



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σύμπλοκα εγκλεισμού αιθερίου ελαίου του φυτού *Mentha Pulegium* (φλισκούνη) σε β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες και αξιολόγηση της βιοδραστικότητας τους

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΕΡΖΕΚΟΥ ΧΡΥΣΑΥΓΗ



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ :
Δρ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ,
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΜΠ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. Δρ. Αναστασίας Δέτση.

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Δρ. Αναστασία Δέτση, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική καθοδήγηση, τις υποδείξεις της, την επιμονή της, τη συμπαράστασή της, τη συνεχή της υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος.

Εν συνεχεία, οφείλω να ευχαριστήσω την τριμελή εξεταστική επιτροπή για τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Επιπλέον, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους υποψήφιους διδάκτορες Ιωάννα Πιττερού και Αλέξανδρο Καλοσπύρο για τη συνεχή υποστήριξη και απεριόριστη βοήθειά τους, καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την εξαιρετική συνεργασία μας, καθώς και την αισιοδοξία που μου μετέφεραν σε κάθε δυσκολία.

Εν συνεχεία, ευχαριστώ τους συνεργάτες από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και ειδικότερα το Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής Του Ανθρώπου για την προσφορά των αιθερίων ελαίων *Mentha Pulegium*.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., για την αρμονική συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε.

Τέλος, θα ήθελα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για όλη τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, η οποία αποτέλεσε ισχυρό κίνητρο για την ολοκλήρωσή τους. Μάλιστα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το φιλικό μου περιβάλλον που με ενθάρρυνε και υπήρξαν συνοδοιπόροι σε αυτήν τη προσπάθεια.

Δερζέκου Χρυσαιγή,

Ιούνιος 2023

Abstract

Essential oils are aromatic, volatile liquids extracted from plants, that can be obtained in various ways, distillation being the main one. They are mixtures of aromatic and odorless substances and consist of lipophilic and highly volatile secondary plant metabolites, mainly mono- and sesquiterpenes, phenylpropanoids, straight chain compounds and sulfur and nitrogen compounds. Essential oils vary due to the method of their extraction, the geographical origin and the growing conditions of the plants of their origin. They are characterized as bioactive compounds with wide application in the cosmetics and food industry as well as in agrochemical applications.

Micro- or nano-encapsulation is an alternative solution that can be used to overcome several limitations in the application of essential oils, since EOs are compounds that can be easily degraded due to interactions with other chemical components and exposure to various factors such as light, temperature and oxygen. Thus, essential oils can be encapsulated in (micro/nano) capsules, as a way of protecting them and controlling the release of essential oils during storage and use.

Cyclodextrins are chemically and physically stable macromolecules, which belong to the family of cyclic oligosaccharides, consisting of repeated glucose units. They have the ability of developing intramolecular interactions, due to their structure since they are water-soluble, biocompatible, with a hydrophilic outer surface and a lipophilic cavity.

Saccharomyces cerevisiae (baker's yeast) is a viable, biocompatible and biodegradable carrier. Incorporating EOs into it, is achieved through a simple process that uses heat and stirring. However, to allow water-soluble compounds to diffuse into it, cells must first undergo "plasmolysis," a procedure that disrupts or weakens cell membranes.

The purpose of this thesis is to study the encapsulation processes of *Mentha Pulegium* essential oils (*MP4a*, *MP5a* essential oils) in the biodegradable carriers β -cyclodextrin and its chemically modified matrices, Methyl- β -cyclodextrin (*Me- β -CD*), 2-hydroxy-propyl- β -cyclodextrin (*HP- β -CD*) and in plasmolyzed cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Their aim was to protect and stabilize volatile essential oils from high temperatures and oxidizing agents, increase their bioavailability, as well as controlled release.

The extraction of essential oils was conducted at the Agricultural University of Athens. The analysis of the chemical composition of the essential oils was conducted with gas chromatograph coupled with mass spectrometer (GC-MS), where *Mentha Pulegium* essential oils were found to have pulegone and isomenthone as the main components. For successful encapsulation in yeast cells, *Saccharomyces cerevisiae* cells were preceded by plasmolysis with a 10% NaCl solution, to remove the contained water and water-soluble molecules therein.

Then, the encapsulation of *Mentha Pulegium* essential oils in the plasmolysed cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as well as in β -cyclodextrin and its modified matrices was carried out by the method of co-precipitation and kneading.

Process yield, for the entrapment systems, was satisfactory, ranging between 71.1% and 87.4%, while the inclusion efficiency, which was conducted with gas chromatograph mass coupled with mass spectrometer (GC-MS), ranged from 57.02% to 98.48%. In fact, these

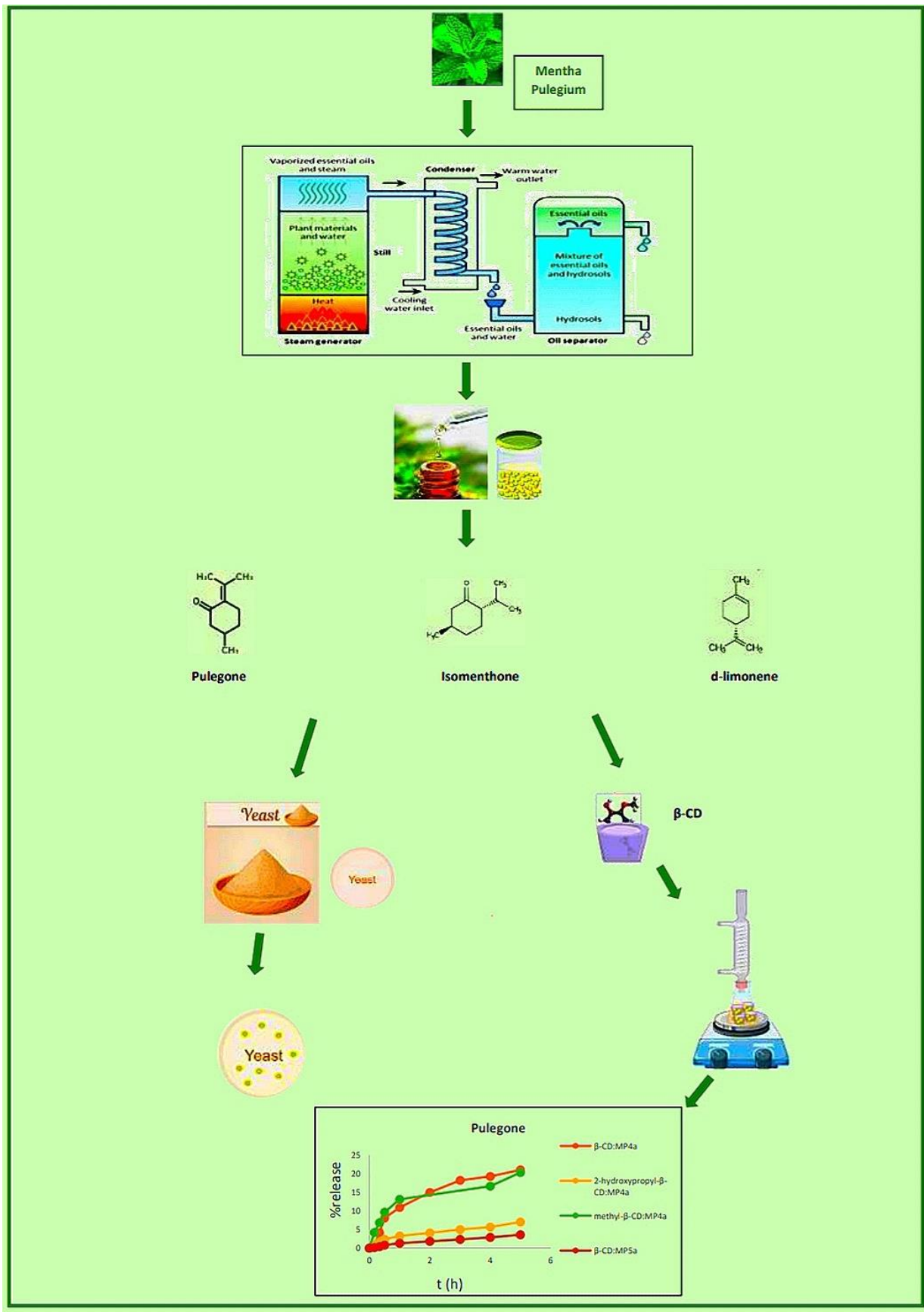
systems were characterized in terms of nanoscale size ($311.4\pm 1.8\text{nm}$ to $465.0\pm 0.3\text{nm}$), Polydispersity Index (0.369 ± 0.040 to 0.473 ± 0.032) and z-potential ($-21.9\pm 0.8\text{mV}$ to $-11.7\pm 0.6\text{mV}$) by means of Dynamic Light Scattering (DLS) and in terms of structure by means of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). From the above methods of characterizing the encapsulation systems, the successful encapsulation of the essential oils in the encapsulation carriers in high percentages and the interactions between them, were confirmed. Additionally, the antioxidant activity of the oils and inclusion complexes (ICs) was studied through the ability to inhibit lipid peroxidation induced by the free radical initiator AAPH, where it was confirmed and expressed as %inhibition of linoleic acid peroxidation, ranging between 71.69% to 97.26%.

Finally, the release of the essential oils was conducted, which initially shows a rapid release ('burst effect') in the first 30min, followed by stabilization. Regarding the modeling kinetics for β -cyclodextrin carrier essential oils and its modified matrices, it was found that the kinetic model that adequately describes the release, based on the correlation coefficient R^2 , is the Higuchi model, while the release exponent n of the Korsmeyer -Peppas equation and the $|A/B|$ ratio by Kopcha indicate carrier erosion and diffusion as the release mechanism.

Scientific Area: Organic Chemistry, Nanotechnology

Key words: essential oils, *β -cyclodextrin*, *Saccharomyces cerevisiae*, encapsulation, complexes, encapsulation performance, process, release study

ΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ



Εικόνα 1 : Γραφική Περίληψη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αιθέρια έλαια είναι αρωματικά, πτητικά υγρά που προέρχονται από τα φυτά και λαμβάνονται με ποικίλες μεθόδους, με κυριότερη την απόσταξη. Αποτελούν μείγματα αρωματικών και άοσμων ουσιών, ενώ αποτελούνται από λιπόφιλους και εξαιρετικά πτητικούς δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες, κυρίως μονο- και σεσκιτερπένια, φαινυλοπροπανοειδή, ενώσεις ευθείας αλυσίδας και ενώσεις θείου και αζώτου. Τα αιθέρια έλαια ποικίλλουν λόγω της μεθόδου παραλαβής τους, της γεωγραφικής προέλευσης και των συνθήκων ανάπτυξης των φυτών προέλευσης τους. Χαρακτηρίζονται ως βιοδραστικές ενώσεις με ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία καλλυντικών και τροφίμων, καθώς και σε αγροχημικές εφαρμογές.

Ο μικρο ή νάνο εγκλεισμός είναι μια εναλλακτική λύση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ξεπεραστούν αρκετοί περιορισμοί στην εφαρμογή αιθέριων ελαίων, καθώς τα ΕOs είναι ενώσεις που μπορούν εύκολα να αποικοδομηθούν λόγω αλληλεπιδράσεων με άλλα χημικά συστατικά και έκθεσης σε διάφορους παράγοντες, όπως το φως, η θερμοκρασία και το οξυγόνο. Έτσι, τα αιθέρια έλαια μπορούν να εγκλωβιστούν σε (μικρο/νάνο) κάψουλες, ως τρόπος προστασίας τους και ελέγχου της αποδέσμευσης αιθέριων ελαίων κατά την αποθήκευση και την εφαρμογή τους.

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι χημικά και φυσικά σταθερά μακρομόρια, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των κυκλικών ολιγοσακχαριτών, αποτελούμενοι από επαναλαμβανόμενες μονάδες γλυκόζης. Έχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, λόγω της δομής τους αφού είναι υδατοδιαλυτά, βιοσυμβατά, με υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και λιπόφιλη κοιλότητα.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* (μαγιά αρτοποιίας) αποτελεί βιώσιμο, βιοσυμβατό και βιοαποδομήσιμο φορέα. Η ενσωμάτωση ΕOs σε αυτό, επιτυγχάνεται μέσω μιας απλής διαδικασίας που χρησιμοποιεί θερμότητα και ανάδευση. Ωστόσο, για να επιτραπεί η διάχυση υδατοδιαλυτών ενώσεων σε αυτόν, πρέπει πρώτα τα κύτταρα να υποβληθούν σε «πλασμόλυση», δηλαδή μια επεξεργασία που διαταράσσει ή εξασθενεί τις κυτταρικές μεμβράνες.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των διεργασιών εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων *Mentha Pulegium* (αιθέρια έλαια MP4a, MP5A) στους βιοδιασπώμενους φορείς β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της, Methyl-β-cyclodextrin (*Me-β-CD*), 2-hydroxy-propyl-β-cyclodextrin (*HP-β-CD*) και σε πλασμολυμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Στόχος αυτών ήταν η προστασία και η σταθεροποίηση των πτητικών αιθερίων ελαίων από υψηλές θερμοκρασίες και οξειδωτικούς παράγοντες, η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας τους, καθώς και η τροποποιημένη αποδέσμευση.

Η εκχύλιση των αιθερίων ελαίων διεξήχθη στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Η ανάλυση της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας (GC-MS), όπου τα αιθέρια έλαια *Mentha Pulegium* βρέθηκε να έχουν ως κύρια συστατικά την πουλεγόνη και την ισομενθόνη.

Για τον επιτυχή εγκλωβισμό στα κύτταρα ζυμομύκητα, προηγήθηκε πλασμόλυση των κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* με διάλυμα NaCl 10%, προς απομάκρυνση του περιεχόμενου νερού και των υδατοδιαλυτών, σε αυτό, μορίων. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ο εγκλωβισμός των αιθερίων ελαίων *Mentha Pulegium* στα πλασμολυμένα κύτταρα του

ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* καθώς και στην β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της με την μέθοδο της συγκαταβύθισης και της υγρής λειοτρίβισης με σχηματισμό πάστας.

Οι αποδόσεις διεργασίας, για τα συστήματα εγκλεισμού, ήταν ικανοποιητικές με εύρος τιμών μεταξύ 71.1% και 87.4%, ενώ οι αποδόσεις εγκλεισμού, που έγιναν μέσω αέριου χρωματογράφου μάζας συζευγμένου με φασματομέτρο μάζας (GC-MS), είχαν εύρος τιμών 57.02% με 98.48%. Μάλιστα, τα συστήματα αυτά χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος νανοσωματιδίων ($311.4 \pm 1.8 \text{ nm}$ έως $465.0 \pm 0.3 \text{ nm}$), δείκτη πολυδιασποράς (0.369 ± 0.040 έως 0.473 ± 0.032) και ζ-δυναμικό ($-21.9 \pm 0.8 \text{ mV}$ έως $-11.7 \pm 0.6 \text{ mV}$) μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και ως προς τη δομή μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR). Από τις παραπάνω μεθόδους χαρακτηρισμού των συστημάτων εγκλεισμού, επιβεβαιώθηκε ο επιτυχής εγκλεισμός των αιθερίων ελαίων στους φορείς εγκλεισμού σε υψηλά ποσοστά και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των ελαίων και των συμπλόκων εγκλεισμού μέσω της ικανότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, όπου και επιβεβαιώθηκε και εκφράστηκε ως %ποσοστό αναστολής της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος, με εύρος 71.69% έως 97.26%.

Τέλος, έγινε μελέτη της αποδέσμευσης των αιθερίων ελαίων, η οποία εμφανίζει αρχικά μια ταχεία αποδέσμευση ('burst effect') στα 30 πρώτα λεπτά, που ακολουθείται από σταθεροποίηση. Όσον αφορά τη κινητική μοντελοποίησης για τα αιθέρια έλαια με φορέα την β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της, διαπιστώθηκε ότι το κινητικό μοντέλο που περιγράφει καλύτερα την αποδέσμευση, βάσει του συντελεστή προσαρμογής R^2 , είναι το μοντέλο Higuchi, ενώ ο εκθέτης αποδέσμευσης η της εξίσωσης Korsmeyer-Peppas και ο λόγος $|A/B|$ της Korcha, υπέδειξαν ως μηχανισμό αποδέσμευσης την διάβρωση του φορέα και την διάχυση.

Επιστημονική Περιοχή : Οργανική Χημεία, Νανοτεχνολογία

Λέξεις κλειδιά : αιθέρια έλαια, β-κυκλοδεξτρίνη, *Saccharomyces cerevisiae*, εγκλεισμός, σύμπλοκα, απόδοση εγκλεισμού, απόδοση διεργασίας, μελέτη αποδέσμευσης

Πίνακας περιεχομένων

1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
1.1 Αιθέρια Έλαια-Essential Oils (EOs)	15
1.1.1 Εισαγωγή	15
1.1.2 Χημική σύσταση αιθερίων ελαίων	15
1.1.2.1 Τερπένια και τερπενοειδή	16
1.1.2.2 Αρωματικές ενώσεις – Φαινυλοπροπανοειδή	19
1.1.2.3 Ενώσεις ευθείας αλυσίδας	20
1.1.2.4 Ενώσεις θείου ή αζώτου	20
1.1.3 Βιοδραστικότητα αιθέριων ελαίων	21
1.1.3.1 Αντιμικροβιακή δραστηριότητα	21
1.1.3.2 Αντιμυκητιακή δράση	22
1.1.3.3 Αντιϊκή δράση	22
1.1.3.4 Αντικαρκινική δράση	22
1.1.3.5 Αντιοξειδωτική δράση	23
1.1.3.6 Κυτταροτοξικότητα	23
1.1.3.7 Αλληλοπαθητική δραστηριότητα	24
1.1.3.8 Απωθητική και εντομοκτόνος δράση	24
1.1.4 Μέθοδοι παραλαβής αιθερίων ελαίων	25
1.1.4.1 Κλασικές και συμβατικές μέθοδοι	26
1.1.4.2 Προηγμένες ή καινοτόμες μέθοδοι	28
1.1.4.3 Μη χρησιμοποιούμενες μέθοδοι	32
1.1.5 <i>Mentha Pulegium L.</i> / Φλισκούνι	32
1.1.5.1 Γενικά στοιχεία	32
1.1.5.2 Αγροχημικές εφαρμογές	33
1.2 (Μικρο/ Νανο) Εγκλεισμός / Ενθυλάκωση βιοδραστικών ενώσεων σε βιοδιασπώμενους φορείς	34
1.2.1 Εισαγωγή	34
1.2.2 Νανοεγκλεισμός	34
1.2.3 Μικροεγκλεισμός	35
1.2.4 Σύγκριση μικρο- και νανο-εγκλεισμού	36
1.2.5 Μέθοδοι εγκλεισμού	37
1.2.6 Φορείς εγκλεισμού	39

1.2.6.1 Κυκλοδεξτρίνες.....	39
1.2.6.2 Ζυμομύκητες	46
1.2.7 Μελέτη αποδέσμευσης – Release της δραστικής ουσίας	47
1.2.7.1 Προφίλ αποδέσμευσης φαρμάκου	48
1.2.7.2 Μαθηματική μοντελοποίηση αποδέσμευσης	49
1.2.7.2.1 Μοντέλα μόνιμης κατάστασης	49
1.2.7.2.2 Μοντέλα μη μόνιμης κατάστασης.....	50
1.2.7.2.2.1 Εμπειρικά και ημιεμπειρικά μοντέλα..	50
1.2.7.2.2.2 Μοντέλα ελεγχόμενης διάχυσης	52
1.2.8 Χαρακτηρισμός συμπλόκων εγκλεισμού	53
1.2.8.1 Μέγεθος (size)	53
1.2.8.2 Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	53
1.2.8.3 ζ - δυναμικό (zeta-potential)	53
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	54
2.1 Υλικά, αντιδραστήρια, όργανα και συσκευές	54
2.2 Μέθοδοι	55
2.2.1 Εγκλεισμός αιθερίου ελαίου σε β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της	55
2.2.1.1 Συγκαταβύθιση (co-precipitation)	55
2.2.1.2 Ζύμωση/σχηματισμός πάστας (kneading).....	57
2.2.2 Εγκλωβισμός αιθερίου ελαίου σε κύτταρα ζυμομύκητα.....	57
2.2.2.1 Πλασμόλυση κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (μαγιά αρτοποιίας).....	57
2.2.2.2 Εγκλωβισμός αιθέριου ελαίου σε κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
2.3 Απόδοση εγκλεισμού	60
2.4 Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού	61
2.5 Ανάλυση χημικής σύστασης αιθέριων ελαίων GC-MS	61
2.6 Χαρακτηρισμός παραγόμενων σωματιδίων	62
2.6.1 Μέγεθος σωματιδίων και ζ-δυναμικό	62
2.6.2 Μελέτη δομής μέσω FT-IR	63
2.6.3 Αποδέσμευση αιθερίου ελαίου από το σύστημα εγκλεισμού	64
2.6.4 Αξιολόγηση αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης με AAPH των ελαίων και των συμπλόκων αυτών με τη β-CD και τις τροποποιημένες μορφές της	65

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
3.1 Ανάλυση χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων GC-MS	66
3.2 Απόδοση πλασμólυσης κυττάρων ζυμομυκήτων	68
3.3 Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού	69
3.4 Απόδοση εγκλεισμού	70
3.5 Μέγεθος και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού	72
3.6 Μελέτη δομής μέσω Φασματομετρίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier	74
3.7 Μελέτη αποδέσμευσης <i>in vitro</i>	80
3.8 Μελέτη της αντιοξειδωτικότητας	83
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	84
5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	86
Παράρτημα Εικόνων	87
Παράρτημα Πινάκων	91
Παράρτημα Διαγραμμάτων.....	92
Βιβλιογραφία	94

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Κυκλοδεξτρίνη	Cyclodextrin	CD
β-κυκλοδεξτρίνη	β-cyclodextrin	β-CD
2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη	2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin	HP-β-CD
Μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη	Methyl-β-cyclodextrin	Me-β-CD
Αιθέρια έλαια	Essential Oils	EOs
Σύμπλοκο εγκλεισμού	Inclusion Complex	IC
διυδροχλωρικό 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride	AAPH
Απόδοση εγκλεισμού	Encapsulation Efficiency	EE
Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού	Inclusion Efficiency	IE
Δυναμική Σκέδαση Φωτός	Dynamic Light Scattering	DLS
Αέρια χρωματογραφία φασματομετρία μάζας	Gas chromatography-mass spectrometry	GC-MS
Φασματομετρία υπερίθρου με μετασχηματισμό Fourier	Fourier - transform infrared spectroscopy	FT-IR
Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού	Ultraviolet-visible spectroscopy	UV-Vis

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1.	Γραφική Περίληψη.....	4
Εικόνα 2.	Μερικά από τα κύρια βιοδραστικά συστατικά των ΕΟ.....	16
Εικόνα 3.	Δομή ημιτερπενίων (a), μονοτερπενίων (b), σεσκιτερπενίων (c).....	17
Εικόνα 4.	Μέθοδος κεφαλής-ουράς σύζευξης δύο ισοπρενίων.....	17
Εικόνα 5.	Βιοσύνθεση τερπενοϊδών μέσω της οδού μεβαλονικού (A) και της οδού DXR (B).....	18
Εικόνα 6.	Παραδείγματα δομών ενώσεων που προέρχονται από φαινυλοπροπάνιο..	19
Εικόνα 7.	Τρόποι εξαγωγής αιθερίων ελαίων.....	25
Εικόνα 8.	Σχηματική αναπαράσταση υδροαπόσταξης με συσκευή Clevenger.....	26
Εικόνα 9.	Σχηματική αναπαράσταση της απόσταξης με ατμό	26
Εικόνα 10.	Σχηματική αναπαράσταση της απόσταξης/εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες	27
Εικόνα 11.	Σχηματική αναπαράσταση της εκχύλισης ψυχρής έκθλιψης.....	27
Εικόνα 12.	Σχηματική αναπαράσταση της εκχύλισης με οργανικό διαλύτη με τη μέθοδο Soxhlet.....	28
Εικόνα 13.	Σχηματική αναπαράσταση της εξαγωγής υπερκρίσιμου υγρού.....	29
Εικόνα 14.	Σχηματική αναπαράσταση της εκχύλισης με μικροκύματα.....	30
Εικόνα 15.	Σχηματική αναπαράσταση της εξαγωγής με υπερήχους.....	30
Εικόνα 16.	Σχηματική αναπαράσταση της MHG.....	31
Εικόνα 17.	Σχηματική αναπαράσταση της Enfleurage	32
Εικόνα 18.	<i>Mentha Pulegium</i>	33
Εικόνα 19.	Είδη πολυμερικών νανοσωματιδίων	35
Εικόνα 20.	Σχηματική αναπαράσταση μιας μικροκάψουλας και μιας μικρόσφαιρας.....	36
Εικόνα 21.	Η χημική δομή και η δομή του κόλλουρου κώννου της κυκλοδεξτρίνης	40
Εικόνα 22.	Δομή και διαμόρφωση φυσικών κυκλοδεξτρινών.....	40
Εικόνα 23.	Οι βασικές τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες.....	42
Εικόνα 24.	Χημική δομή της β-CD, 2-hydroxypropyl-β-CD, methyl-β-CD.....	43
Εικόνα 25.	Σχηματισμός συμπλόκου εγκλεισμού.....	44
Εικόνα 26.	Τεχνικές σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης	45
Εικόνα 27.	Τυπικά προφίλ αποδέσμευσης φαρμάκου που περιλαμβάνουν διαφορετικές φάσεις αποδέσμευσης. Η αυθαίρετη μονάδα (AU) χρησιμοποιείται για το χρόνο αποδέσμευσης φαρμάκου.....	48
Εικόνα 28.	Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός μορίου κυκλοδεξτρίνης, με ένδειξη της υδρόφιλης εξωτερικής επιφάνειας και της υδρόφοβης κοιλότητας.....	56
Εικόνα 29.	Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε β-κυκλοδεξτρίνη με μέθοδο συγκαταβύθισης.....	56
Εικόνα 30.	Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες με μέθοδο kneading.....	57
Εικόνα 31.	Σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού σε τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες..	57
Εικόνα 32.	Συσκευή υπερφυγοκέντρισης SORVALL LYNX 6000.....	58
Εικόνα 33.	Συσκευή λυοφιλοποίησης Lablgo Mini.....	59
Εικόνα 34.	Σχηματική αναπαράσταση συνολικής διεργασίας εγκλεισμού αιθερίων ελαίων σε κύτταρα ζυμομύκητα.....	60

Εικόνα 35.	Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματοόμετρο μάζας, Mass Spectrometer Varian 220-MS.....	62
Εικόνα 36.	Συσκευή DLS, ZetaSizer Nano ZS.....	63
Εικόνα 37.	Κυψελίδα τύπου Y (DTS1070).....	63
Εικόνα 38.	Συσκευή Bruker Alpha II για τη λήψη φασμάτων FT-IR.....	63
Εικόνα 39.	Πειραματική διάταξη για την αποδέσμευση αιθερίου ελαίου από το σύστημα εγκλεισμού.....	64
Εικόνα 40.	Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, JASCO V-770.....	65
Εικόνα 41.	Δομή κύριων συστατικών του <i>Mentha Pulegium</i>	67
Εικόνα 42.	Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (MP4a)	67
Εικόνα 43.	Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (MP5a)	68
Εικόνα 44.	Φάσμα MS της πουλεγόνης.....	68
Εικόνα 45.	Φάσμα FT-IR της β-κυκλοδεξτρίνης	74
Εικόνα 46.	Φάσμα FT-IR της 2-hydroxypropyl-β-κυκλοδεξτρίνης.....	75
Εικόνα 47.	Φάσμα FT-IR της methyl-β-κυκλοδεξτρίνης.....	75
Εικόνα 48.	Φάσμα FT-IR του MP4a.....	76
Εικόνα 49.	Φάσμα FT-IR του MP5a.....	77
Εικόνα 50.	Φάσμα FT-IR του συμπλόκου εγκλεισμού β-CD : MP4a	78
Εικόνα 51.	Φάσμα FT-IR του συμπλόκου εγκλεισμού HP-β-CD : MP4a	78
Εικόνα 52.	Φάσμα FT-IR του συμπλόκου εγκλεισμού Me-β-CD : MP4a	79
Εικόνα 53.	Φάσμα FT-IR του συμπλόκου εγκλεισμού β-CD : MP5a.....	79
Εικόνα 54.	Φάσμα MS των κυριότερων συστατικών του MP4a	87
Εικόνα 55.	Φάσμα MS των κυριότερων συστατικών του MP4a	87
Εικόνα 56.	Φάσμα GC του συμπλόκου εγκλεισμού β-CD:MP4a	88
Εικόνα 57.	Φάσμα GC του συμπλόκου εγκλεισμού Me-β-CD:MP4a	88
Εικόνα 58.	Κατανομή μεγέθους του συμπλόκου β-CD : MP4a	89
Εικόνα 59.	Κατανομή μεγέθους του συμπλόκου HP-β-CD : MP4a	89
Εικόνα 60.	Κατανομή μεγέθους του συμπλόκου Me-β-CD : MP4a	89
Εικόνα 61.	Κατανομή μεγέθους του συμπλόκου β-CD : MP5a	90
Εικόνα 62.	ζ-δυναμικό του συμπλόκου β-CD : MP4a	90
Εικόνα 63.	ζ-δυναμικό του συμπλόκου HP-β-CD : MP4a	90
Εικόνα 64.	ζ-δυναμικό του συμπλόκου Me-β-CD : MP4a	91
Εικόνα 65.	ζ-δυναμικό του συμπλόκου β-CD : MP5a	91

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1.	Αιθέρια έλαια διάφορων φυτών και οι θεραπευτικές δράσεις τους.....	24
Πίνακας 2.	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κάθε μεθόδου εκχύλισης αιθέριων ελαίων	31
Πίνακας 3.	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μερικών μεθόδων εγκλεισμού.....	38
Πίνακας 4.	Φυσικές και χημικές ιδιότητες των α-CD, β-CD και γ-CD	41
Πίνακας 5.	Τεχνικές παρασκευής συμπλόκων εγκλεισμού	45
Πίνακας 6.	Ερμηνεία συντελεστή αποδέσμευσης n	50
Πίνακας 7.	Μοντέλα αποδέσμευσης.....	51

Πίνακας 8.	Ξηρή μάζα συστημάτων εγκλεισμού.....	64
Πίνακας 9.	Ανάλυση χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου <i>MP4a</i>	66
Πίνακας 10.	Ανάλυση χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου <i>MP5a</i>	67
Πίνακας 11.	Απόδοση πλασμόλυσης των κυττάρων ζυμομυκήτων.....	69
Πίνακας 12.	Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου <i>MP4a</i>	69
Πίνακας 13.	Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου <i>MP5a</i>	69
Πίνακας 14.	Εξισώσεις αναφοράς των κύριων συστατικών του <i>Mentha Pulegium</i>	70
Πίνακας 15.	Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (<i>MP4a</i>).....	71
Πίνακας 16.	Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (<i>MP5a</i>).....	71
Πίνακας 17.	Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (<i>MP4a</i>).....	71
Πίνακας 18.	Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> (<i>MP5a</i>).....	71
Πίνακας 19.	Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο <i>MP4a</i>	73
Πίνακας 20.	Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστήματος εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο <i>MP5a</i>	73
Πίνακας 21.	Κορυφές και λειτουργικές ομάδες των διαφορετικών κυκλοδεξτρινών	76
Πίνακας 22.	Κορυφές και λειτουργικές ομάδες του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i> ..	77
Πίνακας 23.	Κορυφές και λειτουργικές ομάδες της β-CD, των τροποποιημένων μορφών της και των συστημάτων εγκλεισμού.....	80
Πίνακας 24.	Συντελεστής συσχέτισης R ² για τα διάφορα κινητικά μοντέλα για την αποδέσμευση του αιθερίου ελαίου <i>Mentha Pulegium</i>	82
Πίνακας 25.	%Ποσοστό αντιοξειδωτικής δράσης των αιθερίων ελαίων και των συστημάτων εγκλεισμού.....	83
Πίνακας 26.	Εξισώσεις και συντελεστές των μοντέλων Korsmeyer-Peppas, Korcha.....	91

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1.	Πλεονεκτήματα του νανο-και μικροεγκλεισμού	37
Διάγραμμα 2.	Απόδοση διεργασίας όλων των συστημάτων εγκλεισμού.....	69
Διάγραμμα 3.	Απόδοση εγκλεισμού όλων των συστημάτων.....	72
Διάγραμμα 4.	Συνολικό διάγραμμα των ποσοστών αποδέσμευσης της πουλεγόνης από τα σύμπλοκα, συναρτήσει του χρόνου.....	81
Διάγραμμα 5.	Αναστολή της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος για τα έλαια και τα συστήματα εγκλεισμού	84
Διάγραμμα 6.	Καμπύλη αναφοράς της ισομενθόνης (Rt=22.40min) του αιθερίου ελαίου <i>MP4a</i>	92
Διάγραμμα 7.	Καμπύλη αναφοράς της πουλεγόνης (Rt=25.88min) του αιθερίου ελαίου <i>MP4a</i>	92
Διάγραμμα 8.	Καμπύλη αναφοράς της πιπεριτενόνης (Rt=28.70min) του αιθερίου ελαίου <i>MP4a</i>	92

Διάγραμμα 9. Καμπύλη αναφοράς της ισομενθόνης ($R_t=22.37\text{min}$) του αιθερίου ελαίου <i>MP5a</i>	93
Διάγραμμα 10. Καμπύλη αναφοράς της πουλεγόνης ($R_t=25.91\text{min}$) του αιθερίου ελαίου <i>MP5a</i>	93

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Αιθέρια Έλαια – Essential Oils (EOs)

1.1.1 Εισαγωγή

Ο όρος αιθέριο έλαιο χρονολογείται από τον 16^ο αιώνα και προέρχεται από το φάρμακο Quinta essentia, που ονομάστηκε από τον Paracelsus von Hohenheim της Ελβετίας [3]. Τα αιθέρια έλαια (αιθερικά ή πτητικά έλαια) είναι φυσικές πτητικές ενώσεις και οφείλουν το όνομά τους στην ευφλεκτότητά τους [1]. Τα περισσότερα από τα ΕΟ είναι γνωστά ως 'γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή' (GRAS) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συντηρητικά τροφίμων ή γευστικοί παράγοντες. [19]

Η βιοσύνθεση τους γίνεται σε ειδικούς τύπους κυττάρων που υπάρχουν σε όλα σχεδόν τα μέρη του φυτού, όπως άνθη, σπόροι, μπουμπούκια, φύλλα, καρποί, ξύλο, ρίζες, φλοιοί και κλαδάκια. Αυτοί οι ειδικοί τύποι κυττάρων είναι οι εκκριτικές τρίχες ή τριχώματα, τα επιδερμικά κύτταρα, τα εσωτερικά εκκριτικά κύτταρα και οι εκκριτικοί θύλακες [1], [3]. Τα αιθέρια έλαια είναι ασφαλή για ανθρώπινη και ζωική χρήση, δίνουν μια χαρακτηριστική γεύση, οσμή ή άρωμα και εντοπίζονται σε βρώσιμα και φαρμακευτικά φυτά. [2], [19]

Οι ενώσεις στα φυτά που σχηματίζουν τα αιθέρια έλαια θεωρούνται ως δευτερογενείς μεταβολίτες με πτητικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι η σύσταση των αιθέριων ελαίων διαφέρει από μια κατηγορία φυτών σε άλλη και η χημική τους σύνθεση μπορεί να αλλάξει από φυτό σε φυτό ακόμα και στο ίδιο είδος. Αυτή η διακύμανση στη σύνθεση μπορεί να οφείλεται σε : ποικιλία φυτών, γεωγραφικές τοποθεσίες, περιόδους συγκομιδής, μεθόδους ξήρανσης και μεθόδους εκχύλισης. [1], [6], [19]

Η ποιότητα, η φρεσκάδα και η μοναδικότητα ενός αιθέριου ελαίου είναι βασικά στοιχεία που σχετίζονται με την αξία του. Τα αιθέρια έλαια είναι πολύ ευαίσθητα στη θερμότητα, την υγρασία και το οξυγόνο [6]. Τα αιθέρια έλαια είναι διαλυτά σε αλκοόλη, αιθέρα και σταθερά έλαια, αλλά αδιάλυτα στο νερό. Αυτά τα πτητικά έλαια είναι γενικά υγρά και άχρωμα σε θερμοκρασία δωματίου, έχουν χαρακτηριστική οσμή και έχουν πυκνότητα μικρότερη από τη μονάδα, με εξαίρεση ελάχιστες περιπτώσεις. Μάλιστα, έχουν δείκτη διάθλασης, πολύ υψηλή οπτική δραστηριότητα και υψηλή τάση ατμών σε θερμοκρασία δωματίου. [3]

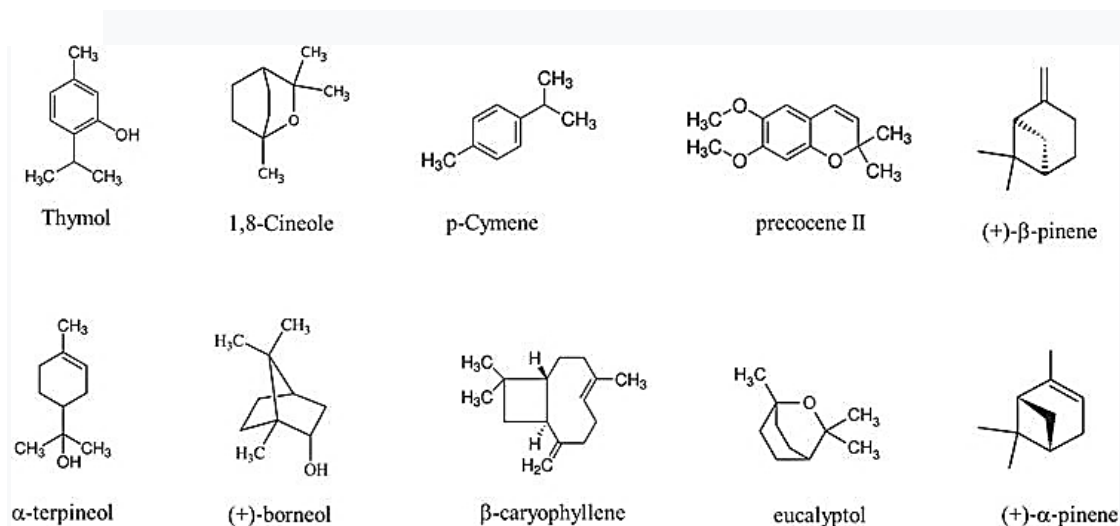
1.1.2 Χημική σύσταση αιθερίων ελαίων

Αυτές οι πτητικές ενώσεις ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες : αλκοόλες, αιθέρες ή οξειδία, αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες, αμίνες, αμίδια, φαινόλες, ετερόκυκλοι και κυρίως τα τερπένια [2]. Ορίζονται από ορισμένα κύρια συστατικά σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (> 20%) σε σύγκριση με άλλα συστατικά που υπάρχουν σε ίχνη [19]. Έτσι, κατηγοριοποιούνται στις εξής ομάδες [6], [32]:

- (i) Τερπένια υδρογονανθράκων (ισοπρένια) και τερπενοειδή (ισοπρενοειδή)
- (ii) Αρωματικές και αλειφατικές ενώσεις (φαινυλοπροπανοειδείς ενώσεις)
- (iii) Ενώσεις ευθείας αλυσίδας που δεν περιέχουν καμία πλευρική αλυσίδα
- (iv) Διάφορες ομάδες με ποικίλες δομές που δεν περιλαμβάνονται στις πρώτες τρεις ομάδες (ενώσεις που περιέχουν θείο ή άζωτο)

Τα αιθέρια έλαιά των περισσότερων φυτών περιέχουν τερπενοειδή σε ποσοστό περίπου 80%. Ωστόσο, η παρουσία παραγώνων φαινυλοπροπανοειδών δίνει στα αιθέρια έλαια χαρακτηριστική γεύση, άσχημη οσμή και πικάντικη γεύση. Αυτές οι δύο κύριες ομάδες ενώσεων προέρχονται από δύο διαφορετικές οδούς, από διαφορετικούς πρωτογενείς μεταβολίτες. [1]

Η Εικόνα 2 απεικονίζει τη χημική δομή ορισμένων συστατικών των ΕΟ [19] :



Εικόνα 2 : Μερικά από τα κύρια βιοδραστικά συστατικά των ΕΟ

1.1.2.1 Τερπένια και τερπενοειδή

Τα κύρια τερπένια είναι τα μονοτερπένια και τα σесκιτερπένια (Εικόνα 3). Επιπλέον, υπάρχουν ημιτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια και τετρατερπένια. Τα τερπενοειδή είναι βιοχημικά τροποποιημένα τερπένια, στα οποία τα ένζυμα μπορούν να προσθέσουν μόρια οξυγόνου και να αφαιρέσουν ή να μετακινήσουν μια ομάδα μεθυλίου. [2], [20]

Η ταξινόμηση των τερπενίων γίνεται σύμφωνα με τον αριθμό μονάδων ισοπρενίου με συντακτικό τύπο $(C_5H_8)_n$, όπου n είναι ο αριθμός των συνδεδεμένων μονάδων ισοπρενίου, για παράδειγμα, δύο μονάδες ισοπρενίου σχηματίζουν μονοτερπένια (δύο ομάδες C_5) με μοριακό τύπο $C_{10}H_{16}$. Άλλες συζεύξεις παράγουν διαφορετικές ενώσεις όπως διτερπένια (C_{20}), τριτερπένια (C_{30}), τετρατερπένια (C_{40}) και επίσης εναλλακτικά ημιτερπένια (C_5) και σесκιτερπένια (C_{15}). Τα μονοτερπένια, τα διτερπένια και τα σесκιτερπένια είναι οι κύριες ομάδες τερπενίων που βρίσκονται στα μπαχαρικά και τα βότανα με αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις, όπως αντιμικροβιακές επιδράσεις σε διαφορετικά παθογόνα όπως τα είδη *Candida*. [2]

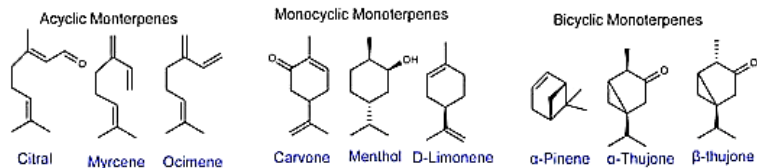
Τα τερπένια βρίσκονται ευρέως στη φύση, είναι φθηνά και διατίθενται εύκολα σε μεγάλη κλίμακα. Επιπλέον, έχοντας συναρμολογήσει τρεις μονάδες ισοπρενίου (C_{15}), τα σесκιτερπένια συνεχίζουν να σχηματίζονται. Η επέκταση της αλυσίδας αυξάνει τον αριθμό των κυκλοποιήσεων και προκαλεί την παραγωγή μιας μεγάλης ποικιλίας δομών. Σε αυτούς τους τύπους, οι βασικές μονάδες πέντε άνθρακα που συναρμολογούνται, όπως ο διαδοχικός συνδυασμός τερπενίων, βοηθά τους επιστήμονες να διερευνήσουν τις γνωστές τάξεις των C_{10} (μονο-), C_{15} (ses-qui-), C_{20} (di-), C_{30} (tri-), C_{40} (τετρα-) και $C > 40$ (πολυ-) τερπενοειδή. Τα «κατώτερα τερπενοειδή» αναφέρονται συνήθως σε ενώσεις C_{10} και C_{15} και συνήθως

αποτελούν «αιθέρια έλαια» όταν εμφανίζονται μαζί. Από την άλλη πλευρά, τα «υψηλότερα τερπενοειδή» είναι η έννοια που αναφέρει τις ενώσεις που φέρουν 20 και περισσότερους άνθρακες. Ως η τελευταία ομάδα, ο όρος «ρητίνη» χρησιμοποιείται όταν τα μη πτητικά τερπενοειδή (διτερπενοειδή ή τριτερπενοειδή) συνδυάζονται με πτητικά (μονοτερπενοειδή και/ή σεσκιτερπενοειδή) (Εικόνα 3). [2], [20]

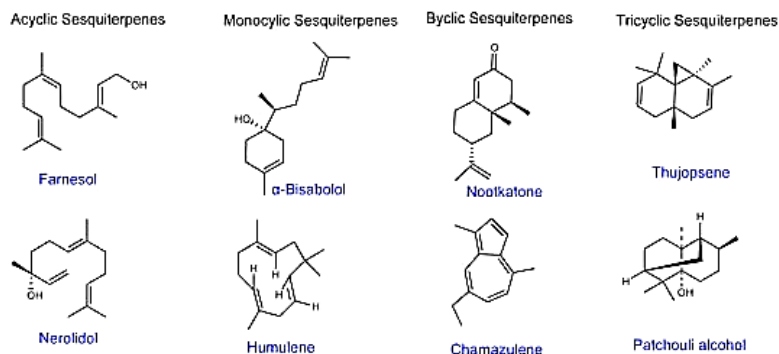
a. HEMITERPENES



b. MONOTERPENES

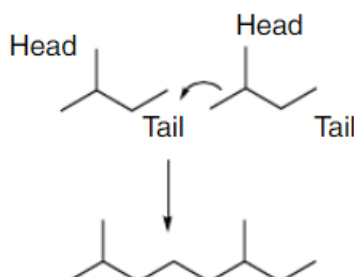


c. SESQUITERPENES



Εικόνα 3 : Δομή ημιτερπενίων (a), μονοτερπενίων (b), σεσκιτερπενίων (c) [7]

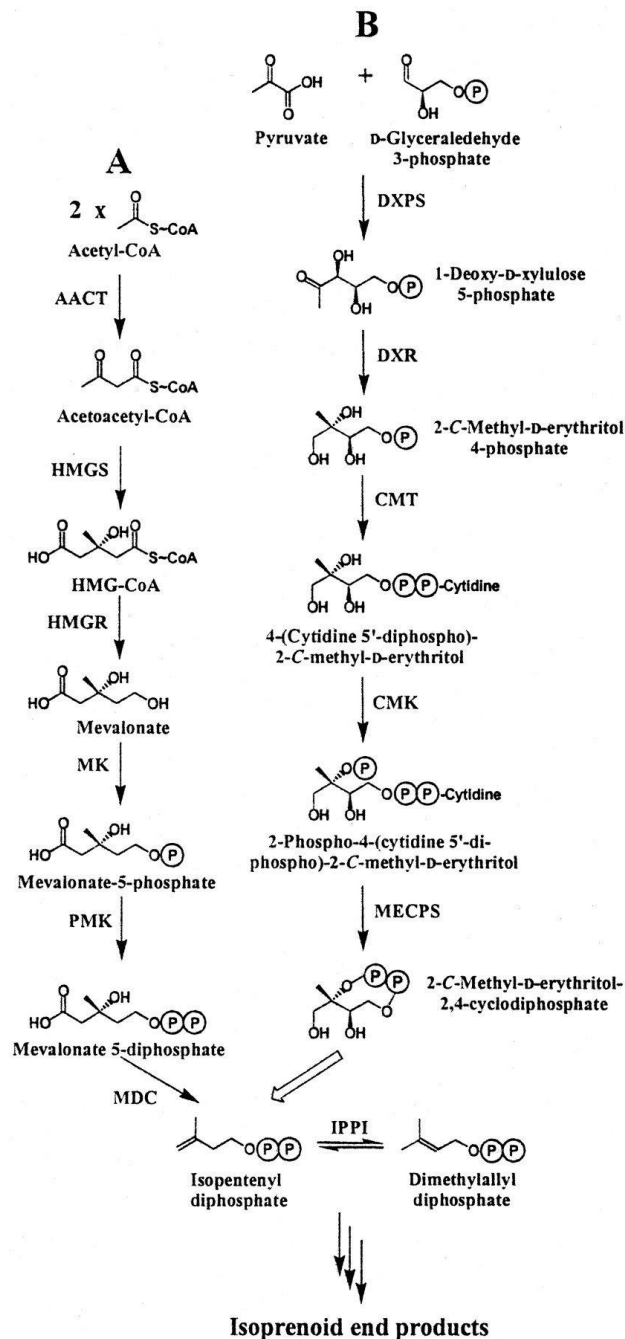
Ο συνδυασμός μονάδων ισοπρενίου (5-ανθρακικής βάσης (C₅) ή 2-μεθυλο-1,3-βουταδιενίου) για το σχηματισμό τερπενίων ως δευτερογενών μεταβολιτών ακολουθεί το μοντέλο κεφαλής προς την ουρά (Εικόνα 4), δηλαδή ζεύξη τύπου head-to-tail, όπου το διακλαδισμένο άκρο της αλυσίδας σχετίζεται με την κεφαλή του μορίου και το άλλο άκρο θεωρείται η ουρά. [2], [5]



Εικόνα 4 : Μέθοδος κεφαλής - ουρά σύζευξης δύο ισοπρενίων [2]

Υπάρχουν δύο μονοπάτια που οδηγούν στη σύνθεση του ισοπρενίου. Αυτά τα δύο μονοπάτια εμφανίζονται στα διαφορετικά μέρη του βόρειου τμήματος του εξειδικευμένου κυττάρου.

Στο κυτταρόπλασμα χρησιμοποιείται η λεγόμενη οδός μεβαλονικού οξέος (A), για τη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών, σεσκιτερπενίων, στερολών, ενώ στο πλαστίδιο χρησιμοποιείται το Rohmer ή η 5-φωσφορική 1-δεοξυ-d-ξυλουλόζη (DOXP) (B), για βιοσύνθεση πλαστιδικών ισοπρενιδίων, όπως φυτόλη (μια πλευρική αλυσίδα χλωροφυλλών), καροτενοειδή, πλαστοκινόνη-9, μονο- και διτερπένια και ισοπρένιο. Και τα δύο δίνουν ενεργό διφωσφορικό ισοπεντενυλεστέρα (IPP) μονάδας C5 ως πρώτη ύλη. Όλα τα άλλα ισοπρενοειδή συντίθενται μέσω της προσέγγισης προσθήκης από την κορυφή στην ουρά [1], [2]. Ειδικότερα :



Εικόνα 5 : Βιοσύνθεση τερπενοειδών μέσω της οδού μεβαλονικού (A) και της οδού DXP (B) [4]

Όσον αφορά τα ΕΟ, οι σημαντικότερες ομάδες φυσικών προϊόντων είναι τα τερπενοειδή, οι οποίες είναι γνωστές ως ουσίες που σχηματίζονται από μονάδες ισοπρενίου (2-μεθυλοβουταδιένιο). Το ισοπρένιο δεν είναι στην πραγματικότητα ένα ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση και δεν βρίσκεται συχνά σε ΕΟs, αλλά το πρότυπο 2-μεθυλοβουτανίου είναι σαφώς διακριτό στον σκελετό των τερπενοειδών. [2]

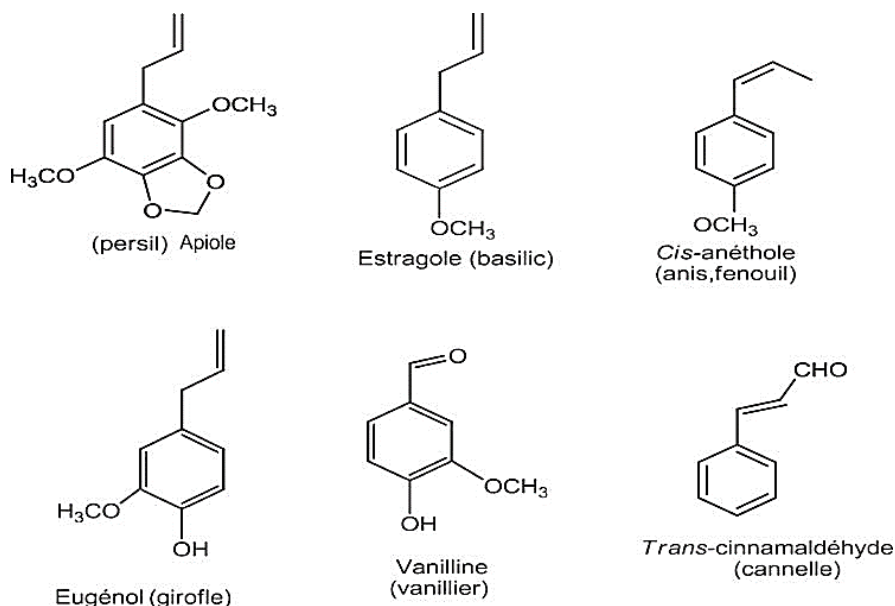
Η βιολογική δραστηριότητα και το χαρακτηριστικό άρωμα των ΕΟs γενικά προκαλούνται από μονοτερπένια, σесκιτερπένια και οξυγονωμένα παράγωγά τους, τα οποία είναι λιπόφιλες δομές. Στα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά, τα τερπένια και τα τερπενοειδή είναι υπεύθυνα για τις φαρμακευτικές, αρωματικές και μαγειρικές εφαρμογές. [2]

1.1.2.2 Αρωματικές ενώσεις – Φαινυλοπροπανοειδή

Γενικά, οι αρωματικές ενώσεις, δηλαδή οι ενώσεις που περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο, συναντώνται λιγότερο από τα τερπένια [20]. Υπάρχουν πολλές φυτικές πηγές που περιλαμβάνουν αυτές τις ενώσεις, όπως γλυκάνισος, μοσχοκάρυδο, γαρύφαλλο, μαϊντανός, μάραθος, αστεροειδής γλυκάνισος, εστραγκόν και μερικές άλλες βοτανικές ομάδες (Lamiaceae, Apiaceae, Rutaceae, Myrtaceae). Οι αρωματικές ενώσεις έχουν τις ίδιες εφαρμογές με εκείνες των μονοτερπενοειδών και των σесκιτερπενοειδών. Περιέχουν αλκοόλες, αλδεΐδες, φαινόλες, μεθοξυ-ενώσεις και παράγωγα μεθυλενοδιοξυλίου. [2]

Διαφέρουν από τα υπόλοιπα, λόγω των εξής :

- ✓ Ο αριθμός και η θέση των ομάδων υδροξυλίου και μεθοξυλίου
- ✓ Η θέση του διπλού δεσμού της πλευρικής αλυσίδας
- ✓ Ο βαθμός οξείδωσης της αλειφατικής αλυσίδας (αλκοόλη, αλδεΐδη, κετόνη ή οξύ κ.λπ.) [20]



Εικόνα 6 : Παραδείγματα δομών ενώσεων που προέρχονται από φαινυλοπροπάνιο [20]

Η σύνθεση αυτής της κατηγορίας ενώσεων σε αρωματικά φυτά οδηγεί σε μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων, αλλά στη παρούσα εργασία θα επικεντρωθούμε στην οδό που οδηγεί σε πτητικές

ενώσεις. Σε σύγκριση με τα ισοπρενοειδή, η σύνθεση πτητικών φαινυλοπροπανοειδών ενώσεων εμφανίζεται λιγότερο συχνά. Αλλά αυτό δεν ισχύει για όλα τα φυτά. Στην πραγματικότητα για στο γαρυφαλέλαιο, η ευγενόλη είναι η κύρια ένωση. [1]

1.1.2.3 Ενώσεις ευθείας αλυσίδας

Ενώσεις ευθείας αλυσίδας, που δεν περιέχουν πλευρικές αλυσίδες : Γενικά, περιέχει ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους διαφόρων προελεύσεων, οι οποίες μπορούν να παρασυρθούν κατά την υδροαπόσταξη [20]. Είναι μόνο ευθείας αλυσίδας μη τερπενοειδείς υδρογονάνθρακες και τα παράγωγά τους με οξυγόνο : αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, αιθέρες και εστέρες. Αυτοί οι υδρογονάνθρακες κυμαίνονται από n-επτάνιο έως ενώσεις με 35 άτομα άνθρακα [6]. Ενδεικτικά, το επτάνιο και η παραφίνη στο χαμομηλιέλαιο, οξέα C3 και C10, ακυκλικοί εστέρες που βρίσκονται ιδιαίτερα στα φρούτα: οξικός βουτυλεστέρας (μήλο), οξικός ισοαμυλεστέρας (μπανάνα), αλδεΐδες όπως οκτανάλη και δεκανάλη από τα εσπεριδοειδή, αλκοόλες όπως 1-οκτεν-3-όλη σε λάδι λεβάντας. [20]

1.1.2.4 Ενώσεις θείου ή αζώτου

Διάφορες ομάδες με ποικίλες δομές που δεν περιλαμβάνονται στις πρώτες τρεις ομάδες (ενώσεις που περιέχουν θείο ή άζωτο) : είναι προϊόντα αποικοδόμησης που προέρχονται από ακόρεστα λιπαρά οξέα, λακτόνες, τερπένια, γλυκοσίδες και ενώσεις που περιέχουν θείο και άζωτο. [6]

Κατάταξη χημικών ουσιών ως μεταβολίτες

Οι χημικές ουσίες που παρασκευάζονται από τη φύση έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δύο ομάδες :

- a. τους πρωτογενείς μεταβολίτες με τέσσερις υποομάδες συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων που έχουν ελάχιστη συμμετοχή στα ΕOs, με τα λιπίδια να είναι τα πιο σημαντικά. Είναι καθολικά σε όλη την οικογένεια ζώων και φυτών και συνιστούν βασικά δομικά στοιχεία της ζωής.
- b. τους δευτερογενείς μεταβολίτες που ταξινομούνται σε αλκαλοειδή, πολυκετίδια, σικιμικά και τερπενοειδή. Ο τελευταίος είναι ο πιο ζωτικός όσον αφορά τα ΕOs.

Οι πρωτογενείς μεταβολίτες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν φυσικά προϊόντα ή φυτικούς δευτερογενείς μεταβολίτες (PSM) που φέρουν διάφορες φυσιολογικές δραστηριότητες. Η ουσιαστική επίδραση των δευτερογενών μεταβολιτών (SMs) στα φυτά είναι να δημιουργούν ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του περιβάλλοντος και των φυτών για την καταλληλότητα και την επιβίωσή τους, γεγονός που κάνει τα PSM να είναι τόσο ζωτικά όσο και οι πρωτογενείς μεταβολίτες.

Κύρια πεδία εφαρμογής

Τα ΕΟ έχουν πρόσφατα κερδίσει αυξανόμενη προσοχή με τις πιθανές βιολογικές δράσεις τους και έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό στη φαρμακοβιομηχανία (ως ασφαλή και φυσικά φάρμακα), στις χημικές βιομηχανίες, σε τομείς τροφίμων (ως συντηρητικά και αρωματικές

ουσίες), σε βιομηχανίες καλλυντικών και αρωμάτων (ως αρώματα, αντιβακτηριακά και αρωματοθεραπευτικά), καθώς και ως παθογόνοι παράγοντες για τη γεωργία, όπως φυτοφάρμακα, γεωργικά παράσιτα και ζιζάνια ή βιοεντομοκτόνα και βιομυκητοκτόνα. Ειδικότερα, διαθέτουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιϊκές και αντικαρκινικές ιδιότητες. [2], [19], [20]

1.1.3 Βιοδραστικότητα αιθέριων ελαίων

1.1.3.1 Αντιμικροβιακή δραστηριότητα

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους έχουν εξεταστεί και ο μηχανισμός δράσης έχει μελετηθεί λεπτομερώς [8], [9], [10]. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αιθέριων ελαίων είναι η υδροφοβία τους, η οποία τους επιτρέπει να διαχωρίζονται σε λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, διαταράσσοντας τη δομή τους και καθιστώντας την πιο διαπερατή. Αυτό, στη συνέχεια, μπορεί να προκαλέσει απώλεια ιόντων και άλλων κυτταρικών μορίων. Αν και μια ορισμένη ποσότητα απώλειας 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. [3], [6], [19]

Τα EOs και/ή τα συστατικά τους μπορούν να έχουν έναν μόνο στόχο ή πολλαπλούς στόχους με τη δραστηριότητά τους. Μάλιστα, έχει αναφερθεί ότι τα EOs που περιέχουν κυρίως αλδεΐδες ή φαινόλες, όπως κινναμαλδεΐδη, κιτράλη, καρβακρόλη, ευγενόλη ή θυμόλη, χαρακτηρίστηκαν από την υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση, ακολουθούμενα από EOs που περιέχουν τερπενικές αλκοόλες. Άλλα EOs που περιέχουν κετόνες ή εστέρες, όπως το β-μυρκενίο, η α-θουγιόνη ή ο οξικός γερανυλεστέρας, είχαν πολύ πιο αδύναμη δράση, ενώ τα πτητικά έλαια που περιείχαν υδρογονάνθρακες τερπενίου ήταν συνήθως ανενεργά. Γενικά, τα αιθέρια έλαια που χαρακτηρίζονται από υψηλό επίπεδο φαινολικών ενώσεων, όπως η καρβακρόλη, η ευγενόλη και η θυμόλη, έχουν σημαντική αντιβακτηριακή δράση. Αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για τη διάσπαση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, την κινητήρια δύναμη των πρωτονίων, τη ροή ηλεκτρονίων, την ενεργό μεταφορά και επίσης την πήξη των περιεχομένων των κυττάρων. [3], [11], [12]

Η χημική δομή των αιθέριων ελαίων επηρεάζει τον τρόπο δράσης τους, όσον αφορά την αντιβακτηριακή τους δράση. Ωστόσο, η σχετική θέση της φαινολικής υδροξυλομάδας στον δακτύλιο δεν φαίνεται να επηρεάζει την ένταση της αντιβακτηριακής δράσης. [3], [6], [13]

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα αιθέρια έλαια είναι πιο δραστικά έναντι των Gram-θετικών σε σχέση με τα Gram-αρνητικά βακτήρια. Επιπλέον, η αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων σχετίζεται με τη χημική τους σύνθεση, τις αναλογίες των πτητικών μορίων και τις αλληλεπιδράσεις τους. [3], [20]

* Μια συνεργιστική επίδραση παρατηρείται όταν ο συνδυασμός των ουσιών είναι μεγαλύτερος από το άθροισμα των επιμέρους επιδράσεων [14]. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση ολόκληρου του αιθέριου 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 ή ενισχυτική δράση. [15]

* Μια αθροιστική επίδραση παρατηρείται όταν ο συνδυασμός είναι ίσος με το άθροισμα των επιμέρους επιδράσεων. [14]

- * Ανταγωνισμός παρατηρείται όταν η επίδραση μιας ή και των δύο ενώσεων είναι λιγότερο σημαντική όταν εφαρμόζονται μαζί, παρά όταν εφαρμόζονται μεμονωμένα. [14]

Τέλος, τα αιθέρια έλαια έχουν επίσης αποκαλυφθεί ότι είναι αποτελεσματικά στην αναστολή της ανάπτυξης και στη μείωση του αριθμού των πιο σοβαρών τροφιμογενών παθογόνων, όπως *Salmonella* spp., *E. coli* και *Listeria monocytogenes*. [3], [6], [16]

1.1.3.2 Αντιμυκητιακή δράση

Οι αντιμυκητιακές δράσεις μοιάζουν στον τρόπο δράσης με αυτούς που περιγράφονται για τα βακτήρια. Στην περίπτωση του ζυμομύκητα έχει αναφερθεί ότι το δυναμικό βαθμίδωσης υδρογόνου (pH) κατά μήκος της μεμβράνης του κυτταροπλάσματος και η απόφραξη της παραγωγής ενέργειας στα κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των μυκητιακών μεμβρανών που οδηγεί σε θάνατο. Αντιμυκητιακές επιδράσεις προκλήθηκαν από συνδυασμό αιθέριων ελαίων γαρύφαλλου και *rosmarinus officinalis* κατά του *C. albicans*. Η τρανς-ανθόλη, ένα κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου Γλυκάνισου, έδειξε αντιμυκητιακή δράση κατά του νηματοειδούς μύκητα, *Mucor mucedo*. Το αιθέριο έλαιο που λαμβάνεται από το ενεργό συστατικό λιμονένιο που περιέχει εσπεριδοειδή, έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του *Aspergillus niger* προκαλώντας επιβλαβείς μορφολογικές αλλοιώσεις, οι οποίες είναι απώλεια μυκητιακών υφών του κυτταροπλάσματος και εκβλάστηση της υφικής άκρης. Επίσης, τα συστατικά που περιέχουν αιθέριο έλαιο δέντρου τσαγιού έχει αναφερθεί ότι μεταβάλλουν τη διαπερατότητα καθώς και τη ρευστότητα της μεμβράνης του *Candida albicans*. [6], [19]

1.1.3.3 Αντιϊκή δράση

Το αιθέριο έλαιο της σαλτολινίας έδειξε αντιϊκή δράση έναντι των HSV-1 και HSV-2, εμποδίζοντας την εξάπλωση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο, σε μολυσμένα κύτταρα. Το έλαιο απενεργοποίησε απευθείας τα σωματίδια του ιού εμποδίζοντας έτσι την προσρόφηση του ιού στα κύτταρα ξενιστές. Η ισο-βορνεόλη, μια κοινή μονοτερπενική αλκοόλη, έδειξε διπλή ιοκτόνο δράση έναντι του HSV-1, συγκεκριμένα ανέστειλε τη γλυκοζυλίωση των ιικών πολυπεπτιδίων. Η αντιϊκή δράση του αιθέριου 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 διεισδύουν στο περίβλημα του ιού, αναστέλλοντας συγκεκριμένες διεργασίες στον κύκλο αντιγραφής του ιού ή καλύπτοντας ιικούς παράγοντες, που είναι απαραίτητοι για την προσρόφηση ή την είσοδο στα κύτταρα ξενιστές, αποκλείοντας έτσι την προκλητικότητα του ιού από κύτταρο σε κύτταρο. Πολλά συστατικά αιθέριων ελαίων, όπως τα μονοτερπένια, τα σεσκιτερπένια και τα τριτερπένια, έχουν αναφερθεί ότι δείχνουν ισχυρή αντιϊκή δράση έναντι του ρινοϊού και του ιού του έρπητα. [19]

1.1.3.4 Αντικαρκινική δράση

Οι ποικίλες θεραπευτικές δυνατότητες των αιθέριων ελαίων προσέλκυσαν, τα τελευταία χρόνια, την προσοχή των ερευνητών για τη δυνητική τους δράση κατά του καρκίνου. Η μελέτη των πτητικών τους συστατικών, στοχεύει στην ανακάλυψη νέων αντικαρκινικών φυσικών

προϊόντων. Είναι ευρέως γνωστό ότι ορισμένα τρόφιμα, όπως το σκόρδο και ο κourkouμάς, 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. Σύμφωνα με τους Wu et al. [21], αυτές οι ενώσεις ενεργοποιούν σε αρουραίους τα ένζυμα που εμπλέκονται στη διαδικασία αποτοξίνωσης της ηπατικής φάσης 1 (διάσπαση χημικών δεσμών που συνδέουν τις καρκινογόνες τοξίνες μεταξύ τους) και της φάσης 2 (δεσμούς με τοξίνες που απελευθερώνουν αποτοξινωτικά ένζυμα, όπως η γλουταθειόνη S-τρανσφεράση). [3]

Το λιμονένιο, ένα ενεργό συστατικό του αιθέριου ελαίου εσπεριδοειδών, έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει αντικαρκινική δράση στο επίπεδο του καρκίνου του στομάχου και του καρκίνου του ήπατος. Το αιθέριο έλαιο χαμομηλιού που περιέχει ένα δραστικό συστατικό, άλφασισαβόλη σεσκιτερπενική αλκοόλη, έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει δράση κατά των γλοιωμάτων (καρκίνος του εγκεφάλου). [6], [19], [20]

1.1.3.5 Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική δράση των αρωματικών φυτών σχετίζεται με τις φαινολικές ενώσεις στη δομή τους. Οι πιο άφθονες από αυτές τις ενώσεις είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τα φαινολικά τερπένια. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται σε λόγους όπως η απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών, ο σχηματισμός ενώσεων με μεταλλικά ιόντα (χηλικοποίηση μετάλλων) και η πρόληψη ή η μείωση του σχηματισμού μονήρους οξυγόνου. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να παρέχουν το υδρογόνο που περιέχεται σε ομάδες υδροξυλίου, στους αρωματικούς δακτυλίους τους για να αποτρέψουν την οξείδωση των λιπιδίων και άλλων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο, η δραστηριότητά τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: βαθμός υδροξυλίωσης, πολικότητα, διαλυτότητα, αναγωγικό δυναμικό, σταθερότητα της προκύπτουσας ρίζας κ.λπ.. [17], [18]

Τα φλαβονοειδή και άλλες φαινολικές ενώσεις βρίσκονται κυρίως στα φύλλα, τα άνθη και τα ξυλώδη μέρη των φυτών. Δεδομένου ότι οι χημικές συνθέσεις των αρωματικών φυτών ποικίλλουν ανάλογα με πολλούς παράγοντες, τα αντιοξειδωτικά τους αποτελέσματα θα ποικίλλουν επίσης. [17]

1.1.3.6 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 και να αποικοδομήσουν τα στρώματα των πολυσακχαριτών, των φωσφολιπιδίων και των λιπαρών οξέων και να διαπεραστούν. Αυτή η κυτταροτοξικότητα φαίνεται να περιλαμβάνει τέτοια 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. [3]

1.1.3.7 Αλληλοπαθητική Δραστηριότητα

Σύμφωνα με την International Allelopathy Society (IAS), η αλληλοπάθεια ορίστηκε το 1996 ως «η επιστήμη που μελετά οποιαδήποτε διαδικασία που περιλαμβάνει δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από φυτά, φύκια, βακτήρια και μύκητες και η οποία επηρεάζει την ανάπτυξη 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. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που εμπλέκονται ονομάζονται αλληλοχημικά. Τα πτητικά έλαια και τα συστατικά τους διερευνώνται για τη διαχείριση ζιζανίων και παρασίτων και θεωρούνται σημαντική πηγή μορίων μολύβδου 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. [3]

1.1.3.8 Απωθητική και εντομοκτόνος δράση

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν μια πλούσια τράπεζα δομικά ποικιλόμορφων 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 αρθρόποδων. Διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την εμπορευματοποίηση εκχυλισμάτων φυτικών αιθέριων ελαίων ως απωθητικών, περιλαμβάνουν κανονιστικές απαιτήσεις, αξία πνευματικής ιδιοκτησίας, βιολογική δραστηριότητα, απόδοση και ποιότητα του προϊόντος. [3]

Παρακάτω παρουσιάζονται διάφορα είδη φυτών, τα αιθέρια έλαια τους, καθώς και οι αντίστοιχες θεραπευτικές δράσεις τους [43] :

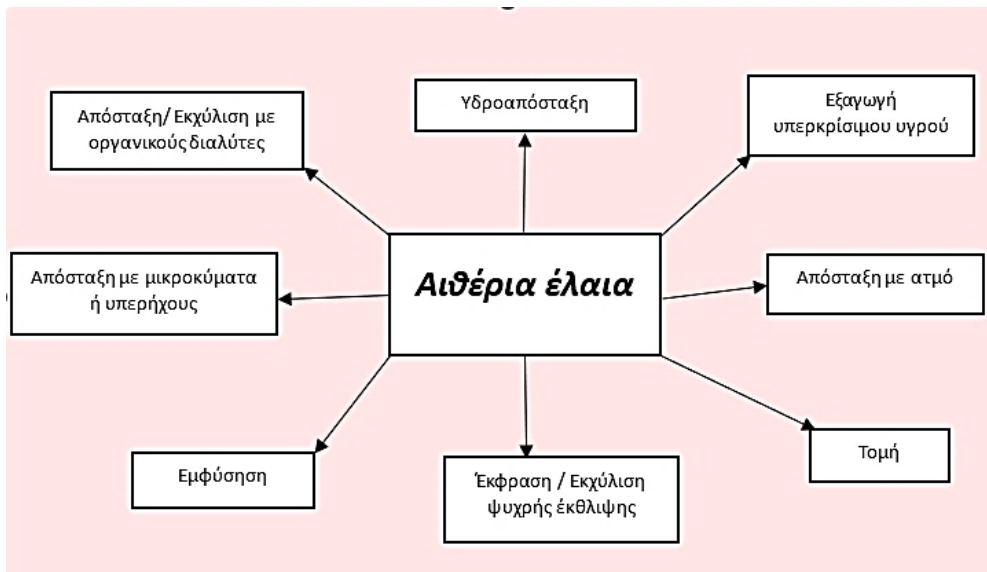
Πίνακας 1 : Αιθέρια έλαια διάφορων φυτών και οι θεραπευτικές δράσεις τους

Είδη φυτών	Αιθέριο έλαιο	Χρήση / Δράση
<i>Pimenta racemosa</i>	Έλαιο δάφνης	Πόνοι, μυϊκή κυκλοφορία, αντιμετώπιση πιτυρίδας
<i>Daucus carota</i>	Έλαιο σπόρων καρότου	Αποτοξίνωση, έκζεμα
<i>Apium graveolens</i>	Έλαιο σπόρων σέλινου	Θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας, αντιμυκητιακό διουρητικό, βελτίωση αρτηριακής πίεσης, αντισηπτικό
<i>Cinnamon species</i>	Έλαιο κανέλας	Αντιμυκητιακό, αντιβακτηριδιακό
<i>Canarium luzonicum</i>	Ελαιόλαδο	Βήχας, επούλωση πληγών, άγχος
<i>Eucalyptus globulus</i>	Έλαιο ευκαλύπτου	Αντισηπτικό, αντισπασμωδικό, θεραπεία της οστρακιάς, της γρίπης, της ιλαράς και του τύφου, το έγχυμα μειώνει τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα
<i>Zingiber officinalis</i>	Έλαιο τζίντζερ	Αποχρεμπτικό, αποτρέπει τον εμετό, αντισηπτικό, αντισπασμωδικό, αντιβακτηριακό, διεγερτικό του κυκλοφορικού, χαλαρώνει τα περιφερειακά αιμοφόρα αγγεία, προάγει την εφίδρωση
<i>Pelargonium graveolens</i>	Ελαιο γερανιού	Ακμή, κυτταρίτιδα, θεραπεία ψειρών, εμμηνόπαυση
<i>Backhousia citriodora</i>	Έλαιο μυρτιάς λεμονιού	Εντομοαπωθητικό, αντιμετωπίζει άγχος, κρυολόγημα, γρίπη, δερματικά προβλήματα

<i>Citrus reticulata</i>	Έλαιο μανταρινιού	Άγχος και ρυτίδες, ακμή, αϋπνία, ουλές
<i>Mentha species</i>	έλαιο μέντας	Αναλγητικό, καταπραυντικό, αντιβακτηριδιακό, αποτρέπει τον εμετό, χαλαρώνει τα περιφερειακά αιμοφόρα αγγεία
<i>Myrtus communis</i>	Έλαιο μυρτιάς	Πονόλαιμος, άσθμα, βήχας
<i>Piper nigrum</i> και άλλα είδη	Έλαιο πιπεριών	Βήχας, ρίγη, κράμπες, πέψη, αντισηπτική, αντιβακτηριδιακή δράση, τοπική χρήση αυξάνει τη ροή του αίματος γύρω από την περιοχή
<i>Rosa species</i>	Ροδέλαιο	Ηρεμιστικό, διεγερτικό του πεπτικού, αποχρεμπτικό, αντιβακτηριακό, αντισηπτικό, τονωτικό των νεφρών, τονωτικό του αίματος, αντικαταθλιπτικό, αντισπασμωδικό,
<i>Mentha spicata</i>	Έλαιο μέντας	Γρίπη και πυρετός, ναυτία, ίλιγγος, άσθμα, εξάντληση
<i>Citrus sinensis</i>	Έλαιο γλυκού πορτοκαλιού	Δυσκοιλιότητα, ανακούφιση από τον βήχα, γρίπη, θεραπεία ούλων, ηρεμεί τα νεύρα, διεγερτικό του πεπτικού συστήματος, ενισχύει την ενέργεια
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Έλαιο δέντρου τσαγιού	Αντισηπτικό, αντιϊκό, για κοψίματα, γρίπη, αντιβακτηριδιακό

1.1.4 Μέθοδοι παραλαβής αιθερίων ελαίων

Η εξαγωγή αιθέριων ελαίων από το φυτικό υλικό μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλές και διαφορετικές διαδικασίες, βασισμένες σε αρχαίες τεχνικές: Απόσταξη, Ζύμωση (Fermentation), Έκφραση (Expression), Εμφύσηση (Enfleurage) ή Τομή (Incision) ή πιο πρόσφατη: Εκχύλιση (Extraction), Απόσταξη υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων (Microwave-assisted essential oil extraction) ή υπερήχων [20]. Ωστόσο, η απόσταξη παραμένει η πιο δημοφιλής μέθοδος λόγω της ευκολίας στην εφαρμογή της. Η Εικόνα 7 δείχνει τους διαφορετικούς τρόπους εξαγωγής αιθέριων ελαίων. [2], [20]



Εικόνα 7 : Τρόποι εξαγωγής αιθερίων ελαίων

Οι μέθοδοι εκχύλισης χωρίζονται, ανάλογα με τις απαιτούμενες ποσότητες και τη πολυπλοκότητα της διαδικασίας, στις εξής κατηγορίες :

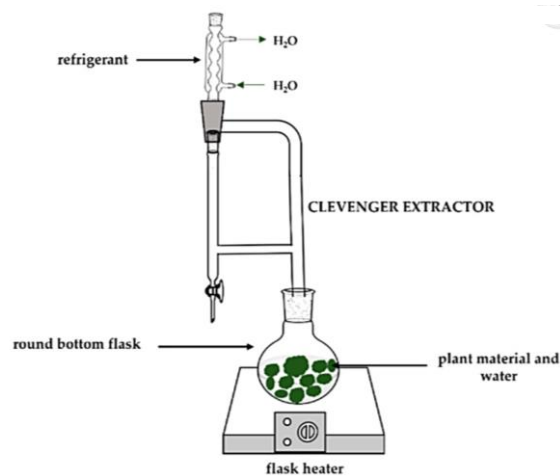
1. Κλασικές ή συμβατικές μέθοδοι
2. Προηγμένες ή καινοτόμες μέθοδοι
3. Μέθοδοι εργαστηριακής κλίμακας [22]

1.1.4.1 Κλασικές ή συμβατικές μέθοδοι

❖ Μέθοδοι Απόσταξης (Distillation)

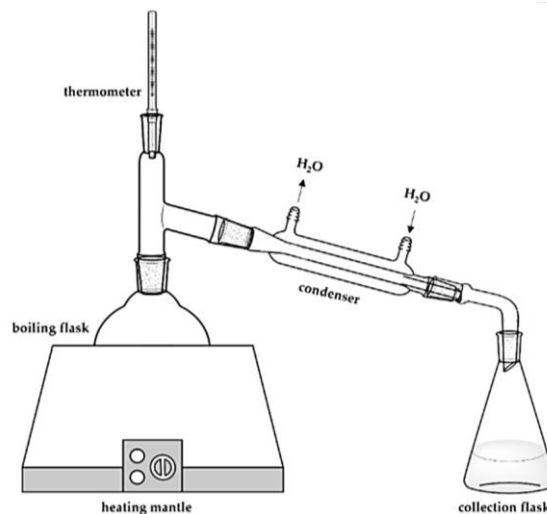
Είναι μια ομάδα μεθόδων που χρησιμοποιούν ατμό ως φορέα ή μεταφορέα ένωσης. Υπάρχουν τρεις ποικιλίες μεθόδων απόσταξης : η υδροαπόσταξη, η μέθοδος απόσταξης με ατμό και απόσταξη με οργανικούς διαλύτες. [1], [22]

- Υδροαπόσταξη : Είναι η απλούστερη και πιο διαδεδομένη τεχνική. Περιλαμβάνει την εμφύσηση της πρώτης ύλης απευθείας στο νερό και στη συνέχεια το σύνολο φέρεται σε βρασμό. Η λειτουργία πραγματοποιείται γενικά σε ατμοσφαιρική πίεση. Οι ατμοί που σχηματίζονται συμπυκνώνονται από ένα σύστημα ψύξης με ροή νερού. Αυτή η τεχνική εκτελείται τακτικά μέσω μιας εγκατάστασης που αναγνωρίζεται ως συσκευή Clevenger, όπου το ενυδατωμένο δείγμα θερμαίνεται για να εξατμιστούν τα πτητικά συστατικά [1], [20]



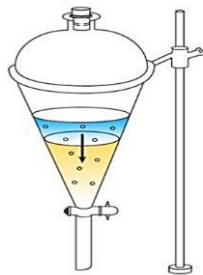
Εικόνα 8 : Σχηματική αναπαράσταση υδροαπόσταξης με συσκευή Clevenger [20]

- Απόσταξη με ατμό : Σε αυτό το είδος απόσταξης, ένα ρεύμα υδρατμών διέρχεται από το φυτό, ανασύροντας τα υδρόφοβα πτητικά συστατικά. Μετά τη συμπύκνωση, ο διαχωρισμός γίνεται με καθίζηση. Αυτή η μέθοδος βελτιώνει την ποιότητα του ΕΟ ελαχιστοποιώντας τις υδρολυτικές αλλοιώσεις. [20]



Εικόνα 9 : Σχηματική αναπαράσταση της απόσταξης με ατμό [22]

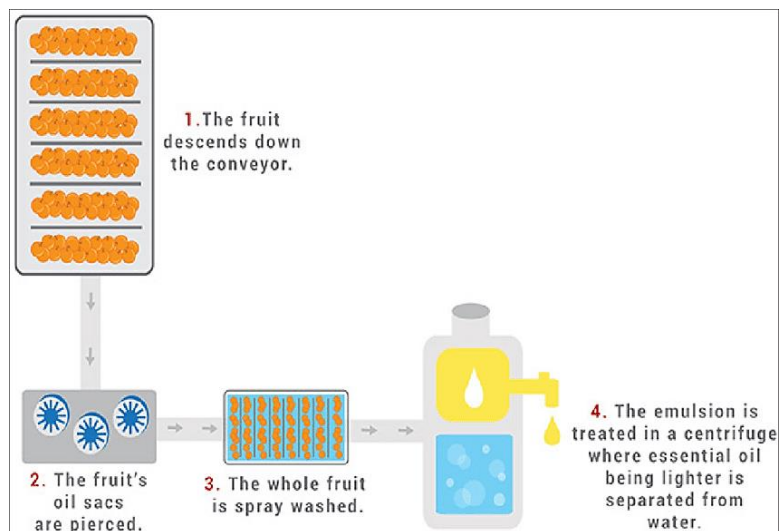
- Απόσταξη/εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες (Solvent extraction): Ορισμένα αιθέρια έλαια έχουν πυκνότητα παρόμοια με του νερού και η διαδικασία με απόσταξη με ατμό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αυτή την περίπτωση. Η αρχή της συγκεκριμένης απόσταξης, συνίσταται στη διαβροχή του φυτού στον διαλύτη, προκειμένου να περάσουν οι οσμηρές ουσίες στον διαλύτη. Χρησιμοποιούνται διαλύτες με βάση το πετρέλαιο, διοξείδιο του άνθρακα ή forane [20] Αυτή η μέθοδος έχει δύο παραλλαγές, καθώς μπορεί να λειτουργήσει σε θερμοκρασία δωματίου ή σε υψηλή θερμοκρασία. Ωστόσο, δεν οδηγεί πραγματικά στην απόκτηση του αιθέριου ελαίου, καθώς όλες οι μη πτητικές ενώσεις εξαγονται επίσης με αυτήν την προσέγγιση. Επομένως, το χημικό προφίλ δεν θα είναι αυτό του πτητικού κλάσματος των φυτών, αλλά της ένωσης που είναι διαλυτή στον διαλύτη που χρησιμοποιείται στη διαδικασία. [1], [20]



Εικόνα 10 : Σχηματική αναπαράσταση της απόσταξης/εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες [47]

❖ Έκφραση ή εκχύλιση ψυχρής έκθλιψης (“expression” or cold pressed method)

Είναι ειδική για το φλοιό εσπεριδοειδών, για να αποφευχθεί η θερμική καταστροφή, καθώς το αιθέριο έλαιο αποθηκεύεται σε συγκεκριμένο μέρος του φυτού, ώστε να παραχθεί ένα έλαιο καλής ποιότητας. Ο περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι το γεγονός ότι δεν εφαρμόζεται σε άλλα μέρη του φυτού. [1], [20], [22]

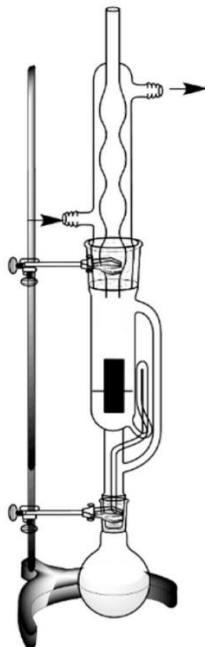


Εικόνα 11 : Σχηματική αναπαράσταση της εκχύλισης ψυχρής έκθλιψης [46]

❖ Εκχύλιση Soxhlet

Μια εκχύλιση Soxhlet χρησιμοποιείται όταν η επιθυμητή ένωση έχει περιορισμένη διαλυτότητα σε έναν διαλύτη και η ακαθαρσία είναι αδιάλυτη σε αυτόν τον διαλύτη.

Επιτρέπει ανακύκλωση μιας μικρής ποσότητας διαλύτη, για να διαλύσει μεγαλύτερη ποσότητα υλικού. Η εκχύλιση Soxhlet περιλαμβάνει επαφή στερεού-υγρού για την απομάκρυνση μιας ή περισσότερων ενώσεων από ένα στερεό, μέσω διάλυσης σε υγρή φάση αναρροής [47]. Η Εικόνα 12 αντιπροσωπεύει την εκχύλιση οργανικών διαλυτών μέσω εκχύλισης Soxhlet :



Εικόνα 12 : Σχηματική αναπαράσταση της εκχύλισης με οργανικό διαλύτη με τη μέθοδο Soxhlet [22]

Οι κύριοι περιορισμοί της της μεθόδου όσον αφορά την επίδραση στο χημικό προφίλ του αιθέριου ελαίου είναι τα ακόλουθα [1]:

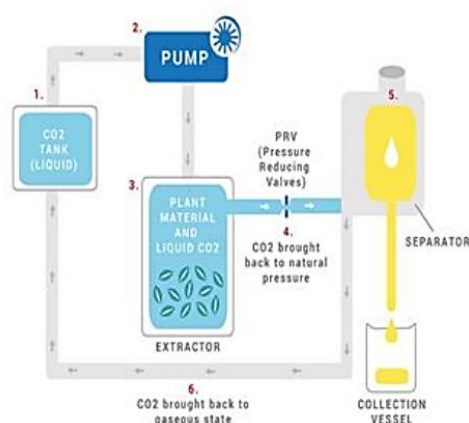
1. Οι θερμοευαίσθητες ενώσεις θα υποστούν μετασχηματισμό ή αποικοδόμηση. Στην πραγματικότητα, η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να καταλύσει κάποιες χημικές αντιδράσεις που δεν θα κάνει το κύτταρο, και αυτό θα οδηγήσει σε χημικές οντότητες που δεν υπήρχαν στα φυτά.
2. Η διαρκής επαφή με το νερό αυξάνει την υδρόλυση. Οι εστεροποιημένες ενώσεις είναι πολύ ευαίσθητες στο νερό καθώς θα διασπαστούν σε ενώσεις που δεν υπάρχουν στα κύτταρα αποθήκευσης αιθέριων ελαίων.
3. Όταν χρησιμοποιείται το γυαλί Clevenger, το αιθέριο έλαιο εκτίθεται στο φως και, επομένως, μπορεί να υποστεί φωτοξείδωση και το χημικό προφίλ θα αποκαλύψει μεγάλο αριθμό οξυγονωμένων παραγώγων που δεν υπάρχουν πραγματικά στο φυτό.

1.1.4.2 Προηγμένες ή καινοτόμες μέθοδοι

✓ *Εξαγωγή υπερκρίσιμου υγρού (Supercritical fluid extraction)*

Είναι η πιο σύγχρονη και εξελιγμένη μέθοδος, η οποία χρησιμοποιεί αέρια στο υπερκρίσιμο στάδιο τους. Το αέριο στο υπερκρίσιμο στάδιο είναι υγρό λόγω της υψηλής πίεσης που εφαρμόζεται σε αυτό. Πολλοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, καθώς ο διαλύτης βρίσκεται στη θερμοκρασία και την πίεσή πάνω από το θερμοδυναμικά κρίσιμο σημείο του,

αλλά ο πιο χρησιμοποιούμενος είναι το CO₂, διότι χρειάζεται λιγότερη πίεση για να υγροποιηθεί, είναι λιγότερο αντιδραστικό, δεν είναι εύφλεκτο, είναι μη τοξικό, είναι διαθέσιμο σε χαμηλό κόστος με υψηλή καθαρότητα και το πιο σημαντικό μπορεί να αφαιρεθεί εύκολα από το φυτικό υλικό. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι το αέριο στην υπερκρίσιμη κατάσταση μπορεί να εισέλθει σε όλο το φυτικό υλικό σαν αέριο και να διαλυτοποιήσει συστατικά, όπως ένα υγρό. Μετά τη διαδικασία εκχύλισης, οι ενώσεις αιθέριων ελαίων αναμειγνύονται με το υπερκρίσιμο υγρό (σε υγρή μορφή). Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με μείωση της θερμοκρασίας και αύξηση της πίεσης έως τις συνθήκες δωματίου. Ο κύριος περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι η πολυπλοκότητα και το υψηλό κόστος του συστήματος. [1], [2], [22]



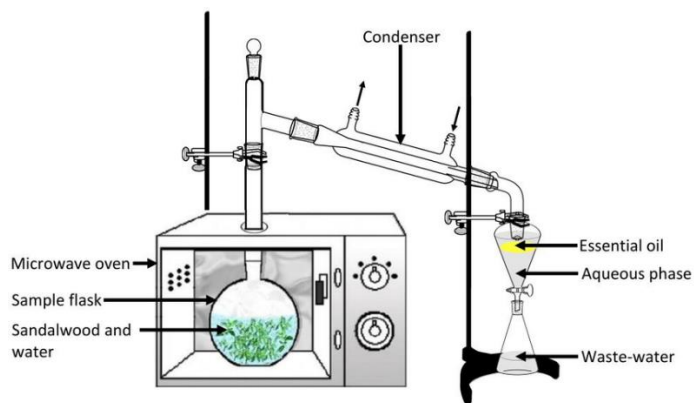
Εικόνα 13 : Σχηματική αναπαράσταση της εξαγωγής υπερκρίσιμου υγρού [46]

✓ *Εξαγωγή αιθέριων ελαίων με τη βοήθεια μικροκυμάτων ή υπερήχων (Microwave-assisted or ultrasounds essential oil extraction)*

Αυτές οι τεχνικές είναι παραλλαγές της μεθόδου απόσταξης, όπου ως πηγή θέρμανσης δεν χρησιμοποιείται η συνηθισμένη πηγή θέρμανσης αλλά τα μικροκύματα ή οι υπέρηχοι. Προσφέρουν αρκετά σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές. Στην πραγματικότητα, απαιτούν μικρότερο όγκο διαλύτη και μειωμένο χρόνο θέρμανσης, που εμποδίζει την απώλεια και την αποικοδόμηση πτητικών και ευαίσθητων, στη θερμότητα, ενώσεων. Έτσι, οδηγούν σε υψηλότερες αποδόσεις. [20]

* *Εκχύλιση με μικροκύματα*

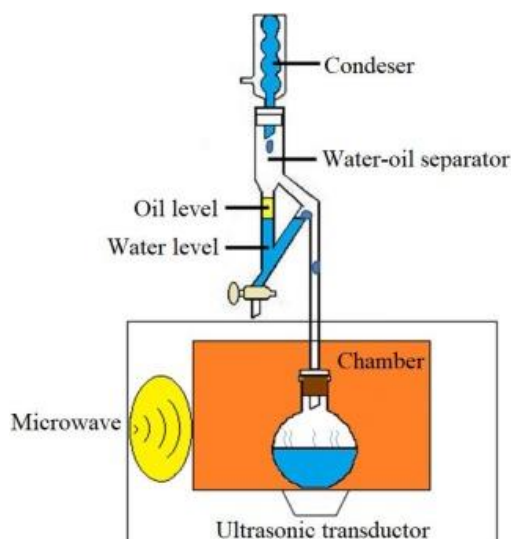
Η αρχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στην αλλαγή της πολικότητας του νερού από τα μικροκύματα και από τη θέρμανση, που παίζει τον ίδιο ρόλο με την κλασική μέθοδο απόσταξης [20]. Η εκχύλιση με μικροκύματα περιλαμβάνει θέρμανση του εκχυλιστή (νερό ή οργανικός διαλύτης) σε επαφή με το φυτό, υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων που επιτρέπει την ομοιογενή θέρμανση. Αυτή η νέα διαδικασία εξαγωγής εξοικονομεί σημαντικό χρόνο και ενέργεια [20]. Αυτή η μέθοδος έχει επιπλέον των περιορισμών της κλασικής μεθόδου απόσταξης, το γεγονός ότι τα μικροκύματα μπορεί να οδηγήσουν σε στερεοχημική εναλλαγή από το ένα ισομερές στο άλλο. [1], [22]



Εικόνα 14 : Σχηματική αναπαράσταση της εκχύλισης με μικροκύματα [44]

* Εξαγωγή με υπερήχους

Η χρήση υπερήχων επιτρέπει την εντατικοποίηση της εξαγωγής ΕΟ. Ως εκ τούτου, συνήθως συνδυάζεται με άλλες τεχνικές εκχύλισης προκειμένου να επιταχυνθεί η διαδικασία εκχύλισης και να αυξηθεί η ταχύτητα μεταφοράς μάζας. Το δείγμα βυθίζεται σε διαλύτη, ενώ υποβάλλεται σε υπερήχους (βύθιση σε λουτρό υπερήχων). Αυτή η μέθοδος, μέσω των γρήγορων κινήσεων του διαλύτη, καθώς βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση, προκαλεί μηχανική δόνηση των τοιχωμάτων και των μεμβρανών του δείγματος που προκαλεί την αποδέσμευση αιθέριων ελαίων. Σε ορισμένους τομείς, θεωρείται ήδη μια μέθοδος εφαρμογής μεγάλης κλίμακας, όπως στην ιατρική και τη βιομηχανία τροφίμων, όπου χρησιμοποιείται για την αύξηση της ποιότητας του εξαγόμενου υποστρώματος, τη μείωση του χρόνου εργασίας και την αύξηση της απόδοσης. [20], [22]

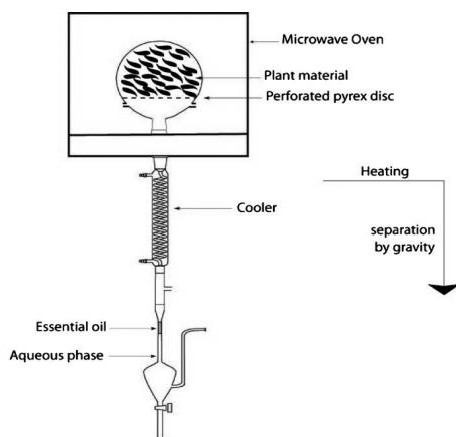


Εικόνα 15 : Σχηματική αναπαράσταση της εξαγωγής με υπερήχους [45]

✓ Υδροδιάχυση και βαρύτητα μικροκυμάτων (MHG)

Είναι μια νέα πράσινη τεχνική για την εξαγωγή αιθέριων ελαίων. Η υδροδιάχυση και η βαρύτητα μικροκυμάτων (MHG) αποτελούν όχι μόνο οικονομική και αποτελεσματική επιλογή, αλλά και φιλική προς το περιβάλλον, καθώς δεν απαιτεί διαλύτη ή νερό και απαιτεί λιγότερη ενέργεια. Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η μείωση του χρόνου εκχύλισης (στην περίπτωση της υδροαπόσταξης διαρκεί 90 λεπτά ή περισσότερο, αλλά σε

αυτήν την τεχνική μόνο 20 λεπτά) και η μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων, καθώς και η εξοικονόμηση ενέργειας. [47]



Εικόνα 16 : Σχηματική αναπαράσταση της MHG [47]

Γενικά, έχουν προκύψει εναλλακτικές μέθοδοι για να ξεπεραστούν ορισμένα από τα μειονεκτήματα και οι περιορισμοί των συμβατικών μεθόδων. Οι παραδοσιακές μέθοδοι έχουν μεγάλους χρόνους εκχύλισης (4 έως 6 ώρες), υψηλή κατανάλωση ενέργειας και χρησιμοποιούν διαλύτες που αυξάνουν τη ρύπανση του περιβάλλοντος. Επιπλέον, μπορούν να προκαλέσουν χημικές αλλαγές στα ΕΟ που είναι θερμικά ασταθή, προκαλώντας μείωση της ποιότητας των εξαγόμενων ελαίων και αλλαγές στη χημική φύση των ενώσεων. Οι «πιο πράσινες» εναλλακτικές είναι πιο βιώσιμες και οικονομικές λόγω της μειωμένης κατανάλωσης νερού και ενέργειας και των μειωμένων εκπομπών CO₂. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι δεν είναι εύκολα προσβάσιμες και η αρχική επένδυση είναι υψηλότερη. Ως εκ τούτου, επί του παρόντος, η μέθοδος υδροαπόσταξης εξακολουθεί να είναι η πιο χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης στο εργαστήριο λόγω της προσβασιμότητας, της απλότητας και του χαμηλότερου κόστους της. Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 2) συνοψίζει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης ΕΟ. [22]

Πίνακας 2 : Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κάθε μεθόδου εκχύλισης αιθέριων ελαίων [22]

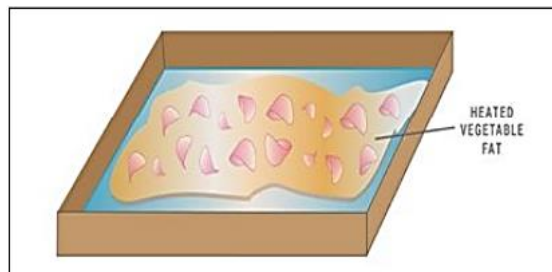
Τίτλος μεθόδου	Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Συμβατικές	Υδροαπόσταξη	<ul style="list-style-type: none"> Ευέλικτο και απλό Εύκολη υλοποίησή Εκλεκτικότητα 	<ul style="list-style-type: none"> Μη δυνατή πλήρης εξαγωγή Υψηλή κατανάλωση ενέργειας Μεγάλος χρόνος ανάσχεσης
	Απόσταξη ατμού	<ul style="list-style-type: none"> Μικρότερος χρόνος ανάσχεσης Μικρότερη απώλεια πολικών μορίων 	<ul style="list-style-type: none"> Μεγαλύτερες εξαγωγές Παρουσιάζουν μη αξιόλογες και υψηλότερου κόστους ενώσεις λόγω μεγάλου χρόνου διεργασίας
	Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη	<ul style="list-style-type: none"> Απλή, φθηνή, αποτελεσματική Κατάλληλη για μικρή κλίμακα 	<ul style="list-style-type: none"> Χρονοβόρα Υψηλή κατανάλωση διαλυτών Οι οργανικοί διαλύτες μπορούν να προκαλέσουν χημικές αλλαγές ή τοξικές επιδράσεις στο τελικό προϊόν
	Ψυχρή έκθλιψη	<ul style="list-style-type: none"> Απλή και φθηνή Κατάλληλη για τη παραγωγή ελαίων εσπεριδοειδών 	Δεν χρησιμοποιείται για δείγματα χαμηλής περιεκτικότητας σε έλαιο
Καινοτόμες	Εξαγωγή υπερκρίσιμου υγρού	<ul style="list-style-type: none"> Μειωμένος χρόνος Διαλύτες χαμηλής τοξικότητας 	Υψηλό κόστος εξοπλισμού, εγκατάστασης και εργασιών συντήρησης
	Εξαγωγή με τη βοήθεια μικροκυμάτων	<ul style="list-style-type: none"> Απλός χειρισμός Χαμηλή κατανάλωση διαλυτών Βελτιωμένη απόδοση εκχύλισης 	Απαιτείται διήθηση ή φυγοκέντρηση στο τέλος

	Εξαγωγή με τη βοήθεια υπερήχων	<ul style="list-style-type: none"> • Απλή και φθηνή • Μειωμένος χρόνος εκχύλισης • Χαμηλή κατανάλωση διαλυτών 	<ul style="list-style-type: none"> • Δύσκολη η αύξηση κλίμακας • Υψηλή κατανάλωση ενέργειας
--	--------------------------------	--	---

1.1.4.3 Μη χρησιμοποιούμενες μέθοδοι :

Ωστόσο, υπάρχουν και κάποιες μέθοδοι που τείνουν να εξαλειφθούν :

- * Η *Enfleurage* είναι μια παλιά τεχνική εκχύλισης, η οποία βασίζεται στην ισχυρή συγγένεια των οσμηρών μορίων για τα λίπη και αφορά κυρίως τα άνθη. Ειδικότερα, αυτά απλώνονται απαλά σε γυάλινες πλάκες επικαλυμμένες με λεπτή στρώση λίπους και αυτές οι πλάκες τοποθετούνται πάνω σε ξύλινα κουφώματα. Οι πτητικές ουσίες διαχέονται και απορροφώνται από το στρώμα λίπους [20]. Το τελικό προϊόν που λαμβάνεται μετά από αυτή τη διαδικασία είναι ένα μεγάλο μέρος του αιθέριου ελαίου που υπάρχει στα φυτά και περιέχει πολλά άλλα τερπένια που μπορούν να διαλυτοποιηθούν στα χρησιμοποιούμενα λίπη, δηλαδή τελικά το προϊόν δεν λέγεται αιθέριο έλαιο αλλά "απόλυτο" [1]. Αυτή η διαδικασία τείνει να εξαφανιστεί επειδή απαιτεί μεγάλο εργατικό δυναμικό. [20]



Εικόνα 17 : Σχηματική αναπαράσταση της *Enfleurage* [46]

- * Τομή : χρησιμοποιείται σπάνια και περιλαμβάνει χωρισμό του φλοιού των δέντρων, με στόχο την συλλογή του χυμού, για παράδειγμα το καουτσούκ του δέντρου από καουτσούκ. [20]

1.1.5 *Mentha Pulegium L.* / Φλισκούνη

1.1.5.1 Γενικά στοιχεία

Το *Mentha Pulegium*, πιο γνωστό ως ρεννυρογιά (φλισκούνη) ή μέντα (Βραζιλία), είναι ένα από τα πιο γνωστά είδη του γένους *Mentha*. Το *Mentha Pulegium L.* βρίσκεται στην περιοχή της Ευρώπης και της Μεσογείου. Στην Βοσνία-Ερζεγοβίνη, αυτό το φυτό χρησιμοποιείται παραδοσιακά από την ιατρική για τη θεραπεία διαταραχών του νευρικού συστήματος. Τα εκχυλίσματα Ρεννυρογιά είναι καλά εντομοαπωθητικά. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι αυτά τα εκχυλίσματα έχουν και άλλες ιδιότητες, όπως αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές. Μάλιστα, ενδείκνυται για μετεωρισμό, δυσπεψία, εντερικούς κολικούς, κοινό κρυολόγημα, καθυστερημένη έμμηνου ρύση, δερματικά εξανθήματα, ουρική αρθρίτιδα, πονοκεφάλους και ήπιες λοιμώξεις του αναπνευστικού. [18], [22]



Εικόνα 18 : *Mentha Pulegium*

Οι φαρμακευτικές ιδιότητες του *M. Pulegium* αποδίδονται στα μονοτερπένια που υπάρχουν στο αιθέριο έλαιο, καθώς και στα παράγωγα πολυφαινόλης. Λόγω της μυρωδιάς που μοιάζει με της μέντας, το αιθέριο έλαιο *M. Pulegium* έχει ευρεία εφαρμογή, δηλαδή είναι συστατικό τροφίμων και αρωμάτων. Η πουλεγόνη, η πιπεριτόνη ή η πιπεριτενόνη έχουν αναγνωρισθεί ως τα κυρίαρχα συστατικά του. Οι τοξικές επιδράσεις του αιθέριου ελαίου *M. Pulegium* οφείλονται κυρίως στο κύριο συστατικό του (pulegone). Ειδικότερα, οι αναφορές δείχνουν ότι η κατάποση έως και 10 mL ελαίου *Mentha Pulegium* προκαλεί γαστρίτιδα και ήπια τοξικότητα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, χωρίς ηπατονεφρική βλάβη, ενώ θάνατοι προκύπτουν από την κατάποση 15 έως 30 mL αυτού του ελαίου. Λόγω της πιθανής τοξικότητάς του, δεν συνιστάται για παιδιά και άλλες ευαίσθητες ομάδες. [18]

1.1.5.2 Αγροχημικές Εφαρμογές

Η απώλεια ποιότητας των αγροτικών προϊόντων προκαλείται από την παρουσία εντόμων. Η παρουσία αυτών των παρασίτων οδηγεί σε μειωμένη ποιότητα, χαμηλή απόδοση και οικονομικές απώλειες. Επιπλέον, η υγεία των ανθρώπων και των ζώων τίθεται σε κίνδυνο λόγω της παραγωγής καρκινογόνων δευτερογενών μεταβολιτών. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, χρησιμοποιήθηκαν σε υπερβολική ποσότητα χημικά εντομοκτόνα. Παρά το γεγονός ότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά, η υπερβολική χρήση τους προκάλεσε ανοχή σε πολλά είδη εντόμων και μη αναστρέψιμη βλάβη στο περιβάλλον. Τα αιθέρια έλαια έχουν αναδειχθεί ως μια φυσική φυτική εναλλακτική για την προστασία των γεωργικών προϊόντων από τα παράσιτα. Η χρήση των ΕΟ έχει ενταθεί, κυρίως σε κήπους και κατοικίες, για την καταπολέμηση των παρασίτων, όντας σημαντική λόγω της τοξικής (παρασιτοκτόνου) δράσης τους. Τα ΕΟs μπορούν να εισπνευστούν, να καταποθούν ή να απορροφηθούν από το δέρμα των εντόμων. Τα μονοτερπενοειδή είναι μια σημαντική ομάδα χημικών ενώσεων στα αιθέρια έλαια που παρεμβαίνουν στο οκταμερικό σύστημα των εντόμων, το οποίο αποτελεί στόχο για τον έλεγχο των εντόμων. Καθώς τα σπονδυλωτά δεν έχουν υποδοχείς οκτοπαμίνης, οι περισσότερες χημικές ουσίες σε ΕΟ είναι σχετικά ασφαλείς στη χρήση. Το ειδικό ρυθμιστικό καθεστώς σε συνδυασμό με τη διαθεσιμότητα αιθέριων ελαίων κατέστησαν δυνατή την εμπορευματοποίηση φυτοφαρμάκων με βάση το ΕΟ. Η τεχνολογία νανοεγκλεισμού χρησιμοποιείται για την παραγωγή αυτών των φυσικών φυτοφαρμάκων προκειμένου να μιμηθεί τη χημική διαμερισματοποίηση στα φυτά, προστατεύοντας τα αιθέρια έλαια από την υποβάθμιση. [22]

1.2 (Μικρο/ Νανο) Εγκλεισμός / Ενθυλάκωση βιοδραστικών ενώσεων σε βιοδιασπώμενους φορείς

1.2.1 Εισαγωγή

Ο μικροεγκλεισμός αναφέρεται στη διαδικασία εγκλεισμού μιας βιοδραστικής ένωσης σε μέγεθος σωματιδίου που έχει διάμετρο 1–1000 μm, με σκοπό την ελεγχόμενη και παρατεταμένη χορήγηση καθώς και την προστασία της εγκλεισμένης βιοδραστικής ένωσης από το περιβάλλον. [35]

Ο νανοεγκλεισμός είναι η σύνθεση καψουλών με μέγεθος μικρότερο από 1 micron (1000 nm), που διαθέτουν διαφορετικές ιδιότητες από τον συνηθισμένο εγκλεισμό [32]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι κάψουλες θα πρέπει να είναι μικρότερες από 100 nm για να θεωρούνται νανοκάψουλες. [34]

Η πρόοδος του εγκλεισμού από τη μικροκλίμακα στη νανοκλίμακα έγινε λόγω της ανάγκης για περισσότερες δυνατότητες στοχευμένης αποδέσμευσης, όπως η χρήση χημικοθεραπευτικών στον καρκίνο. [35]

1.2.2 Νανοεγκλεισμός

Η νανοτεχνολογία αντιπροσωπεύει μια επαναστατική πορεία για την τεχνολογική ανάπτυξη όσον αφορά τη διαχείριση υλικών σε νανομετρική κλίμακα (ένα δισεκατομμύριο φορές μικρότερη από ένα μέτρο). Η χρήση της νανοτεχνολογίας σε φυσικά προϊόντα έχει αποκτήσει εξέχουσα θέση σε πολλές μελέτες, καθώς έχει οδηγήσει σε αποτελεσματικά εναλλακτικά προϊόντα για διάφορους σκοπούς. Τα αιθέρια έλαια είναι μεταβολίτες που ενδιαφέρουν διάφορες βιομηχανίες, αλλά έχουν ιδιόμορφα χαρακτηριστικά, όπως η πτητικότητα των χημικών συστατικών τους, γι' αυτό και εμφανίζονται ως ενεργά συστατικά διαφόρων συστημάτων εγκλεισμού. Αφού αποδειχθούν οι βιοδραστικές ιδιότητές τους, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν τεχνολογικά εργαλεία για να παρακάμψουμε το πρόβλημα της υψηλής πτητικότητας και, ταυτόχρονα, να αξιοποιήσουμε στο έπακρο τη βιοδραστική τους ισχύ. Ο εγκλεισμός βιοδραστικών ενώσεων αντιπροσωπεύει μια βιώσιμη και αποτελεσματική εναλλακτική λύση. Επιπλέον, αυτή η τεχνική μπορεί να αυξήσει τη φυσική σταθερότητα των ουσιών, να τις προστατεύσει από τις αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον, να μειώσει την πτητικότητά τους, να αυξήσει τη βιοδραστηριότητά τους, να μειώσει την τοξικότητα και ακόμη και να επιτρέψει την αποδέσμευση στοιχείων με την πάροδο του χρόνου σε συγκεκριμένα μέσα. [24]

Ο μηχανισμός ελεγχόμενης αποδέσμευσης αποτελείται από τη μετατόπιση των στοιχείων που υπάρχουν στα νανοσωματίδια (NPs) στο μέσο εφαρμογής. Αυτή η μετατόπιση είναι σταδιακή και έχει οφέλη, όπως μειωμένη εξάτμιση πτητικών στοιχείων, εύκολος χειρισμός, μείωση της φυτοτοξικότητας και των περιβαλλοντικών ρύπων, γεγονός που έχει πλεονεκτήματα τόσο για το οικοσύστημα όσο και για την ανθρώπινη υγεία. [24]

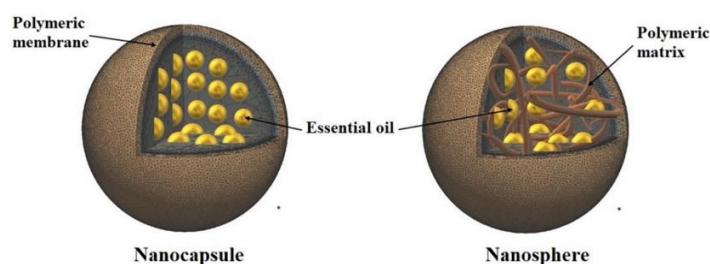
Υπάρχουν διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί βιοδραστικής αποδέσμευσης : αποδέσμευση λόγω διάβρωσης ή αποδόμησης πολυμερών, αυτοδιάχυση μέσω των πόρων, αποδέσμευση μέσω της διάβρωσης της επιφάνειας του πολυμερούς και παλμική παροχή που ξεκινά από την εφαρμογή ενός μαγνητικού πεδίου. [24]

Διάφοροι τύποι υλικών έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς αυτών των δραστικών συστατικών, κυρίως φυσικά και συνθετικά πολυμερή. Κατά την ανάπτυξη του εγκλεισμού νανο- ή μικροσωματιδίων, οι φορείς αυτοί λειτουργούν ως προστατευτική μεμβράνη. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να έχουμε βαθιά γνώση των χαρακτηριστικών των φορέων όσον αφορά τη βιοαποδομησιμότητα, την ικανότητα για λειτουργικότητα της επιφάνειας,

τη σύζευξη, τη συμπλοκοποίηση, την ικανότητα εγκλεισμού και τη χημική συγγένεια με τη δραστική ουσία. [24]

Τα συστήματα νανοεγκλεισμού καλύπτουν διάφορες εφαρμογές, όπως βιοάμυνας (που χρησιμοποιούνται άμεσα στον έλεγχο παρασίτων και φορέων ασθενειών), στην ιατρική (ειδικά στην επιλεκτική χορήγηση φαρμάκων), στα καλλυντικά (στην προστασία ουσιών που είναι επιρρεπείς σε οξείδωση και στην παροχή δραστικών ουσιών σε βαθύτερα στρώματα του δέρματος), στην τεχνολογία τροφίμων (προστατεύοντας εξαιρετικά αντιοξειδωτικές ουσίες και βιταμίνες) και σε πιο διαφορετικές εφαρμογές στις οποίες είναι απαραίτητο να καθοδηγηθεί το δραστικό συστατικό στο σημείο δράσης, καθώς και να ελεγχθεί ο ρυθμός αποδέσμευσης του. Αυτός ο τύπος τεχνολογίας επιτρέπει σε κάποιον να διατηρεί τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των δραστικών ενώσεων, όπως τις προστατευτικές τους ικανότητες, τη σταθεροποίηση και την παρατεταμένη αποδέσμευση. [24]

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια αποτελούνται από νανοκάψουλες και νανοσφαίρες. Οι νανοσφαίρες έχουν μονολιθικού τύπου δομή (μήτρα) στην οποία τα ενεργά φαρμακευτικά συστατικά (API) είναι εγκλεισμένα μέσα στα σωματίδια ή προσροφώνται στην επιφάνειά τους. Από την άλλη, οι νανοκάψουλες είναι το φυσαλιδώδες σύστημα, στο οποίο το API περιορίζεται σε μια κοιλότητα που αποτελείται από έναν εσωτερικό υγρό πυρήνα που περιβάλλεται από μια πολυμερή μεμβράνη. Σε αυτήν την περίπτωση, το API συνήθως είναι διαλυμένο στον εσωτερικό πυρήνα και μπορεί επίσης να προσροφηθεί στην επιφάνεια της κάψουλας. [62]



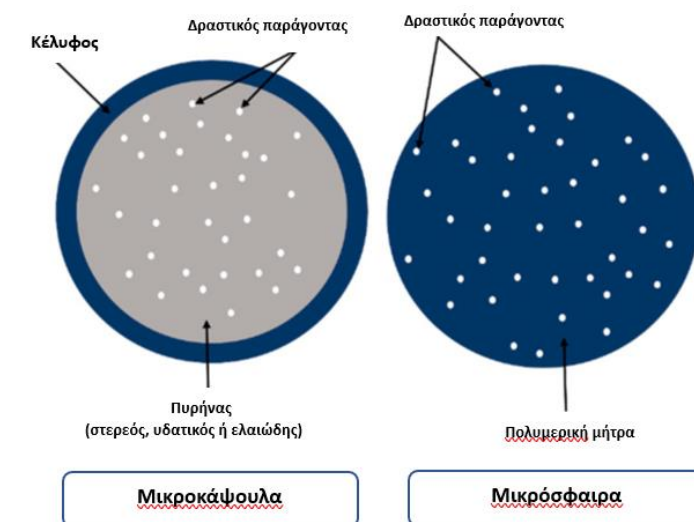
Εικόνα 19 : Είδη πολυμερικών νανοσωματιδίων [62]

1.2.3 Μικροεγκλεισμός

Ο μικροεγκλεισμός είναι η προστασία μικρών στερεών, υγρών ή αέριων σωματιδίων μέσω ενός συστήματος επίστρωσης (1–1000 nm). Το εγκλεισμένο υλικό ονομάζεται πυρήνας και το υλικό που σχηματίζει την επικάλυψη των σωματιδίων είναι το τοίχωμα ή ο παράγοντας εγκλεισμού. Το υλικό τοίχου μπορεί να είναι μια φυσική, συνθετική ή ημι-συνθετική πολυμερική επίστρωση. Σε αυτή την τεχνολογία, σχηματίζονται μικροσωματίδια, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σε σχέση με το μέγεθος και τη μορφολογία τους, σύμφωνα με τον παράγοντα εγκλεισμού και τη μέθοδο μικροεγκλεισμού που χρησιμοποιείται. [22]

Τα μικροσωματίδια ταξινομούνται ανάλογα με τη μορφή τους : ως σύστημα τύπου δεξαμενής, «μικροκάψουλες», όταν ο πυρήνας (εγκλεισμένο υλικό) είναι συγκεντρωμένος στην κεντρική περιοχή, επικαλυμμένος από ένα συνεχές υλικό

τοιχώματος (παράγοντας εγκλεισμού) ή ένα μονολιθικό σύστημα, «μικροσφαιρίδια», όταν ο δραστικός παράγοντας (πυρήνας) είναι διασκορπισμένος σε ένα σύστημα μήτρας (Εικόνα 20). Γενικά, η κύρια διαφορά είναι ότι στις μικροσφαίρες, μέρος του εγκλεισμένου υλικού εκτίθεται στην επιφάνεια του μικροσωματιδίου. [22]

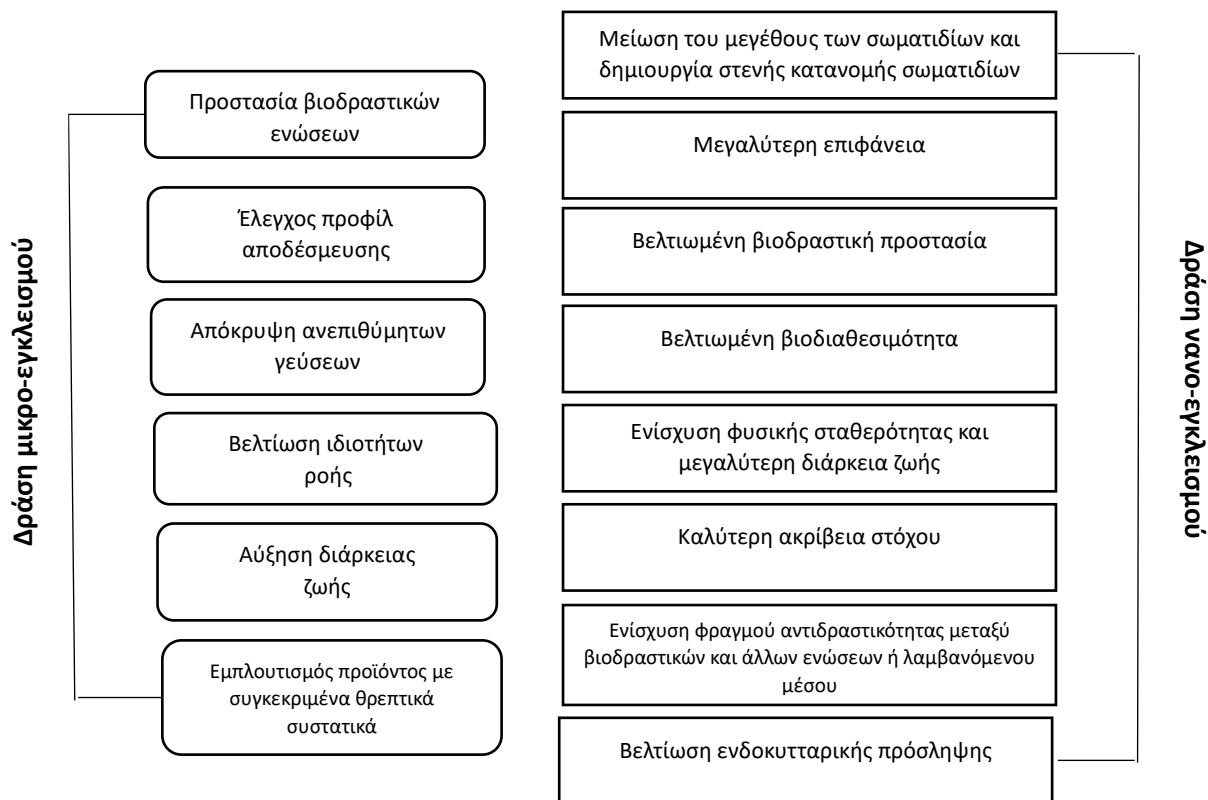


Εικόνα 20 : Σχηματική αναπαράσταση μιας μικροκάψουλας και μιας μικρόσφαιρας

Η διαδικασία καθορισμού ενός συστήματος μικροκάψουλας εξαρτάται κυρίως από τον σκοπό αυτών. Χαρακτηριστικά όπως το σχήμα, το μέγεθος, η διαπερατότητα, η βιοδιασπασιμότητα ή η βιοσυμβατότητα ορίζονται ανάλογα με την εφαρμογή αυτού του υλικού. Άλλες φυσικές και μηχανικές ιδιότητες της μικροκάψουλας, όπως η αντοχή και η ευκαμψία, πρέπει επίσης να καθοριστούν. [22]

1.2.4 Σύγκριση μικρο- και νανοεγκλεισμού

Μια σύγκριση της λειτουργικότητας του μικρο- και νανοεγκλεισμού απεικονίζεται στο Διάγραμμα 1. Οι κύριες λειτουργίες του μικροεγκλεισμού που λαμβάνονται υπόψη είναι η προστασία των δραστικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένης της παράτασης της διάρκειας ζωής και ο έλεγχος της αποδέσμευσης βιοδραστικών συστατικών. Αντίθετα για τις νανοκάψουλες, δίνεται μεγαλύτερη προσοχή στις λειτουργίες που σχετίζονται με το μειωμένο μέγεθος, όπως η μεγαλύτερη επιφάνεια και η βελτίωση της ενδοκυτταρικής πρόσληψης, ενώ συγχρόνως η σύνθεση σε νανοκλίμακες μπορεί να βελτιώσει και τη βιοδιαθεσιμότητα. Ωστόσο, αυτό μπορεί να εξαρτάται από την τεχνική που χρησιμοποιείται. [23], [32]



Διάγραμμα 1 : Πλεονεκτήματα του νανο-και μικροεγκλεισμού [32]

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης εγκλεισμένων EOs έχουν πρόσφατα αποδειχθεί σε μελέτες που συγκρίνουν τη χρήση εγκλεισμένων και μη ελαίων [24]. Ειδικότερα :

1. προστατεύουν αυτά τα βιοπροϊόντα από περιβαλλοντικές επιδράσεις (θερμότητα, υγρασία, φως και οξυγόνο),
2. μειώνουν την πτητικότητα,
3. βελτιώνουν τη σταθερότητα, προάγοντας έτσι μεγαλύτερη διάρκεια ζωής
4. παρέχουν ελεγχόμενη αποδέσμευση, η οποία παρατείνει τη βιολογική επίδραση των ενώσεων [24], [26]

Η αποδέσμευση μπορεί να συμβεί σε συγκεκριμένο καθορισμένο χρόνο ή όχι, μέσω ενός μηχανισμού διάχυσης ή μέσω ρήξης του τοιχώματος. Η αποδέσμευση μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω διακυμάνσεων θερμοκρασίας, διαλυτότητας, μεταβολών του pH ή ακόμα και της βιοαποικοδομησιμότητας του υλικού του τοιχώματος. [22]

1.2.5 Μέθοδοι εγκλεισμού

Ανάλογα με τη φύση της αλληλεπίδρασης του υλικού εγκλεισμού και του εγκλεισμένου υλικού, οι μέθοδοι εγκλεισμού μπορούν να διακριθούν ως χημικές, φυσικοχημικές και μηχανικές [22]. Υπάρχουν διάφορες μεθοδολογίες για την παραγωγή συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο, όπως ο μοριακός εγκλεισμός ή ο διεπιφανειακός πολυμερισμός (molecular inclusion or interfacial polymerization), διατήρηση και εγκλεισμός λιπιδίων (conservation and liposome encapsulation), εξάτμιση διαλύτη (solvent evaporation), συνκρυστάλλωση (co-crystallization), εξώθηση ή επίστρωση ρευστοποιημένης κλίνης (extrusion,

or fluidized bed coating), νανογαλάκτωμα (nanoemulsion), ξήρανση με ψεκασμό (spray-drying), ψύξη/ψύξη με ψεκασμό (spray chilling/cooling), λυοφιλοποίηση/λυοφυλίωση (freeze-drying), συσσωμάτωση/κροκίδωση (coacervation), ηλεκτροϊονοποίηση (electrospinning), ηλεκτροψεκασμός (electrospraying), γαλακτωματοποίηση-ιοντική ζελατινοποίηση (emulsion–ionic gelation) και ταχεία διαστολή υπερκρίσιμων διαλυμάτων (rapid expansion of supercritical solutions (RESS)), μεταξύ άλλων. Η επιλογή της τεχνικής εγκλεισμού εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του αιθέριου ελαίου και των πολυμερών μητρών (όπως υδροφιλία ή λιποφιλικότητα), την αναλογία γαλακτωματοποιητή/υλικού τοιχώματος, τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα και τις επιθυμητές ιδιότητες του προϊόντος, όπως το μέγεθος των σωματιδίων, διασπορά μεγέθους, απόδοση φόρτωσης, ρυθμός αποδέσμευσης κ.λπ. [26]. Γενικά, μια μέθοδος εγκλεισμού πρέπει να είναι γρήγορη, εύκολη, αναπαραγωγίμη και εύκολα επεκτάσιμη για τη βιομηχανία, ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι το σύστημα αυτό μπορεί να αυξήσει τους μηχανισμούς παθητικής κυτταρικής απορρόφησης, να μειώσει τις αντιστάσεις μεταφοράς μάζας και να αυξήσει την αντιμικροβιακή δραστηριότητα λόγω του υποκυτταρικού του μεγέθους. Τα βασικά βήματα σε μια μέθοδο εγκλεισμού είναι η ενσωμάτωση των βιοδραστικών ενώσεων, σχηματισμός σταγονιδίων, απομάκρυνση του διαλύτη, συλλογή των καψουλών και ξήρανση. Τα πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί μερικών εκ των προαναφερθεισών μεθόδων αναφέρονται στο παρακάτω πίνακα. [22], [26], [32], [36], [48]

Πίνακας 3 : Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μερικών μεθόδων εγκλεισμού [48]

Τεχνική	Αιθέριο Έλαιο	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Ξήρανση με ψεκασμό	ηλιέλαιο σε σκόνη, δεντρολίβανο, ευγενόλη, έλαιο σπόρων φρούτου του πάθους	Συνδυασμός σχηματισμού σωματιδίων και ξήρανσης σε ένα μόνο βήμα, δυνατότητα χρήσης μεγάλης ποικιλίας παραγόντων εγκλεισμού, δυναμικά μεγάλης κλίμακας παραγωγή, απλός εξοπλισμός, χαμηλό κόστος λειτουργίας, κάψουλες υψηλής ποιότητας με καλή απόδοση, γρήγορη διαλυτότητα των καψουλών, μικρό μέγεθος, υψηλή σταθερότητα κάψουλας, συνεχής λειτουργία	παραλλαγές στο μέγεθος και η κατανομή του σχήματος των σωματιδίων, οι υψηλές θερμοκρασίες και οι γρήγοροι ρυθμοί ξήρανσης που συνήθως δεν επιτρέπουν τον εγκλεισμό των θερμοευαίσθητων ενώσεων
Κροκίδωση	Πιπέρι Σετσουάν, Ρίγανη, Τριαντάφυλλο	Υψηλή ικανότητα φόρτωσης (έως 99%), χαμηλή θερμοκρασία, ελεγχόμενη αποδέσμευση των ενεργών υλικών, απλές συνθήκες προετοιμασίας, υψηλή αναπαραγωγισιμότητα.	Απαιτεί ακριβή προσαρμογή των συνθηκών λειτουργίας, συσσωμάτωση μικροκάψουλας, υψηλό κόστος
Εξώθηση	Γαρούφαλλο, θυμάρι, κανέλα	σταθερότητα έναντι της οξείδωσης, παρατεταμένη διάρκεια ζωής, χαμηλότεροι ρυθμοί εξάτμισης αιθέριων ελαίων	δαπανηρή διαδικασία, τα σωματίδια δεν έχουν ομοιόμορφη κατανομή
Λυοφιλοποίηση	Κανέλα, γαρούφαλλο, ελιά	προϊόντα εξαιρετικής ποιότητας	υψηλό κόστος, μεγάλος χρόνος διεργασίας
Ιονική ζελατινοποίηση	Λινάρι, Τσουκνίδα, Θυμάρι, Τζίντζερ	Απλός και εύκολος έλεγχος παραγωγής, χαμηλό κόστος και υψηλή απόδοση εγκλεισμού, υψηλής ποιότητας μικροσφαίρες με μικρή διάμετρο, ήπιες συνθήκες και χαμηλές θερμοκρασίες	Κατανομή μεγάλου μεγέθους σωματιδίων, ετερογένεια διασποράς, σημαντική πολυδιασπορά (έως 0,5), παραγωγή σωματιδίων μόνο σε υδατική διασπορά, απαιτείται ελεγχόμενη ανάδευση
Ταχεία διαστολή υπερκρίσιμων διαλυμάτων	ρίγανη, ελαιοκράμβη	μη τοξικότητα, εύκολη αφαίρεση του διαλύτη χωρίς αποικοδόμηση του προϊόντος, ελεγχόμενα μεγέθη σωματιδίων και μορφολογίες, θεωρείται πράσινη τεχνολογία	-

Εγκλεισμός λιπιδωμάτων	Θυμαρί, Σκόρδο	Αποτελεσματική προστασία των υδατοδιαλυτών ενεργών συστατικών και εξαιρετικές ιδιότητες ελεγχόμενης αποδέσμευσης, μεγαλύτερη σταθερότητα, αποδοτικότητα φόρτωσης, υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, βιοσυμβατότητα και βιοαποδομησιμότητα	Υψηλό κόστος, μεγάλη ποικιλία στην κατανομή μεγεθών σωματιδίων, χαμηλή φυσική και χημική σταθερότητα, ανάγκη εισαγωγής νέων πολύπλοκων σταδίων για μετα-θεραπεία
Πολυμερισμός μικρογαλακτώματος	Ρίγανη, Γαρύφαλλο	Εξαιρετικός έλεγχος του μέσου μεγέθους των σταγόνων που λαμβάνονται, χαμηλό κόστος, ικανότητα μεταφοράς υψηλών ποσοτήτων δραστικής ουσίας, εφαρμογή σε μεγάλες κλίμακες, πρακτική και εύκολη αναπαραγωγιμότητα και αξιοπιστία διαδικασίας	Δυσκολία παραγωγής μεγάλων διεπιφανειών ο/ω, απαιτείται αφαίρεση μονομερών και υπολειμματικών διαλυτών, απώλειες υδατοδιαλυτών δραστικών ενώσεων, τοξικότητα των μονομερών, των διαλυτών και των υποπροϊόντων της αντίδρασης

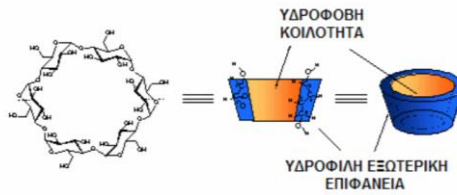
Ο μικρο ή νάνο εγκλεισμός είναι μια εναλλακτική λύση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ξεπεραστούν αρκετοί περιορισμοί στην εφαρμογή αιθέριων ελαίων. Αυτή η εφαρμογή επηρεάζεται βαθιά από την υψηλή μεταβλητότητα και τη χημικά ασταθή φύση των ΕOs. Επιπλέον, τα ΕOs είναι ενώσεις που μπορούν εύκολα να αποικοδομηθούν λόγω αλληλεπιδράσεων με άλλα χημικά συστατικά και έκθεσης σε διάφορους παράγοντες όπως το φως, η θερμοκρασία και το οξυγόνο. Έτσι, τα αιθέρια έλαια μπορούν να εγκλωβιστούν σε (μικρο/νανο) κάψουλες, οι οποίες λειτουργούν ως μικροδεξαμενές, εξασφαλίζοντας εξαιρετική προστασία. Η διαδικασία εγκλεισμού, όπου τα μικρά σωματίδια εγκλείονται σε στερεούς φορείς για να αυξηθεί η προστασία τους, έχει την ικανότητα να μειώνει την εξάτμιση, να προωθεί τον ευκολότερο χειρισμό και να ελέγχει την αποδέσμευση αιθέριων ελαίων κατά την αποθήκευση και την εφαρμογή. Επιπλέον, μέσω αυτής, είναι δυνατή η αλλαγή της εμφάνισης των ΕOs (που συμπεριφέρονται σαν σκόνη), χωρίς αλλαγή της δομής και των ιδιοτήτων τους. [22]

1.2.6 Φορείς εγκλεισμού

1.2.6.1 Κυκλοδεξτρίνες

Γενικά στοιχεία

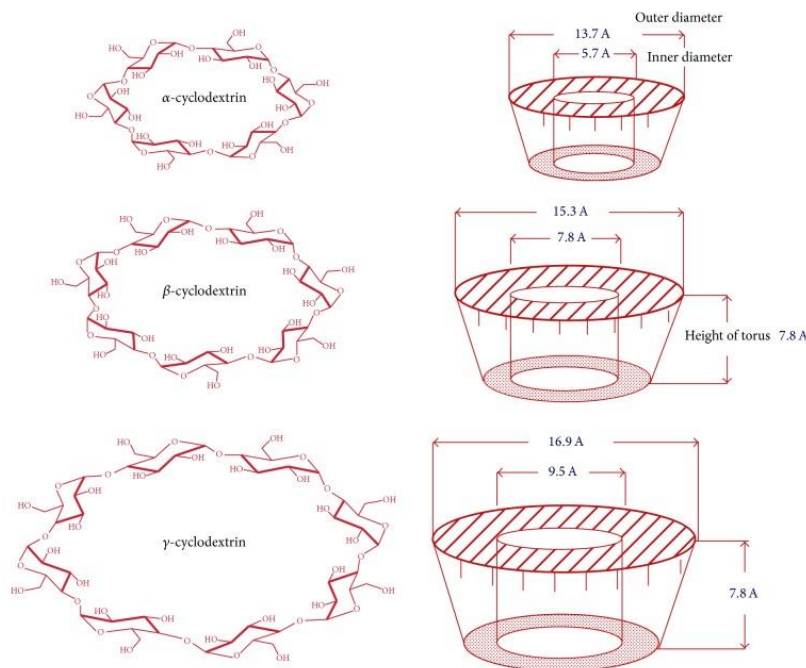
Οι κυκλοδεξτρίνες είναι χημικά και φυσικά σταθερά μακρομόρια που παράγονται από ενζυματική αποικοδόμηση του αμύλου, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των κυκλικών ολιγοσακχαριτών, αποτελούμενοι από επαναλαμβανόμενες μονάδες γλυκόζης. Έχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, η οποία τους επιτρέπει να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με ένα ευρύ φάσμα βιοδραστικών ενώσεων. Η ικανότητά τους αυτή βασίζεται στην ιδιαίτερη δομή τους αφού είναι υδατοδιαλυτά, βιοσυμβατά, με υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και λιπόφιλη κοιλότητα. Ειδικότερα, η εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών είναι μια υδρόφοβη περιοχή που αποτελείται από δακτυλίους πυρανόζης, ενώ η εξωτερική επιφάνεια αποκτά υδρόφιλη φύση λόγω της παρουσίας υδροξυλομάδων μονάδων γλυκόζης, επιτρέποντας ένα ευρύ φάσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων και ενώσεων που μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού, όπως ιόντα, ολιγονουκλεοτίδια και πρωτεΐνες. Έχουν το σχήμα κόλουρου κώνου ή δακτυλίου παρά τέλειου κυλίνδρου, λόγω της διαμόρφωσης καρέκλας της μονάδας γλυκοπυρανόζης. [27], [58], [60]



Εικόνα 21 : Η χημική δομή και η δομή του κόλουρου κώνου της κυκλοδεξτρίνης [59]

Οι κυκλοδεξτρίνες ταξινομούνται ως φυσικές και παράγωγα κυκλοδεξτρινών. Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες περιλαμβάνουν τρεις πολύ γνωστούς βιομηχανικά παραγόμενους (κύριους και δευτερεύοντες) κυκλικούς ολιγοσακχαρίτες. Οι πιο κοινές φυσικές κυκλοδεξτρίνες είναι οι α , β και γ που αποτελούνται από 6, 7 και 8 μονάδες γλυκοπυρανόζης. Είναι κρυσταλλικές, ομοιογενείς και μη υγροσκοπικές ουσίες. Μεταξύ αυτών, η β -κυκλοδεξτρίνη είναι ιδανική για συμπλοκοποίηση λόγω του τέλει μεγέθους κοιλότητας, της αποτελεσματικής συμπλοκοποίησης και φόρτωσης του φαρμάκου, της διαθεσιμότητας και του σχετικά χαμηλού κόστους. Η εικόνα 22 δείχνει τη δομή και τη διαμόρφωση των φυσικών κυκλοδεξτρινών. [27]

Η κύρια διαφορά των τριών φυσικών CD, εκτός από το μέγεθος της κεντρικής τους κοιλότητας, είναι η υδατοδιαλυτότητά τους. Η β -CD είναι η λιγότερο διαλυτή αλλά, ταυτόχρονα, έχει το καταλληλότερο μέγεθος κοιλότητας, για σχηματισμό συμπλόκου, με πολλά φάρμακα. Η κακή διαλυτότητα μπορεί να εξηγηθεί ως προς τη μοριακή ακαμψία του μορίου CD και το αποτέλεσμα που προκαλείται από τον διαμοριακό δεσμό υδρογόνου στην κρυσταλλική κατάσταση. Τέλος, τόσο η α -CD όσο και η γ -CD έχουν υψηλότερη διαλυτότητα στο νερό. [29]



Εικόνα 22 : Δομή και διαμόρφωση φυσικών κυκλοδεξτρινών [27]

Πίνακας 4 : Φυσικές και χημικές ιδιότητες των α -CD, β -CD και γ -CD [48]

	α -CD	β -CD	γ -CD
Μονάδες γλυκόζης	6	7	8
Μοριακή μάζα	972	1135	1297
Υδατικό διάλυμα (g/100mL 25°C)	14.2	1.85	23.2
Διάμετρος κοιλότητας (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	1.5-8.3
Όγκος κοιλότητας (Å ³)	174	262	427
Κρυσταλλική μορφή	Εξαγωνικές λεπίδες	Μονοκλινικά παραλληλόγραμμα	Τετραγωνικά πρίσματα
Pk	12.332	12.202	12.081
Σημείο τήξης (°C)	275	280	275
Επιφανειακή τάση (nM/m)	73	73	73
Ρυθμός όξινης υδρόλυσης (h ⁻¹)	0.11	0.13	0.23

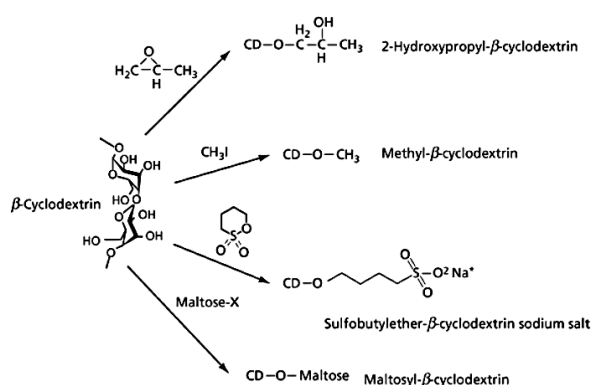
Σύμφωνα με συγκριτικές αναλύσεις που έγιναν σε περισσότερες από τριάντα γνωστές κυκλοδεξτρίνες που περιέχουν φαρμακευτικά σκευάσματα, η β -κυκλοδεξτρίνη είναι η πιο προσβάσιμη και η οικονομικά πιο συμφέρουσα. Έχει χαμηλότερο κόστος παραγωγής, μεγαλύτερη διαθεσιμότητα και διαθέτει τις κατάλληλες διαστάσεις. Πιο συγκεκριμένα, το μέγεθος της κοιλότητας της β -κυκλοδεξτρίνης είναι κατάλληλο για τον εγκλεισμό ενώσεων με εύρος μοριακού βάρους μεταξύ 200-800 g/mol. Παρόλα αυτά, η υδατοδιαλυτότητά της, δηλαδή 1.85 g/100mL, είναι πολύ χαμηλότερη από εκείνη της α - και της γ -κυκλοδεξτρίνης που είναι 14.5 g/100mL και 23.2 g/100mL αντίστοιχα σε θερμοκρασία δωματίου, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4. Μια πιθανή εξήγηση για τη διαφορετική διαλυτότητα που παρουσιάζει η καθεμία κυκλοδεξτρίνη αφορά τους δεσμούς υδρογόνου που μπορούν να σχηματιστούν μεταξύ των μονάδων γλυκοκυρανόζης. Στη β -κυκλοδεξτρίνη σχηματίζεται μία "ζώνη" από έξι δεσμούς υδρογόνου, ενώ στην α -κυκλοδεξτρίνη η ίδια "ζώνη" αποτελείται από μόνο τέσσερις δεσμούς υδρογόνου. Επίσης, η γ -κυκλοδεξτρίνη δεν είναι ομοεπίπεδη, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ευελιξία και επομένως μεγαλύτερη διαλυτότητα. [60]

Η β -κυκλοδεξτρίνη είναι ένα κατάλοιπο φυτοφαρμάκου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε σκευάσματα φυτοφαρμάκων λόγω της ικανότητάς του να προάγει την αποδόμηση των μολυσματικών παρασιτοκτόνων και την επιλεκτική αναγνώριση των μορίων φυτοφαρμάκων. [50]

Η διαλυτοποιητική δράση της β -κυκλοδεξτρίνης και των παραγώγων της σχετίζεται στενά με τη μοριακή τους δομή. Οι διαφορετικές μοριακές δομές και η αντίστοιχη υδατοδιαλυτότητα οδηγούν σε διαφορετικά διαλυτοποιητικά αποτελέσματα των σχηματιζόμενων εγκλεισμών στα φάρμακα, αλλά όλα βελτιώνουν τη υδατοδιαλυτότητα και τη σταθερότητα των φαρμάκων σε μεγάλο βαθμό [50]. Έτσι, διάφορα υδρόφιλα, υδρόφοβα και ιοντικά παράγωγα έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση των φυσικοχημικών και βιοφαρμακευτικών ιδιοτήτων του φαρμάκου και της ικανότητας εγκλεισμού των φυσικών κυκλοδεξτρινών. [27], [28]

Οι βασικές τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες που χρησιμοποιούνται ως έκδοχα στις φαρμακομορφές είναι όλες παράγωγα της β-κυκλοδεξτρίνης :

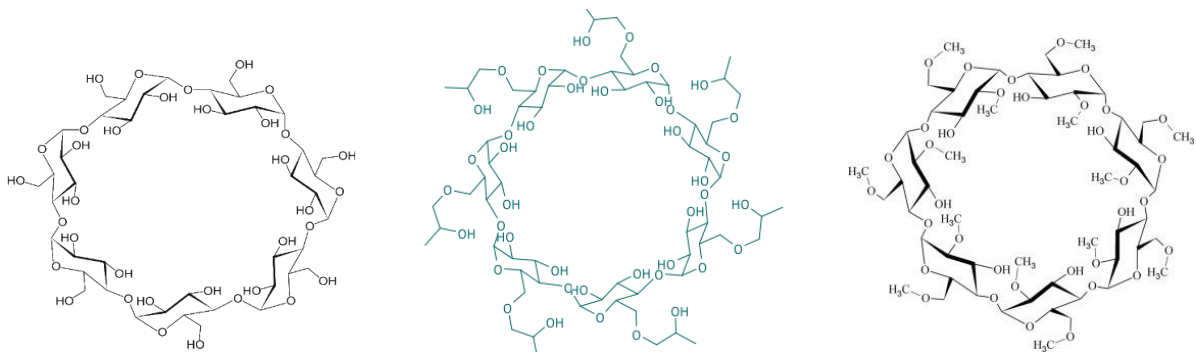
1. Τυχαία μεθυλιωμένα παράγωγα με μέσο MS 14 (*M14-β-CD*).
2. Δύο διαφορετικά υδροξυπρόπυλο παράγωγα, το ένα με μέσο μοριακό βαθμό υποκατάστασης 3 (*((2HP)3-β-CD*) και το άλλο με μέσο μοριακό βαθμό υποκατάστασης 7 (*((2HP)7-β-CD*).
3. Σουλφο-βούτυλο αιθερικά παράγωγα με μέσο MS 7 (*SBE7-β-CD*).
4. Γλυκόσυλο και μαλτόσυλο κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες περιέχουν μόνο μόρια γλυκόζης (*G1-β-CD*) ή μαλτοσακχαρίτες όπως η μαλτόζη (*G2-β-CD*) συνδεδεμένα απευθείας με α-(1→6) γλυκοζιτικό δεσμό στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης [59]



Εικόνα 23 : Οι βασικές τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες

Η παραγωγή τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών έχει σαν στόχο:

1. Να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητα των κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων τους : Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό. Η β-κυκλοδεξτρίνη έχει τη μικρότερη υδατοδιαλυτότητα λόγω της περισσότερο άκαμπτης δομής της που οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της υδροξυλομάδας του C-2 μιας μονάδας γλυκοπυρανόζης και της υδροξυλομάδας του C-3 της γειτονικής ομάδας, σχηματίζοντας επτά ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου που εμποδίζουν την αλληλεπίδραση της κυκλοδεξτρίνης με το διαλύτη. Αυτή η «ζώνη δεσμών υδρογόνου» δεν είναι πλήρης στις υπόλοιπες φυσικές κυκλοδεξτρίνες και γι' αυτό ευνοείται η αλληλεπίδραση αυτών με τα μόρια του νερού.
2. Να βελτιώσει τη σύνδεση-αλληλεπίδραση των εγκλωβισμένων μορίων με τις κυκλοδεξτρίνες.
3. Να εκλύσει συγκεκριμένες καταλυτικές ομάδες στη θέση σύνδεσης.
4. Να σχηματίσει αδιάλυτες δομές που περιέχουν κυκλοδεξτρίνες, όπως τα πολυμερή, σε στόχο την εφαρμογή τους στη χρωματογραφία. [59], [60]



Εικόνα 24 : Χημική δομή της β-CD, 2-hydroxypropyl-β-CD, methyl-β-CD

ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΕΣ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

Η προσθήκη του μέθυλο-υποκαταστάτη στις υδροξυλομάδες των κυκλοδεξτρινών αυξάνει σημαντικά την υδατοδιαλυτότητα της τροποποιημένης κυκλοδεξτρίνης σε σχέση με αυτή της αρχικής. Η μεθυλίωση όμως αυξάνει και την ικανότητα συμπλοκοποίησης των κυκλοδεξτρινών, καθώς η υποκατάσταση των υδροξυλομάδων στις θέσεις 2 και 6 αυξάνει την υδροφοβικότητα της εσωτερικής κοιλότητας. [50], [59]

ΥΔΡΟΞΥΑΛΚΥΛΙΩΜΕΝΕΣ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

Οι υδροξυαλκυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες παράγονται μετά από κατεργασία των κυκλοδεξτρινών με οξείδια των αλκυλενίων και υποκατάσταση των ελεύθερων υδροξυλομάδων στις θέσεις C-2, C-3 και C-6 κάθε μονάδας γλυκοπυρανόζης. Το DS στις υδροξυαλκυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες επηρεάζει τόσο την ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα όσο και τη διαλυτότητά τους. [50], [59]

Η κινητήρια δύναμη για τη συμπλοκοποίηση περιλαμβάνει την απομάκρυνση του μορίου του νερού από την υδρόφοβη κοιλότητα και το σχηματισμό δυνάμεων Van der Waals και αλληλεπιδράσεων δεσμού υδρογόνου. Έχει αποδειχτεί ότι τα σύμπλοκα εγκλεισμού βιοδραστικών μορίων με κυκλοδεξτρίνες επηρεάζουν την αποδέσμευση βιοδραστικών ενώσεων, με τη σταθερότητα του συμπλέγματος εγκλεισμού να εξαρτάται από τον τύπο των δεσμών που υπάρχουν μεταξύ των κυκλοδεξτρινών και των φιλοξενούμενων μορίων τους. [27], [58]

Εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνες

Η ιδιαίτερη δομή των κυκλοδεξτρινών τις καθιστά ιδανικούς φορείς για τον εγκλεισμό διαφόρων μορίων. Όταν βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα, η υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών καταλαμβάνεται από πολικά μόρια νερού. Η κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών είναι πιο υδρόφοβη από το νερό. Η κινητήρια δύναμη σχηματισμού των συμπλόκων βασίζεται στην αντικατάσταση των μορίων νερού με λιγότερο πολικά υδροφοβικά μόρια, όπως τα φάρμακα. Επιτυγχάνεται έτσι ένα σταθερότερο σύμπλοκο, αφού αλλάζει την ενθαλπία και μειώνει τη συνολική ενέργεια του συστήματος. Η δέσμευση βιοδραστικών ενώσεων εντός της κυκλοδεξτρίνης-ξενιστή δεν είναι σταθερή ή μόνιμη, αλλά μάλλον μια δυναμική ισορροπία. Με αυτόν τον τρόπο, ο σχηματισμός συστημάτων εγκλεισμού είναι αποτέλεσμα μιας ισορροπίας μεταξύ των ελεύθερων μορίων και των μορίων CD με τις βιοδραστικές ενώσεις - σύμπλοκο CD. [25], [60]

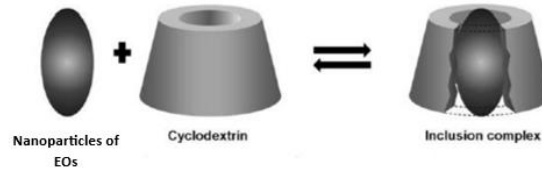


Όπου : CD: η κυκλοδεξτρίνη

G: το προς εγκλεισμό μόριο

CDG: το σύμπλοκο εγκλεισμού

Kc: η σταθερά ισορροπίας



Εικόνα 25 : Σχηματισμός συμπλόκου εγκλεισμού

Ο σχηματισμός των συμπλόκων εγκλεισμού (ICs) εξαρτάται από δύο παράγοντες. Ο πρώτος είναι το μέγεθος του φιλοξενούμενου μορίου ή ορισμένων υδρόφοβων ομάδων αυτού. Στην περίπτωση μεγάλων φιλοξενούμενων μορίων, ο εγκλεισμός εξαρτάται από τη παρουσία μιας κατάλληλης ομάδας ή ενός δακτυλίου ικανού να εισέλθει. Μόνο τα λιπόφιλα τμήματα αυτών των μορίων δύνανται να εγκλωβιστούν στη λιπόφιλη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης και όχι ολόκληρα τα μόρια. Ο δεύτερος παράγοντας σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού είναι οι θερμοδυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του συμπλόκου, δηλαδή της κυκλοδεξτρίνης, του φιλοξενούμενου μορίου και του διαλύτη. Για να σχηματιστεί το σύμπλοκο απαιτείται μία κινητήρια δύναμη, η οποία θα “έλκει” το φιλοξενούμενο μόριο μέσα στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. [60]

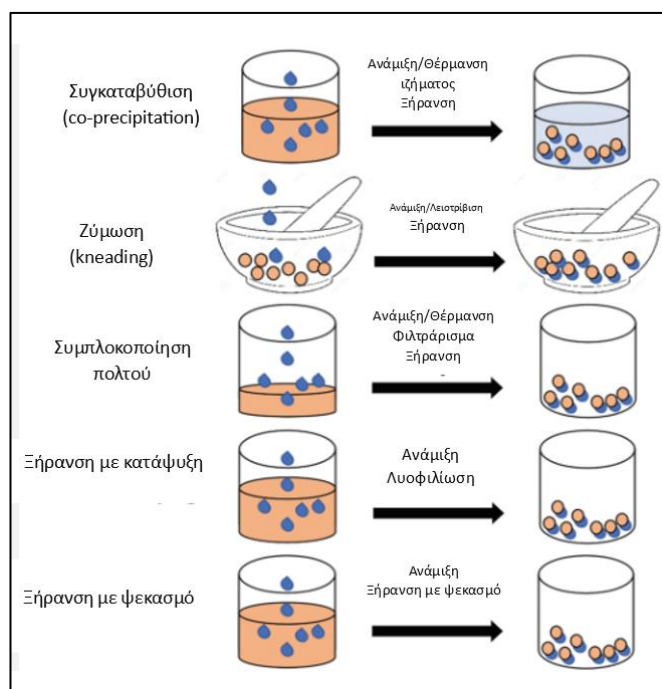
Ορισμένες φορές, εκτός από τη δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού, έχει παρατηρηθεί και η δημιουργία συμπλόκων μη εγκλεισμού (non inclusion complexes). Σε αυτά, το φιλοξενούμενο μόριο δε βρίσκεται εντός της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης, αλλά στο εξωτερικό αυτής. Η δημιουργία των συμπλόκων αυτών οφείλεται κατά κύριο λόγο σε διαμοριακές δυνάμεις, όπως οι δυνάμεις van der Waals, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις και οι δεσμοί υδρογόνου. [60]

Εκτός από το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού και συμπλόκων μη εγκλεισμού είναι δυνατός και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων. Δραστικές ενώσεις που βρίσκονται εξωτερικά της κυκλοδεξτρίνης αναπτύσσουν διαμοριακές δυνάμεις με τα σύμπλοκα εγκλεισμού σχηματίζοντας υδατοδιαλυτά συσσωματώματα. Αυτά τα συσσωματώματα σύμφωνα με μελέτες ευνοούν τη διαλυτοποίηση λιπόφιλων ενώσεων. [60]

Για την προετοιμασία συμπλόκων EOs/CD με επιθυμητά χαρακτηριστικά, είναι σημαντικό να εντοπιστούν διάφοροι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη διαδικασία. Έτσι, αυτοί οι βασικοί παράγοντες είναι οι συνδιαλύτες και ο τύπος CD που χρησιμοποιείται, η μοριακή αναλογία των μορίων (EO:CD), η τεχνική παρασκευής που εφαρμόζεται και οι συνθήκες ξήρανσης (χρόνος και θερμοκρασία) [49]. Ωστόσο, σημαντικοί παράγοντες είναι και ο τύπος της κυκλοδεξτρίνης, το μέγεθος της κοιλότητας, το pH και η κατάσταση ιονισμού, η θερμοκρασία και η μέθοδος παρασκευής [48]. Η επιλογή της τεχνικής προετοιμασίας βασίζεται στην ταχύτητα, την απλότητα, την απόδοση ανάκτησης, το κόστος, τα επιθυμητά μορφομετρικά χαρακτηριστικά και η απόδοση του τελικού προϊόντος, τα οποία είναι σημαντικά για τη βελτιστοποίηση της ποιότητας των συμπλεγμάτων εγκλεισμού και της βιοδιαθεσιμότητας των EOs. [49]

Τεχνικές σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης

Για σύμπλοκα εγκλεισμού EOs/CD σε στερεή κατάσταση, οι πιο κοινές τεχνικές παρασκευής που εφαρμόζονται είναι η μέθοδος συν-καταβύθισης (co-precipitation method) και η μέθοδος ζύμωσης (kneading method) και η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στο διάλυμα είναι η παρασκευή συμπλόκου εγκλεισμού σε υδατικό μέσο, δηλαδή μοριακός εγκλεισμός στο διάλυμα. Συνήθως, η παρασκευή συμπλόκων απαιτεί συνδιαλύτες. Κατά τη διάλυση των CD και των πτητικών οργανικών ενώσεων με συνδιαλύτες, τα διαλύματα που προκύπτουν αναμειγνύονται και υποβάλλονται σε επεξεργασία με διαφορετικές μεθόδους, π.χ. λυοφιλίωση, συγκαταβύθιση, υπερήχους, αργή διάχυση, ξήρανση με ψεκάσμο και περιστροφική εξάτμιση, οι οποίες περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 5. Αν και αυτές οι τεχνικές παρουσιάζουν εξαιρετικά αποτελέσματα όσον αφορά την αποτελεσματικότητα, είναι χρονοβόρες διαδικασίες αφού η εξάτμιση του διαλύτη πρέπει να πραγματοποιηθεί σε μεταγενέστερο στάδιο. Ορισμένες τεχνικές παρασκευής συμπλόκου εγκλεισμού δεν χρειάζονται συνδιαλύτες, όπως τα φυσικά μείγματα, η τεχνολογία υπερκρίσιμων ρευστών και οι μέθοδοι στεγανοποιημένης θέρμανσης, ή χρησιμοποιούν μικρή ποσότητα νερού για να βοηθήσουν το μείγμα της σκόνης CDs με τα αιθέρια έλαια, όπως η συμπλοκοποίηση με μορφή πολτού (*Slurry complexation*), συμπλοκοποίηση πάστας και μέθοδοι ζύμωσης, όπως εμφανίζονται στον Πίνακα 5. [49]



Εικόνα 26 : Τεχνικές σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης [53]

Πίνακας 5 : Τεχνικές παρασκευής συμπλόκων εγκλεισμού

Τεχνική προετοιμασίας	Συνδιαλύτες	Βήματα	T _{max}	Χρονική διάρκεια	Παρατηρήσεις
Παρασκευή IC σε υδατικό μέσο	Αιθανόλη/Νερό	1)Ανακάτεμα 2)Διήθηση	25 °C	12–24 ώρες	<ul style="list-style-type: none"> •Μια απλή τεχνική για προκαταρκτικές μελέτες •Μέθοδος κατασκευής διαγράμματος διαλυτότητας φάσης και προσδιορισμός K_f
Ξήρανση με κατάψυξη	Αιθανόλη/Νερό	1)Ανάδευση 2)Διήθηση 3)Λυοφιλοποίηση	30 °C	3 ημέρες	<ul style="list-style-type: none"> •Ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ CD και VOC •Υψηλής ποιότητας και σταθερό προϊόν •Βέλτιστη για θερμοευαίσθητες ενώσεις •Δυνατότητα scale up

Συγκαταβύθιση	Αιθανόλη/Νερό	1)Ανάδευση κάτω από τη φωτιά 2)Αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία 3)Διήθηση κενού 4)Ξήρανση υπό κενό	55 °C	Μακράς διάρκειας	<ul style="list-style-type: none"> •Μια από τις πιο απλές τεχνικές •Χρησιμοποιείται ευρέως στο εργαστήριο •Προβλήματα με την παραγωγή μεγάλης κλίμακας
Υπέρηχοι	Αιθανόλη/Νερό	1)Ανάδευση με συσκευή υπερήχων 2)Διήθηση 3)Πλύσιμο 4)Λυοφιλοποίηση	60 °C	3 ημέρες	<ul style="list-style-type: none"> •Πολύ απλή και εύκολη στον έλεγχο
Ξήρανση με ψεκασμό	Αιθανόλη/Νερό	Ατμοποίηση του διαλύματος VOC και του διαλύματος CD	125 °C	NA	<ul style="list-style-type: none"> •Χαμηλή περιεκτικότητα σε φάρμακα •Οι υψηλές θερμοκρασίες πιθανότατα οδηγούν στην εξάτμιση των VOC
Περιστροφική εξάτμιση	Αιθανόλη/Νερό	1)Ανάδευση 2)Διήθηση 3)Περιστροφική εξάτμιση	80 °C	NA	<ul style="list-style-type: none"> •Υψηλή περιεκτικότητα σε φάρμακα •Υψηλή φυσική σταθερότητα των VOC
Αργή διάχυση	Νερό	Διάχυση των ατμών VOC στο διάλυμα CD	25 °C	2 εβδομάδες	<ul style="list-style-type: none"> •Χρονοβόρα μέθοδος
Συμπλοκοποίηση με μορφή πολτού	Μικρή ποσότητα νερού	1)Ανάδευση 2)Ξήρανση 3)Χειροκίνητη λειοτρίβηση	25 °C	1 εβδομάδα	<ul style="list-style-type: none"> •Ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ CD και VOC •Απλή τεχνική •Οικονομική μέθοδος
Συμπλοκοποίηση πάστας	Κανένας	1)Χειροκίνητη ανάδευση υποβοηθούμενη από νερό 2)Ξήρανση 3)Χειροκίνητη λειοτρίβηση	25 °C	2 ημέρες	<ul style="list-style-type: none"> •Οικονομική μέθοδος •Μερική συμπλοκοποίηση
Φυσικό μείγμα	Κανένας	Χειροκίνητη ανάδευση	25 °C	15 λεπτά	<ul style="list-style-type: none"> •Χωρίς ομοιογενή δομή •Έλλειψη αλληλεπίδρασης
Μέθοδος Ζύμωσης	Κανένας	1)Η ζύμωση βοηθείται από το νερό 2)Φούρνος κενού 3)Τρίψιμο/Λειοτρίβηση και κοσκίνισμα	70 °C	13 h	<ul style="list-style-type: none"> •Σύμπλοκα VOC/CD με υψηλή σταθερότητα
Τεχνολογία Υπερκρίσιμων Ρευστών	Κανένας	Υποβολή σε υπερκρίσιμες συνθήκες	50 °C	6 h	<ul style="list-style-type: none"> •Αποτυχημένος σχηματισμός IC VOC/CD •Χαμηλότερη αλληλεπίδραση μεταξύ VOC και CD
Μέθοδος σφράγισης-θέρμανσης	Κανένας	1)Σφράγιση όξινου μέσου και θέρμανση 2)Λυοφιλοποίηση	28 °C	Μακρά διάρκειας	<ul style="list-style-type: none"> •Πολύ καλή απόδοση εγκλεισμού •Απλή τεχνική

Συντομογραφίες: **CD** - κυκλοδεξτρίνη, **IC** - σύμπλεγμα εγκλεισμού, **T_{max}** - μέγιστη θερμοκρασία, **NA** - μη διαθέσιμο, **VOC** - πτητική οργανική ένωση. [49]

1.2.6.2 Ζυμομύκητες

Γενικά στοιχεία

Ο *Saccharomyces cerevisiae* (μαγιά αρτοποιίας) έχει αναγνωριστεί από καιρό ως βιώσιμος, βιοσυμβατός και βιοαποδομήσιμος φορέας για μια ποικιλία εξωγενών ενώσεων. Τόσο τα υδρόφοβα όσο και τα υδρόφιλα συστατικά τροφίμων και τα φαρμακευτικά προϊόντα έχουν εγκλειστεί σε κύτταρα ζυμομύκητα για προστασία, κάλυψη και στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου. Η ενσωμάτωση EOs στη μαγιά επιτυγχάνεται μέσω μιας απλής διαδικασίας που χρησιμοποιεί θερμότητα και ανάδευση. Μόλις το ΕΟ εισέλθει στο "κελί", η μαγιά γίνεται μη βιώσιμη. Το παχύ εξωτερικό περίβλημα του κυττάρου ζύμης, ωστόσο, παραμένει άθικτο και απομονώνει το έλαιο από το περιβάλλον. Από αυτή την άποψη, το *S. cerevisiae* είναι ένας

ιδανικός φορέας : διατηρεί τη δραστηριότητα του ωφέλιμου φορτίου του (EO) ενώ χάνει την ικανότητα αναπαραγωγής και, κατά συνέπεια, να επηρεάζει τα υδάτινα οικοσυστήματα. [51], [56]

Προετοιμασία ζυμομυκήτων

Διαπερατότητα μέσω πλασμόλυσης : Ένας αριθμός ενώσεων μπορεί να μην είναι σε θέση να διασχίσει τις πλασματικές μεμβράνες, επειδή είναι ελάχιστα διαλυτές σε αυτές λόγω της υψηλής υδροφιλικής ή του ιοντικού χαρακτήρα. Ένας κοινός τρόπος για να επιτραπεί η διάχυση τέτοιων υδατοδιαλυτών ενώσεων είναι πριν από την έκθεση στην ένωση που μας ενδιαφέρει, τα κύτταρα να υποβάλλονται σε «πλασμόλυση», δηλαδή, μια επεξεργασία που διαταράσσει ή εξασθενεί τις κυτταρικές μεμβράνες. Σημειώνεται ότι οι πλασμολυτικές θεραπείες επηρεάζουν την ακεραιότητα όχι μόνο της πλασματικής μεμβράνης, αλλά και σχεδόν όλων των κυτταροπλασματικών οργανιδίων. Η πλασμόλυση μπορεί να επιτευχθεί με δύο κύριες προσεγγίσεις [57] :

(A) μέτρια ή σοβαρά ωσμωτικά σοκ, συνήθως με χρήση υπερτονικού NaCl. Παραδείγματα ενώσεων που εγκλείονται με τέτοιες μεθόδους περιλαμβάνουν λιμονένιο, εκχυλίσματα σκόρδου και βόειου κρέατος και ρεσβερατρόλη. [57]

(B) Επεξεργασία με τουλάχιστον μερικώς υδατοδιαλυτούς οργανικούς διαλύτες, όπως ο οξικός αιθυλεστέρας (π.χ. για εγκλεισμό ιχθυελαίου). Η βιβλιογραφία συχνά αναφέρει επίσης τη χρήση αιθανόλης και τολουολίου για το σκοπό αυτό.

Ορισμένες πηγές προτιμούν συγκεκριμένα να περιορίσουν τη χρήση του όρου «πλασμόλυση» στις διεργασίες που βασίζονται σε οργανικούς διαλύτες, αναφερόμενοι σε αυτές που βασίζονται στο NaCl ως επιταχυνόμενη αυτόλυση, που κατά κάποιον τρόπο υπονοεί ότι οι διαδικασίες περιλαμβάνουν και την αποδέσμευση πεπτικών ενζύμων στον ενδοκυτταρικό χώρο. [57]

1.2.7 Μελέτη αποδέσμευσης – Release της δραστικής ουσίας

Δύο σημαντικοί μηχανισμοί αποδέσμευσης υιοθετούνται για εφαρμογές τροφίμων.

- a. η «καθυστερημένη αποδέσμευση», η οποία αποτρέπει την αποικοδόμηση των βιοδραστικών ουσιών μέχρι να φτάσουν στην στοχευόμενη θέση και
- b. η «παρατεταμένη αποδέσμευση» για σταθερό και μόνιμο ρυθμό αποδέσμευσης σε περίπτωση γεύσης, αρώματος, αντιοξειδωτικών κ.λπ.

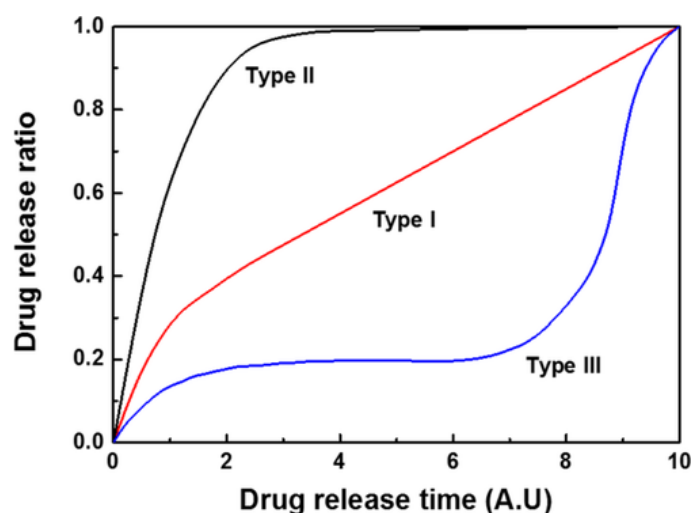
Οι *in vitro* κινητικές μελέτες αποδέσμευσης εφαρμόζονται για να εξεταστεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των συστημάτων εγκλεισμού σε νανοσυστήματα. Οι μελέτες αυτές παρέχουν πληροφορίες για την ανάλυση της συμπεριφοράς του προϊόντος και για την πρόβλεψη συμπεριφορών *in vivo* μέσω μαθηματικών μοντέλων. Γενικά, οι *in vitro* μελέτες αποδέσμευσης βασίζονται στο σχεδιασμό της συσκευής, στην επιλογή των μέσων αποδέσμευσης και στην ανάδευση. Η συμπεριφορά αποδέσμευσης μπορεί να παρακολουθηθεί χρησιμοποιώντας (i) δείγμα και συγκεκριμένη μέθοδο, κατά την οποία το δείγμα που περιέχει εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο εγχέεται στο μέσο αποδέσμευσης και στη συνέχεια η αποδέσμευση του αιθερίου ελαίου αξιολογείται σε σταθερά διαστήματα βάσει της ποσότητας του αιθερίου ελαίου στο μέσο αποδέσμευσης, (ii) μέθοδο συνεχούς ροής, στην οποία η αποδέσμευση του φαρμάκου συμβαίνει λόγω της κυκλοφορίας του μέσου

αποδέσμευσης μέσω στήλης USP IV που περιέχει δείγμα φορτωμένο με αιθέριο έλαιο, (iii) μέθοδο μεμβράνης αιμοκάθαρσης στην οποία ένας μικρός όγκος δείγματος φορτωμένος με έλαιο λαμβάνεται μέσα σε σάκο αιμοκάθαρσης που περιέχει μέσα αποδέσμευσης, σφραγίζεται σωστά και στη συνέχεια διατηρείται σε μεγαλύτερο δοχείο που περιέχει τα ίδια μέσα αποδέσμευσης. Το αιθέριο έλαιο που αποδεσμεύεται από το δείγμα διαχέεται μέσω του σάκου αιμοκάθαρσης στο εξωτερικό δοχείο και λαμβάνεται δείγμα για ποσοτικό προσδιορισμό σε τακτά χρονικά διαστήματα. [40]

1.2.7.1 Προφίλ αποδέσμευσης φαρμάκου

Η μελέτη αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από τους νανοφορείς αποτελεί μία από τις σημαντικότερες, για τον πλήρη χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων και μπορεί να εμφανίσει μία ή πολλαπλές φάσεις στις συμπεριφορές αποδέσμευσης (δηλαδή μονο-, διφασική ή τριφασική). Το πιο σύνηθες προφίλ αποδέσμευσης από πολυμερικά συστήματα μεταφοράς δραστικής ουσίας είναι το τριφασικό προφίλ. [61]

Στην Εικόνα 27, η καμπύλη Τύπου I δείχνει τη μονοφασική αποδέσμευση από μια ενιαία ομοιογενή φάση, η καμπύλη τύπου II αντιστοιχεί στη διφασική που χαρακτηρίζεται από την αρχική έκρηξη και κορεσμό (δηλαδή αποδέσμευση μηδενικής τάξης) και η καμπύλη Τύπου III αντιπροσωπεύει την τριφασική (δηλαδή φάση I, φάση II και φάση III). Η φάση I αναφέρεται συχνά ως ταχεία φάση αποδέσμευσης (burst release phase) που προκαλείται από αποσύνθεση σωματιδίων, σχηματισμό ρωγμών στη μήτρα, μη εγκλεισμένα σωματίδια φαρμάκου ή ενυδάτωση μορίων φαρμάκου στην επιφάνεια, δηλαδή αποδέσμευση των μορίων της δραστικής ουσίας που είναι επιφανειακά προσροφημένα. Η φάση II είναι κοινώς γνωστή ως περίοδος βραδύτερης αποδέσμευσης, κατά την οποία η αποδέσμευση του φαρμάκου υπαγορεύεται με διάχυση μέσω του σχετικά πυκνού πολυμερούς με λίγους πόρους. Η φάση III περιγράφεται ως περίοδος ταχείας αποδέσμευσης ή μερικές φορές ονομάζεται δεύτερη έκρηξη. Η έναρξη της «διάβρωσης» (δηλαδή το σημείο στο οποίο τα προϊόντα αποδόμησης και τα φάρμακα αποδεσμεύονται πολύ πιο γρήγορα) θεωρείται συνήθως υπεύθυνη για αυτήν την επιταχυνόμενη αποδέσμευση και η αποδέσμευση του φαρμάκου κατά τη διάρκεια της περιόδου ελέγχεται κυρίως από την αποδόμηση. [61]



Εικόνα 27 : Τυπικά προφίλ αποδέσμευσης φαρμάκου που περιλαμβάνουν διαφορετικές φάσεις αποδέσμευσης. Η αυθαίρετη μονάδα (AU) χρησιμοποιείται για το χρόνο αποδέσμευσης φαρμάκου [61]

1.2.7.2 Μαθηματική μοντελοποίηση αποδέσμευσης

Ο σκοπός της ανάπτυξης του μοντέλου είναι να συσχετίσει τις παραμέτρους της διαδικασίας χρησιμοποιώντας μαθηματικές εξισώσεις. Η μαθηματική μοντελοποίηση μας δίνει τη δυνατότητα να αναπτύξουμε νέα προϊόντα, χρησιμοποιώντας δεδομένα κινητικής αποδέσμευσης που λαμβάνονται από μελέτη ελεγχόμενης αποδέσμευσης, να προβλέψουμε το προφίλ αυτής, να βελτιστοποιήσουμε τη διαδικασία και να μελετήσουμε την επίδραση των παραμέτρων σχεδίασης (σχήμα, μέγεθος) στον ρυθμό αποδέσμευσης. Η μοντελοποίηση μπορεί να είναι μηχανιστική, εμπειρική και ημιεμπειρική. Τα μηχανιστικά μοντέλα ασχολούνται με τον μηχανισμό αποδέσμευσης που συμβαίνει σε πραγματικές διεργασίες όπως διάλυση, διάχυση, καθίζηση κ.λπ., ενώ τα εμπειρικά και ημιεμπειρικά μοντέλα δεν βασίζονται σε πραγματικά φαινόμενα που εμπλέκονται, αλλά περιγραφικά περιορίζονται σε απλή προσαρμογή καμπύλης. [40]

Υπάρχουν αρκετά μοντέλα προσομοίωσης των πειραματικών δεδομένων και ερμηνείας των μηχανισμών αποδέσμευσης, όπως [30], [31], [37], [38] :

- a. Μοντέλο μηδενικής τάξης
- b. Μοντέλο πρώτης τάξης
- c. Higuchi (νόμος τετραγωνικής ρίζας)
- d. Korsmeyer-Peppas (νόμος ισχύος)
- e. Korcha
- f. Peppas-Sahlin
- g. Avrami (εκτεταμένος εκθετικός νόμος) ή Weibull
- h. Hixson-Crowell
- i. Baker-Lonsdale
- j. Hopfenberg

Ειδικότερα :

1.2.7.2.1 Μοντέλα Μόνιμης κατάστασης (steady state) :

Μοντέλο μηδενικής τάξης

Η αποδέσμευση σταθερής κατάστασης ή αποδέσμευση μηδενικής τάξης, είναι ένα εύχρηστο κινητικό μοντέλο στα δυναμικά μαθηματικά. Χρησιμοποιείται σε ειδικές περιπτώσεις όπου ο ρυθμός εκροής είναι συνεχής και σταθερός ανά μονάδα χρόνου στο σύστημα κάψουλας, όπως συμπεραίνεται από την Εξ. (1). [37]

$$M_t/M_\infty = at + b \quad \text{Εξ. (1)}$$

όπου τα M_t και M_∞ αναφέρονται στις ποσότητες ΕOs που αποδεσμεύονται τις στιγμές t και σε άπειρο χρόνο, αντίστοιχα, οπότε το M_t/M_∞ αντιπροσωπεύει τη αθροιστική αποδέσμευση τη στιγμή t . [37]

Η εγκυρότητα του μοντέλου αποδεικνύεται για διάφορους τύπους σκονών τροποποιημένης αποδέσμευσης, όπως σε σωματίδια μήτρας με χαμηλά διαλυτά ΕOs, επικαλυμμένες μορφές, ωσμωτικά συστήματα. [37]

1.2.7.2.2 Μοντέλα Μη Μόνιμης κατάστασης (non steady state) :

1.2.7.2.2.1 Εμπειρικά και ημιεμπειρικά μοντέλα

Μοντέλο πρώτης τάξης

Το μοντέλο αυτό αφορά σε κινητική αποδέσμευσης υδατοδιαλυτών ουσιών σε πορώδη μήτρα και γαλακτώματα W/O/W. [40]

Higuchi

Η εξίσωση Higuchi αφορά σε κινητική αποδέσμευσης υδατοδιαλυτών και μερικώς υδατοδιαλυτών υλικών σε στερεή και ημιστερεή μήτρα [40]. Έχει κάποιους περιορισμούς, αλλά η απλότητά της τη κάνει ευρέως χρησιμοποιούμενη σήμερα. Η αρχική συγκέντρωση της ενεργής ουσίας στο σύστημα είναι πολύ υψηλότερη από τη διαλυτότητα του δραστικού συστατικού, προκειμένου να δικαιολογηθεί η ψευδο-σταθερή κατάσταση. Τα ακραία φαινόμενα και η διόγκωση του προ-πολυμερούς πρέπει να είναι αμελητέα, γιατί βασίζεται σε μονοδιάστατη διάχυση. Στο φάρμακο που χρησιμοποιείται, τα σωματίδια είναι πολύ μικρότερα σε διάμετρο παρά σε πάχος, ενώ έχει εφαρμογές για Fickian μηχανισμό διάχυσης. [37], [39]

Korsmeyer-Peppas

Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιείται για άγνωστους μηχανισμούς αποδέσμευσης και εάν ο μηχανισμοί αυτής είναι περισσότεροι του ενός. Επιπλέον, χρησιμοποιείται το 60 % των πρώτων δεδομένων αποδέσμευσης ΕΟ, δηλαδή για %release<60% [37], [40]. Μάλιστα, βάσει της τιμής του n, διαπιστώνεται και ο μηχανισμός αποδέσμευσης. Ειδικότερα [71]:

Πίνακας 6 : Ερμηνεία συντελεστή αποδέσμευσης n

Εκθέτης αποδέσμευσης (n)	Μηχανισμός μεταφοράς δραστικής ουσίας	Ρυθμός συναρτήσεως του χρόνου	Μηχανισμός αποδέσμευσης 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

Korcha

Βρίσκει εφαρμογές για φαινόμενα διάχυσης ή διάβρωσης [37]. Σύμφωνα με την εξίσωση του Πίνακα 7, εάν ο λόγος $|A/B|>1$ ο μηχανισμός διάχυσης είναι κυρίαρχος, ενώ για $|A/B|<1$ ο μηχανισμός διάβρωσης είναι κυρίαρχος. Τέλος, εάν $|A/B| = 1$, τόσο ο μηχανισμός διάχυσης όσο και η διάβρωση επηρεάζουν την αποδέσμευση της εγκλεισμένης ένωσης. [41]

Peppas-Sahlin

Εφαρμόζεται για "ανώμαλη" διαδικασία αποδέσμευσης φαρμάκου που περιλαμβάνει μηχανισμούς διάχυσης και χαλάρωσης, δηλαδή βρίσκει εφαρμογή σε Fickian και μη-Fickian

διάχυση [37], [40]. Στην εξίσωση του Πίνακα 7, εάν η αναλογία $|k_1/k_2| > 1$ η αποδέσμευση της εγκλεισμένης ένωσης περιγράφεται κυρίως με διάχυση και εάν $|k_1/k_2| < 1$ περιγράφεται κυρίως από διάβρωση. Επίσης, εάν η αναλογία $|k_1/k_2| = 1$, περιλαμβάνονται τόσο ο μηχανισμός της διάχυσης του Fickian όσο και η διάβρωση. [41]

Avrami ή Weibull

Η εξίσωση του Avrami, η οποία χρησιμοποιεί ως βάση την Weibull, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στα φαινόμενα κρυστάλλωσης, ωστόσο, η χρήση της στο πεδίο της ελεγχόμενης αποδέσμευσης για διάφορες εφαρμογές όπως η εγκλεισμένη αρωματική ένωση έχει αναπτυχθεί με επιτυχία [30]. Η Weibull αφορά όλες τις μελέτες αποδέσμευσης και εφαρμόζεται για σύγκριση των προφίλ αποδέσμευσης συστημάτων μήτρας. Η δεύτερη και τρίτη μορφή στον Πίνακα 7, επιτρέπει τον προσδιορισμό n και k με μια απλή γραμμική παλινδρόμηση. [37], [40]

Hixson–Crowell

Εφαρμόζεται για την κινητική αποδέσμευσης όταν η διάλυση συμβαίνει σε επίπεδα παράλληλα με την επιφάνεια του βιοδραστικού παράγοντα. [40]

Baker-Lonsdale

Εφαρμόζεται σε μικροσφαίρες ή μικροκάψουλες. [40]

Hopfenberg

Για κινητικές αποδέσμευσης βελτιστοποιημένων σφαιρών ελαίου με δεδομένα που λαμβάνονται από σύνθετο προφίλ [40]. Αυτά τα μοντέλα επιτρέπουν την περιγραφή της φαινομενικής αποδέσμευσης μιας φαρμακευτικής ουσίας σε ένα υγρό, για υλικά διαφορετικού σχήματος (μεμβράνη, δισκίο και κύλινδρος). [30]

Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι εξισώσεις και η επεξήγηση των παραμέτρων των προαναφερθέντων μοντέλων [30], [31], [37], [38], [40], [41], [42] :

Πίνακας 7 : Μοντέλα αποδέσμευσης

Μοντέλο	Εξίσωση	Παράμετροι
Μοντέλο πρώτης τάξης	$M_t = M_0 \exp(-k_1 t)$	M_0 - αρχική ποσότητα της εγκλεισμένης ένωσης, M_t - ποσότητα στο χρόνο 't', k_1 - σταθερά ρυθμού
Higuchi	$M_t = K_H (t)^{1/2}$	K_H - σταθερά διάλυσης
Korsmeyer-Peppas	$M_t / M_\infty = kt^n$	M_t / M_∞ - κλάσμα αποδέσμευσης τη στιγμή 't', n - εκθέτης αποδέσμευσης
Korcha	$M_t / M_\infty = A t^{0.5} + B t$	M_t - ποσότητα εγκλεισμένης ένωσης που αποδεσμεύεται τη χρονική στιγμή t A - σταθερά του ρυθμού διάχυσης B - σταθερά του ρυθμού διάβρωσης

Peppas–Sahlin	$M_t/M_\infty = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$	M_t/M_∞ - κλάσμα φαρμάκου που αποδεσμεύεται στο χρόνο t , k_1 και k_2 - κινητικές σταθερές που σχετίζονται με τη διάχυση και τη χαλαρή αποδέσμευση, m - καθαρά Fickian εκθέτης διάχυσης
Weibull ή Avrami	$m = 1 - \exp(-(t - T_i)^b/a)$ ή $\log[-\ln(1 - M_t/M_\infty)] = a \log t + b$ ή $\ln[-\ln(1 - M_t/M_\infty)] = \ln k + n \ln t$	A - παράμετρος κλιμάκωσης, T_i - δείχνει το χρόνο καθυστέρησης πριν την αποδέσμευση, b - παράμετρος σχήματος
Hixson–Crowell	$(M_0)^{1/3} - (M_t)^{1/3} = K_{HC} t$	M_t - ποσότητα εγκλεισμένης ένωσης που αποδεσμεύεται σε χρόνο t , M_0 - αρχική ποσότητα εγκλεισμένης ένωσης K_{HC} - σταθερά
Baker-Lonsdale	$\frac{3}{2} (1 - (1 - M_t/M_\infty)^{2/3}) - M_t/M_\infty = kt$	k - σταθερά ρυθμού
Hopfenberg	$M_t/M_\infty = 1 - (1 - (k_0 t / c_0 a_0))^n$	c_0 και a_0 - αρχική συγκέντρωση και ακτίνα της εγκλεισμένης ουσίας, k_0 - σταθερά ρυθμού, n - παράμετρος σχήματος

1.2.7.2.2 Μοντέλα ελεγχόμενης διάχυσης

Για ένα μονολιθικό σύστημα στο οποίο ο δραστικός παράγοντας είναι εξίσου διασκορπισμένος σε όλη την πολυμερή μήτρα, η διάχυση σε ασταθή κατάσταση και η χρονική της συσχέτιση σε μια μονοδιάστατη μήτρα (άρα τα ακραία φαινόμενα μπορούν να παραβλεφθούν) μπορούν να περιγραφούν από τον δεύτερο νόμο διάχυσης του Fick. Σε γενικές περιπτώσεις αποδέσμευσης ΕOs, όπου ο συντελεστής διάχυσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση, μια αναθεωρημένη διαχυτική έκφραση δίνεται ως Εξ. (2), όπου $\partial C / \partial x$ είναι η βαθμίδα συγκέντρωσης. [37]

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\partial}{\partial x} \left(DC \frac{\partial C}{\partial x} \right) \text{ Εξ. (2)}$$

Προερχόμενο από τον αναθεωρημένο νόμο του Fick, ένα αναλυτικό μοντέλο διάχυσης μονολιθικών σφαιρικών συσκευών αναφέρθηκε από τον Crank, που δόθηκε ως Εξ. (3), όπου $m(t)$ είναι το κλασματικό τμήμα του τμήματος αποδέσμευσης τη στιγμή t της συνολικής ποσότητας των ΕOs (m_{TOT}). [37]

$$\frac{m(t)}{m_{TOT}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left\{ - \frac{D n^2 \pi^2 t}{r^2} \right\} \text{ Εξ. (3)}$$

Αυτή η προσέγγιση βασίζεται σε τρεις υποθέσεις: (1) την απουσία σημαντικών αλλαγών στη μήτρα του πολυμερούς κατά την αποδέσμευση, (2) τις τέλει συνθήκες βύθισης κατά την αποδέσμευση και (3) η αποδέσμευση των ΕOs ελέγχεται κυρίως με διάχυση μέσω της πολυμερικής μήτρας. [37]

Όπως συμβαίνει και με τις μονολιθικές συσκευές, οι κάψουλες πυρήνα-κελύφους ακολουθούν τη μεταφορά διάχυσης της δεξαμενής αποδέσμευσης. Σύμφωνα με τον Crank, το κλασματικό μέρος της αποδεσμευμένης ποσότητας μπορεί να εκφραστεί ως συνάρτηση του χρόνου t , του ενεργού συντελεστή διάχυσης D στην επιστρωση και του πάχους επικάλυψης δ (Εξ. (4)). Αυτή η εξίσωση δείχνει ότι ο ρυθμός αποδέσμευσης ενός συστατικού ΕΟ μειώνεται, καθώς μειώνεται η διαπερατότητα του κελύφους, δηλαδή μειώνεται ο συντελεστής διάχυσής του στο κέλυφος ή αυξάνεται το πάχος του κελύφους. [37]

$$\frac{m(t)}{m_{TOT}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left\{ -\frac{D n^2 (2n+1)^2 t}{4\delta^2} \right\} \text{ Εξ. (4)}$$

1.2.8 Χαρακτηρισμός συμπλόκων εγκλεισμού

1.2.8.1 Μέγεθος (size)

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των σωματιδίων είναι το μέγεθός τους. Παίζει βασικό ρόλο στη σταθερότητα των συμπλόκων, στην αποδέσμευση και στη στοχευμένη δράση της εγκλεισμένης ένωσης αλλά και στην ενίσχυση της δράσης των ουσιών που έχουν εγκλειστεί. Ανάλογα με την εφαρμογή των σωματιδίων, διαφοροποιείται και το κατάλληλο μέγεθός τους. Το μέγεθος των σωματιδίων που σχηματίζονται, επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, όπως τη μέθοδο σχηματισμού, το φορέα εγκλεισμού, τη γραμμομοριακή αναλογία του “φιλοξενούμενου” μορίου, του ξενιστή, καθώς και του διαλύτη. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων, μειώνονται φαινόμενα καθίζησης και συσσωμάτωσης, αλλά αυξάνεται και το ιξώδες του τελικού προϊόντος. [60]

1.2.8.2 Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)

Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) αποτελεί μέτρο της ομοιομορφίας του μεγέθους των σωματιδίων. Μία τιμή κοντά στο μηδέν υποδηλώνει μικρή διακύμανση μεγέθους των σωματιδίων, δηλαδή μονοδιασπορά, ενώ τιμές μεγαλύτερες από 0.2 υποδεικνύουν ευρεία κατανομή μεγέθους των σωματιδίων και άρα πολυδιασπορά. Το πλεονέκτημα ενός συστήματος μονοδιασποράς σχετίζεται με την ικανότητά του να παρέχει μια σταθερή ποσότητα της ένωσης, σε σύγκριση με ένα μίγμα από πολυδιασπαρμένα σωματίδια με διαφορετικές ικανότητες φόρτωσης. [60]

1.2.8.3 ζ-δυναμικό (zeta-potential)

Το ζ-δυναμικό έχει αναγνωριστεί ως ένας πολύ καλός δείκτης του μεγέθους της αλληλεπίδρασης μεταξύ των σωματιδίων και οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται συνήθως για την αξιολόγηση της σταθερότητας των συμπλόκων εγκλεισμού. Ορίζεται ως η διαφορά δυναμικού μεταξύ της στοιβάδας ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων και της ηλεκτρικά ουδέτερης περιοχής του διαλύματος. Μάλιστα, υποδεικνύει το φορτίο στην επιφάνεια των νανοφορέων, ενώ επηρεάζει την φύση και τα χαρακτηριστικά τους, όπως τα επιφανειακά χαρακτηριστικά, την φυσικοχημική τους σταθερότητα, την φόρτωση και την στοχευμένη αποδέσμευση του δραστικού συστατικού με το αντίστοιχο προφίλ αποδέσμευσης του [63]. Ένα υψηλό, κατ’ απόλυτη τιμή, ζ-δυναμικό υποδεικνύει μια ισχυρή απωθητική ηλεκτρική δύναμη, η οποία αποτρέπει τη σύντηξη δύο σταγονιδίων, οδηγώντας σε ένα σταθερότερο νανοσύστημα. Διασπορές με ζ-δυναμικό μεγαλύτερο από +30 mV ή -30 mV, θεωρούνται

σταθερές. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες ανέφεραν ότι το ζ-δυναμικό επηρέασε τη διείσδυση στο δέρμα και την απορρόφηση. Εκτός αυτού, η μορφολογία των συμπλόκων εγκλεισμού επηρεάζει την αποδέσμευση της δραστικής ουσίας, τη μεταφορά στο σώμα και την ικανότητα εκλεκτικότητας. [60]

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο εγκλωβισμός των αιθερίων ελαίων του φλισκουνοίου, *Mentha Pulegium*, στους βιοδιασπώμενους φορείς β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της, Methyl-β-cyclodextrin (*Me-β-CD*), 2-hydroxy-propyl-β-cyclodextrin (*HP-β-CD*) και σε πλασμολυμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Τα συστήματα νανοεγκλεισμού βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς και διαφορετικούς τομείς. Ο εγκλεισμός πραγματοποιείται με στόχο τη προστασία και τη σταθεροποίηση των πτητικών αιθερίων ελαίων από εξωγενείς παράγοντες, την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας τους, καθώς και την τροποποιημένη αποδέσμευση.

Αρχικά, αφού πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των αιθερίων ελαίων στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, γίνεται ανάλυση της χημικής τους σύστασης με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας (GC-MS). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εγκλωβισμός αυτών στους βιοδιασπώμενους φορείς β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της, καθώς και σε πλασμολυμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Τα συστήματα αυτά χαρακτηρίζονται ως προς το μέγεθος νανοσωματιδίων, δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και ως προς τη δομή μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR). Επίσης, μελετάται *in vitro* η αποδέσμευση των αιθερίων ελαίων από τα σύμπλοκα εγκλεισμού και η μαθηματική μοντελοποίηση αυτής. Τέλος, μελετάται η ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά, αντιδραστήρια, όργανα και συσκευές

Τα υλικά και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία είναι τα εξής :

- Αιθέριο έλαιο *Mentha Pulegium*
- Υπερκάθαρο νερό (H₂O)
- β-κυκλοδεξτρίνη 98% (β-cyclodextrin 98%)
- μεθυλ- β-κυκλοδεξτρίνη (methyl- β-cyclodextrin)
- 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (2-hydroxypropyl- β-cyclodextrin)
- Αιθανόλη (EtOH, C₂H₅OH)
- Εξάνιο υψηλής καθαρότητας (C₆H₁₄)
- Κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH 1M)
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl)

- Οξικό οξύ (CH₃COOH)
- Όξινο φωσφορικό δικάλιο (K₂HPO₄) και διόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄)
- Βορικό οξύ (boric acid, H₃BO₃)
- Λινελαϊκό οξύ (linoleic acid, C₁₈H₃₂O₂)
- Διυδροχλωρικό 2,2'-Azobis (2-αμιδινοπροπάνιο) (AAPH)
- Κόκκοι ξηραντικού μέσου Na₂SO₄
- Βρωμιούχο κάλιο (KBr)
- Tween 20

Τα αιθέρια έλαια *Mentha Pulegium* (MP4a, MP5a) που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία παρασχέθηκαν από το Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, Σχολή Επιστημών Τροφίμων & Διατροφής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Η β-CD 98% και η Me-β-CD αγοράστηκαν από την εταιρία Glentham Life Sciences, ενώ η HP-β-CD από την Acros organics. Η EtOH αγοράστηκε από την εταιρία Fisher Scientific, το εξάνιο υψηλής καθαρότητας από την PanReac, ενώ τα κύτταρα ζυμομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η κοινή μαγιά αρτοποιίας του εμπορίου. Τέλος, τα K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, HCl προμηθεύτηκαν από την εταιρία Penta.

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό και χαρακτηρισμό των συμπλόκων εγκλεισμού, είναι :

- Αντλία υψηλού κενού, κατασκευαστής Edwards
- Ζυγός ακριβείας Explorer, κατασκευαστής OHAUS
- Αναδευτήρας τύπου Vortex ZX4, κατασκευαστής Velp
- Φασματόμετρο FT-IR- Alpha II, κατασκευαστής Bruker
- Συσκευή DLS, κατασκευαστής Malvern Zetasizer Nano ZS
- Συσκευή υπερήχων 2210 Ultrasonic Bath, κατασκευαστής Branson
- Υπερφυγόκεντρος SORVALL LYNX 6000, κατασκευαστής Thermo Fisher Scientific
- Συσκευή λυοφιλοποίησης (Freeze dryer) Lablgo Mini, κατασκευαστής Frozen it time Ltd
- Αέριος χρωματογράφος (GC) 450-GC, κατασκευαστής Varian
- Φασματόμετρο μάζας (MS) 220-MS, κατασκευαστής Varian
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis V-770, κατασκευαστής JASCO
- Χρωματογραφική στήλη VF-5ms 30M x 0.25MM D DF=0.25, κατασκευαστής Varian

2.2 Μέθοδοι

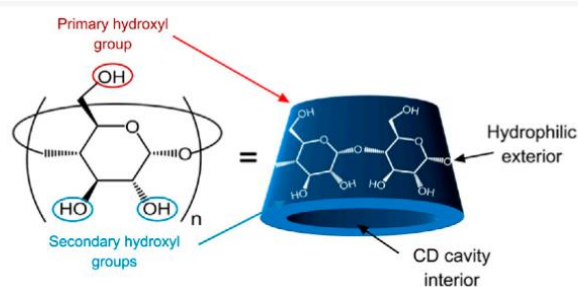
2.2.1 Εγκλεισμός αιθερίου ελαίου σε β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της

2.2.1.1 Συγκαταθύθιση (co-precipitation)

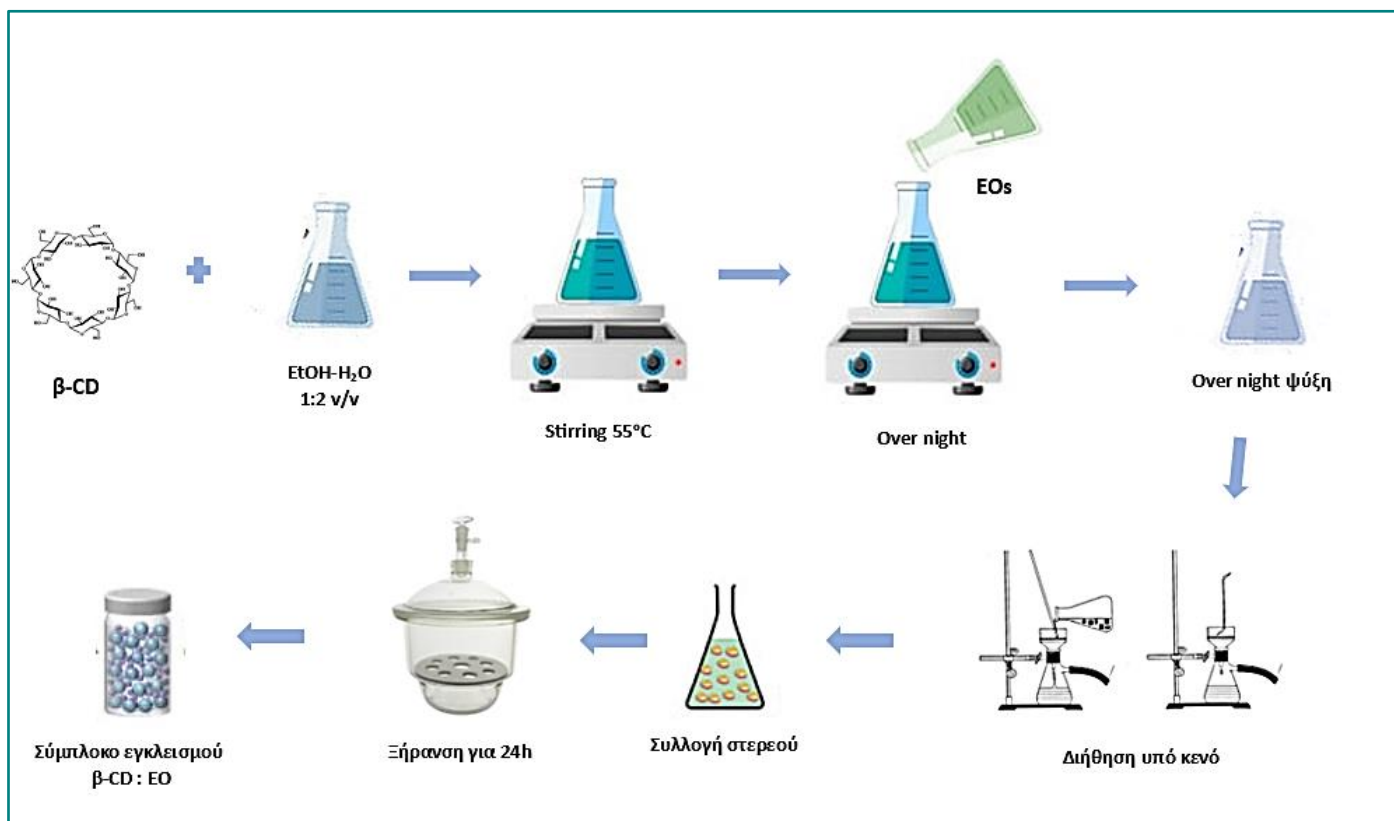
Αρχικά, ζυγίζεται ποσότητα β-κυκλοδεξτρίνης (β-cyclodextrin, β-CD) και μεταφέρεται σε σμυρισμένη σφαιρική φιάλη. Παρασκευάζεται μίγμα EtOH:H₂O, με υπερκάθαρο νερό, αναλογίας 1:2 (v/v), ώστε η συγκέντρωση της β-CD να είναι ίση με 100 mg/mL, και τοποθετείται στην σφαιρική φιάλη με την β-CD. Η β-CD και το μίγμα EtOH:H₂O αφήνονται προς ήπια ανάδευση (≈170rpm) σε ελαιόλουτρο, σε θερμοκρασία 55 °C, έως ότου το μίγμα γίνει διαυγές.

Έπειτα, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα ΕΟ, ώστε η αναλογία β-CD:ΕΟ να είναι ίση με 80:20 (w/w) και τοποθετείται στην σφαιρική φιάλη του παραπάνω μίγματος μέχρι να σχηματιστεί γαλακτώμα, δηλαδή να θολώσει το μίγμα λόγω της δημιουργίας συμπλόκου.

Πραγματοποιείται over night ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια over night ψύξη του γαλακτώματος, ώστε λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας να καθιζάνει το ίζημα. Ακολούθως, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό, με porosity No 3 και παραλαβή της στερεής μάζας (ίζημα), η οποία τοποθετείται σε προζυγισμένο vial σε ξηραντήρα με αντλία υψηλού κενού, τύπου Edwards, προς απομάκρυνση της παραμένουσας υγρασίας, για 24 h.



Εικόνα 28 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός μορίου κυκλοδεξτρίνης, με ένδειξη της υδρόφιλης εξωτερικής επιφάνειας και της υδρόφοβης κοιλότητας [52]

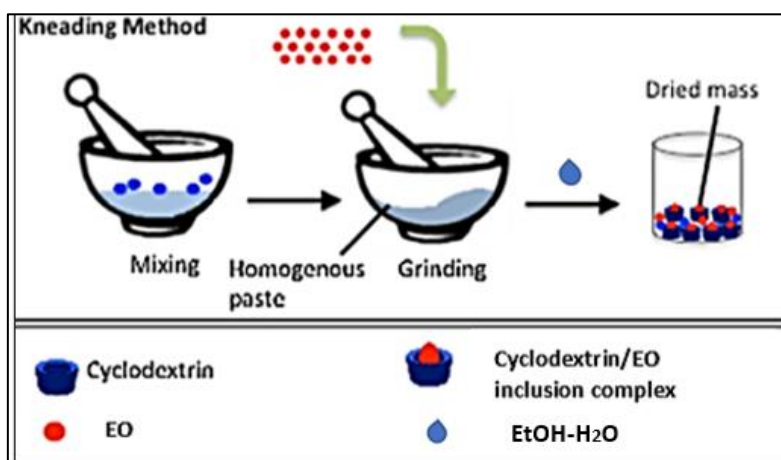


Εικόνα 29 : Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε β-κυκλοδεξτρίνη με μέθοδο συγκαταθύθισης

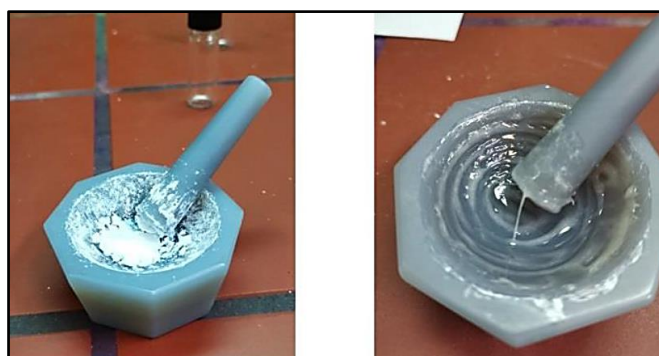
2.2.1.2 Ζύμωση/σχηματισμός πάστας (kneading)

Αρχικά, ζυγίζεται ποσότητα τροποποιημένης β-κυκλοδεξτρίνης (2-hydroxypropyl- ή methyl-) και μεταφέρεται στο γουδί. Παρασκευάζεται μίγμα EtOH:H₂O, με υπερκάθαρο νερό, αναλογίας 2:3 (v/v), ώστε η συγκέντρωση της τροποποιημένης b-CD να είναι ίση με 250 mg/mL. Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα ΕΟ σε vial, ώστε η αναλογία b-CD:ΕΟ να είναι ίση με 80:20 (w/w) και τοποθετείται και αυτή στο γουδί, προσθέτοντας μερικές σταγόνες του παραπάνω μίγματος EtOH:H₂O, προκειμένου να ληφθεί και πιθανή ποσότητα ΕΟ που έμεινε στο vial.

Στη συνέχεια, ακολουθεί λειοτρίβιση του παραπάνω μίγματος για περίπου 45min, ώστε η αρχική πάστα να γίνει σκόνη και έπειτα αυτή τοποθετείται σε ξηραντήρα με αντλία υψηλού κενού, τύπου Edwards, προς απομάκρυνση της παραμένουσας υγρασίας, για 24 h.



Εικόνα 30 : Σχηματική αναπαράσταση της διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες με μέθοδο kneading [54]



Εικόνα 31 : Σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού σε τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες

2.2.2 Εγκλωβισμός αιθερίου ελαίου σε κύτταρα ζυμομύκητα

2.2.2.1 Πλασμόλυση κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* (μαγιά αρτοποιίας)

Η πλασμόλυση των κυττάρων του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* γίνεται ώστε να αξιοποιηθεί η κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων ως φορέας εγκλεισμού. Μέσω της πλασμόλυσης, το περιεχόμενο νερό 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.

Αρχικά, ζυγίζεται ποσότητα 2g κυττάρων μαγιάς και μεταφέρεται σε συμυρισμένη σφαιρική φιάλη. Παρασκευάζεται μίγμα πλασμολύτη NaCl 10%w/v, οπότε ζυγίζονται 5 g NaCl και προστίθενται σε 50 mL υπερκάθαρο νερό και τοποθετείται στην σφαιρική φιάλη με την μαγιά, οπότε η συγκέντρωση της είναι ίση με 40 mg/mL. Με την πλήρη διαλυτοποίηση της μαγιάς στο διάλυμα NaCl, το μίγμα αποκτά μπεζ χρώμα, λόγω της πλασμόλυσης των κυττάρων ζυμομύκητα δηλαδή της εξόδου του κυτταροπλάσματος από τον πυρήνα των κυττάρων. Το διάλυμα αυτό αφήνεται προς ήπια ανάδευση (≈ 170 rpm) σε ελαιόλουτρο, σε θερμοκρασία περίπου 40 °C, για 48h και στη συνέχεια αυξάνεται η θερμοκρασία στους 85 °C και το μίγμα αφήνεται στις ίδιες συνθήκες ανάδευσης για 15 min με στόχο την απενεργοποίηση των κυττάρων.

Μετά το πέρας των 15 min, το διάλυμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα τα πλασμολυμένα κύτταρα να καθιζάνουν και έπειτα (το διάλυμα) τοποθετείται σε πλαστικά φιαλίδια προς υπερφυγοκέντρωση, με στόχο την απομάκρυνση τους.



Εικόνα 32 : Συσκευή υπερφυγοκέντρωσης SORVALL LYNX 6000

Η υπερφυγοκέντρωση (SORVALL LYNX 6000) πραγματοποιείται για 15 min, σε 15.000 rpm και θερμοκρασία 15 °C. Τα υπερκείμενα υγρά, που αποτελούνται από νερό και προϊόντα λύσης των κυττάρων, αποχύνονται και τα εναπομείναντα στερεά επαναδιασπείρονται με την ελάχιστη δυνατή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και τη βοήθεια αναδευτήρα vortex. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές, με στόχο τα υπερκείμενα υγρά να είναι όσο πιο διαυγή γίνεται.

Το στερεό που λαμβάνεται στο πέρας της φυγοκέντρωσης, επαναδιαπείρεται στην ελάχιστη δυνατή ποσότητα υπερκάθαρου νερού, τοποθετείται σε κρυσταλλωτήριο, καλύπτεται και καταψύχεται. Έπειτα, μεταφέρονται στη συσκευή λυοφιλοποίησης (Frozen in Time, Lablgo Mini) για 48 h.



Εικόνα 33 : Συσκευή λυοφιλοποίησης Lablyo Mini

Τα λυοφιλοποιημένα κύτταρα παραλαμβάνονται σε ξηρή μορφή, οπότε με ειδική σπάτουλα περισυλλέγεται η μέγιστη δυνατή ποσότητα αυτών και μεταφέρεται σε προζυγισμένα γυάλινα φιαλίδια. Τέλος, ζυγίζεται η ποσότητα των κυττάρων, προκειμένου να υπολογιστεί η απόδοση της διεργασίας (πλασμόλυσης) και στη συνέχεια φυλάσσονται στο ψυγείο.

2.2.2.2 Εγκλωβισμός αιθέριου ελαίου σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*

Για τον εγκλωβισμό ΕΟ σε κύτταρα ζυμομύκητα, χρησιμοποιούνται τα πλασμολυμένα κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae*, όπως αυτά παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία. Έτσι, απαιτείται μίγμα πλασμολυμένων κυττάρων, υπερκάθαρου νερού σε αναλογία 1:6 (w/v), ωστόσο χρησιμοποιούνται 100mg πλασμολυμένων κυττάρων και 2mL υπερκάθαρου νερού, ώστε να διαλυτοποιηθούν πλήρως και τοποθετούνται σε σμυρισμένη φιάλη. Αφήνονται προς ήπια ανάδευση (≈ 170 rpm) σε ελαιόλουτρο, έως ότου αποκτήσει θερμοκρασία 55-60 °C.

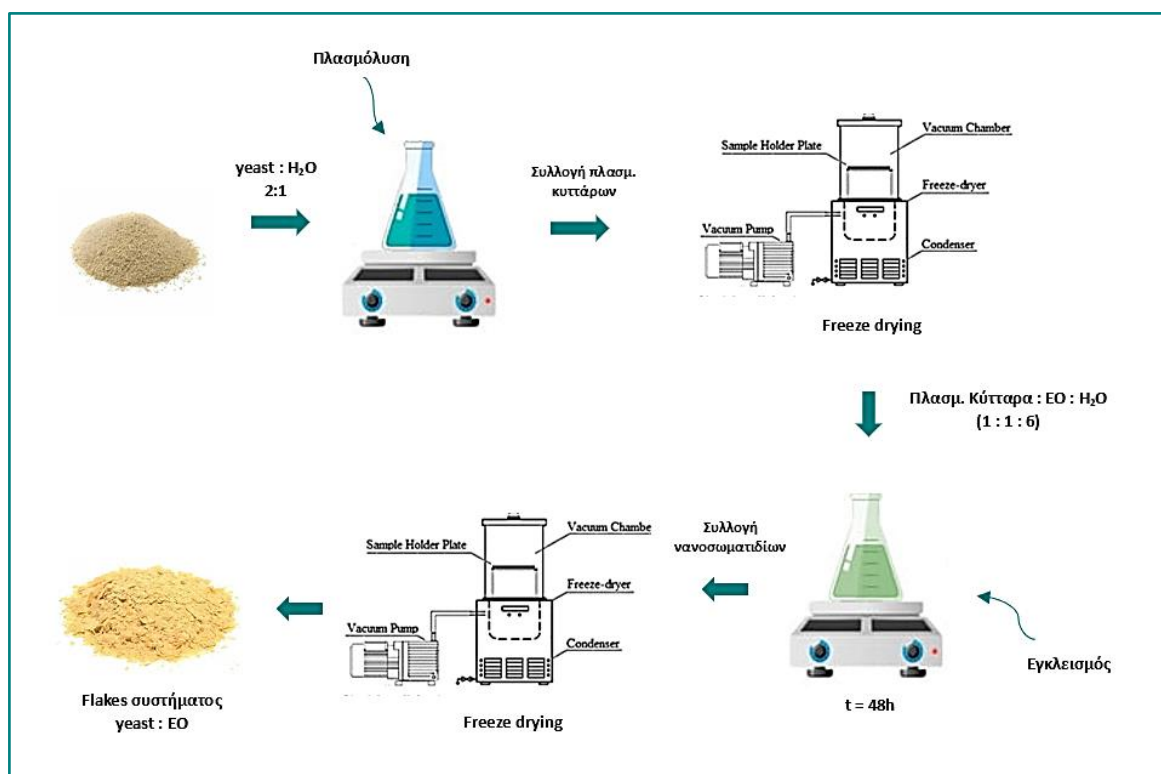
Αφού το μίγμα γίνει ομοιογενές, προστίθεται το ΕΟ στάγδην, το οποίο βρίσκεται σε αναλογία 1:1 (w/w) με τα πλασμολυμένα κύτταρα. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται ανάδευση του ελαιώδους μίγματος, στις ίδιες συνθήκες για 48 h.

Μετά το πέρας της ανάδευσης, το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να ψυχθεί μερικώς και μεταφέρεται σε πλαστικά φιαλίδια προς υπερφυγοκέντρωση.

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

Το στερεό που λαμβάνεται στο πέρας της φυγοκέντρωσης, επαναδιαπείρεται στην ελάχιστη ποσότητα υπερκάθαρου νερού, τοποθετείται σε κρυσταλλωτήριο, καλύπτεται και

καταψύχεται. Τέλος, γίνεται η λυοφιλοποίηση τους για 48 h και το σύστημα παραλαμβάνεται σε ξηρή μορφή για τους περαιτέρω χαρακτηρισμούς.



Εικόνα 34 : Σχηματική αναπαράσταση συνολικής διεργασίας εγκλεισμού αιθερίων ελαίων σε κύτταρα ζυμομύκητα

2.3 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%). Η απόδοση εγκλεισμού (EE) ορίζεται ως το ποσοστό του ΕΟ που “παγιδεύεται” επιτυχώς εντός του φορέα, έναντι της ποσότητας ΕΟ που εισήχθη στην αρχή της διαδικασίας. [55]

Στην άμεση απόδοση εγκλεισμού, μετράται η ποσότητα αιθερίου ελαίου που έχει εγκλειστεί στο σύστημα μέσω αποδέσμευσης 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, 10 mg συστήματος εγκλεισμού διασπείρονται σε 10 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 φασματοόμετρο μάζας (GC-MS). Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα που έχουν ως φορέα την β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της.

Ο έμμεσος τρόπος υπολογισμού της απόδοσης εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε μέσω ποσοτικοποίησης της συγκέντρωσης αιθερίου ελαίου στα υπερκείμενα υγρά των δειγμάτων, που έχουν ως φορέα εγκλεισμού κύτταρα *S. cerevisiae*, μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματόμετρο μάζας (GC-MS). Ειδικότερα, αφού ογκομετρηθούν τα υπερκείμενα υγρά, λαμβάνεται ποσότητα από αυτά και αναμιγνύεται με κατάλληλη ποσότητα εξανίου (αναλογία 1 : 1), όπου ύστερα από ανάδευση μέσω ρόφησης/εκρόφησης, αφήνεται σε ηρεμία. Έτσι, εμφανίζονται δύο φάσεις, ενώ συγχρόνως η ποσότητα του αιθερίου ελαίου περνάει από την υδατική φάση σε αυτή του εξανίου (οργανική), η οποία και συλλέγεται. Τέλος, προστίθεται στο παραπάνω διάλυμα μερικοί κόκκοι ξηραντικού μέσου Na_2SO_4 , λαμβάνεται ποσότητα 10μL αυτού και αραιώνεται σε τελικό όγκο 100μL με εξάνιο υψηλής καθαρότητας, ώστε να ακολουθήσει έγχυση στο GC-MS.

Και οι δυο περιπτώσεις ποσοτικοποίησης του εκάστοτε αιθερίου ελαίου και συγκεκριμένα των συστατικών του, έγιναν 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.

2.4 Απόδοση διεργασίας (εγκλεισμού) (EY)

Η απόδοση διεργασίας (EY) ορίζεται ως το ποσοστό των συμπλόκων που παράγονται σε σχέση με το συνολικό βάρος των υλικών που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία. Για τον υπολογισμό της απόδοσης διεργασίας εγκλεισμού στο εκάστοτε σύστημα λαμβάνονται οι παρακάτω εξισώσεις :

- Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε κυκλοδεξτρίνη

$$\text{Απόδοση } \beta\text{-CD} : EO = \frac{\text{μάζα ανακτώμενων νανοσωματιδίων}}{\text{μάζα CD} + \text{μάζα EO}} * 100\%$$

- Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*

$$\text{Απόδοση } S.cerevisiae : EO = \frac{\text{μάζα ανακτώμενων κυττάρων ζυμομυκήτων}}{\text{μάζα πλασμολυμένων κυττάρων } S.cerevisiae + \text{μάζα EO}} * 100\%$$

2.5 Ανάλυση χημικής σύστασης αιθέριων ελαίων GC-MS

Για την ανάλυση της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματόμετρο μάζας.

Αρχικά, για την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση, γίνεται ανάμιξη του συστήματος εγκλεισμού ΕΟ-CD με εξάνιο υψηλής καθαρότητας, ώστε η τελική συγκέντρωση του μίγματος να είναι ίση με 1 mg/mL. Τίθενται προς ανάδευση και έπειτα γίνεται διήθηση με φίλτρο 0.22μm.

Στη συνέχεια, εγχύθηκε 1 μL προκύπτοντος δείγματος, διαλυμένο σε 1 μL 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

φέρων 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. Για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε Mass Spectrometer Varian 220-MS με παγίδα ιόντων (Ion Trap).



Εικόνα 35 : Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματόμετρο μάζας, Mass Spectrometer Varian 220-MS

2.6 Χαρακτηρισμός παραγόμενων νανοσωματιδίων

2.6.1 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, 5 mg δείγματος διασπείρονται σε 20 mL υπερκάθαρο νερό και ακολουθούν υπέρηχοι για 15 min, προκειμένου να «σπάσουν» τυχόν συσσωματώματα που υπήρχαν στα δείγματα διασποράς νανοσωματιδίων. Το προκύπτον μίγμα αναδεύεται για 2min σε αναδευτήρα τύπου Vortex, για να δημιουργηθεί ομοιόμορφη διασπορά. Σε περίπτωση μεγαλύτερου μεγέθους νανοσωματιδίων συμπλόκων, τα δείγματα διέρχονται από ειδικό φίλτρο, ώστε να συγκρατηθούν αυτά και να μην περάσουν στην κυψελίδα.

Έπειτα, λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα από την διασπορά και τοποθετείται με χρήση σύριγγας στην κυψελίδα τύπου Y (DTS1070), ώστε να καλυφθούν πλήρως τα ηλεκτρόδια της κυψελίδας, και εισάγεται στο όργανο σε θερμοκρασία 25 °C. Με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού λαμβάνονται τρεις μετρήσεις για την υδροδυναμική διάμετρο, τρεις για τον δείκτη πολυδιασποράς και τρεις για το ζ-δυναμικό, από τις οποίες τελικά λαμβάνεται ο μέσος όρος.



Εικόνα 36 : Συσκευή DLS, ZetaSizer Nano ZS



Εικόνα 37 : Κυψελίδα τύπου Y (DTS1070)

2.6.2 Μελέτη δομής μέσω Φασματομετρίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Ο σχηματισμός των συμπλόκων εγκλεισμού μπορεί να αποδειχθεί μέσω της χρήσης φασματοσκοπίας υπερύθρου. Πιο αναλυτικά, αρχικά λαμβάνονται τα φάσματα απορρόφησης FT-IR της κυκλοδεξτρίνης, του αιθέριου ελαίου και των συμπλόκων εγκλεισμού. Τα φάσματα αυτά συγκρίνονται μεταξύ τους, παρατηρώντας το συνδυασμό και την ύπαρξη μετατοπισμένων κορυφών στο φάσμα του συμπλόκου, οι οποίες οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΕΟ και β-κυκλοδεξτρίνης. Έτσι, υπάρχει μια πρώτη ένδειξη αναφορικά με το σχηματισμό συμπλόκων.



Εικόνα 38 : Συσκευή Bruker Alpha II για τη λήψη φασμάτων FT-IR

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

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

2.6.3 Αποδέσμευση αιθερίου ελαίου από το σύστημα εγκλεισμού (Release)

Για την μελέτη αποδέσμευσης 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 7.43.

Το pH ρυθμίζεται περίπου στο 7.4 προκειμένου να προσομοιάζει το φυσιολογικό pH για εφαρμογή της διασποράς των συστημάτων εγκλεισμού ως εντομοκτόνα. Στην συνέχεια, ζυγίζονται κατάλληλες ποσότητες ξηρής μάζας συστήματος εγκλεισμού (Πίνακας 8) και διασπείρονται στην παραπάνω υδατική φάση.

Πίνακας 8 : Ξηρή μάζα συστημάτων εγκλεισμού

Δείγμα	Ξηρή μάζα συστήματος εγκλεισμού (g)
XD1	0.1031
XD3	0.1059
XD4	0.1021
XD5	0.0772

Η διασπορά τοποθετείται προς ήπια ανάδευση, 250 rpm, σε θερμοκρασία 37 °C. Οι συνθήκες επιλέγονται έτσι ώστε να προσομοιάζουν το περιβάλλον εφαρμογής. Σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνεται ποσότητα 1 mL από την διασπορά και η κάθε μία τοποθετείται σε Eppendorf tubes. Με κάθε παραλαβή δείγματος, προστίθεται αντίστοιχη ποσότητα buffer, ώστε να διατηρείται σταθερός ο όγκος του διαλύματος.



Εικόνα 39 : Πειραματική διάταξη για την αποδέσμευση αιθερίου ελαίου από το σύστημα εγκλεισμού

Το κάθε δείγμα από τα Eppendorf tubes τοποθετείται σε vial, αφού φιλτραριστεί και σε αυτό προστίθεται 1mL, εξάνιο υψηλής καθαρότητας. Αναδεύεται και έπειτα αφήνεται σε ηρεμία προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Λαμβάνεται μόνο η υπερκείμενη φάση (ελαιώδη) με τη βοήθεια πιπέτας (200μL) και ακολουθεί μέτρηση του αποδεσμευμένου ΕΟ

στο εξάνιο συναρτήσει του χρόνου, σε GC-MS. Έτσι, με τα προκύπτοντα δεδομένα, σχεδιάζεται το διάγραμμα ποσοστιαίου ρυθμού αποδέσμευσης, καθώς και τα διαγράμματα των κινητικών μοντέλων αποδέσμευσης.

2.6.4 Αξιολόγηση αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης με AAPH των ελαίων και των συμπλόκων αυτών με τη β -CD και τις τροποποιημένες μορφές της : Αναστολή της επαγόμενης οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος από 2,2'-Azobis(2-αμιδινοπροπάνιο) διυδροχλωρικό (AAPH)

Η επαγόμενη οξείδωση του λινελαϊκού οξέος από την AAPH, αποτελεί ένα γρήγορο και αξιόπιστο τρόπο προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης. Βασίζεται στην αναστολή της οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος, που ξεκινά από τον παραγωγό υπεροξειδίων αυτού, διυδροχλωρικό 2,2'-αζοβισ(2-αμιδινοπροπάνιο) (AAPH), παρέχοντας ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας προστασίας *in vitro* των λιπιδίων από τα αντιοξειδωτικά, όσον αφορά την οξείδωση τους.

Έτσι, εξετάζεται και αξιολογείται η αντιοξειδωτική δράση του αιθερίου ελαίου φλισκουιού (*Mentha Pulegium*).

Η οξείδωση του λινελαϊκού οξέος από το AAPH ακολουθείται από φασματοφωτομετρία UV στα 234 nm, δηλαδή στο μήκος κύματος που απορροφούν τα παραγόμενα υπεροξειδία λινελαϊκού οξέος. Ειδικότερα :

Αρχικά, μετράται η απορρόφηση των χρησιμοποιούμενων διαλυτών (baseline), καθώς και του AAPH η οποία στην συνέχεια θα αφαιρεθεί από τις ληφθείσες μετρήσεις. Έπειτα, μετράται η απορρόφηση των παραγόμενων υπεροξειδίων από το AAPH για την περίπτωση απουσίας αντιοξειδωτικού, οπότε 14 μ L του διαλύματος λινελαϊκού νατρίου προστίθενται στην κυψελίδα UV μαζί με 1.32 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, 14 μ L νερού, 14 μ L εξανίου. Η αντίδραση οξείδωσης ξεκινά στους 37 °C υπό αέρα με την προσθήκη 70 μ L ενός διαλύματος AAPH, το οποίο χρησιμοποιείται ως εκκινητής ελεύθερων ριζών και παρακολουθείται στα 234 nm. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τον ίδιο όγκο διαλύματος αιθερίου ελαίου σε εξάνιο, καθώς και για τα σύμπλοκα, συγκέντρωσης 1mg/mL (αντί εξανίου), για το προσδιορισμό της απορρόφησης των παραγόμενων υπεροξειδίων από το AAPH για την περίπτωση παρουσίας αντιοξειδωτικού.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % Αναστολή της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος.



Εικόνα 40 : Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, JASCO V-770

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γενικά στον εγκλωβισμό, η ιδέα του ποσοτικού προσδιορισμού του ΕΟ κατά τη διαδικασία αυτού είναι 1) ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλεισμού και άλλων παραμέτρων αυτού, 2) η εκτέλεση μιας μελέτης ελεγχόμενης αποδέσμευσης και κατανόησης της κινητικής της, καθώς και 3) η αξιολόγηση της σταθερότητας των συμπλόκων με βάση το πόσο έλαιο έχει απομείνει στις κάψουλες ή πόσο έλαιο αποδεσμεύεται στους φορείς και εξακολουθεί να προσκολλάται στην επιφάνεια. Εκτός αυτού, είναι σημαντικό να προσδιοριστούν ακριβώς τα συστατικά που εγκλείονται με επιτυχία και είναι υπεύθυνα για τη βιολογική λειτουργία των ΕOs. Αυτά τα στοιχεία ή οι τύποι ΕOs θα έχουν επιπτώσεις στις παραμέτρους αξιολόγησης του εγκλεισμού. [32]

3.1 Ανάλυση χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων GC-MS

Mentha Pulegium (MP4a)

Τα 4 συστατικά που αποτελούσαν το 92.4% του συνόλου βάρους του αιθέριου ελαίου αναλύθηκαν και τακτοποιήθηκαν. Η απόδοση της εκχύλισης για το ληφθέν (φύλλα και στελέχη) δείγμα ήταν $1.19\% \pm 0.001$ v/w.

Η ανάλυση της χημικής σύστασης του αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium (MP4a)* υποδεικνύει ότι τα κύρια συστατικά του, με βάση την περιεκτικότητά του σε αυτά, είναι τα : Πουλεγόνη, Ισομενθόνη, δ-λιμονένιο, Πιπεριτενόνη. Οι χρόνοι ανάσχεσης και η ποσοστιαία περιεκτικότητα αυτών απεικονίζονται στο παρακάτω πίνακα. Τα αποτελέσματα διασταυρώνονται τόσο από την βιβλιογραφία όσο και από την βιβλιοθήκη του οργάνου συζευγμένης χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται.

Πίνακας 9 : Ανάλυση χημικής σύστασης αιθέριου ελαίου MP4a

Χημική Ένωση		Rt (min)	Ποσοστό %
δ-λιμονένιο	d-limonene	15.32	4.00
Ισομενθόνη	Isomenthone	22.40	17.00
Πουλεγόνη	Pulegone	25.88	68.60
Πιπεριτενόνη	Piperitenone	28.70	2.80

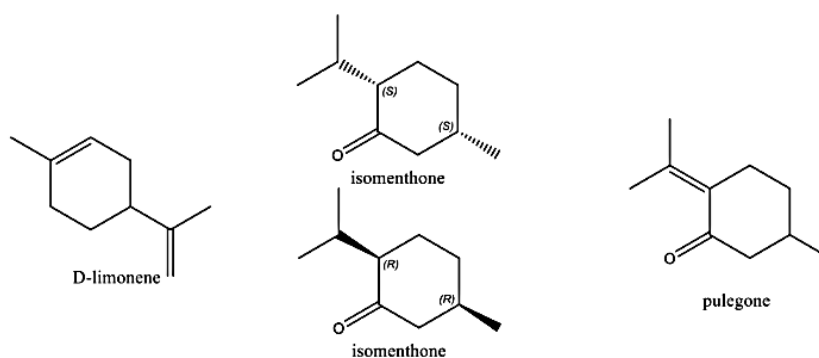
Mentha Pulegium (MP5a)

Τα συστατικά με περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 1% στη σύσταση του αιθέριου ελαίου και που αποτελούν το 96.61% του συνόλου βάρους του αιθέριου ελαίου, αναλύθηκαν και τακτοποιήθηκαν. Η απόδοση της εκχύλισης για το ληφθέν (φύλλα και στελέχη) δείγμα ήταν $2.30\% \pm 0.001$ v/w.

Η ανάλυση της χημικής σύστασης του αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium (MP5a)* υποδεικνύει ότι τα κύρια συστατικά του, με βάση την περιεκτικότητά του σε αυτά, είναι τα : Πουλεγόνη, Ισομενθόνη, δ-λεμονένιο, Πιπεριτενόνη. Οι χρόνοι ανάσχεσης και η ποσοστιαία περιεκτικότητα των συστατικών του απεικονίζεται στο παρακάτω πίνακα. Τα αποτελέσματα διασταυρώνονται τόσο από την βιβλιογραφία όσο και από την βιβλιοθήκη του οργάνου συζευγμένης χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται.

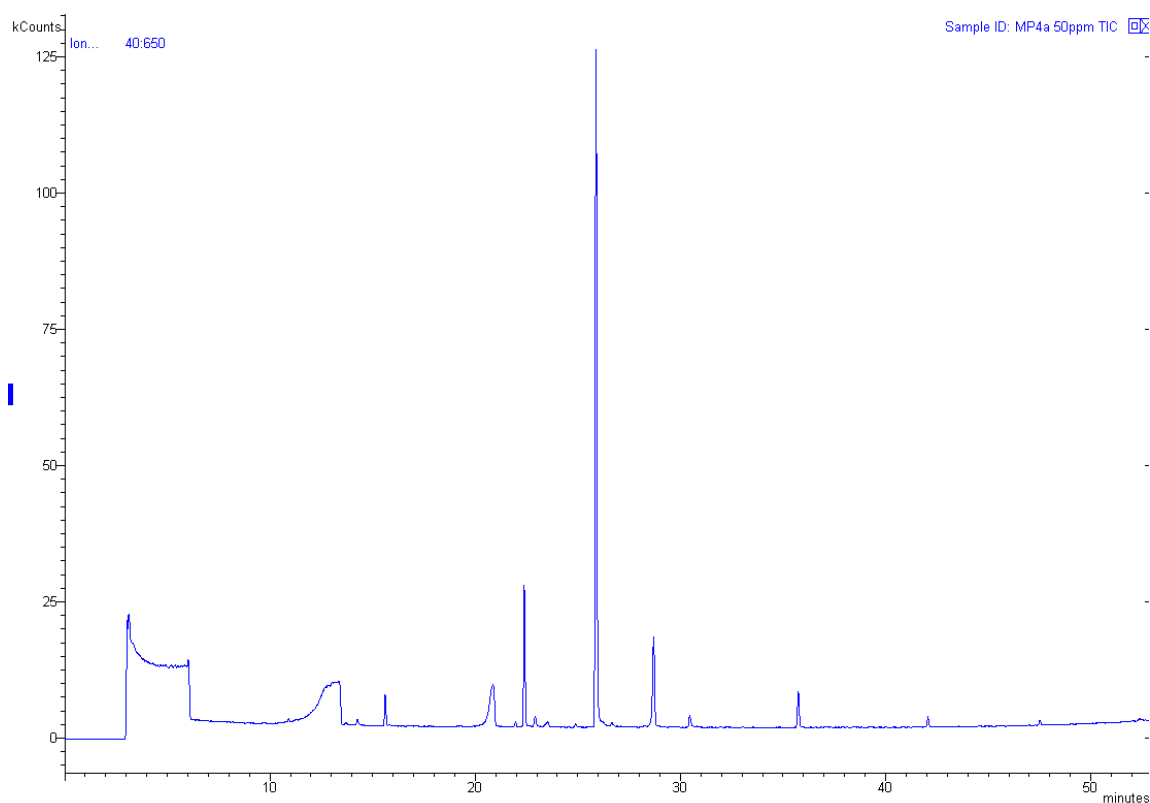
Πίνακας 10 : Ανάλυση χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου MP5a

Χημική Ένωση		Rt (min)	Ποσοστό %
3-οκτανόλη	3-octanol	14.22	1.82
δ-λιμονένιο	d-limonene	15.45	4.46
Ισομενθόνη	Isomenthone	22.37	17.47
Ισοπουλεγόνη	Isopulegone	23.61	1.45
Πουλεγόνη	Pulegone	25.91	69.60
Πυπεριτενόνη	Piperitenone	28.57	1.81

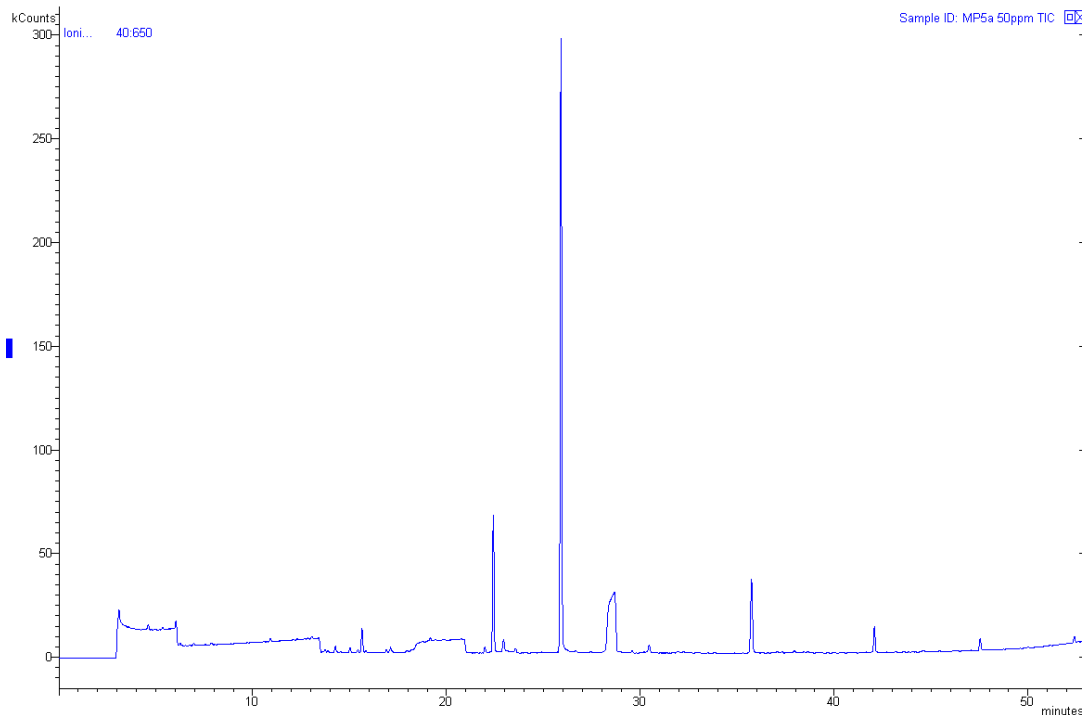


Εικόνα 41 : Δομή κύριων συστατικών του *Mentha Pulegium*

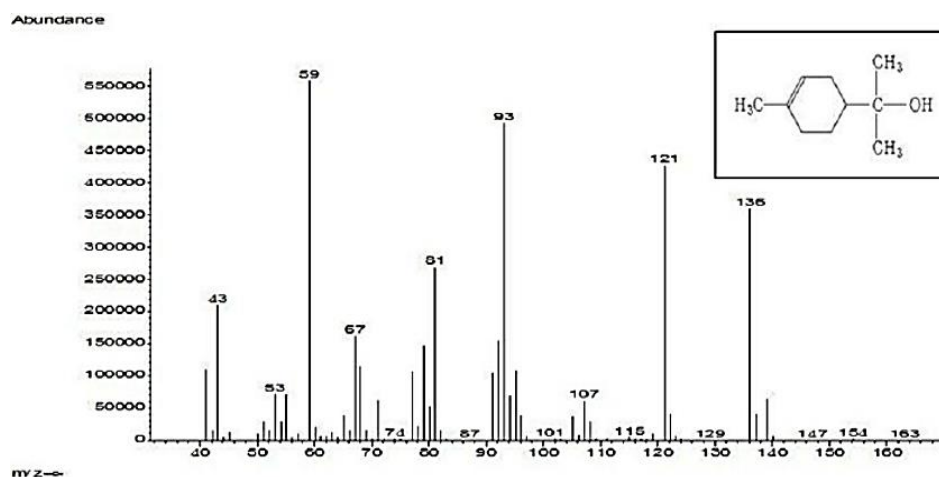
Παρακάτω δίνονται τα φάσματα του GC για τα αιθέρια έλαια του φλισκουιού, *MP4a*, *MP5a*, καθώς και το φάσμα MS του κυριότερου συστατικού του, δηλαδή της πουλεγόνης.



Εικόνα 42 : Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium* (*MP4a*)



Εικόνα 43 : Φάσμα GC του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium* (MP5a)



Εικόνα 44 : Φάσμα MS της πουλεγιόνης

3.2 Απόδοση πλασμόλυσης κυττάρων ζυμομυκήτων

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης πλασμόλυσης, χρησιμοποιείται η παρακάτω εξίσωση :

$$\text{Απόδοση πλασμόλυσης} = \frac{\text{μάζα ανακτώμενων πλασμολυμένων κυττάρων ζυμομυκήτων}}{\text{αρχική μάζα κυττάρων ζυμομυκήτων}} * 100\%$$

Επομένως, με πλασμολύτη NaCl 10%, ισχύουν τα εξής :

Πίνακας 11 : Απόδοση πλασμόλυσης των κυττάρων ζυμομυκήτων

Αρχική μάζα κυττάρων (mg)	Μάζα ανακτώμενων κυττάρων (mg)	Απόδοση πλασμόλυσης
2000	1040	52%

3.3 Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού

Παρακάτω παρουσιάζονται σε Πίνακες ξεχωριστά οι αποδόσεις διεργασίας για κάθε σύστημα του εκάστοτε αιθερίου ελαίου, όπως υπολογίστηκαν βάσει των προαναφερθεισών εξισώσεων.

Mentha Pulegium (MP4a)

Πίνακας 12 : Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου MP4a

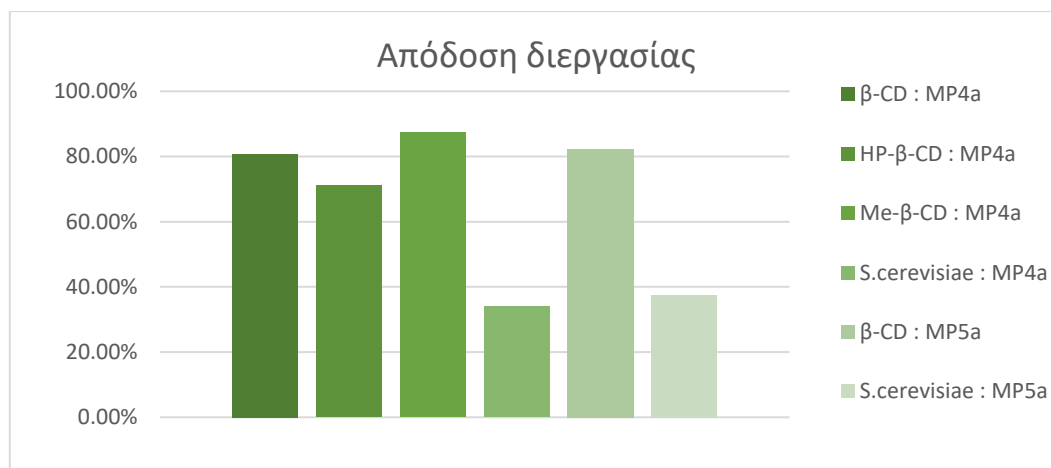
Σύστημα εγκλεισμού	Μάζα CD (mg)	Μάζα <i>S.cerevisiae</i> (mg)	Μάζα ΕΟ (mg)	Απόδοση διεργασίας
<i>β</i> -CD : MP4a	500	-	125	80.8%
HP- <i>β</i> -CD : MP4a	500	-	125	71.1%
Me- <i>β</i> -CD : MP4a	500	-	125	87.4%
<i>S.cerevisiae</i> : MP4a	-	100	100	33.9%

Mentha Pulegium (MP5a)

Πίνακας 13 : Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου MP5a

Σύστημα εγκλεισμού	Μάζα CD (mg)	Μάζα <i>S.cerevisiae</i> (mg)	Μάζα ΕΟ (mg)	Απόδοση διεργασίας
<i>β</i> -CD : MP5a	3200	-	800	82.4%
<i>S.cerevisiae</i> : MP5a	-	100	100	37.6%

Το παρακάτω Διάγραμμα απεικονίζει τις αποδόσεις διεργασίας για όλα τα συστήματα :



Διάγραμμα 2 : Απόδοση διεργασίας όλων των συστημάτων εγκλεισμού

Τα ποσοστά ανάκτησης συμπλόκων εγκλεισμού/Απόδοση διεργασίας με τη β-CD είναι αρκετά υψηλά, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην αρχική υψηλή αναλογία β-κυκλοδεξτρίνης-αιθέριου ελαίου. Η μεγαλύτερη ποσότητα ανακτώμενου συμπλόκου, όπως και το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης επετεύχθη στην περίπτωση του συστήματος *Me-β-CD : MP4a*, λόγω της αύξησης της υδατοδιαλυτότητας του αιθέριου ελαίου.

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

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα (Πίνακες 12-13, Διάγραμμα 2), διαπιστώνεται πως οι αποδόσεις που επιτυγχάνονται στα συστήματα εγκλεισμού που έχουν ως φορέα την β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της, είναι πολύ υψηλότερες (πάνω από διπλάσιες) σε σχέση με τα συστήματα με φορέα εγκλεισμού τα κύτταρα ζυμομύκητα. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στα περισσότερα στάδια και απαιτούμενο εξοπλισμό του τελευταίου, άρα και περισσότερες απώλειες, λόγω της απαιτούμενης πειραματικής διαδικασίας για την δημιουργία-προετοιμασία των κυττάρων ζυμομύκητα.

3.4 Απόδοση εγκλεισμού (EE%)

Όπως προαναφέρθηκε, στην απόδοση εγκλεισμού υπολογίζεται το ποσοστό του ΕΟ που “παγιδεύεται” επιτυχώς εντός του φορέα, έναντι του ΕΟ που εισήχθη στην αρχή της διαδικασίας. Επομένως, η απόδοση εγκλεισμού (EE) ορίζεται ως :

$$\text{Άμεση απόδοση : Direct EE\%} = \frac{\text{μάζα ΕΟ που εγκλείστηκε}}{\text{αρχική μάζα ΕΟ}} * 100\%$$

$$\text{Έμμεση απόδοση : Indirect EE\%} = \frac{\text{αρχική μάζα ΕΟ} - \text{μάζα ΕΟ που δεν εγκλείστηκε}}{\text{αρχική μάζα ΕΟ}} * 100\%$$

Επιπλέον, για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού, κατασκευάζεται πρώτα η καμπύλη αναφοράς των κύριων συστατικών κάθε αιθέριου ελαίου μέσω GC-MS (Παράρτημα).

Συνεπώς, η συγκέντρωση του ΕΟ *Mentha Pulegium* στα νανοσωματίδια, υπολογίζεται από τις εξισώσεις που φαίνονται στο Πίνακα :

Πίνακας 14 : Εξισώσεις αναφοράς των κύριων συστατικών του *Mentha Pulegium*

	<i>MP4a</i>	<i>MP5a</i>
Ισομενθόνη	$y=3910.6x-1415.7$	$y=5590.6x+54969$
Πουλεγόννη	$y=21514x-51068$	$y=27989x+140667$

Με αυτό το τρόπο, ποσοτικοποιείται η ζητούμενη ποσότητα αιθερίου ελαίου σε κάθε σύστημα και υπολογίζονται οι αντίστοιχες αποδόσεις, όπως παρουσιάζονται στους Πίνακες.

Mentha Pulegium (MP4a)

Πίνακας 15 : Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium* (MP4a)

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που εγκλείστηκε (mg)	Άμεση Απόδοση εγκλεισμού
<i>β-CD : MP4a</i>	125	103.02	82.42%
<i>HP-β-CD : MP4a</i>	125	90.43	72.34%
<i>Me-β-CD : MP4a</i>	125	123.11	98.48%

Mentha Pulegium (MP5a)

Πίνακας 16 : Άμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium* (MP5a)

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που εγκλείστηκε (mg)	Άμεση Απόδοση εγκλεισμού
<i>β-CD : MP5a</i>	800	456.18	57.02%

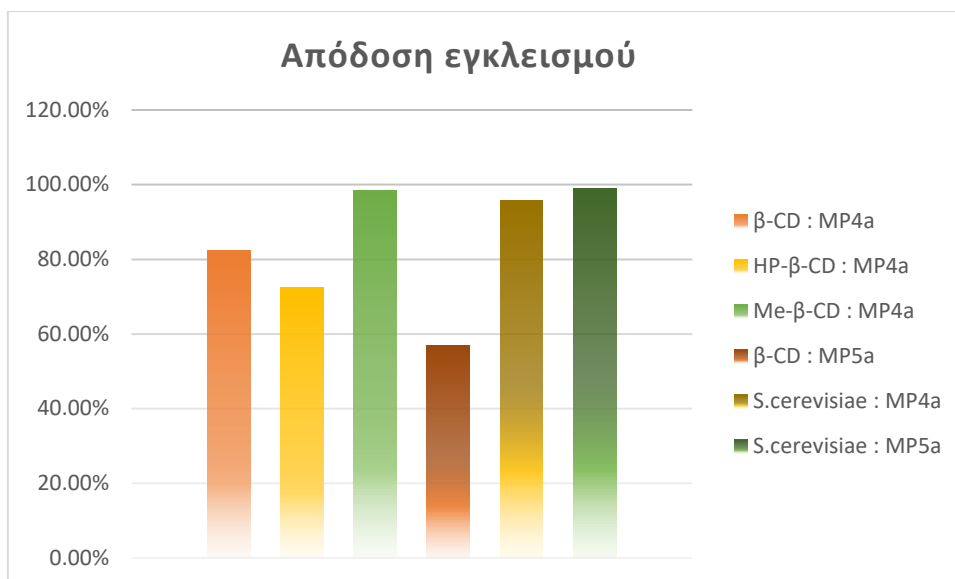
Είναι έκδηλο, λοιπόν, ότι το ποσοστό της ποσότητας του ελαίου MP4a που εγκλείστηκε σχηματίζοντας σύμπλοκο με την β-κυκλοδεξτρίνη σε κάθε περίπτωση, είναι υψηλό, ενώ στη περίπτωση του MP5a το αντίστοιχο ποσοστό είναι χαμηλό. Ωστόσο, και στα δύο έλαια διαπιστώνεται ότι η ισομενθόνη εμφανίζει υψηλότερη 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. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι τεχνικές παρασκευής συμπλόκων εγκλεισμού, καθώς κι άλλοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα εγκλεισμού.

Πίνακας 17 : Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium* (MP4a)

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που δεν εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού
<i>S.cerevisiae : MP4a</i>	100	4.27	95.73%

Πίνακας 18 : Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου *Mentha Pulegium* (MP5a)

Σύστημα Εγκλεισμού	Αρχική μάζα ΕΟ (mg)	Μάζα ΕΟ που δεν εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού
<i>S.cerevisiae : MP5a</i>	100	1.01	98.99%



Διάγραμμα 3 : Απόδοση εγκλεισμού όλων των συστημάτων

Από τους Πίνακες 15-18, 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 και την 2-hydroxypropyl-β-κυκλοδεξτρίνη. Ωστόσο, οι αποδόσεις αυτές είναι ίδιας τάξης μεγέθους με τη περίπτωση της methyl-β-κυκλοδεξτρίνης.

Μάλιστα, στην περίπτωση χρήσης ως φορέα εγκλεισμού τον ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, διαπιστώθηκε ότι η πουλεγόνη παρουσιάζει υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού σε σχέση με τα άλλα συστατικά του αιθερίου ελαίου, δηλαδή εμφανίζει υψηλότερη αλληλεπίδραση με τα κύτταρα ζυμομύκητα από ότι με τα μόρια της β-κυκλοδεξτρίνης. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στην χημική δομή και στις φυσικοχημικές ιδιότητες της, καθώς και στον τύπο αλληλεπίδρασής της με τον φορέα β-CD. Με όμοιο τρόπο ερμηνεύεται και η διαφορετική συγκράτηση των διαφορετικών κύριων συστατικών στην β-CD και στις τροποποιημένες μορφές της.

Έτσι, διαπιστώνεται ότι η ισομενθόνη έχει υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού στη περίπτωση της β-CD και των τροποποιημένων μορφών της, ενώ η πουλεγόνη στα κύτταρα ζυμομύκητα. Αυτό συμβαίνει καθώς η ισομενθόνη έχει αρωματικό χαρακτήρα, ενώ η πουλεγόνη έχει αυξημένη λιποφιλία και είναι αδιάλυτη σε υδρόφιλο περιβάλλον, σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά.

Τέλος, όποιες άλλες διαφορές στις αποδόσεις εγκλεισμού των δύο ελαίων, ίσως οφείλονται και στα δευτερεύοντα συστατικά τα οποία δεν εξετάζονται περαιτέρω.

3.5 Μέγεθος και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) αποτελεί μέτρο της ομοιομορφίας του μεγέθους των σωματιδίων και πρέπει να λαμβάνει τιμές μικρότερες από 0.5 ώστε το σύστημα εγκλεισμού να θεωρείται αποδεκτό. [60]

Το ζ-δυναμικό υποδεικνύει το φορτίο στην επιφάνεια των νανοφορέων, επομένως λόγω της παρουσίας των -OH στην επιφάνεια των συμπλόκων κυκλοδεξτρινών, αναμένεται αρνητική

τιμή ζ-δυναμικού. Ένα υψηλό ζ-δυναμικό υποδεικνύει μια ισχυρή απωθητική ηλεκτρική δύναμη, η οποία αποτρέπει τη σύντηξη δύο σταγονιδίων, οδηγώντας σε ένα σταθερότερο νανοσύστημα. Διασπορές με ζ-δυναμικό μεγαλύτερο από +30 mV ή -30 mV, θεωρούνται σταθερές. [60]

Η μέτρηση των τιμών υδροδυναμικής διαμέτρου των συστημάτων εγκλεισμού, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού πραγματοποιείται μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS, ZetaSizer Nano ZS), όπου με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού λαμβάνονται τρεις μετρήσεις για κάθε ένα από τα μεγέθη, από τις οποίες τελικά λαμβάνεται ο μέσος όρος. Οι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων αυτών και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις παρουσιάζονται στους Πίνακες.

Mentha Pulegium (MP4a)

Πίνακας 19 : Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστημάτων εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο MP4a

Σύστημα εγκλεισμού	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
<i>β-CD : MP4a</i>	465.0±0.3	0.473±0.032	-14.4±1.8
<i>HP-β-CD : MP4a</i>	400.7±3.7	0.380±0.010	-21.9±0.8
<i>Me-β-CD : MP4a</i>	311.4±1.8	0.369±0.040	-11.7±0.6

Mentha Pulegium (MP5a)

Πίνακας 20 : Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό συστήματος εγκλεισμού με αιθέριο έλαιο MP5a

Σύστημα εγκλεισμού	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
<i>β-CD : MP5a</i>	445.6±5.9	0.416±0.042	-12±1.2

Όπως παρατηρείται, τα νανοσωματίδια με φορέα εγκλεισμού την β-κυκλοδεξτρίνη εμφανίζουν μέση υδροδυναμική διάμετρο στο εύρος 311.4±1.8 nm – 465.0±0.3 nm με τιμές PDI να κυμαίνονται από 0.369±0.040 – 0.473±0.032, υποδηλώνοντας μέτρια ομοιομορφία της πολυδιασποράς.

Το εύρος τιμών ζ-δυναμικού για τα συστήματα εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium*, είναι -21.9±0.8 - -11.7±0.6. Την υψηλότερη κατ'απόλυτη τιμή ζ – δυναμικού παρουσίασε το σύστημα *HP-β-CD : MP4a*, υποδηλώνοντας σχετικά σταθερή διασπορά των νανοσωματιδίων. Αντίθετα, στα υπόλοιπα συστήματα παρουσιάζεται μέτρια σταθερότητα προς αστάθεια, παρουσιάζοντας υψηλή τάση προς συσσωμάτωση.

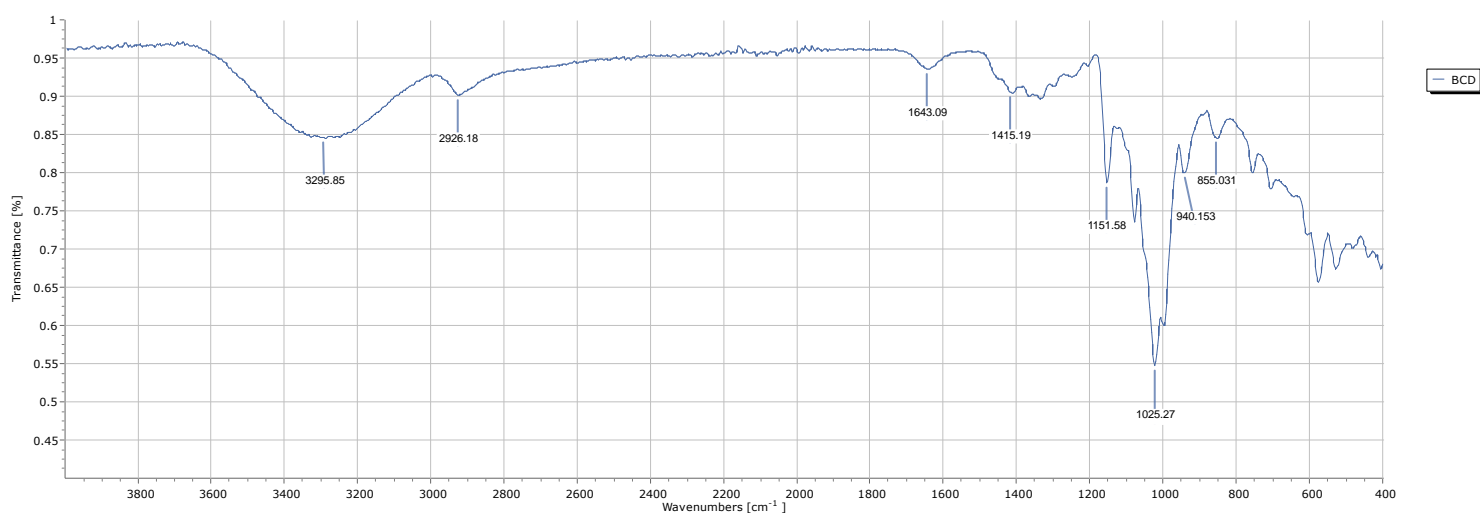
Η μεταβλητότητα στο PDI θα μπορούσε να οφείλεται στην τάση των συμπλόκων εγκλεισμού β-CD να συσσωματώνονται. Η ισχυρή τάση για συσσωμάτωση είναι συνέπεια της αυτοσυναρμολόγησης της β-CD στο νερό λόγω της έλλειψης σημαντικού καθαρού φορτίου στα σύμπλοκα εγκλεισμού, επομένως δεν υπάρχουν απωστικές δυνάμεις για την πρόληψη της συσσωμάτωσης τους[63].

Επιπλέον, στην κατανομή μεγέθους των σωματιδίων των λιποσωμάτων έχει παρατηρηθεί και η εμφάνιση κάποιων επιπλέον κορυφών που αντιστοιχούν σε σωματίδια μικρότερου μεγέθους. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο φαινόμενο πολλαπλής σκέδασης (multiple scattering) κατά το οποίο φωτόνια που είναι διασκορπισμένα από την προς ανάλυση ουσία επανασκεδάζονται από γειτονικά σωματίδια πριν φθάσουν στον ανιχνευτή οργάνων. Για την αποφυγή αυτού του φαινομένου απαιτείται περαιτέρω αραίωση των δειγμάτων.

3.6 Μελέτη δομής μέσω Φασματομετρίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR) είναι μια μορφή φασματοσκοπίας που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ως ποσοτική αναλυτική μέθοδος και επίσης ως εργαλείο για τον προσδιορισμό των μηχανισμών σύνδεσης σε στερεά και σε επιφάνειες. Οι μοριακές δονήσεις (τάσης και κάμψης ή παραμόρφωσης) μπορούν να σχετίζονται άμεσα με τη συμμετρία των μορίων, και έτσι είναι συχνά δυνατό να προσδιοριστεί με ακρίβεια πώς ένα μόριο συνδέεται σε επιφάνειες ή ως συστατικό σε μια στερεά φάση από το υπέρυθρο φάσμα του. Υπάρχουν πολλές πειραματικές μέθοδοι για την ανίχνευση δειγμάτων διαφόρων καταστάσεων και σε διαφορετικές φασματικές περιοχές. Στην περιοχή mid-IR ($400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$), υπάρχουν αρκετές εξαιρετικά σημαντικές και χρήσιμες κατηγορίες δεσμών που μπορούν να μελετηθούν. Μάλιστα, ένα μόριο για να απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία, ώστε να προκληθεί μια ενεργειακή μετάπτωση, πρέπει να υποστεί περιοδική μεταβολή στην διπολική ροπή του. [64]

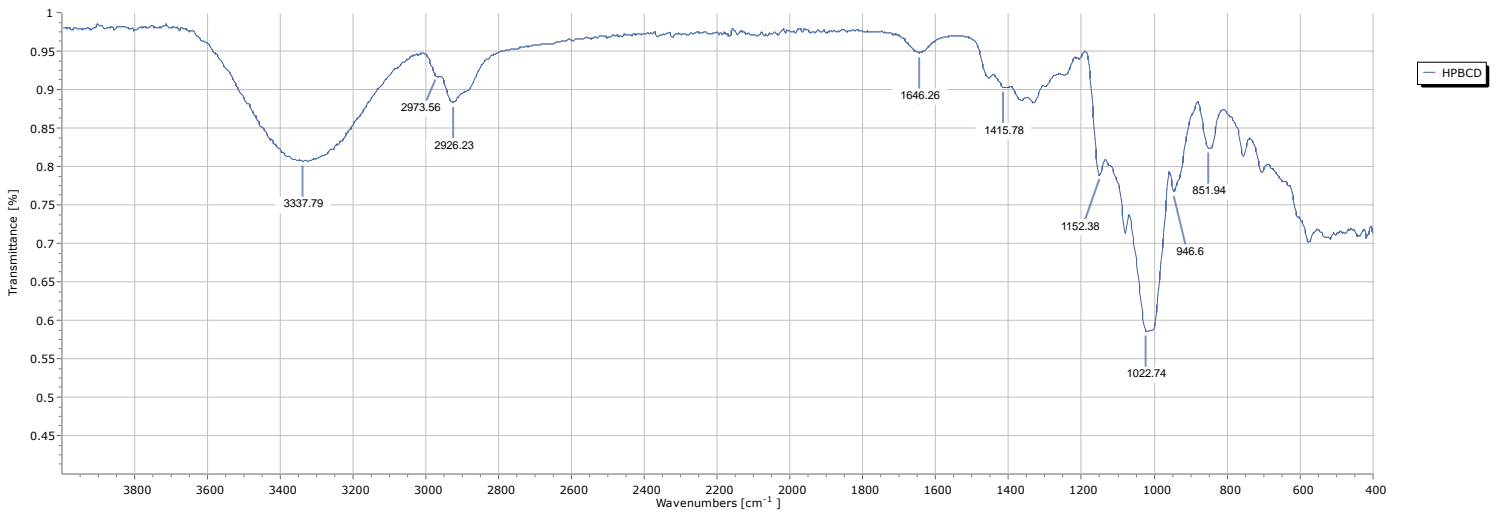
Beta-cyclodextrin



Εικόνα 45 : Φάσμα FT-IR της β-κυκλοδεξτρίνης

Στο φάσμα FT-IR της β-κυκλοδεξτρίνης εμφανίζονται χαρακτηριστικές κορυφές στους κυματαριθμούς 3295 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , 1643 cm^{-1} , 1415 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} , 940 cm^{-1} και 855 cm^{-1} .

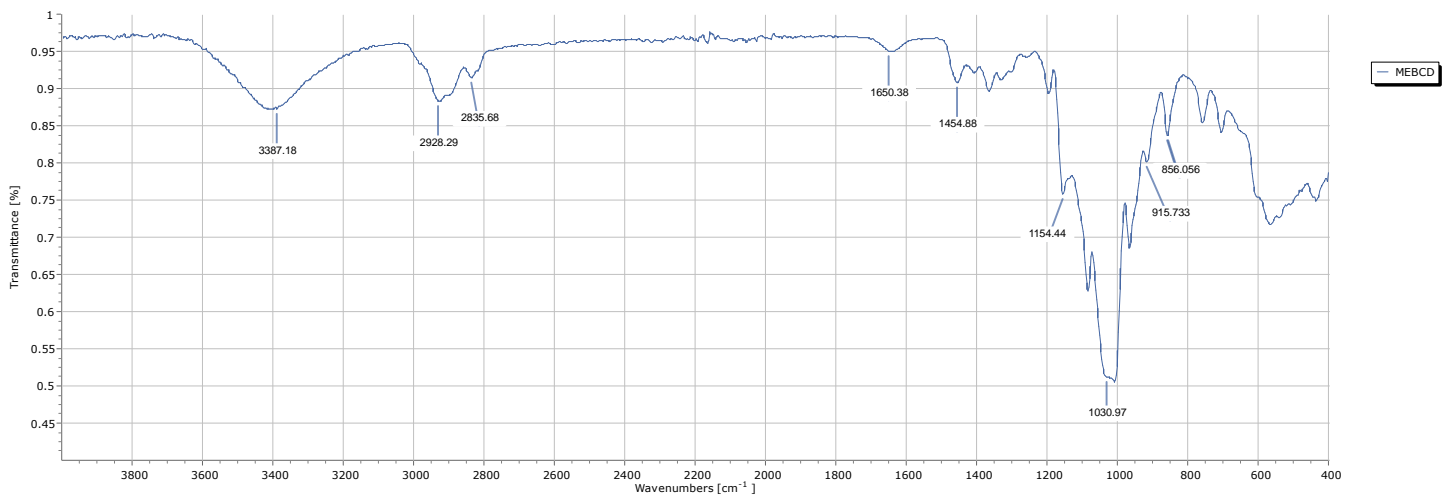
2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin



Εικόνα 46 : Φάσμα FT-IR της 2-υδροχπροργιλ-β-κυκλοδεξτρίνης

Στο φάσμα FT-IR της 2-υδροχπροργιλ-β-κυκλοδεξτρίνης εμφανίζονται χαρακτηριστικές κορυφές σε παρόμοιους κυματαριθμούς με την β-κυκλοδεξτρίνη, με την διαφορά ότι υπάρχει μία επιπλέον κορυφή με κυματαριθμό 2973.56 cm⁻¹.

Methyl-beta-cyclodextrin



Εικόνα 47 : Φάσμα FT-IR της methyl-β-κυκλοδεξτρίνης

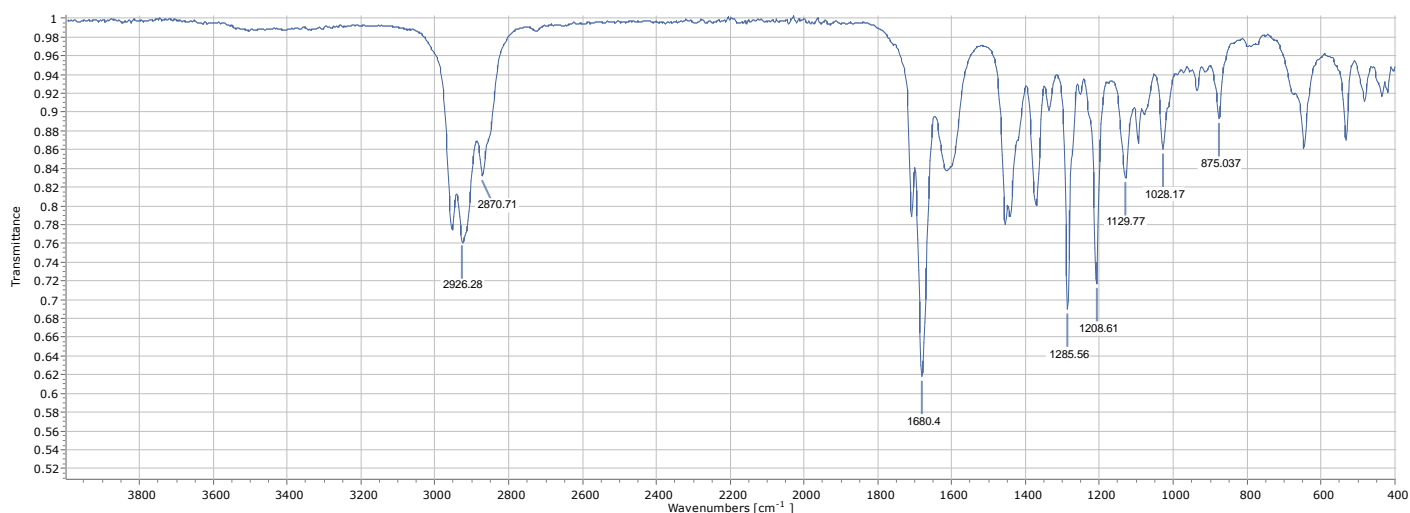
Ομοίως, στο φάσμα FT-IR της methyl-β-κυκλοδεξτρίνης εμφανίζονται χαρακτηριστικές κορυφές σε παρόμοιους κυματαριθμούς με την β-κυκλοδεξτρίνη, με την διαφορά ότι υπάρχει μία επιπλέον κορυφή με κυματαριθμό 2835.68 cm⁻¹.

Ειδικότερα, παρακάτω παρουσιάζονται οι κορυφές και οι λειτουργικές ομάδες των διαφορετικών κυκλοδεξτρινών, στις οποίες αυτές αποδίδονται [65], [66], [67] :

Πίνακας 21 : Κορυφές και λειτουργικές ομάδες των διαφορετικών κυκλοδεξτρινών

Λειτουργική ομάδα	Κυματαριθμός (cm ⁻¹) β-CD	Κυματαριθμός (cm ⁻¹) HP-β-CD	Κυματαριθμός (cm ⁻¹) Me-β-CD
Δόνηση τάσης του δεσμού O-H της β-CD	3295	3337	3387
Αντισυμμετρική δόνηση τάσης δεσμού -CH του -CH ₃	-	2973	-
Δόνηση τάσης του δεσμού C-H της β-CD	2926	2926	2928
Δόνηση τάσης του δεσμού C-H του μεθυλ-	-	-	2835
Αντισυμμετρική δόνηση τάσης δεσμού -CH του -CH ₂	1643	1646	1650
Δόνηση κάμψης του δεσμού O-H	1415	1415	1454
Δόνηση τάσης του γλυκοσιδικού δεσμού C-O-C	1151	1152	1154
Δόνηση τάσης του C-O	1025	1022	1030
Δόνηση τάσης του C-H στο δακτύλιο της κυκλοδεξτρίνης	940	946	915
Δόνηση κάμψης του C-C-H του α-γλυκοσιδικού δεσμού	855	851	856

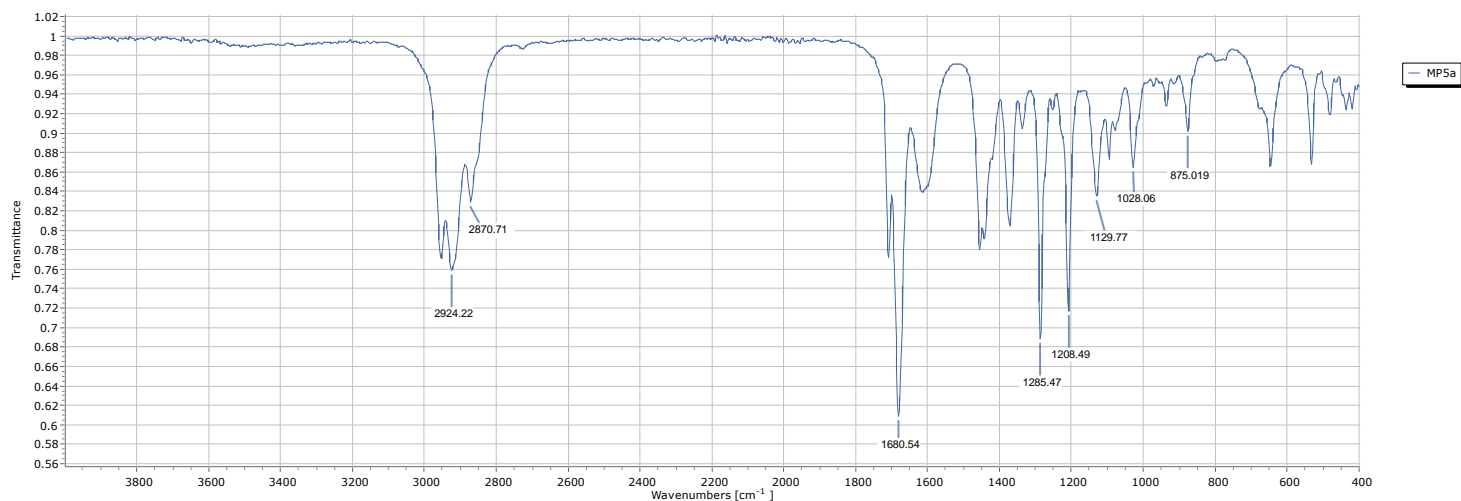
Mentha Pulegium MP4a



Εικόνα 48 : Φάσμα FT-IR του MP4a

Στο φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium MP4a* οι χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στους κυματαριθμούς 2926 cm^{-1} , 2870 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} , 1285 cm^{-1} , 1208 cm^{-1} , 1129 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} και 875 cm^{-1} .

Mentha Pulegium MP5a



Εικόνα 49 : Φάσμα FT-IR του *MP5a*

Στο φάσμα FT-IR του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium MP5a* οι χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στους κυματαριθμούς 2924 cm^{-1} , 2870 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} , 1285 cm^{-1} , 1208 cm^{-1} , 1129 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} και 875 cm^{-1} .

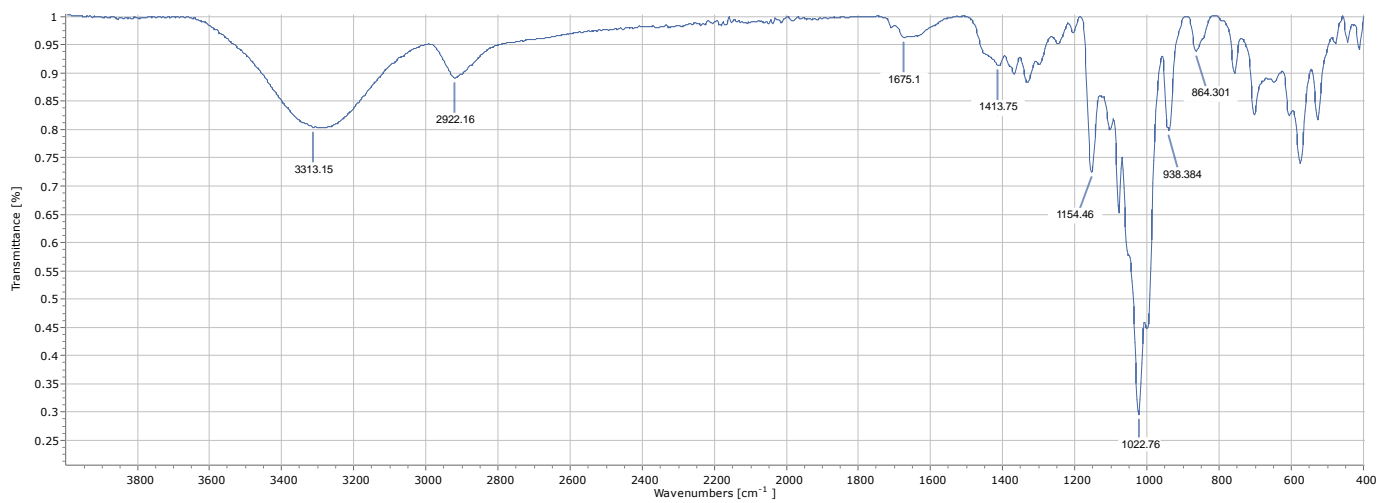
Ειδικότερα, οι κορυφές αυτές αποδίδονται στα εξής [68], [69]:

Πίνακας 22 : Κορυφές και λειτουργικές ομάδες του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium*

Λειτουργική ομάδα	Κυματαριθμός (cm^{-1}) <i>MP4a</i>	Κυματαριθμός (cm^{-1}) <i>MP5a</i>
Αντισυμμετρική δόνηση τάσεως δεσμού -CH	2926	2924
Συμμετρική δόνηση τάσεως δεσμού -CH	2870	2870
Δόνηση κάμψης του δεσμού -CH	875	875
Δόνηση τάσης του καρβονυλίου C=O της πιπεριτενόνης και της πουλεγόνης	1680	1680
Δόνηση τάσης του δεσμού -C=O της πουλεγόνης	1285	1285
Δόνηση τάσης των υπολοίπων καρβονυλικών ομάδων των δευτερευόντων συστατικών του	1028	1028

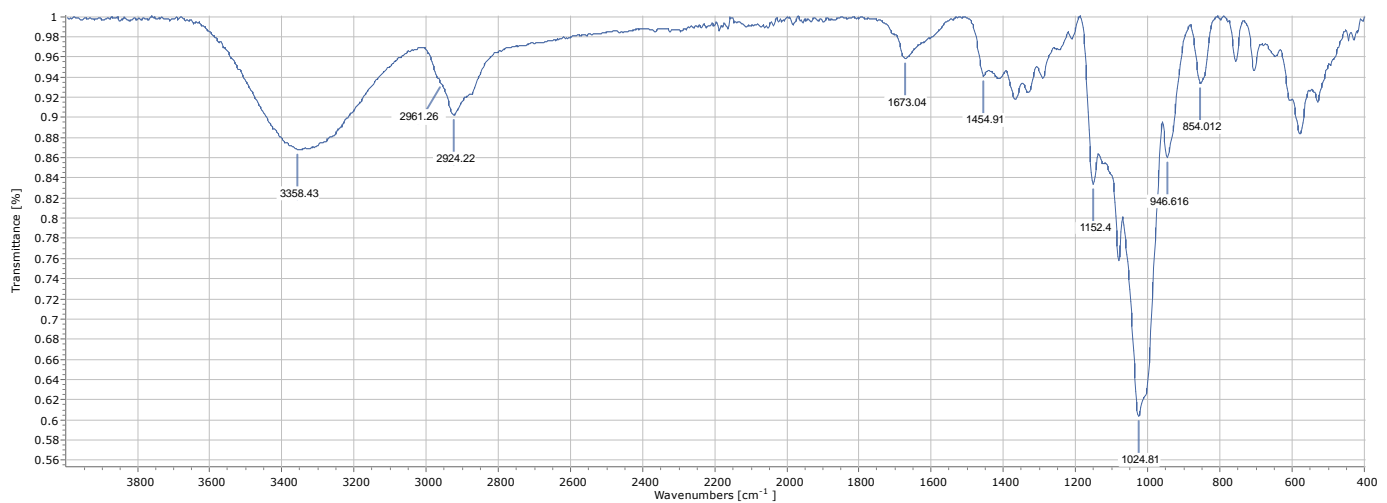
αιθερίου ελαίου και στην δόνηση τάσης του -C-O της 3-οκτανόλης.		
Δονήσεις τάσης ομάδων -CH ₂ και -CH ₃	1208	1208
Δονήσεις κάμψης των ομάδων -CH ₂ και -CH ₃	1129	1129

Σύστημα εγκλεισμού β-CD : MP_{4α}



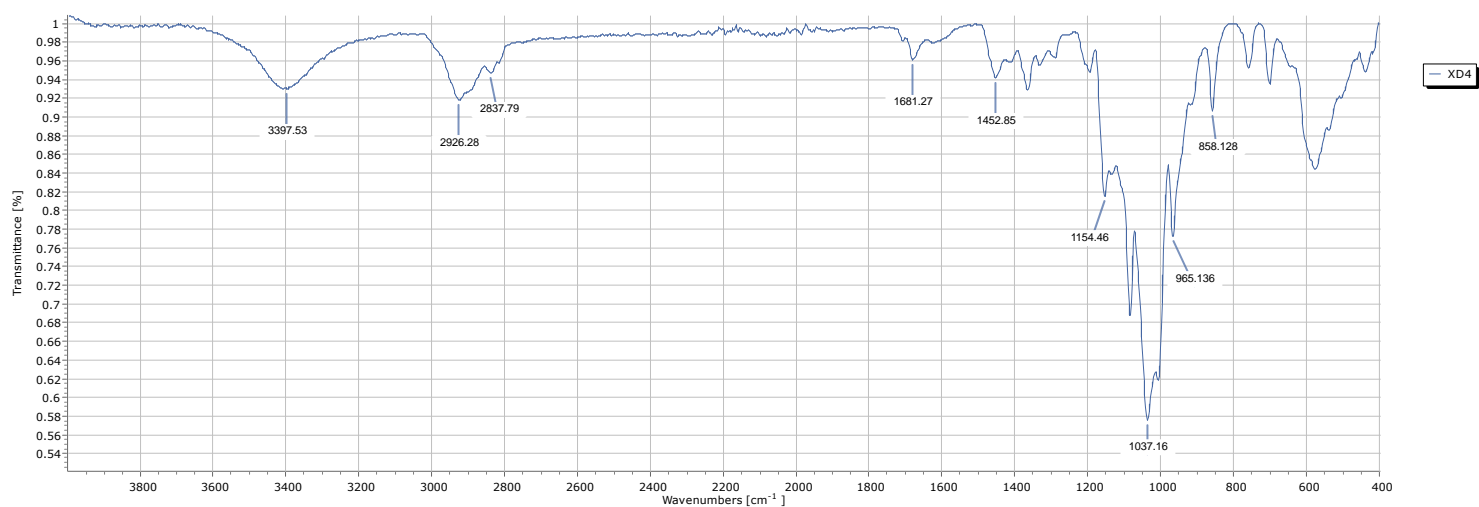
Εικόνα 50 : Φάσμα FT-IR του συμπλόκου εγκλεισμού β-CD : MP_{4α}

Σύστημα εγκλεισμού 2-hydroxypropyl-β-CD : MP_{4α}



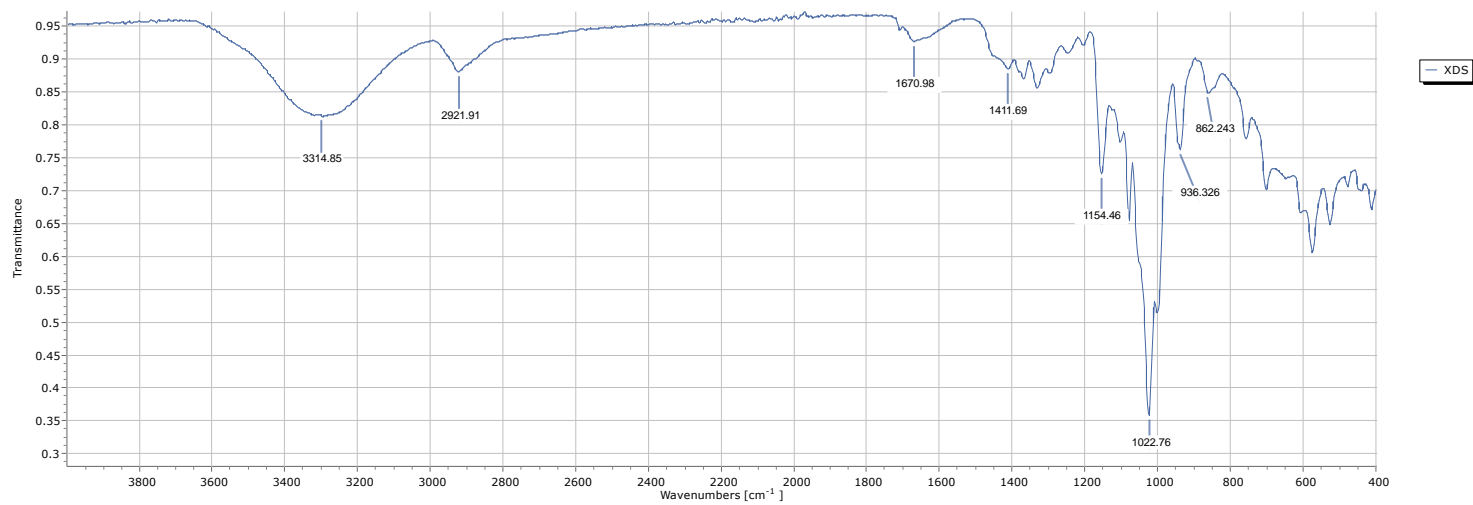
Εικόνα 51 : Φάσμα FT-IR του συμπλόκου εγκλεισμού HP-β-CD : MP_{4α}

Σύστημα εγκλεισμού methyl-β-CD : MP₄a



Εικόνα 52 : Φάσμα FT-IR του συμπλόκου εγκλεισμού Me-β-CD : MP₄a

Σύστημα εγκλεισμού β-CD : MP₅a



Εικόνα 53 : Φάσμα FT-IR του συμπλόκου εγκλεισμού β-CD : MP₅a

Στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 23) παρουσιάζονται οι μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών της β-κυκλοδεξτρίνης και των τροποποιημένων μορφών της, στα συστήματα εγκλεισμού :

Πίνακας 23 : Κορυφές και λειτουργικές ομάδες της β-CD, των τροποποιημένων μορφών της και των συστημάτων εγκλεισμού

Λειτουργική ομάδα	Κυματαριθμός (cm ⁻¹) β-CD	Κυματαριθμός (cm ⁻¹) HP-β-CD	Κυματαριθμός (cm ⁻¹) Me-β-CD	Κυματαριθμός (cm ⁻¹) β-CD : MP4a	Κυματαριθμός (cm ⁻¹) HP-β-CD : MP4a	Κυματαριθμός (cm ⁻¹) Me-β-CD : MP4a	Κυματαριθμός (cm ⁻¹) β-CD : MP5a
Δόνηση τάσης του δεσμού O-H της β-CD	3295	3337	3387	3313	3358	3397	3314
Αντισυμμετρική δόνηση τάσης δεσμού -CH του -CH ₃	-	2973	-	-	2981	-	-
Δόνηση τάσης του δεσμού C-H της β-CD	2926	2926	2928	2922	2924	2926	2921
Δόνηση τάσης του δεσμού C-H του μεθυλ-	-	-	2835	-	-	2837	-
Αντισυμμετρική δόνηση τάσης δεσμού -CH του -CH ₂	1643	1646	1650	1675	1673	1681	1670
Δόνηση κάμψης του δεσμού O-H	1415	1415	1454	1413	1454	1452	1411
Δόνηση τάσης του γλυκοσιδικού δεσμού C-O-C	1151	1152	1154	1154	1152	1154	1154
Δόνηση τάσης του C-O	1025	1022	1030	1022	1024	1037	1022
Δόνηση τάσης του C-H στο δακτύλιο της κυκλοδεξτρίνης	940	946	915	938	946	965	936
Δόνηση κάμψης του C-C-H του α-γλυκοσιδικού δεσμού	855	851	856	864	854	858	862

Διαπιστώνεται, λοιπόν, ότι στα φάσματα των δειγμάτων εγκλεισμού παρατηρούνται κυρίως κορυφές από τη β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της και όχι τόσο από το αιθέριο έλαιο. Ωστόσο, η εμφάνιση έστω και ελάχιστων κορυφών του ελαίου (1680cm⁻¹) είναι αναμενόμενη στα συστήματα εγκλεισμού διότι σημαντικό ποσοστό του εκχυλίσματος δεν έχει εγκλειστεί στην εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης και παραμένει στην επιφάνειά της. Τέλος, η υψηλή ένταση περίπου στα 1025cm⁻¹ μπορεί να αποδοθεί τόσο στη συβολή της β-CD, όσο και στου ελαίου.

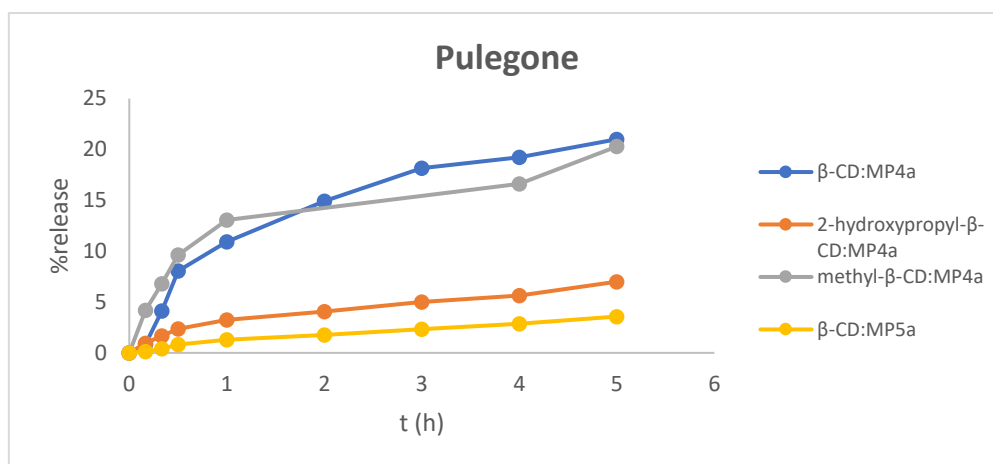
Γενικά, η απουσία χαρακτηριστικών κορυφών/ζωνών του αιθερίου ελαίου στα φάσματα των δειγμάτων εγκλεισμού, αποτελεί ένδειξη που μπορεί να επιβεβαιώσει τον εγκλεισμό τους στη β-κυκλοδεξτρίνη. Μάλιστα, οι μετατοπισμένες κορυφές οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίου-φορέα, εδώ β-κυκλοδεξτρίνης, και φιλοξενούμενου μορίου, υποδηλώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού. Επομένως, επιβεβαιώνεται ο επιτυχής εγκλεισμός και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση.

3.7 Μελέτη αποδέσμευσης *in vitro*

Η *in vitro* μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης των EOs από τα νανο- και μικρο-σωματίδια των συστημάτων εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε για τα συστήματα εγκλεισμού β-CD:MP4a, HP-β-CD:MP4a, Me-β-CD:MP4a, β-CD:MP5a. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε όλα τα συστήματα για 5 ώρες. Η μελέτη έγινε σε θερμοκρασία 35 °C και pH περίπου ίσο με 7.4, προκειμένου να προσομοιάζει το φυσιολογικό pH για εφαρμογή της διασποράς των συστημάτων εγκλεισμού ως εντομοκτόνα, δηλαδή στην επικείμενη μελέτη βιοδραστικότητας. Θεωρητικά, δύο στάδια περιλαμβάνονται στην αποδέσμευση του συμπλοκοποιημένου φιλοξενούμενου μορίου από ένα σύστημα. Σε πρώτη φάση, και για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, λαμβάνει χώρα η φάση της ταχείας αποδέσμευσης-burst effect. Η φάση αυτή

σχετίζεται με τα μόρια που είναι επιφανειακά προσδεμένα με τον φορέα. Στη δεύτερη φάση, ο ρυθμός αποδέσμευσης σιγά-σιγά επιβραδύνεται και τελικά σταθεροποιείται σχηματίζοντας ένα πλατό. Η αποδέσμευση, σε αυτή τη φάση, αφορά στη διάχυση των μορίων που βρίσκονται στο εσωτερικό της κοιλότητας του φορέα.

Παρακάτω παρατίθενται σε διάγραμμα τα ποσοστά αποδέσμευσης της πουλεγόνης, δηλαδή του κύριου συστατικού του αιθερίου ελαίου του φλισκουνιού, από τα σύμπλοκα β -CD:MP4a, HP- β -CD:MP4a, Me- β -CD:MP4a, β -CD:MP5a, συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 4 : Συνολικό διάγραμμα των ποσοστών αποδέσμευσης της πουλεγόνης από τα σύμπλοκα, συναρτήσει του χρόνου.

Έτσι, από το προφίλ αποδέσμευσης του MP_{4a} , όπου φορέας εγκλεισμού είναι η β -κυκλοδεξτρίνη, διακρίνεται μία αρχική γρήγορη φάση όπου αποδεσμεύεται ποσότητα πουλεγόνης έως και 8.0% («burst effect») κατά τα πρώτα 30min και μια πιο αργή φάση αποδέσμευσης που ακολουθεί, με αποτέλεσμα την αθροιστική αποδέσμευση στο 21.1% του βασικού συστατικού του ελαίου στις 5 ώρες. Στη περίπτωση όπου φορέας είναι η HP- β -CD, επίσης κατά τα πρώτα 30min τα ποσοστά αυτά μειώνονται σε 2.4% και 7.0% αντίστοιχα στις 5h. Τέλος, με φορέα την Me- β -CD το burst effect παρατηρείται κατά τη 1h με τα αντίστοιχα ποσοστά να είναι 13.1%, 20.3% στις 5h. Από το προφίλ αποδέσμευσης του MP_{5a} , όπου φορέας εγκλεισμού είναι η β -κυκλοδεξτρίνη παρατηρείται μία αρχική γρήγορη φάση αποδέσμευσης κατά τα πρώτα 30min έως και 0.81%, με αποτέλεσμα την αθροιστική αποδέσμευση στο 3.6% του βασικού συστατικού του ελαίου στις 5 ώρες.

Για την μαθηματική μοντελοποίηση της αποδέσμευσης, δηλαδή την εύρεση της κινητικής, από τα μοντέλα που διατίθενται προς προσαρμογή επιλέγεται αυτό με τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης, R^2 , το οποίο και εμφανίζει την βέλτιστη γραμμικότητα. Τα κυριότερα κινητικά μοντέλα αποδέσμευσης με την καλύτερη περιγραφή και τη μεγαλύτερη εφαρμογή είναι:

- Μηδενικής τάξης (Zero order)
- Πρώτης τάξης (First order)
- Higuchi
- Korsmeyer-Peppas
- Korcha

Το μοντέλο Korsmeyer-Peppas αξιοποιείται για την εύρεση του μηχανισμού αποδέσμευσης του αιθερίου ελαίου από τον εκάστοτε φορέα αλλά δεν λαμβάνεται ως κύριο μοντέλο περιγραφής του φαινομένου, διότι κατά βάση είναι εμπειρικό και περιγράφει το 60% της αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας.

Πίνακας 24 : Συντελεστής συσχέτισης R^2 για τα διάφορα κινητικά μοντέλα για την αποδέσμευση του αιθερίου ελαίου *Mentha Pulegium*

Σύστημα εγκλεισμού	Zero order	First order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Korcha
	R^2	R^2	R^2	R^2	R^2
<i>β-CD : MP4a</i>	0.8949	0.6332	0.9599	0.8123	0.9606
<i>HP-β-CD : MP4a</i>	0.8909	0.7845	0.9895	0.8601	0.9926
<i>Me-β-CD : MP4a</i>	0.9207	0.7138	0.9337	0.9971	0.9897
<i>β-CD : MP5a</i>	0.9727	0.6337	0.9742	0.4124	0.9898

Με την κατάλληλη προσαρμογή των δεδομένων σε γραμμικά συστήματα και σύμφωνα με τον συντελεστή R^2 των κυριότερων κινητικών μοντέλων, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα :

- Το μοντέλο Higuchi είναι το καταλληλότερο για την περιγραφή του προφίλ αποδέσμευσης της πουλεγόνης - κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου του φλισκουιού- από όλα τα συστήματα εγκλεισμού
- Το κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas αν και στα περισσότερα συστήματα έχει υψηλό R^2 , είναι ημι-εμπειρικό μοντέλο και δεν μπορεί να περιγράψει επαρκώς το προφίλ αποδέσμευσης. Ωστόσο, υποδεικνύει, μέσω της τιμής του εκθέτη αποδέσμευσης n , το μηχανισμό αυτού. Έτσι:
 - *β-CD : MP4a* : $n = 0.64$, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεταφορά της πουλεγόνης (δραστική ουσία) είναι ανώμαλη/μη-Fickian μεταφορά και ο μηχανισμός αποδέσμευσης είναι η διάχυση και διάβρωση
 - *HP-β-CD : MP4a* : $n = 0.36$, γεγονός που υποδηλώνει ψευδο-Fickian διάχυση ως τρόπο μεταφορά της δραστικής ουσίας και ο μηχανισμός αποδέσμευσης της είναι η διάχυση από μη διογκωτική μήτρα
 - *Me-β-CD : MP4a* : $n = 0.64$, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεταφορά της πουλεγόνης (δραστική ουσία) είναι ανώμαλη/μη-Fickian μεταφορά και ο μηχανισμός αποδέσμευσης είναι η διάχυση και διάβρωση
 - *β-CD : MP4a* : $n = 0.37$, γεγονός που υποδηλώνει ψευδο-Fickian διάχυση ως τρόπο μεταφορά της δραστικής ουσίας και ο μηχανισμός αποδέσμευσης της είναι η διάχυση από μη διογκωτική μήτρα
- Το κινητικό μοντέλο Korcha αν και έχει υψηλό R^2 , επίσης είναι ημι-εμπειρικό μοντέλο και δεν μπορεί να περιγράψει επαρκώς το προφίλ αποδέσμευσης. Ωστόσο, υποδεικνύει, μέσω της τιμής του λόγου $|A/B|$, το μηχανισμό αυτού :
 - *β-CD : MP4a* : $|A/B| = 18.3$,
 - *HP-β-CD : MP4a* : $|A/B| = 12.2$,
 - *Me-β-CD : MP4a* : $|A/B| = 3.9$,
 - *β-CD : MP5a* : $|A/B| = 2.5$

γεγονός που υποδηλώνει ότι για όλα τα συστήματα ο μηχανισμός διάχυσης είναι κυρίαρχος, αφού $|A/B| > 1$.

- Η ταχεία αποδέσμευση που παρατηρείται στις παραπάνω περιπτώσεις αποδίδεται στην ποσότητα του αιθερίου ελαίου που έχει προσροφηθεί στην επιφάνεια των σωματιδίων και διαφεύγει γρήγορα στο φορέα αποδέσμευσης, ενώ η αργή φάση που ακολουθεί καθορίζεται από τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν.

3.8 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης

Η μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε στα αιθέρια έλαια φλισκουιού *MP4a*, *MP5a*, καθώς και στα σύμπλοκα εγκλεισμού β -*CD:MP4a*, *HP-β-CD:MP4a*, *Me-β-CD:MP4a*, αφού το β -*CD:MP5a* δεν μελετήθηκε λόγω χαμηλής απόδοσης εγκλεισμού. Έτσι, για το προσδιορισμό αυτό, μετρήθηκε η απορρόφηση διαλυμάτων των προαναφερθέντων σε εξάνιο υψηλής καθαρότητας, στα 234nm, δηλαδή στο μήκος κύματος απορρόφησης των παραγόμενων υπεροξειδίων λινελαϊκού οξέος, από το AAPH. [70]

Από τις ληφθείσες μετρήσεις απορρόφησης του λινελαϊκού διαλύματος παρουσία AAPH διαπιστώνεται ότι μεταξύ $t=0$, $t=1$, η απορρόφηση αυξήθηκε γεγονός που επιβεβαιώνει την οξειδωτική δράση του τελευταίου και επομένως τη παραγωγή υπεροξειδίων του λινελαϊκού οξέος.

Επιπλέον, από τις ληφθείσες μετρήσεις παρουσία των EOs και των συμπλόκων αυτών με τη β -*CD* και τις τροποποιημένες μορφές της, διαπιστώνεται σταθερότητα των απορροφήσεων μεταξύ $t=0$, $t=1$. Έτσι, επιβεβαιώνεται η αντιοξειδωτική δράση αυτών, δηλαδή η αναστολή της υπεροξείδωσης του λινελαϊκού οξέος από το AAPH.

Το ποσοστό αντιοξειδωτικής δράσης, δηλαδή το ποσοστό αναστολής της υπεροξείδωσης του λινελαϊκού οξέος είναι :

$$\left(100 - \frac{\text{μέσο ποσό απορρόφησης του αιθερίου ελαίου μεταξύ } t=0 \text{ και } t=1}{\text{μέσο ποσό απορρόφησης του λινελαϊκού οξέος μεταξύ } t=0 \text{ και } t=1}\right) * 100\%$$

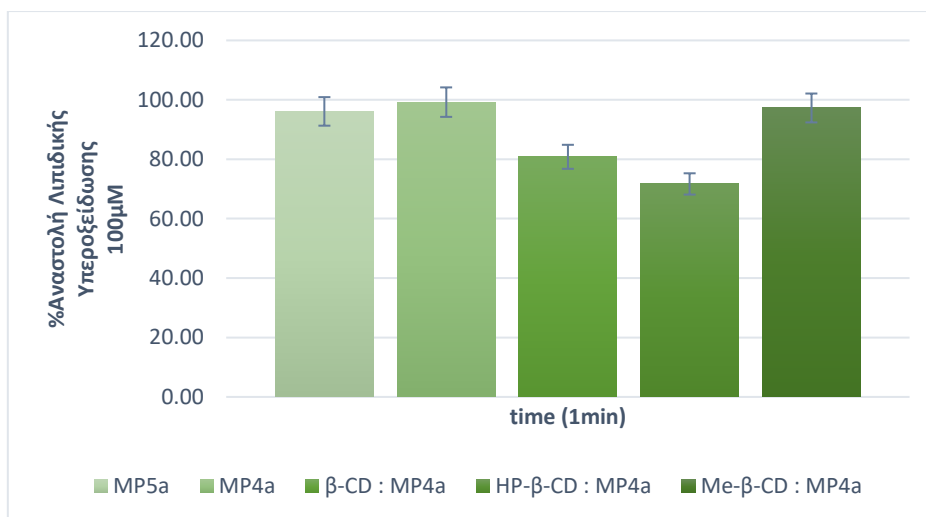
Άρα :

Πίνακας 25 : %Ποσοστό αντιοξειδωτικής δράσης των αιθερίων ελαίων και των συστημάτων εγκλεισμού

Αιθέριο έλαιο / Σύστημα	%ποσοστό αντιοξειδωτικής δράσης
<i>MP4a</i>	99.23%
<i>MP5a</i>	96.11%
β - <i>CD:MP4a</i>	80.82%
<i>HP-β-CD:MP4a</i>	71.69%
<i>Me-β-CD:MP4a</i>	97.26%

Επομένως, παρατηρείται ότι τόσο τα έλαια, όσο και τα συστήματα εγκλεισμού έχουν πολύ υψηλή αντιοξειδωτική δράση, όπως φαίνεται από τα υψηλά ποσοστά αναστολής της υπεροξείδωσης του λινελαϊκού οξέος. Ωστόσο, διαπιστώνεται ότι στη περίπτωση των β -*CD:MP4a*, *HP-β-CD:MP4a* η δράση αυτή μειώνεται ελαφρώς, σε αντίθεση με τη περίπτωση του *Me-β-CD:MP4a* όπου αυξάνεται η αντιοξειδωτική δράση. Έτσι, γίνεται κατανοητό ότι μέσω του εγκλεισμού του EO *MP4a* σε *Me-β-CD* αυξάνεται η αντιοξειδωτική του δράση.

Μάλιστα, στο παρακάτω Διάγραμμα απεικονίζεται η αναστολή αυτής της δράσης τόσο για τα έλαια, όσο και για τα συστήματα εγκλεισμού.



Διάγραμμα 5 : Αναστολή της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος για τα έλαια και τα συστήματα εγκλεισμού.

4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε ο εγκλωβισμός των αιθερίων ελαίων *Mentha Pulegium* (MP4a) και *Mentha Pulegium* (MP5a) σε βιοδιασπώμενους φορείς και συγκεκριμένα στην β-κυκλοδεξτρίνη και στις τροποποιημένες μορφές της, 2-hydroxypropyl-β-κυκλοδεξτρίνη και methyl-β-κυκλοδεξτρίνη, καθώς και στα πλασμουμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Αρχικά, η χημική ανάλυση των αιθερίων ελαίων μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματόμετρο μάζας (GC-MS), υπέδειξε τα κύρια συστατικά τους. Αναλυτικότερα, τα κύρια συστατικά είναι η πουλεγόνη, η ισομενθόνη, το λεμονένιο και η πιπεριτενόνη με διαφορές στο ποσοστό περιεκτικότητας τους στο έλαιο. Σε κάθε περίπτωση, η πουλεγόνη περιέχεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα αιθέρια έλαια *Mentha Pulegium*, σχεδόν 70%, ενώ η πιπεριτενόνη περιέχεται στο μικρότερο.

Ο εγκλεισμός των αιθερίων ελαίων *Mentha Pulegium* (MP4a) και *Mentha Pulegium* (MP5a) στον φορέα της β-κυκλοδεξτρίνης επιτεύχθηκε με την μέθοδο της συγκαταβύθισης και στις τροποποιημένες μορφές της με τη μέθοδο λειοτρίβισης με σχηματισμό πάστας (kneading). Μάλιστα, με τη Me-β-CD παρουσίασε την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού διεργασίας από τα υπόλοιπα συστήματα εγκλεισμού (87.4%), ενώ με την 2-hydroxypropyl-β-κυκλοδεξτρίνη τη χαμηλότερη (71.1%). Επιπλέον, αφού πραγματοποιήθηκε πλασμόλυση των κυττάρων ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* με απόδοση πλασμόλυσης 52%, διαπιστώθηκε ότι τα συστήματα εγκλεισμού αιθερίου ελαίου σε αυτά παρουσιάζουν τις χαμηλότερες αποδόσεις, όπου στο σύστημα εγκλεισμού CS:MP4a βρέθηκε η χαμηλότερη απόδοση διεργασίας ίση με 33.9%.

Από τον προσδιορισμό των αποδόσεων εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων, μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματόμετρο μάζας (GC-MS), στους διάφορους φορείς, διαπιστώθηκε ότι το έλαιο MP4a παρουσιάζει υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού στη περίπτωση της Me-β-CD (98.48%) και τη χαμηλότερη στη HP-β-CD (72.34%). Επιπλέον, στη περίπτωση της β-CD παρουσίασε πολύ υψηλότερη απόδοση στη περίπτωση του MP4a, συγκριτικά με του MP5a, 82.42% έναντι 57.02%. Ακόμη, διαπιστώθηκε πως σε φορείς

εγκλεισμού όπως η β-κυκλοδεξτρίνη και οι τροποποιημένες μορφές της, εγκλείονται περισσότερο τα συστατικά λεμονένιο και ισομενθόνη, αν και η πουλεγόννη είναι σε πολύ μεγαλύτερη αναλογία. Στην περίπτωση που φορέας είναι τα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* εμφανίζονται πολύ υψηλές αποδόσεις εγκλεισμού, με την πουλεγόννη να εγκλείεται σε μεγαλύτερο ποσοστό. 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 με τη β-κυκλοδεξτρίνη και τις τροποποιημένες μορφές της, μελετήθηκαν ως προς το μέγεθος και το ζ-δυναμικό τους μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Διαπιστώθηκε ότι τα συστήματα αυτά έχουν μέγεθος νανο-σωματιδίων με μέση υδροδυναμική διάμετρο στο εύρος 311.4 ± 1.8 nm – 465.0 ± 0.3 nm και τιμές PDI να κυμαίνονται από 0.369 ± 0.040 – 0.473 ± 0.032 , υποδηλώνοντας μέτρια ομοιομορφία της πολυδιασποράς. Όσον αφορά το ζ-δυναμικό των συστημάτων εγκλεισμού, παρατηρούνται αρνητικές τιμές λόγω της παρουσίας των -OH στην επιφάνεια των συμπλόκων κυκλοδεξτρινών, με την υψηλότερη κατ' απόλυτη τιμή ζ – δυναμικού να παρουσιάζει το σύστημα *HP-β-CD : MP4a*, υποδηλώνοντας σχετικά σταθερή διασπορά των νανοσωματιδίων.

Επιπρόσθετα, η επιτυχία εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων στις διάφορες μορφές β-κυκλοδεξτρίνης διερευνήθηκε μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου 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.

Επιπλέον, μελετήθηκε η αντιοξειδωτικότητα των ελαίων και των συμπλόκων αυτών με τη β-CD και τις τροποποιημένες μορφές της, μέσω της αναστολής της επαγόμενης οξειδωσης του λινελαϊκού οξέος από 2,2'-Azobis(2-αμιδινοπροπάνιο) διυδροχλωρικό (AAPH). Οι ληφθείσες μετρήσεις απορρόφησης υπέδειξαν ότι τα έλαια *MP4a*, *MP5a* έχουν πολύ υψηλή αντιοξειδωτική δράση, με ποσοστό αναστολής 96.11% και 99.23%. Το ίδιο ισχύει και για τα συστήματα εγκλεισμού, με το *Me-β-CD* να εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό αναστολής από όλα και ειδικότερα 97.26%.

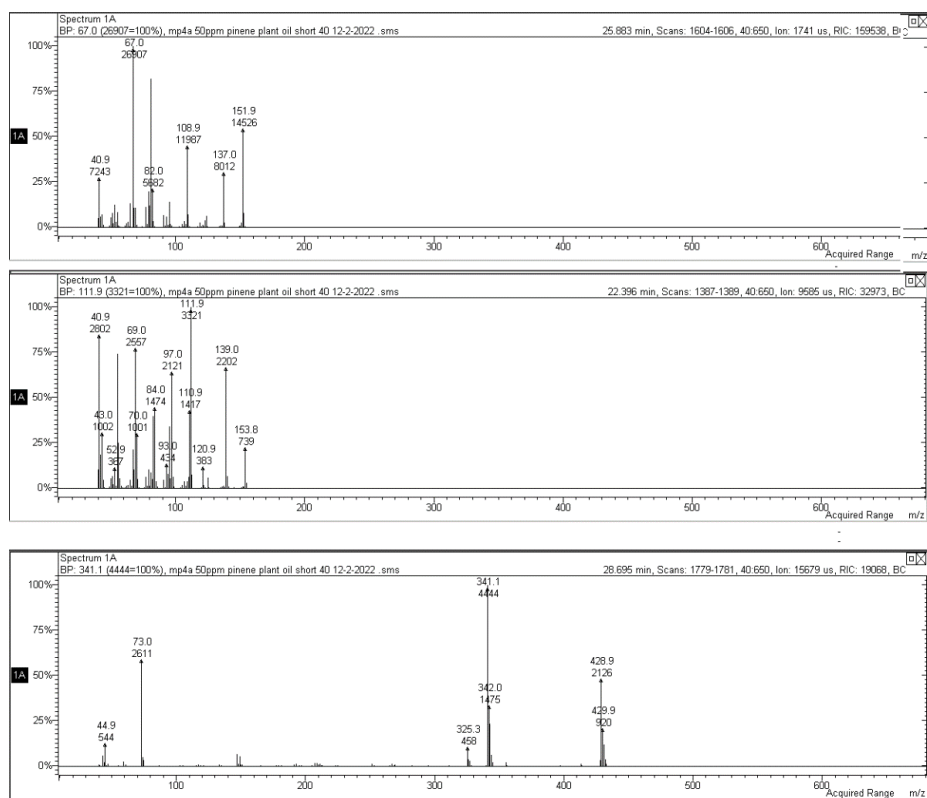
Τέλος, από την κινητική μοντελοποίηση της αποδέσμευσης που πραγματοποιήθηκε για τα συστήματα εγκλεισμού *β-CD:MP4a*, *HP-β-CD:MP4a*, *Me-β-CD:MP4a*, *β-CD:MP5a*, παρατηρήθηκε αρχικά ταχεία αποδέσμευση, ακολουθούμενη από μία σταδιακή. Μάλιστα, διαπιστώθηκε πως το κινητικό μοντέλο που περιγράφει καλύτερα την αποδέσμευση των αιθερίων ελαίων από τα νανοσωματίδια της β-κυκλοδεξτρίνης και των τροποποιημένων μορφών της είναι το μοντέλο Higuchi ενώ ο μηχανισμός αποδέσμευσης που επικρατεί βάσει του εκθέτη αποδέσμευσης, n , της εξίσωσης Korsmeyer-Peppas και του λόγου $|A/B|$ της εξίσωσης Korcha, είναι η διάβρωση του φορέα και η διάχυση.

5.ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

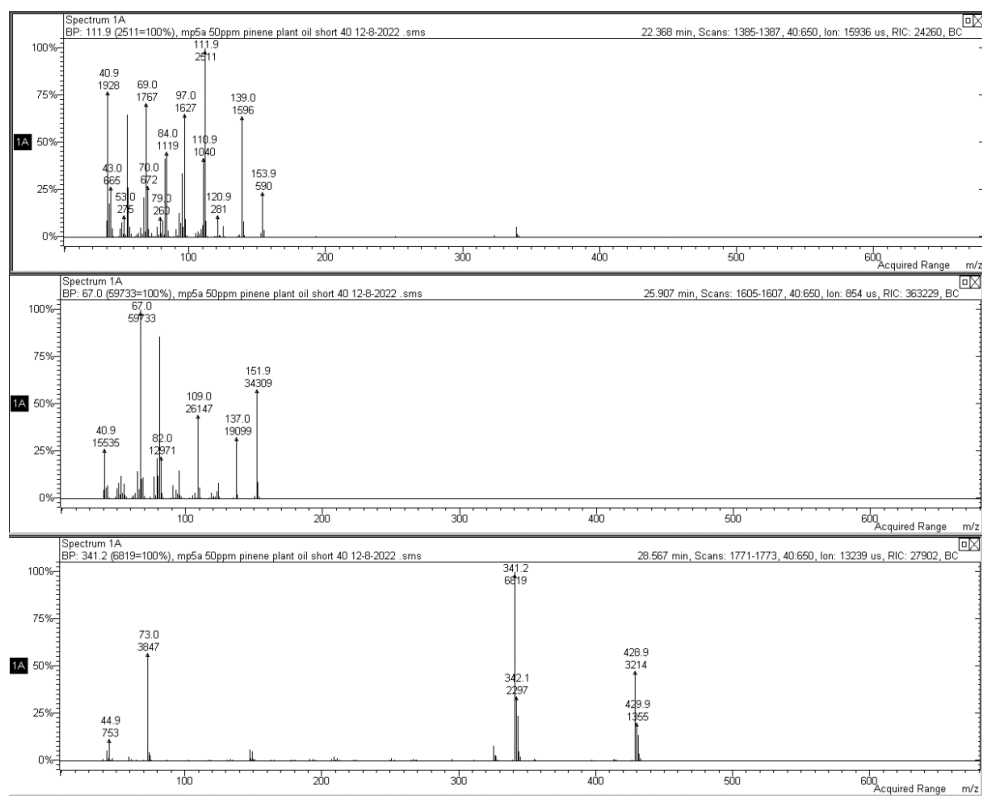
Δεδομένης της δυνατότητας μελλοντικής εφαρμογής των παραγόμενων συστημάτων σε πολλές φαρμακευτικές και αγροχημικές εφαρμογές, προτείνονται ορισμένες δυνατότητες εξέλιξης της παρούσας μελέτης.

- Μελέτη επικάλυψης της β-κυκλοδεξτρίνης και των τροποποιημένων μορφών της με χιτοζάνη, με στόχο την ενίσχυση της δραστηριότητας των κύριων συστατικών των εγκλεισμένων αιθερίων ελαίων, την αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού και διεργασίας και την ελεγχόμενη και παρατεταμένη αποδέσμευση.
- Χρήση εναλλακτικών μεθόδων εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων στους φορείς, με στόχο την αύξηση των αποδόσεων εγκλεισμού και διεργασίας
- Μελέτη της δομής όλων των συμπλόκων εγκλεισμού με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)
- Μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων των συμπλόκων εγκλεισμού με Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA)
- Μελέτη της μορφολογίας των συμπλόκων εγκλεισμού μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM)
- Μελέτη της εντομοκτόνου δράσης του *Mentha Pulegium* και όλων των συστημάτων εγκλεισμού, με στόχο τη χρήση τους έναντι του παρασίτου *tuta absoluta* (φυλλορύκτης της τομάτας) και άλλων εχθρών των θερμοκηπίων
- Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν τη διεργασία πλασμόλυσης και εγκλωβισμού στα κύτταρα ζυμομύκητα *S. cerevisiae*
- Μελέτη in vitro άλλων δράσεων των αιθερίων ελαίων *Mentha Pulegium*

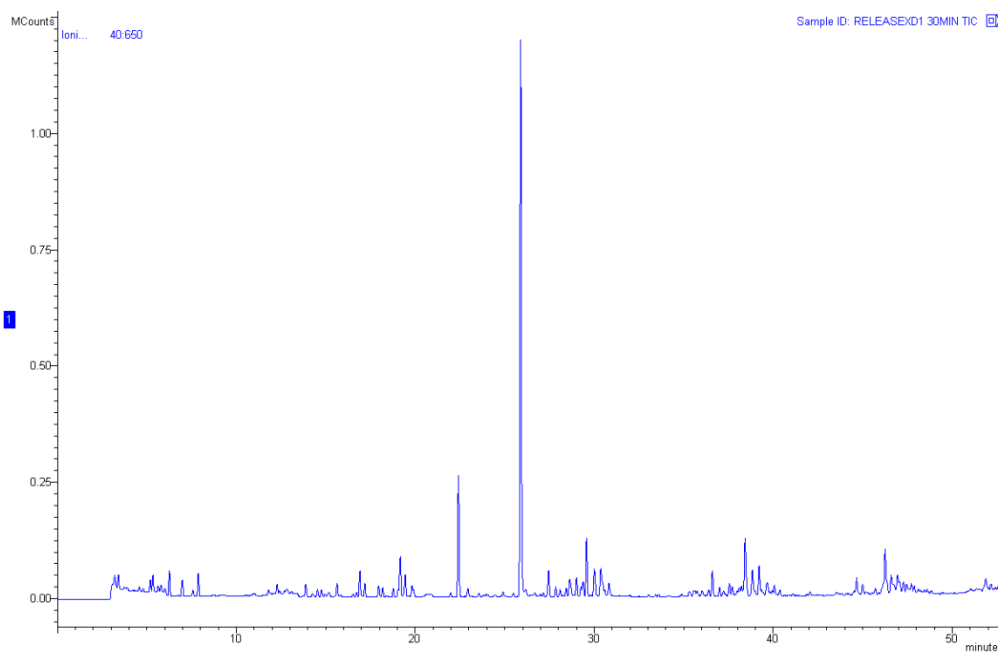
Παράρτημα Εικόνων



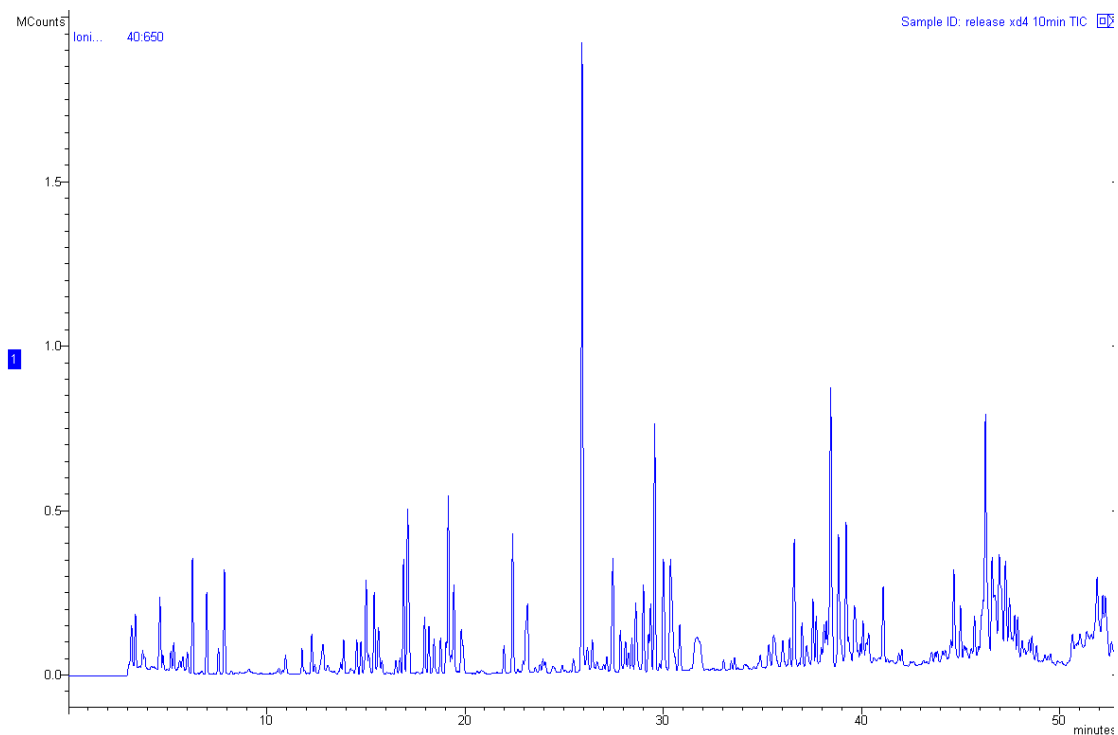
Εικόνα 54 : Φάσμα MS των κυριότερων συστατικών του MP4a



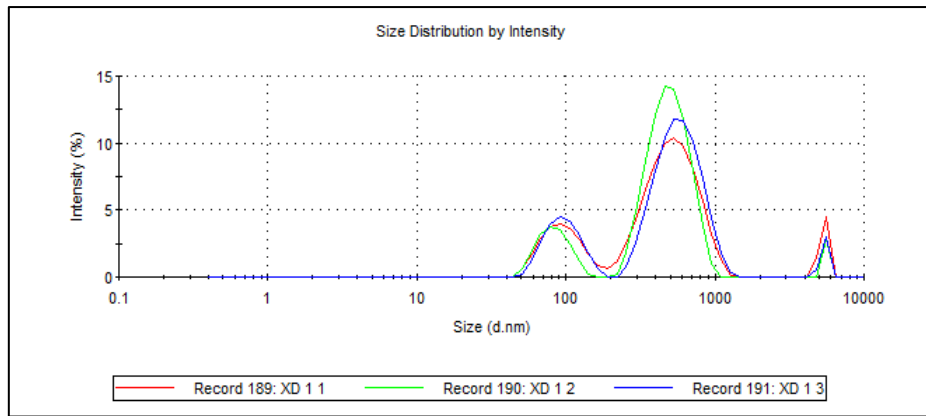
Εικόνα 55 : Φάσμα MS των κυριότερων συστατικών του MP5a



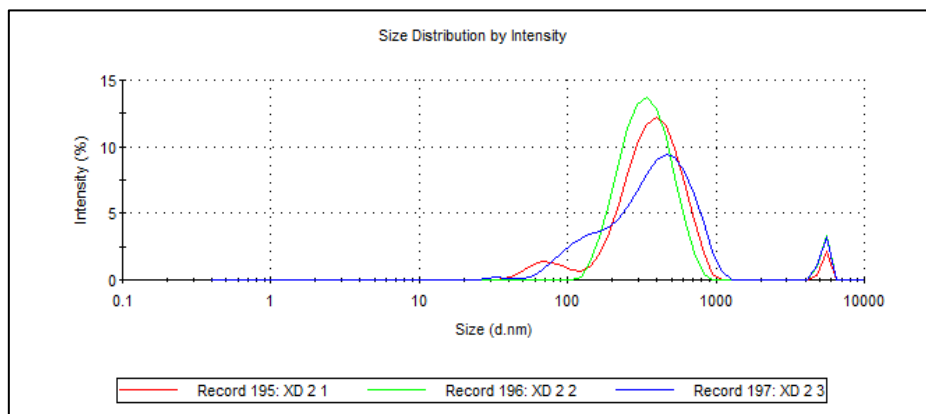
Εικόνα 56 : Φάσμα GC του συμπλόκου εγκλεισμού β-CD:MP4α



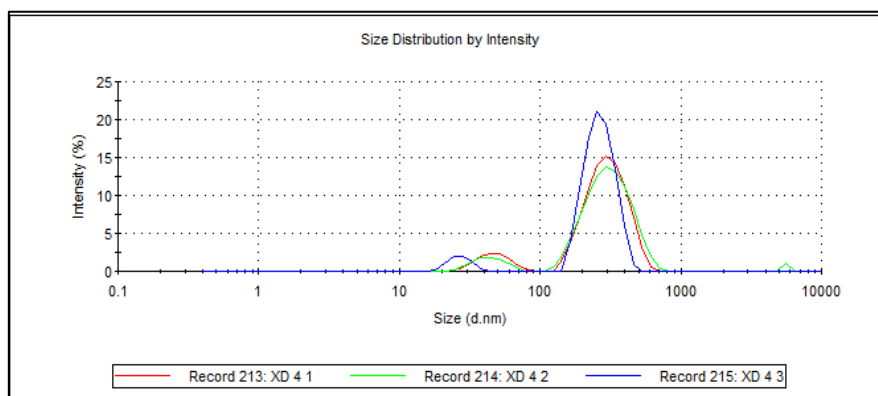
Εικόνα 57 : Φάσμα GC του συμπλόκου εγκλεισμού Me-β-CD:MP4α



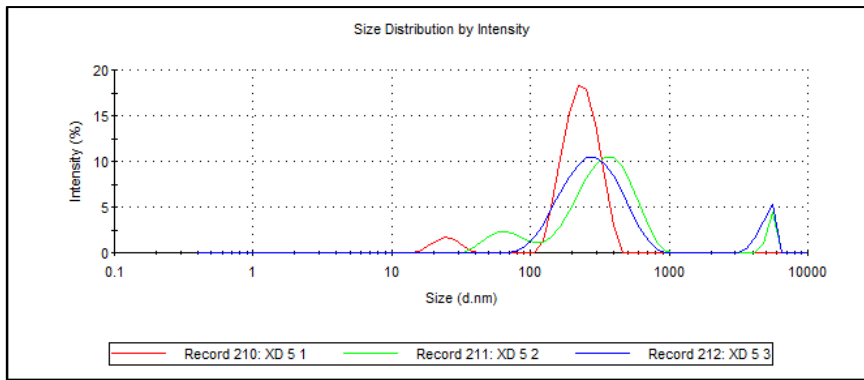
Εικόνα 58 : Κατανομή μεγέθους του συμπλόκου β-CD : MP4a



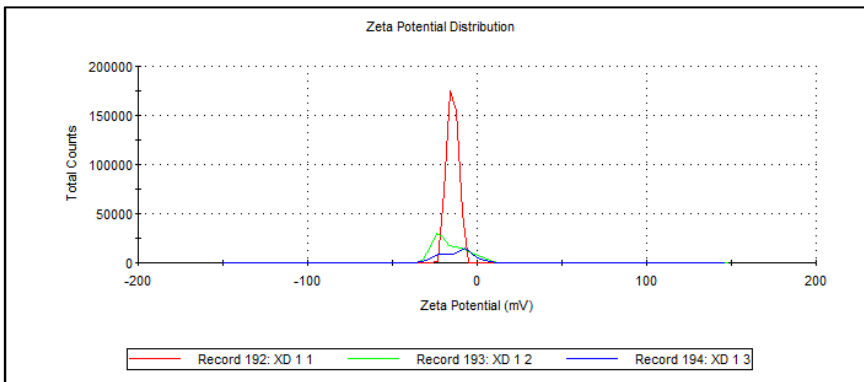
Εικόνα 59 : Κατανομή μεγέθους του συμπλόκου HP-β-CD : MP4a



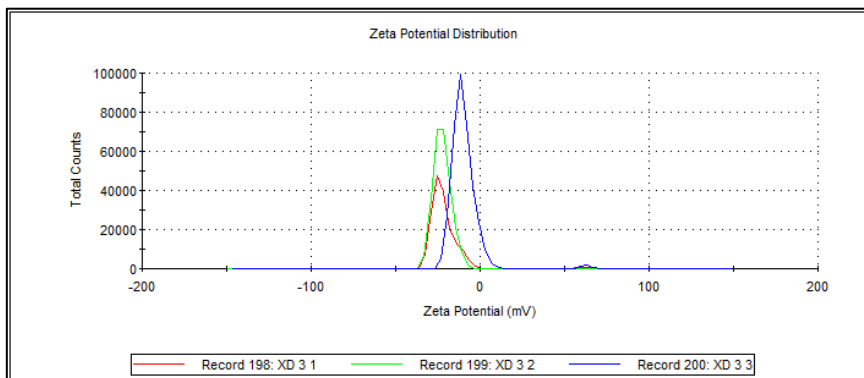
Εικόνα 60 : Κατανομή μεγέθους του συμπλόκου Me-β-CD : MP4a



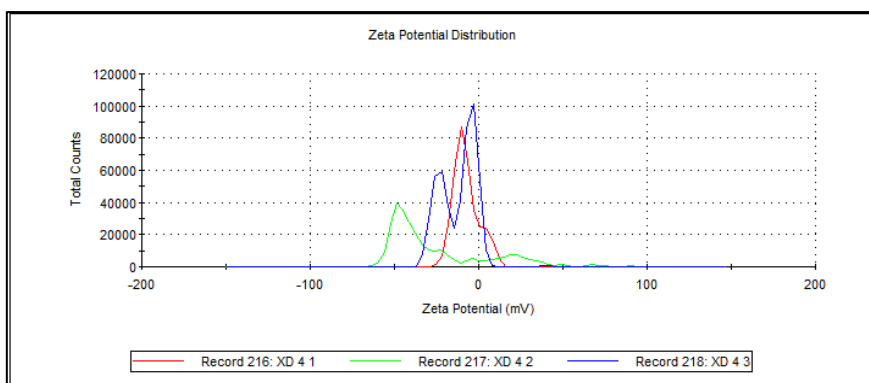
Εικόνα 61 : Κατανομή μεγέθους του συμπλόκου β-CD : MP5a



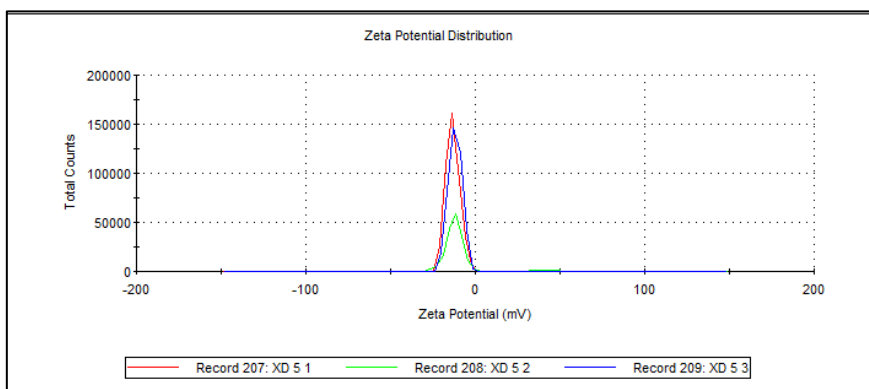
Εικόνα 62 : ζ-δυναμικό του συμπλόκου β-CD : MP4a



Εικόνα 63 : ζ-δυναμικό του συμπλόκου HP-β-CD : MP4a



Εικόνα 64 : ζ-δυναμικό του συμπλόκου Me-β-CD : MP4a



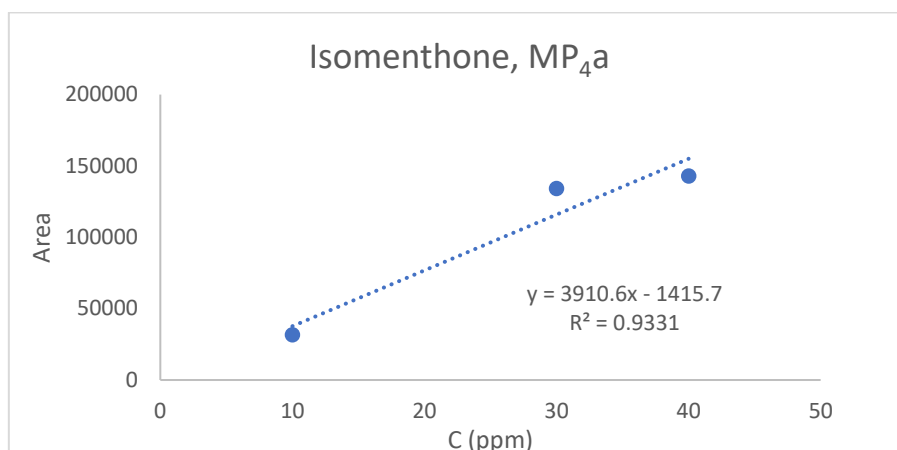
Εικόνα 65 : ζ-δυναμικό του συμπλόκου β-CD : MP5a

Παράρτημα Πινάκων

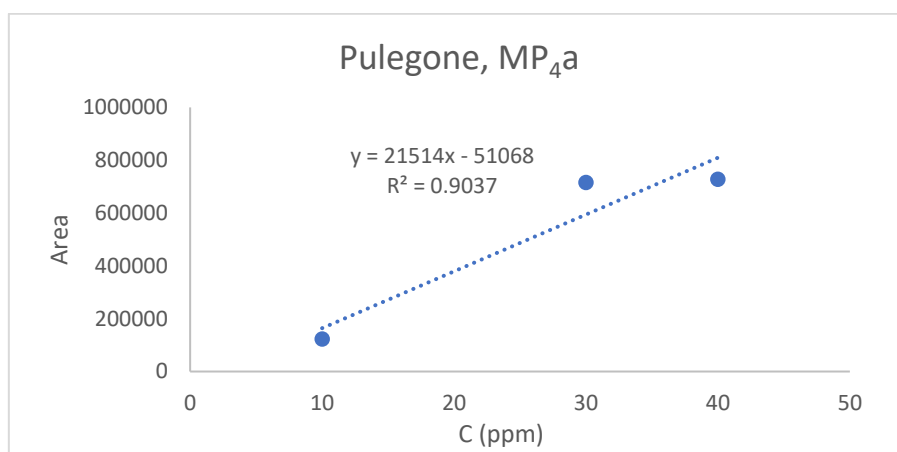
Πίνακας 26 : Εξισώσεις και συντελεστές των μοντέλων Korsmeyer-Peppas, Κορcha

Σύστημα εγκλεισμού	Εξίσωση Korsmeyer-Peppas	Εξίσωση Κορcha	n (Korsmeyer-Peppas)	A (Κορcha)	B (Κορcha)	A/B (Κορcha)
β-CD : MP4a	$\gamma=0.6449x-0.2072$	$\gamma=0.5696x^2+10.408x-1.1013$	0.64	10.408	0.5696	18.3
HP-β-CD : MP4a	$\gamma=0.3586x-0.1572$	$\gamma=-0.2815x^2+3.4465x-0.1217$	0.36	3.4465	-0.2815	12.2
Me-β-CD : MP4a	$\gamma=0.6408x-0.0014$	$\gamma=2.7489x^2+10.728x-0.1418$	0.64	10.728	2.7489	3.9
β-CD : MP5a	$\gamma=0.3682x-0.5645$	$\gamma=0.3368x^2+0.8417x-0.0808$	0.37	0.8417	0.3368	2.5

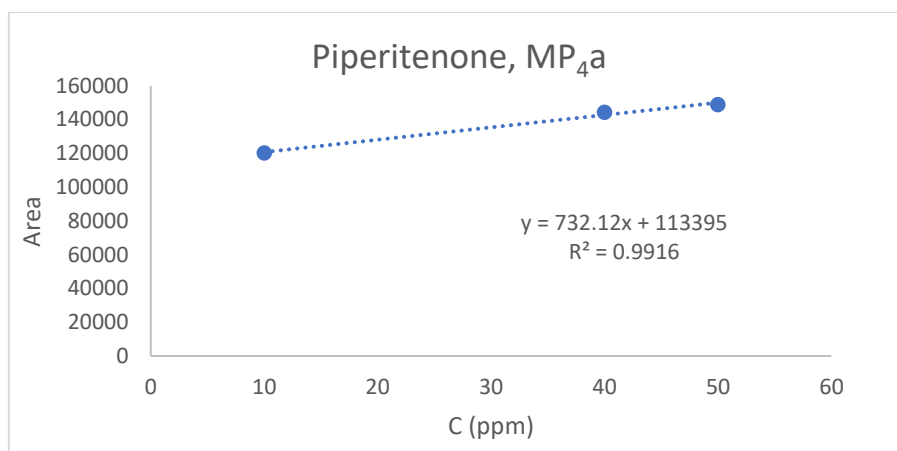
Παράρτημα Διαγραμμάτων



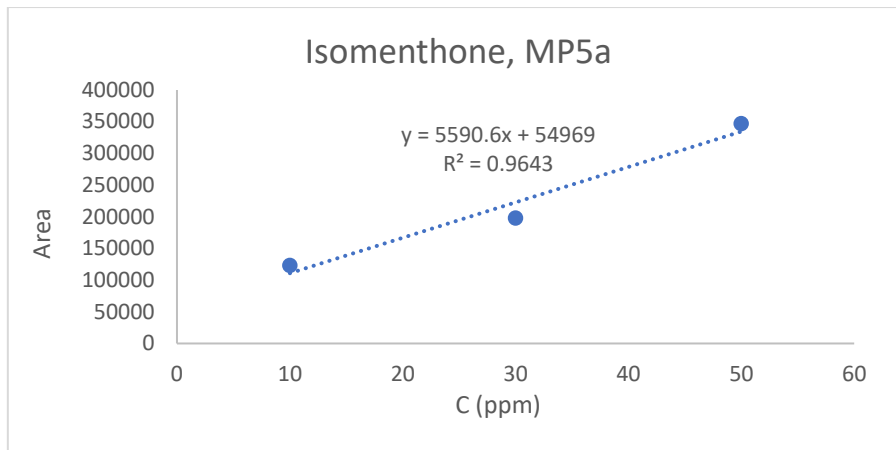
Διάγραμμα 6 : Καμπύλη αναφοράς της ισομενθόνης ($R_t=22.40min$) του αιθερίου ελαίου MP4a



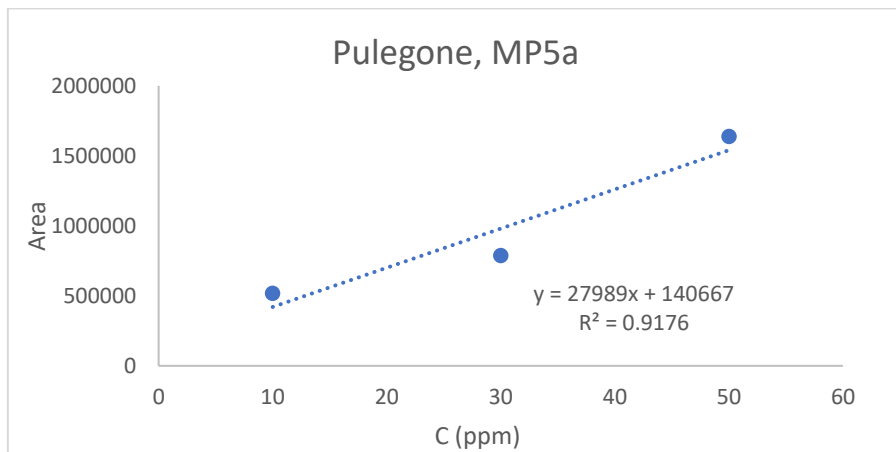
Διάγραμμα 7 : Καμπύλη αναφοράς της πουλεγονής ($R_t=25.88min$) του αιθερίου ελαίου MP4a



Διάγραμμα 8 : Καμπύλη αναφοράς της πιπεριτενόνης ($R_t=28.70min$) του αιθερίου ελαίου MP4a



Διάγραμμα 9 : Καμπύλη αναφοράς της ισομενθόνης ($R_t=22.37min$) του αιθερίου ελαίου MP5a



Διάγραμμα 10 : Καμπύλη αναφοράς της πουλεγονής ($R_t=25.91min$) του αιθερίου ελαίου MP5a

Βιβλιογραφία

- [1] Fokou, J. B. H., Dongmo, P. M. J., & Boyom, F. F. (2020). Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. In *Essential oils-oils of nature*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.86573.
- [2] Eslahi, H., Fahimi, N., & Sardarian, A. R. (2017). Chemical composition of essential oils. *Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications*, 119-71.
- [3] Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25. doi: 10.3390/medicines3040025.
- [4] Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W., & Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13172-13177.
- [5] Kluger, R. H. and Eastman, . Richard H. (2018, April 11). isoprenoid. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/isoprenoid>
- [6] Morsy, N. F. S. (2017). Chemical structure, quality indices and bioactivity of essential oil constituents. *Active ingredients from aromatic and medicinal plants*, 175-206. DOI: 10.5772/66231.
- [7] Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., & Zeng, H. (2021). Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5710.
- [8] Abers, M., Schroeder, S., Goelz, L., Sulser, A., St Rose, T., Puchalski, K., & Langland, J. (2021). Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC complementary medicine and therapies*, 21(1), 1-14.
- [9] Yang, S. K., Tan, N. P., Chong, C. W., Abushelaibi, A., Lim, S. H. E., & Lai, K. S. (2021). The missing piece: Recent approaches investigating the antimicrobial mode of action of essential oils. *Evolutionary Bioinformatics*, 17, 1176934320938391. DOI:10.1177/1176934320938391
- [10] Xiang, F., Bai, J., Tan, X., Chen, T., Yang, W., & He, F. (2018). Antimicrobial activities and mechanism of the essential oil from *Artemisia argyi* Levl. et Van. var. *argyi* cv. Qiai. *Industrial crops and products*, 125, 582-587.
- [11] Man, A., Santacroce, L., Iacob, R., Mare, A., & Man, L. (2019). Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. *Pathogens*, 8(1), 15.
- [12] Mangalagiri, N. P., Panditi, S. K., & Jeevigunta, N. L. L. (2021). Antimicrobial activity of essential plant oils and their major components. *Heliyon*, 7(4), e06835.
- [13] Gheorghita, D., Robu, A., Antoniac, A., Antoniac, I., Ditu, L. M., Raiciu, A. D., et al. (2022). In Vitro Antibacterial Activity of Some Plant Essential Oils against Four Different Microbial Strains. *Applied Sciences*, 12(19), 9482.
- [14] Davidson, P. M., & Parish, M. E. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food technology (USA)*, 148-155.

- [15] Huang, X., Lao, Y., Pan, Y., Chen, Y., Zhao, H., Gong, L., et al. (2021). Synergistic antimicrobial effectiveness of plant essential oil and its application in seafood preservation: A review. *Molecules*, 26(2), 307.
- [16] Cho, Y., Kim, H., Beuchat, L. R., & Ryu, J. H. (2020). Synergistic activities of gaseous oregano and thyme thymol essential oils against *Listeria monocytogenes* on surfaces of a laboratory medium and radish sprouts. *Food Microbiology*, 86, 103357.
- [17] Celik, H., & İlhan, K. (2023). Antioxidant effective aromatic compounds. Life in extreme environments-diversity, adaptability and valuable resources of bioactive molecules. *IntechOpen*. DOI: 10.5772/intechopen.106242.
- [18] Bektašević, M., & Politeo, O. (2022). Biological Application of Essential Oils and Essential Oils Components in Terms of Antioxidant Activity and Inhibition of Cholinesterase Enzymes. In *Essential Oils-Advances in Extractions and Biological Applications*. IntechOpen.
- [19] Oliyaei, N., Tanideh, N., & Nasirifar, S. Z. (2022). Application of Essential Oils in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Essential Oils: Advances in Extractions and Biological Applications*; Santana de Oliveira, M., de Aguiar Andrade, H., Eds, 139-152. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.102966.
- [20] Selmi, S., Rtibi, K., Hosni, K., & Sebai, H. (2022). Essential Oil, Chemical Compositions, and Therapeutic Potential. *Essential Oils: Advances in Extractions and Biological Applications*, 163. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.102447.
- [21] Wu, C. C., Sheen, L. Y., Chen, H. W., Kuo, W. W., Tsai, S. J., & Lii, C. K. (2002). Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(2), 378-383. DOI: 10.1021/jf010937z.
- [22] Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022). Microencapsulation of essential oils: A review. *Polymers*, 14(9), 1730. DOI: 10.3390/polym14091730.
- [23] Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(1), 143-182.
- [24] Albuquerque, P. M., Azevedo, S. G., de Andrade, C. P., D'Ambros, N. C. D. S., Pérez, M. T. M., & Manzato, L. (2022). Biotechnological Applications of Nanoencapsulated Essential Oils: A Review. *Polymers*, 14(24), 5495.
- [25] Perinelli, D. R., Palmieri, G. F., Cespi, M., & Bonacucina, G. (2020). Encapsulation of flavours and fragrances into polymeric capsules and cyclodextrins inclusion complexes: An update. *Molecules*, 25(24), 5878. DOI: 10.3390/molecules25245878.
- [26] Zubair, M., Shahzad, S., Hussain, A., Pradhan, R. A., Arshad, M., & Ullah, A. (2022). Current trends in the utilization of essential oils for polysaccharide-and protein-derived food packaging materials. *Polymers*, 14(6), 1146. DOI: 10.3390/polym14061146.
- [27] Gidwani, B., & Vyas, A. (2015). A comprehensive review on cyclodextrin-based carriers for delivery of chemotherapeutic cytotoxic anticancer drugs. *BioMed research international*, 2015. DOI: 10.1155/2015/198268.

- [28] Faisal, Z., Kunsági-Máté, S., Lemli, B., Szente, L., Bergmann, D., Humpf, H. U., & Poór, M. (2019). Interaction of dihydrocitronone with native and chemically modified cyclodextrins. *Molecules*, 24(7), 1328. DOI: 10.3390/molecules24071328.
- [29] Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., & Loftsson, T. (2018). Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. *Molecules*, 23(5), 1161. DOI: 10.3390/molecules23051161.
- [30] Wicochea R., José D., et al. (2022, January 28). Modelling of essential oils kinetics release from encapsulation matrix. *Proceedings of the 16th Weurman Flavour Research Symposium*.
- [31] Mehran, M., Masoum, S., & Memarzadeh, M. (2020). Microencapsulation of *Mentha spicata* essential oil by spray drying: Optimization, characterization, release kinetics of essential oil from microcapsules in food models. *Industrial Crops and Products*, 154, 112694.
- [32] Shaaban, H. A., & Farouk, A. (2022). Encapsulation of Essential Oils and Their Use in Food Applications. In *Essential Oils-Advances in Extractions and Biological Applications*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.103147.
- [33] Yada, R. Y., Buck, N., Canady, R., DeMerlis, C., Duncan, T., Janer, G., et al. (2014). Engineered nanoscale food ingredients: evaluation of current knowledge on material characteristics relevant to uptake from the gastrointestinal tract. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 730-744.
- [34] Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 34-60.
- [35] Ngwuluka, N. C., Abu-Thabit, N. Y., Uwaezuoke, O. J., Erebor, J. O., Ilomuanya, M. O., Mohamed, R. R., ... & Ebrahim, N. A. (2021). Natural polymers in micro-and nanoencapsulation for therapeutic and diagnostic applications: part I: lipids and fabrication techniques. *Nano Microencapsul Tech Appl*, 3-54. DOI: 10.5772/intechopen.94856
- [36] Reis, D. R., Ambrosi, A., & Di Luccio, M. (2022). Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation. *Future Foods*, 100126.
- [37] Tian, Q., Zhou, W., Cai, Q., Ma, G., & Lian, G. (2021). Concepts, processing, and recent developments in encapsulating essential oils. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 30, 255-271.
- [38] Pérez-San Martín, A., Uribe, K., Hernández-Montelongo, J., Naveas, N., Manso-Silván, M., Oyarzún, P., et al. (2022). Antibacterial Activity and Kinetic Release of *Laureliopsis philippiana* (Looser) Essential Oil from Nanostructured Porous Silicon with Surface-Functionalization Alternatives. *Applied Sciences*, 12(16), 8258.
- [39] Lis Arias, M. J., & López Hernández, A. (2022). Study of microcapsules of essential oils: drug delivery and particle characterization. *Polymer Science: Peer Review Journal*. DOI: 10.31031/PSPRJ.2022.04.000583
- [40] Sundar, S. K., & Parikh, J. K. (2023). Advances and trends in encapsulation of essential oils. *International Journal of Pharmaceutics*, 122668.
- [41] Komijani, M., Mohebbi, M., & Ghorani, B. (2022). Assembly of electrospun tri-layered nanofibrous structure of zein/basil seed gum/zein for increasing the bioaccessibility of lycopene. *LWT*, 161, 113328.

- [42] Rezaei, A., & Nasirpour, A. (2019). Evaluation of release kinetics and mechanisms of curcumin and curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex incorporated in electrospun almond gum/PVA nanofibers in simulated saliva and simulated gastrointestinal conditions. *BioNanoScience*, 9, 438-445.
- [43] Irshad, M., Subhani, M. A., Ali, S., & Hussain, A. (2020). Biological importance of essential oils. *Essential Oils-Oils of Nature*, 1. DOI: 10.5772/intechopen.87198.
- [44] Kusuma, H. S., & Mahfud, M. (2016, April). Preliminary study: Kinetics of oil extraction from sandalwood by microwave-assisted hydrodistillation. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 128, No. 1, p. 012009). IOP Publishing.
- [45] Wang, Y., Li, R., Jiang, Z. T., Tan, J., Tang, S. H., Li, T. T., et al. (2018). Green and solvent-free simultaneous ultrasonic-microwave assisted extraction of essential oil from white and black peppers. *Industrial Crops and Products*, 114, 164-172.
- [46] Asfaw M.D. (2022) Basic Essential Oil Extraction Techniques and Procedures from Aromatic Plants. *J Chromatogr Sep Tech*. 13:489.
- [47] Rassem, H. H., Nour, A. H., & Yunus, R. M. (2016). Techniques for extraction of essential oils from plants: a review. *Aust. J. Basic Appl. Sci*, 10(16), 117-127.
- [48] Capelezzo, A. P., Mohr, L. C., Dalcanton, F., de Mello, J. M. M., & Fiori, M. A. (2018). β -Cyclodextrins as encapsulating agents of essential oils. *Cyclodextrin: A versatile ingredient*, 169-200. DOI: 10.5772/intechopen.73568.
- [49] Paiva-Santos, A. C., Ferreira, L., Peixoto, D., Silva, F., Soares, M. J., Zeinali, M., et al. (2022). Cyclodextrins as an encapsulation molecular strategy for volatile organic compounds—pharmaceutical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112758.
- [50] Liu, Z., Xu, W., Kovaleva, E. G., Cheng, J., & Li, H. (2022). Recent progress in encapsulation and controlled release of pesticides based on cyclodextrin derivative carriers. *Advanced Agrochem*.
- [51] Katageri, A. R., & Sheikh, M. A. (2012). Cyclodextrin a gift to pharmaceutical world review. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(1), 52-56.
- [52] Mele, E. (2020). Electrospinning of essential oils. *Polymers*, 12(4), 908..
- [53] Rakmai, J., Mejuto, J. C., Sang, Y., Jafari, S. M., Xiao, J., & Simal-Gandara, J. (2021). Encapsulation of Essential Oils. *Functionality of Cyclodextrins in Encapsulation for Food Applications*, 115-135.
- [54] Gharib, R., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., Charcosset, C., & Auezova, L. (2015). Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. *Carbohydrate polymers*, 129, 175-186.
- [55] Murtadza, S. A. A., Jai, J., Md Zaki, N. A., & Hamzah, F. (2021). Essential oils encapsulation performance evaluation: a review on encapsulation parameters/Siti Afiah 'Aisyah Murtadza...[et al.]. *Malaysian Journal of Chemical Engineering and Technology (MJCET)*, 4(2), 114-123.

- [56] Workman, M. J., Gomes, B., Weng, J. L., Ista, L. K., Jesus, C. P., David, M. R., et al. (2020). Yeast-encapsulated essential oils: a new perspective as an environmentally friendly larvicide. *Parasites & vectors*, 13, 1-9.
- [57] Coradello, G., & Tirelli, N. (2021). Yeast cells in microencapsulation. General features and controlling factors of the encapsulation process. *Molecules*, 26(11), 3123.
- [58] Sharma, S., Mulrey, L., Byrne, M., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2022). Encapsulation of essential oils in nanocarriers for active food packaging. *Foods*, 11(15), 2337. DOI: 10.3390/foods11152337.
- [59] Χρυσούλα, Ι. (2015). ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ Glimepiride ΜΕ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.
- [60] Τσάμη, Α. (2021). Εγκλεισμός αιθερίων ελαίων εσπεριδοειδών σε βιοδιασπώμενους φορείς τροποποιημένης αποδέσμευσης. ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ, ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ.
- [61] Xu, Y., Kim, C. S., Saylor, D. M., & Koo, D. (2017). Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug–polymer applications: A review of experiments and theories. *Journal of biomedical materials research part B: applied biomaterials*, 105(6), 1692-1716.
- [62] Lammari, N., Louaer, O., Meniai, A. H., & Elaissari, A. (2020). Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects. *Pharmaceutics*, 12(5), 431.
- [63] Kotronia, M., Kavetsou, E., Loupassaki, S., Kikionis, S., Vouyiouka, S., & Detsi, A. (2017). Encapsulation of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil in β -cyclodextrin (β -CD): Synthesis and characterization of the inclusion complexes. *Bioengineering*, 4(3), 74.
- [64] Peak, D. (2005) FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY, Editor(s): Daniel Hillel, *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Elsevier, 80-85, 9780123485304.
- [65] David, I., Orboi, M. D., Simandi, M. D., Chirilă, C. A., Megyesi, C. I., Rădulescu, L., et al. (2019). Fatty acid profile of Romanian's common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lipid fractions and their complexation ability by β -cyclodextrin. *PLoS One*, 14(11), e0225474.
- [66] Gabaldon J., Lucas-Abellán C., et al. (2019) Adsorption Properties of β - and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrins Cross-Linked with Epichlorohydrin in Aqueous Solution. A Sustainable Recycling Strategy in Textile Dyeing Process. *Polymers*. 11. 21. 10.3390/polym11020252
- [67] Carretti, E., Natali, I., Matarrese, C., Bracco, P., Weiss, R. G., Baglioni, P., Dei, L. (2010). A new family of high viscosity polymeric dispersions for cleaning easel paintings. *Journal of Cultural Heritage*, 11(4), 373-380.
- [68] Tanavar, H., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2021). Investigation of the chemical properties of *Mentha pulegium* essential oil and its application in *Ocimum basilicum* seed mucilage edible coating for extending the quality and shelf life of veal stored in refrigerator (4° C). *Food Science & Nutrition*, 9(10), 5600-5615.
- [69] Azadi, S., Osanloo, M., Zarenezhad, E., Farjam, M., Jalali, A., & Ghanbariasad, A. (2023). Nano-scaled emulsion and nanogel containing *Mentha pulegium* essential oil: cytotoxicity on

human melanoma cells and effects on apoptosis regulator genes. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 1-12.

[70] Katopodi, A., Tsotsou, E., Iliou, T., Deligiannidou, G. E., Pontiki, E., Kontogiorgis, C., Detsi, A. (2021). Synthesis, bioactivity, pharmacokinetic and biomimetic properties of multi-substituted coumarin derivatives. *Molecules*, 26(19), 5999.

[71] Paarakh, M. P., Jose, P. A., Setty, C. M., & Peterchristoper, G. V. (2018). Release kinetics—concepts and applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology (IJPRT)*, 8(1), 12-20.