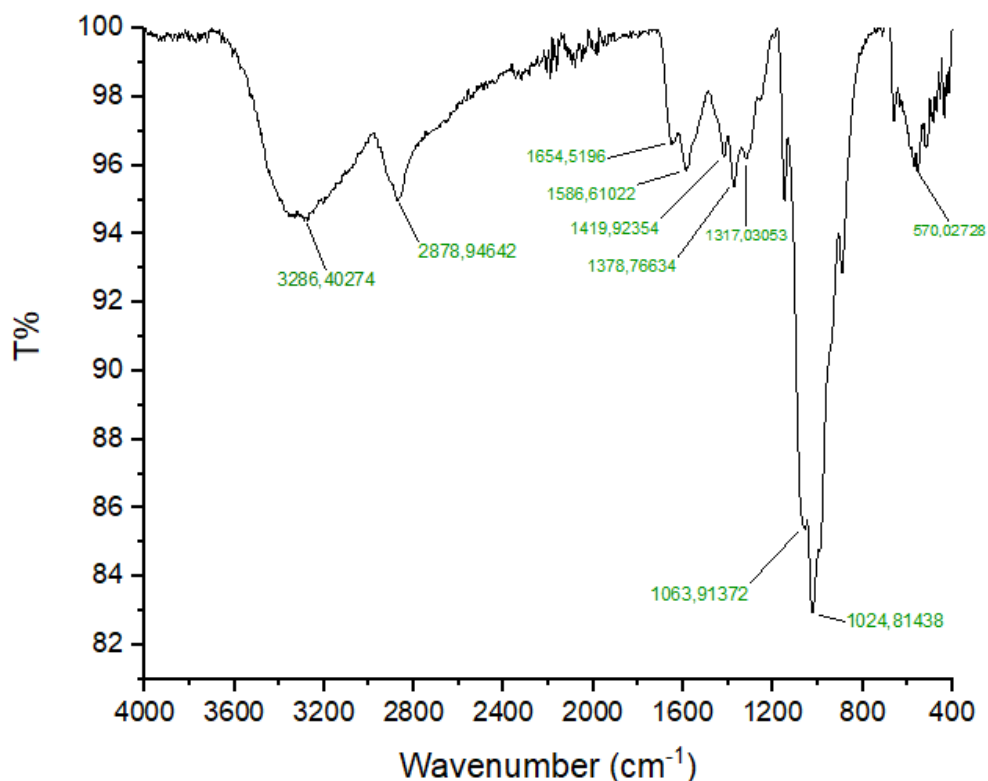
Πλασμολυμμένα κύτταρα *S. cerevisiae*



Εικόνα 46: Φάσμα FT-IR πλασμολυμένων κυττάρων *S. cerevisiae*.

Στο φάσμα FT-IR των πλασμολυμένων κυττάρων ζυμομύκητα εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές στους κυματαριθμούς 3282 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , 1627 cm^{-1} , 1526 cm^{-1} και 1039 cm^{-1} . Πιο συγκεκριμένα, η ευρεία κορυφή που εμφανίζεται στα 3282 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης της ομάδας του υδροξυλίου, -OH, των πολυσακχαριτών. Η κορυφή στα 2926 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στην δόνηση τάσης του δεσμού -CH₂ των νουκλεϊκών οξέων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Οι κορυφές στα 1627 cm^{-1} και 1526 cm^{-1} αποδίδονται στα πρωτεϊνικά αμίδια I, και II, αντίστοιχα. Τέλος, η κορυφή στα 1039 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση κάμψης των -CH. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί στην βιβλιογραφία σε ανάλογα φάσματα FTIR πλασμολυμένων κυττάρων.^[54]

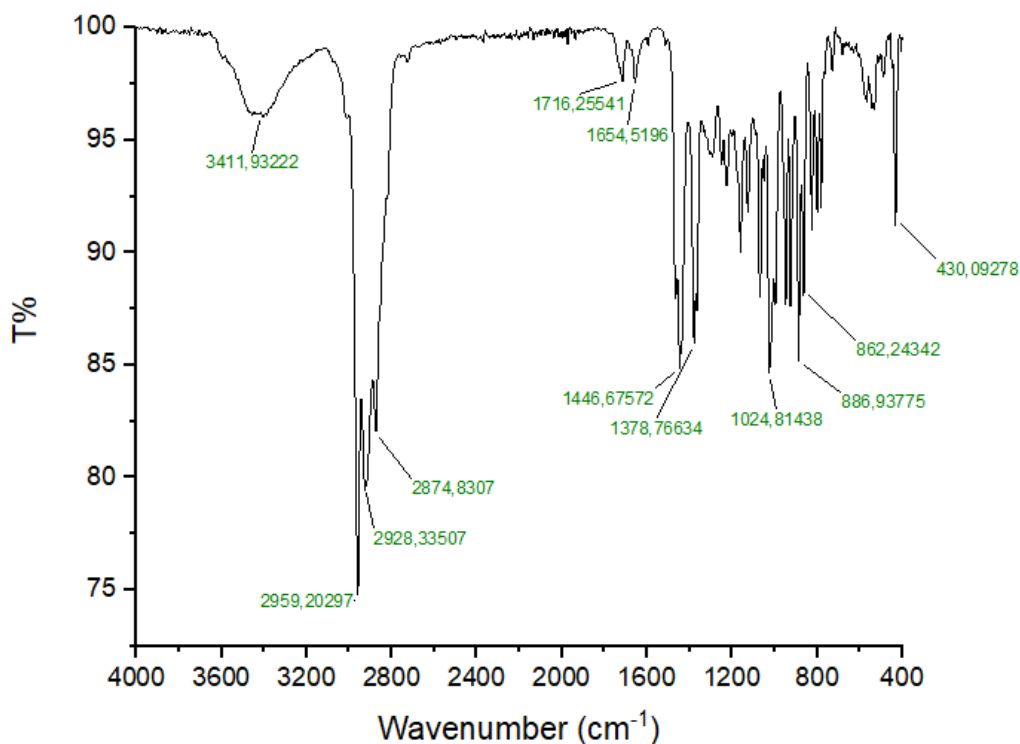
Χιτοζάνη



Εικόνα 47: Φάσμα FT-IR της χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους.

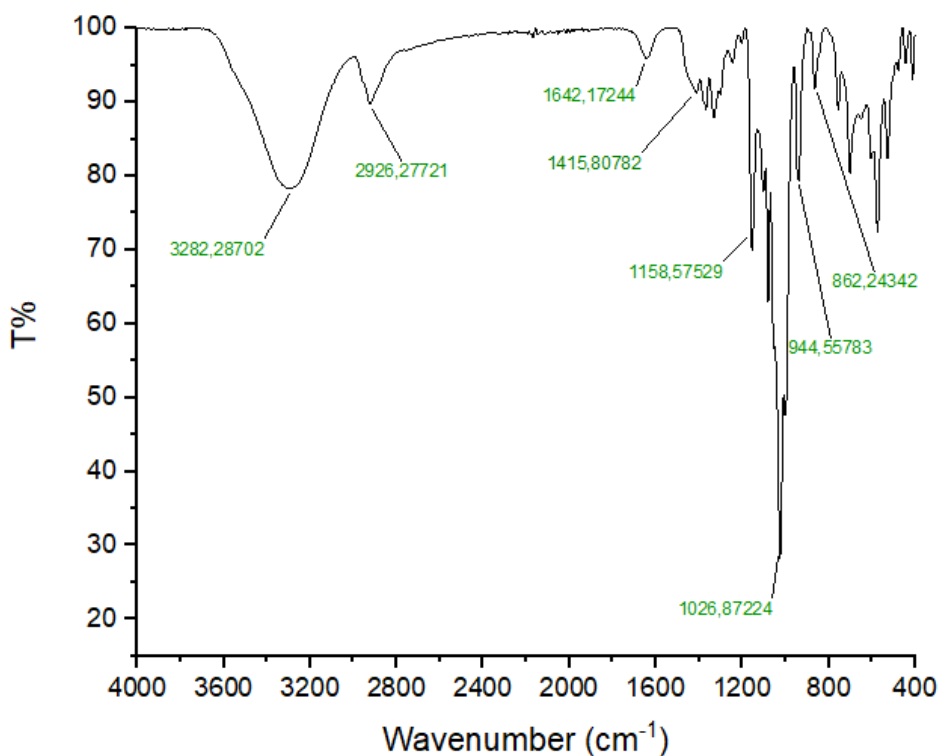
Στο φάσμα FT-IR της χιτοζάνης οι χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στους κυματαριθμούς 3286 cm^{-1} , 2878 cm^{-1} , 1654 cm^{-1} , 1586 cm^{-1} , 1378 cm^{-1} και 1024 cm^{-1} . Αναλυτικότερα, η ευρεία κορυφή που εμφανίζεται στα 3329 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης της ομάδας του υδροξυλίου, -OH, και της αμινομάδας, -NH. Η κορυφή στα 2878 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στην δόνηση τάσης του δεσμού -CH. Οι κορυφές στα 1654 cm^{-1} , 1586 cm^{-1} και 1378 cm^{-1} είναι αποτέλεσμα των αμιδίων I, II, III. Η κορυφή στα 1654 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης του -C=O στις ακεταμιδομάδες ενώ η κορυφή στα 1586 cm^{-1} στην γωνιακή παραμόρφωση των δεσμών -NH. Τέλος, η κορυφή στα 1378 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση κάμψης του δεσμού -CO και -C-O-C ενώ η κορυφή στα 1024 cm^{-1} στις δονήσεις κάμψης του -CH αλλά και δόνηση τάσης και κάμψης των -CH₂ και -CH₃. Παρόμοια συμπεράσματα έχουν βρεθεί κατά την μελέτη FTIR φασμάτων χιτοζάνης προς εγκλεισμό αιθερίων ελαίων και ποιοτικό χαρακτηρισμό επιτυχίας του εγκλεισμού.^[56]

Origanum Majorana (OM2)



Εικόνα 48: Φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana (OM2)*.

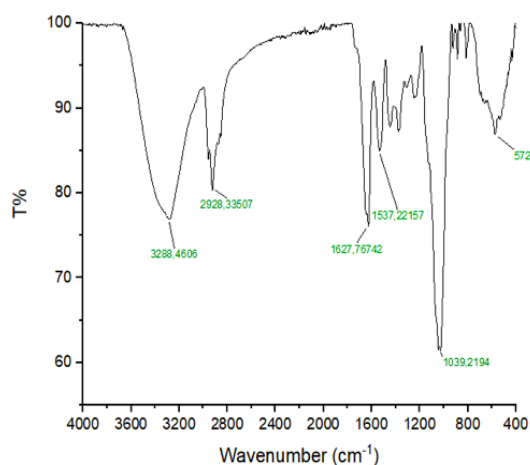
Στο φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana (OM2)* οι χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στους κυματαριθμούς 3411 cm^{-1} , 2959 cm^{-1} , 1716 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} , 1378 cm^{-1} , 1024 cm^{-1} , 886 cm^{-1} και 862 cm^{-1} . Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή στα 3411 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης του φαινολικού υδροξυλίου, -OH, της τερπινεν-4-όλης που είναι και το επικρατέστερο από τα κύρια συστατικά του ελαίου. Οι κορυφές στα 2959 cm^{-1} και 862 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις τάσης και κάμψης του δεσμού -CH, αντίστοιχα. Ακόμη, η κορυφή στα 1446 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης του -C=C στους αρωματικούς δακτυλίους των κύριων και δευτερευόντων συστατικών του ελαίου ενώ οι κορυφές στα 1716 cm^{-1} και 1024 cm^{-1} αποδίδονται στην δόνηση τάσης του δεσμού -C=O των καρβονυλικών ομάδων και στην δόνηση τάσης του -C-O της α-τερπινεόλης και των άλλων δευτεροταγών αλκοολών του αιθερίου ελαίου, αντίστοιχα. Οι κορυφές στα 1378 cm^{-1} και 886 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις τάσης και κάμψης των ομάδων -CH₂ και -CH₃.



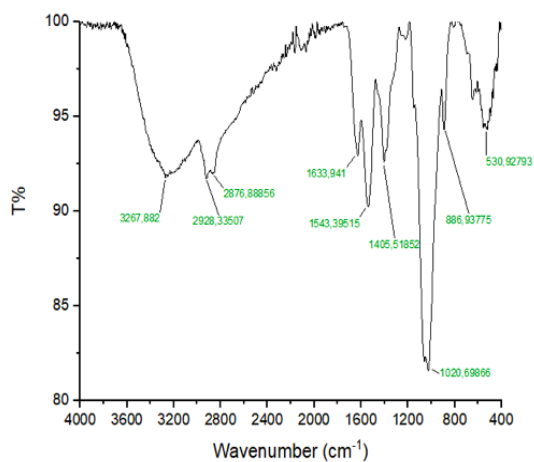
Εικόνα 49: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β-CD:OM2.

Το φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β-CD:OM2 παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από το φάσμα FTIR του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (OM2) ενώ ομοιάζει περισσότερο με το φάσμα FTIR της β-κυκλοδεξτρίνης, από το οποίο εμφανίζει μικρές διαφορές στους κυματαριθμούς ορισμένων κορυφών. Αυτό σε συνδυασμό με την απουσία νέων κορυφών, οδηγούν στο συμπέρασμα πως δεν δημιουργούνται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ του ελαίου και των ομάδων C-C, C-O-C και OH του φορέα.^[57] Οι χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος του συστήματος εγκλεισμού παρουσιάζονται στους κυματαριθμούς 3282 cm⁻¹, 2926 cm⁻¹, 1642 cm⁻¹, 1415 cm⁻¹, 1158 cm⁻¹, 1026 cm⁻¹, 944 cm⁻¹ και 862 cm⁻¹. Συνεπώς, σχεδόν σε όλες τις κορυφές, όπως οι 3282 cm⁻¹, 1642 cm⁻¹, 1158 cm⁻¹, 1026 cm⁻¹ και 862 cm⁻¹, παρατηρούνται μετατοπίσεις από το φάσμα της β-CD, ενώ οι περισσότερες κορυφές του αιθερίου ελαίου είναι απύσες. Η μετατόπιση της κορυφής στα 3282 cm⁻¹ και η μείωση της διαπερατότητας θα μπορούσαν να αποδοθούν στην δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών του ελαίου και της β-CD.^[58] Ωστόσο, η κορυφή στα 1415 cm⁻¹ θα μπορούσε να θεωρηθεί μετατοπισμένη κορυφή του ελαίου από τα 1446 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσεις του -C=C, και πιθανότητα επικαλύπτεται με την μετατοπισμένη κορυφή στα 1415 cm⁻¹ του φάσματος της β-CD. Μάλιστα, χαρακτηριστική διαφορά παρατηρείται στην ένταση της κορυφής στα 1026 cm⁻¹, η οποία εμφανίζεται και στα τρία φάσματα (φορέα, αιθερίου ελαίου, συστήματος εγκλεισμού) (ελαφρώς μετατοπισμένη) γεγονός που σημαίνει τον εμπλουτισμό του φορέα εγκλεισμού με ομάδες -COC του αιθερίου ελαίου. Ακόμη, στο φάσμα του συστήματος εγκλεισμού παρατηρείται μια ακόμη κορυφή του ελαίου στα 862 cm⁻¹, η οποία πιθανότητα ταυτίζεται με την μετατοπισμένη κορυφή από το φάσμα της β-κυκλοδεξτρίνης και ως αποτέλεσμα η διαπερατότητα αυξάνεται σε σχέση με αυτή στο φάσμα του φορέα ενώ μειώνεται

σε σχέση με αυτή στο φάσμα του ελαίου. Αυτό αποδίδεται στην μειωμένη περιεκτικότητα του ελαίου στον φορέα καθώς και στην περιορισμένη δόνηση και κάμψη μέσα στην κοιλότητα της β-CD.^[59] Έτσι, αποδεικνύεται ο επιτυχής εγκλεισμός του αιθερίου ελαίου *OM2* στην β-CD καθώς και η παρουσία αλληλεπιδράσεων μεταξύ φορέα και εγκλεισμένης ουσίας.



Εικόνα 50: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού *S.cerevisiae:OM2*.



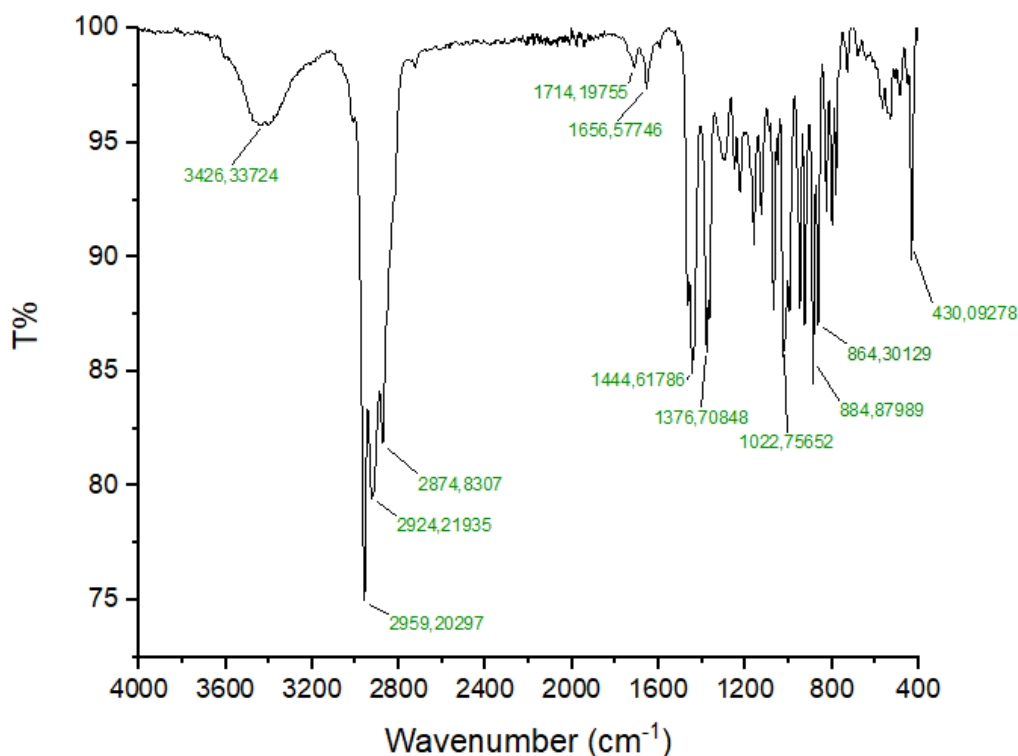
Εικόνα 51: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού *CS:S.cerevisiae:OM2*.

Στην περίπτωση των πλασμολυμένων κυττάρων *S. cerevisiae* ως φορέα εγκλεισμού, οι μετατοπίσεις στο φάσμα του συστήματος εγκλεισμού φτάνουν τα 15 cm^{-1} , γεγονός το οποίο, σε συνδυασμό με την απουσία των περισσότερων χαρακτηριστικών κορυφών του ελαίου, αποτελεί ένδειξη ισχυρής αλληλεπίδρασης του αιθερίου ελαίου με τον φορέα. Οι κορυφές του *OM2* που παρατηρούνται στο φάσμα του συστήματος εγκλεισμού είναι στους κυματαριθμούς 2928 cm^{-1} και 1024 cm^{-1} σε διαφορετικές εντάσεις. Αυτό, ίσως, οφείλεται στην ταύτιση των κορυφών του ελαίου με τις κορυφές του φορέα με αποτέλεσμα και την διαφορά της έντασής τους στην περίπτωση του κυματαριθμού 1024 cm^{-1} , ενώ η μειωμένη διαπερατότητα του εγκλεισμού για κυματαριθμό 2928 cm^{-1} ίσως οφείλεται στην παρουσία του -OH των αλκοολών του αιθερίου ελαίου. Επιπλέον, η αντίστοιχη μεταβολή στην διαπερατότητα στις κορυφές των κυματαριθμών 1627 cm^{-1} και 1537 cm^{-1} ίσως οφείλονται στην αλληλεπίδραση του ελαίου με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών της μεμβράνης.^[60] Έτσι, συμπεραίνεται επιτυχής εγκλεισμός του αιθερίου ελαίου.

Τα συστήματα εγκλεισμού που αποτελούνται από αιθέριο έλαιο εγκλεισμένο σε κύτταρα ζυμομύκητα επικαλυμμένα με χιτοζάνη ομοιάζουν κατά βάση με τα φάσματα της χιτοζάνης. Ωστόσο, παρατηρούνται τόσο μετατοπίσεις στις χαρακτηριστικές κορυφές όσο και διαφορές στην ένταση της διαπερατότητας. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μετατόπιση φτάνει τα 20 cm^{-1} ενώ οι περισσότερες κορυφές εμφανίζονται λίγο ή περισσότερο μετατοπισμένες. Μάλιστα, στο φάσμα του συστήματος εγκλεισμού το εύρος 1700 cm^{-1} - 1100 cm^{-1} εμφανίζεται αρκετά διαφοροποιημένο τόσο από το φάσμα της χιτοζάνης όσο και από το φάσμα των κυττάρων ζυμομύκητα με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο ενώ οι κορυφές στο εύρος 1405 cm^{-1} - 1020 cm^{-1} απουσιάζουν πλήρως στο σύστημα εγκλεισμού με την κορυφή 1378 cm^{-1} να είναι χαρακτηριστική στο φάσμα της

χιτοζάνης και να αποδίδεται στην δόνηση του -CO. Με βάση όλα τα ανωτέρω, συμπεραίνεται πως η χιτοζάνη αλληλεπιδρά με τα πλασμολυμένα κύτταρα ζυμομύκητα, όπως έχει βρεθεί και στην βιβλιογραφία σε περίπτωση επικάλυψης με χιτοζάνη κυττάρων με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο.^[43]

Origanum Majorana (OM3)



Εικόνα 52: Φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (OM3).

Στο φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (OM3) οι χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στους κυματαριθμούς 3426 cm^{-1} , 2959 cm^{-1} , 1714 cm^{-1} , 1444 cm^{-1} , 1376 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , 884 cm^{-1} και 862 cm^{-1} . Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή στα 3426 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης του φαινολικού υδροξυλίου, -OH, στην τερπινεν-4-όλη που είναι και το επικρατέστερο από τα κύρια συστατικά του ελαίου. Οι κορυφές στα 2959 cm^{-1} και 862 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις τάσης και κάμψης του δεσμού -CH, αντίστοιχα. Ακόμη, η κορυφή στα 1444 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης του -C=C στους αρωματικούς δακτυλίους των κύριων και δευτερευόντων συστατικών του ελαίου ενώ οι κορυφές στα 1714 cm^{-1} και 1022 cm^{-1} αποδίδονται στην δόνηση τάσης του δεσμού -C=O των καρβονυλικών ομάδων και στην δόνηση τάσης του -C-O της α-τερπινεόλης και των άλλων δευτεροταγών αλκοολών του αιθερίου ελαίου, αντίστοιχα. Οι κορυφές στα 1376 cm^{-1} και 884 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις τάσης και κάμψης των ομάδων -CH₂ και -CH₃.

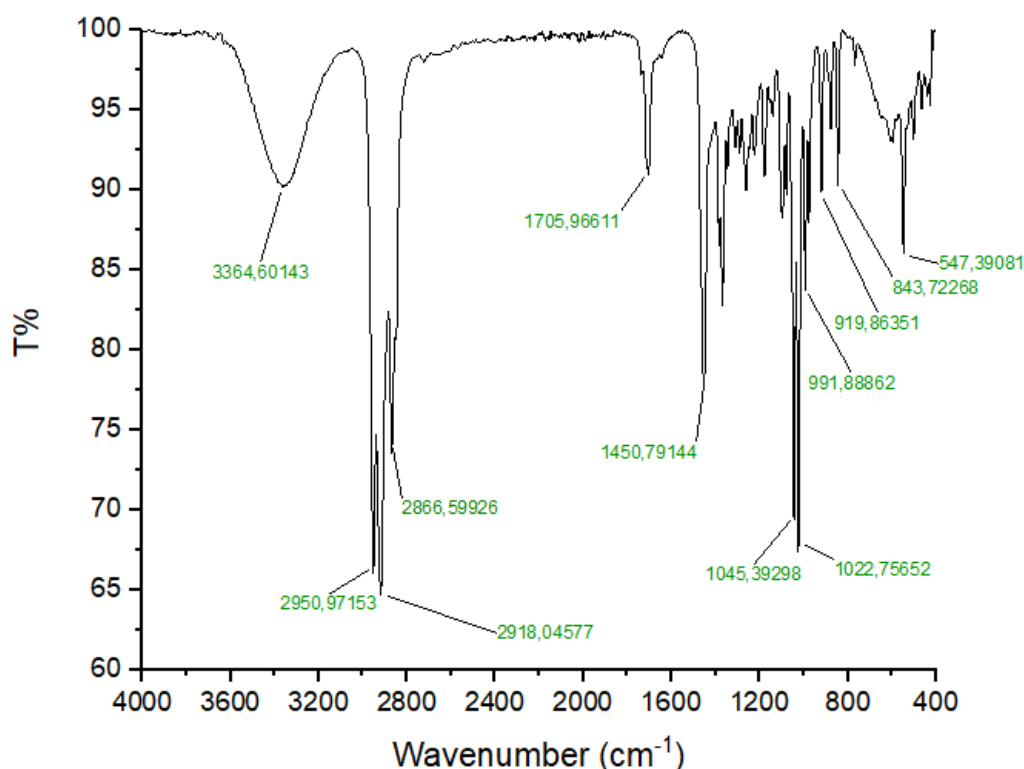
Όπως και με το αιθέριο έλαιο OM2, το φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β-CD:OM3 παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από το φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (OM3) ενώ ομοιάζει αρκετά με το φάσμα του φορέα

της β -CD. Οι χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος του συστήματος εγκλεισμού παρουσιάζονται στους κυματαριθμούς 3304 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1411 cm^{-1} , 1156 cm^{-1} , 1024 cm^{-1} , 940 cm^{-1} και 864 cm^{-1} . Σχεδόν σε όλες τις κορυφές, όπως οι 3304 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} , 1411 cm^{-1} , 1156 cm^{-1} , 1026 cm^{-1} , 940 cm^{-1} και 864 cm^{-1} παρατηρούνται μετατοπίσεις, μικρότερες του *OM2*, από το φάσμα της β -CD, ενώ οι κορυφές του αιθερίου ελαίου είναι κατά βάση απύσες. Επιπλέον, για τις κορυφές στα 3304 cm^{-1} , 1411 cm^{-1} και 864 cm^{-1} , εξάγονται αντίστοιχα συμπεράσματα με το έλαιο *OM2*. Ομοίως, συμπεραίνεται επιτυχής εγκλεισμός ΕΟ στην β -CD. (Παράρτημα Εικόνων, Εικόνα 59)

Στην περίπτωση των πλασμολυμένων κυττάρων *S. cerevisiae* ως φορέα εγκλεισμού, παρατηρούνται μικρές μετατοπίσεις στο φάσμα του συστήματος εγκλεισμού σε σχέση με αυτό του φορέα, οι οποίες φτάνουν τα 5 cm^{-1} , γεγονός το οποίο, σε συνδυασμό με την σχεδόν ολική απουσία των χαρακτηριστικών κορυφών του ελαίου, αποτελεί ένδειξη επιτυχούς εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου στον φορέα. Σε αντιστοιχία με το έλαιο *OM2*, η κορυφή στα 2926 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχίζεται και στο έλαιο *OM3*, εμφανίζεται στο φάσμα του συστήματος εγκλεισμού σε μικρότερη διαπερατότητα γεγονός που ίσως οφείλεται στην παρουσία ομάδων -OH ως συστατικά του αιθερίου ελαίου. Οι υπόλοιπες διακυμάνσεις στις εντάσεις των χαρακτηριστικών κορυφών του φορέα οφείλονται στην αλληλεπίδραση του ελαίου με τον φορέα. Τα παραπάνω υποδεικνύουν τον επιτυχή εγκλεισμό του αιθερίου ελαίου στα κύτταρα ζυμομήκυτα. (Παράρτημα Εικόνων, Εικόνα 60)

Τα συστήματα εγκλεισμού που αποτελούνται από αιθέριο έλαιο εγκλεισμένο σε κύτταρα ζυμομήκυτα επικαλυμμένα με χιτοζάνη ομοιάζουν κατά βάση με τα φάσματα της χιτοζάνης. Ωστόσο, παρατηρούνται τόσο μετατοπίσεις στις χαρακτηριστικές κορυφές όσο και διαφορές στην ένταση της διαπερατότητας. Πιο συγκεκριμένα, οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις φτάνουν τα 39 cm^{-1} ενώ οι περισσότερες κορυφές εμφανίζονται λίγο ή περισσότερο μετατοπισμένες. Μάλιστα, οι κορυφές στο εύρος 1405 cm^{-1} - 1020 cm^{-1} απουσιάζουν πλήρως στο σύστημα επικάλυψης ενώ υπάρχουν και στο σύστημα εγκλεισμένου αιθερίου ελαίου σε κύτταρα και στο φάσμα της χιτοζάνης. Μάλιστα, στο φάσμα της χιτοζάνης η κορυφή 1378 cm^{-1} , που απουσιάζει στο σύστημα επικάλυψης, είναι χαρακτηριστική και αποδίδεται στην δόνηση του -CO. Με βάση τα ανωτέρω, συμπεραίνεται πως η χιτοζάνη αλληλεπιδρά με τα κύτταρα ζυμομήκυτα με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο. (Παράρτημα Εικόνων, Εικόνα 61)

Mentha Arvensis (MA)

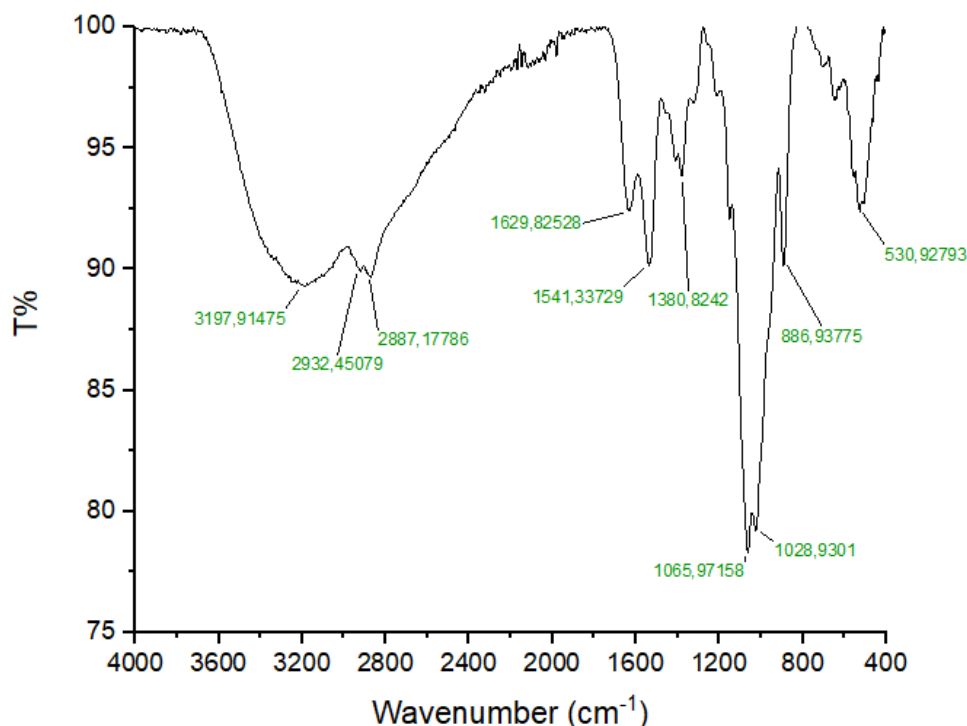


Εικόνα 53: Φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Mentha Arvensis* (MA).

Στο φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Mentha Arvensis* (MA) οι χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στους κυματαριθμούς 3364 cm^{-1} , 2950 cm^{-1} , 2866 cm^{-1} , 1705 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , 919 cm^{-1} και 843 cm^{-1} . Αναλυτικότερα, η κορυφή στα 3364 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης του φαινολικού υδροξυλίου, -OH, της μενθόλης που είναι και το κύριο συστατικά του ελαίου. Οι κορυφές στα 2950 cm^{-1} , 2866 cm^{-1} και 843 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις τάσης (αντισυμμετρική και συμμετρική) και κάμψης του δεσμού -CH, αντίστοιχα. Ακόμη, οι κορυφές στα 1705 cm^{-1} και 1022 cm^{-1} αποδίδονται στην δόνηση τάσης του δεσμού -C=O των καρβονυλικών ομάδων και στην δόνηση τάσης του -C-O της μενθόλης (δευτεροταγής αλκοόλη), αντίστοιχα. Οι κορυφές στα 1450 cm^{-1} και 919 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις τάσης και κάμψης των ομάδων -CH₂ και -CH₃.

Το φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β-CD:MA ομοιάζει περισσότερο με το φάσμα της β-CD, ωστόσο παρουσιάζει διαφορές τόσο από το φάσμα FTIR της β-κυκλοδεξτρίνης όσο και από το αιθέριο έλαιο *Mentha Arvensis* (MA). Οι χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος του συστήματος εγκλεισμού παρουσιάζονται στους κυματαριθμούς 3290 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} , 1413 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} , 938 cm^{-1} και 866 cm^{-1} . Οι κορυφές του MA είναι απύσες σχεδόν σε όλο το εύρος κυματαριθμών, ενώ η υψηλή ένταση της κορυφής στα 1020 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί τόσο στην συμβολή της β-CD όσο και στο αιθερίου ελαίου. Η μεγαλύτερη μετατόπιση των υπόλοιπων κορυφών στο φάσμα του συστήματος εγκλεισμού, σε σχέση με το φάσμα της β-CD, είναι 16 cm^{-1} . Όλα τα παραπάνω, καταλήγουν στο συμπέρασμα της αλληλεπίδρασης του φορέα με το αιθέριο έλαιο και τον επιτυχή εγκλεισμό. (Παράρτημα Εικόνων, Εικόνα 62)

Στην περίπτωση που φορέα εγκλεισμού αποτελούν τα κύτταρα *S. cerevisiae* παρατηρούνται μικρές μετατοπίσεις στις κορυφές των κυττάρων ζυμομύκητα σε σχέση με το σύστημα εγκλεισμού, ενώ η μεγαλύτερη είναι στα 11 cm^{-1} . Συνεπώς, συμπεραίνεται υψηλή αλληλεπίδραση του φορέα και του ελαίου. Και σε αυτή την περίπτωση εγκλεισμού με φορέα τα κύτταρα ζυμομύκητα παρατηρούνται διαφορές στις εντάσεις των βασικών κορυφών του ως αποτέλεσμα του εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου σε αυτόν. (Παράρτημα Εικόνων, Εικόνα 63)



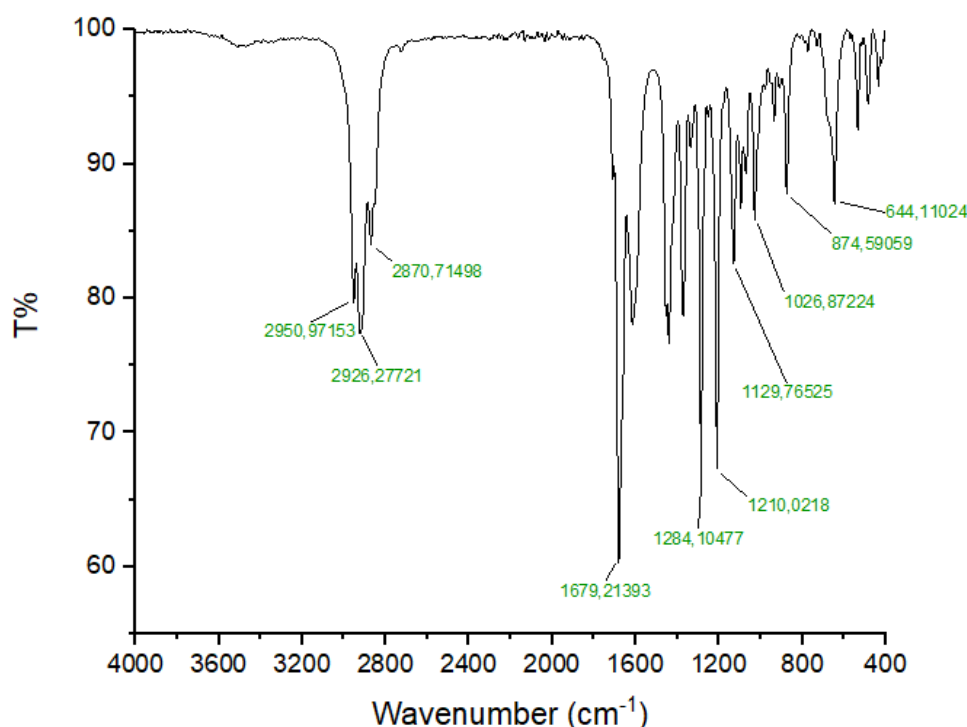
Εικόνα 54: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού CS:MA.

Στα συστήματα εγκλεισμού με φορέα την χιτοζάνη, οι κορυφές του φορέα εμφανίζονται όλες στο φάσμα του συστήματος εγκλεισμού με μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών έως και διαφοροποιήσεις στις εντάσεις αυτών, γεγονός που υποδηλώνει μια αλληλεπίδραση του φορέα με το αιθέριο έλαιο. Μάλιστα, η έντονη μείωση της διαπερατότητας που παρατηρείται στην κορυφή με κυματαριθμό 1028 cm^{-1} ίσως οφείλεται στον εμπλουτισμό με ομάδες μεθυλίου και μεθυλενίου. Τέλος, ιδιαίτερα έντονη διαφορά παρατηρείται στο εύρος $3290\text{ cm}^{-1} - 2878\text{ cm}^{-1}$ μεταξύ των φασμάτων της χιτοζάνης και του συστήματος εγκλεισμού CS:MA, το οποίο πιθανότατα είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του φορέα με τις ομάδες $-\text{NH}_3^+$ και $-\text{OH}$ της χιτοζάνης, όπως έχει αναφερθεί και στην βιβλιογραφία.^[56]

Στο φάσμα των συστημάτων εγκλεισμού με φορέα τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη κύτταρα ζυμομύκητα παρατηρούνται ομοιότητες στις βασικές κορυφές με αυτό της χιτοζάνης. Ωστόσο, παρατηρούνται απουσίες βασικών κορυφών και μετατοπίσεις έως και 28 cm^{-1} , το οποίο υποδηλώνει την ισχυρή αλληλεπίδραση της χιτοζάνης με τα κύτταρα ζυμομύκητα. Ακόμη, ισχύουν, αντίστοιχα, οι παραπάνω σχολιασμοί σχετικά με την σύγκριση των φασμάτων της χιτοζάνης, του συστήματος εγκλεισμένου αιθερίου ελαίου σε ζυμομύκητα με αυτού του

συστήματος εγκλεισμού προς επικάλυψη, με την διαφορά ότι στην προκειμένη περίπτωση το σύστημα *CS:S.cerevisiae:MA* παρουσιάζει έντονες διαφορές στις εντάσεις των κορυφών στο φάσμα FTIR σε σχέση με τα *CS:S.cerevisiae:OM2* και *CS:S.cerevisiae:OM3*, το οποίο πιθανώς οφείλεται στην διαφορά της σύστασης των ελαίων *OM2* και *OM3* με το *MA*, που αποτελείται κυρίως από την μενθόλη. (Παράρτημα Εικόνων, Εικόνα 64)

Mentha Pulegium (MP)



Εικόνα 55: Φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium (MP)*.

Στο φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium (MP)* οι χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στους κυματαριθμούς 2926 cm⁻¹, 2870 cm⁻¹, 1679 cm⁻¹, 1284 cm⁻¹, 1210 cm⁻¹, 1129 cm⁻¹, 1026 cm⁻¹ και 874 cm⁻¹. Οι κορυφές στα 2926 cm⁻¹, 2870 cm⁻¹ και 874 cm⁻¹ αποδίδονται στους διαφορετικούς τρόπους δονήσεως τάσεως (αντισυμμετρική και συμμετρική) και κάμψης του δεσμού -CH, αντίστοιχα. Ακόμη, η κορυφή στα 1679 cm⁻¹ αποδίδεται στην δόνηση τάσης του -C=C στον αρωματικό δακτύλιο της πιπεριτενόνης. Οι κορυφές στα 1284 cm⁻¹ και 1026 cm⁻¹ αποδίδονται στην δόνηση τάσης του δεσμού -C=O της πουλεγόνης και των υπολοίπων καρβονυλικών ομάδων των δευτερευόντων συστατικών του αιθερίου ελαίου και στην δόνηση τάσης του -C-O της 3-οκτανόλης. Οι κορυφές στα 1210 cm⁻¹ και 1129 cm⁻¹ αποδίδονται στις δονήσεις τάσης και κάμψης των ομάδων -CH₂ και -CH₃.

Το φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β-CD:MP ομοιάζει περισσότερο με το φάσμα της β-CD και παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από το φάσμα του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium (MP)*. Οι χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος του συστήματος εγκλεισμού παρουσιάζονται στους κυματαριθμούς 3311 cm⁻¹, 2926 cm⁻¹, 1668 cm⁻¹, 1421 cm⁻¹, 1154 cm⁻¹, 1020 cm⁻¹, 938 cm⁻¹ και

862 cm^{-1} . Οι κορυφές του *MP* είναι απύσες σχεδόν σε όλο το εύρος κυματαριθμών, ενώ η υψηλή ένταση της κορυφής στα 1020 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί τόσο στην συμβολή της β -CD όσο και στου ελαίου. Η μεγαλύτερη μετατόπιση των υπόλοιπων κορυφών στο φάσμα του συστήματος εγκλεισμού, σε σχέση με το φάσμα της β -CD, είναι 8 cm^{-1} . Όλα τα παραπάνω, καταλήγουν στο συμπέρασμα της αλληλεπίδρασης του φορέα με το έλαιο και τον επιτυχή εγκλεισμό. (Παράρτημα Εικόνων, Εικόνα 65)

Στην περίπτωση που φορέα εγκλεισμού αποτελούν τα κύτταρα *S. cerevisiae* παρατηρούνται μικρές μετατοπίσεις στις κορυφές των κυττάρων ζυμομύκητα σε σχέση με το σύστημα εγκλεισμού, ενώ η μεγαλύτερη είναι στα 20 cm^{-1} . Συνεπώς, συμπεραίνεται υψηλή αλληλεπίδραση του φορέα και του αιθερίου ελαίου. Μάλιστα, μεγάλη διαφορά παρατηρείται στην ένταση της μετατοπισμένης κορυφής στα 1039 cm^{-1} του φορέα, που αποδίδεται σε δόνηση κάμψης του -CH, γεγονός που ίσως σημαίνει τον εμπλουτισμό σε -CH ομάδες του αιθερίου ελαίου. Μάλιστα, μεταξύ των άλλων διαφοροποιήσεων στις εντάσεις των χαρακτηριστικών κορυφών, ιδιαίτερα έντονη διαφορά παρατηρείται μεταξύ των φασμάτων του φορέα και του συστήματος εγκλεισμού στον κυματαριθμό 1526 cm^{-1} (1535 cm^{-1} στο φάσμα του συστήματος εγκλεισμού) που είναι αποτέλεσμα του αμιδίου II, της μεμβράνης του κυττάρου του ζυμομύκητα και ίσως προκύπτει από την αλληλεπίδραση του ελαίου με τον φορέα. (Παράρτημα Εικόνων, Εικόνα 66)

3.5 Μελέτη απελευθέρωσης *in vitro*

Η μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης των ΕOs από τα νανο- και μικρο- σωματίδια των συστημάτων εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε για τα συστήματα εγκλεισμού β -CD:OM3, β -CD:MA, CS:MA, CS:*S.cerevisiae*:OM3 και CS:*S.cerevisiae*:MA. Η *in vitro* μελέτη πραγματοποιήθηκε σε όλα τα συστήματα για 48 ώρες ενώ λήφθηκαν επιλεκτικά τιμές σε μεγαλύτερους χρόνους. Η μελέτη έγινε σε θερμοκρασία 35 °C και pH ίσο με 7.4, προκειμένου να προσομοιάζονται οι συνθήκες εφαρμογής αυτών των συστημάτων εγκλεισμού στην επικείμενη μελέτη βιοδραστικότητας.

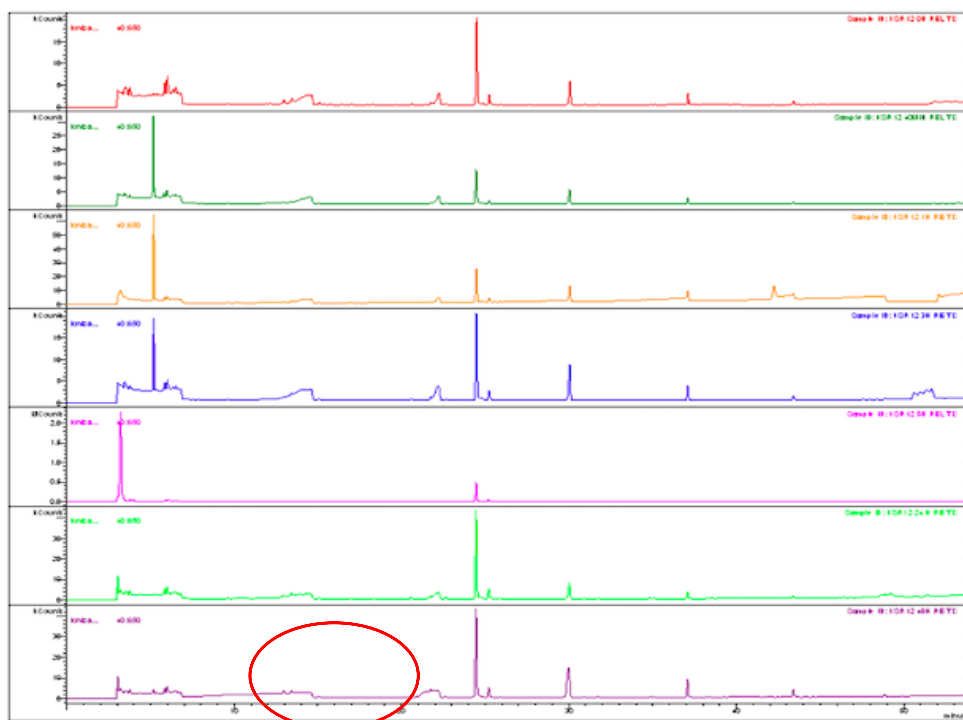
Για την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης, από τα μοντέλα που διατίθενται προς προσαρμογή επιλέγεται αυτό με τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης, R^2 , το οποίο και εμφανίζει την καλύτερη γραμμικότητα. Το μοντέλο Korsmeyer-Peppas αξιοποιείται για την εύρεση του μηχανισμού απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου από τον εκάστοτε φορέα αλλά δεν λαμβάνεται ως κύριο μοντέλο περιγραφής του φαινομένου απελευθέρωσης διότι κατά βάση είναι εμπειρικό και περιγράφει το 60% της απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας.

Origanum Majorana (OM3)

Από το προφίλ απελευθέρωσης του OM3 από το σύστημα β -CD:OM3, διαπιστώνεται ότι μεγάλη ποσότητα ελαίου (86%) («burst effect») απελευθερώνεται με ταχύ ρυθμό ενώ ακολουθεί μια αργή και σταθερή φάση απελευθέρωσης από τη μια ώρα και μετά.

Στην περίπτωση που φορέας είναι τα κύτταρα ζυμομύκητα, διαπιστώνεται η απότομη απελευθέρωση μεγάλης ποσότητας του ελαίου (88%) («burst effect») στις πέντε ώρες, ενώ στη συνέχεια ο ρυθμός απελευθέρωσης του ελαίου μειώνεται ακολουθούμενος από ένα σταθερό προφίλ «plateau». Το ποσοστό απελευθέρωσης (αθροιστικά) του ελαίου φτάνει μέχρι και 91% στις δύο μέρες.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι στην περίπτωση του αιθερίου ελαίου *OM3* η συνολική ποσότητα αιθερίου ελαίου που απελευθερώνεται κάθε χρονική στιγμή προκύπτει από το άθροισμα των κύριων συστατικών όπως αυτά έχουν αναφερθεί. Ωστόσο, μόνο δυο από τα κύρια συστατικά φαίνεται να αποδεσμεύονται κατά την μελέτη απελευθέρωσης και συγκεκριμένα η τερπινεν-4-όλη και η α -τερπινεόλη, τόσο από την β -CD όσο και από τα κύτταρα ζυμομύκητα. Συνεπώς, η συνολική ποσότητα του ελαίου, όπως αυτή παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 1, αποτελεί το άθροισμα των δυο αυτών συστατικών.



Εικόνα 56: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorna* (*OM3*) κατά την μελέτη απελευθέρωσής του από την β -CD κάθε χρονική στιγμή.

Η απουσία των τερπενίων κατά την μελέτη απελευθέρωσης πιθανότατα οφείλεται στην ισχυρότερη αλληλεπίδρασή τους με τους φορείς εγκλεισμού ή και στον εγκλεισμό αυτών στην κυτταρική μεμβράνη στην περίπτωση που φορέας εγκλεισμού είναι τα κύτταρα ζυμομύκητα. Επιπλέον, η απουσία των συστατικών αυτών μπορεί να αποδοθεί και σε απώλειες λόγω εξάτμισης τους από το μέσο απελευθέρωσης.

Από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου *OM3* από τους φορείς εγκλεισμού, βρέθηκε ότι το κινητικό μοντέλο που περιγράφει καλύτερα την απελευθέρωση από την β -κυκλοδεξτρίνη είναι το μοντέλο Higuchi, με R^2 ίσο με 0.393. Με την εφαρμογή του μοντέλου Korsmeyer-Peppas, βρίσκεται

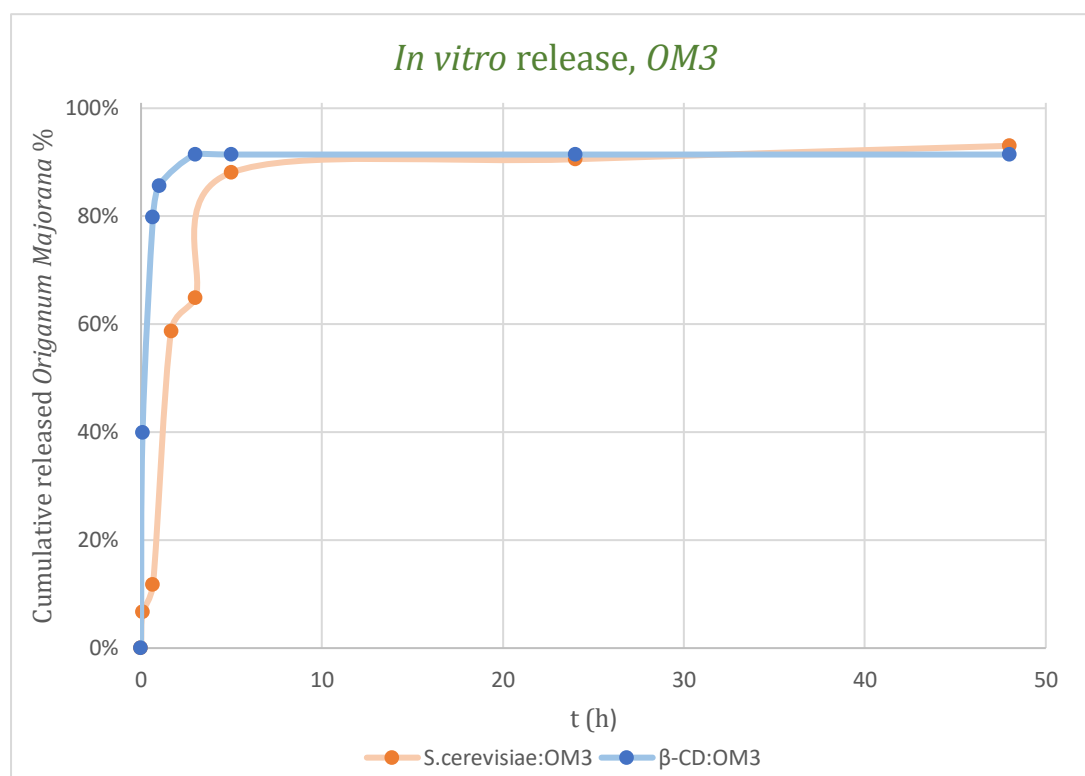
ο συντελεστής n ίσος με 0.982 που υποδεικνύει ως μηχανισμό απελευθέρωσης την διάχυση και την διάβρωση του φορέα και η διάχυση (βλ. Πίνακα 5).

Αντίστοιχα, από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης του *OM3* στην περίπτωση που ο φορέας εγκλεισμού είναι τα κύτταρα του ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, προκύπτει ότι το μοντέλο Higuchi περιγράφει καλύτερα την αποδέσμευση του ΕΟ, με συντελεστή R^2 ίσο με 0.652. Ο μηχανισμός απελευθέρωσης είναι η διάχυση κατά Fick.

Τα αποτελέσματα του συντελεστή R^2 για όλα τα μοντέλα για τα οποία έγινε προσαρμογή στα δεδομένα απελευθέρωσης του *OM3* συνοψίζονται στον Πίνακα 25.

Πίνακας 25. Συντελεστής συσχέτισης R^2 για τα διάφορα κινητικά μοντέλα και εκθέτης απελευθέρωσης n , για την περίπτωση απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου *OM3*.

Σύστημα εγκλεισμού	Zero order	First order	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas	Εκθέτης απελευθέρωσης n
	R^2	R^2	R^2	R^2	R^2	
β -CD: <i>OM3</i>	0.169	0.138	0.393	0.106	0.995	0.982
<i>S.cerevisiae</i> : <i>OM3</i>	0.425	0.204	0.652	0.279	0.797	-



Μ₁ Διάγραμμα 1: Συγκριτικό διάγραμμα *in vitro* απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (*OM3*) από τα διάφορα συστήματα εγκλεισμού.

Από το προφίλ απελευθέρωσης του *MA*, διαπιστώνεται ότι στην περίπτωση που φορέας εγκλεισμού είναι η β-κυκλοδεξτρίνη, διακρίνονται δυο φάσεις. Μια αρχική γρήγορη φάση όπου απελευθερώνεται ποσότητα αιθερίου ελαίου έως και 96% («burst effect») και μια πιο αργή φάση απελευθέρωσης που ακολουθεί, με αποτέλεσμα την αθροιστική απελευθέρωση στο 98% του ελαίου στις 48 ώρες.

Στην περίπτωση που φορέας είναι τα κύτταρα ζυμομύκητα, διαπιστώνεται η απότομη απελευθέρωση μεγάλης ποσότητας του αιθερίου ελαίου (54%) («burst effect») στις πέντε ώρες, ενώ έπειτα ο ρυθμός απελευθερούμενου ελαίου μειώνεται ακολουθούμενος από ένα σταθερό προφίλ «plateau». Το ποσοστό απελευθέρωσης (αθροιστικά) του ελαίου φτάνει μέχρι και 82% στις δύο μέρες.

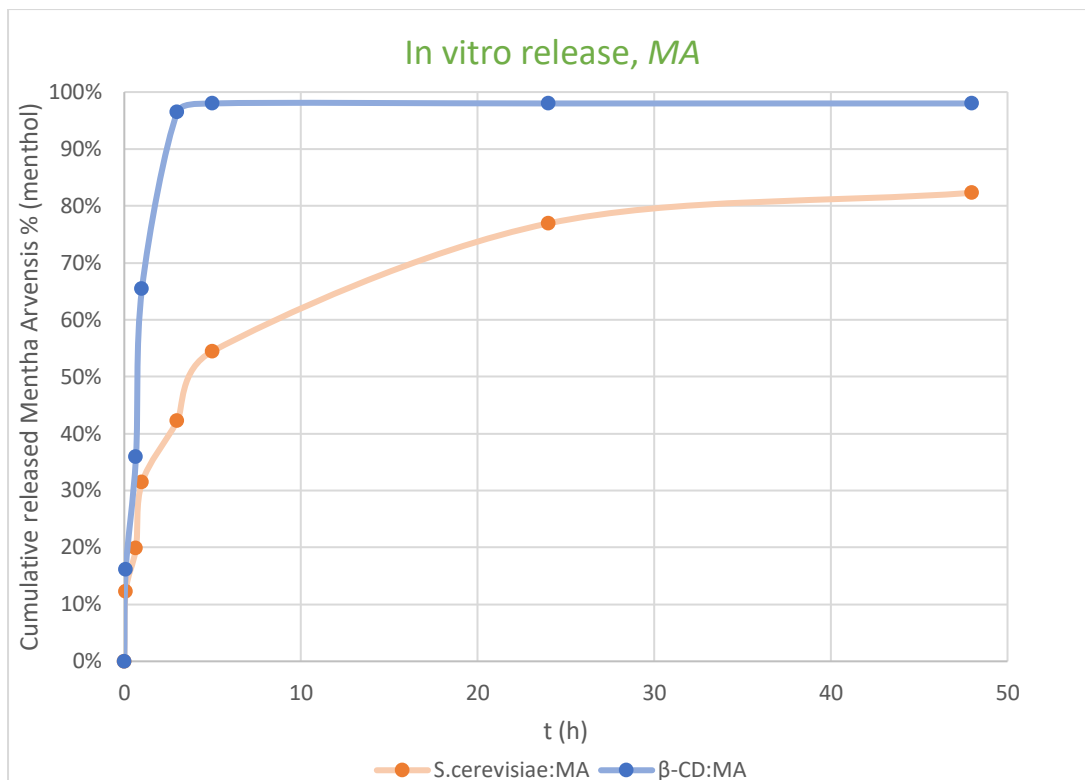
Από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης του ελαίου *MA* από τους φορείς εγκλεισμού, βρέθηκε ότι το κινητικό μοντέλο που περιγράφει καλύτερα την απελευθέρωση από την β-κυκλοδεξτρίνη είναι το μοντέλο Higuchi, με R^2 ίσο με 0.530. Με την εφαρμογή του μοντέλου Korsmeyer-Peppas, βρίσκεται ο συντελεστής n ίσος με 0.969 που υποδεικνύει ως μηχανισμό απελευθέρωσης την διάβρωση του φορέα και την διάχυση (βλ. Πίνακα 5).

Αντίστοιχα, από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης του *MA* στην περίπτωση που φορέας εγκλεισμού είναι τα κύτταρα του ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, προκύπτει ότι το μοντέλο Higuchi περιγράφει καλύτερα την αποδέσμευση του ΕΟ, με συντελεστή R^2 ίσο με 0.667. Μάλιστα, ο μηχανισμός απελευθέρωσης είναι η διάχυση κατά Fick.

Τα αποτελέσματα του συντελεστή R^2 για όλα τα μοντέλα για τα οποία έγινε προσαρμογή στα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης του *MA* συνοψίζονται στον Πίνακα 26.

Πίνακας 26. Συντελεστής συσχέτισης R^2 για τα διάφορα κινητικά μοντέλα και εκθέτης απελευθέρωσης n , για την περίπτωση απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου *MA*.

Σύστημα εγκλεισμού	Zero order	First order	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas	Εκθέτης απελευθέρωσης n
	R^2	R^2	R^2	R^2	R^2	
β -CD: <i>MA</i>	0.308	0.230	0.530	0.195	0.995	0.969
<i>S.cerevisiae</i> : <i>MA</i>	0.402	0.304	0.667	0.227	0.852	-



Διάγραμμα 2: Συγκριτικό διάγραμμα *in vitro* απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου *Mentha Arvensis* (MA) από τα διάφορα συστήματα εγκλεισμού.

Από τα ανωτέρω, συμπεραίνεται πως στα συστήματα εγκλεισμού όπου φορέας είναι η β-κυκλοδεξτρίνη η δραστική ουσία απελευθερώνεται μέσω διάχυσης και διάβρωσης του φορέα. Η ταχεία απελευθέρωση που παρατηρείται στις παραπάνω περιπτώσεις αποδίδεται στην ποσότητα του αιθερίου ελαίου που έχει προσροφηθεί στην επιφάνεια των σωματιδίων και διαφεύγει γρήγορα στο μέσο απελευθέρωσης ενώ η αργή φάση που ακολουθεί καθορίζεται από τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν.^[61]

Ανάλογα, το φαινόμενο που επικρατεί στην απελευθέρωση αιθερίου ελαίου από φορέα εγκλεισμού τα κύτταρα ζυμομύκητα είναι η διάχυση κατά Fick. Έτσι, δικαιολογείται ο ταχύς ρυθμός απελευθέρωσης αιθερίου ελαίου στους πρώτους χρόνους, όπου η διαφορά συγκέντρωσης εντός του συστήματος εγκλεισμού και στο μέσο απελευθέρωσης είναι μεγαλύτερη, και η σταδιακή μείωσή του μετέπειτα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την βιβλιογραφία στην περίπτωση εγκλεισμού αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium* σε κύτταρα *S.cerevisiae*.^[54]

Συγκριτικά για τους φορείς β-CD και κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* διαπιστώνεται ότι τα δραστικά συστατικά των αιθερίων ελαίων απελευθερώνονται ταχύτερα στην περίπτωση της β-κυκλοδεξτρίνης. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν τα συστατικά των αιθερίων ελαίων με τους δύο διαφορετικούς φορείς εγκλεισμού.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε *in vitro* μελέτη απελευθέρωσης για το σύστημα CS:MA. Ωστόσο, μικρή ποσότητα αιθερίου ελαίου απελευθερώθηκε μέχρι τις 48

ώρες, η οποία δεν ξεπερνά το 30%. Ακόμη, στην περίπτωση απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου *Mentha Arvensis* από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης λήφθηκε μέτρηση της ποσότητας απελευθέρωσης του στις 120 h (5μέρες) όπου βρέθηκε αθροιστικό ποσοστό απελευθέρωση της μενθόλης ίσο με 37%. Συνεπώς, το αιθέριο έλαιο συνεχίζει να απελευθερώνεται από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης με αργό ρυθμό.

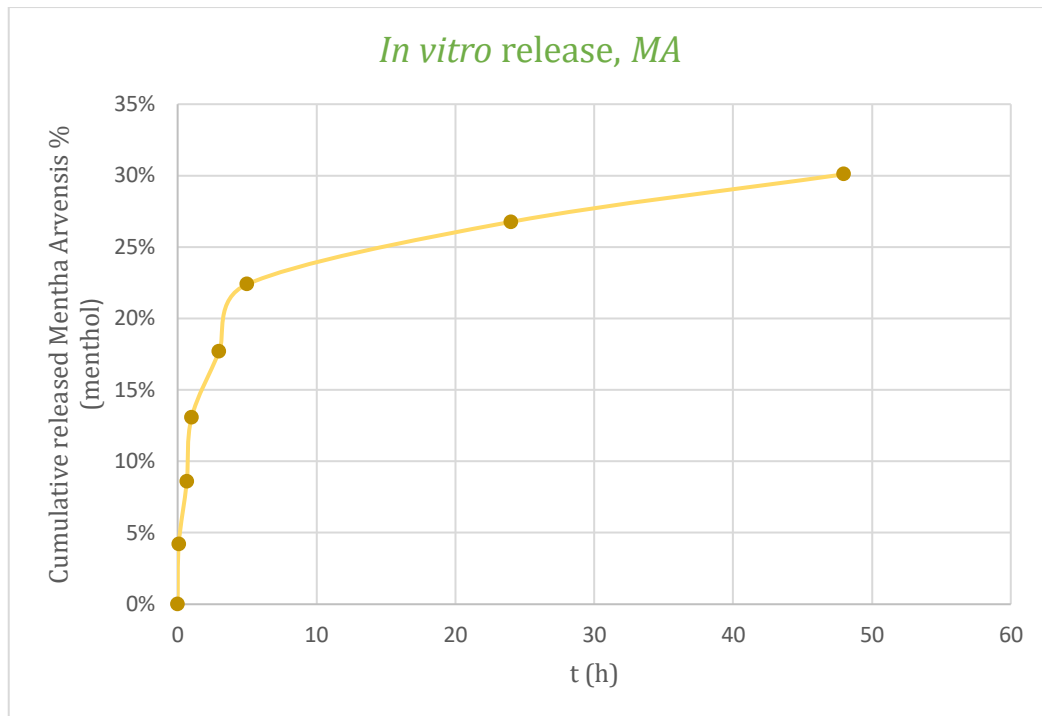
Ωστόσο, αυτό μπορεί να οφείλεται στην υψηλή αναλογία EO/CS, η οποία φτάνει 0.4 mg EO/ mg CS και όπως έχει βρεθεί σε αντίστοιχη μελέτη εγκλεισμού αιθερίου ελαίου ρίγανης σε νανοσωματίδια χιτοζάνης, η αύξηση του λόγου mg EO/mg CS μειώνει το ποσοστό απελευθέρωσης (για αναλογία EO/CS, 0.1, απελευθερώνεται σχεδόν το 82% από τα νανοσωματίδια ενώ για αναλογία EO/CS, 0.8, απελευθερώνεται μόνο το 12%).^[62] Ο ισχυρισμός αυτός επιβεβαιώνεται, αντίστοιχα, σε μελέτη απελευθέρωσης της καρβακρόλης από νανοσωματίδια χιτοζάνης, σε pH 7.0 με αναλογία EO/CS, 1, παρατηρείται απελευθέρωση του 9.6% αθροιστικού ποσοστού της δραστικής ένωσης σε 5 ώρες ενώ απελευθέρωση της τάξης του 26.4% παρατηρούνται σε χρονικό διάστημα δέκα ημερών.^[63]

Από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης του ελαίου MA από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, βρέθηκε ότι το κινητικό μοντέλο που περιγράφει καλύτερα την απελευθέρωση είναι το μοντέλο Higuchi, με R² ίσο με 0.821. Με την εφαρμογή του μοντέλου Korsmeyer-Peppas, βρίσκεται ο συντελεστής n ίσος με 0.945 που υποδεικνύει ως μηχανισμό απελευθέρωσης την διάβρωση του φορέα και την διάχυση (βλ. Πίνακα 5).

Τα αποτελέσματα του συντελεστή R² για όλα τα μοντέλα για τα οποία έγινε προσαρμογή στα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης του MA συνοψίζονται στον Πίνακα 27.

Πίνακας 27. Συντελεστής συσχέτισης R² για τα διάφορα κινητικά μοντέλα και εκθέτης απελευθέρωσης n, για την περίπτωση απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου MA νανοσωματίδια χιτοζάνης.

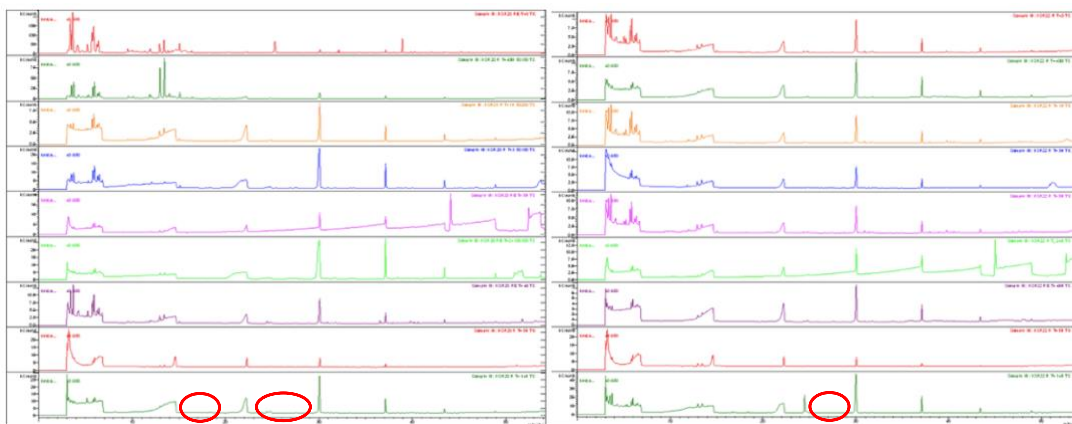
Σύστημα εγκλεισμού	Zero order	First order	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas	Εκθέτης απελευθέρωσης n
	R ²	R ²	R ²	R ²	R ²	
CS:MA	0.610	0.444	0.821	0.304	0.996	0.945



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα in vitro απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου *Mentha Arvensis* (MA) από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης.

Η αρχική απελευθέρωση μεγάλης ποσότητας αιθερίου ελαίου από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης αποδόθηκε στα μόρια του MA που προσροφήθηκαν στην επιφάνεια των σωματιδίων και στο αιθέριο έλαιο που παγιδεύτηκε κοντά στην επιφάνεια, καθώς ο ρυθμός διάβρωσης του πολυμερούς κοντά στην επιφάνεια είναι υψηλός και η ποσότητα της ουσίας που απελευθερώνεται θα είναι επίσης υψηλή (Anitha et. al., 2011).^[64]

Τέλος, η in vitro απελευθέρωση πραγματοποιήθηκε και για τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη κύτταρα *S.cerevisiae* με εγκλεισμένα τα αιθέρια έλαιο *Origanum Majorana* (OM3) και *Mentha Arvensis* (MA). Ωστόσο, για τις πρώτες 48 ώρες δεν απελευθερώνεται ποσότητα αιθερίου ελαίου από τα συστήματα εγκλεισμού. Αυτό αποτελεί ένδειξη της επιτυχούς επιβράδυνσης της απελευθέρωσης ελαίου από τα συστήματα *S.cerevisiae*:ΕΟ με την επικάλυψή τους με χιτοζάνη.



Εικόνα 57: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου *Origanum Majorana* (OM3) κατά την μελέτη απελευθέρωσής του από τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη κύτταρα ζυμομύκητα κάθε χρονική στιγμή.

Εικόνα 58: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου *Mentha Arvensis* κατά την μελέτη απελευθέρωσής του από τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη κύτταρα ζυμομύκητα κάθε χρονική στιγμή.

Από τα φάσματα GC των Εικόνων 57 και 58, διαπιστώνεται πως τόσο το αιθέριο έλαιο *Origanum Majorana* (OM3) όσο και το *Mentha Arvensis* εξακολουθούν να μην απελευθερώνονται από τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη κύτταρα ζυμομύκητα ακόμη και στους χρόνους 240 h (10 μέρες) και 336 h (14 μέρες). Ωστόσο, η τόσο παρατεταμένη καθυστέρηση της αποδέσμευσής τους ίσως οφείλεται στην εξάτμισή τους από το μέσο απελευθέρωσης.

3.6 Μελέτη βιοδραστικότητας

Η μελέτη βιοδραστικότητας των νέων συστημάτων εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας & Εντομολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Σχολή Επιστημών των Φυτών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, για την σύγκριση της δράσης αιθερίων ελαίων διαφόρων χημειοτύπων, συγκεκριμένα του *Origanum Majorana* (OM2) και του *Mentha Pulegium*, πριν και μετά τον εγκλεισμό τους σε βιοδιασπώμενους και βιοσυμβατούς φορείς. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα συστήματα εγκλεισμού *S.cerevisiae:OM2* και β -CD:MP κατά της επιβίωσης του εχθρού των θερμοκηπιακών καλλιεργειών, *Tetranychus urticae*.

Νύμφες τετρανύχου (*Tetranychus urticae*) ψεκάζονταν με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου συγκέντρωσης 1‰ (v/v) και κατόπιν τοποθετούνταν σε τρυβλία Petri επάνω σε ψεκασμένο φύλλο φασολιού. Η καταμέτρηση της θνησιμότητας γίνονταν ανά 24 ώρες, για 7 ημέρες μετά τον ψεκασμό. Η θνησιμότητα ήταν μηδενική μετά τον ψεκασμό με απιονισμένο νερό όπως και με νερό και γαλακτωματοποιητή, ενώ μετά την επέμβαση με ακαρεοκτόνο ήταν 100%. Μετά από ψεκασμό με το αιθέριο έλαιο *Origanum Majorana* (OM2), η θνησιμότητα έφθασε το 66% στις νύμφες, ενώ μετά τον ψεκασμό με αιθέριο έλαιο εγκλεισμένο σε κύτταρα ζυμομυκήτων η θνησιμότητα αυξήθηκε (82%). Μετά τον ψεκασμό με το αιθέριο έλαιο *Mentha Pulegium*, βρέθηκε ότι το 50% των νυμφών νεκρώθηκαν, αλλά μετά τον ψεκασμό με το αιθέριο έλαιο εγκλεισμένο σε β -CD το ποσοστό θνησιμότητας τους διπλασιάστηκε (100%). Στην τελευταία περίπτωση, το ποσοστό θνησιμότητας κατά την 3η, 4η και 5η ημέρα μετά την επέμβαση ήταν 2 ή και 3 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό του μη εγκλεισμένου ελαίου. Επομένως, ο εγκλεισμός των αιθερίων ελαίων σε κύτταρα ζυμομυκήτων και β -CD βελτίωσε σημαντικά την αποτελεσματικότητά τους στην αντιμετώπιση του *T. urticae*.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός των αιθερίων ελαίων *Origanum Majorana* (OM2), *Origanum Majorana* (OM3), *Mentha Arvensis* (MA) και *Mentha Pulegium* (MP) σε βιοδιασπώμενους φορείς και συγκεκριμένα στην β-κυκλοδεξτρίνη, στα πλασμολυμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, στην χιτοζάνη καθώς και σε πλασμολυμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* με επικάλυψη χιτοζάνης.

Αρχικά, από την χημική ανάλυση των αιθερίων ελαίων μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοόμετρο μάζας (GC-MS) προσδιορίστηκαν τα κύρια συστατικά τους. Αναλυτικότερα, για τα αιθέρια έλαια *Origanum Majorana* (OM2, OM3) τα κύρια συστατικά είναι το α-τερπινένιο, το γ-τερπινένιο, η α-τερπινεόλη και η τερπινεν-4-όλη με διαφορές στο ποσοστό με την οποία περιέχονται στο έλαιο. Σε κάθε περίπτωση, η τερπινεν-4-όλη περιέχεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα αιθέρια έλαια *Origanum Majorana* ενώ η α-τερπινεόλη περιέχεται στο μικρότερο. Το αιθέριο έλαιο *Mentha Arvensis* (MA) έχει ως κύριο συστατικό την μενθόλη η οποία καταλαμβάνει ποσοστό μεγαλύτερο από 50% στο αιθέριο έλαιο, ενώ η πουλεγόνη και η πιπεριτενόνη διαπιστώνονται ως τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium* (MP), με την πουλεγόνη να αποτελεί περισσότερο από το 70% του αιθερίου ελαίου.

Ο εγκλεισμός των αιθερίων ελαίων *Origanum Majorana* (OM2), *Origanum Majorana* (OM3), *Mentha Arvensis* (MA) και *Mentha Pulegium* (MP) στον φορέα της β-κυκλοδεξτρίνης επιτεύχθηκε με την μέθοδο της συγκαταβύθισης και παρουσίασε τις υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού διεργασίας από τα υπόλοιπα συστήματα εγκλεισμού, έως και 93%. Από τα υπόλοιπα συστήματα εγκλεισμού, συγκεκριμένα εγκλεισμό σε πλασμολυμένα κύτταρα ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, σε χιτοζάνη με την μέθοδο της ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης και σε επικάλυψη με χιτοζάνη των πλασμολυμένων κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* διαπιστώθηκε ότι τα συστήματα με την χιτοζάνη, είτε ως φορέα είτε ως μέσο επικάλυψης, παρουσιάζουν τις χαμηλότερες αποδόσεις. Στο σύστημα εγκλεισμού CS:MA βρέθηκε η χαμηλότερη απόδοση ίση με 28%.

Από τον προσδιορισμό των αποδόσεων εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων, μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοόμετρο μάζας (GC-MS), στους διάφορους φορείς, διαπιστώθηκε ότι το έλαιο *Mentha Arvensis* παρουσιάζει τις υψηλότερες αποδόσεις από όλα τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια σε κάθε φορέα εγκλεισμού, με τιμές που ξεπερνάνε το 90%. Ακόμη, διαπιστώθηκε πως σε φορείς εγκλεισμού όπως η β-κυκλοδεξτρίνη εγκλείονται περισσότερο τα συστατικά τερπινεν-4-όλη και α-τερπινεόλη από τα αιθέρια έλαια *Origanum Majorana* και πιπεριτενόνη από το αιθέριο έλαιο *Mentha Pulegium*. Στην περίπτωση που φορέας είναι τα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού παρουσιάζουν το α-τερπινένιο, το γ-τερπινένιο και η πουλεγόνη. Αυτό αποδίδεται στην χημική δομή και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κύριων συστατικών, με τα πιο υδρόφιλα να εγκλείονται σε υψηλότερα ποσοστά στην β-κυκλοδεξτρίνη και τα πιο λιπόφιλα στα κύτταρα ζυμομύκητα.

Τα συστήματα εγκλεισμού μελετήθηκαν ως προς το μέγεθος και το ζ δυναμικό τους μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Τα συστήματα εγκλεισμού με φορέα την β-κυκλοδεξτρίνη και την χιτοζάνη έχουν μέγεθος νανο-σωματιδίων ενώ τα συστήματα εγκλεισμού με φορέα τα πλασμολυμένα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* και τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη κύτταρα έχουν μέγεθος στην τάξη της μικροκλίμακας. Μάλιστα, κατά την επικάλυψη με χιτοζάνη των κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο, για τα *Origanum Majorana* και *Mentha Arvensis* τα οποία μελετήθηκαν, παρατηρείται αύξηση στην διάμετρο των σωματιδίων σε σχέση με τα μη επικαλυμμένα η οποία φτάνει μέχρι και τα 3 μm, στην περίπτωση του CS:*S.cerevisiae*:MA. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στο επιπλέον στρώμα που δημιουργεί η χιτοζάνη γύρω από τα κύτταρα ζυμομύκητα. Σχετικά με το ζ δυναμικό των συστημάτων εγκλεισμού, παρατηρούνται αρνητικές τιμές στην περίπτωση που φορείς είναι η β-κυκλοδεξτρίνη και τα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* ενώ στα συστήματα με φορέα την χιτοζάνη είτε με επικάλυψη του φορέα με αυτή, διαπιστώνονται θετικές τιμές ζ δυναμικού, οι οποίες οφείλονται στις θετικά φορτισμένες αμινομάδες της χιτοζάνης. Χαρακτηριστική είναι η μεταβολή του προσήμου του ζ δυναμικού από το σύστημα εγκλεισμού *S.cerevisiae*:MA στο συστήματα με την επικάλυψη αυτών με χιτοζάνη, CS:*S.cerevisiae*:MA, με τιμές του ζ δυναμικού να μεταβάλλονται από -23.7 ± 1.7 mV σε 19.7 ± 9.0 mV.

Επιπλέον, η επιτυχία εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων στους διαφόρους φορείς διερευνήθηκε μέσω φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR). Η μελέτη των φασμάτων FT-IR των φορέων εγκλεισμού, των αιθερίων ελαίων αλλά και των συστημάτων εγκλεισμού υπέδειξαν την επιτυχία της διεργασίας εγκλεισμού είτε λόγω απουσίας χαρακτηριστικών κορυφών των αιθερίων ελαίων από τα φάσματα των συστημάτων εγκλεισμού είτε λόγω μετατοπίσεων στις χαρακτηριστικές κορυφές στα φάσματα του συστήματος εγκλεισμού σε σχέση με αυτά του φορέα και του αιθερίου ελαίου.

Από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης που πραγματοποιήθηκε για τα συστήματα εγκλεισμού β-CD:OM3, β-CD:MA, CS:MA, CS:*S.cerevisiae*:OM3 και CS:*S.cerevisiae*:MA, διαπιστώθηκε πως το κινητικό μοντέλο που περιγράφει καλύτερα την απελευθέρωση των αιθερίων ελαίων από τα νανοσωματίδια της β-κυκλοδεξτρίνης και της χιτοζάνης είναι το μοντέλο Higuchi ενώ ο μηχανισμός απελευθέρωσης που επικρατεί βάση του εκθέτη απελευθέρωσης, n, της εξίσωσης Korsmeyer-Perppas είναι η διάβρωση του φορέα και η διάχυση. Επιπροσθέτως, βρέθηκε πως το μοντέλο Higuchi περιγράφει καλύτερα και την απελευθέρωση των αιθερίων ελαίων από τα κύτταρα ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* ενώ ο μηχανισμός απελευθέρωσης είναι η διάχυση κατά Fick. Η επιβράδυνση της απελευθέρωσης των αιθερίων ελαίων *Origanum Majorana* (OM3) και *Mentha Arvensis* (MA) από τα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* επιτεύχθηκε μέσω της επικάλυψης αυτών με χιτοζάνη καθώς όπως φάνηκε από την μελέτη της απελευθέρωσής τους δεν αποδεσμεύτηκε σημαντική ποσότητα αιθερίου ελαίου από το σύστημα εγκλεισμού στο χρονικό εύρος των 48 h όπου και μελετήθηκαν τα συστήματα σε αντίθεση με τα συστήματα εγκλεισμού χωρίς επικάλυψη τα οποία στο αντίστοιχο χρονικό διάστημα έχουν φτάσει αθροιστική απελευθέρωση 82% και 91%, αντίστοιχα για κάθε αιθέριο έλαιο.

Τελικός στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη της εντομοκτόνου δράσης αυτών των συστημάτων εγκλεισμού έναντι του εχθρού των θερμοκηπιακών καλλιεργειών *Tetranychus urticae*. Βρέθηκε ότι τα συστήματα εγκλεισμού *S.cerevisiae:OM2* και β -CD:MP βελτίωσαν την ακαρεοκτόνο δράση σε σχέση με την απλή εφαρμογή των αιθερίων ελαίων κατά 16% και 50%, αντίστοιχα. Έτσι, επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα ενίσχυσης και επιμήκυνσης της εντομοκτόνου δράσης αιθερίων ελαίων μαντζουράνας και φλισκουνιού μέσω του εγκλεισμού τους σε φυσικούς, βιοδιασπώμενους και βιοσυμβατούς φορείς εγκλεισμού.

5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Δεδομένης της καινοτομίας της παρούσας μελέτης και των δυνατοτήτων μελλοντικής εφαρμογής των παραγόμενων συστημάτων ως φιλικότερα προς το περιβάλλον εντομοκτόνα, προτείνονται ορισμένες δυνατότητες εξέλιξής της.

- Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την διεργασία εγκλεισμού σε νανοσωματίδια χιτοζάνης για την αύξηση των αποδόσεων διεργασίας και εγκλεισμού.
- Μελέτη διεργασίας επικάλυψης νανοσωματιδίων β-κυκλοδεξτρίνης με χιτοζάνη.
- Μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης των αιθερίων ελαίων από τα διάφορα συστήματα εγκλεισμού σε άλλες συνθήκες θερμοκρασίας.
- Μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων των παραγόμενων συστημάτων εγκλεισμού μέσω Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA).
- Μελέτη της μορφολογίας των συστημάτων εγκλεισμού που αναπτύχθηκαν μέσω Μικροσκοπίας Φθορισμού, Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) ή Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (TEM).
- Μελέτη της βιοδραστικότητας των παραγόμενων συστημάτων εγκλεισμού των ελαίων *Origanum Majorana* (OM3) και *Mentha Arvensis* (MA) στον *Tetranychus urticae* και όλων των συστημάτων εγκλεισμού σε άλλα έντομα καθώς και σε μεγαλύτερη κλίμακα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A. Djilani Abdelouaheb, A. Dicko, "The therapeutic benefits of essential oils." *Nutrition, well-being and health* 7 **2012**, 155-179.
- [2] K. Baser, H. C. & G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*, CRC press **2009**.
- [3] N. F. S. Morsy, "Chemical Structure, Quality Indices and Bioactivity of Essential Oil Constituents" *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*, IntechOpen **2017**.
- [4] W. Dhifi, "Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review." *Medicines* 3.4 **2016**, 25.
- [5] F. F. Y. Stephan, B. K. J. Jules, "Terpenoids as Important Bioactive Constituents of Essential Oils." *Essential Oils-Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications*, IntechOpen **2020**.
- [6] H. Ozbek, S. Ugras, H. Dulger, I. Bayram, I. Tuncer, G. & A. Öztürk, "Hepatoprotective effect of *F. vulgare* essential oil" *Fitoterapia* **2003**, 74, 317-319.
- [7] A. Pengelly, "The Constituents of Medicinal Plants; Allen & Unwin" **2004**.
- [8] E. J. Bowles, "The Chemistry of Aromatherapeutic Oils" 3rd Edition Griffin Press **2003**.
- [9] K. Svoboda, J. Hampson, T. Hunter, "Secretory tissues: Storage and chemical variation of essential oils in secretory tissues of higher plants and their bioactivity" *International Journal of Aromatherapy* **1999**, 9, 124-131.
- [10] S. G. Deans, K. P. Svoboda, M. Gundidza, E. Y. Brechany, "Essential oil profiles of several temperate and tropical aromatic plants: their antimicrobial and antioxidant activities" *Acta Horti* **1992**, 306, 229-232.
- [11] S. G. Griffin, S. G. Wyllie, J. L. Markham, D. N. Leach, "The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity" *Flavour and Fragrance Journal* **1999**, 14, 322-332.
- [12] A. E. Edris, "Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents" *Phytotherapy Research* **2007**, 21, 308-323.
- [13] K. H. C. Baser, G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*, CRC Press NW **2010**.
- [14] D. P. De Sousa, G. A. S. Júnior, L. N. Andrade, J. S. Batista, "Spasmolytic Activity of Chiral Monoterpene Esters" *Rec. Nat. Prod.* **2011**, 5, 117-122.

- [15] Y. Sugawara, C. Hara, K. Tamura, T. Fujii, K. Nakamura, T. Masujima, T. Aoki, "Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools" *Analytica Chimica Acta* **1998**, 365, 293-299.
- [16] A. T. Peana, P. S. D'Aquila, F. Panin, G. Serra, P. Pippia, M. D. L. Moretti, "Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils" *Phytomedicine* **2002**, 9, 721-726.
- [17] C. Ghelardini, N. Galeotti, G. Mazzanti, "Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils" *Planta Medica* **2001**, 67, 564- 566.
- [18] N. Miceli, M. F. Taviano, D. Giuffrida, A. Trovato, O. Tzakou, E. M. Galati, "Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham" *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 97, 261-266.
- [19] N. G. M. Gomes, M. G. Campos, J. M. C. Órfão, C. A. F. Ribeiro, "Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery" *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **2009**, 33, 1372-1389.
- [20] H. J. D. Dorman, S. G. Deans, "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils" *Journal of Applied Microbiology* **2000**, 88, 308-316.
- [21] D. P. De Sousa, G. A. Júnior, L. N. Andrade, F. R. Calasans, X. P. Nunes, J. M. Barbosa-Filho, J. S. Batista, "Structure and spasmolytic activity relationships of analogues found in many aromatic plants" *Z. Naturforsch. C.* **2008**, 63, 808-812.
- [22] H. Gali-Muhtasib, C. Hilan, C. Khater, "Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils" *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, 71, 513-520.
- [23] A. El Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E. H. Aït Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F. N. R. Renaud, A. Elaissari, "Essential oils: From extraction to encapsulation" *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, 483 (1-2), 220-243.
- [24] M. Saifullah, "Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review" *Trends in Food Science & Technology* **2019**, 86, 230-251.
- [25] A. M. Bakry, S. Abbas, B. Ali, H. Majeed H., M. Y. Abouelwafa, A. Mousa, L. Liang, "Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications" *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY* **2016**, 15, 143-182.
- [26] P. Yun, S. Devahastin, N. Chiewchan, "Microstructures of encapsulates and their relations with encapsulation efficiency and controlled release of bioactive

constituents: A review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20.2 **2021**, 1768-1799.

[27] A.P. Chiriac, A. G. Rusu, L. E. Nita, V. M. Chiriac, I. Neamtu, A. Sandu, "Polymeric Carriers Designed for Encapsulation of Essential Oils with Biological Activity" *Pharmaceutics* **2021**, 13(5), 631.

[28] A. K. Chaudhari, V. K. Singh, S. Das, N. K. Dubey, "Nanoencapsulation of essential oils and their bioactive constituents: A novel strategy to control mycotoxin contamination in food system" *Food and Chemical Toxicology* **2021**, 149.

[29] A. Cid-Samamed, J. Rakmai, J. C. Mejuto, J. Simal-Gandara, G. Astray, "Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications" *Food Chemistry* **2022**, 384.

[30] A. Rezaei, M. Fathi, S. M. Jafari, "Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers" *Food Hydrocolloids* **2019**, 88, 146-162.

[31] G. M. Walker, G. G. Stewart, "Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages" *Beverages* **2016**, 2(4), 30.

[32] M. Parapouli, A. Vasileiadis, A. S. Afendra, E. Hatziloukas, "Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications" *AIMS Microbiol* **2020**, 6(1), 1-31.

[33] G. Coradello, N. Tirelli, "Yeast Cells in Microencapsulation. General Features and Controlling Factors of the Encapsulation Process." *Molecules* **2021**, 26, 3123.

[34] V. R. Ribeiro, I. D. A. A. Fernandes, I. P. Mari, A. P. Stafussa, R. Rossetto, G. M. Maciel, C. W. I. Haminiuk, "Bringing together *Saccharomyces cerevisiae* and bioactive compounds from plants: A new function for a well-known biosorbent" *Journal of Functional Foods* **2019**, 60.

[35] M. Nakhaee Moghadam, B. Khameneh, B. S. Fazly Bazzaz, "Saccharomyces cerevisiae as an Efficient Carrier for Delivery of Bioactives: a Review" *Food Biophysics* **2019**.

[36] A. A. Safoura, "Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes || Nanostructures of chitosan for encapsulation of food ingredients" **2019**, 381-418.

[37] G. Maleki, E. J. Woltering, M. R. Mozafari, "Applications of chitosan-based carrier as an encapsulating agent in food industry" *Trends in Food Science & Technology* **2022**, 120, 88-99.

[38] N. Kamaly, "Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release." *Chemical reviews* 116.4 **2016**, 2602-2663.

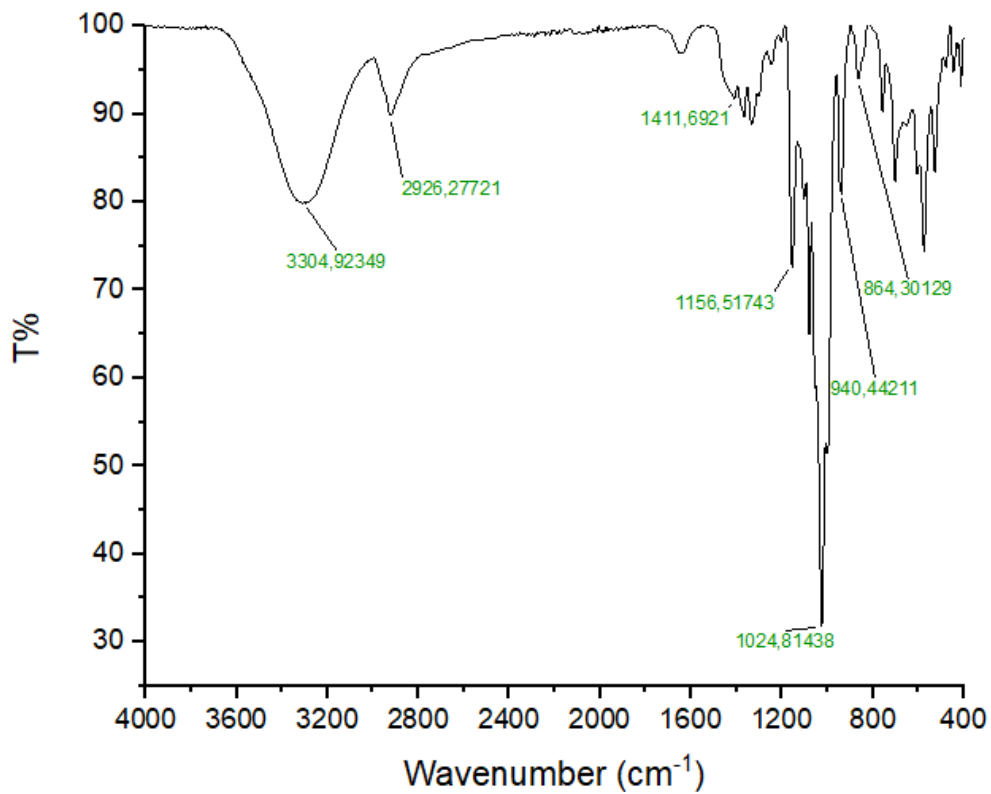
- [39] J. Luiz de Oliveira, E. V. Ramos Campos, L. F. Fraceto, "Recent Developments and Challenges for Nanoscale Formulation of Botanical Pesticides for Use in Sustainable Agriculture" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, 66 (34), 8898-8913.
- [40] S. Shakiba, "Emerging investigator series: polymeric nanocarriers for agricultural applications: synthesis, characterization, and environmental and biological interactions." *Environmental Science: Nano* 7.1 **2020**, 37-67.
- [41] M. P. Paarakh, "Release kinetics–concepts and applications." *Int. J. Pharm. Res. Technol* 8.1 **2018**, 12-20.
- [42] R. L. Abarca, F. J. Rodríguez, A. Guarda, M. J. Galotto, J. E. Bruna, "Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component" *Food Chemistry* **2016**, 196, 968-975.
- [43] C. Tan, J. Wang, B. Sun, "Polysaccharide dual coating of yeast capsules for stabilization of anthocyanins" *Food Chemistry* **2021**, 357.
- [44] A. Judefeind, M. M. D. Villiers, "Drug loading into and in vitro release from nanosized drug delivery systems." *Nanotechnology in Drug Delivery*, Springer, New York, NY, **2009**, 129-162.
- [45] D. S. Kohane, "Microparticles and nanoparticles for drug delivery." *Biotechnology and bioengineering* 96.2 **2007**, 203-209.
- [46] J. R. Wendorf, M. Singh, D. T. O'Hagan, "Nanoparticles and microparticles as vaccine adjuvants." *Nanoparticulates as Drug Carriers* **2006**, 675-696.
- [47] V. J. Mohanraj, Y. Chen, "Nanoparticles-a review." *Tropical journal of pharmaceutical research* 5.1 **2006**, 561-573.
- [48] J. W. Wiechers, N. Musee, "Engineered inorganic nanoparticles and cosmetics: facts, issues, knowledge gaps and challenges." *Journal of biomedical nanotechnology* 6.5 **2010**, 408-431.
- [49] M. Roussaki, "Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles." *Polymer Degradation and stability* 108 **2014**, 182-187.
- [50] S. Honary, "Green Synthesis of Silver Nanoparticles Induced by the Fungus *Penicillium citrinum*." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12.1 **2013**, 7-11.
- [51] M. Kotronia, E. Kavetsou, S. Loupassaki, S. Kikionis, S. Vouyiouka, A. Detsi, "Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) Essential Oil in β -Cyclodextrin (β -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes" *Bioengineering* **2017**, 4(3), 74.

- [52] H. S. Kwak, "Overview of Nano- and Microencapsulation for Foods" In *Nano- and Microencapsulation for Foods* **2014**.
- [53] F. Dou, Y. Lu, N. Nitin, "Yeast cell microcarriers for delivery of a model bioactive compound in skin" *International Journal of Pharmaceutics* **2021**, 609.
- [54] E. Kavetsou, S. Koutsoukos, D. Daferera, M. G. Polissiou, D. Karagiannis, D. Perdakis, A. Detsi, "Encapsulation of *Mentha pulegium* essential oil in yeast cell microcarriers: an approach to environmentally friendly pesticides" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**.
- [55] M. Hadidi, S. Pouramin, F. Adinepour, S. Haghani, S. M. Jafari, "Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities" *Carbohydrate Polymers* **2020**, 236.
- [56] J. Wu, Q. Shu, Y. Niu, Y. Jiao, Q. Chen, "Preparation, Characterization, and Antibacterial Effects of Chitosan Nanoparticles Embedded with Essential Oils Synthesized in an Ionic Liquid Containing System" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, 66 (27), 7006-7014.
- [57] M. Kfoury, "Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin." *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* 80.1 **2014**, 51-60.
- [58] P. P. Menezes, M. R. Serafini, B. V. Santana, R. S. Nunes, Jr. L. J. Quintans, G. F. Silva, I. A. Medeiros, M. Marchioro, B. P. Fraga, M. R. V. Santos, A. A. S. Araujo, "Solid-state- β - cyclodextrin complexes containing geraniol" *Thermochim. Acta* **2012**, 548, 45–50.
- [59] D. Toro-Sanchez, J. F. Ayala-Zavala, L. Machi., H. Santacruz, M. A. Villegas-Ochoa, E. Alvarez-Parrilla, G. A. Gonzalez-Aguilar, "Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules" *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2010**, 67, 431–441.
- [60] R. Salari, "New aspects of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel carrier for berberine." *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 21.1 **2013**, 1-8.
- [61] M. Kotronia, E. Kavetsou, S. Loupassaki, S. Kikionis, S. Vouyiouka, A. Detsi, "Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) Essential Oil in β -Cyclodextrin (β -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes" *Bioengineering* **2017**, 4, 74.
- [62] S. F. Hosseini, M. Zandi, M. Rezaei, F. Farahmandghavi, "Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study" *Carbohydrate Polymers* **2013**, 95 (1), 50-56.

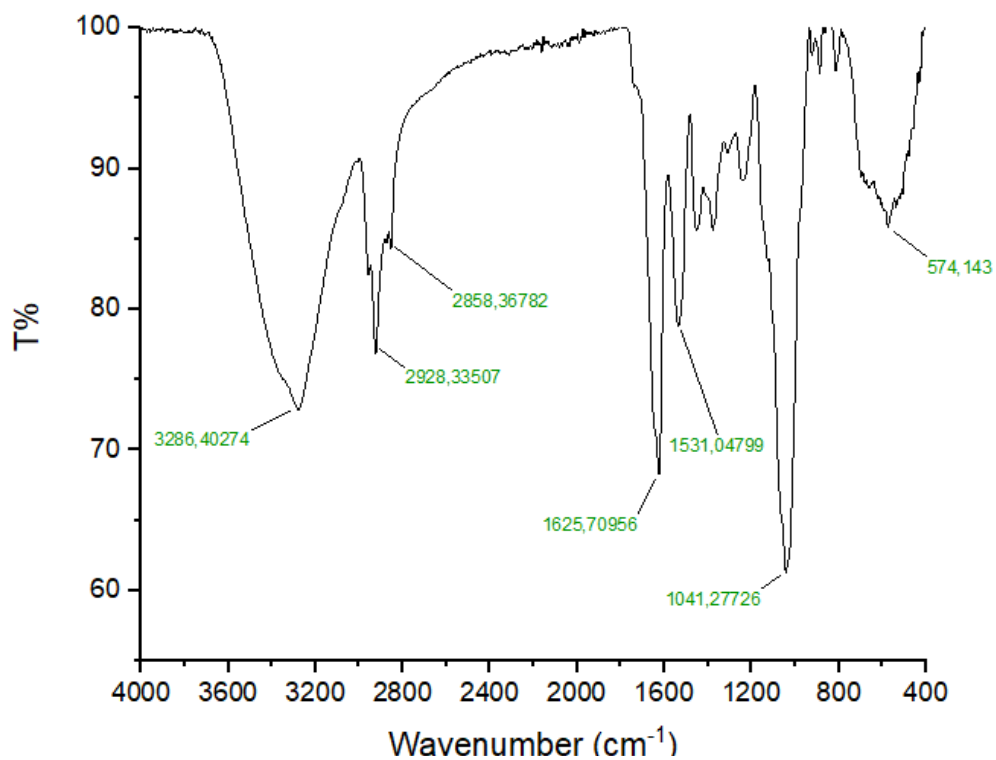
[63] L. Keawchaoon, R. Yoksan, "Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, 84 (1), 163-171.

[64] A. Anitha, V. G. Deepagan, V. D. Rani, D. Menon, S. V. Nair, R. Jayakumar, "Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles" *Carbohydrate Polymers* **2011**, 84 (3), 1158-1164.

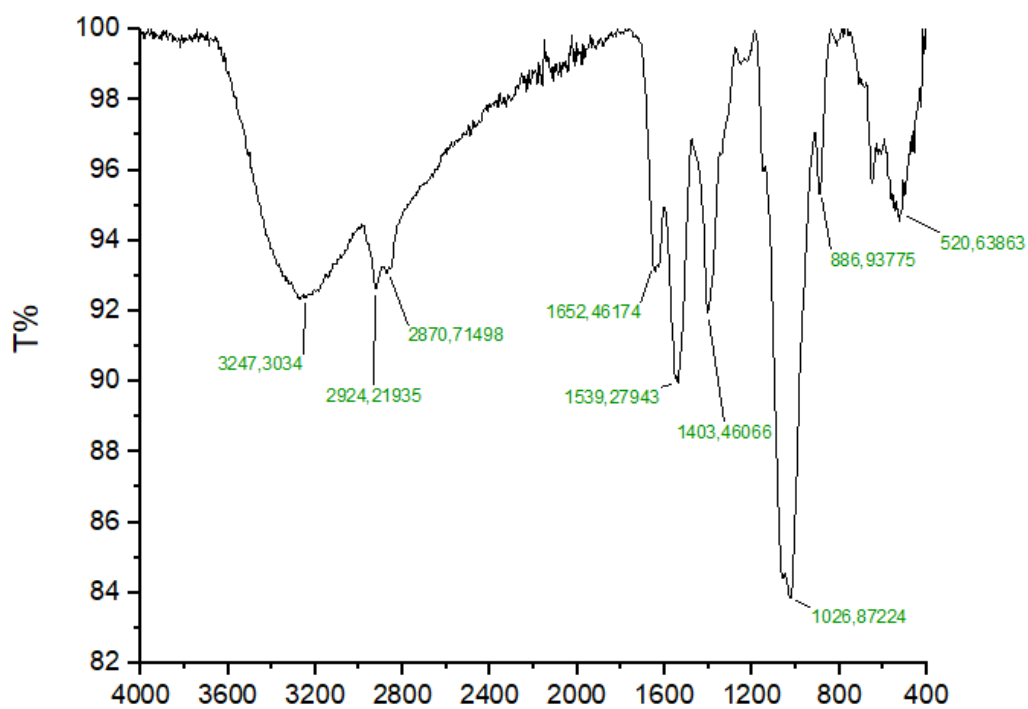
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ



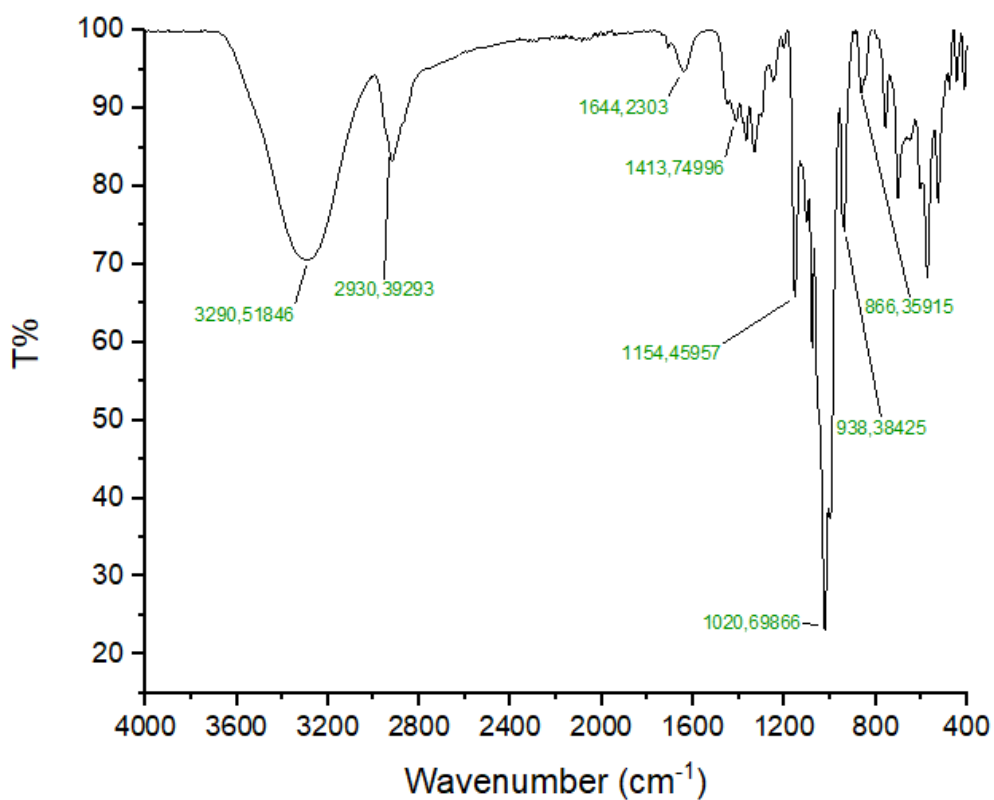
Εικόνα 59: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β -CD:OM3.



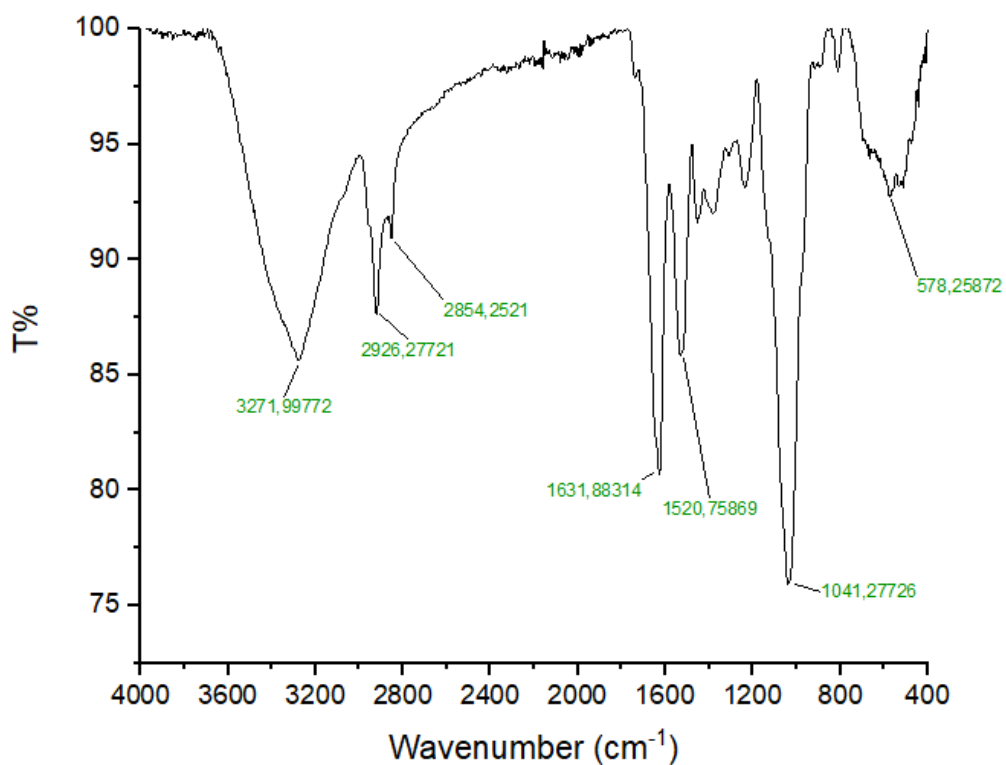
Εικόνα 60: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού *S. cerevisiae*:OM3.



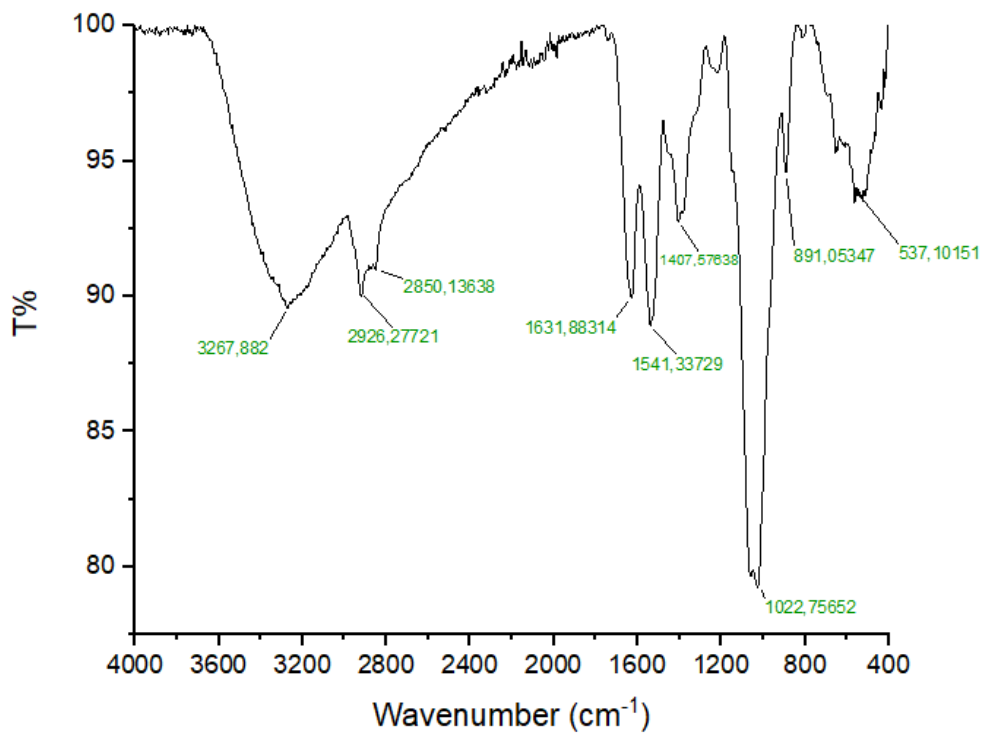
Εικόνα 61: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού CS:S. *cerevisiae:OM3*.



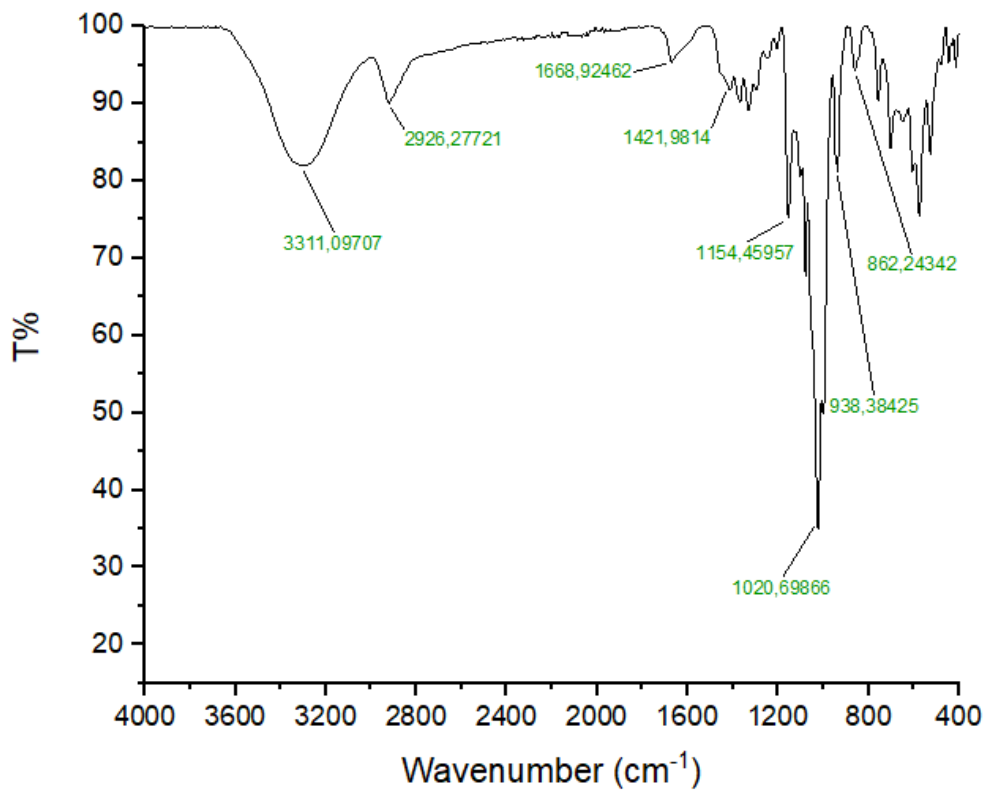
Εικόνα 62: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β-CD:MA.



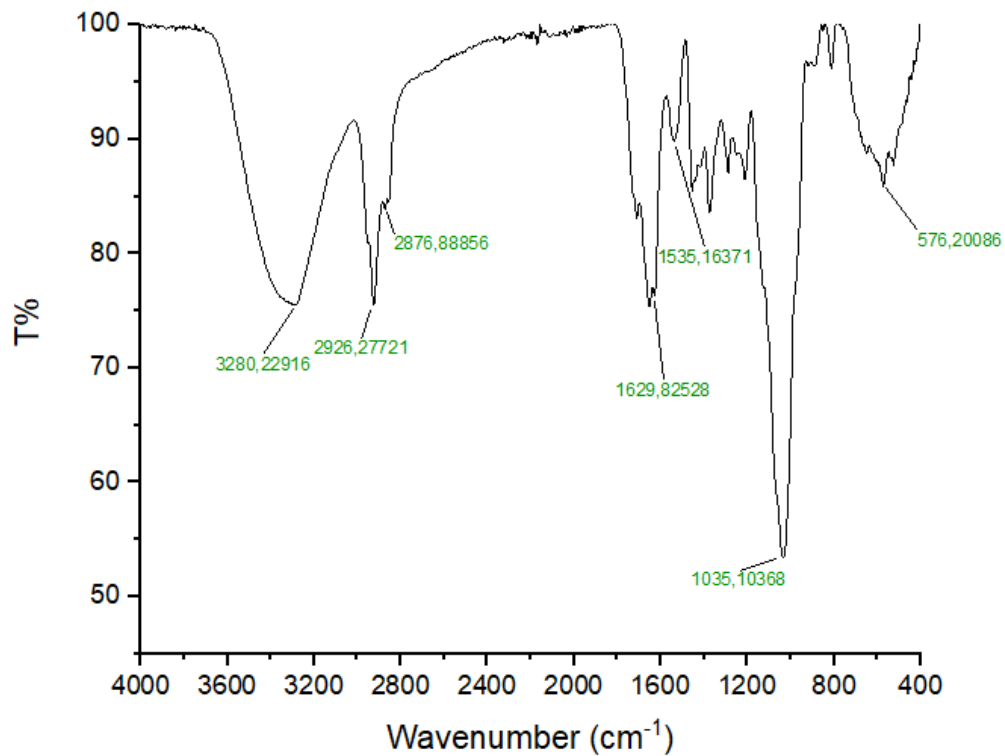
Εικόνα 63: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού *S. cerevisiae:MA*.



Εικόνα 64: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού CS:*S. cerevisiae:MA*.



Εικόνα 65: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β -CD:MP.



Εικόνα 66: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού *S. cerevisiae*:MP.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Γραφική Περίληψη	2
Εικόνα 2: Ένωση μορίων ισοπρενίων.....	13
Εικόνα 3: Μονοπάτια βιοσύνθεσης μονοτερπενίων, σесκιτερπενίων και διτερπενίων	14
Εικόνα 4: Δομή μεμονωμένων ημιτερπενίων και ημιτερπενοειδών	14
Εικόνα 5: Δομές ορισμένων μονοτερπενίων και μονοτερπενοειδών	15
Εικόνα 6: Δομή μεμονωμένων σесκιτερπενίων και σесκιτερπενοειδών.....	16
Εικόνα 7: Δομή μεμονωμένων διτερπενίων και διτερπενοειδών.....	17
Εικόνα 8: Χημικές δομές φαινυλοπροπενίων	18
Εικόνα 9: Χημικές δομές ενώσεων που περιέχουν θείο και άζωτο.....	19
Εικόνα 10: Διαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου της υδροαπόσταξης	28
Εικόνα 11: Διαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου απόσταξης με ατμό	29
Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής MAHD	33
Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση χωρίς διαλύτη συσκευής εκχύλισης μικροκυμάτων	33
Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της μικροκυματικής υδροδιάχυσης και βαρύτητας	34
Εικόνα 15: Σύνθεση μικροκάψουλας ελαίου σε απλοποιημένη μορφή	36
Εικόνα 16: Διάφορες μορφές καψουλών:(α)Μονοπύρηνες ή απλές,(β) Πολυκέλυφος,(γ)Πολυπύρηνες ή πολυπύρηνες, (δ)Μητρικές, (ε)Ακανόνιστες ..	37
Εικόνα 17: Δομή α - κυκλοδεξτρίνης	38
Εικόνα 18: Διαστάσεις α-CD, β-CD και γ-CD.....	39
Εικόνα 19: Δομή κυκλοδεξτρίνης για ενθυλάκωση βιοδραστικού ελαίου.....	39
Εικόνα 20: Στη δομή ενός κυττάρου ζυμομύκητα (εδώ αντιπροσωπεύεται σε κατάσταση μετά την εκβλάστηση), τα στοιχεία που δυνητικά λειτουργούν ως φραγμοί στην ενθυλάκωση (κυτταρικό τοίχωμα και κυτταρική μεμβράνη) απεικονίζονται με μεγεθυντικό τρόπο στη δεξιά πλευρά του σχήματος.....	41
Εικόνα 21: Δομή χιτοζάνης.....	43
Εικόνα 22: Ερευνητικά άρθρα που δημοσιεύθηκαν για συστήματα χιτοζάνης ως φορέα	45
Εικόνα 23: Πράσινη τεχνολογία βοτανικών φυτφαρμάκων σε συνδυασμό με την νανοτεχνολογία	46
Εικόνα 24: Σχηματικό διάγραμμα μηχανισμού ελεγχόμενης απελευθέρωσης ελαίου.....	50
Εικόνα 25: Μοντέλα προφίλ απελευθέρωσης δραστικής ουσίας	51
Εικόνα 26: Φαινόμενο απότομης απελευθέρωσης.....	52
Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε β-κυκλοεξτρίνη.....	59
Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας πλασμόλυσης κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
Εικόνα 29: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε πλασμολυμένα κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε χιτοζάνη	62
Εικόνα 31: Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας επικάλυψης κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i> εγκλεισμένων με αιθέριο έλαιο με χιτοζάνη	63

Εικόνα 32: Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματόμετρο μάζας, Mass Spectrometer Varian 220-MS.....	64
Εικόνα 33: Συσκευή ZetaSizer Nano ZS, για τις μετρήσεις DLS.....	63
Εικόνα 34: Συσκευή Buker, Alpha II για την λήψη φασμάτων FTIR.....	66
Εικόνα 35: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM2).....	68
Εικόνα 36: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM3).....	69
Εικόνα 37: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Arvensis</i> (MA).....	69
Εικόνα 38: Φάσμα MS της μενθόλης.....	70
Εικόνα 39: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (MP).....	71
Εικόνα 40: Κατανομή μεγέθους συστήματος εγκλεισμού <i>S. cerevisiae:OM2</i>	78
Εικόνα 41: Κατανομή μεγέθους συστήματος εγκλεισμού β-CD:OM3.....	78
Εικόνα 42: Κατανομή μεγέθους συστήματος εγκλεισμού CS: <i>S. cerevisiae:MA</i>	79
Εικόνα 43: Κατανομή ζ-δυναμικού του συστήματος εγκλεισμού <i>S. cerevisiae:MA</i>	79
Εικόνα 44: Κατανομή ζ-δυναμικού του συστήματος εγκλεισμού β-CD:MP.....	80
Εικόνα 45: Φάσμα FT-IR β-κυκλοδεξτρίνης.....	82
Εικόνα 46: Φάσμα FT-IR πλασμολυμένων κυττάρων <i>S. cerevisiae</i>	83
Εικόνα 47: Φάσμα FT-IR της χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους.....	84
Εικόνα 48: Φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM2).....	85
Εικόνα 49: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β-CD:OM2.....	86
Εικόνα 50: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού <i>S.cerevisiae:OM2</i>	87
Εικόνα 51: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού CS: <i>S.cerevisiae:OM2</i>	87
Εικόνα 52: Φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM3)......	88
Εικόνα 53: Φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Arvensis</i> (MA).....	90
Εικόνα 54: Φάσμα FT-IR του του συστήματος εγκλεισμού CS:MA.....	91
Εικόνα 55: Φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (MP).....	92
Εικόνα 56: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM3) κατά την μελέτη απελευθέρωσής του από την β-CD κάθε χρονική στιγμή.	94
Εικόνα 57: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM3) κατά την μελέτη απελευθέρωσής του από τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη κύτταρα ζυμομύκητα κάθε χρονική στιγμή.....	99
Εικόνα 58: Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Arvensis</i> κατά την μελέτη απελευθέρωσής του από τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη κύτταρα ζυμομύκητα κάθε χρονική στιγμή.....	99
Εικόνα 59: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β-CD:OM3.....	111
Εικόνα 60: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού <i>S. cerevisiae:OM3</i>	111
Εικόνα 61: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού CS: <i>S. cerevisiae:OM3</i>	112
Εικόνα 62: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β-CD:MA.....	112
Εικόνα 63: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού <i>S. cerevisiae:MA</i>	113
Εικόνα 64: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού CS: <i>S. cerevisiae:MA</i>	113
Εικόνα 65: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού β-CD:MP.....	114
Εικόνα 66: Φάσμα FT-IR του συστήματος εγκλεισμού <i>S. cerevisiae:MP</i>	114

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κύριοι χημειότυποι μερικών αρωματικών φυτών.....	11
Πίνακας 2: Διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων αιθέριων ελαίων και οι βιοδραστηκότητές τους.....	27
Πίνακας 3: Φυσικά υλικά για παραγωγή μικρο/νανο σκευασμάτων παρασιτοκτόνου.....	47
Πίνακας 4: Βοτανικά φυτοφάρμακα που παράγονται στο εμπόριο με βάση την τεχνολογία μικρο/νανο εγκλειμού.....	49
Πίνακας 5: Χαρακτηρισμός μηχανισμού απελευθέρωσης με βάση την τιμή του εκθέτη n.....	55
Πίνακας 6: Ανάλυση χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM2).....	67
Πίνακας 7: Ανάλυση χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM3).....	68
Πίνακας 8: Ανάλυση χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i>	70
Πίνακας 9: Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM2).....	72
Πίνακας 10: Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM3).....	72
Πίνακας 11: Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Arvensis</i> (MA).....	72
Πίνακας 12: Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (MP).....	72
Πίνακας 13: Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM2).....	73
Πίνακας 14: Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM2).....	74
Πίνακας 15: Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM3).....	74
Πίνακας 16: Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM3).....	74
Πίνακας 17: Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Mentha Arvensis</i> (MA).....	74
Πίνακας 18: Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Mentha Arvensis</i> (MA).....	75
Πίνακας 19: Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (MP).....	75
Πίνακας 20: Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (MP).....	75
Πίνακας 21: Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο <i>Origanum Majorana</i> (OM2).....	77
Πίνακας 22: Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο <i>Origanum Majorana</i> (OM3).....	78
Πίνακας 23: Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο <i>Mentha Arvensis</i> (MA).....	78
Πίνακας 24: Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο <i>Mentha Pulegium</i> (MP).....	79

Πίνακας 25: Συντελεστής συσχέτισης R^2 για τα διάφορα κινητικά μοντέλα και εκθέτης απελευθέρωσης n , για την περίπτωση απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου <i>OM3</i>	95
Πίνακας 26: Συντελεστής συσχέτισης R^2 για τα διάφορα κινητικά μοντέλα και εκθέτης απελευθέρωσης n , για την περίπτωση απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου <i>MA</i>	96
Πίνακας 27: Συντελεστής συσχέτισης R^2 για τα διάφορα κινητικά μοντέλα και εκθέτης απελευθέρωσης n , για την περίπτωση απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου <i>MA</i> νανοσωματίδια χιτοζάνης	98

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Συγκριτικό διάγραμμα <i>in vitro</i> απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου <i>Origanum Majorana</i> (OM3) από τα διάφορα συστήματα εγκλεισμού	95
Διάγραμμα 2: Συγκριτικό διάγραμμα <i>in vitro</i> απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Arvensis</i> (MA) από τα διάφορα συστήματα εγκλεισμού	97
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα <i>in vitro</i> απελευθέρωσης του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Arvensis</i> (MA) από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης	99