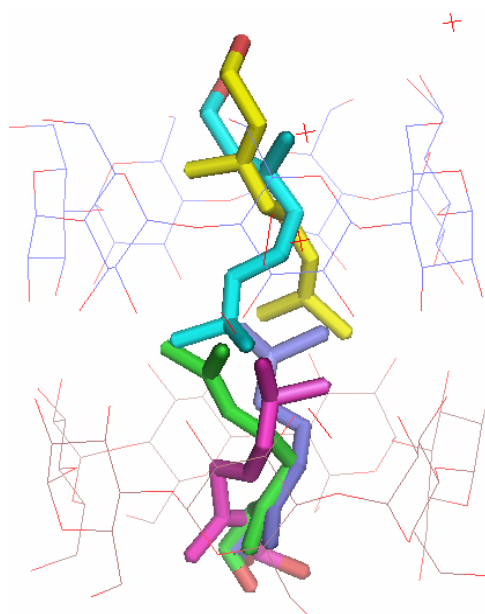


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»**  
**ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ**  
**ΓΕΡΑΝΙΟΛΗΣ ΣΕ  $\beta$ -ΚΥΚΛΟΔΕΕΤΡΙΝΗ ΜΕ**  
**ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ**



**Βασιλική-Σταματία Κ. Μπουλάκη**  
**Γεωπόνος – Βιοτεχνολόγος**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Κωνσταντίνος Μπεθάνης**

**ΑΘΗΝΑ 2010**

---

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»  
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ  
ΓΕΡΑΝΙΟΛΗΣ ΣΕ  $\beta$ -ΚΥΚΛΟΔΕΕΤΡΙΝΗ ΜΕ  
ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ**

**Βασιλική-Σταματία Κ. Μπουλάκη  
Γεωπόνος – Βιοτεχνολόγος**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Κωνσταντίνος Μπεθάνης**

**ΑΘΗΝΑ 2010**



---

Μεταπτυχιακή Διατριβή

***Μελέτη του προϊόντος εγκλεισμού γερανιόλης σε β-  
CD με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ***

**της Βασιλική- Σταματία Κ. Μπουλάκη**

Επιβλέπων Καθηγητής: Κωνσταντίνος Μπεθάνης

Πενταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Α. Χούντας,  
Καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Δ/ντης Εργ. Φυσικής Γ.Π.Α., (Μέλος)

Β. Κωνσταντίνου,  
Καθηγήτρια, Γενικό Τμήμα, Εργ. Γεν. Χημείας Γ.Π.Α., (Μέλος)

Ν. Αλβέρτος,  
Επίκουρος Καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργ. Φυσικής Γ.Π.Α.,  
(Μέλος)

Π. Ταραντίλης,  
Επίκουρος Καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργ. Γεν. Χημείας Γ.Π.Α.,  
(Μέλος)

Κ. Μπεθάνης,  
Επίκουρος Καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργ. Φυσικής Γ.Π.Α.,  
(Επιβλέπων)

---

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι ολιγοσακχαρίδια που παράγονται από ενζυμική αποδόμηση της αμυλόζης. Αποτελούνται από γλυκοζιτικές μονάδες που συνδέονται με  $\alpha(1-4)$ -γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η πιο ενδιαφέρουσα ιδιότητα τους είναι αυτή του σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού (ξενιστής-ξενιζόμενο μόριο) με συστατικά που διαθέτουν υδρόφοβα τμήματα και η αλλαγή φυσικοχημικών ιδιοτήτων και των δύο μελών του συμπλόκου, όπως διαλυτοποίηση υδρόφοβων συστατικών, αργή ή ελεγχόμενη απελευθέρωση συστατικών (όπως φάρμακα ή αρώματα), σταθεροποίηση πτητικών συστατικών, διαχωρισμός συστατικών (π.χ χειρόμορφων).

Η γερανιόλη είναι ένα σημαντικό συστατικό των αιθερίων ελαίων που λαμβάνονται από πολλά και σημαντικά φυτικά είδη όπως *Zingiber officinale* (τζίντζερ), *Citrus limon* (λεμόνι), *Citrus aurantifolia* (λάιμ), *Lavandula latifolia* (λεβάντα), *Myristica fragrans* (το μοσχοκάρυδο), *Citrus sinensis* (πορτοκάλι), *Cymbopogon martini* (παλαμαρόζα), *Rosa damascene* και *Rosa centifolia* (τριαντάφυλλο). Χάρη στην γλυκιά οσμή της, χρησιμοποιείται στην αρωματοποιεία, στη σαπωνοποιεία στην κοσμετική και στην βιομηχανία τροφίμων. Ακόμα, πολύ σημαντικές είναι οι ιδιότητες αυτής στην ιατρική, στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο καρκίνος, καθώς και στις μεταμοσχεύσεις (παρεμπόδιση οξείας απόρριψης μοσχεύματος). Τέλος έχει αξιολογηθεί ως σημαντικό εντομοαπωθητικό κι ως απωθητικό ζώων για τις γεωργικές εκμεταλλεύσεις. Ο εγκλεισμός αυτού του πτητικού μορίου σε κυκλοδεξτρίνη ( $\beta$ -CD) είναι πολύ σημαντικός για την εκμετάλλευση και καλύτερη αξιοποίηση όλων αυτών των ιδιοτήτων (αύξηση διαλυτότητας, προστασία έναντι της θερμοκρασίας και του οξειδωτικού στρες, ελεγχόμενη απελευθέρωση).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παρασκευή και κρυστάλλωση του συμπλόκου γερανιόλης σε φυσική  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη ( $\beta$ -CD). Τα αποτελέσματα της επιτυχούς κρυστάλλωσης και της συλλογής δεδομένων με περίθλαση ακτινών-X (σε σύγχροτρο υπό κρυογονικές συνθήκες) έδειξαν ότι το σύμπλοκο: κρυσταλλώνει στην μονοκλινή ομάδα χώρου P2<sub>1</sub>, με διαστάσεις κυψελίδας  $a=15.58\text{\AA}$ ,  $b=24.98\text{\AA}$ ,  $c=18.68\text{\AA}$  και γωνίες  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=110.91^\circ$  και

---

$\gamma=90^\circ$ . Η ασύμμετρη μονάδα περιέχει ένα διμερές  $\beta$ -CD τύπου «κεφαλής-κεφαλής» που μέσα του έχει εγκεκλεισμένα δύο ξενιζόμενα μόρια (στοιχειομετρία 1:1), κατανεμημένα σε 5 θέσεις και 16 μόρια νερού κατανεμημένα σε 25 θέσεις. Τα διμερή διατάσσονται στον τύπο καναλιού (channel) παράλληλα στον άξονα- $\alpha$ . Η κρυσταλλική αυτή μοριακή διεύθυνση επιτυγχάνεται χάρις στους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ διμερών  $\beta$ -CD και του δικτύου νερού αλλά και μεταξύ των ξενιζομένων μορίων γερανιόλης με ξενιζόμενα μόρια και μόρια ξενιστές γειτονικών διμερών  $\beta$ -CD. Η δομή επιλύθηκε με μοριακή αντικατάσταση και βελτιστοποιήθηκε με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, κατά την οποία με αλληπάλληλους χάρτες διαφορετικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας προσδιορίστηκαν όλα τα άτομα του ξενιστή και του ξενιζομένου μορίου, καθώς και των νερών, που συγκροτούν ένα δίκτυο και σταθεροποιούν το κρυσταλλικό πλέγμα. Η βελτιστοποίηση απέδωσε συντελεστή αξιοπιστίας  $R=0.0768$  και δείκτη προσαρμογής  $GooF=1.257$ .

---

# ABSTRACT

Cyclodextrins (CDs) are microcyclic oligosaccharides produced by enzymatic degradation of amylose. They consist of  $\alpha$  (1-4) linked glucose units. The most interesting CD property is the formation of inclusion (host-guest) complexes with compounds disposing lipophilic moieties and the changes of physical and chemical properties of both members caused by complexation, such as: solubilization of lipophilic compounds with low solubility in water, slow or controlled release of compounds (drugs, fragrances), speeding up bioavailability, stabilization of reactive compounds, fixation of volatile compounds and separation of compound in the form of complexes.

Geraniol is an essential oils ingredient, met in many important plant species, such as *Zingiber officinale*, *Citrus limon*, *Citrus aurantifolia*, *Lavandula latifolia*, *Myristica fragrans*, *Citrus sinensis*, *Cymbopogon martini*, *Rosa damascene* and *Rosa centifolia*. Geraniol, thanks to its nice smell (sweet fragrance alike to rose fragrance) is used in perfumery, cosmetics and domestic applications, as well as in food industry. It is also important for winery, as it is contained in aromatic grape varieties (*Vitis vinifera*) and contributes to its characteristic "floral" aroma and its flavor. In addition, geraniol is a natural antioxidant and it has been suggested to help prevent cancer, as well as, acute transplant rejection. Finally, it is studied and applied as insect repellent and animal repellent for agricultural exploitations. Its inclusion in cyclodextrin ( $\beta$ -CD) has been proven to be very important for the exploitation geraniol's interesting properties (increase in solubility, protection against high temperature and oxidative stress, slow or controlled release).

In this work, the complex of geraniol with  $\beta$ -CD is crystallized and analyzed with X-ray crystallography. The inclusion compound, geraniol/ $\beta$ -CD is crystallized in the monoclinic space group  $P2_1$ , with unit cell parameters:  $a=15.58$ ,  $b=24.98$ ,  $c=18.68\text{\AA}$ ,  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=110.91^\circ$ ,  $\gamma=90^\circ$ . The crystal structure has been determined by the molecular replacement method (program Dirdif), using as initial model the atomic coordinates of the complex indolobutyric acid/ $\beta$ -CD. The structure refinement was based on the least-square method, using SHELXL 97 program. The final model is obtained with  $R=0.0768$  and  $GooF=1.257$ . The complex is crystallized with stoichiometry host:guest, 1:1. In

---

the asymmetric unit, two  $\beta$ -CD molecules form a head-to-head dimer and two geraniol molecules, distributed in five positions, are encapsulated within this dimer. 16 water molecules, distributed in 25 positions have also been found in the asymmetric unit. The crystal packing for the crystallized complex is a channel of  $\beta$ -CD dimers across a- axis and the structure is stabilized with hydrogen bonds of a net of waters and hydrogen bonds between encapsulated geraniol molecules with guest and host molecules of adjacent  $\beta$ -CD dimers.

Επιστημονική Περιοχή:

Υπερμοριακή Χημεία	Supramolecular chemistry
Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ	X-ray Crystallography
Φαινόμενα Εγκλεισμού και Μακροκυκλική Χημεία	Inclusion Phenomena and Macrocylic Chemistry

Λέξεις Κλειδιά:

Γερανιόλη	Geraniol
$\beta$ -κυκλοδεξτρίνη	$\beta$ -cyclodextrin
Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ	x-ray crystallography
Προϊόντα Εγκλεισμού	Inclusion complexes
Κρυσταλλική δομή	Crystal structure

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	9
ΣΚΟΠΟΣ.....	11
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	13
1. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ.....	14
2. ΓΕΡΑΝΙΟΛΗ.....	15
2.1 Γενικά.....	15
2.2 Σημασία γερανιόλης.....	17
3. ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ (CDs).....	19
3.1 Γενικά.....	19
3.2 Χημική Προέλευση.....	21
3.3 Περιγραφή Δομής CD.....	23
3.4 Εφαρμογές των CDs.....	27
4. ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ CDs.....	29
4.1 Γενικά.....	29
4.2 Μηχανισμός εγκλεισμού.....	30
4.3 Χημεία εγκλεισμού.....	31
4.4 Η στοιχειομετρία των συμπλόκων CD.....	33
4.5 Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού.....	34
4.5.1 Γεωμετρική συμβατότητα.....	34
4.5.2 Πολικότητα, φορτίο.....	35
4.5.3 Περιβάλλον.....	36
4.6 Μέθοδοι παρασκευής συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης.....	38
4.7 Τεχνικές μελέτης συμπλόκων κυκλοδεξτρινών.....	39
4.8 Εγκλεισμός γερανιόλης σε β-CD.....	40
5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΟΜΗΣ.....	41
5.1 Τεχνικές ταυτοποίησης και Μελέτης Δομής και Στερεοχημείας.....	41
5.2 Κρυσταλλογραφική μελέτη των κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων εγκλεισμού.....	42
6. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ-X.....	43
6.1 Γενικά.....	43
6.2 Κρυστάλλωση.....	43
6.3 Ακτίνες-X και η Περίθλαση τους από Κρύσταλλο.....	45
6.3.1 Πηγες ακτίνων-X.....	45
6.3.2 Περίθλαση ακτίνων-X από κρύσταλλο.....	46
6.4 Προσδιορισμός της δομής.....	48
6.4.1 Γενικά.....	48
6.4.2 Ανάλυση Δεδομένων.....	49
6.4.2.1 Συλλογή- Αναγωγή δεδομένων.....	49
6.4.2.2 Επίλυση δομής (αρχικές φάσεις).....	51
6.4.2.3 Βελτιστοποίηση δομής και κατασκευή του μοριακού μοντέλου.....	52
6.4.2.4 Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας.....	54
6.4.3 Έλεγχος αξιοπιστίας των συντεταγμένων της δομής.....	56
6.4.4 Οπτικοποίηση.....	56
6.4.5 Κατάθεση της δομής.....	57
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	59
7. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ.....	60
7.1 Κρυστάλλωση συμπλόκου γερανιόλης/β-CD.....	60
8. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	62
9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	65
9.1 Αναγωγή δεδομένων.....	65
9.2 Επίλυση δομής και βελτιστοποίηση δομής.....	66
9.3 Έλεγχος αξιοπιστίας των συντεταγμένων της δομής.....	70

---

9.4	Οπτικοποίηση .....	70
9.5	Κατάθεση της δομής .....	70
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>		<b>73</b>
10.	ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΓΕΡΑΝΙΟΛΗΣ/ <i>B</i> -CD .....	74
11.	ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ ( <i>B</i> -CD) ΣΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ .....	76
12.	ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΔΙΜΕΡΟΥΣ ΤΗΣ <i>B</i> -CD ΣΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΓΕΡΑΝΙΟΛΗΣ/ <i>B</i> -CD .....	87
13.	ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΓΕΡΑΝΙΟΛΗΣ/ <i>B</i> -CD .....	91
14.	ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΔΙΜΕΡΩΝ ΤΗΣ <i>B</i> -CD (CRYSTAL PACKING) .....	95
15.	ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΝΕΡΟΥ .....	102
15.	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ-ΣΧΟΛΙΑ .....	105
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>		<b>106</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι .....</b>		<b>117</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ .....</b>		<b>119</b>



---

## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η δομική μελέτη του προϊόντος εγκλεισμού της γερανιόλης σε  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη ( $\beta$ -CD) με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός γερανιόλης σε  $\beta$ -CD και κρυστάλλωση του συμπλόκου αυτού. Ακολούθησε συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων από περίθλαση ακτίνων-Χ και επεξεργασία αυτών για τον προσδιορισμό ενός αξιόπιστου προτύπου της δομής του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD.

Η γερανιόλη είναι ένα άκυκλο μονοτερπένιο, το οποίο αποτελεί σημαντικό συστατικό των αιθερίων ελαίων του γερανιού, του τζίντζερ, του λεμονιού, τη λεβάντας, του μοσχοκάρυδου, του πορτοκαλιού, της παλμαρόζας, του τριαντάφυλλου και της κιτρονέλλας (Hagvall *et al.*, 2008). Ως ένα συστατικό αιθερίων ελαίων με γλυκιά οσμή τριαντάφυλλου, χρησιμοποιείται στην αρωματοποιεία, στη σαπωνοποιεία και στην κοσμετική (Rastogi *et al.*, 1998; Rastogi *et al.*, 1996, Lapczynski, 2008, Tiwari and Kakkar, 2009), καθώς και στην βιομηχανία παραγωγής προϊόντων οικιακής χρήσης (Rastogi *et al.*, 2001, Lapczynski, 2008). Ακόμα, περιέχεται σε αρωματικές ποικιλίες σταφυλιών (*Vitis vinifera*) και συμβάλλει στο χαρακτηριστικό «λουλουδάτο» άρωμα τους και την γεύση τους (Luan *et al.*, 2004). Η γερανιόλη επίσης έχει αξιολογηθεί ως γευστικός παράγοντας κι έχει χρησιμοποιηθεί από τη βιομηχανία τροφίμων (Mourtzinou *et al.*, 2007; Tiwari and Kakkar, 2009). Παρουσιάζει ακόμα σημαντική ιατροφαρμακευτική δράση στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο καρκίνος, γεγονός που έχει φανεί τόσο σε *in vitro*, όσο και *in vivo* πειράματα (Shoff *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1997, Carnesecchi *et al.*, 2002, Carnesecchi *et al.*, 2004) και στην παρεμπόδιση της οξείας απόρριψης ξένου μολυσματικού (Ji *et al.*, 2002). Επίσης, παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Saccharomyces cerevisiae* (Prashar *et al.*, 2003), καθώς κι απωθητική δράση έναντι κάποιων ζώων πιθανά ανεπιθύμητων για τον άνθρωπο ή για κάποιες καλλιέργειες του και εντομοαπωθητική δράση (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

---

Τα μόρια της κυκλοδεξτρίνης (CD), από την άλλη, είναι σταθερά μόρια με ικανότητα να σχηματίζουν προϊόντα εγκλεισμού με διάφορα οργανικά ή ανόργανα μόρια. Τα προϊόντα εγκλεισμού που προκύπτουν παρουσιάζουν τροποποιημένες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες (Clarot *et al.*, 2000; Polyakov *et al.*, 2004). Για παράδειγμα, παρουσιάζουν αυξημένη διαλυτότητα και μεγαλύτερη σταθερότητα έναντι στρεσογόνων παραγόντων όπως είναι η αυξημένη θερμοκρασία, το φως και οι οξειδωτικοί παράγοντες (Clarot *et al.*, 2000). Τα εγκλεισμένα μόρια σε CDs αποκτούν την ικανότητα να απορροφούνται καλύτερα από τον ζωικό οργανισμό (μεγαλύτερη ικανότητα να διαπερνούν μεμβράνες, καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα) (Szejtli, 1988). Ακόμα, η προστασία που παρέχεται στα εγκλεισμένα μόρια έναντι της οξείδωσης, της φωτοεπαγόμενης αποσύνθεσης (ή των φωτοεπαγόμενων αλλοιώσεων), της θερμικής αποσύνθεσης και της εξάχνωσης, καθιστά τα εγκλεισμένα μόρια περισσότερο εύχρηστα και επιδεκτικά σε επεξεργασίες (Szente and Szejtli, 2004; Mourtzinos *et al.*, 2007; Steed and Atwood, 2002).

Ο εγκλεισμός της γερανιόλης σε CDs είναι σημαντικός καθώς προσφέρει στη γερανιόλη, η οποία είναι ένα πτητικό κι αρκετά ευπαθή μόριο, τη δυνατότητα αξιοποίησης των πολύτιμων ιδιοτήτων της. Για τον λόγο αυτό το προϊόν εγκλεισμού της σε CDs έχει μελετηθεί αρκετές φορές στο παρελθόν (Mourtzinos *et al.*, 2008; Decock *et al.*, 2008; Ehen, 2006; Clarot *et al.*, 2000; Bhandari *et al.*, 2001). Εντούτοις, η δομική μελέτη του συμπλόκου εγκλεισμού γερανιόλης με  $\beta$ -CD με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X πραγματοποιείται στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά. Η μέθοδος αυτή είναι η μόνη που δίνει ακριβείς πληροφορίες για την δομή του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή και ξενιζομένου μορίου και την διευθέτηση των μορίων μέσα στον κρύσταλλο.

---

# **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## 1. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

Τα αιθέρια έλαια (aetherolea) είναι πτητικά υδροφοβικά έλαια χαρακτηριστικής οσμής, τα οποία λαμβάνονται από τα φυτά ως σύνθετα μίγματα και είναι υπεύθυνα για ιδιότητες τους όπως το χαρακτηριστικό τους άρωμα και την γεύση τους (Gunnar Samuelsson, 2004). Συστατικά τους είναι κατά το μεγαλύτερο ποσοστό μονοτερπένια και σεσκιτερπένια. Περιέχουν δε και άλλες ενώσεις όπως φαινυλοπροπανοειδή, θειούχες ή αζωτούχες ενώσεις και αλεικυκλικούς υδρογονάνθρακες (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1996)

Τα αιθέρια έλαια, χάρη στην χαρακτηριστική τους οσμή, βρίσκουν εφαρμογή στην αρωματοποιία καλλυντικών και τροφίμων ως φυσικά αρώματα αλλά και στην ιατροφαρμακευτική χάρη στην αντιμυκητική και αντιβιοτική τους δράση με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες για τον ανθρώπινο οργανισμό και χωρίς να προκαλείται εθισμός.

Τα αιθέρια έλαια απομονώνονται από τα φυτά και ακολούθως διαχωρίζονται εκείνα τα συστατικά που μας ενδιαφέρουν (για μελέτη ή εκμετάλλευση) με διάφορες τεχνικές όπως με απόσταξη ή εκχύλιση με πτητικούς διαλύτες ή ψυχρή συμπύεση.

Μερικά παραδείγματα μονοτερπενίων κύριων συστατικών αιθερίων ελαίων είναι:

- i. Η γερανιόλη και η κιτρονελόλη, τα οποία περιέχονται στο έλαιο των τριανταφύλλων
- ii. Η λιναλοόλη και η λεβαντουλόλη, τα οποία περιέχονται στο έλαιο της λεβάντας
- iii. Η 2ζ-κιτράλη που περιέχεται στο έλαιο lemongrass
- iv. Η μενθόλη που περιέχεται στο έλαιο της μέντας
- v. Η πιπεριτόνη που περιέχεται στο έλαιο του ευκαλύπτου
- vi. Το μυρσένιο που περιέχεται στο έλαιο της δάφνης (Gunnar Samuelsson, 2004)

---

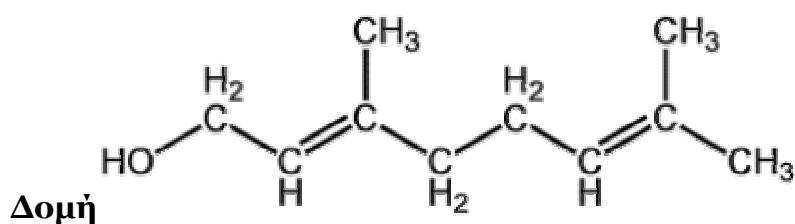
## 2. ΓΕΡΑΝΙΟΛΗ

### 2.1 Γενικά

Η γερανιόλη είναι ένα σημαντικό συστατικό αιθερίων ελαίων, το οποίο περιέχεται σε πολλά και σημαντικά φυτικά είδη όπως *Zingiber officinale* (τζίντζερ), *Citrus limon* (λεμόνι), *Citrus aurantifolia* (λάιμ), *Lavandula latifolia* (λεβάντα), *Myristica fragrans* (το μοσχοκάρυδο), *Citrus sinensis* (πορτοκάλι), *Cymbopogon martini* (παλμαρόζα), *Rosa damascene* και *Rosa centifolia* (τριαντάφυλλο). Πρόκειται για ένα άκυκλο τερπένιο (μονοτερπένιο), αποτελούμενο από 10 άτομα άνθρακα, το οποίο σημειώνεται ως το κύριο συστατικό του ελαίου του τριαντάφυλλου, του γερανιού και του ελαίου της παλμαρόζας. Είναι αλκοόλη και το όνομα της προέρχεται, όπως συνηθίζεται, από το όνομα του φυτού που απομονώθηκε πρώτα, το γεράνι (*Pelargonium* sp.) (Carnesecchi *et al.*, 2002; Hagvall *et al.*, 2008; Lijima *et al.*, 2004).

**ΓΕΡΑΝΙΟΛΗ (2,6-Dimethyl-trans-2,6-octadien-8-ol)**

**Χημικός τύπος** C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O



**Εικόνα 2.1**

**Πίνακας 2.1 Συνοπτικός πίνακας των κύριων ιδιοτήτων της γερανιόλης**

<b>Χημικός τύπος</b>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
<b>Μοριακό βάρος</b>	154.25
<b>Σημείο τήξης, °C</b>	-15
<b>Σημείο βρασμού, °C</b>	229
<b>Τάση ατμών (Vapor pressure, mmHg)</b>	0.013 (25 °C)
<b>Πυκνότητα</b>	0.8965g/cm <sup>3</sup> (0°C)
<b>Υδατοδιαλυτότητα</b>	Αδιάλυτο
<b>Δείκτης διάθλασης</b>	1.4744 (16°C)
<b>Συντελεστής κατανομής (Partition coefficient, pK<sub>ow</sub>)</b>	3.28
<b>Θερμότητα εξάτμισης (Heat of vaporization)</b>	54.2 KJ/mol

---

## 2.2 Σημασία γερανιόλης

Η γερανιόλη παρουσιάζει σημαντικές δράσεις στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο καρκίνος, γεγονός που έχει φανεί τόσο σε *in vitro*, όσο και *in vivo* πειράματα. Έχει αποδειχτεί η αντιογκική της δράση έναντι της λευχαιμίας των τρωκτικών, του παγκρεατικού όγκου και των καρκινικών κυττάρων του μελανού όγκου (Shoff *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1997). Ακόμα, σε πειράματα των Carnesecchi *et al.* σε ανθρώπινες σειρές κυττάρων, αποδείχτηκε σημαντική ανασταλτική δράση της γερανιόλης στην ανάπτυξη καρκίνου του εντέρου (Carnesecchi *et al.*, 2002), καθώς και σημαντική θεραπευτική δράση έναντι του καρκινικού όγκου του εντέρου, ιδίως όταν χορηγείται σε συνδυασμό με το άλλοτε αποτελεσματικό αντικαρκινικό φάρμακο για τον καρκίνο του εντέρου 5-fluorouracil (Carnesecchi *et al.*, 2004). Επίσης έχει δείχτεί ότι παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και κατά αυτόν τον τρόπο μπορεί να παρεμποδιστεί η οξεία απόρριψη ξένου μοσχεύματος στην περίπτωση μεταμόσχευσης (Ji *et al.*, 2002).

Ακόμα αιθέρια έλαια με κύριο συστατικό τους την γερανιόλη παρουσιάζουν σημαντικές δράσεις πιθανότατα χάρη στην παρουσία της γερανιόλης. Για παράδειγμα, το αιθέριο έλαιο του φυτικού είδους *Cymbopogon martini* (palmarose) παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Saccharomyces cerevisiae* (Prashar *et al.*, 2003). Το αιθέριο έλαιο του γένους *Cymbopogon* (έλαιο παλμαρόζας και κιτρονέλλας), όπως και η γερανιόλη που απομονώνεται από το γένος αυτό, παρουσιάζει σημαντική εντομοαπωθητική δράση, αλλά κι απωθητική δράση έναντι κάποιων ζώων πιθανά ανεπιθύμητων για τον άνθρωπο ή για κάποιες καλλιέργειες αυτού (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

---

Η γερανιόλη ως σημαντικό συστατικό πολλών αιθερίων ελαίων με γλυκιά οσμή τριαντάφυλλου, χρησιμοποιείται στην αρωματοποιεία, στη σαπωνοποιεία και στην κοσμετική (Rastogi *et al.*, 1998; Rastogi *et al.*, 1996, Lapczynski, 2008, Tiwari and Kakkar, 2009), καθώς και στην βιομηχανία παραγωγής προϊόντων οικιακής χρήσης (Rastogi *et al.*, 2001, Lapczynski, 2008). Ακόμα έχει αξιολογηθεί ως γευστικός παράγοντας κι έχει χρησιμοποιηθεί από τη βιομηχανία τροφίμων (Mourtzinou *et al.*, 2007; Tiwari and Kakkar, 2009). Επίσης είναι σημαντική για την οινοποιία καθώς περιέχεται σε αρωματικές ποικιλίες σταφυλιών (*Vitis vinifera*) και συμβάλλει στο χαρακτηριστικό «λουλουδάτο» άρωμα τους και στη γεύση τους (Luan *et al.*, 2004).



## 3. ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ (CDs)

### 3.1 Γενικά

Πρόκειται για μακροκυκλικούς ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι συνήθως από 6, 7, ή 8 γλυκοζιτικές υπομονάδες, οι οποίες ονομάζονται αντιστοίχως  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ - κυκλοδεξτρίνες (CDs).

Σύμφωνα με τον Stoddart (Stoddart, 1989) «Οι CDs είναι μοριακά δοχεία γενικής χρήσεως για οργανικά, ανόργανα και οργανομεταλλικά συστατικά, τα οποία μπορούν να είναι ουδέτερα, κατιονικά, ανιονικά, ή ακόμα και δραστικά μόρια». Συνήθως συντίθενται από γλυκοπυρανοζιδικές υπομονάδες με  $^4C_1$  διαμόρφωση. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι CDs, ως ξενιστές, έχουν μια μέση δομή κόλουρου κώνου με μια κοιλότητα που σχηματίζεται με H3 και H5 πρωτόνια και μονήρη ζεύγη από γλυκοζιδικά άτομα οξυγόνου που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο, το οποίο προσφέρει τον υδροφοβικό χαρακτήρα στην κοιλότητα, ενώ οι βάσεις που σχηματίζονται από τις πρωτοταγείς και δευτεροταγείς υδροξυλομάδες δημιουργούν υδροφιλικό χαρακτήρα στο εξωτερικό του μορίου (Dodziuk, 2006).

Η μεγάλη σημασία των CDs τόσο στην έρευνα όσο και στη βιομηχανία βασίζεται στην ικανότητα τους να εγκλείουν μόρια κατά εκλεκτικό τρόπο, χάρη στο φαινόμενο της μοριακής αναγνώρισης ή της χειρομορφικής αναγνώρισης αναφερόμενοι σε εναντιομερή μόρια. Η μελέτη των παραγόντων που οδηγούν σε αυτή την εκλεκτική συμπλοκοποίηση είναι πολύ σημαντική, καθώς αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί σε πολλές εφαρμογές προσχεδιασμένης συμπλοκοποίησης (Dodziuk, 2006).

Με βάση τις μελέτες με ακτίνες-X, οι φυσικές CDs θεωρούνταν για χρόνια ότι κατέχουν μια άκαμπτη δομή κόλουρου κώνου. Αυτή η άποψη δεν συμβιβάζεται τόσο με την ικανότητα των CDs να σχηματίζουν σύμπλοκα με ξενιζόμενα μόρια διαφόρων μορφών, όσο και με πειραματικά και θεωρητικά αποτελέσματα. Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα παρέχεται από τους διαφορετικούς τρόπους εισόδου του ξενιζομένου μορίου στο σύμπλοκο νιτροφαινόλης με τριμεθυλιωμένη (permethylated)  $\alpha$ -CD στην περίπτωση της στερεής κατάστασης και στην περίπτωση διαλύματος (Dodziuk, 2006).

---

Πολυάριθμα παράγωγα των CDs έχουν συντεθεί με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων συμπλοκοποίησης και την τροποποίηση κάποιων ιδιοτήτων των συμπλόκων που αυτές σχηματίζουν έτσι ώστε να γίνονται καταλληλότερα για κάποιες εφαρμογές. Για παράδειγμα, ένα φαρμακευτικό μόριο συμπλοκοποιημένο με κάποιο CD παράγωγο μπορεί να έχει ακόμα μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα από ότι θα είχε συμπλοκοποιημένο με κάποια φυσική CD. Για τον λόγο αυτό, έχουν παρασκευαστεί πολυάριθμα CDs παράγωγα μονο- ή πολυ- υποκατεστημένων στις θέσεις 2, 3 ή/και 6 από αλκυλικές ομάδες καθώς και τροποποιήσεις των υδροξυλομάδων σε σουλφοπρόπυλ, καρβοξυμέθυλ, τόσυλ, αλδεΐδο, σιλύλ και πολλές άλλες ομάδες έχουν επιτευχθεί.

Η CD κατάλυση και οι εφαρμογές των CD ως ενζυμικά μοντέλα αποτελούν επίσης ένα ενδιαφέρον πεδίο. Οι CD είναι γνωστές ως καταλύτες πολυάριθμων αντιδράσεων (Dodziuk, 2006).

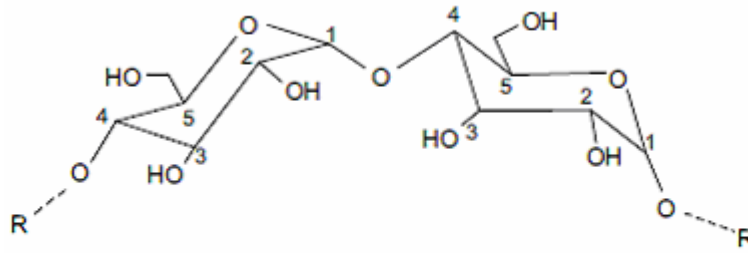
---

## 3.2 Χημική Προέλευση

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι ημι-συνθετικά προϊόντα που παράγονται από το άμυλο, ένα ανανεώσιμο φυσικό υλικό, μέσω μιας απλής ενζυμικής μετατροπής.

Το άμυλο, μαζί με την κυτταρίνη αποτελούν τα κύρια προϊόντα της φωτοσύνθεσης. Από την αποδόμηση του αμύλου προκύπτουν η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη, ενώ με ενζυμική υδρόλυση της πρώτης προκύπτουν οι δεξτρίνες. Οι δεξτρίνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε βιομηχανίες τροφίμων και σε βιομηχανίες υφασμάτων και χάρτου, μπορούν να αποδομηθούν, με τη βοήθεια του ενζύμου γλυκοζοτρανσφεράση και να υποστούν ενδομοριακή κυκλοποίηση.

Υπάρχουν πολλοί οργανισμοί που περιέχουν γλυκοζοτρανσφεράσες. Οι γλυκοζοτρανσφεράσες μερικών μόνο από αυτούς τους οργανισμούς έχουν μελετηθεί. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την σύνθεση σημαντικών ολίγο- και πολύ-σακχαριτών. Οι προκύπτουσες CDs περιέχουν 6-12 μονάδες γλυκόζης ανά δακτύλιο ενώ οι συχνότερα παρατηρούμενες είναι οι  $\alpha$ -,  $\eta$   $\beta$ -, και  $\eta$   $\gamma$ - CDs (με 6, 7 ή 8 μονάδες γλυκόζης αντίστοιχα). Οι σχετικές ποσότητες αυτών των τριών ομάδων εξαρτώνται από τον τύπο του ενζύμου που χρησιμοποιείται και μπορεί να επηρεαστεί από την προσθήκη οργανικών ενώσεων (Saenger, 1980).



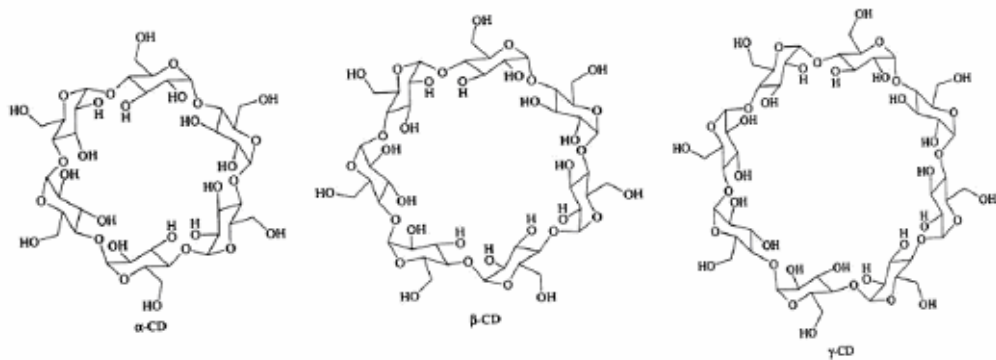
**Εικόνα 3.1 A(1,4)- γλυκοζιδικός δεσμός μεταξύ δύο μορίων γλυκοπυρανόζης**

Η γλυκοζο-τρανσφεράση που προέρχεται από τον *Bacillus* No. 38-2 είναι ένα ένζυμο κατάλληλο για την βιομηχανική παραγωγή της  $\beta$ -CD με αρκετά υψηλή απόδοση, ενεργό ακόμη και στους 80°C και σε pH 6-10, δηλαδή σε συνθήκες υπό τις οποίες δεν δρουν άλλα ένζυμα. Το 80% του αμύλου μετατρέπεται κυρίως σε  $\beta$ -CD (Saenger, 1980).

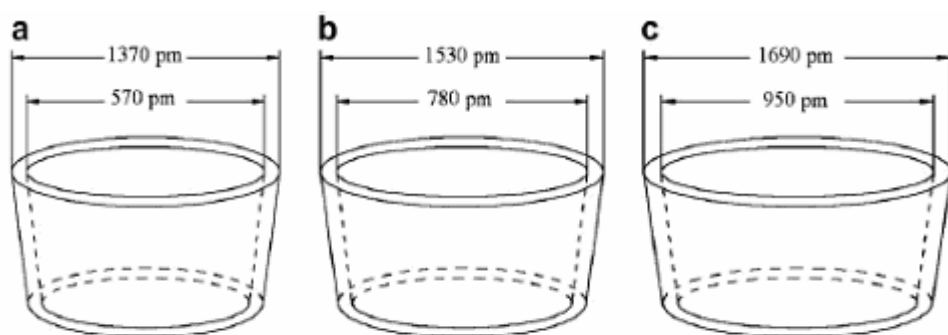
Οι ελεύθερες CD απομονώνονται με συμπλοκοποίηση με τολουένιο, το οποίο είναι το κατάλληλο αντιδραστήριο που προστίθεται στο μίγμα μετατροπής που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των CD. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο  $\beta$ -CD διαχωρίζεται αμέσως και η αντίδραση μετατοπίζεται προς τον σχηματισμό της  $\beta$ -CD. Οι βιομηχανικά παραγόμενες κυκλοδεξτρίνες είναι 99% καθαρές (Saenger, 1980).

### 3.3 Περιγραφή Δομής CD

Οι  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ -CD είναι ολιγοσακχαρίτες 6-8 μονάδων  $\alpha$ -D γλυκοπυρανόζης, οι οποίες έχουν διαμόρφωση ανάκλιντρου, συνδεδεμένες με ( $\alpha$ -1,4)- γλυκοζιτικούς δεσμούς. Έτσι σχηματίζονται κυκλικά μόρια, σχήματος κόλουρου κώνου. Οι περιφέρειες των CD, γενικά, παρουσιάζουν υδρόφιλο χαρακτήρα, εξαιτίας της παρουσίας υδροξυλομάδων (πρωτοταγών και δευτεροταγών), ενώ η κοιλότητα παρουσιάζει υδρόφοβο χαρακτήρα λόγω της παρουσίας αιθερικών ατόμων οξυγόνου, αλλά και πολλών ατόμων υδρογόνου των C3H και C5H μεθινικών ομάδων και C6H2 μεθυλενικών ομάδων. Οι διαστάσεις του κόλουρου κώνου φαίνονται στην Εικόνα 3.3 (Harata, 1998; Steed and Atwood, 2002). Το άνοιγμα της κοιλότητας της μακροκυκλικής δομής της CD καθορίζεται από ένα πολύγωνο που συντίθεται από τα γλυκοζιτικά O4 άτομα. Η μέση ακτίνα των O4 πολυγώνων, είναι 4,3, 5,0 και 5,9Å στην  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ -CD αντίστοιχα, ενώ τα πλευρικά μήκη κυμαίνονται μεταξύ 4,2 και 4,6Å. Η κοιλότητα επενδύεται εσωτερικά από τα άτομα υδρογόνου και τις γέφυρες γλυκοζιτικού οξυγόνου, αντίστοιχα. Τα μη συζευμένα ηλεκτρονιακά ζεύγη των γεφυρών του γλυκοζιτικού οξυγόνου κατευθύνονται προς το εσωτερικό της κοιλότητας παράγοντας υψηλή ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην κοιλότητα, προσδίδοντας σε αυτή κάποια χαρακτηριστικά βάσης κατά Lewis (Naidoo *et al.*, 2004, Saenger, 1987, Steed and Atwood, 2000). Στο μεγαλύτερο χείλος του κόλουρου κώνου βρίσκονται τα δευτεροταγή υδροξύλια και στο μικρότερο τα πρωτοταγή, των οποίων η ελεύθερη περιστροφή μειώνει την αποτελεσματική διάμετρο της κοιλότητας. Η C2-OH ομάδα μιας γλυκοπυρανοζιτικής ομάδας σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την C3-OH ομάδα της γειτονικής μονάδας γλυκοπυρανόζης κι έτσι στην περίπτωση της  $\beta$ -CD σχηματίζονται 7 τέτοιοι δεσμοί υδρογόνου, οι οποίοι ευθύνονται και για την μεγαλύτερη ακαμψία του μορίου της CD και τη μικρότερη διαλυτότητα στο νερό σε σύγκριση με τα μόρια  $\gamma$ - και  $\alpha$ -CD (Naidoo *et al.*, 2004; Saenger, 1987).



**Εικόνα 3.2** Χημικές δομές  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ -CDs.



**Εικόνα 3.3** Κατά προσέγγιση γεωμετρικές διαστάσεις των α)  $\alpha$ -, β)  $\beta$ - και γ)  $\gamma$ - CD (Steed and Atwood, 2002).



**Εικόνα 3.4 Διαστάσεις και υδρόφιλες/υδρόφοβες περιοχές των CD μορίων (Szejtli, 2004)**

<b>Συγκριτικός πίνακας <math>\alpha</math>-, <math>\beta</math>- και <math>\gamma</math>- CDs</b>			
	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Αριθμός γλυκοζιτικών μονάδων	6	7	8
Μοριακά βάρη	972	1134	1296
Κατά προσέγγιση διάμετρο εσωτερική κοιλότητα (nm)	500	620	800
Κατά προσέγγιση πυκνότητα (10 <sup>6</sup> ρm <sup>3</sup> )	1460	1540	1750
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> στους 25°C	150+/- 0.5	162.5+/- 0.5	177.4+/- 0.5
Διαλυτότητα στο νερό (θερμοκρασία δωματίου, g/100mL)	14.5	1.85	23.2
Επιφανειακή τάση(MN/m)	71	71	71
Έυρος θερμοκρασίας τήξης (°C)	255-260	255-265	240-245
Περιεχόμενο κρυστάλλου σε νερό (wt.%)	10.2	13-15	8-18
Μόρια νερού στην κοιλότητα	6	11	17

**Πίνακας 3.1 Συγκριτικός πίνακας  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ - κυκλοδεξτρινών (CDs).**



### 3.4 Εφαρμογές των CDs

Κάθε χρόνο χιλιάδες τόνοι CDs παράγονται μέσω τεχνολογιών φιλικών για το περιβάλλον, και για τον λόγο αυτό η τιμή τους δεν είναι πλέον απαγορευτική για βιομηχανικές εφαρμογές.

Ο εγκλεισμός ενώσεων μέσω του σχηματισμού συμπλόκου επιφέρει σημαντικές τροποποιήσεις των ιδιοτήτων των εγκλειόμενων ουσιών. Για τον λόγο αυτό, η τεχνολογία αυτή της «μοριακής ενθυλάκωσης» χρησιμοποιείται ευρύτατα σε πολλά βιομηχανικά προϊόντα, τεχνολογίες και αναλυτικές μεθόδους. Σε αυτό συμβάλλει και το γεγονός ότι οι CDs δεν παρουσιάζουν τοξικότητα και επομένως μπορούν να καταναλωθούν ως συστατικά φαρμάκων, τροφίμων ή καλλυντικών (Szejtli, 1998). Ακόμα, χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες εντομοκτόνων και αρωματικών χώρου.

Μερικές από τις επιθυμητές ιδιότητες που επιφέρει ο εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνη είναι:

- I. Η σταθεροποίηση μορίων ευαίσθητων σε φως ή οξυγόνο.
- II. Ο έλεγχος της χημικής δραστηριότητας των ξενιζομένων μορίων.
- III. Σταθεροποίηση των πολύ πτητικών ουσιών και παρεμπόδιση της εξάτμισης τους και κατά αυτόν τον τρόπο ασφαλέστερη αποθήκευση και ασφαλέστερο χειρισμό.
- IV. Τροποποίηση ορισμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ξενιζομένων μορίων, όπως η αύξηση της διαλυτότητας αρκετά δυσδιάλυτων ουσιών, η βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας ενός φαρμάκου ελάχιστα διαλυτού σε νερό (ταχύτερη διάλυση στο νερό, ταχύτερη και πληρέστερη απορρόφηση), αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης του ξενιζομένου μορίου (κάλυψη ή μεταβολή χρώματος), παρεμπόδιση δυσάρεστων οσμών ή γεύσεων (Szejtli, 1998).

Οι εφαρμογές των CDs αναφέρονται κυρίως στη Βιομηχανία τροφίμων. Το 80-90% της παγκόσμιας παραγωγής προορίζεται για αυτήν χάρη στην σταθερότητα που προσφέρει στις υψηλές θερμοκρασίες (οι οποίες συχνά χρησιμοποιούνται κατά την επεξεργασία των τροφίμων), στην ανθεκτικότητα διαφόρων αρωματικών ενώσεων έναντι της οξειδωσης, την ανθεκτικότητα έναντι της θερμικής αποδιάταξης, την σταθερότητα χρωματισμού, την ευκολία χειρισμού κ.ά (Steed and Atwood, 2002).

---

Σημαντικές είναι οι εφαρμογές τους στη βιομηχανία φαρμάκων, συγκεκριμένα στην τυποποίηση των φαρμάκων (μορφή ταμπλέτας). Επιπλέον οι εφαρμογές τους επεκτείνονται και στην αναλυτική χημεία σε διάφορες τεχνικές όπως TLC, GC, HPLC. Τέλος, τα μόρια αυτά χρησιμοποιούνται και ως βιομημητικά μόρια από την βιοτεχνολογία (Steed and Atwood, 2002).

---

## 4. ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ CDs

### 4.1 Γενικά

Οι CDs μπορούν να αλληλεπιδρούν με ποικιλία μεταλλικών ιόντων και μη-πολικών (ουδετέρων) μορίων. Τα προϊόντα εγκλεισμού ανήκουν στον τύπο των συμπλόκων «ξενιστή-ξενιζόμενο μόριο». Τα μόρια ξενιστή και ξενιζόμενου έχουν θέσεις πρόσδεσης στερεοηλεκτρονικά συμπληρωματικές. Χαρακτηριστικό γνώρισμα του ξενιστή είναι ότι οι θέσεις πρόσδεσης είναι προσανατολισμένες με την ίδια διεύθυνση στον χώρο, ενώ οι θέσεις πρόσδεσης του ξενιζόμενου μορίου αποκλίνουν στο σύμπλοκο. Οπότε η σχέση των αποκλινόντων και συγκλινόντων θέσεων πρόσδεσης ξενιστή-ξενιζόμενου είναι αυτή που εκφράζει την σταθερότητα αυτού (Schlenk *et al.*, 1950; Szejtli, 1988).

Για τον σχηματισμό του συμπλόκου, πραγματοποιείται αντικατάσταση των μορίων του νερού υψηλής ενθαλπίας από κατάλληλο ξενιζόμενο μόριο και η συχνότερη αναλογία μορίων ξενιστή και ξενιζόμενου μορίου που συναντάται είναι 1:1. Το ξενιζόμενο αυτό μόριο είναι συνήθως άπολο μόριο-δέκτης και το σύμπλοκο πραγματοποιείται μετά από αλληλεπίδραση αυτού με κυκλοδεξτρίνη σε υδατικό περιβάλλον.

Το ισοζύγιο σύνδεσης-αποσύνδεσης μέσα σε διάλυμα είναι ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της σχέσης ξενιστή-ξενιζόμενου μορίου, καθώς ο εγκλεισμός είναι μια θερμοδυναμική κατάσταση ισορροπίας της μορφής. Τα μόρια ξενιστή και ξενιζόμενου συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς, με δυνάμεις όπως ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις λόγω μεταφοράς φορτίου (Liu, 2002; Szejtli, 1988).

---

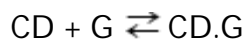
## 4.2 Μηχανισμός εγκλεισμού

Ο σχηματισμός συμπλόκου εγκλεισμού περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχειώδη βήματα:

- 1) Τα μόρια νερού φεύγουν από την κοιλότητα της CD και μετακινούνται σε ένα ενεργειακό επίπεδο αντίστοιχο με εκείνο της αέριας κατάστασης. Κατά συνέπεια, οι αλληλεπιδράσεις van der Waals και ο αριθμός των υδρογονικών δεσμών μειώνεται, ενώ οι βαθμοί ελευθερίας μετατόπισης και περιστροφής των ελευθέρων μορίων νερού αυξάνονται.
- 2) Η ενέργεια διαμόρφωσης του δακτυλίου της CD μειώνεται στην περίπτωση της  $\alpha$ - ή της τροποποιημένης  $\beta$ -CD.
- 3) Το άπολο ξενιζόμενο μόριο απαλλάσσεται από το ενυδατωμένο περίβλημα του κι επίσης υιοθετεί την κατάσταση του ιδανικού αερίου. Αυτό το άδειο περίβλημα ενυδάτωσης καταρρέει και αναδιατάσσεται.
- 4) Το ξενιζόμενο μόριο, θεωρούμενο ότι βρίσκεται σε κατάσταση ιδανικού αερίου, εισέρχεται στην άδεια κοιλότητα CD και το σύμπλοκο σταθεροποιείται με αλληλεπιδράσεις Van der Waals, και μερικές φορές με υδρογονικούς δεσμούς. Το ξενιζόμενο μόριο διατηρεί ένα βαθμό ελευθερίας που αντιστοιχεί σε μονοδιάστατη περιστροφή.
- 5) Τα εκτοπιζόμενα μόρια νερού συμπυκνώνονται από την αέρια στην υγρή κατάσταση. Αλλαγές στην ενθαλπία και την εντροπία μπορούν να θεωρηθούν ως ενδεικτικές με εκείνες της καλά γνωστής συμπύκνωσης νερού.
- 6) Η δομή του νερού αποκαθίσταται γύρω από τα εκτεθειμένα μέρη του ξενιζομένου μορίου, και ενσωματώνεται σε κέλυφος ενυδάτωσης του δακτυλίου της CD (Szejtli, 1988).

### 4.3 Χημεία εγκλεισμού

Ο εγκλεισμός είναι μια διαδικασία θερμοδυναμικής ισορροπίας με συντελεστή συσχέτισης, την σταθερά συμπλοκοποίησης  $K_{ass}$  (association constant,  $K$ ), που δίνεται από τη σχέση:



$$K_{ass} = [CD.G]/[CD].[G]$$

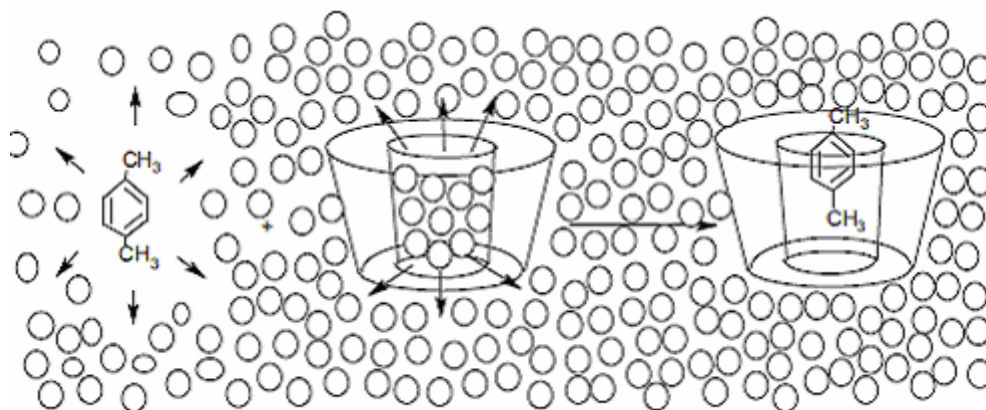
Πρωτίστως, οι κρίσιμοι παράγοντες για τον εγκλεισμό είναι:

- 1) στερεοχημική παρεμπόδιση
- 2) απελευθέρωση νερού υψηλής ενέργειας
- 3) υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις
- 4) αλληλεπιδράσεις van der Waals
- 5) δυνάμεις διασποράς
- 6) αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου
- 7) αλληλεπιδράσεις μεταφοράς φορτίου
- 8) ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και
- 9) υδρογονικοί δεσμοί

Γενικά το μέγεθος του ξενιζόμενου μορίου που μπορεί να φιλοξενηθεί αυξάνεται όσο το μέγεθος της CD αυξάνει, αν και υπάρχει κάποια ευελιξία στις δομές του ξενιστή και η καταλληλότητα του μεγέθους δεν είναι ένα άκαμπτο κριτήριο. Η απελευθέρωση υψηλής ενέργειας νερού και η υδροφοβική αλληλεπίδραση περιλαμβάνει δύο ενεργειακούς όρους: α) το ενθαλπικό κέρδος όπως προκύπτει από τα υψηλής ενέργειας μόρια του διαλύτη που αποδεσμεύονται από την κοιλότητα και επανασυνδέονται με τον όγκο του διαλύτη και β) το εντροπικό κέρδος καθώς δύο τρύπες στον όγκο του διαλύτη, του ξενιστή και του ξενιζόμενου μορίου, επάγονται σε μία, σύμπλοκο.

Κατά το κλασσικό υδροφοβικό φαινόμενο η εντροπία του συστήματος μειώνεται, αλλά αυτό δεν συμβαίνει πάντα στα σύμπλοκα CD επειδή η κοιλότητα τους δεν είναι πραγματικά υδροφοβική. Στην πραγματικότητα, έχει μια ποικιλία από λειτουργικότητες και περιγράφεται καλύτερα ως μη πολική. Παρ'όλα αυτά, οι μη κλασσικές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να είναι υψίστης σημασίας.

Επιπρόσθετα των παραπάνω παραγόντων, συχνά στερεά και διαλυμένα σύμπλοκα σταθεροποιούνται με επιπρόσθετες ενθαλπικά ευνοούμενες αλληλεπιδράσεις, όπως υδρογονικούς δεσμούς μεταξύ ξενιζόμενου μορίου και πρωτοταγή ή δευτεροταγή υδροξυλικές ομάδες της κυκλοδεξτρίνης, διπολικές αλληλεπιδράσεις και van der Waals δυνάμεις (Szejtli, 1988; Steed and Atwood, 2002).



**Εικόνα 4.1 Σχηματική απεικόνιση της συμπλοκοποίησης εγκλεισμού του p-ξυλένιου από μια κυκλοδεξτρίνη.**

Όσο μεγαλύτερο είναι το ξενιζόμενο μόριο, τόσο πιο αργά γίνεται ο σχηματισμός και η διάσπαση του συμπλόκου. Ο ιονισμός του ξενιζόμενου μορίου μειώνει τον ρυθμό του σχηματισμού και της αποδιάταξης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα μόρια νερού είναι ισχυρότερα συνδεδεμένα σε ένα ιονισμένο μόριο, για παράδειγμα σε ένα φαινολικό ιόν, από ότι σε ένα ουδέτερο μόριο (Szejtli,1988).

#### 4.4 Η στοιχειομετρία των συμπλόκων CD

Στο διάλυμα μπορεί να συνυπάρχουν 1:1, αλλά και 1:2, 2:1 ή 2:2 σύμπλοκα ξενιστή: ξενιζόμενο μόριο ανάλογα με τις ιδιότητες του ξενιζομένου μορίου (π.χ το μέγεθος και το σχήμα) και την συγκέντρωση CD και/ή του ξενιζομένου μορίου. Η αναλογία ασυμπλοκοποιητού/συμπλοκοποιημένου για ξενιζομένου μορίου καθορίζεται από την ισορροπία σύνδεσης/αποσύνδεσης. Εντούτοις, οι στοιχειομετρικές αναλογίες διαφέρουν στην κρυσταλλική κατάσταση με την μοριακή αναλογία να είναι επαυξημένη ως προς τον αριθμό των ξενιζομένων μορίων ανά μόριο CD.

Τα σύμπλοκα CD στην κρυσταλλική κατάσταση, σύμφωνα με θεωρητικούς υπολογισμούς και πειραματικές παρατηρήσεις, χαρακτηρίζονται από πλήρως καθορισμένες και αυστηρά σταθερές αναλογίες ξενιστή-ξενιζομένου μορίου. Η στοιχειομετρία επηρεάζεται από την ταυτόχρονη κρυστάλλωση συμπλόκων CD με μόρια νερού ως ξενιζόμενα μόρια. Συνηθίζεται μια σύνθεση 1:1 ή 1:2 μοριακής αναλογίας, εντούτοις σπανίως είναι ακριβής καθώς παρατηρούνται συχνά ως ατέλειες ενυδατωμένη CD και/ή ξενιζόμενο μόριο. Η στοιχειομετρία του κρυσταλλωμένου συμπλόκου μπορεί να βελτιωθεί, αν μελετηθούν οι ουσίες που επηρεάζουν την ενυδάτωση και κατ'επέκταση την κρυστάλλωση του (Szejtli, 1988).

Παρασκευάζοντας σύμπλοκα με διαφοροποιημένες αναλογίες ξενιστή-ξενιζομένου μορίου, τα προϊόντα μπορεί να δείξουν αρκετά διαφορετική σύνθεση, αλλά με προσεκτική απομάκρυνση των μη συμπλοκοποιημένων συστατικών για αποφυγή καταστροφής των συμπλόκων (π.χ με χρήση ενός διαλύτη που δεν σχηματίζει σύμπλοκο), παρατηρείται επίσης μια αυστηρά σταθερή στοιχειομετρία.

Η στοιχειομετρία καθαρών συμπλόκων καθορίζεται μόνο από την φύση του ξενιζομένου μορίου και το μέγεθος της κοιλότητας της CD ή των προϊόντων αυτής (Szejtli, 1988).

## 4.5 Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού

Οι προαπαιτούμενες συνθήκες για τον σχηματισμό συμπλόκων ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες:

### 4.5.1 Γεωμετρική συμβατότητα

Περισσότερο οι γεωμετρικοί παρά οι χημικοί παράγοντες είναι καθοριστικοί στον καθορισμό του είδους των ξενιζομένων μορίων που μπορούν να εισχωρήσουν στην κοιλότητα της CD. Έτσι, οι CDs είναι ικανές να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με συστατικά που έχουν συμβατό μέγεθος με τις διαστάσεις της κοιλότητας των CDs (οι  $\alpha$ -,  $\beta$ -, και  $\gamma$ -CD διαφέρουν ως προς τις εσωτερικές διαμέτρους τους). Εντούτοις, η δομή των συμπλόκων εγκλεισμού CD διαφοροποιείται σημαντικά στην κρυσταλλικής μορφή απ'ότι σε ένα διάλυμα. Στην κρυσταλλική κατάσταση τα ξενιζόμενα μόρια μπορούν να διευθετηθούν όχι μόνο στην κοιλότητα του μορίου CD, αλλά επίσης και στις διαμοριακές κοιλότητες που σχηματίζονται από το κρυσταλλικό πλέγμα ή τον σχηματισμό σάντουιτς μεταξύ δύο μορίων CD. Αντίθετα, σε ένα διάλυμα το ξενιζόμενο μόριο βρίσκεται στην κοιλότητα της CD και το όλο σύμπλοκο περικλείεται από κέλυφος διαλύτη. Ακόμα, μερικά από τα μόρια CD παραμένουν χωρίς να καταλειφθούν ή καταλαμβάνονται από μόρια νερού στην κρυσταλλική κατάσταση\*, γεγονός που επηρεάζει και την στοιχειομετρία των συμπλόκων.

Τα ξενιζόμενα μόρια κατά κανόνα προσανατολίζονται στην κοιλότητα του ξενιστή σε τέτοια θέση ώστε να επιτυγχάνεται το μέγιστο της επαφής μεταξύ του υδροφοβικού μέρους του ξενιζομένου μορίου και της μη πολικής κοιλότητας CD. Το υδρόφιλο τμήμα του ξενιζόμενου μορίου παραμένει, όσο είναι δυνατό, στην εξωτερική περιοχή του συμπλόκου. Αυτό εξασφαλίζει την μέγιστη επαφή τόσο με τον διαλύτη όσο και με τις υδροξυλικές ομάδες του ξενιστή. Ο σχηματισμός συμπλόκου με μόρια σημαντικά μεγαλύτερα από την κοιλότητα είναι επίσης δυνατός. Αυτό γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε μόνο μερικές ομάδες ή πλευρικές αλυσίδες να εισχωρούν στην υδρογονανθρακική κοιλότητα. Συχνά παρατηρείται αύξηση στην διαλυτότητα δυσδιάλυτων συγκριτικά μεγάλου όγκου μορίων (π.χ μορφίνη, κορτιζονικός εστέρας) όταν αυξηθεί η συγκέντρωση της CD σε υδατικά διαλύματα, ενδεικτικό της συμπλοκοποίησης αυτών με CD. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί μόνο από το



γεγονός ότι η παρουσία λειτουργικών ομάδων που μπορούν να εισχωρούν μέσα στην κοιλότητα αρκούν για την επίτευξη συμπλόκου με CD.

Ακόμα η έλλειψη στερεοχημικών περιορισμών είναι πολύ σημαντική για την συμπλοκοποίηση με CD. Οι στερεοχημικές απαιτήσεις συμπλοκοποίησης μπορούν να αξιολογηθούν μέσω των Stuart μοριακών μοντέλων (Szejtli, 1988). Καθώς οι στερεοχημικές απαιτήσεις είναι λιγότερο αυστηρές σε διαλύματα, σύμπλοκα μπορούν να σχηματίζονται τα οποία δεν κρυσταλλώνονται όπως στην περίπτωση του βενζοϊκού οξέος (κρυστάλλωση μόνο του συμπλόκου που σχηματίζει με την  $\beta$ -CD κι όχι αυτού με την  $\alpha$ -CD).

Μοριακές αναλογίες υπέρ των μορίων της CD, αν και λιγότερο συχνές, είναι επίσης δυνατές. Για παράδειγμα, σύμπλοκα CD 2:1 (ξενιστής:ξενιζόμενο μόριο) σχηματίζονται όταν το ξενιζόμενο μόριο έχει μεγάλο μήκος, όπως είναι η περίπτωση της βιταμίνης D<sub>3</sub> (Szejtli, 1988).

\* Τα μόρια αυτά, μέσω ενός φαινομένου που ονομάζεται «παρεμβολή» (“intercalation”), συμβάλλουν στην διαφοροποίηση της στοιχειομετρικής αναλογίας που συναντάται σχεδόν πάντα στα διαλύματα (1:1) προς μια μοριακή αναλογία επαυξημένη ως προς τον αριθμό των ξενιζομένων μορίων ανά μόριο CD.

#### **4.5.2 Πολικότητα, φορτίο**

Η έκταση της συμπλοκοποίησης επίσης εξαρτάται από την πολικότητα του μορίου ξενιστή. Ισχυρά υδροφιλικά μόρια (πολύ διαλυτά στο νερό), ισχυρά ενυδατωμένες και ιονισμένες ομάδες δεν είναι, ή είναι μόνο πολύ ασθενώς συμπλοκοποιήσιμες. Μόνο μόρια τα οποία είναι λιγότερο πολικά από το νερό μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με τις κυκλοδεξτρίνες.

Η σταθερότητα ενός συμπλόκου είναι ανάλογη με τον υδροφοβικό χαρακτήρα των υποκαταστατών, έτσι ένας μέθυλο ή αίθυλο υποκαταστάτης στην κατάλληλη θέση θα αυξήσει την σταθερότητα, π.χ μια μεθυλομάδα σε μία όρθο θέση με μια καρβονυλομάδα παρουσιάζει θωράκιση στην υδροφιλική καρβονυλομάδα, αυξάνοντας έτσι τον υδροφοβικό χαρακτήρα ολόκληρου του μορίου. Οι ιονικές μορφές είναι συνήθως, αλλά όχι πάντα, μη ευνοϊκές για τον σχηματισμό συμπλόκου.

Πολύ ισχυρές δυνάμεις συνοχής μεταξύ των μορίων του ξενιζομένου μορίου εμποδίζουν τον διαχωρισμό τους, ο οποίος είναι προαπαιτούμενος για τον εγκλεισμό. Μέτρο της συνοχής μεταξύ των μορίων της κρυσταλλικής ύλης είναι το σημείο τήξης της. Όταν το σημείο τήξης είναι πάνω από 250°C γενικά δεν μπορεί να παρασκευαστεί ένα σταθερό CD-σύμπλοκο (Szejtli, 1988).

### 4.5.3 Περιβάλλον

Δεν απαιτείται πάντα η ύπαρξη διαλύτη για τον σχηματισμό συμπλόκου. Αναμιγνύοντας σκόνη κρυσταλλικής κυκλοδεξτρίνης με ξενιζόμενο μόριο επίσης σε σκόνη, για παράδειγμα β-κυκλοδεξτρίνη και σαλικυλικό οξύ, και αποθηκεύοντας το σε ένα κλειστό μπουκάλι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος θα έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός 1:1 συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνης/σαλικυλικό οξύ μέσα σε μερικούς μήνες. Αυτή η διαδικασία μπορεί να ελεγχθεί με καταγραφή του διαγράμματος περίθλασης ακτίνων-X από σκόνες.

Με μη εξαχνώσιμα ξενιζόμενα μόρια αυτή η διαδικασία είναι πρακτικά μη πραγματοποιήσιμη καθώς είναι πολύ αργή. Η συμπλοκοποίηση σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιείται με παρουσία νερού. Ο σχηματισμός συμπλόκου σε διάλυμα είναι μια πολύ γρήγορη διαδικασία, παρόλα αυτά ουσίες που έχουν καλή διαλυτότητα, σχηματίζουν γενικά ασθενή σύμπλοκα. Τα καλώς συμπλοκοποιήσιμα ξενιζόμενα μόρια είναι ασθενώς διαλυτά στο νερό. Για να επιτευχθεί ισορροπία σε υδατικό διάλυμα είτε απαιτείται μεγάλος χρόνος αντίδρασης, ή το ξενιζόμενο μόριο πρέπει να διαλύεται σε κάποιον οργανικό διαλύτη.

Η επιλογή του οργανικού διαλύτη είναι περιορισμένη: συνήθως μόνο μερικοί μικρού μοριακού βάρους και ισχυρά υδρόφιλους διαλύτες όπως η μεθανόλη, 2-μεθόξυ-αιθανόλη, αιθυλενική γλυκόλη, διαιθυλενική γλυκόλη, γλυκερίνη κλπ., μπορούν να χρησιμοποιηθούν, καθώς δεν σχηματίζουν πολύ σταθερά σύμπλοκα με CD. Εντούτοις, υπάρχει μια ανοχή στην ύπαρξη στο απομονωμένο προϊόν κάποιων συμπλόκων όπου συμμετέχει και ο διαλύτης, καθώς οι διαλύτες είναι αναπόσπαστο κομμάτι του προϊόντος είτε ως σύμπλοκο διαλύτη-κυκλοδεξτρίνης, ή ως ένα τριμερές σύμπλοκο, προσδεμένο μέσα στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, δίπλα στο κύριο ξενιζόμενο μόριο. Ένα παράδειγμα του τελευταίου είναι η αιθανόλη, πολλά

---

φαρμακευτικά σύμπλοκα κυκλοδεξτρίνης παρασκευάζονται παρουσία αυτής και κατά συνέπεια 0.01-2.0% αιθανόλης μπορούν να βρεθούν σε τέτοια προϊόντα.

Γενικά η παρουσία οργανικών διαλυτών δεν είναι επιθυμητή αλλά σε πολλές περιπτώσεις είναι αναπόφευκτη. Πολλά ασθενώς διαλυτά ξενιζόμενα μόρια μπορούν να συμπλοκοποιούνται σε οποιαδήποτε αποδεκτή συγκέντρωση ή χρόνο, χωρίς την χρήση κάποιου οργανικού διαλύτη, άλλα όμως όχι. Για παράδειγμα, αποδεκτό σύμπλοκο  $\beta$ -CD με βιταμίνη D<sub>3</sub> δεν μπορεί να παρασκευαστεί χωρίς την χρήση αιθανόλης ή ακετόνης.

Η παρουσία αφυδατωμένου διαλύτη ευνοεί την απομόνωση κρυσταλλικού προϊόντος, καθώς η διήθηση και η αποξήρανση του απομονωμένου συμπλόκου είναι γρήγορη και το προϊόν είναι γενικά μια εξευγενισμένη σκόνη. Χωρίς διαλύτες η διήθηση είναι, στις περισσότερες περιπτώσεις λιγότερο γρήγορη, και μετά την αποξήρανση το σύμπλοκο αποτελείται από σκληρής υφής δεσμίδες, οι οποίες πρέπει να κονιορτοποιηθούν με μηχανικό τρόπο.

Η σταθερότητα και η διαλυτότητα ενός σχηματισμένου συμπλόκου μπορεί να επηρεαστεί από ανόργανα άλατα, μερικώς με σχηματισμό συμπλόκων εξωτερικής σφαίρας με τα υδροξύλια της κυκλοδεξτρίνης, και μερικώς δια μέσου φαινομένων αφυδάτωσης. Τα πρώτα αυξάνουν την διαλυτότητα των κυκλοδεξτρινών, τα τελευταία μειώνουν την διαλυτότητα των συμπλόκων, έχοντας ως αποτέλεσμα την κρυστάλλωση σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Το pH του διαλύτη παίζει κάποιο ρόλο στην διαδικασία της κρυστάλλωσης. Για παράδειγμα, η θερμοκρασία της αρχόμενης κρυστάλλωσης σε ένα 3% w/w υδατικό διάλυμα  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης αλλάζει μόνο ελαφρώς σε τιμές ουδέτερου κι όξινου περιβάλλοντος, ενώ σε βασικό περιβάλλον η κρυστάλλωση αποτυγχάνει να συμβεί.

Η συμπλοκοποίηση στην στερεά φάση είναι θερμοδυναμικά αυθόρμητη, αλλά η σταθερότητα του συμπλόκου είναι μεγαλύτερη σε υδατικά διαλύματα παρά στην στερεά φάση. Η υδροφοβικότητα, η οποία είναι μια σημαντική δύναμη σταθεροποίησης, υπάρχει μόνο σε διαλύματα. Πολυάριθμες ουσίες σχηματίζουν σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών μόνο σε διάλυμα, αλλά απομονώνοντας το προϊόν με κρυστάλλωση, λυοφιλίωσης,

---

κλπ, δεν επιτυγχάνεται πάντα συμπλοκοποίηση, παρά μόνο ένα μίγμα καλής διασποράς κυκλοδεξτρίνης και ξενιζόμενου μορίου.

Επειδή τόσο η κυκλοδεξτρίνη, όσο και το ξενιζόμενο μόριο είναι ενυδατωμένα, η δομή των μορίων του νερού γύρω από αυτά τα συστατικά παίζει έναν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ισορροπίας και της σταθερότητας του συμπλόκου και κατά συνέπεια της επίδρασης της κυκλοδεξτρίνης στο ξενιζόμενο μόριο. Το φαινόμενο σταθεροποίησης που προσφέρει η κυκλοδεξτρίνη στα ελαφρώς ευαίσθητα ξενιζόμενα μόρια εξαρτάται από την έκταση της συμπλοκοποίησης η οποία, πέραν από άλλους παράγοντες, εξαρτάται από την υδατική δομή (water structure). Μερικά συστατικά διευκολύνουν την δομή που σχηματίζεται από το νερό, ενώ κάποια άλλα ασκούν μια δράση αποδιοργάνωσης αυτής της δομής. Στα πρώτα περιλαμβάνονται συστατικά όπως η σουκρόζη, η σορβιτόλη και η φρουκτόζη τα οποία προάγουν την συμπλοκοποίηση με όλες τις συνέπειες αυτής. Στα τελευταία περιλαμβάνονται τα καρβαμίδια και τα μεθυλακεταμίδια τα οποία τρέπουν την ισορροπία του συμπλόκου προς την διάσταση (Szejtli, 1988).

#### **4.6 Μέθοδοι παρασκευής συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης**

Δεν υπάρχουν γενικευμένες μέθοδοι για την παρασκευή συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης. Η μέθοδος πρέπει να είναι προσαρμοσμένη στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου ξενιζόμενου μορίου (“tailor made”), και των συνθηκών παρασκευής, όπως ορίζονται από την κλίμακα παραγωγής τους (μικρής κλίμακας παρασκευή ή υψηλής κλίμακας βιομηχανική παραγωγή) (Szejtli, 1988).

Δεν υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της σταθερότητας του συμπλόκου σε διάλυμα και της διαλυτότητας του συμπλόκου, αν και ο όρος «σταθερότητα συμπλόκου» αναφέρεται στην ισορροπία διάσπασης/σύνδεσης του ξενιστή και του ξενιζόμενου μορίου σε διάλυμα. Εντούτοις, με βάση την διαλυτότητα συχνά υπολογίζεται η σταθερά του συμπλόκου και για τον λόγο αυτό η διαλυτότητα λαμβάνεται υπόψη στην παρασκευή συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης (Szejtli, 1988).

## 4.7 Τεχνικές μελέτης συμπλόκων κυκλοδεξτρινών

Η χρωματογραφία είναι μία από τις σημαντικότερες μεθόδους για μελέτη μοριακής και χειρομορφικής αναγνώρισης, υπολογισμό της στοιχειομετρίας του συμπλόκου και της σταθεράς σχηματισμού, και συνεπώς τις ενθαλπίες και τις εντροπίες σχηματισμού του συμπλόκου.

Για την κατανόηση των δυνάμεων συμπλοκοποίησης προαπαιτείται η γνώση των ενεργειακών διαφορών και φραγμών που εμπλέκονται στην συμπλοκοποίηση των CD. Οι θερμοδομετρικές μετρήσεις, που περιλαμβάνουν θερμοδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης και διαφορική θερμοδομετρία σάρωσης δίνουν τα πιο ακριβή θερμοδυναμικά στοιχεία που χαρακτηρίζουν τα σύμπλοκα (Dodziuk, 2006).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι δομές των CD διασαφηνίζονται με περίθλαση ακτίνων-X και σε ορισμένες ειδικές περιπτώσεις με περίθλαση νετρονίων, καθώς αυτές αποδίδουν ακριβείς πληροφορίες σχετικά με τη δομή των CD στη στερεά κατάσταση. Επιπρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη δυναμική των συμπλόκων στη στερεά φάση, δίνονται με φασματοσκοπία NMR που επιτρέπει την αποσαφήνιση της δομής σε διάλυμα. Οι πληροφορίες αυτές είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς οι περισσότερες εφαρμογές των CD λαμβάνουν χώρα σε αυτήν την κατάσταση. Οι έρευνες NMR με μορφή συνήθως μικρών, χημικών μετατοπίσεων μπορούν να δώσουν τεκμήρια του σχηματισμού συμπλόκου. Η μελέτη του NOE φαινομένου προσφέρει πληροφορίες για το πώς τα οργανικά ξενιζόμενα μόρια εισέρχονται στην κοιλότητα του ξενιστή στη στερεή φάση και σε διάλυμα.

Το φάσμα NMR είναι επίσης ευαίσθητο στη δυναμική του συμπλόκου και έτσι παρέχει πληροφορίες για την μη-ακαμψία του και την κίνηση του ξενιστή και/ή του ξενιζομένου μορίου ακόμα και στη στερεά φάση. Αντίθετα, τα αποτελέσματα των ακτίνων-X καταλήγουν σε μια και μοναδική άκαμπτη δομή, εξαιτίας του μέσου όρου των θέσεων και του χρόνου σε αυτές που υπολογίζεται (Pergamon, 1996).

Τέλος το γεγονός ότι η συμπλοκοποίηση των μορίων με CD αλλάζει τις ιδιότητες τόσο του ξενιστή, όσο και του ξενιζομένου μορίου, μας επιτρέπει τον έλεγχο της πορείας της συμπλοκοποίησης με τις παραπάνω πειραματικές τεχνικές (Dodziuk, 2006).

## 4.8 Εγκλεισμός γερανιόλης σε $\beta$ -CD

Ο εγκλεισμός της γερανιόλης σε CDs είναι αρκετά σημαντικός καθώς η γερανιόλη είναι ένα πτητικό και ευπαθές μόριο με πολλές όμως πολύτιμες ιδιότητες, οι οποίες γίνεται προσπάθεια να αξιοποιηθούν. Για τον λόγο αυτό, το προϊόν εγκλεισμού της έχει μελετηθεί αρκετές φορές στο παρελθόν.

Οι Mourtzinos *et al.* πραγματοποίησαν μελέτη του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD με αέρια και ψυχρή ξήρανση, ενώ ο σχηματισμός συμπλόκου εγκλεισμού γερανιόλης/ $\beta$ -CD επιβεβαιώθηκε με θερμοδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC). Ακόμα με οξειδωτική θερμοδομετρία DSC αποδείχθηκε ότι η γερανιόλη εγκλεισμένη σε  $\beta$ -CD προστατεύεται από την οξείδωση, σε θερμοκρασία όπου ως ελεύθερο μόριο οξειδώνεται (Mourtzinos *et al.*, 2008). Ακόμα οι Decock *et al.* υπολόγισαν τη σταθερά συμπλοκοποίησης της γερανιόλης/ $\beta$ -CD με αέρια χρωματογραφία σε υδατικό διάλυμα (30°C) και διαπιστώθηκε ότι η  $\beta$ -CD και κάποια τροποποιημένα παράγωγα της είναι η καλύτερη επιλογή ξενιστών για την γερανιόλη (Decock *et al.*, 2008). Σε θερμοανλυτικές μελέτες της Zsuzsanna Ehen εξετάστηκε η καταλληλότερη επιλογή ξενιστή ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, ή  $\gamma$ -CD) βάσει της ικανότητας συμπλοκοποίησης, της θερμικής σταθερότητας των συμπλόκων που σχηματίζουν και την δυνατότητα αποθήκευσης αυτών των συμπλόκων. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι ο ιδανικός ξενιστής είναι η  $\beta$ -CD καθώς διασφαλίζει με την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα την επιβράδυνση της πτητικότητας της γερανιόλης (Ehen, 2006). Ακόμα, μελετήθηκε ο στοιχειομετρικός συντελεστής και οι συντελεστές σχηματισμού των συμπλόκων γερανιόλης/ $\beta$ -CD από τους Clarot *et al.* με χρήση της μεθόδου HPLC με πορώδη γραφίτικο άνθρακα (PGC) κι αποφάνθηκε ότι η αναλογία γερανιόλης: $\beta$ -CD είναι 1:1 (Clarot *et al.*, 2000). Ακόμα, μελετήθηκε από τους Siralertmukul *et al.* η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου εγκλεισμού γερανιόλης/ $\beta$ -CD και η εφαρμογή του στην παραδοσιακή επικάλυψη επιφάνειας κεραμικών και χρησιμοποιήθηκαν με σειρά οι μέθοδοι συγκαθίζησης (παρασκευή συμπλόκου), φασματοφωτομετρία (μέτρηση του συνολικού περιεχομένου γερανιόλης) και φασματοσκοπία IR (ανάλυση του συμπλόκου εγκλεισμού) (Siralertmukul *et al.*, 2009).

---

## 5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΟΜΗΣ

### 5.1 Τεχνικές ταυτοποίησης και Μελέτης Δομής και Στερεοχημείας

Αφού απομονώσουμε μια φυσική ουσία (π.χ γερανιόλη) από την πηγή της, ακολουθείται πιστοποίηση της καθαρότητας της, ταυτοποίηση και προσδιορισμός της δομής της και της στερεοχημείας της.

Η πιστοποίηση της καθαρότητας μιας ουσίας που απομονώθηκε συνήθως γίνεται με την τεχνική της χρωματογραφίας. Μάλιστα για τις πτητικές ενώσεις χρησιμοποιείται η αέριος χρωματογραφία, ενώ για τις μη πτητικές και θερμοευαίσθητες χρησιμοποιείται η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και η χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Με τις τεχνικές αυτές, πραγματοποιείται επίσης εμμέσως με χρήση προτύπων δειγμάτων ενώσεων της ίδιας κατηγορίας μια πρώτη ταυτοποίηση της ουσίας που απομονώθηκε. Επιπλέον στοιχεία αποδεικτικά της καθαρότητας καθώς και της ταυτότητας μιας ουσίας, στην περίπτωση που αυτή είναι γνωστή, μπορούν να προκύψουν από τον προσδιορισμό των φυσικών σταθερών αυτής και τη συγκριτική μελέτη των φασμάτων αυτής.

Ακολούθως, πραγματοποιείται, στην περίπτωση που θεωρηθεί αναγκαίο ο προσδιορισμός της δομής της ένωσης. Η μέθοδος που αρχικά εφαρμόζεται για τον σκοπό αυτό είναι η αποικοδόμηση του μορίου, π.χ με οξειδωτικά μέσα, κατά την οποία προσδιορίζονται τα μικρά τμήματα που προκύπτουν και με επανασύνδεση αυτών προκύπτει ο πιθανός τύπος του αρχικού προϊόντος.

Σύγχρονες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δομής είναι η καταγραφή διαφόρων φασμάτων, όπως υπερύθρου (I.R), υπεριώδους (U.V), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H}$  N.M.R,  $^{13}\text{C}$  N.M.R, N.M.R δύο διαστάσεων), μάζας (M.S), κυκλικού διχρωισμού (C.D), κ.ά Με σύγκριση των δεδομένων, που προκύπτουν από τα παραπάνω φάσματα, με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, εξάγονται σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την δομή της ένωσης.

---

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα μπορούν να δώσουν πληροφορίες σχετικά με τη δομή του μορίου της ένωσης, τον σκελετό, τις χαρακτηριστικές ομάδες και ενίοτε σχετικά με την στερεοχημεία του μορίου. Στις παραπάνω μεθόδους χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες της αρχικής ένωσης, χωρίς να είναι απαραίτητη η γνώση της χημικής συμπεριφοράς της ένωσης.

Τέλος η τεχνική της μελέτης κρυστάλλων μιας ένωσης με ακτίνες-X (κρυσταλλογραφία), στην περίπτωση που αυτή μπορεί να κρυσταλλωθεί, είναι η μόνη που δίνει ακριβή στοιχεία για τη δομή και τη στερεοχημεία της ένωσης (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1996).

## **5.2 Κρυσταλλογραφική μελέτη των κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων εγκλεισμού**

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής των CDs, περίπου 70 χρόνια μετά την ανακάλυψη των CDs (τέλη 19<sup>ου</sup> αιώνα). Μέχρι τότε, η κυκλική δομή των CDs προσεγγιζόταν βάσει χημικών αναλύσεων, χωρίς όμως έτσι να είναι δυνατή η κατανόηση μοναδικών χαρακτηριστικών των CDs όπως της ικανότητας τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με μια ποικιλία από ξενιζόμενα μόρια.

Η ανάπτυξη της δομικής μελέτης των CDs με την χρήση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X του τελευταίου αιώνα συνοψίζεται σε μερικά άρθρα ανασκόπησης. Η μέθοδος αυτή αρχικά εφαρμόστηκε το 1942 για τον ορισμό του μοριακού βάρους των CDs. Αργότερα, το 1959, οι James et al. πρότειναν μια δομή πακεταρίσματος για μερικά κρυσταλλικά σύμπλοκα της α-CD με μικρά ξενιζόμενα μόρια. Η κρυσταλλική δομή που πρώτα επιλύθηκε με ανάλυση ακτίνων-X ήταν εκείνη του συμπλόκου α-CD με οξικό κάλιο το 1965. Οι δομές δύο άλλων γνωστών CDs, της β- και γ-CD, προσδιορίστηκαν το 1976 και 1980, αντίστοιχα. Η πλειονότητα των προσδιορισμένων κρυσταλλικών δομών CD και συμπλόκων CD βρίσκεται στην κρυσταλλογραφική βάση του Cambridge, Cambridge Crystallographic Database (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/>).



---

## **6. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ-X**

### **6.1 Γενικά**

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X είναι το πρωταρχικό εργαλείο για τον προσδιορισμό των ατομικών θέσεων των μορίων. Για την εφαρμογή της απαιτείται η δημιουργία κρυστάλλου υψηλής ποιότητας του συστήματος του οποίου η δομή μελετάται. Ένας υψηλής ποιότητας κρύσταλλος περιέχει μόρια διατεταγμένα κανονικά έτσι ώστε να σχηματίζεται ένα πλέγμα από μόρια, το οποίο εξυπηρετεί ως μια περιθλαστική επιφάνεια για τις ακτίνες. Οι ακτίνες-X είναι οι καταλληλότερες ακτίνες καθώς το μήκος κύματος τους βρίσκεται στην περιοχή των Angstroms (0,1nm) και προσεγγίζει το μήκος των ενδομοριακών δεσμών (Hammes, 2005).

### **6.2 Κρυστάλλωση**

Η κρυσταλλογραφική μελέτη ξεκινά με την διαδικασία της κρυστάλλωσης. Η κρυστάλλωση απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες, καθώς είναι εξαιρετικά ευαίσθητη τόσο στο pH, όσο και τη θερμοκρασία, αλλά επίσης στις δονήσεις, τους διαλύτες και τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας.

Η κρυστάλλωση είναι μια σχετικά αργή διαδικασία, που συνήθως απαιτεί αρκετές μέρες και στηρίζεται στην αρχή της βαθμιαίας αύξησης της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας πέραν του ορίου της διαλυτότητας. Η διαδικασία της κρυστάλλωσης ξεκινά με την διάλυση μιας ουσίας σε κατάλληλο διαλύτη σε συγκέντρωση όπου το διάλυμα να βρίσκεται κοντά στο σημείο κόρου. Η συγκέντρωση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με τη μέθοδο της βραδείας εξάτμισης, της βραδείας ψύξης ή διάχυσης. Οι πυρήνες κρυστάλλωσης που θα προκύψουν, ανάλογα με τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία του διαλύματος, θα πρέπει να έχουν ορισμένο μέγεθος για να προχωρήσει η διαδικασία της κρυστάλλωσης (Κόκκορος, 1970).

Όσο αναπτύσσονται κρύσταλλοι στο μητρικό υγρό, μειώνεται η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στο άμεσο περιβάλλον των πυρήνων κρυστάλλωσης και αυξάνεται η εναπόθεση ύλης περιμετρικά αυτών. Ο κρύσταλλος που θα επιλεγεί για τα πειράματα περίθλασης ακτίνων-Χ και για την συλλογή δεδομένων θα πρέπει να έχει το κατάλληλο μέγεθος και σχήμα. Επίσης δεν θα πρέπει να παρουσιάζει σύμφυση, ή άλλου είδους ελαττώματα όπως ρωγμές ή επιπρόσθετους μικρούς κολλημένους σε αυτόν κρυστάλλους. Οι διαστάσεις του δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 1mm, ώστε να εκτίθεται ολόκληρος σε περιοχή δέσμης ακτινών ίδιας έντασης. Η σημασία της τελικής επιλογής του μονοκρυστάλλου είναι μεγάλη αφού η σκεδαστική του ικανότητα είναι εκείνη που θα οδηγήσει σε ικανοποιητικό πρότυπο περίθλασης για την ανάλυση της δομής.

Η μέθοδος κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η «μέθοδος της αργής ψύξης», η οποία είναι μία από τις συνηθέστερες μεθόδους για τα σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, αρχικά σε υπέρκορο υδατικό διάλυμα  $\beta$ -CD προστίθεται η προς εγκλεισμό ουσία. Το διάλυμα CD πρέπει να έχει περιεκτικότητα διπλάσιας εκείνης του κορεσμού. Για να επιτευχθεί αυτό, το νερό που χρησιμοποιείται βρίσκεται στους 70°C. Στο διάλυμα αυτό εισάγεται ισομοριακή ποσότητα της ουσίας προς εγκλεισμό. Προστίθεται τόσο νερό ώστε το τελικό διάλυμα να βρίσκεται κοντά στον κόρο και αυτό αναδεύεται στους 24°C. Το τυχόν εξατμιζόμενο νερό αναπληρώνεται ώστε να επιτυγχάνεται πλήρης διάλυση του μίγματος. Κορεσμένο διάλυμα  $\beta$ -CD επιτυγχάνεται με την προσθήκη 30mg  $\beta$ -CD σε 1ml νερό. Η παρουσία αιωρούμενων σωματιδίων ορατών οδηγεί στην βοηθητική χρήση κάποιου οργανικού διαλύτη, όπως αιθανόλης.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου διαπιστώνεται μακροσκοπικά από τη διαύγεια του διαλύματος. Η αναλογία συγκέντρωσης  $\beta$ -CD/εγκλειόμενης ουσίας, η θερμοκρασία και ο χρόνος ανάδευσης που απαιτούνται ποικίλλουν κατά περίπτωση. Γι'αυτό πραγματοποιούνται προσπάθειες κρυστάλλωσης ενός συμπλόκου σε διάφορες συνθήκες (συγκέντρωσης ή χειρισμών) ανιχνευτικά για το κάθε σύμπλοκο, έτσι ώστε να επιλέγονται οι εν τέλει καταλληλότεροι χειρισμοί και συγκεντρώσεις κρυστάλλωσης.

Τα διαλύματα των ουσιών (ξενιστού και ξενιζομένου μορίου) εισάγονται σε πυρίμαχα γυάλινα δοχεία (σωληνίσκοι) αεροστεγώς κλεισμένα

και εμβαπτίζονται σε νερό στους 70°C και αναδεύονται μέχρι να φτάσουν στην πλήρη διαύγεια. Κατόπιν, εφόσον αυτό πραγματοποιηθεί, οι σωληνίσκοι τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 70°C και αρχίζει η σταδιακή ψύξη τους μέχρι τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η διαδικασία της κρυστάλλωσης συνήθως διαρκεί 7-15 μέρες και η ελάττωση της θερμοκρασίας γίνεται 2 ή 3 φορές την ημέρα και είναι της τάξης των 3-4°C τις πρώτες μέρες του πειράματος και 1-2°C προς το τέλος του πειράματος, έως ότου η θερμοκρασία φτάσει τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος όπου θα παραμείνει για μια μέρα. Κατόπιν, τα διαλύματα μεταφέρονται σε περιβάλλον σταθερής θερμοκρασίας στους 18°C, όπου ολοκληρώνεται η ανάπτυξη των κρυστάλλων από τους οποίους επιλέγονται κατάλληλα, βάσει προαναφερθέντων κριτηρίων, που θα εκτεθούν σε ακτίνες X ώστε να μελετηθεί η δομή τους.

## **6.3 Ακτίνες-X και η Περίθλαση τους από Κρύσταλλο**

### **6.3.1 Πηγές ακτίνων-X**

Οι ακτίνες-X παράγονται με βομβαρδισμό ενός στόχου (συνήθως μεταλλικού) με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Εάν η ενέργεια του προσπίπτοντος ηλεκτρονίου είναι επαρκώς υψηλή, θα εκδιώξει ένα ηλεκτρόνιο από την εσωτερική τροχιά του στόχου. Ένα φωτόνιο εκπέμπεται όταν ένα ηλεκτρόνιο του εξωτερικού τροχιακού μετακομίσει σε ένα εκκενωμένο εσωτερικό τροχιακό. Για τυπικούς στόχους, τα μήκη κύματος των φωτονίων είναι από δέκατα του Angstrom μέχρι και μερικά Angstroms. Σήμερα, εκτός από τους καθοδικούς σωλήνες παραγωγής ακτίνων-X, έχουν αναπτυχθεί πηγές μεγαλύτερης έντασης και μεταβαλλόμενου μήκους κύματος δίπλα σε επιταχυντές ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (σύγχροτρον). Ένα σύγχροτρον παράγει ακτίνες-X πολύ μεγαλύτερης έντασης (χιλιάδες φορές μεγαλύτερης) από ότι μια συμβατική πηγή, και μάλιστα ενός εύρους μηκών κύματος. Με ακτινοβολία σύγχροτρον είναι εφικτός ο προσδιορισμός δομών και μικρότερων κρυστάλλων από αυτούς που προσδιορίζονται με ακτίνες-X συμβατικών πηγών, κι αυτό είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα.

### 6.3.2 Περίθλαση ακτίνων-Χ από κρύσταλλο

Ως κρύσταλλος μπορεί να θεωρηθεί μια κανονική διάταξη μορίων, ή στοιχείων σκέδασης, με μόνο επτά δυνατές διευθετήσεις συμμετρίας. Για παράδειγμα, μια πιθανή διευθέτηση συμμετρίας είναι ένας απλός κύβος, κατά τον οποίο οι τρεις άξονες είναι ίσοι σε μήκος και σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία  $90^\circ$ . Άλλα πλέγματα μπορούν να παραχθούν έχοντας άνισες πλευρές και γωνίες διαφορετικές από  $90^\circ$ .

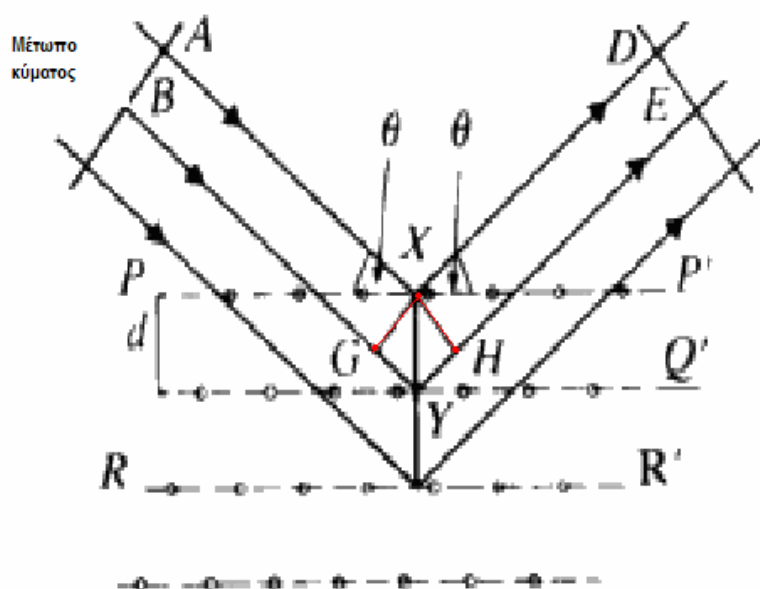
Ο κρυσταλλικός τύπος δεν δίνει μια ολοκληρωμένη εικόνα της πιθανής διευθέτησης των ατόμων μέσα στον κρύσταλλο, που σχηματίζουν το πλέγμα. Το πλέγμα είναι μια αόριστη διάταξη σημείων (ατόμων) στο χώρο, τα οποία όπως έδειξε ο Bravais, καταλήγουν να περιέχονται σε 14 είδη πλεγμάτων, τα λεγόμενα πλέγματα Bravais. Για παράδειγμα για ένα κυβικό κρύσταλλο, τρία πλέγματα είναι πιθανά: ένα με ένα άτομο σε κάθε γωνία του κύβου, ένα με ένα επιπλέον άτομο στο κέντρο του κύβου (body-centered cube), και ένα με επιπλέον άτομο στο κέντρο κάθε πλευράς του κύβου (face-centered cube). Ο προσδιορισμός του κρυσταλλικού τύπου και η ταξινόμηση του πλέγματος σε ένα από τα 14 πλέγματα Bravais είναι σημαντική για την ανάλυση των δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ.

Ο W. L. Bragg έδειξε ότι η περίθλαση των ακτίνων-Χ από έναν κρύσταλλο μπορεί να περιγραφεί ως η σκέδαση από παράλληλα επίπεδα μορίων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.1 Εάν η προσπίπτουσα ακτινοβολία σχηματίζει γωνία  $\theta$  με το μοριακό επίπεδο, τότε θα σκεδαστεί επίσης με μια γωνία  $\theta$ . Αυτή καλείται ελαστική σκέδαση και γίνεται η παραδοχή ότι η σκεδαζόμενη ακτινοβολία δεν χάνει ούτε απορροφά ενέργεια. Στην πραγματικότητα, συμβαίνει ένα είδος ανελαστικής σκέδασης κατά την οποία ενέργεια μπορεί να κερδισθεί ή να χαθεί, αλλά είναι αμελητέα και το γεγονός δεν λαμβάνεται υπόψη.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 6.1, η σκέδαση μπορεί να συμβεί για καθένα από τα επίπεδα τα οποία σχηματίζουν την ίδια γωνία τόσο με την προσπίπτουσα, όσο και με την σκεδαζόμενη ακτινοβολία, δηλ. συμβαίνει ανάκλαση των ακτίνων-Χ από κάθε τέτοιο επίπεδο. Για ένα επιλεγμένο κύμα, η ακτινοβολία μπορεί να σκεδαστεί από καθένα από τα επίπεδα, με διαφορετική όμως φάση σκεδαζόμενης ακτινοβολίας καθώς κάθε κύμα θα

έχει διανύσει μια διαφορετική απόσταση ανάλογα με την μεταξύ των επιπέδων απόσταση  $d$ . Εάν η διαφορά στο μήκος της διαδρομής που έχει διανυθεί από τις σκεδαζόμενες από διαφορετικά επίπεδα ακτινοβολίες ( $d' = 2d \cdot \sin\theta$ ) είναι ίση με το μήκος κύματος ή με ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος, τότε τα δύο κύματα θα βρίσκονται σε φάση και μια συμβολή ενίσχυσης θα συμβεί, και αυτό σημαίνει ότι η ένταση της ακτινοβολίας θα είναι μέγιστη. Αυτή είναι η συνθήκη του Bragg, δηλ.  $n\lambda = 2d \sin\theta$

Η συνθήκη του Bragg μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υπολογιστεί η ελάχιστη απόσταση των επιπέδων που μπορούν να διακριθούν από ακτίνες-X ενός δοθέντος μήκους κύματος. Καθώς η μέγιστη τιμή του  $\sin\theta$  είναι 1,  $d_{\min} = \lambda/2$  (Hammes, 2005).



**Εικόνα 6.1 Ανακλάσεις από οικογένεια πλεγματικών επιπέδων σύμφωνα με τη συνθήκη των Bragg.**

## 6.4 Προσδιορισμός της δομής

### 6.4.1 Γενικά

Από την έκθεση μονοκρυσταλλου σε ακτίνες-X λαμβάνεται ένα πρότυπο περίθλασης. Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από την σκεδαστική ικανότητα των ξεχωριστών ατόμων (ατομικός παράγοντας  $f$ ) και την φάση των κυμάτων από κάθε πηγή σκέδασης. Ο παράγοντας δομής,  $F$ , για κάθε επίπεδο μπορεί να οριστεί ως το άθροισμα των ατομικών παραγόντων σκέδασης  $f_i$ , πολλαπλασιασμένων με έναν παράγοντα φάσης,  $a_i$ , για το κάθε άτομο: 
$$\mathbf{F} = \sum \mathbf{f}_i \mathbf{a}_i$$

Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη με την τιμή του πλάτους του παράγοντα δομής. Ο παράγοντας δομής  $F_{hkl}$ , που αντιστοιχεί στο ανακλώμενο κύμα από το επίπεδο  $hkl$  ( $hkl$ : δείκτες Miller που προσδιορίζουν ένα επίπεδο του κρυσταλλικού πλέγματος), εκφράζεται με ένα μιγαδικό αριθμό πλάτους  $|F_{hkl}|$  και φάσης  $\varphi_{hkl}$ , δηλ. 
$$\mathbf{F}_{hkl} = |F_{hkl}| \exp(i\varphi_{hkl})$$
 (τα ατομικά ζεύγη συντεταγμένων είναι γνωστά).

Η μετατροπή των παραγόντων δομής σε ατομικές συντεταγμένες γίνεται με χρήση του μετασχηματισμού Fourier,

$$\rho(\mathbf{r}) = (1/V) \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp(-2\pi i \varphi_{hkl}) \quad (1).$$

Υπολογίζεται έτσι, η συνάρτηση κατανομής της ηλεκτρονιακής πυκνότητας,  $\rho(\mathbf{r})$  (οι ακτίνες-X σκεδάζονται μόνο από τα ατομικά ηλεκτρόνια) και οι ατομικές θέσεις αντιστοιχούν στα μέγιστα της  $\rho(\mathbf{r})$ . Το πρόβλημα είναι ότι τα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X μπορούν να δώσουν πληροφορίες μόνο για την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας που είναι ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους του παράγοντα δομής ( $I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$ ), ενώ δεν μπορούν να δώσουν καμιά πληροφορία για την φάση,  $\varphi_{hkl}$ , του παράγοντα δομής. Το πρόβλημα αυτό ονομάζεται «πρόβλημα των φάσεων» (Taylor, 2003) και είναι κεντρικό στον κρυσταλλογραφικό προσδιορισμό των δομών. Ο μετασχηματισμός Fourier χρησιμοποιεί τους παράγοντες δομής (οι οποίοι είναι συναρτήσεις της ηλεκτρονιακής πυκνότητας) και τρέπει την συναρτησιακή σχέση (functional dependence) έτσι ώστε η ηλεκτρονιακή πυκνότητα να εκφράζεται συναρτήσει των παραγόντων δομής. Αυτό φαίνεται άμεσα από την πλευρά των μαθηματικών,

---

αλλά το πρόβλημα είναι ότι οι πραγματικοί παράγοντες δομής περιέχουν τόσο τα πλάτη, όσο και τις φάσεις.

Για την λύση του προβλήματος των φάσεων έχουν αναπτυχθεί διάφοροι μέθοδοι, χωρίς όμως να υπάρχει μια γενική λύση. Στην περίπτωση των κρυσταλλικών δομών που συναντούμε στα υπερμοριακά συστήματα των προϊόντων εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται οι άμεσες μέθοδοι, η ισόμορφη αντικατάσταση και η μοριακή αντικατάσταση (Hammes, 2005).

## **6.4.2 Ανάλυση Δεδομένων**

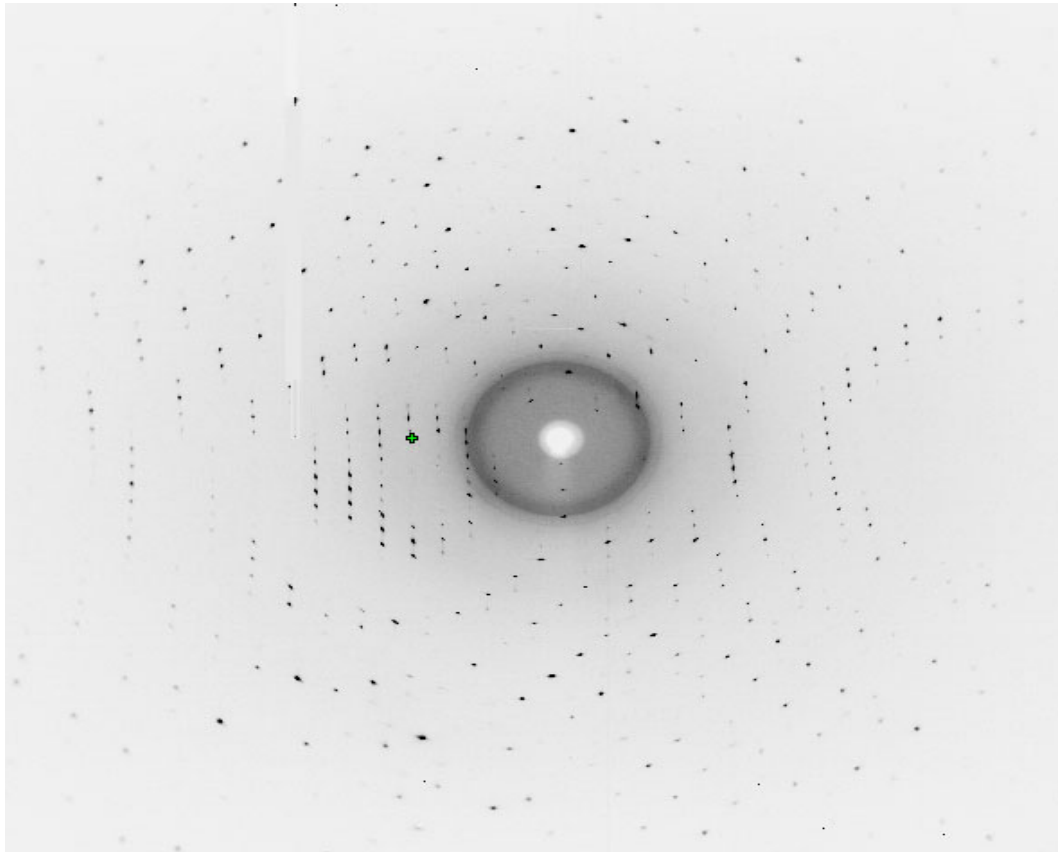
### **6.4.2.1 Συλλογή- Αναγωγή δεδομένων**

Τα δεδομένα ακτίνων-X μπορεί να συλλεχθούν με 0, 1, και 2- διαστάσεων ανιχνευτές. Ο 0-διαστάσεων ανιχνευτή (single counter) είναι ο πιο απλός και ο 2-διαστάσεων είναι ο πιο αποδοτικός υπό όρους μετρήσιμων περιθλώμενων ακτίνων-X σε όλες τις διευθύνσεις. Στις μέρες μας, οι ηλεκτρονικοί και οι IP (phospholuminescent, πολύ γνωστά με το εμπορικό όνομα Image Plate) ανιχνευτές έχουν επικρατήσει. Οι 2-d ανιχνευτές και το σχετικά υπολογιστικά προγράμματα χρησιμοποιούνται σήμερα σε όλα τα πειράματα.

Ο στόχος της συλλογής δεδομένων είναι η λήψη ενός συνόλου από συνεχώς μετρημένες, δεικτοδοτημένες εντάσεις για όσο το δυνατόν περισσότερες ανακλάσεις. Μετά την συλλογή των δεδομένων, οι ανεπεξέργαστες εντάσεις πρέπει να επεξεργαστούν για να βελτιωθεί η συνοχή τους και να μεγιστοποιηθεί ο αριθμός των μετρήσεων οι οποίες είναι επαρκώς ορθές για να χρησιμοποιηθούν.

Με σκοπό την επεξεργασία των δεδομένων, αρχικά απαιτείται η δεικτοδότηση των ανακλάσεων που καταγράφηκαν στις πολλαπλές καταγεγραμμένες εικόνες περίθλασης. Αυτό σημαίνει αρχικά αναγνώριση των διαστάσεων της μοναδιαίας κυψελίδας και αντιστοίχιση των κηλίδων των εικόνων περίθλασης με θέσεις του αντιστρόφου χώρου. Η δεικτοδότηση γενικά συμπληρώνεται με χρήση μιας επαναλαμβανόμενης φόρμουλας αυτοδεικτοδότησης. Ένα παραπροϊόν της δεικτοδότησης είναι ο προσδιορισμός της συμμετρίας του κρυστάλλου, δηλαδή, της ομάδας χώρου

αυτού. Έχοντας προσδιορισμένη την συμμετρία, τα δεδομένα συνενώνονται σε ενιαίο σύνολο. Αυτό μετατρέπει τις εκατοντάδες εικόνες που περιέχουν χιλιάδες ανακλάσεις σε ένα απλό αρχείο. Το αρχείο αυτό αποτελείται από καταγραφές δεικτών Miller κάθε ανάκλασης, και της αντίστοιχης έντασης με την εκτίμηση του λάθους της. Κηλίδες που εμφανίζονται σε δύο ή περισσότερες εικόνες πρέπει να συγχωνευτούν και τελικά να αναχθούν σε κοινή κλίμακα έτσι ώστε να έχουν μια συνεχή κλίμακα έντασης. Η βελτιστοποίηση της κλίμακας εντάσεων είναι κρίσιμη γιατί η σχετική ένταση των κηλίδων είναι η πληροφορία κλειδί από την οποία η δομή προσδιορίζεται. Η αναγωγή σε κοινή κλίμακα και η μεταβελτιστοποίηση είναι τα τελικά στάδια μιας τέτοιας διαδικασίας.



**Εικόνα 6.2** Εικόνα περίθλασης



### 6.4.2.2 Επίλυση δομής (αρχικές φάσεις)

Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 6.3.1, εξαρτάται από την εύρεση των φάσεων των περιθλώμενων ακτίνων-Χ από τον μονοκρυστάλλο. Οι κύριες προσεγγιστικές μέθοδοι επίλυσης του προβλήματος των φάσεων είναι: η *ab initio* εύρεση των φάσεων, η μοριακή αντικατάσταση, η μονή ή πολλαπλή Ισόμορφη Αντικατάσταση (SIR or MIR) και η ανώμαλη σκέδαση ακτίνων-Χ (Multi-wavelength or Single-wavelength Anomalous Diffraction-MAD και SAD phasing).

Αναφέρονται αναλυτικότερα οι προσεγγίσεις για τη λύση του προβλήματος των φάσεων στις περιπτώσεις δομών συμπλόκων κυκλοδεξτρινών:

#### 1) ***Ab initio* εύρεση φάσεων**

Οι *Ab initio* μέθοδοι για την επίλυση του κρυσταλλογραφικού προβλήματος των φάσεων βασίζονται αποκλειστικά στην πληροφορία της έντασης της περιθλώμενης ακτινοβολίας και δεν απαιτούν προηγούμενη γνώση καμίας από τις ατομικές θέσεις. Δομές μικρών μορίων μέχρι 100 μη υδρογονικών ατόμων επιλύονται χρησιμοποιώντας τις λεγόμενες «άμεσες μεθόδους». Οι άμεσες μέθοδοι βασίζονται στην θετικότητα και την ατομικότητα της ηλεκτρονικής πυκνότητας και χρησιμοποιούν τη θεωρία πιθανοτήτων και τη παραδοχή μοντέλου των κατά προσέγγιση ίσων, επιλυμένων ατόμων για την εκτίμηση των φάσεων από τις μετρούμενες εντάσεις (Hauptman, 1991). Σύγχρονες εξελίξεις στις άμεσες μεθόδους (Hauptman, 1997; Uson & Sheldrick, 1999; Burla et al., 2007) έχουν επιτύχει την επίλυση κρυσταλλικών δομών μικρών πρωτεϊνών με πειραματικά δεδομένα περίθλασης ακτίνων-Χ υψηλής (ατομικής) διακριτικής ικανότητας (<1.4Å).

Οι άμεσες Μέθοδοι έχουν επίσης αποδειχτεί χρήσιμες στον προσδιορισμό της θέσης των βαρέων ατόμων στα ισόμορφα παράγωγα (SIR, MIR) και των ατόμων σελινίου κι άλλων ανώμαλων σκεδαστών (MAD, SAD).

## 2) Μοριακή αντικατάσταση

Η μοριακή αντικατάσταση ξεκινά από ένα διαθέσιμο, ομόλογο της εξεταζόμενης δομής, πρότυπο και χρησιμοποιεί μεθόδους, που πρώτα περιγράφηκαν από τον M. Rossmann και D. Blow (1962), για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού και της θέσης στη μοναδιαία κυψελίδα.

### 6.4.2.3 Βελτιστοποίηση δομής και κατασκευή του μοριακού μοντέλου

Η ερμηνεία του ηλεκτρονικού χάρτη παράγει ένα μοντέλο των ατομικών θέσεων στη μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου που μελετάται. Δοθέντος ενός τέτοιου μοντέλου, οι θέσεις των ατόμων και οι αντίστοιχοι παράγοντες που περιγράφουν την θερμική κίνηση του κάθε ατόμου (Debye-Waller B) μπορούν να βελτιστοποιηθούν προσπαθώντας να βελτιστοποιηθεί η συμφωνία τους με τα παρατηρούμενα δεδομένα περίθλασης της δομής, και κατά αυτόν τον τρόπο να αποδοθεί ένα καλύτερο σύνολο φάσεων. Εν συνεχεία, ο νέος χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας (χάρτης διαφορικής πυκνότητας) αντιστοιχεί σε ένα νέο μοντέλο για το οποίο εκτελούνται επιπλέον κύκλοι βελτιστοποίησης με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, οι οποίοι θα αντιστοιχούν σε ακόμα έναν νέο χάρτη. Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι η συσχέτιση μεταξύ των δεδομένων και του μοντέλου να μεγιστοποιηθεί.

Η μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων βασιζόμενη στα  $F^2$  είναι η συνηθέστερη μέθοδος βελτιστοποίησης στην κρυσταλλογραφία μικρών μορίων. Η κεντρική ιδέα είναι η εξής:

Αν υποθέσουμε ότι η  $z$  είναι μια γραμμική συνάρτηση με  $x_n$  μεταβλητές και  $\rho_n$  παραμέτρους που την ορίζουν και οι τιμές της συνάρτησης είναι γνωστές με  $m$  σημεία με  $m > n$ ,  $z = \rho_1 x_1 + \rho_2 x_2 + \dots + \rho_n x_n$ . Η αρχή των ελαχίστων τετραγώνων εξασφαλίζει ότι οι καλύτερες τιμές για τις παραμέτρους  $\rho_1, \rho_2, \dots, \rho_n$  δίνονται όταν γίνεται ελάχιστη η συνάρτηση:

$\chi^2 = \sum w_j (z_{o,j} - z_{c,j})^2$ , όπου  $z_{o,j}$  είναι η μετρούμενη τιμή της συνάρτησης στο  $j$  και  $z_{c,j}$  είναι η υπολογισμένη τιμή της συνάρτησης στο  $j$ , και το  $w_j$  είναι μια παράμετρος βάρους που απονέμεται στην μετρούμενη τιμή.

Οι παράμετροι που βελτιστοποιούνται στον προσδιορισμό μιας κρυσταλλική δομής είναι οι  $x$ ,  $y$ , και  $z$  παράμετροι θέσης και οι  $U$

ισοτροπικοί ή οι  $U_{ij}$  ανισοτροπικοί παράμετροι θερμικής ή στατικής αποδιάταξης για κάθε άτομο. Μια χαρακτηριστική βελτιστοποίηση  $k$  *ισοτροπικών* ατόμων θα χρησιμοποιήσει  $4k$  ατομικές παραμέτρους, 3 παραμέτρους θέσης και 1 ισοτροπική παράμετρο αποδιάταξης ανά άτομο. Μια χαρακτηριστική βελτιστοποίηση  $m$  *ανισοτροπικών* ατόμων θα απαιτούσε  $9m$  παραμέτρους, 3 παραμέτρους θέσης και 6 ανισοτροπικές παραμέτρους ανά άτομο. Επιπρόσθετα σε αυτές τις ατομικές παραμέτρους, ένας συνολικός παράγοντας κλίμακας (overall scale factor) βελτιστοποιείται. Αυτός ο παράγοντας κλίμακας αφορά μια ποικιλία πειραματικών δεδομένων από το μέγεθος του κρυστάλλου έως την ένταση της πηγής ακτινοβολίας. Οι  $|F_c|$  τιμές δεν είναι γραμμικές συναρτήσεις ατομικών παραμέτρων. Με σκοπό να χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, κατά προσέγγιση τιμές για αυτές τις συναρτήσεις επιτυγχάνονται χρησιμοποιώντας σειρές Taylor και περικλύπτοντας τις σειρές μετά τον γραμμικό όρο. Εξαιτίας των άτεχνων προσεγγίσεων που έχουν γίνει στις σειρές Taylor, μερικοί κύκλοι βελτιστοποίησης απαιτούνται για την επίτευξη σύγκλισης. Οι παράγοντες βάρους (weight factors) επιλέγονται συνήθως για να αντιπροσωπεύουν την σχετική επίδραση που θα έχει μια παρατήρηση στα αποτελέσματα.

Σε κάθε βήμα βελτιστοποίησης αξιολογείται κατά πόσο ταιριάζει το προσδιορισμένο μοντέλο στα παρατηρούμενα πειραματικά δεδομένα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διάφοροι δείκτες αξιοπιστίας (discrepancy factors). Ο πιο γνωστός είναι ο δείκτης αξιοπιστίας  $R$  όπου:

$R = \frac{\sum (|F_o| - |F_c|)}{\sum |F_o|}$ . Ο δείκτης  $R$  βασίζεται μόνο στα παρατηρούμενα δεδομένα,  $F_o > 2 \sigma(F_o)$  και πάντα καταγράφεται σε βελτιώσεις βασιζόμενες στο  $F$ .

Κατά την διαδικασία της βελτιστοποίησης χρησιμοποιούνται «περιορισμοί» και «εξαναγκασμοί». Οι «περιορισμοί» είναι συνθήκες σύμφωνα με τις οποίες ορισμένες παράμετροι της κρυσταλλικής δομής παραμένουν σταθερές ή συνδεδεμένες με άλλες μεταβλητές και δεν επιτρέπεται η ελεύθερη μεταβολή τους κατά την διαδικασία της βελτιστοποίησης. Ένα παράδειγμα «περιορισμού» είναι η σταθεροποίηση των συντεταγμένων  $x$ ,  $y$ , και  $z$  ενός ατόμου που βρίσκεται σε κρυσταλλογραφικό κέντρο ή άξονα συμμετρίας. Οι «εξαναγκασμοί» εισάγονται όταν τα πειραματικά δεδομένα δεν είναι καλής ποιότητας ή μέρη

---

της δομής εμφανίζουν μεγάλη αταξία. Οι «εξαναγκασμοί» είναι επιπρόσθετη πληροφορία, όπως το μήκος χημικών δεσμών. Ένας «εξαναγκασμός» χειρίζεται ως επιπλέον πειραματική παρατήρηση με καθορισμένη αβεβαιότητα.

#### 6.4.2.4 Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Ένας χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας μπορεί να κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας τις υπολογισμένες φάσεις και τους παρατηρούμενους από το πείραμα παράγοντες δομής. Δυστυχώς, οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, με συντελεστές  $|F_o|$ , έχουν την τάση να δίνουν μόνο τα μέρη του μοντέλου που είναι ήδη γνωστά. Είναι συνήθως πιο χρήσιμος ο υπολογισμός του διαφορικού χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Οι διαφορικοί χάρτες υπολογίζονται χρησιμοποιώντας τους συντελεστές  $(|F_o| - |F_c|)$  με φάσεις υπολογισμένες. Όταν οι διαφορικοί χάρτες δίνουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε περιοχές πέρα από αυτές που καλύπτει το προτεινόμενο μοντέλο, αποκαλύπτουν νέες κορυφές ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Αντίθετα, όταν το προτεινόμενο μοντέλο βρίσκεται σε περιοχές που δεν αντιστοιχούν στην πραγματική ηλεκτρονιακή πυκνότητα, τότε οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας παράγουν αρνητικές κορυφές ( $\rho < 0$ ).

Έτσι από ένα αρχικό μερικό μοντέλο της δομής, οι διαδοχικοί διαφορικοί χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε κάθε κύκλο βελτιστοποίησης αποκαλύπτουν νέα άτομα τα οποία περιλαμβάνονται και συμπληρώνουν το αρχικό μοντέλο. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι όλα τα μη-υδρογονικά άτομα να βρεθούν.

Η πρόσθεση κάθε φορά μη-υδρογονικών ατόμων στο μοντέλο πρέπει να γίνεται έτσι ώστε να προκύπτουν χημικώς λογικά μήκη και γωνίες δεσμών. Η επανάληψη, ακολούθως, των υπολογισμών του παράγοντα δομής (βελτιστοποίηση δομής με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων), πρέπει να οδηγεί σε βελτιωμένο χάρτη Fourier και αποκαλύπτει νέες ατομικές θέσεις. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν όλα τα μη-υδρογονικά άτομα βρεθούν και οι παράμετροι θέσης κατά προσέγγιση συγκλίνουν (όλες οι αναλογίες shift/error είναι  $< 0.2$ ).

---

Τελικά τα βήματα για την ολοκλήρωση της βελτιστοποίησης της δομής είναι τα εξής:

- Άτομα σε ειδικές θέσεις μπορεί να απαιτούν περιορισμούς στις παραμέτρους. Αυτοί οι περιορισμοί εφαρμόζονται αυτόματα στο πρόγραμμα SHELXL (Sheldrick, 2008).
- Τοποθέτηση και βελτιστοποίηση των θέσεων των υδρογονικών ατόμων. Για πολλά υδρογονικά άτομα, είναι δυνατό να υπολογιστούν απλώς οι θέσεις με γνωστή γεωμετρία. Εάν οι θέσεις των υδρογονικών ατόμων πρόκειται να βελτιστοποιηθούν, πρέπει να εξασφαλιστεί ότι οι τελικές τους θέσεις αντιπροσωπεύουν χημικά λογική γεωμετρία.
- Βελτιστοποίηση των ισοτροπικών παραμέτρων για τα μη υδρογονικά άτομα, τα οποία μονιμοποιήθηκαν στα πρώτα στάδια της επεξεργασίας.
- Προσεκτικός προσδιορισμός και των άλλων θέσεων κατάληψης για περιοχές της δομής που ενδεικνύουν αταξία (περισσότεροι του ενός προσανατολισμοί για μια δοθείσα ομάδα). Συχνά η γεωμετρία των αποδιαταγμένων ατόμων πρέπει να περιοριστεί έτσι ώστε να αντιστοιχεί σε λογική στοιχειομετρία. Οι θερμοί παράμετροι B θα πρέπει να τους δοθούν αρχικά λογικές ισοτροπικές τιμές. Ενώ καθώς το μοντέλο συγκλίνει (ολοκλήρωση βελτιστοποίησης), θερμοί παράμετροι αντικατάστασης μπορεί να οριστούν εν τέλει και ανισοτροπικά (συχνά με περιορισμούς).

Αφού συμπληρωθούν οι δομές, πραγματοποιείται έλεγχος της βελτιστοποίησης της δομής σύμφωνα με τα εξής διάφορα κριτήρια:

1. Οι δεσμοί του μοντέλου πρέπει να είναι χημικά λογικοί. Παρόμοιοι δεσμοί θα πρέπει να έχουν παρόμοιες γεωμετρίες, και όλα τα μήκη δεσμών, οι γωνίες δεσμών κλπ, πρέπει να έχουν τιμές αντίστοιχες της βιβλιογραφίας.
2. Δε θα πρέπει να υπάρχουν άτομα με μη θετικές θερμικές παραμέτρους B. Οι παράμετροι B πρέπει να ελεγχθούν για συστηματικά σφάλματα.
3. Θεωρείται ότι η δομή συνέκλινε στη βέλτιστη λύση όταν η μέγιστη αναλογία μετατόπιση/σφάλμα είναι  $< 0.2$ . Ο λόγος των πειραματικά παρατηρούμενων εντάσεων προς το σύνολο των παραμέτρων (δεδομένα/ παράμετρο) πρέπει να ξεπερνά το 7. Αυτό αποτελεί και

- δείκτη του πλήθους των ανισοτροπικών παραμέτρων που μπορούμε να ορίσουμε.
4. Οι συναρτήσεις βάρους (weighting scheme) πρέπει να προσαρμόζονται έτσι ώστε να παράγουν σχεδόν σταθερές τιμές για τις διακυμάνσεις συναρτήσεως της έντασης και της διακριτότητας.
  5. Δεν πρέπει να υπάρχουν κορυφές με ισχυρές εντάσεις στη λίστα που αναφέρει τα χειρότερα προσαρμοσμένα δεδομένα.
  6. Οι τελικοί διαφορικοί χάρτες δεν πρέπει να έχουν ασυνήθιστα υψηλές κορυφές ή χαμηλές κοιλάδες.
  7. Το τελικό  $R$  θα πρέπει να είναι λογικά χαμηλό για την ποιότητα των δεδομένων. Καλές μικρών μορίων κρυσταλλικές δομές συνήθως έχουν  $R < 0.05$ . Αποδεκτές δομές μικρών μορίων έχουν τυπικά  $R < 0.10$ .

### 6.4.3 Έλεγχος αξιοπιστίας των συντεταγμένων της δομής

Οι παράμετροι που προκύπτουν από τον προσδιορισμό της δομής από την κρυσταλλογραφία των ακτίνων-Χ, δηλαδή οι ατομικές συντεταγμένες και παράγοντες θερμικής κίνησης) θα έχουν συσχετισμένες αβεβαιότητες. Για να αξιολογηθεί η αξιοπιστία του μοντέλου, ελέγχονται μόνο οι στερεοχημικές και γεωμετρικές ιδιότητες του, χωρίς αναφορά σε πειραματικά δεδομένα (Mac Arthur *et al.*, 1994; Laskowski *et al.*, 1998).

### 6.4.4 Οπτικοποίηση

Η οπτικοποίηση των δεδομένων ατομικών συντεταγμένων που επιτυγχάνονται από μια κρυσταλλογραφική μελέτη είναι ένα απαραίτητο βήμα στην ανάλυση και στην ερμηνεία της δομής. Ο επιστήμονας μπορεί να χρησιμοποιήσει οπτικοποίηση για διαφόρους σκοπούς, όπως επιτυγχάνοντας μια εποπτική εικόνα της δομής σαν ολότητα, ή μελετώντας λεπτομερώς ιδιαίτερες σχέσεις στον χώρο. Σε μερικές περιπτώσεις, οι ατομικές λεπτομέρειες χρειάζονται να οπτικοποιούνται, καθώς σε άλλες περιπτώσεις, υψηλού επιπέδου δομικά χαρακτηριστικά πρέπει να εκθέτονται.

Υπολογιστικά προγράμματα για μοριακό σχεδιασμό παρέχουν ένα αλληλεπιδρών, οπτικό περιβάλλον για επίδειξη και εκμετάλλευση των μοντέλων. Ο θεμελιώδης ρόλος των υπολογιστικών προγραμμάτων για την

---

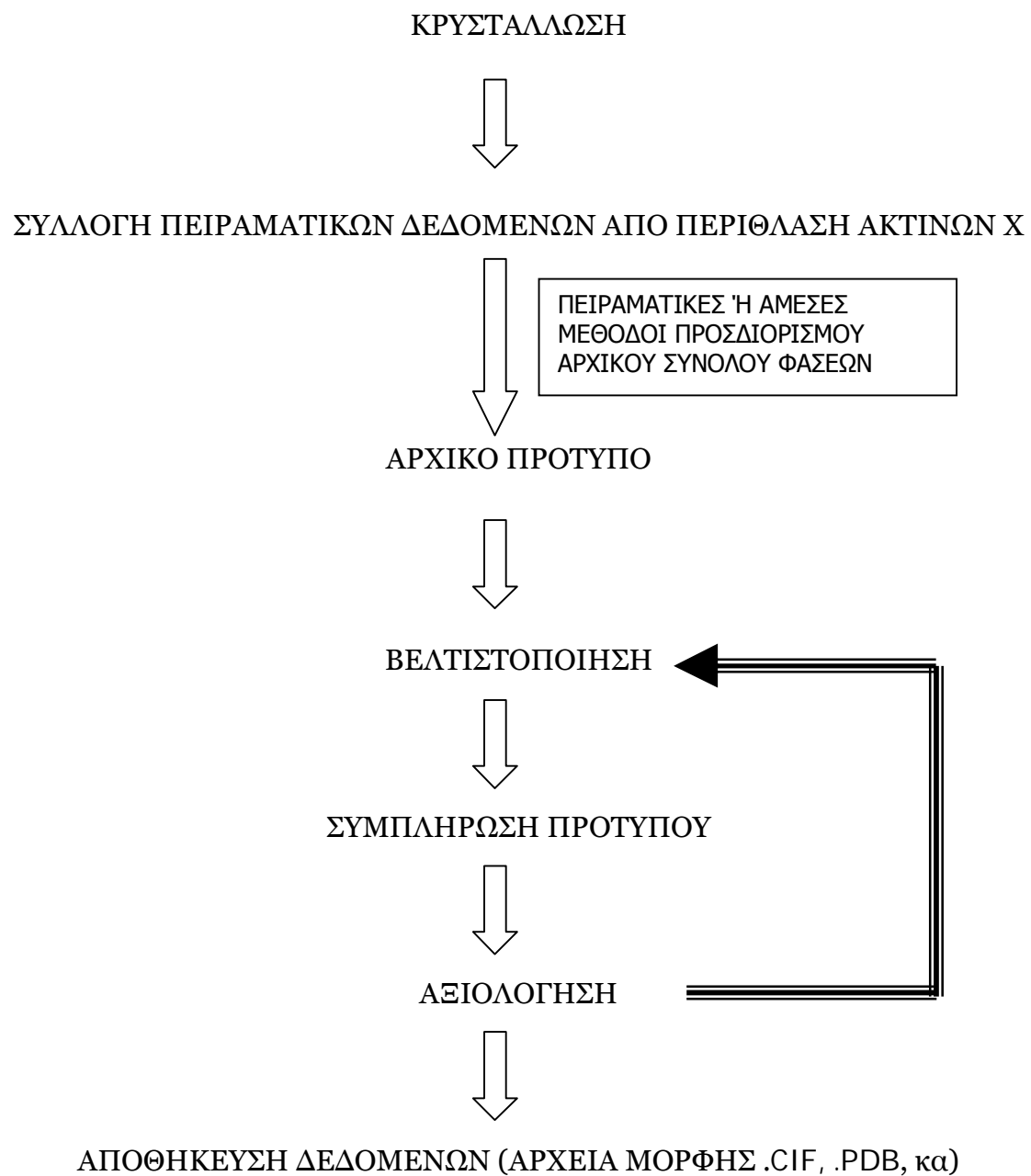
μελέτη των μορίων είναι να παράγουν ζωντανές και κατανοητές επιδείξεις-πειστικές εικόνες των μοντέλων. Αν και οι λεπτομέρειες του προγραμματισμού για τις επιδείξεις γραφικών διαφέρει από το ένα πρόγραμμα στο άλλο, όλα παράγουν μια εικόνα σύμφωνα με τις ίδιες γεωμετρικές αρχές.

#### 6.4.5 Κατάθεση της δομής

Μετά την ολοκλήρωση και επαλήθευση μιας δομής ακολουθεί η κατάθεση της σε μια κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων όπως η Protein Data Bank (PDB: για τις πρωτεϊνικές δομές) ή της Cambridge Structural Database (CCSD: για μικρά μόρια).

Η κατάθεση είναι της μορφής των καταλόγων των ατομικών συντεταγμένων, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επίδειξη και την μελέτη του μοντέλου με τα μοριακά γραφικά προγράμματα. Η μεγάλη πλειονότητα των μοντέλων είναι διαθέσιμα μέσω της PDB. Τα δομικά αρχεία PDB, τα οποία ονομάζονται καταχωρήσεις ατομικών συντεταγμένων, *atomic coordinate entries*, μπορούν να διαβαστούν μέσω διορθωτικών και επεξεργαστών κειμένου προγράμματα και περιέχουν επί προσθέτως στην λίστα συντεταγμένων, μια επικεφαλίδα ή ένα εναρκτήριο τμήμα με πληροφορίες σχετικά με δημοσιευμένα άρθρα πάνω στην πρωτεΐνη, λεπτομέρειες στην πειραματική εργασία που παρήγαγε τη δομή και άλλες χρήσιμες πληροφορίες.

Η Cambridge Structural Database είναι η μόνη περιεκτική συλλογή κρυσταλλικών δομών μικρών οργανικών και οργανομεταλλικών μορίων. Οι δομές αυτές έχουν αναλυθεί με περίθλαση ακτίνων-X ή τεχνικές περίθλασης νετρονίων. Η βάση δεδομένων περιέχει κρυσταλλικές δομές για πάνω από 322.000 οργανικά και οργανομεταλλικά συστατικά. Η βάση ανανεώνεται κάθε δυο μήνες. Υπολογιστικά προγράμματα έχουν αναπτυχθεί για την μελέτη, ανάκτηση, επίδειξη και ανάλυση των CSD πληροφοριών. Το σύστημα υπολογιστικών προγραμμάτων CSD χρησιμοποιείται από όλο τον κόσμο από ακαδημαϊκές και βιομηχανικές ερευνητικές ομάδες και υποστηρίζονται και αναπτύσσονται με αυξανόμενους ρυθμούς από CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre) εξειδικευμένο προσωπικό στο Cambridge.



**Εικόνα 6.3** Σχηματική παρουσίαση της διαδικασίας επίλυσης και βελτιστοποίησης της δομής προϊόντος εγκλεισμού σε μόριο ξενιστή.



---

# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 7. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ

### 7.1 Κρυστάλλωση συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD

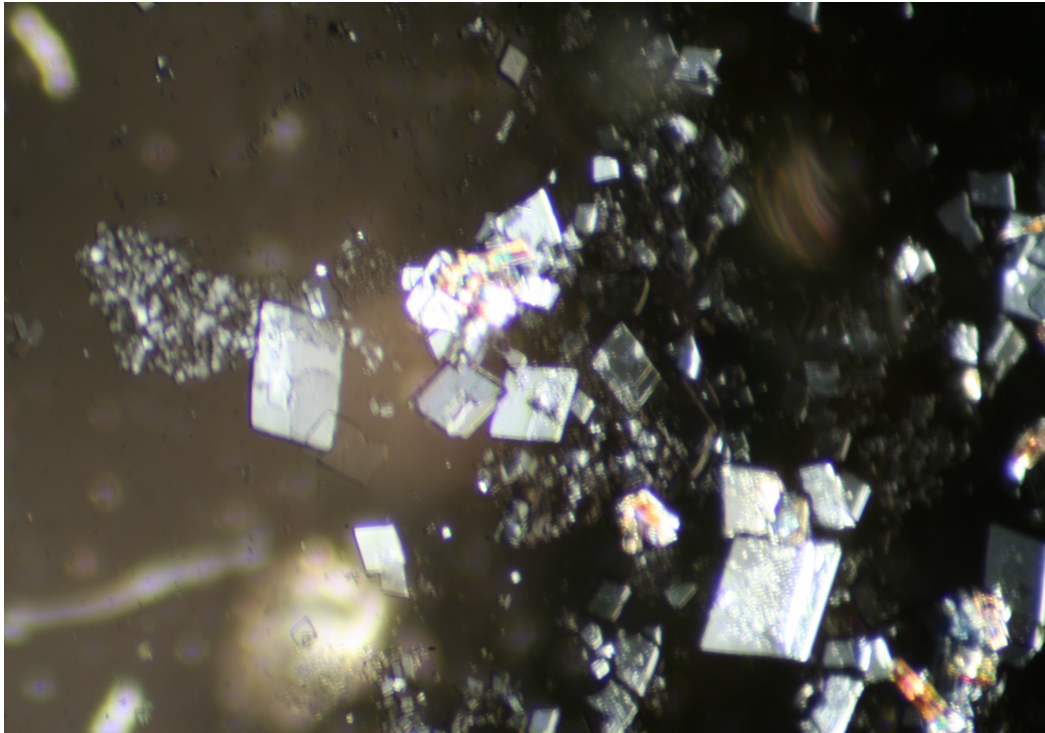
Στην παρούσα κρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής,  $\beta$ -CD από την εταιρεία Fluka, με μοριακό βάρος (MW)=1135.12, και ως ξενιζόμενο μόριο, γερανιόλη από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, Mo Η.Π.Α) με MW=154.25 και πυκνότητα 0,8965g/ml. Γνωρίζοντας ότι τα 30mg κυκλοδεξτρίνης, στους 70°C διαλύονται πλήρως σε 1ml νερό (dH<sub>2</sub>O), χρησιμοποιήθηκε στους 70°C υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης 0.026M.

Δοκιμάστηκαν δύο χειρισμοί για την κρυστάλλωση της γερανιόλης. Κατά τον πρώτο χειρισμό, στο υδατικό διάλυμα  $\beta$ -CD, προστέθηκε ισομοριακή ποσότητα γερανιόλης, η οποία αντιστοιχεί σε 10ml αυτής, και dH<sub>2</sub>O καθώς και λίγες σταγόνες αλκοόλης (5 σταγόνες) ωστόσο το διάλυμα μας έγινε διαυγές, με τελική συγκέντρωση γερανιόλης 0.011M στο υπό κρυστάλλωση διάλυμα. Αντίθετα, κατά τον δεύτερο χειρισμό, ο οποίος αντιστοιχεί σε στοιχειομετρική αναλογία 1:2 (αναλογία αρχικής ποσότητας ξενιστή προς ποσότητα ξενιζομένου μορίου), προστέθηκαν 20ml γερανιόλης και η τελική συγκέντρωση γερανιόλης στο τελικό διάλυμα είναι 0.022M.

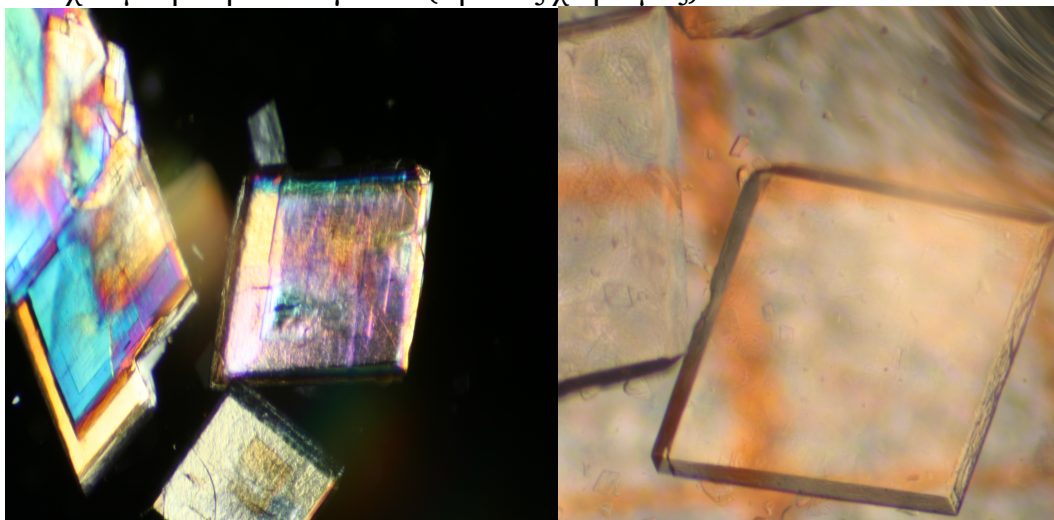
Κατόπιν, οι σωληνίσκοι με τα υπό κρυστάλλωση διαλύματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 70°C και άρχισε η σταδιακή ψύξη τους μέχρι τους 23°C (θερμοκρασία περιβάλλοντος) για χρονικό διάστημα οκτώ ημερών. Πραγματοποιήθηκε ελάττωση της θερμοκρασίας της τάξης των 5°C/12h για τις τρεις πρώτες ημέρες του πειράματος και της τάξης των 3-5°C/12h για τις μέρες που ακολούθησαν, ωστόσο δηλαδή η θερμοκρασία του υδατόλουτρου φτάσει στους 23°C (θερμοκρασία δωματίου). Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι αφού παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες, μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας στους 18°C ώστε οι κρύσταλλοι να αναπτυχθούν σε κατάλληλο μέγεθος.

Οι κρύσταλλοι που σχηματίστηκαν διαφοροποιούνται κατά τους δύο χειρισμούς (Εικόνα 7.1, Εικόνα 7.2). Κατά το πρώτο χειρισμό, όπου η στοιχειομετρική αναλογία είναι 1:1, οι κρύσταλλοι όπως φαίνονται στην εικόνα (Εικόνα 7.1), είναι λιγοστοί και μέτριας ποιότητας. Σε αυτούς βέβαια περιλαμβάνονται και κάποιοι μονοκρύσταλλοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την συλλογή δεδομένων ακτίνων-X. Κατά τον δεύτερο

χειρισμό, σχηματίζονται περισσότεροι καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι που πληρούν τα κριτήρια καταλληλότητας για συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων και για τον λόγο αυτό ένας από αυτούς εκτέθηκε σε ακτίνες-X και από τα δεδομένα που συλλέξαμε καταλήξαμε στο τελικό μοριακό μοντέλο της δομής του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD.



**Εικόνα 7.1** Κρύσταλλοι γερανιόλης/ $\beta$ -CD, οι οποίοι προέκυψαν με στοιχειομετρική αναλογία 1:1 (πρώτος χειρισμός).



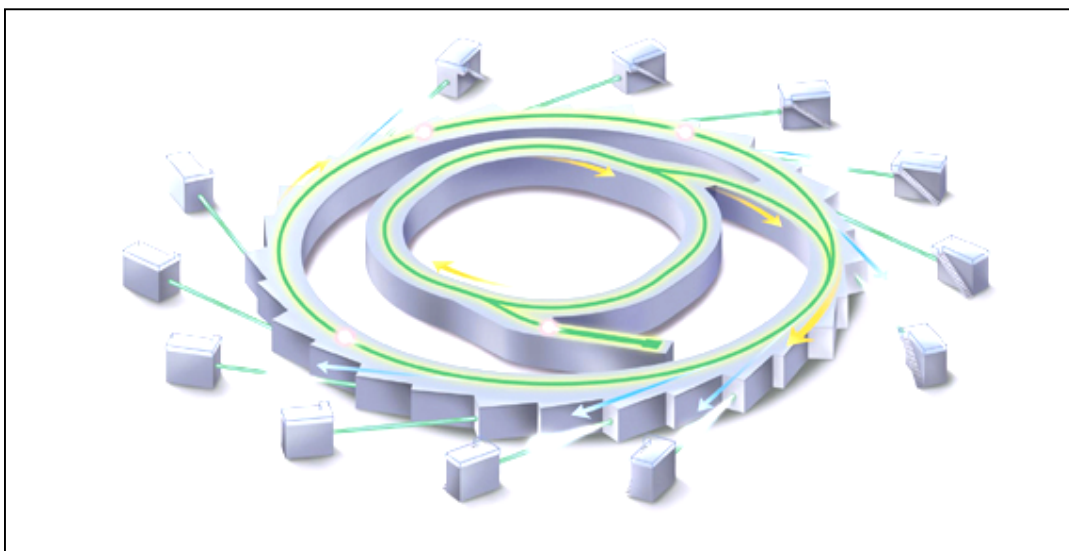
**(α)**

**(β)**

**Εικόνα 7.2** **(α)**Κρύσταλλοι γερανιόλης/ $\beta$ -CD, οι οποίοι προέκυψαν με στοιχειομετρική αναλογία 1:2 (δεύτερος χειρισμός), **(β)**Πρισματικός μονοκρύσταλλος διαστάσεων περίπου 1mm, κατάλληλος για συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X.

## 8. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Στο πείραμα μας, η συλλογή των πειραματικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων X στον κρύσταλλο του συμπλόκου γερανιόλης/  $\beta$ -CD πραγματοποιήθηκε από μέλη του εργαστηρίου Φυσικής του ΓΠΑ. Η συλλογή έγινε από την περίθλαση ακτινοβολίας σύγχροτρον στο σταθμό του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL) στο Αμβούργο, που στεγάζεται στο Γερμανικό Κέντρο Ερευνών με σύγχροτρον ακτινοβολία DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron) (DORIS: [Doppel-Ring-Speicher], "double-ring storage").



**Εικόνα 8.1** Η διάταξη ενός τυπικού σύγχροτρον



**Εικόνα 8.2** DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron, "German Electron Synchrotron"), το μεγαλύτερο γερμανικό ερευνητικό κέντρο για την σωματιδιακή φυσική, που στεγάζεται στο Αμβούργο.

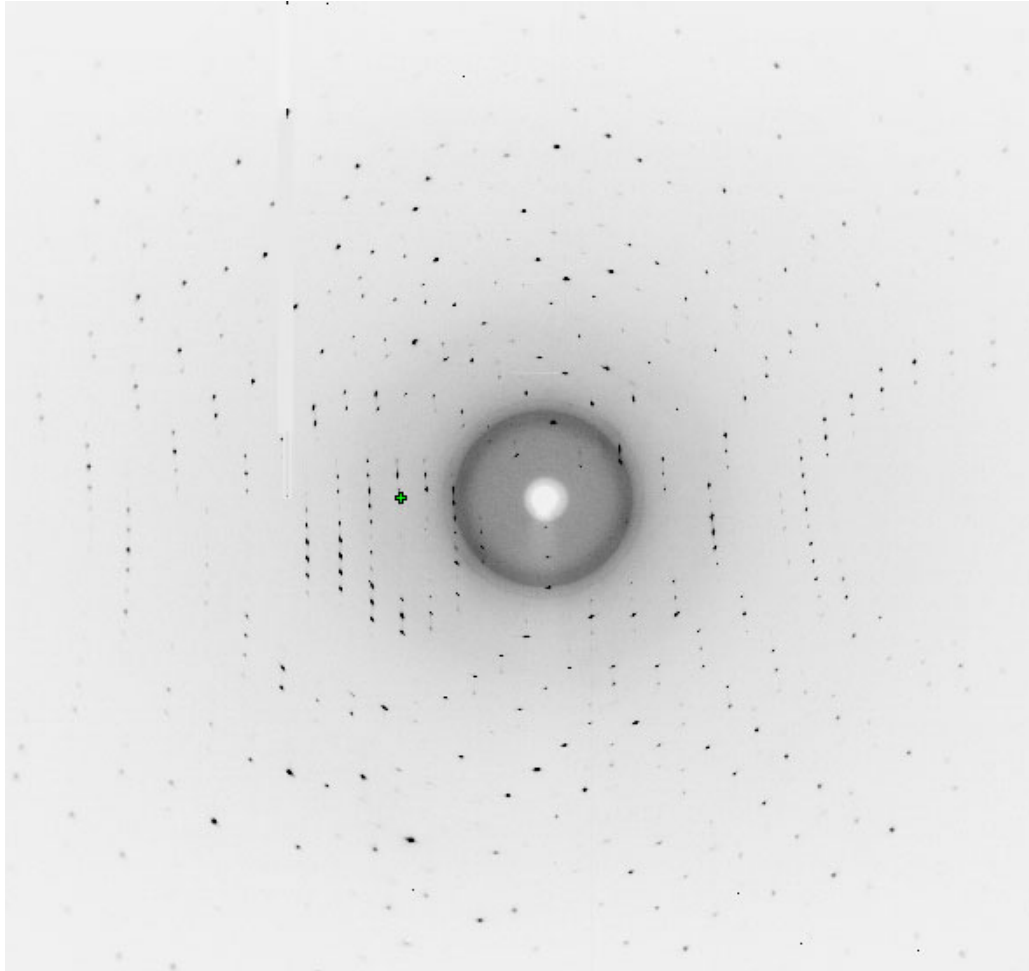
Η πηγή ακτινοβολίας σύγχροτρον που χρησιμοποιήθηκε (EMBL X11) έδινε προσπίπτουσα ακτινοβολία με  $\lambda=0.81\text{\AA}$ , η οποία ανακλώμενη στο μονοκρυστάλλο του συμπλόκου καταγραφόταν σε marCCD 165 ανιχνευτή. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα γερανιόλης/ $\beta$ -CD συλλέχθηκαν σε κρυογονικές συνθήκες: ο κρύσταλλος τοποθετήθηκε σε βρόγχο στήριξης κάτω από ρεύμα αζώτου στους  $100^\circ\text{K}$ . Στον Πίνακα 8.1 δίνονται οι συνθήκες του κρυσταλλογραφικού πειράματος.

Με την τεχνική του περιστρεφόμενου κρυστάλλου συλλέχθηκαν 220 εικόνες περίθλασης που αντιστοιχούν σε εικόνες περίθλασης των ακτίνων-X καθώς ο μονοκρυστάλλος περιστρέφεται κατά  $1^\circ$ , δηλαδή συλλέχθηκαν δεδομένα κατά την περιστροφή του μονοκρυστάλλου κατά  $220^\circ$ . Η περιστροφή αυτή υπερκαλύπτει μια πλήρη περιστροφή, η οποία είναι ίση με  $180^\circ$ . Σημειώνεται ότι στον χώρο των περιθλάσεων, οι ανακλάσεις έχουν πάντα κέντρο συμμετρίας (νόμος Friedel), οπότε για δεδομένα μιας πλήρους περιστροφής ( $=360^\circ$ ) αρκούν τα δεδομένα μισής περιστροφής ( $= 360^\circ/2 = 180^\circ$ ). Παρ'όλα αυτά παίρνουμε δεδομένα από συνολική περιστροφή μεγαλύτερης των  $180^\circ$  ώστε να ελαχιστοποιήσουμε απώλειες



παρατηρούμενων μερικών ανακλάσεων. Ο πλεονασμός αυτός χρησιμοποιείται και ως δείκτης αξιοπιστίας για την ορθή συλλογή δεδομένων,  $R_{\text{merge}}$  (Βλέπε επόμενη παράγραφο).

Στην 8.3 παρατίθεται η αρχική εικόνα περίθλασης ακτίνων-X στο μονοκρυστάλλο γερανιόλης/  $\beta$ -CD όπως συλλέχθηκε από τον ανιχνευτή (για γωνία περιστροφής  $\theta=0^\circ$ ).



**Εικόνα 8.3** Εικόνα περίθλασης ακτίνων-X από το μονοκρυστάλλο συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.1** Αρχικά πειραματικά δεδομένα κρυσταλλογραφικής μελέτης γερανιόλης/ $\beta$ -CD.

<b>Πειραματικά δεδομένα</b>	
Εμπειρικός Τύπος	C <sub>104</sub> H <sub>176</sub> O <sub>72</sub>
Μοριακό Βάρος	2578.45
Θερμοκρασία	100 °K
Μήκος κύματος	0.81480 Å
Z, Υπολογισμένη πυκνότητα	2, 1.261 Mg/m <sup>3</sup>
Συντελεστής απορρόφησης	0.107 mm <sup>-1</sup>
<i>F</i> (000)	2752
Διαστάσεις Κρυστάλλου	0.8mm

## 9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

### 9.1 Αναγωγή δεδομένων

Η επεξεργασία και η κανονικοποίηση των δεδομένων σε κοινή κλίμακα πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα XDS (Kabsch, 1993).

Επισυνάπτονται τα αποτελέσματα του προγράμματος XDS, geraniol\_xds\_results.txt και geraniol\_xds\_statistics.txt (βλέπε συνοδευτικό CD, Παράρτημα II), στα οποία βασίστηκε η επιλογή της ομάδας χώρου και της μοναδιαίας κυψελίδας.

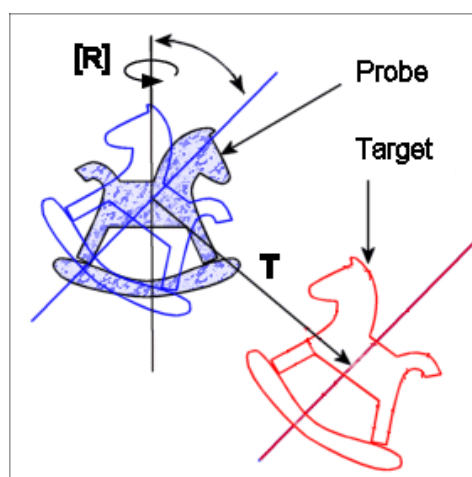
Το σύμπλοκο κρυσταλλώνει σε μονοκλινές σύστημα και στην ομάδα χώρου P2<sub>1</sub>. Οι διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας και άλλα κρυσταλλογραφικά δεδομένα δίνονται στον πίνακα 9.1. Η δεικτοδότηση των εικόνων περίθλασης που έγινε σύμφωνα με αυτή τη μοναδιαία κυψελίδα οδήγησε σε 7.593 ανακλάσεις που δεν σχετίζονται με πράξεις συμμετρίας (μοναδικές ανακλάσεις). Το πλήθος αυτό των παρατηρούμενων ανακλάσεων αντιστοιχεί σε πληρότητα 91.7% σε όλο το κέλυφος της πειραματικά επιτευχθείσας διακριτικής ικανότητας. Για αυτά τα δεδομένα, η μωσαϊκότητα του κρυστάλλου προσδιορίστηκε στο 0.44 και ο δείκτης  $R_{\text{merge}}=1.6\%$ .

## 9.2 Επίλυση δομής και βελτιστοποίηση δομής

Η προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε για το πρόβλημα των φάσεων είναι η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης.

Για την επίλυση της δομής του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD, χρησιμοποιήθηκε ως ομόλογο μοντέλο το σύμπλοκο του ινδολοβουτυρικού οξέος (IBA) σε  $\beta$ -CD. Από το μοντέλο αυτό αφαιρέθηκαν τα άτομα O(2), O(3), C(6) και O(6) που αντιστοιχούν στα πρωτοταγή και δευτεροταγή υδροξύλια των διμερών  $\beta$ -CD και . Το σύμπλοκο αυτό κρυσταλλώνει με παρομοίων κρυσταλλικών διαστάσεων μοναδιαία κυψελίδα και για τον λόγο αυτό έγινε η υπόθεση ότι το μοριακό μοντέλο αυτής παρουσιάζει ικανοποιητική ομοιότητα με το μοριακό μοντέλο του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD.

Με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος DIRDIF (Beurskens *et al.*, 2008), το οποίο χρησιμοποιεί τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης, επετεύχθη ο προσδιορισμός ενός αρχικού μοντέλου, με βελτιστοποίηση του οποίου προέκυψε το τελικό μοντέλο που θα κατατεθεί στην βάση δεδομένων. Η βελτιστοποίηση της δομής έγινε με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων βασιζόμενη στο  $F^2$  (συνηθέστερη μέθοδος βελτιστοποίησης στην κρυσταλλογραφία μικρών μορίων), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SXELXL97 (Sheldrick, 2008) από το πακέτο WINGX (Farrugia, 1999) (Βλέπε Παράρτημα I).



**Εικόνα 9.1** Απεικόνιση των συναρτήσεων περιστροφής και μετατόπισης που εφαρμόζονται για την υπέρθεση μιας δομής ανιχνευτή και μιας δομής στόχου στην μοριακή αντικατάσταση.



Ο δείκτης αξιοπιστίας για το αρχικό μοντέλο της δομής, όπως προέκυψε από το πρόγραμμα μοριακής αντικατάστασης (DIRDIF), ήταν  $R_1 = 0.3350$ . Με διαδοχικούς διαφορικούς χάρτες Fourier, που υπολογίστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος SXELXL97 (Sheldrick, 2008) από το πακέτο WINGX (Farrugia, 1999) (Βλέπε Παράρτημα Ι), και βασιζόμενοι σε λογικές (ως προς τη χημική γεωμετρία) υποθέσεις, εντοπίστηκαν σταδιακά όλες οι ατομικές θέσεις του διμερούς της  $\beta$ -CD, τα μόρια της γερανιόλης και τα μόρια νερού, με δείκτη αξιοπιστίας που συγκλίνει τελικά στην τιμή  $R_1 = 0.0768$ .

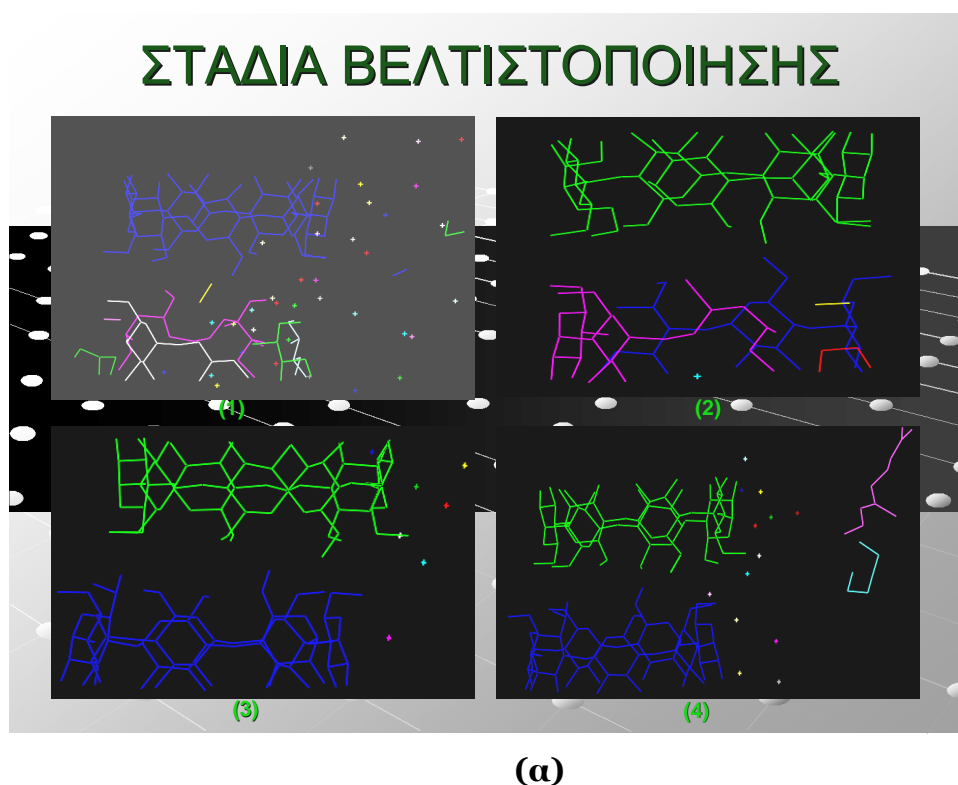
Αναλυτικότερα, κατά την βελτιστοποίηση, ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Εύρεση όλων των ατομικών θέσεων της  $\beta$ -CD.
2. Σταδιακός εντοπισμός των μορίων νερού στην ασύμμετρη μονάδα της κρυσταλλικής δομής.
3. Σταδιακή εύρεση των ατόμων του ξενιζομένου μορίου.
4. Εντοπισμός των ατόμων που είναι σε αποδιάταξη κι εύρεση των αριθμών κατάληψης των θέσεων που αυτά καταλαμβάνουν.
5. Πρόσθεση ατόμων υδρογόνου σε κατάλληλες θέσεις με υπολογιστικό τρόπο.
6. Άτομα με υψηλή θερμική κίνηση, όπως τα οξυγόνα τίθενται ως ανισοτροπικά.

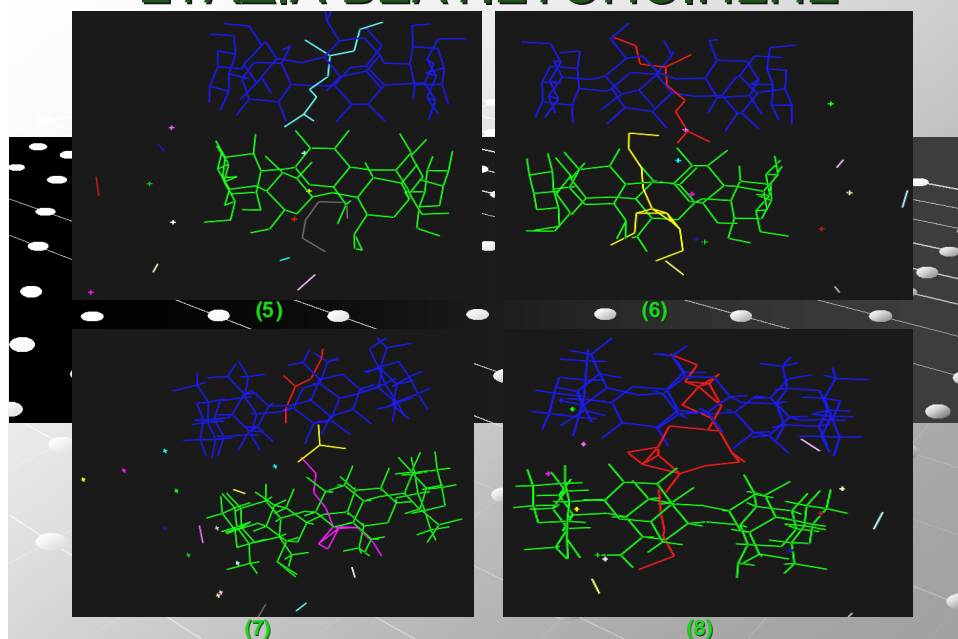
Οι εικόνες που ακολουθούν δείχνουν κάποια χαρακτηριστικά στάδια επίλυσης της δομής, τα οποία ξεκινούν από την αρχική δομή που δόθηκε από το πρόγραμμα DIRDIF, όπου παρατηρείται το μεγαλύτερο μέρος της δομής του διμερούς  $\beta$ -CD και κάποια εντοπισμένη ηλεκτρονιακή πυκνότητα, έως την τελική δομή του διμερούς με τα εγκλειόμενα μόρια γερανιόλης καταναμημένα σε 5 θέσεις και τα 16 μόρια νερού που το περιβάλλουν καταναμημένα σε 25 θέσεις. Στα στάδια αυτά παρατηρείται ο σταδιακός προσδιορισμός ολόκληρης της δομής του διμερούς (Εικόνα 9.2(α)1-3) και πρόσθεση των υδρογόνων αυτών (με γεωμετρικούς υπολογισμούς) (Εικόνα 9.2(β)7), η εύρεση σχηματισμών που υποπτευόμαστε ότι είναι της δομής των μορίων γερανιόλης (Εικόνα 9.2(α)4), εισαγωγή αυτών των σχηματισμών στο διμερές (Εικόνα 9.2(β)5), βελτιστοποίηση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών αυτών των σχηματισμών κι εύρεση και νέων σχηματισμών τα οποία επίσης βελτιστοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο (στο μεταξύ κάποιοι σχηματισμοί που έχουν εντοπιστεί διαλύονται και εντοπίζονται εκ νέου) έως την τελική δομή

όπου οι σχηματισμοί έχουν καθιερωθεί σε συγκεκριμένες θέσεις, έχουν βρεθεί οι συνθήκες στις οποίες αυτοί συνυπάρχουν (Εικόνα 9.2(α)4 και (β)5-8). Καθόλη την διαδικασία εντοπίζονται τα μόρια νερού και οι θέσεις που αυτά καταλαμβάνουν (Εικόνα 9.2(α)3-4 και (β)5-8).

Επισυνάπτονται τα αρχεία που μας δίνουν τις θέσεις των ατόμων στον χώρο, καθώς και τις υπόλοιπες πληροφορίες που απαιτούνται για μια πλήρη εικόνα της δομής του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD, *geran.res* και *shelxl.lst* (βλέπε συνοδευτικό CD, Παράρτημα II).



## ΣΤΑΔΙΑ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ



(β)

**Εικόνα 9.2 (α, β)** Χαρακτηριστικές εικόνες διαφόρων σταδίων προσδιορισμού της δομής του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD, από την αρχική δομή που προσδιορίστηκε από το πρόγραμμα *dirdif* ως την τελική δομή που επιτεύχθει μετά από μια σειρά κύκλων *Shelxl97*.

---

### 9.3 Έλεγχος αξιοπιστίας των συντεταγμένων της δομής

Στο σημείο αυτό, αξιολογήθηκε η αξιοπιστία του μοντέλου, στο οποίο καταλήξαμε, με έλεγχο των στερεοχημικών και γεωμετρικών ιδιοτήτων αυτού, χωρίς αναφορά σε πειραματικά δεδομένα.

Η αξιολόγηση αυτή του μοντέλου επισυνάπτεται σε ηλεκτρονική μορφή, στα αρχεία `geran.cif`, `geran.fcf`, `archive.cif` (βλέπε συνοδευτικό CD, Παράρτημα II) .

### 9.4 Οπτικοποίηση

Τα υπολογιστικά πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκαν για την οπτικοποίηση του μοριακού μοντέλου και την μελέτη των γεωμετρικών χαρακτηριστικών, καθώς και των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, είναι το Mercury 1.4.2 (Macrae et al, 2008) και το PyMol, αλληλεπιδρών, οπτικό περιβάλλον για επίδειξη και εκμετάλλευση των μοντέλων.

### 9.5 Κατάθεση της δομής

Μετά την ολοκλήρωση και επαλήθευση της δομής του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD ακολουθεί η κατάθεση στη κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων της Cambridge Structural Database(CSD), της οποίας η ηλεκτρονική τοποθεσία είναι: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>

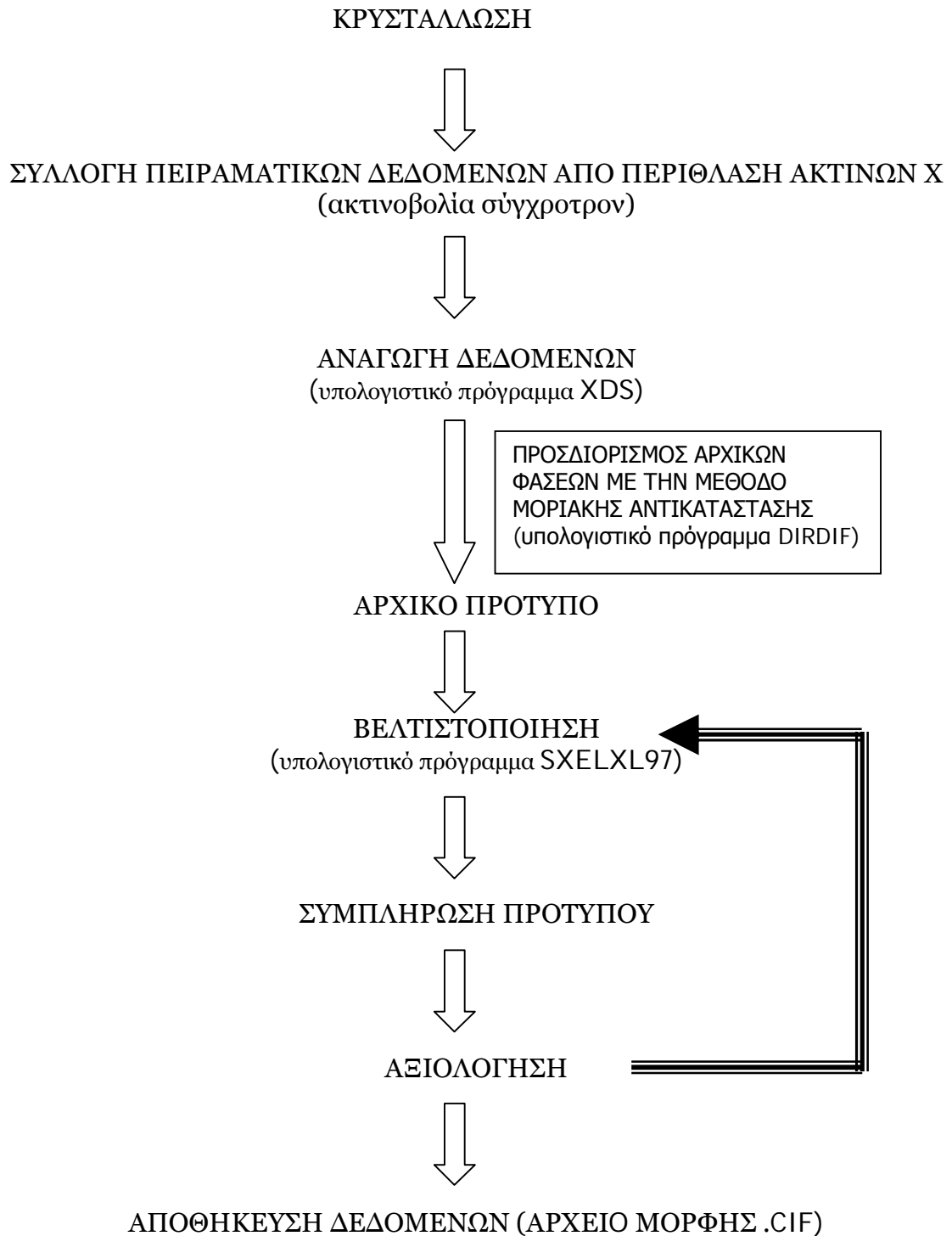
Στην εικόνα 9.2 δίνεται το διάγραμμα ροής της κρυσταλλογραφικής μελέτης που εκπονήθηκε για την παρούσα εργασία.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9.1** Κρυσταλλογραφικά δεδομένα κρυσταλλογραφικής μελέτης γερανιόλης/ $\beta$ -CD.

<b>Κρυσταλλογραφικά Δεδομένα</b>	
Κρυσταλλικό Σύστημα, Ομάδα χώρου	Μονοκλινές , P2 <sub>1</sub>
Διαστάσεις της κυψελίδας	a = 15.58 Å alpha = 90 deg. b = 24.98 Å beta = 110.91deg. c = 18.68 Å gamma = 90 deg.
Όγκος	6791 Å <sup>3</sup>
Εύρος $\theta$ (°) για συλλογή δεδομένων	1.68 έως 25.10 deg
Οριακοί Δείκτες	-16 ≤ h ≤ 16, -23 ≤ k ≤ 23, -19 ≤ l ≤ 19
Συνολικές ανακλάσεις /Μοναδικές	7593 / 7593 [R(int) = 0.0000]
Πληρότητα ως προς $\theta$ (°)	91.7 %
Μοσαϊκότητα	0.44
R <sub>merge</sub>	1.6%

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9.2** Βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

<b>Βελτιστοποίηση</b>	
Μέθοδος βελτιστοποίησης	Μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων επί του F <sup>2</sup>
Δεδομένα / Περιορισμοί /Παράμετροι	7593 / 13 / 1028
Δείκτης προσαρμογής επί του F <sup>2</sup>	1.257
Τελικοί Δείκτες R[I>2sigma(I)]	R1 = 0.0763, wR2 = 0.2294
Δείκτες αξιοπιστίας (όλα τα δεδομένα)	R1 = 0.0768, wR2 = 0.2307
$\Delta\rho_{max}$ , $\Delta\rho_{min}$	0.781 και -0.551 e.Å <sup>-3</sup>



**Εικόνα 9.2** Διάγραμμα ροής κρυσταλλογραφικής μελέτης προϊόντος εγκλεισμού γερανιόλης σε  $\beta$ -CD.

---

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

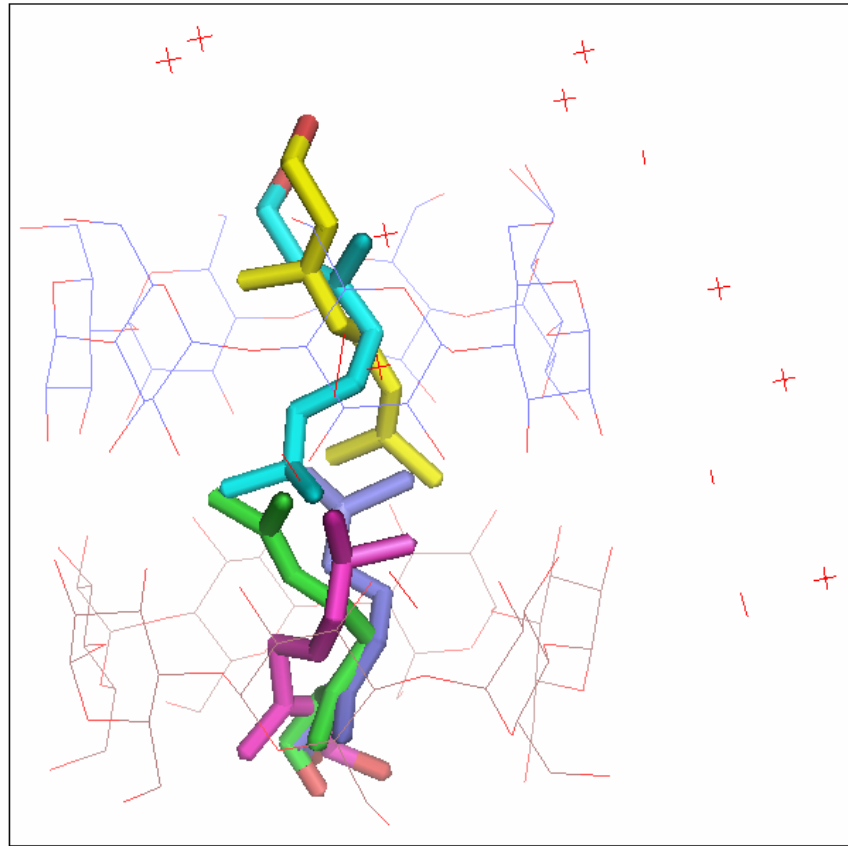
## 10. ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΓΕΡΑΝΙΟΛΗΣ/ $\beta$ -CD

Η κρυσταλλογραφική μελέτη έδειξε αρχικά ότι το σύμπλοκο γερανιόλης/ $\beta$ -CD κρυσταλλώνει σε μονοκλινές κρυσταλλικό σύστημα και στην ομάδα χώρου  $P2_1$ . Η  $P2_1$  αναφέρεται σε μοναδιαία κυψελίδα χωρίς επιπλέον πλεγματικά σημεία πέραν αυτών των κορυφών (primitive), στην οποία εφαρμόζεται συμμετρία άξονα ελικώσεως  $2_1$ . Ο άξονας ελικώσεως  $2_1$  είναι παράλληλος (ως συνήθως) στον κρυσταλλογραφικό άξονα  $\mathbf{b}$  και δηλώνει συμμετρία με στροφή κατά  $180^\circ$  και μετάθεση παράλληλα στον άξονα κατά  $b/2$ , ενώ δεν υπάρχει κέντρο συμμετρίας.

Στην ασύμμετρη μονάδα της μοναδιαίας κυψελίδας βρίσκονται δύο μόρια  $\beta$ -CD, τα οποία διατάσσονται με τις περιοχές των δευτεροταγών υδροξυλίων τους να βρίσκονται η μία απέναντι από την άλλη, σχηματίζοντας ένα διμερές τύπου κεφαλής-κεφαλής, μέσα στο οποίο φιλοξενούνται δύο μόρια γερανιόλης, καταναμημένα σε πέντε θέσεις, A, B, C, D, E. Τα εγκλειόμενα μόρια της γερανιόλης εμφανίζονται αποδιατεταγμένα εξαιτίας των ασθενών υδροφοβικών και Van der Waals, αλληλεπιδράσεων με τα άτομα της υδροφοβικής κοιλότητας της  $\beta$ -CD. Σύμφωνα με αυτά, η στοιχειομετρία ξενιστή προς ξενιζομένου μορίου είναι 1:1, κάτι αναμενόμενο σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Decock et al., 2008, Clarot et al., 2000, Ajisaka et al., 2000, Donze and Coleman, 1993 ). Τα μόρια της  $\beta$ -CD που αποτελούν το διμερές έχουν ονομαστεί, κατά σύμβαση, ως «Ξενιστής-A» και «Ξενιστής-B». Τέλος, η ασύμμετρη μονάδα περιέχει ακόμα 16 μόρια νερού καταναμημένα σε 25 θέσεις.

Ακολουθεί γραφική αναπαράσταση της ασύμμετρης μονάδας (εικόνα 10.1), στην οποία παρουσιάζεται το διμερές των  $\beta$ -CD, μέσα στο οποίο βρίσκονται τα δύο μόρια γερανιόλης καταναμημένα σε 5 θέσεις (A, B, C, D, E) και κάποια από τα νερά που βρίσκονται στην ασύμμετρη μονάδα (η δομή των νερών στην ασύμμετρη μονάδα φαίνεται λεπτομερέστερα στην εικόνα 15.1).





**Εικόνα 10.1** Γραφική αναπαράσταση των δύο μορίων γερανιόλης κατανεμημένα και στις 5 πιθανές θέσεις (κάθε θέση αναπαρίσταται με διαφορετικό χρώμα), των CD μορίων και των μορίων νερού με χρήση του προγράμματος PyMol (DeLano, 2002).

## 11. ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ (β-CD) ΣΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ

Η διαμόρφωση του μορίου της β-CD μετά τον εγκλεισμό του μορίου της γερανιόλης μέσα σε αυτήν προσδιορίζεται από τις τιμές γεωμετρικών χαρακτηριστικών που παρατίθενται στους πίνακες 11.1 και 11.2. Στους πίνακες αυτούς παρουσιάζονται γεωμετρικά χαρακτηριστικά τόσο του μορίου(A) (Ξενιστή-A), όσο και του μορίου(B) (Ξενιστής-B) της κυκλοδεξτρίνης που αποτελούν το διμερές, το οποίο περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά που μελετώνται περιλαμβάνουν:

- τις αποστάσεις,  $D$ ,  $[D=O4n...O4(n+1) \text{ αποστάσεις}]$ , (πλευρές του επταγώνου που σχηματίζεται από τα  $O_4$  των γλυκοζιτικών μονάδων, όπου  $n$  ( $n=1...7$ ) ο αριθμός της γλυκοζιτικής μονάδας.
- Τις γωνίες,  $\Phi_n$ , του επταγώνου που σχηματίζεται από τα  $O_4$  των γλυκοζιτικών μονάδων  $[\Phi_n= O4(n-1)...O4n...O4(n+1) \text{ γωνίες}]$ , όπου  $n$  ( $n=1...7$ ) ο αριθμός της γλυκοζιτικής μονάδας.
- Την απόσταση  $d$  σε  $\text{Å}$  των  $O_4$  ατόμων κάθε γλυκοζιτικής μονάδας της κυκλοδεξτρίνης από το μέσο επίπεδο που αυτά σχηματίζουν.
- Την απόσταση  $D_K$  σε  $\text{Å}$  των  $O_4$  ατόμων κάθε γλυκοζιτικής μονάδας της κυκλοδεξτρίνης από το βαρύκεντρο αυτών,  $[D_K=KA...O4n \text{ απόσταση}]$ , όπου  $KA$  το βαρύκεντρο και  $n$  ( $n=1...7$ ) ο αριθμός της γλυκοζιτικής μονάδας.
- Την diedρη γωνία,  $t$ , μεταξύ των  $O_5-C_5-C_6-O_6$  κάθε γλυκοζιτικής μονάδας, με  $[t= (O_5n-C_5n-C_6n-O_6n) \text{ γωνία}]$  όπου  $n$  ( $n=1...7$ ) ο αριθμός της γλυκοζιτικής μονάδας για τον προσδιορισμό της διαμόρφωσης gauche-gauche (gg) ή gauche-trans(gt) κάθε γλυκοζιτικής μονάδας.

**Πίνακας 11.1** Διαμόρφωση του μορίου της  $\beta$ -CD (Ξενοστής-A) μετά τον εγκλεισμό του μορίου γερανιόλης μέσα σε αυτή.

**Γερανιόλη/ $\beta$ -CD**

**Ξενοστής-A**

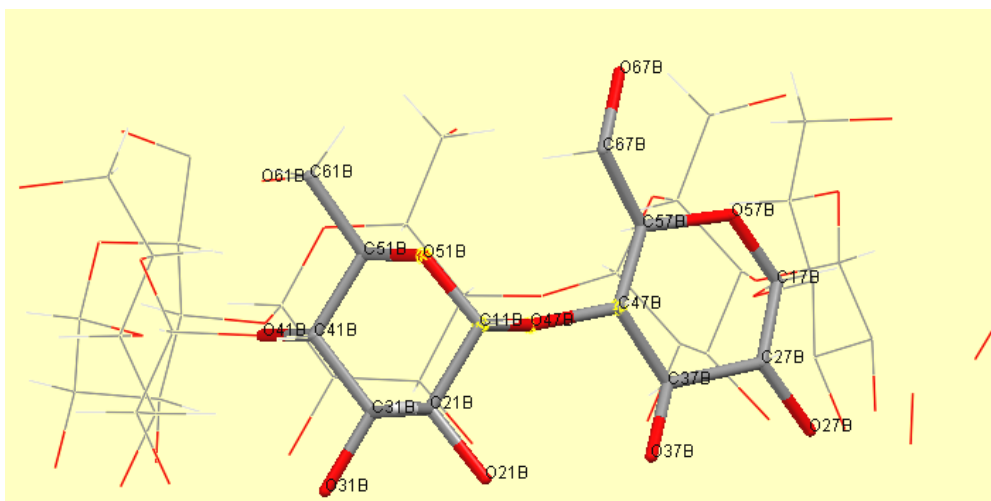
Γλυκοζιτική μονάδα	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7
D(Å)	4.424	4.349	4.470	4.410	4.328	4.495	4.416
$\Phi$ h(°)	126.47	128.46	129.61	129.81	125.57	130.20	129.69
d(Å)	0.050	0.053	0.067	0.018	0.058	0.014	0.091
DK(Å)	5.167	5.116	5.014	5.036	5.203	5.037	5.017
t(°)	62.93/85.11	-63.66	-67.78	-57.32	-62.67	-67.15	-62.12
Διαμόρφωση	gt /gt	gg	gg	gg	gg	gg	gg

**Πίνακας 11.2** Διαμόρφωση του μορίου της  $\beta$ -CD (Ξενοστής-B) μετά τον εγκλεισμό του μορίου γερανιόλης μέσα σε αυτή.

**Γερανιόλη/ $\beta$ -CD**

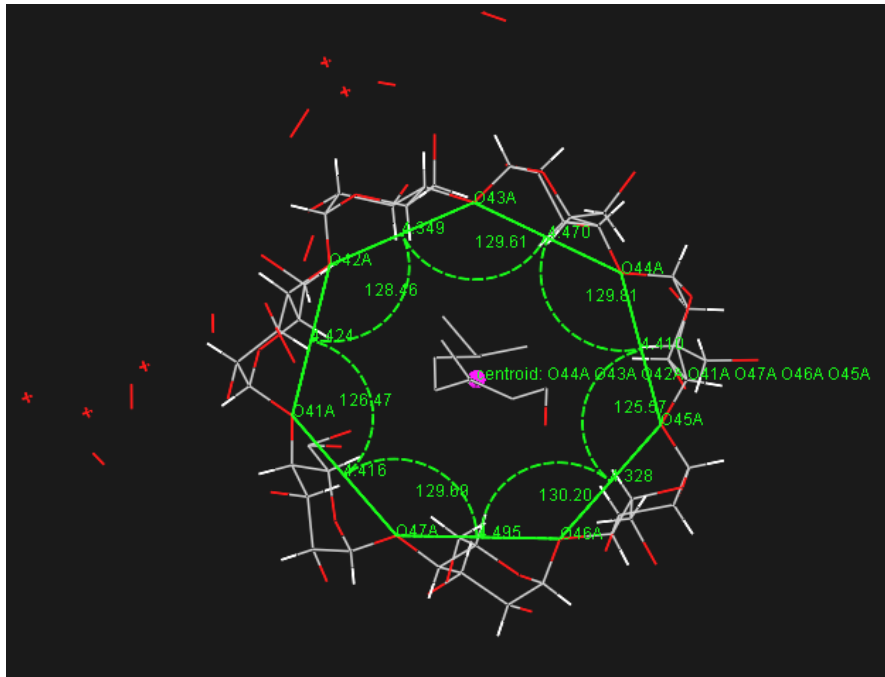
**Ξενοστής-B**

Γλυκοζιτική υπομονάδα	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7
D(Å)	4.443	4.435	4.485	4.400	4.431	4.451	4.387
$\Phi$ h(°)	129.17	128.49	126.59	130.63	128.03	127.66	129.28
d(Å)	0.052	0.046	0.067	0.014	0.067	0.006	0.077
D <sub>K</sub> (Å)	5.076	5.128	5.165	5.045	5.124	5.140	5.075
t(°)	-63.13	-65.24	-55.54	-66.39	-66.45	-64.39	61.35
Διαμόρφωση	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gt

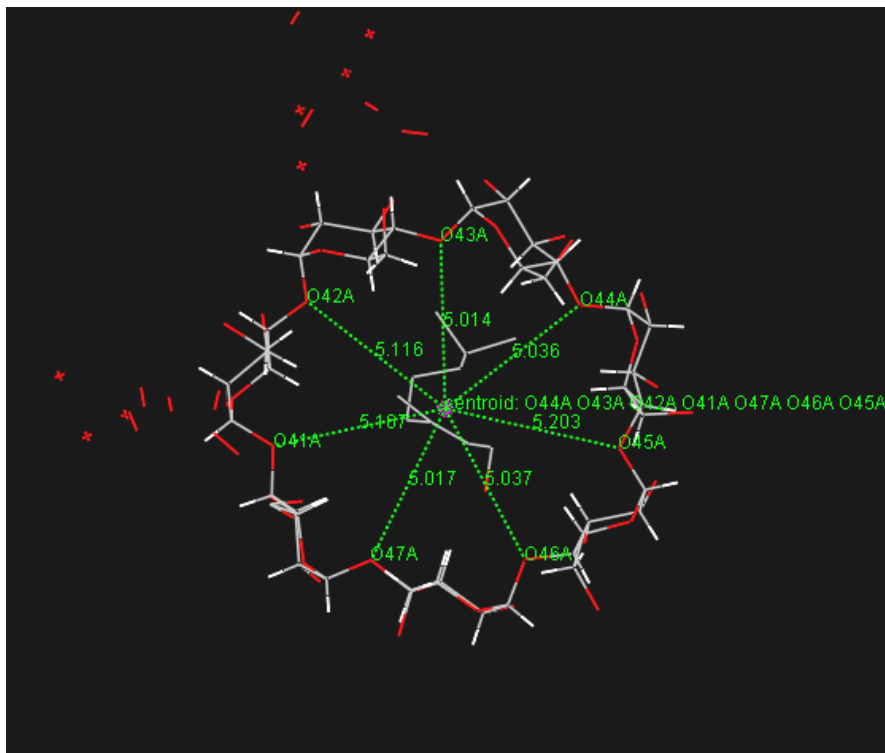


**Εικόνα 11.1** Γραφική αναπαράσταση του Ξενιστή Β της  $\beta$ -CD, όπου σημειώνονται αριθμημένα τα άτομα δύο γειτονικών γλυκοζιτικών μονάδων της  $\beta$ -CD.

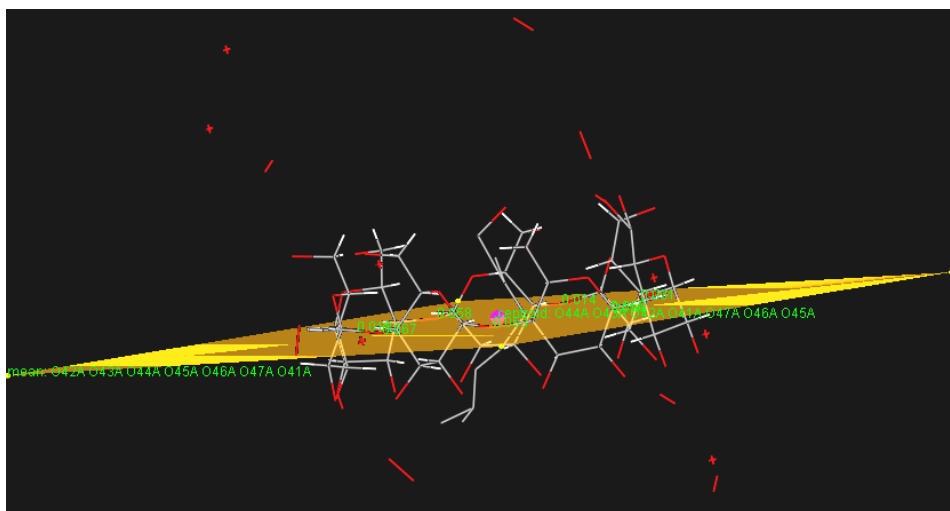
Η δομή του προϊόντος εγκλεισμού της γερανιόλης σε  $\beta$ -CD αναπαρίσταται με χρήση του προγράμματος μοριακής προσομοίωσης Mercury 1.4.2 (Macrae et al, 2008). Η χρήση αυτού του προγράμματος μας επιτρέπει την μελέτη μερικών στοιχείων που αφορούν την γεωμετρία στον χώρο των μορίων του συμπλόκου, τις αλληλεπιδράσεις των μορίων του συμπλόκου και πως αυτές σταθεροποιούν το σύμπλοκο και την μοριακή διεύθυνση της κρυσταλλικής δομής.



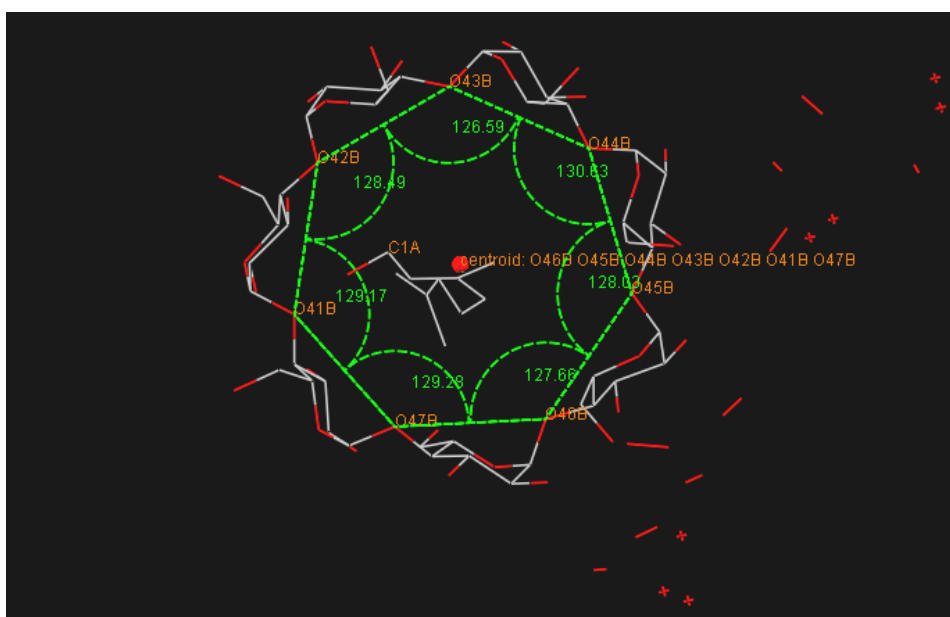
**Εικόνα 11.2** Στην εικόνα παρουσιάζεται ο ξενιστής A της  $\beta$ -CD, οι αποστάσεις και οι γωνίες που σχηματίζουν τα O<sub>4</sub>, καθώς και το βαρύκεντρο αυτών.



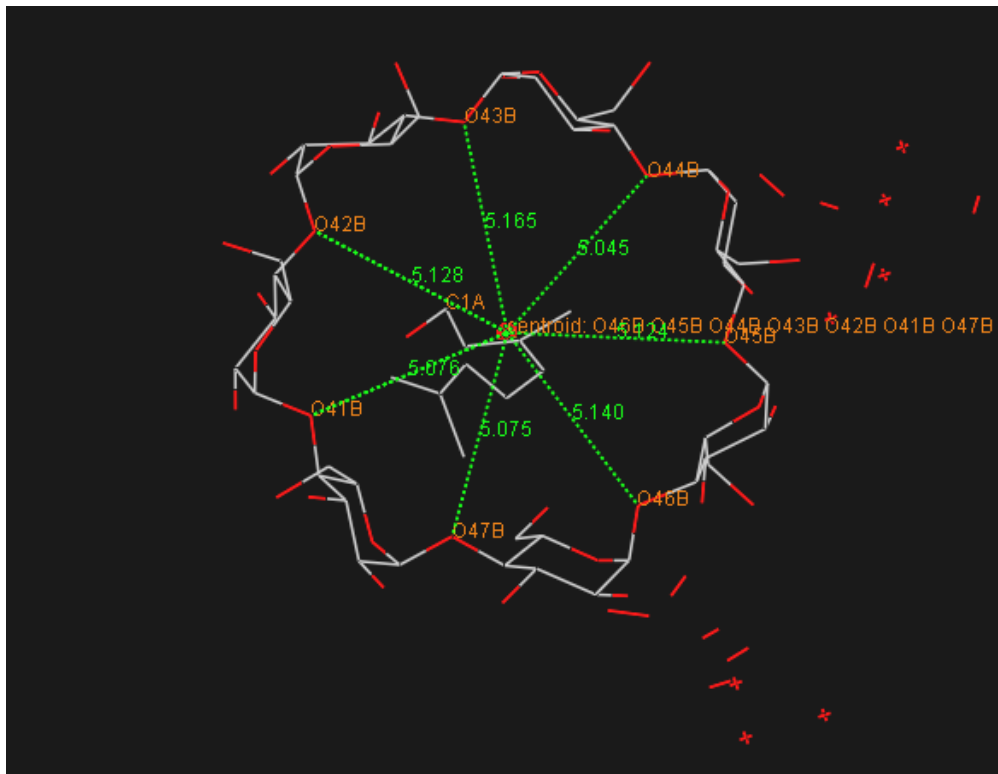
**Εικόνα 11.3** Στην εικόνα παρουσιάζεται ο ξενιστής A της  $\beta$ -CD, το βαρύκεντρο των O<sub>4</sub> και οι αποστάσεις των O<sub>4</sub> από αυτό.



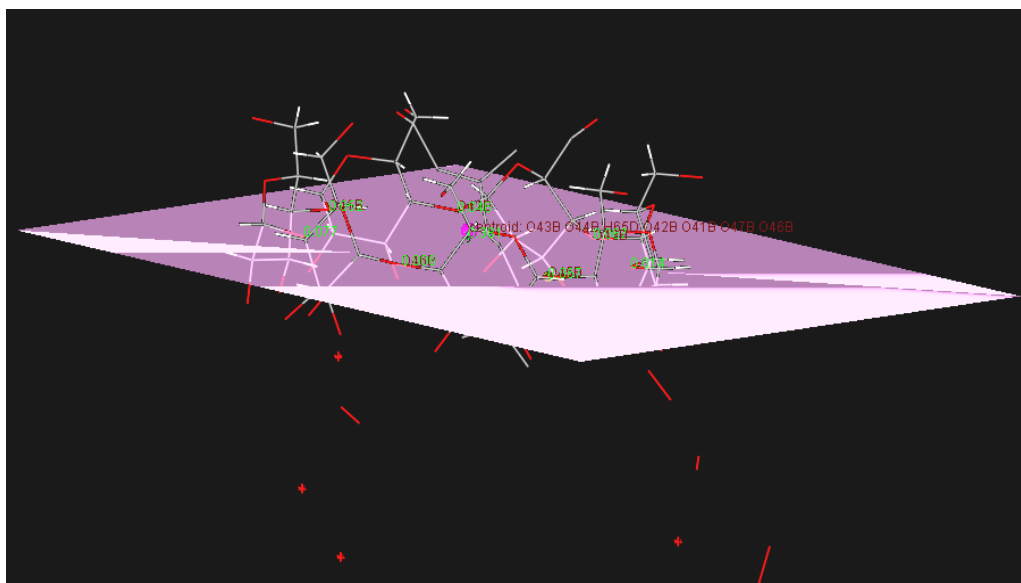
**Εικόνα 11.4** Στην εικόνα παρουσιάζεται ο Ξενιστής-A της  $\beta$ -CD, το μέσο επίπεδο των O4, πάνω στο οποίο βρίσκεται και το βαρύκεντρο των O4 και τέλος οι αποστάσεις των O4 από αυτό το επίπεδο.



**Εικόνα 11.5** Στην εικόνα παρουσιάζεται ο Ξενιστής-B της  $\beta$ -CD, οι αποστάσεις και οι γωνίες που σχηματίζουν τα O4, καθώς και το βαρύκεντρο αυτών.



**Εικόνα 11.6** Στην εικόνα παρουσιάζεται ο Ξενιστής-B της  $\beta$ -CD, το βαρύκεντρο των O4 και οι αποστάσεις των O4 από αυτό.



**Εικόνα 11.7** Στην εικόνα παρουσιάζεται ο Ξενιστής-B της  $\beta$ -CD, το μέσο επίπεδο των O4, σε απόσταση 0.381Å από το οποίο βρίσκεται και το βαρύκεντρο των O4 και τέλος οι αποστάσεις των O4 από αυτό το επίπεδο.

Ακόμα παρατίθεται πίνακας (Πίνακας 11.3) όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των γεωμετρικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζονται στους Πίνακες 11.1 και 11.2 για τον Α και Β Ξενιστή της  $\beta$ -CD, για το σύμπλοκο γερανιόλης/  $\beta$ -CD για άμεση σύγκριση αυτών μεταξύ των δυο υπομονάδων.

**Πίνακας 11.3** Μέσες τιμές γεωμετρικών χαρακτηριστικών της  $\beta$ -CD

**Geraniol/ $\beta$ -CD**

<b>Ξενιστής</b>	<b>A-</b>	<b>B-</b>
<b>D(Å)</b>	4.413	4.433
<b><math>\Phi</math>h(°)</b>	128.544	128.55
<b>d(Å)</b>	0.0501	0.047
<b>D<sub>K</sub>(Å)</b>	5.084	5.108

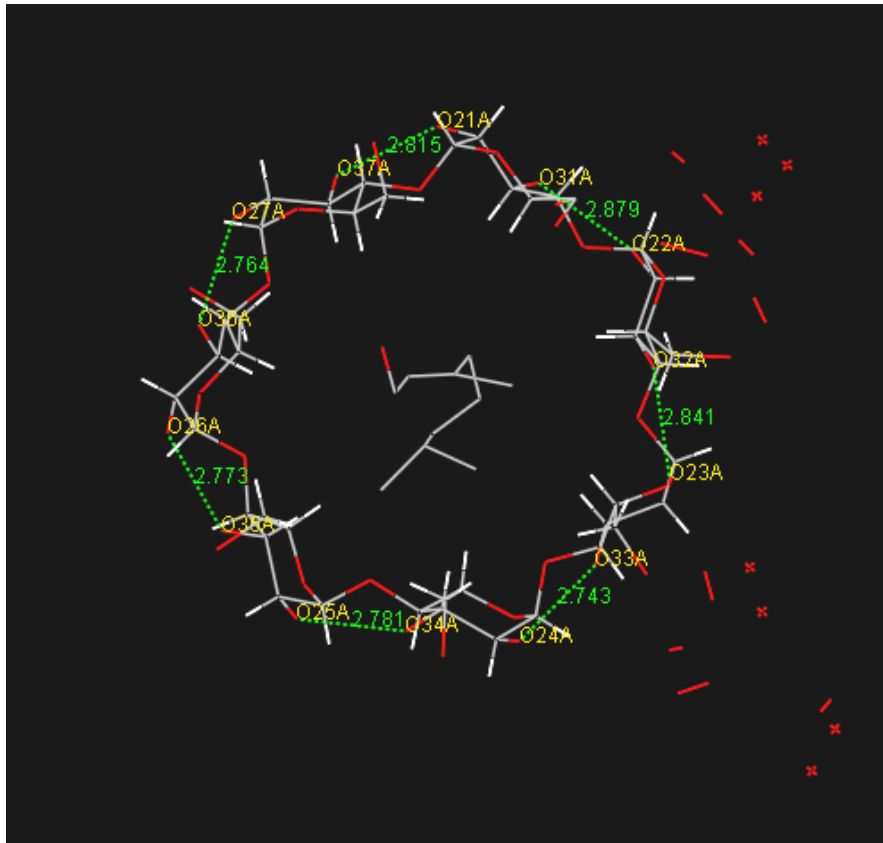
Οι γλυκοζιτικές μονάδες εξακολουθούν να υιοθετούν <sup>4</sup>C<sub>1</sub>-διαμόρφωση ανάκλιντρου. Αυτό επιβεβαιώνεται κι από το γεγονός ότι οι αποστάσεις των O4η από το κέντρο του μορίου (D<sub>K</sub>), τόσο στον Ξενιστή-A, όσο και στον Ξενιστή-B, είναι περίπου ίδιες και ίσες περίπου με 5Å (D<sub>K</sub>=5.084Å και D<sub>K</sub>=5.108Å για τον Ξενιστή-A και τον Ξενιστή-B, αντίστοιχα). Επομένως δεν παρατηρείται παραμόρφωση των ξενιστών λόγω του εγκλεισμού της γερανιόλης και της κρυσταλλικής διευθέτησης. Τα μόρια της  $\beta$ -CD διατηρούν τον άξονα 7<sup>ης</sup> τάξης, που διέρχεται από το βαρύκεντρο των O4.



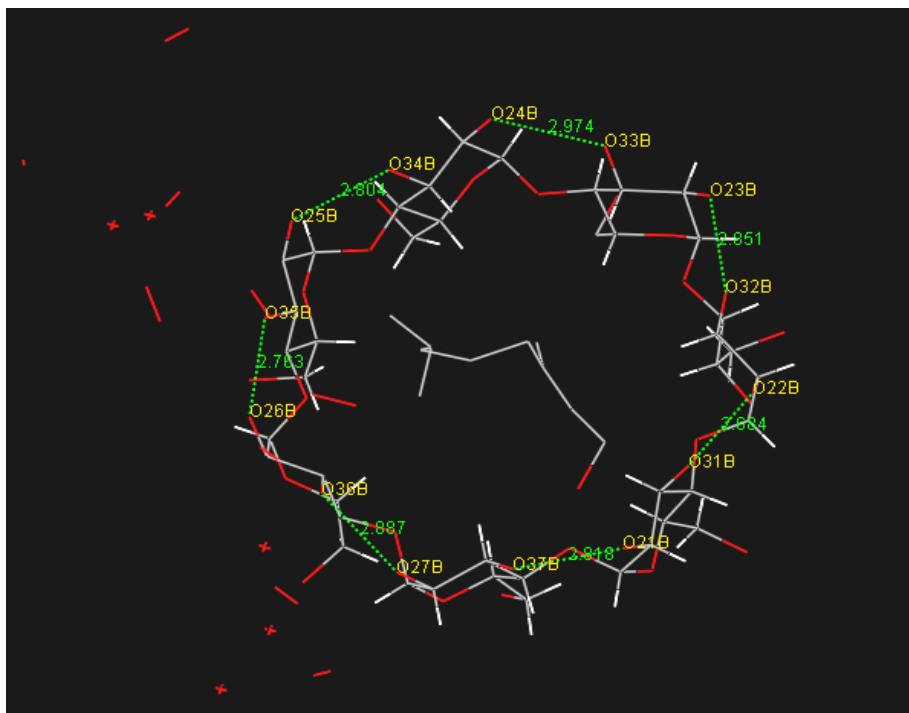
---

Επιπλέον, δεν παρατηρείται παραμόρφωση ούτε του μέσου επιπέδου του μακρόκυκλου των CD καθώς τα  $O4n$  άτομα δεν παρεκκλίνουν σχεδόν καθόλου από το μέσο επίπεδο που αυτά ορίζουν ( $d(\text{Å}) = 0.0501$  και  $d(\text{Å}) = 0.047$  για τον του A και B Ξενιστή αντίστοιχα), οπότε μπορούν να θεωρηθούν συνεπίπεδα άτομα, των οποίων μάλιστα οι αποστάσεις σχηματίζουν κατά προσέγγιση κανονικά πολύγωνα, βάσει των των παραμέτρων D και Φh που παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.1 και 11.2.

Το γεγονός αυτό εξηγείται από την ύπαρξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ των διαδοχικών γλυκοζιτικών μονάδων που αποτελούν το κάθε μόριο κυκλοδεξτρίνης (A και B Ξενιστής) και σταθεροποιούν την δομή των κυκλοδεξτρινών. Πρόκειται για τους δεσμούς  $O(3n-1)\dots O(2n)$ , όπου  $n=1,2\dots 7$  ο αριθμός της γλυκοζιτικής μονάδας της  $\beta$ -CD που φαίνονται στις εικόνες που ακολουθούν.



**Εικόνα 11.8** Ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν την δομή του Ξενιοσίνης-Α της κυκλοδεξτρίνης, με μέσο μήκος 2.799 Å.



**Εικόνα 11.9** Ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν την δομή του Ξενιοσίνης-Β της κυκλοδεξτρίνης, με μέσο μήκος 2.826 Å.

Οι παραπάνω δεσμοί σχηματίζονται καθώς όλες οι δευτεροταγείς O(2) και O(3) υδροξυλομάδες βρίσκονται στην μία πλευρά των κυκλοδεξτρινών, χάρη στον προσανατολισμό των γλυκοζιτικών μονάδων (cis διαμόρφωση) που σχηματίζουν τις κυκλοδεξτρίνες. Αντίθετα, οι πρωτοταγείς υδροξυλομάδες των O(6) των κυκλοδεξτρινών, βρίσκονται στην άλλη πλευρά της κυκλοδεξτρίνης και μπορούν να περιστρέφονται γύρω από τον C(5)-C(6) δεσμό με τον προτιμώμενο προσανατολισμό της διαδοχής O(5)-C(5)-C(6)-O(6) να έχει αρνητικό πρόσημο, (-)-*gauche*, όπως φαίνεται και στους πίνακες 1 και 2 (δίδρη γωνία t).

Ο προσανατολισμός αυτός σημαίνει ότι οι O(6) υδροξυλομάδες δείχνουν, κατά κύριο λόγο, έξω από κέντρο του μακρόκυκλου. Αντίθετα, κατά τον προσανατολισμό της διαδοχής O(5)-C(5)-C(6)-O(6) με θετικό πρόσημο, (+)-*gauche*, ο οποίος αποτελεί και την λιγότερο προτιμώμενη διαμόρφωση των γλυκοζιτικών μονάδων της κυκλοδεξτρίνης, οι O(6) υδροξυλομάδες κατευθύνονται προς το κέντρο της κοιλότητας και για τον λόγο αυτό μπορούν να δημιουργούν δεσμό υδρογόνου με το εγκλειόμενο ξενιζόμενο μόριο.

Ο σχετικός προσανατολισμός των γλυκοζιτικών υπομονάδων περιγράφεται επίσης καλά κι από τις δίδρη γωνίες γύρω από τους γλυκοζιτικούς δεσμούς που ορίζονται από την  $\varphi$ , O5(x)-C1(x)-O4(x')-C4(x') (όπου x, ο αριθμός της γλυκοζιτικής μονάδας και x' ο αριθμός της γλυκοζιτικής μονάδας που ακολουθεί σύμφωνα με το σχήμα της κυκλοδεξτρίνης) και  $\psi$ , C1(x)-O4(x')-C(x')-C(x) (Saenger and Steiner, 1998).

**Πίνακας 11.4** Οι διεδρες γωνίες  $\varphi$  και  $\psi$  των γλυκοζιτικών μονάδων του Ξενιστή -A και του Ξενιστή -B.

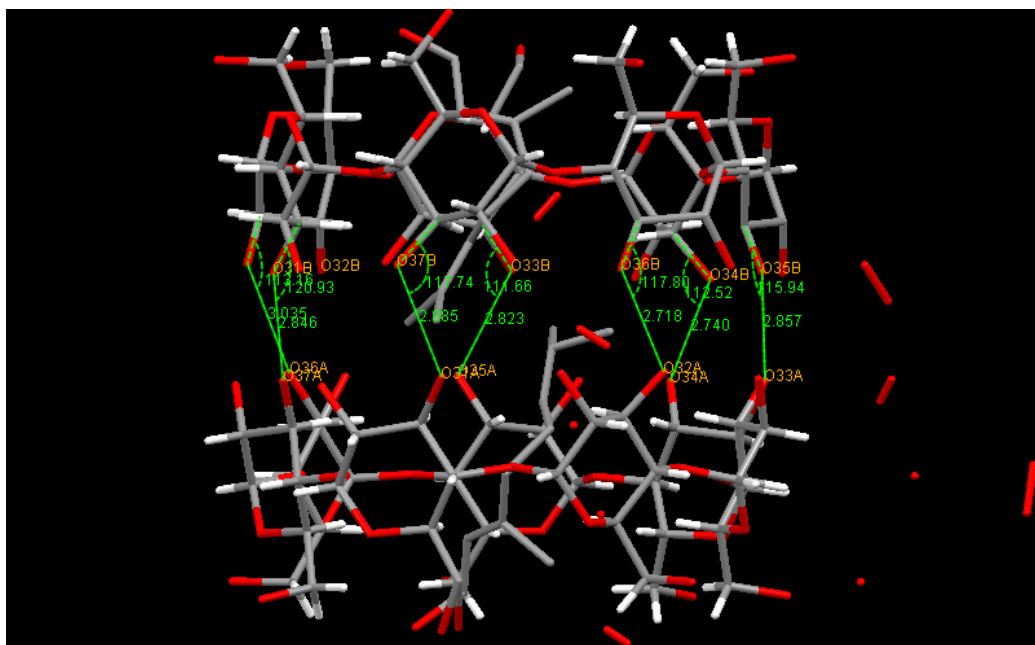
$\varphi$	Ξενιστής-A(°)	Ξενιστής-B(°)
C41-O41-C12-O52	109.80	120.46
C42-O42-C13-O53	112.42	117.13
C43-O43-C14-O54	113.59	106.22
C44-O44-C15-O55	114.14	115.03
C45-O45-C16-O56	116.72	114.84
C46-O46-C17-O57	118.36	114.37
C47-O47-C11-O51	115.83	110.40
$\psi$	Ξενιστής-A(°)	Ξενιστής-B(°)
C11-O47-C47-C37	126.99	122.13
C12-O41-C41-C31	128.41	125.85
C13-O42-C42-C32	130.18	132.60
C14-O43-C43-C33	124.84	126.72
C15-O44-C44-C34	121.92	128.96
C16-O45-C45-C45	123.44	124.86
C17-O46-C46-C46	131.22	130.30

Οι αναμενόμενες τιμές για τις γωνίες  $\varphi$  και  $\psi$  κυμαίνονται μεταξύ 102-123° και 112-149° αντίστοιχα για τις  $\beta$ -CDs. Από τον παραπάνω πίνακα, γίνεται φανερό ότι οι γωνίες  $\varphi$  και  $\psi$  των γλυκοζιτικών μονάδων της  $\beta$ -CD μετά τον εγκλεισμό σε αυτή του μορίου της γερανιόλης παραμένουν σε αυτά τα όρια, οπότε η διαμόρφωση αυτής μπορεί να θεωρηθεί αμετάβλητη σε σχέση με την διαμόρφωση της  $\beta$ -CD όταν δεν εγκλείεται κάποιο μόριο στην κοιλότητα αυτής.

Το γεγονός της μη παραμόρφωσης των μορίων CD κατά τον εγκλεισμό μορίων γερανιόλης σε αυτά πιθανά εξηγείται από την φύση των δυνάμεων που οδηγούν σε αυτόν (μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις).

## 12. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΔΙΜΕΡΟΥΣ ΤΗΣ $\beta$ -CD ΣΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΓΕΡΑΝΙΟΛΗΣ/ $\beta$ -CD

Δύο μόρια  $\beta$ -CD, όπως φαίνεται στο σχήμα (Εικόνα 12.1), ο Ξενιστή-A και -B της κυκλοδεξτρίνης σχηματίζουν το διμερές τύπου κεφαλής-κεφαλής (head to head) μέσω  $O_{3nB} \dots O_{3(8-n)A}$  δεσμών υδρογόνου (όπου  $n=1,2 \dots 7$ , ο αριθμός της γλυκοζιτικής μονάδας), οι οποίοι φαίνονται στο σχήμα που ακολουθεί και περιγράφονται από τον πίνακα που ακολουθεί:

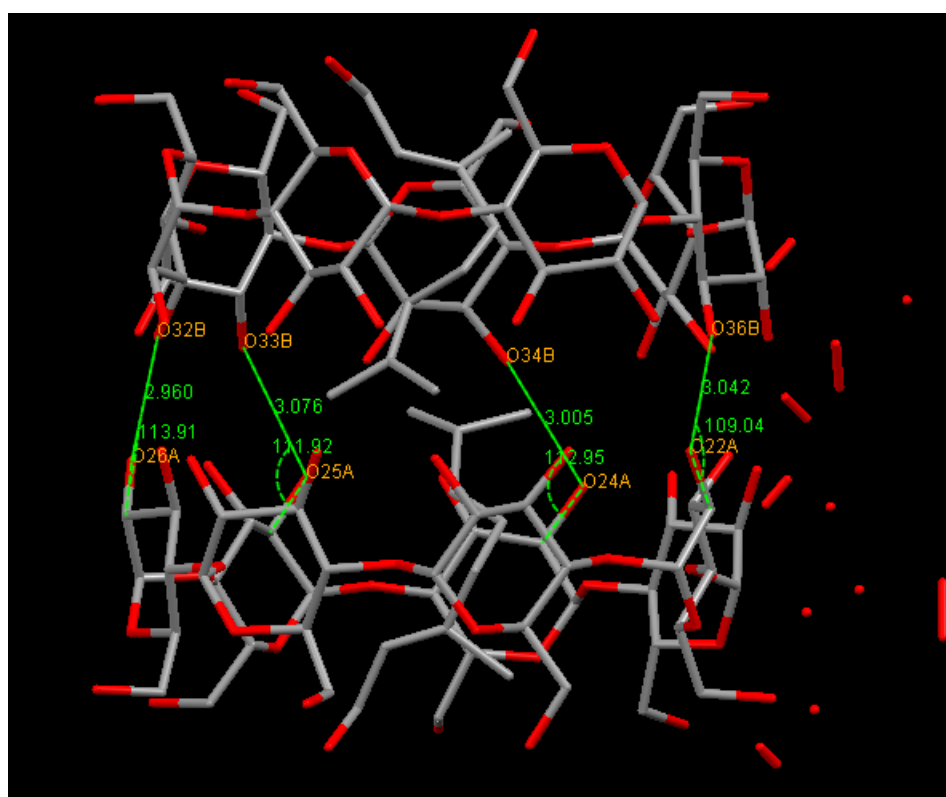


**Εικόνα 12.1** Οι διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου  $O_{3nB} \dots O_{3(8-n)A}$  που συνενώνουν τα δυο μόρια της κυκλοδεξτρίνης.



**Πίνακας 12.2** Περιγραφή των διαμοριακών δεσμών υδρογόνου  $O_{2nB}...O_3(8-n)A$  που συνενώνουν τα δυο μόρια της κυκλοδεξτρίνης.

Ξενιστής-B	Ξενιστής-A	Αποστάσεις (Å)	Γωνίες (°)
O21B	O37A	3.035	115.67
O22B	O36A	3.035	113.16
O24B	O34A	2.970	111.91
O25B	O33A	2.984	117.19
O26B	O32A	3.046	112.72



**Σχήμα 12.3** Οι διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου  $O_{2nB}...O_2(8-n)A$  που συνενώνουν τους Ξενιστές A και B της κυκλοδεξτρίνης (CD).

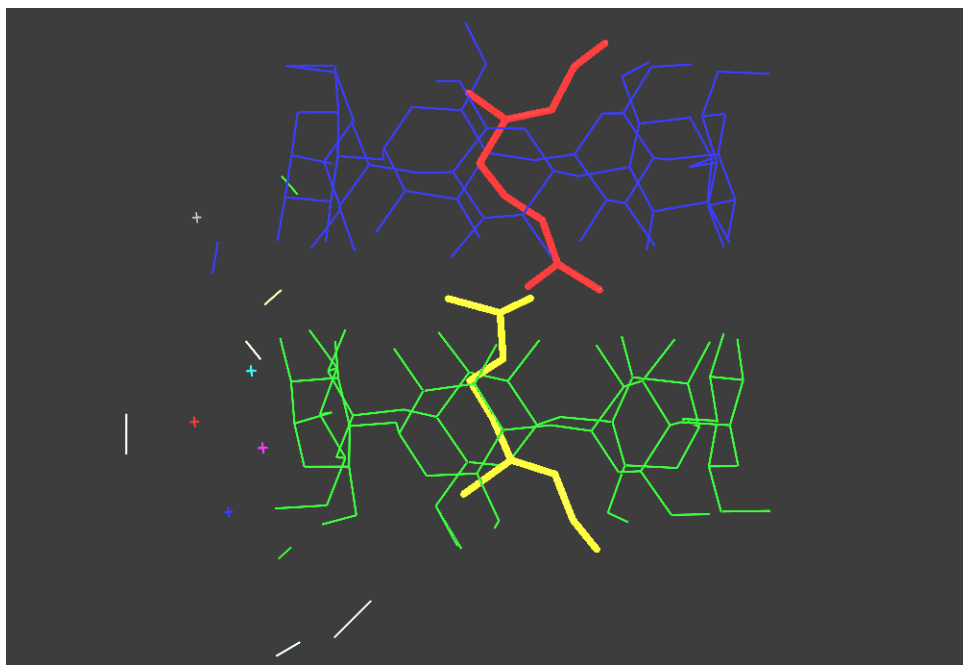
**Πίνακας 12.3** Περιγραφή των διαμοριακών δεσμών υδρογόνου  
O<sub>3n</sub>B...O<sub>2</sub>(8-n)A που συνενώνουν τους Ξενιστές A και B της  
κυκλοδεξτρίνης.

<b>Ξενιστής-B</b>	<b>Ξενιστής-A</b>	<b>Αποστάσεις (Å)</b>	<b>Γωνίες (°)</b>
<b>O32B</b>	<b>O26A</b>	2.960	113.91
<b>O33B</b>	<b>O25A</b>	3.076	111.92
<b>O34B</b>	<b>O24A</b>	3.005	112.95
<b>O36B</b>	<b>O22A</b>	3.042	109.04



## 13. ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΓΕΡΑΝΙΟΛΗΣ/ $\beta$ -CD

Από την ολοκλήρωση της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων προέκυψε το εξής μοριακό μοντέλο:

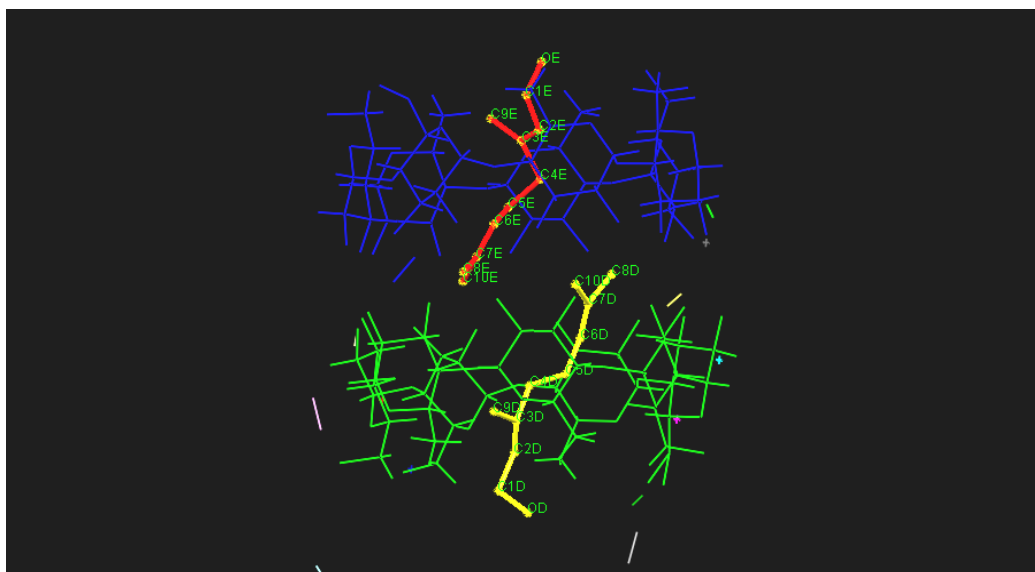


**Εικόνα 13.1 Το διμερές γερανιόλης/ $\beta$ -CD**

Κατά το μοντέλο αυτό, ως ασύμμετρη επαναλαμβανόμενη μονάδα λαμβάνεται το διμερές  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης (τους Ξενιστές A και B), στο οποίο εγκλείονται δύο γραμμικά μόρια γερανιόλης, τα οποία όμως καταλαμβάνουν πάνω από μία θέσεις κατά μήκος του κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό πιθανά οφείλεται στο σχήμα και το μέγεθος της γερανιόλης (γραμμικότητα γερανιόλης, μη-συμπληρωματικό σχήμα αυτής με τις θέσεις πρόσδεσης των  $\beta$ -CDs). Σε κάθε περίπτωση ο προσανατολισμός του εγκλειόμενου μορίου της γερανιόλης είναι τέτοιος ώστε το υδροξύλιο της γερανιόλης να εξέρχεται από την περιοχή των πρωτοταγών υδροξυλίων της  $\beta$ -CD.

Το εγκλειόμενο μόριο της γερανιόλης στο Ξενιστή-A μπορεί να πάρει είτε τη θέση B, είτε τη θέση D (δύο πιθανές θέσεις κατάληψης) με αντίστοιχους βαθμούς κατάληψης 40% και 60%. Ενώ η ξενιζόμενη γερανιόλη στον Ξενιστή-B μπορεί να πάρει τη θέση A, ή τη θέση C ή E





**Εικόνα 13.4** Ο 3<sup>ος</sup> συνδυασμός με κατάληψη 40%: δύο μόρια γερανιόλης στη θέση E και στη θέση D, με αριθμούς κατάληψης 40% και 60%, αντίστοιχα.

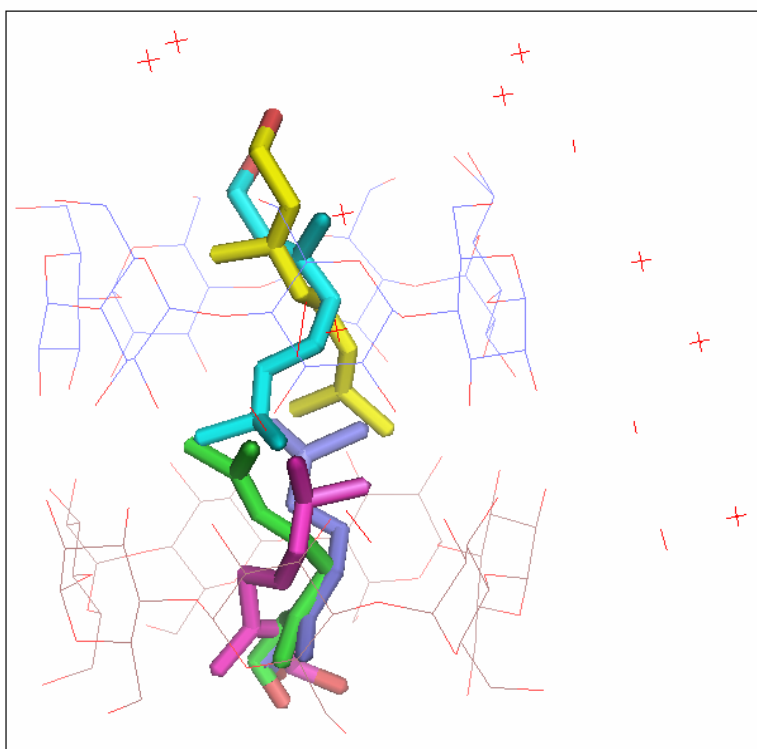
**Πίνακας 13.1** Απόσταση των μη-υδρογονικών ατόμων της γερανιόλης με το βαρύκεντρο του Ξενιστή-A (θέσεις B και D), και το βαρύκεντρο του Ξενιστή-B (θέσεις A, C και E) (Με κίτρινο σημειώνονται οι μικρότερες αποστάσεις για καθεμιά από τις 5 θέσεις των μορίων).

**ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΑΤΟΜΩΝ  
ΓΕΡΑΝΙΟΛΗΣ/ΒΑΡΥΚΕΝΤΡΟΥ (Å)**

	<b>α-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ</b>		<b>β-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ</b>		<b>ΘΕΣΗ E</b>
	<b>ΘΕΣΗ B</b>	<b>ΘΕΣΗ D</b>	<b>ΘΕΣΗ A</b>	<b>ΘΕΣΗ C</b>	
<b>O</b>	4.344	4.792	4.335	4.414	4.263
<b>C1</b>	3.286	4.177	3.218	3.942	3.310
<b>C2</b>	1.911	2.875	1.979	2.436	1.951
<b>C3</b>	1.238	1.634	1.343	2.017	1.333
<b>C4</b>	<b>1.178</b>	<b>0.751</b>	<b>1.243</b>	1.178	<b>1.005</b>
<b>C5</b>	1.641	1.207	1.685	<b>1.119</b>	1.698
<b>C6</b>	1.949	2.233	1.834	2.386	1.923
<b>C7</b>	3.210	3.259	3.269	2.765	3.235
<b>C8</b>	4.456	4.639	4.309	4.267	4.198
<b>C9</b>	2.563	2.163	2.447	3.293	2.587
<b>C10</b>	4.175	3.883	4.294	3.405	4.320
<b>M.O</b>	2.723	3.086	2.723	2.838	2.711

Στις εικόνες 13.2, 13.3 και 13.4, διακρίνονται τα μόρια της γερανιόλης να εγκλείονται στην υδρόφοβη κοιλότητα των  $\beta$ -CD, διατηρώντας το υδρόφιλο τμήμα τους (τις υδροξυλομάδες, οι οποίες στο σχήμα συμβολίζονται ως OA, OB, OC, OD κι OE, για τις θέσεις A, B, C, D κι E, αντίστοιχα) έξω από αυτήν.

Ακόμα, σύμφωνα με τις εικόνες 13.2-4 και τον Πίνακα 13.1, συμπεραίνουμε ότι τα μόρια της γερανιόλης βρίσκονται περίπου στο κέντρο της κοιλότητας των ξενιστών, σε θέσεις κατά προσέγγιση, ισαπέχουσες από το βαρύκεντρο του αντίστοιχου Ξενιστή της  $\beta$ -CD (περίπου 2.82 Å). Μάλιστα, η ελάχιστη απόσταση από το βαρύκεντρο παρουσιάζεται μεταξύ των C4 και C5 ατόμων της γερανιόλης.



**ΞΕΝΙΣΤΗΣ A:**

**ΘΕΣΗ D: κατάληψη 60%**

**ΘΕΣΗ B: κατάληψη 40%**

**ΞΕΝΙΣΤΗΣ B:**

**ΘΕΣΗ A: κατάληψη 40%**

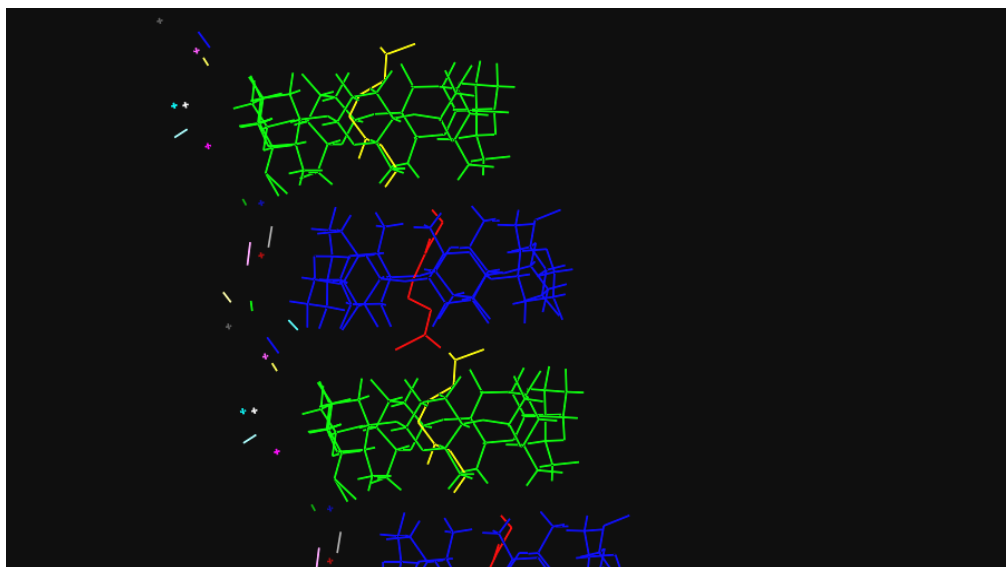
**ΘΕΣΗ E: κατάληψη 40%**

**ΘΕΣΗ C: κατάληψη 20%**

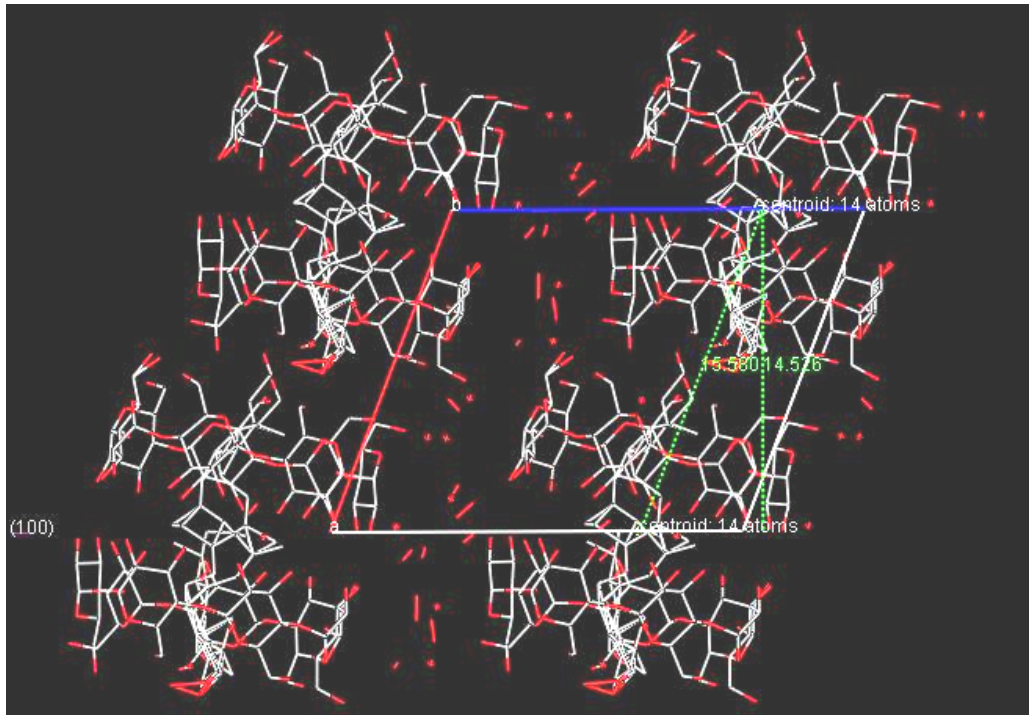
**Εικόνα 13.5** Γραφική αναπαράσταση των μορίων γερανιόλης κατανεμημένα στις 5 πιθανές θέσεις. Κάθε θέση αναπαρίσταται με διαφορετικό χρώμα και σημειώνεται το ποσοστό κατάληψης αυτής.

## 14. ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΔΙΜΕΡΩΝ ΤΗΣ $\beta$ -CD (Crystal Packing)

Στην κρυσταλλική κατάσταση τα διμερή τύπου κεφαλής-κεφαλής του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD σχηματίζουν στρώματα παράλληλα του κρυσταλλογραφικού άξονα **b**. Τα «κέντρα βάρους» των διμερών δύο γειτονικών τέτοιων στρωμάτων απέχουν κατά 15.58 Å, απόσταση ίση με το μήκος της πλευράς *a* της μοναδιαίας κυψελίδας ( $=|a|$ ) και διατάσσονται ακριβώς κατά τη διεύθυνση του κρυσταλλογραφικού άξονα **a**. Συμπεραίνουμε, έτσι, ότι το σύμπλοκο γερανιόλης/ $\beta$ -CD κρυσταλλώνει με την μοριακή διάταξη τύπου καναλιού (channel, CH) (Mentzafos *et al.*, 1991).



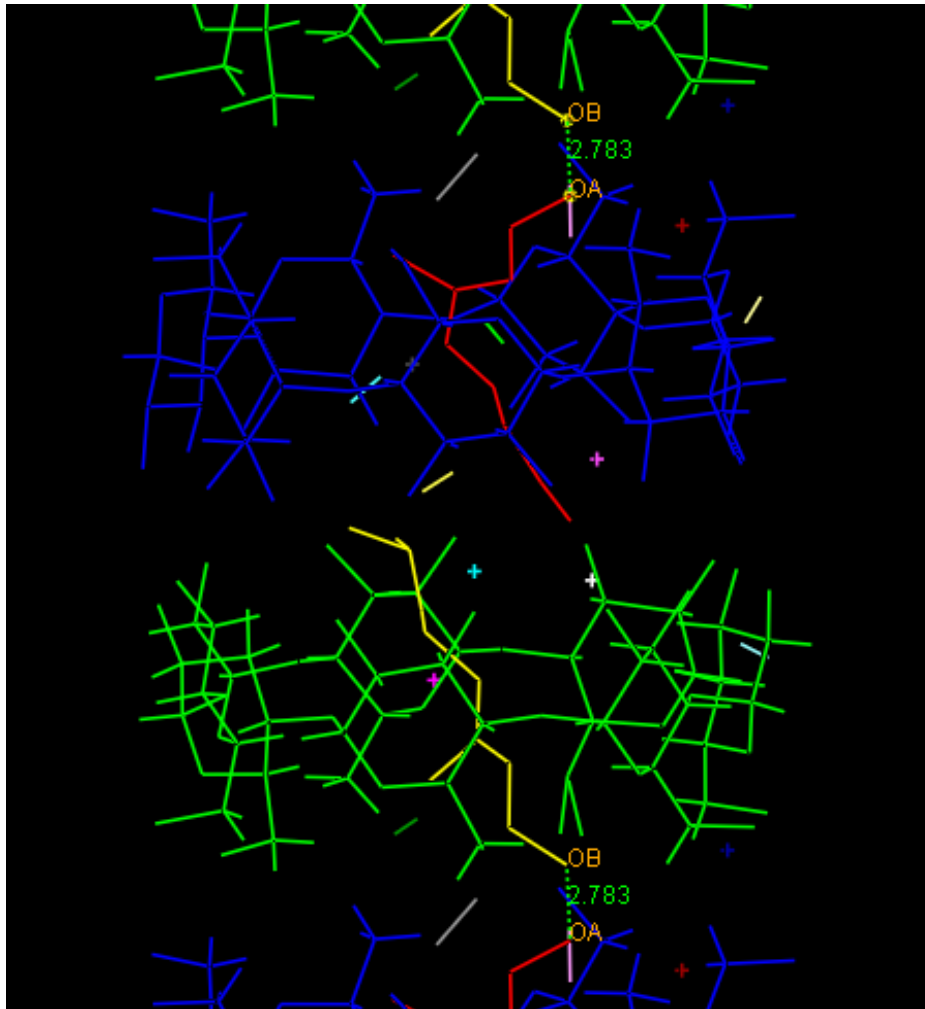
**Εικόνα 14.1** Διάταξη μορίων  $\beta$ -CD σε κανάλι κατά τον *a* κρυσταλλογραφικό άξονα. Τα μόρια νερού σταθεροποιούν την δομή αυτή, χωρίς να περιλαμβάνονται στην υδρόφοβη κοιλότητα που δημιουργούν τα διμερή της  $\beta$ -CD.



**Εικόνα 14.2** Στρώματα που σχηματίζουν τα διμερή του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD . Μετρείται η απόσταση των βαρυκέντρων γειτονικών διμερών και υπολογίζεται η γωνία που αυτά σχηματίζουν, η οποία συμπίπτει και με την γωνία της μοναδιαίας κυψελίδας μονοκλινούς κρυσταλλικού συστήματος.

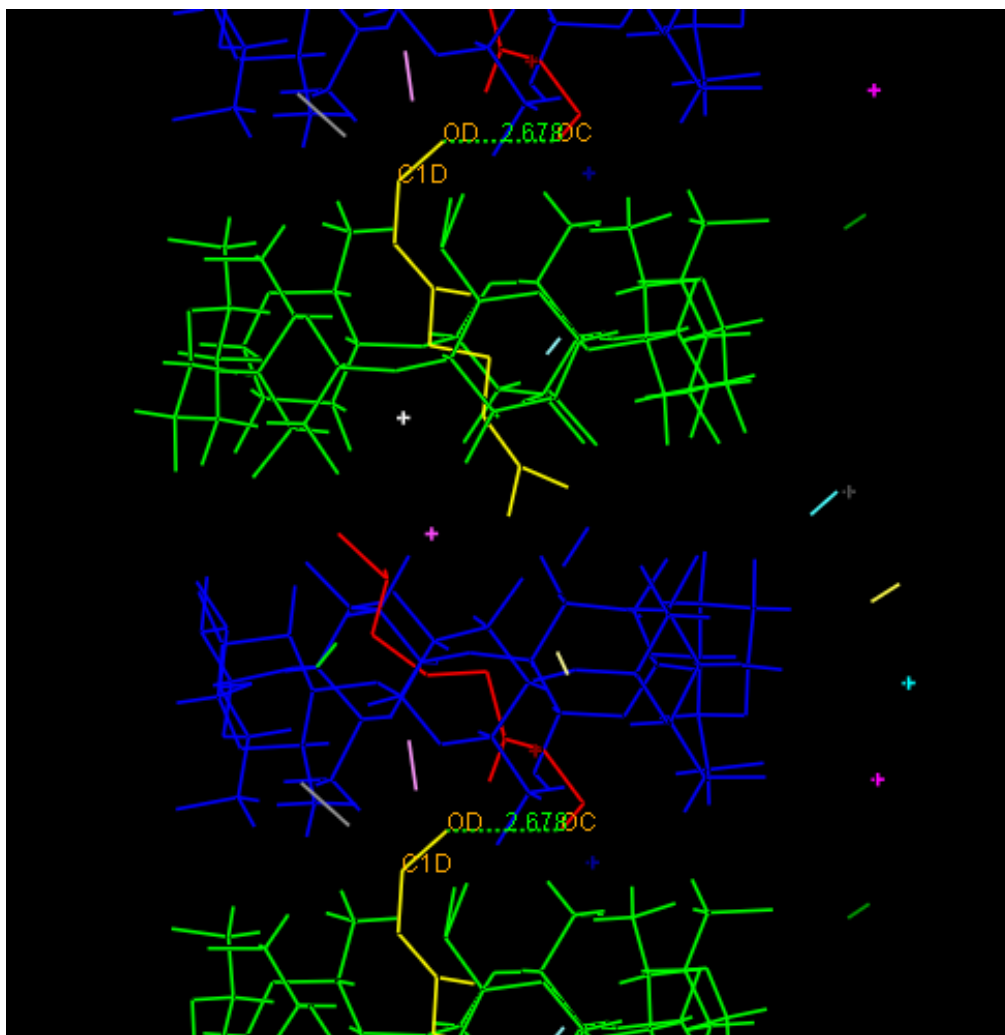
Στην σταθεροποίηση αυτού του καναλιού συμβάλλουν δεσμοί υδρογόνου μεταξύ: (i) των μορίων της  $\beta$ -CD κι ενός δικτύου νερού γύρω από αυτά καθώς και (ii) μεταξύ της υδροξυλομάδας των εγκλεισμένων μορίων γερανιόλης με πρωτοταγή υδροξύλια της  $\beta$ -CD γειτονικών διμερών, αλλά και υδροξύλια ξενιζομένων μορίων γερανιόλης σε γειτονικά διμερή.

Αναλυτικότερα, για τον Συνδυασμό 1 (θέσεις γερανιόλης A και B, με αριθμό κατάληψης 40%) κατά μήκος του καναλιού παρατηρείται ο υδρογονικός δεσμός μεταξύ του υδροξυλίου της γερανιόλης που βρίσκεται στην A θέση (OA) και εξέρχεται από την πλευρά των πρωτοταγή υδροξυλίων του Ξενιστή-A, με το υδροξύλιο της γερανιόλης που βρίσκεται στην B θέση (OB) και εξέρχεται επίσης από την πλευρά των πρωτοταγών υδροξυλίων του Ξενιστή-B του γειτονικού διμερούς. Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνεται ο δεσμός αυτός με μήκος OA-OB=2.783 και γωνία C1A-OA-OB= 103.09°.



**Εικόνα 14.2** Απεικόνιση δεσμού μεταξύ των μορίων της γερανιόλης γειτονικών διμερών  $\beta$ -CD που συμβάλλει στην σταθεροποίηση του καναλιού (με πιθανότητα 40%).

Για τον συνδυασμό 2 (θέσεις γερανιόλης C και D, με αριθμό κατάληψης 20%) παρατηρείται αντίστοιχα κατά μήκος του καναλιού ο υδρογονικός δεσμός μεταξύ του υδροξυλίου της γερανιόλης της C θέσης (OC), με το υδροξύλιο της γερανιόλης που βρίσκεται της D θέσης (OD) του γειτονικού διμερούς, όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί, με μήκος OC-OD= 2.678 και γωνία C1D-OD-OC= 122.55°.

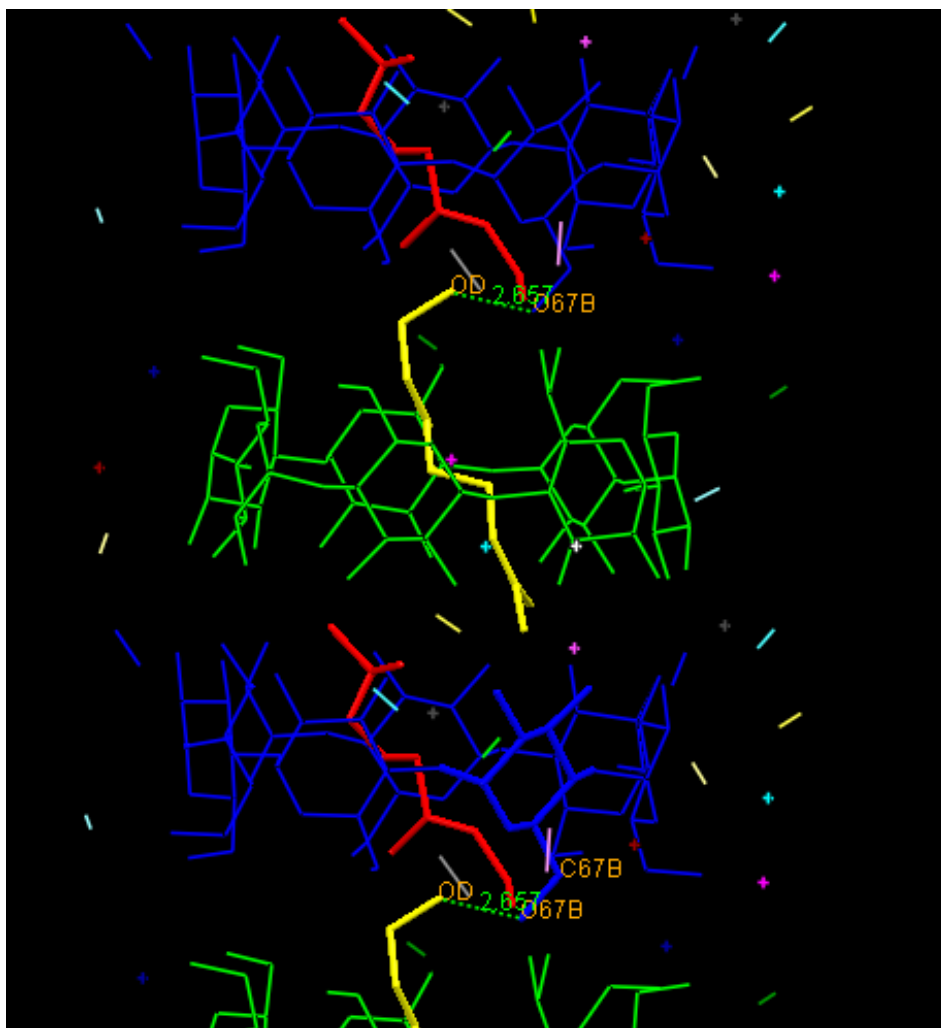


**Εικόνα 14.3** Απεικόνιση δεσμού μεταξύ των μορίων της γερανιόλης γειτονικών διμερών  $\beta$ -CD που συμβάλλει στην σταθεροποίηση του καναλιού (πιθανότητα 20%).

Υδρογονικοί δεσμοί κατά μήκος του καναλιού μεταξύ των εξερχόμενων υδροξυλίων των εγκλειόμενων μορίων γερανιόλης και των πρωτοταγών υδροξυλίων  $\beta$ -CD γειτονικού διμερούς παρατηρούνται για τις θέσεις:

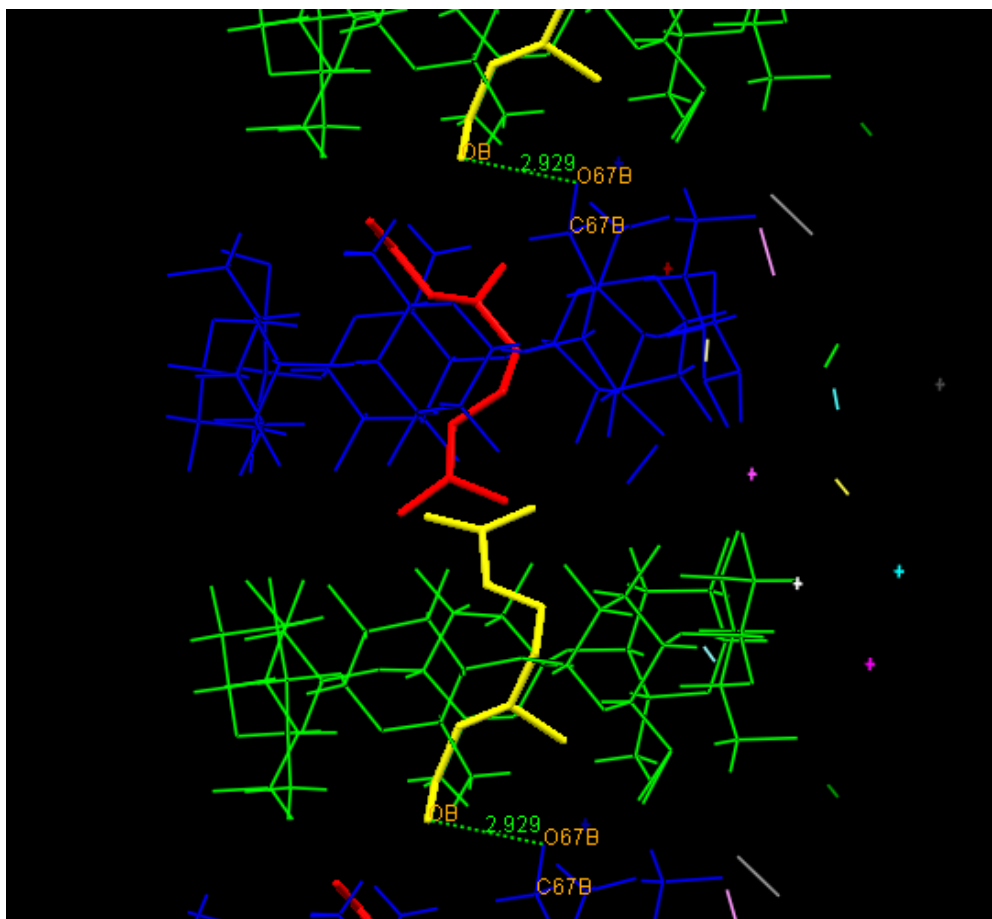
(i) D θέση (OD) (με αριθμό κατάληψης 60%) με το οξυγόνο O67 του Ξενιστή-B της κυκλοδεξτρίνης (O67B) γειτονικού διμερούς, όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί, με μήκος OD-O67B = 2.657 και γωνία C67B-O67B-OD = 103.23°.





**Εικόνα 14.4** Απεικόνιση δεσμού μεταξύ του μορίου της γερανιόλης και του μορίου της  $\beta$ -CD γειτονικής ασύμμετρης μονάδας που συμβάλλει στην σταθεροποίηση του καναλιού (με πιθανότητα 60%).

(ii) Β θέση (OB) (με αριθμό κατάληψης 40%) με το οξυγόνο O67 του Ξενιστή-B της κυκλοδεξτρίνης (O67B) γειτονικού διμερούς, όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί, με μήκος OB-O67B = 2.929 και γωνία C1B-OB-O67B = 105.60° ή OB-O67B-C67B.



**Εικόνα 14.5** Απεικόνιση δεσμού μεταξύ του μορίου της γερανιόλης και του μορίου της  $\beta$ -CD γειτονικής ασύμμετρης μονάδας που συμβάλλει στην σταθεροποίηση του καναλιού (με πιθανότητα 40%).

Οι  $\beta$ -CD συμμετέχουν στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τα ξενιζόμενα μόρια κυρίως χάρη στις πρωτοταγείς τους υδροξυλομάδες (O(6)-ομάδες) καθώς αυτές είναι ευέλικτες και μπορούν να περιστρέφονται γύρω από τον C(5)-C(6) δεσμό αντίθετα με τα δευτεροταγή O(2) και O(3) άτομα, τα οποία είναι άκαμπτα εξαιτίας της προτιμώμενης  ${}^4C_1$ -διαμόρφωσης. Είναι γνωστό ότι οι πρωτοταγείς υδροξυλομάδες των O(6) των γλυκοζιτικών μονάδων κυκλοδεξτρινών, μπορούν να περιστρέφονται γύρω από τον C(5)-C(6) δεσμό.

Κρυσταλλογραφικές (Dodziuk, 2006) κι άλλες μελέτες (Kirscher and Woods) έχουν δείξει ότι η προτιμώμενη διαμόρφωση των  $\alpha$ -D-γλυκοπυρανοζών των  $\beta$ -κυκλοδεξτρινών είναι αυτή κατά την οποία οι O(6) υδροξυλομάδες δείχνουν έξω από το κέντρο του μακρόκυκλου. Η διαμόρφωση αυτή λέγεται (-)-*gauche* και αντιστοιχεί σε αρνητική τιμή

---

( $\sim 60^\circ$ ) της diedρης γωνίας O(5)-C(5)-C(6)-O(6). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 11.2 τόσο στον Ξενιστή A, όσο και στον Ξενιστή B, έξι από τις επτά γλυκοζιτικές μονάδες παρουσίασαν τέτοια διαμόρφωση.

Αντίθετα, για την έβδομη γλυκοζιτική μονάδα του Ξενιστή-B παρατηρήθηκε (Πίνακα 11.2) θετική τιμή ( $+61.35^\circ$ ) της diedρης γωνίας O(5)-C(5)-C(6)-O(6), τιμή η οποία αντιστοιχεί σε διαμόρφωση (+)-*gauche* δηλαδή το O67B κατευθύνεται προς το κέντρο της κοιλότητας. Η διαμόρφωση αυτή δικαιολογείται τώρα που εξετάστηκαν οι υδρογονικοί δεσμοί καθώς όπως σημειώθηκε το O67B κάνει υδρογονικό δεσμό με το εγκλειόμενο μόριο της γερανιόλης του γειτονικού διμερούς, όταν αυτό βρίσκεται τόσο στη θέση D (60%), όσο και στη θέση B (40%).

## 15. ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΝΕΡΟΥ

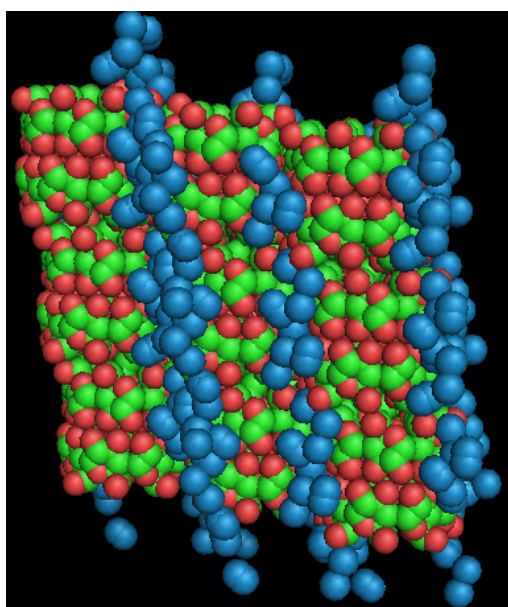
Η ασύμμετρη μονάδα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, περιέχει 16 μόρια νερού κατανεμημένα σε 25 θέσεις. Οι υδροξυλομάδες, καθώς δρουν είτε ως δότες είτε ως δέκτες δεσμού υδρογόνου, μπορούν να σχηματίζουν αλυσίδες του τύπου O-H...O-H...O, κάτι που παρατηρείται και στην παρούσα μελέτη μας. Πρόκειται για αλυσίδες των δύο έως τεσσάρων μορίων νερού, οι οποίες κυρίως παρατηρούνται στο κρύσταλλο που μελετάται. Επίσης υπάρχουν δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των νερών και ατόμων του μορίου της  $\beta$ -CD, που ανήκουν όμως σε διαφορετικές ασύμμετρες μονάδες.

Ακόμα παρατηρείται ότι μέσα στις διατάξεις, η γεωμετρία των υδρογονικών δεσμών είναι πολύ ευέλικτη, που επιτρέπει μια αξιοσημείωτη επιμήκυνση των αποστάσεων των H...O και μεγάλες αποκλίσεις από την γραμμικότητα (Steiner and Saenger, 1992a). Παρόλαυτα, οι γεωμετρίες περιορίζονται αυστηρά από την μικρότερη δυνατή προσέγγιση των H...H των 2.05Å.

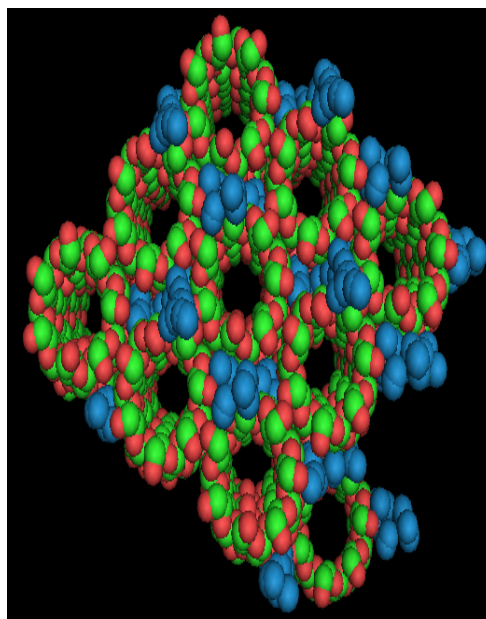
Στην εικόνα 15.1 (α και β), αναπαρίστανται το σύμπλοκο γερανιόλης/ $\beta$ -CD (διμερές CD και τα 2 μόρια γερανιόλης κατανεμημένα σε 5 θέσεις), καθώς και τα 16 μόρια νερού που κατανέμονται σε 25 θέσεις. Σημειώνονται οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ δύο ή/και περισσότερων μορίων νερού (έως και τεσσάρων) και τα αντίστοιχα μήκη αυτών.

Στην εικόνα 15.2 φαίνεται ο ρόλος των μορίων του νερού στην σταθεροποίηση της δομής.

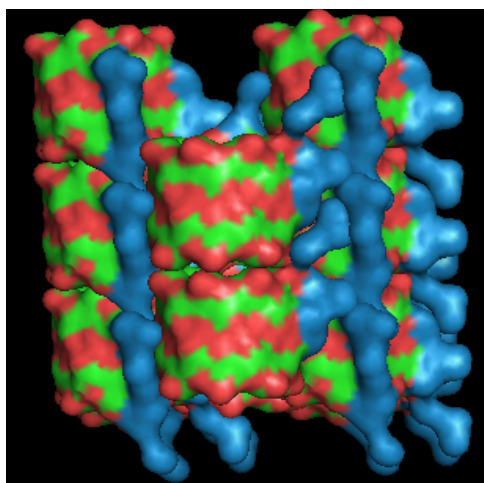




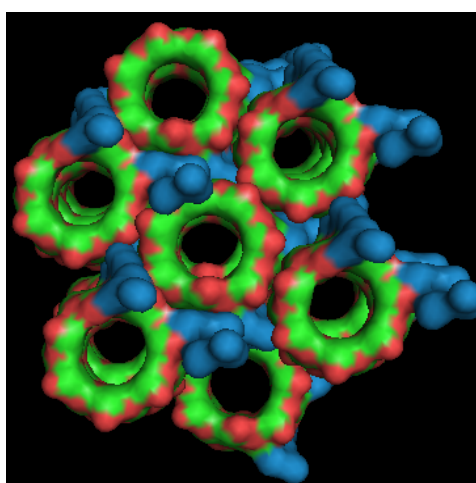
(α)



(β)



(γ)



(δ)

**Εικόνα 15.2** Μοριακή διάταξη διμερών γερανιόλης/ $\beta$ -CD, κατά την οποία με γαλάζιο συμβολίζονται τα μόρια νερού, με χρήση των χλωροπληρωτικών μοντέλων του προγράμματος PyMol (DeLano, 2002) (τα ζεύγη εικόνων (α,β) και (γ,δ) αναπαριστούν τη δομή με σφαίρες και επιφάνειες Van der Waals, αντίστοιχα).

## 15. Παρατηρήσεις-Σχόλια

Ο εγκλεισμός της γερανιόλης σε  $\beta$ -CD είναι αρκετά σημαντικός καθώς η γερανιόλη είναι ένα πτητικό και ευπαθές μόριο με πολλές όμως πολύτιμες ιδιότητες. Για τον λόγο αυτό το προϊόν εγκλεισμού της έχει μελετηθεί και με άλλες μεθόδους στο παρελθόν. Εντούτοις, η δομική μελέτη του συμπλόκου εγκλεισμού γερανιόλης/  $\beta$ -CD με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X πραγματοποιείται στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά.

Η μέθοδος αυτή είναι η μόνη που δίνει ακριβείς πληροφορίες για την δομή του συμπλόκου γερανιόλης/ $\beta$ -CD, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή και ξενιζομένου μορίου στην στερεή φάση και την επαναλαμβανόμενη διάταξη των μορίων μέσα στον κρύσταλλο. Η δομική πληροφορία που προκύπτει από μία κρυσταλλική δομή εμπεριέχει αλλοιώσεις που οφείλονται στις απαραίτητες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που οδήγησαν στην περιοδική διάταξη του κρυστάλλου και για τον λόγο αυτό η μελέτη με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X θεωρείται ότι αλληλοσυμπληρώνεται με άλλες τεχνικές, οι οποίες δίνουν περισσότερες πληροφορίες για την συμπεριφορά των μορίων στην υδατική φάση.

Το μοντέλο που προκύπτει από την κρυσταλλογραφική μελέτη παρουσιάζει ευρύτερο ενδιαφέρον καθώς το μόριο της γερανιόλης, όπως και το σύμπλοκο γερανιόλη/  $\beta$ -CD, έχει έναν σημαντικό βιολογικό και ιατρικό ρόλο. Συμπληρώνει, έτσι, μελέτες ερευνητών που χρησιμοποίησαν άλλες τεχνικές, όπως φασματομετρία ή κινητικές μελέτες και μελέτες πάνω στα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία μπορεί να συμμετάσχει αυτό το μόριο ή ασθένειες στις οποίες το μόριο μπορεί να παίξει ρόλο. Επιπλέον, το μοντέλο μπορεί να χρησιμεύσει σαν βάση για την κατανόηση των ιδιοτήτων του μορίου και της συμπεριφοράς του στα βιολογικά συστήματα.

---

## Βιβλιογραφία

Αλεξάνδρου Ν.Ε, Βαρβόγλη Α.Γ. (1996), «Οργανική Χημεία», Εκδόσεις Ζήτη, σελ. 270-273

Ζιώγας Β., Μαρκόγλου Ν.Α (2010), «Γεωργική Φαρμακολογία», Εκδόσεις Σταμούλη.

Ιγνατιάδου-Ραγκούση Β. (1996), «Χημεία Φυσικών Προϊόντων», σελ. 22-24, 51-75, 83-85.

Bhandari B., D'Arcy B., Young G. (2001), "Flavour retention during high temperature short time extrusion cooking process", *Int. J. Food Sci. Tech.*, Vol. 36, pp. 453-461.

Bennet, R. N and Wallsgrove, R. M. (1994), "Secondary metabolites in plant defence mechanisms", *New Phytol.* 127, pp. 617-633.

Bernardinelli C. & Flack H. D. (1985), "Least-Squares Absolute-Structure Refinement. Practical Experience and Ancillary Calculations", *Acta Cryst.*, Vol. A41, pp. 500-511.

Beurskens P. T., Beurskens G., de Gelder R., Garcia-Granda S., Gould R. O. and Smits J. M. M. (2008), «The DIRDIF2008 program system, Crystallography Laboratory», University of Nijmegen, The Netherlands.

Blow D. M. (2006), "International Tables for Crystallography", Vol. F, ch. 13.1, pp. 263-268.

Burke YD, Stark MJ, Roach SL, Sen SE, Croweel PL (1997), "Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary iso prenyls farnesol and geraniol", *Lipids* 32, pp 151-156.



---

Burla, M.C., Caliandro, R., Camalli, M., Carrozzini, B., Cascarano, G.L., De Caro, C., Giacobuzzo, C., Polidori, G. Siliqi, D., & Spagna, R. (2007), "IL MILIONE: a suite of computer programs for crystal structure solution of proteins", J. Appl. Cryst., 40, pp. 609-613.

Buvári-Barcza Ágnes and Barcza Lajos (1996), "Solubility Characteristics of  $\beta$ -Cyclodextrin" , J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. Vol. 26, 4, pp. 303-309.

Carnesecchi S, Langeley K, Exinger F, Gosse F, Rayl F (2002), "Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-fluorouracil treatment", J Pharmacol Exp Ther, 301, pp. 625-630.

Carnesecchi S, Bras-Gonclves R, Amyaouch B, Mirjam Z, Gosse F, Poupon M, Rayl F (2004), "Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5 fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts", Cancer Lett 215, pp. 53-59.

Clarot I., Cledat D., Battu S., Cardot P. J. P. (2000), "Chromatographic study of terpene derivatives on porous graphitic carbon stationary with  $\beta$ -cyclodextrin as mobile phase modifier", Journal of Chromatography, vol. 903, 1-2, pp. 67-76.

Connors K.A, Lipari JM (1976), "Effect of cycloamyloses on apparent dissociation constants of carboxylic acids and phenols: Equilibrium analytical selectivity induced by complex formation", J. Pharm. Sci., Vol. 65 Issue 3, pp. 379 – 383.

Decock G., Landy D., Surpateanu G., Fourmentin S. (2008), "Study of the retention of aroma components by cyclodextrins by static headspace gas chromatography, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry", Vol. 62, 3-4, pp.297-302.

---

DeLano W. L. (2002), The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.

Dev. S., Narula, APS and Yadav, J.S. (1986), "CRC Handbook of Terpenoids, Monoterpenoids", CRC Press, vol. I-II.

Duke, J.A (1992), "Handbook of Biologically Active Phytochemicals and their Activities", CRC Press.

Dodson, E. (2003), "Is it Jolly SAD?", Acta Cryst. D59, pp. 1958-1965.

Ealick, S.E. (2000), "Advances in multiple wavelength anomalous diffraction crystallography", Curr Opin Chem Biol, Vol.4 (5), pp. 495–459.

Dodziuk H. (2006), "Cyclodextrins and Their Complexes; chemistry, analytical methods, applications", WILEY-VCH.

Ehen Zsuzsanna (2006), "Characterization of pharmaceutical ingredients and cyclodextrin inclusion complexes using conventional and combined thermoanalytical techniques", PhD thesis, pp. 1-7.

Farrugia L. J. (1999), J. Appl. Crystallogr, vol.32, pp. 837-838.

Flack H. D. (1983), "On enantiomorph-polarity estimation", Acta Cryst., Vol. A39, pp.876-881.

Flack H. D. and Schwarzenbach D. (1988), "On the use of least-squares restraints for origin fixing in polar space groups", Acta Cryst., Vol. A44, pp. 499-506.

---

Giordano F., Novac C., Moyano J. R. (2001), "Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds", *Thermochimica Acta*, 380, pp. 123-151.

Grillo Renato , Nathalie F. S. de Melo, Daniele R. de Araújo, Gustavo H. G. Trossini, Elaine F. F. da Cunha, Teodorico de Castro Ramalho and Leonardo Fernandes Fraceto (2009), "Host–guest complexation of a nitroheterocyclic compound with cyclodextrins: a spectrofluorimetric and molecular modeling study", *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, pp. 1-6.

Imre Bako (1994), "Semiempirical Calculations on Cyclodextrins", *J Incl Phenom Mol Rec Chem*, vol. 18, pp. 275-289.

Ji P, Si MS, Podnos Y, Imagawa DK (2002), "Monoterpene geraniol prevents acute allograft rejection", *Transplant Proc.*, Vol. 34, pp. 1418-1419.

Hagvall L., Jens M.B, Borje A., Weidolf L., Merk H., Karlberg A. (2008), "Cytochrome P450-mediated activation of the fragrance compound geraniol forms potent contact allergens", *Tox. Appl. Pharmac.*, 233, pp. 308-313.

Hamilton W. C. (1965), "Significance tests on the crystallographic R factor", *Acta Cryst.*, Vol. 18, pp. 502-510.

Hammes Gordon G. (2005), "Spectroscopy for the Biological Sciences", Wiley Interscience Publication, pp. 17-25.

Harata Kazuaki (1998), "Structural Aspects of Stereodifferentiation in the Solid State", *Chem. Rev.*, Vol. 98, 1803-1827.

Hauptman, H. A. (1991), "The phase problem of x-ray crystallography", *Rep. Prog. Phys.* pp. 1427-1454.

---

Hauptman, H. A. (1997), "Phasing methods for protein crystallography", *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (5): pp. 672–80.

Kabsch W. (1993), *J. Appl. Cryst.*, vol. 26, pp. 795-800.

Kirschner K. N, Woods R. J (2001), "Solvent interactions determine carbohydrate conformation" , *PNAS*, vol. 98, 19, pp.10541-10545.

Lapczynski A., Bhatia S.P., Foxenberg R.J, Letizia C.S, Api A.M (2008), "Fragrance material review on geraniol", *Food Chem. Tox.*, Vol. 46, pp.160-170.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W. and Thornton, J. M. (1998), "Validation of protein models derived from experiment". *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, pp. 631–639.

Leslie, A. G. W. (1987), Profile fitting. In: "Computational Aspects of Protein Crystal Data Analysis. Proceedings of the Daresbury Study Weekend 23-24 January, 1987", Helliwell J.H., Machin P.A. and Papiz M.Z. (eds), Warrington, U.K.: Daresbury Laboratory, pp. 39-50.

Lijima Y, Gand DR, Fridman E, Lewinsohn E, Pichersky E. (2004), "Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil", *Plant Physiol* 134, pp. 370-379.

Lei Liu and Qing-Xiang Guo (2002), "The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins", *Journ. of Inc. Phen. And Macr. Chem.*, Vol. 42, 1-2, pp. 1-14.

Lei Liu, Ke-Sheng Song, Xiao-Song Li and Qing-Xiang Guo (2001), "Charge-transfer Interaction: A Driving Force for Cyclodextrin Inclusion Complexation", *Journ. of Inc. Phen. And Macr. Chem.*, Vol. 40, pp. 35-39.

---

Le Xin Song, Lei Bai, Xiao Min Xu, Jian He, Shu Zhen Pan (2008), "Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry", *Coord. Chem. Rev.*, vol. 253, pp. 1276-1284.

Loffson T., Jarho P., Mar Masson, T. Jarvinen (2005), "Cyclodextrins in drug Delivery", *Expert Opin. Drug Deliv.*, Vol. 2, pp. 335-351.

Luan F., Hampel D., Mosandl M., Wüst M. (2004), "Enantioselective analysis of free and glycosidically bound monoterpene polyols in *Vitis vinifera* L. cvs. Morio Muscat and Muscat Ottonel.", *J Agric Food Chem*, Vol. 52, p.p 2036–2041.

Luan F. , Mosandl A., Münch A., Wüst M. (2005), "Metabolism of geraniol in grape berry mesocarp of *Vitis vinifera* L. cv. Scheurebe: demonstration of stereoselective reduction, *E/Z*-isomerization, oxidation and glycosylation", *Phytochemistry*, 66(3), pp. 295-303.

MacArthur, M. W., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. (1994), "Knowledge-based validation of protein structure coordinates derived by X-ray crystallography and NMR spectroscopy", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, Vol. 4, pp. 731–737.

Macrae C. F., Edgington P. R., McCabe P., Pidcock E., Shields G. P., Taylor R., Towler M. and J. van de Streek (2006), *J.Appl.Cryst.*, vol. 39, pp. 453-457.

Macrae C. F., Bruno I. J., Chisholm J. A., Edgington P. R., McCabe P., Pidcock E., Rodriguez-Monge L., Taylor R., J. van de Streek and Wood P. A. (2008), *J. Appl. Cryst.*, vol. 41, pp. 466-470.

Martel B., Morcellet M., Ruffin D., Vinet F., Weltrowski M (2002), "Capture and Controlled Release of Fragrances by CD Finished Textiles", *J Incl Phen Macrocycl Chem*, 44, pp. 439-442.

---

Mentzafos D., Mavridis I. M., Le Bas G., Tsoukaris G. (1991), "Structure of the 4-tert-Butylbenzyl Alcohol- $\beta$ -Cyclodextrin Complex, Common Features in the Geometry of  $\beta$ -Cyclodextrin Dimeric Complexes", *Acta Cryst.*, B47, pp.746-757.

Moutzinos I., Kalogeropoulos N., Papadakis S.E, Konstantinou K. and Krathanos V.T (2007), "Encapsulation of Nutraceutical Monoterpenes in  $\beta$ -Cyclodextrin and Modified Starch, *Journal of Food Science*", Vol. 73, Nr.1, pp 89-94.

Naidoo Kevin J., Chen Jeff Yu-Jen, Jansson Jennie L. M., Widmalm Goran and Maliniak Arnold (2004), "Molecular Properties Related to the Anomalous Solubility of  $\beta$ -Cyclodextrin", *J. Phys. Chem. B*, Vol. 108(14), pp. 4236-4238.

Oldfield T. J. (2002), "Data Mining the Protein Data Bank: Residue Interactions", *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, Vol. 49, pp. 510–528.

Polyakov NE, Leshina T, Konovalova TA, Hand EO, Kispert LD (2004), "Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: NMR, EPR, and optical studies", *Free Radical Bio Med*, Vol. 36, 872-880.

Prashar A., Hili P., Veness GR., Evans SC. (2003), "Antimicrobial action of palmarose oil (*Cymbopogon martini*) on *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytochemistry*", Vol. 63, pp. 569-575.

Rastogi S.C., Johansen J.D. and Menne T., Natural ingredients based cosmetics (1996), "Content of selected fragrance sensitizers", *Contact Dermatitis*, Vol.34, pp. 423–426.

Rastogi S. C. , Johansen J. D., Frosch P., Menne T., Bruze M., Lepoittevin J. P., Dreier B., Andersen K. E., White I. R. (1998),

---

"Deodorants on the European market: quantitative chemical analysis of 21 fragrances", *Contact Dermatitis*, Vol. 38, pp. 29-35.

Rastogi S. C., Heydorn S., Johansen J. D. and Basketter D. A. (2001), "Fragrance chemicals in domestic and occupational products", *Contact Dermatitis*, Vol. 45, 4, pp. 221-225.

Rogers D. (1981), "On the application of Hamilton's ratio test to the assignment of absolute configuration and an alternative test", *Acta Cryst.*, Vol. A37, pp.734-741.

Rossmann, M. G., and Blow, D. M. (1962), "The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit", *Acta Cryst.*, Vol. 15, pp. 24-31.

Saenger Wolfram (1980), "Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Vol. 19, pp. 344-362.

Saenger Wolfram (1987), "Structure and Dynamics of Water Surrounding Biomolecules", *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, Vol. 16, pp. 93-114.

Saenger Wolfram and Steiner Thomas (1998), "Cyclodextrin Inclusion Complexes: Host-Guest Interactions and Hydrogen-Bonding Networks", *Acta Cryst.*, A54, pp. 798-805.

Samuelsson Gunnar (2004), «Φαρμακευτικά Προϊόντα Φυσικής Προέλευσης», Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 192-193, 151-208.

Schroeder F. (1998), "Induced chemical defences in plants", *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, pp. 1213-1216.

---

Schlenk, H. and Holman, R.T. (1950), "Separation and stabilization of fatty acids by urea complexes", *J. Am. Chem. Soc.* 72, pp. 5001-5004.

Schlenk, H. and Holman, R.T. (1950), "The urea complexes of unsaturated fatty acids". *Science* (Washington, D. C., 1883) 112, pp. 19-20.

Sheldrick G. M. (1997), "SHELXTL Reference Manual", Bruker-AXS, Inc., Madison, WI

Sheldrick G. M. (2008), *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, vol. 64, pp. 112-122.

Shoff SM, Grummer M, Yatvin MB, Elson CE (1991), "Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol", *Cancer Res*, Vol. 51, p.p 37–42.

Siralertmukul K., Nueman K., Limpanath S., Nilpairat S. (2009), "The preparation and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin-geraniol oil inclusion complex and application in local-pottery surface coating", 35<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, pp. 1-3.

Szejtli, J. (1998), "Introduction and Overview of Cyclodextrin Chemistry", *Chem Rev*, Vol. 98, pp. 1743-1753.

Szejtli (2004), "Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology", pp. 283-304.

Szente L, Szejtli J. (2004), "Cyclodextrins as food ingredients", *Trends Food Sci Tech*, Vol. 15, pp. 137-142.

Steed J.W. and Atwood J.L (2002), "Supramolecular Chemistry", Wiley, pp. 321-334.



---

Stoddart, J. F. *Carbohydr. Res.* (1989), "A century of cyclodextrins", Vol. 192, pp. 12-15

Taylor, G. (2003), "The phase problem", *Acta Crystallogr.*, D59, pp. 1881-1890.

Tickle, I. J., Laskowski, R. A. and Moss, D. S. (1998), "Error estimates of protein structure coordinates and deviations from standard geometry by full-matrix refinement of B- and B2-crystallin.", *Acta Cryst.* D54, pp. 243–252.

Tiwari M. and Kakkar, "Plant derived antioxidants-Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress"(2009), *Toxicology in Vitro*, Vol. 23, 2, pp. 295-301.

Usón, I., Sheldrick, G.M. (1999), "Advances in direct methods for protein crystallography, *Curr. Opin. Struct. Biol.*", Vol. 9 (5), pp. 643–648.

Yu SG, Hildebrandt LA, Elson CE (1995), "Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice.", *J Nutr* 125, pp. 2763–2767.

Wagner, G. J (1991), "Secreting grandular trichomes: More than just hairs", *Plant Physiol.*, Vol. 96, pp. 675-679.

Wang B.C. (1985), "Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography", *Methods Enzymol.*, Vol. 115, pp. 90-112.

Wang C. X., Chen Sh. L. (2005), "Fragrance-release Property of  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Compounds and their Application in Aromatherapy", *Journal of Industrial Textiles*, Vol. 34, No. 3, pp.157-166.

---

Wilson A. J. C. (**1976**), "Statistical bias in least-squares refinement", *Acta Cryst.*, , Vol. A32, pp. 994-996.

Parthe E. & Gelato L. M. (**1984**), "The standardization of inorganic crystal-structure data", *Acta Cryst.*, Vol. A40, pp.169-183.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Α. Υπολογιστικό πακέτο WINGX

Προγράμματα όπως το SHELXL (Siemens, 1995) και το TEXSAN (Molecular Structure Corporation, 1995) είναι εμπορικά υπολογιστικά προγράμματα που χρησιμοποιούνται για την εύρεση της δομής μικρών μορίων από δεδομένα περίθλασης ακτίνων X μέσω της διαδικασίας της επίλυσης και βελτιστοποίησής της δομής με μια προκαθορισμένη και αυτοματοποιημένη μέθοδο. Τα υπολογιστικά αυτά πακέτα είναι συνήθως αρκετά ακριβά και συμβατά με συγκεκριμένου τύπου διαθλασίμετρα. Το WINGX παρέχει ένα ολοκληρωμένο και ελεύθερα διαθέσιμο σετ προγραμμάτων, συμβατών με τα Microsoft Windows™, που βοηθούν προς αυτήν την κατεύθυνση.

Το WinGX είναι μια συλλογή από συναφή προγράμματα, που τρέχουν στην πλατφόρμα των Microsoft Windows™, και περιέχει τα καλύτερα ελεύθερα διαθέσιμα προγράμματα. Περιέχει μερικά προγράμματα από το πακέτο GX (Mallinson & Muir, 1985), από όπου και το όνομά του. Η μεταφορά δεδομένων μεταξύ διαφορετικών προγραμμάτων (ώστε η διαδικασία προσδιορισμού της δομής να είναι απλή και αυτοματοποιημένη) γίνεται αυτόματα, και η χειροκίνητη επέμβαση στους φακέλους περιορίζεται στο ελάχιστο. Το πακέτο WinGX περιλαμβάνει τα προγράμματα: SHELXS (Sheldrick, 1986), DIRDIF (Beurskens *et al.*, 1996) για την επίλυση της δομής και SIR92 (Altomare *et al.*, 1993), SHELXL93 (Sheldrick, 1993) και ORTEPIII (Johnson & Burnett, 1996; Farrugia, 1997) για την βελτιστοποίηση αυτής. Ακόμα, υπάρχουν πολλές ενσωματωμένες συνδέσεις με εξωτερικά προγράμματα γραφικών, όπως τα RasMol (Sayle & Milner-White, 1995) και SCHAKAL (Keller, 1989), αλλά και νεότερα προγράμματα όπως τα SHELX97 (Sheldrick, 1997) και SIR97 (Altomare *et al.*, 1999). Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τις μορφές SHELX και CIF για τις κύριες διεργασίες διαχείρισης και αποθήκευσης των φακέλων. Ουσιαστικά, όλοι οι φάκελοι χρησιμοποιούν τον ASCII κωδικό και επομένως ο χειρισμός τους μπορεί να γίνει με έναν κοινό επεξεργαστή κειμένου. Οι περισσότερες λειτουργίες επιτυγχάνονται μέσω GUIs. Το πρόγραμμα

---

(γραμμένο πλήρως σε Fortran77) έχει απαιτήσεις: H/Y IBM ή συμβατό υπολογιστή με τα Microsoft Windows 2 versions 3.1x, Windows 95/98 ή Windows NT, με επεξεργαστή στα 486 66 MHz, μνήμη RAM τουλάχιστον 16 Mbyte και ελεύθερο χώρο στον σκληρό δίσκο 20 Mbyte τουλάχιστον.

### **A.1. Πρόγραμμα SHELXL-97**

Το SHELXL-97 είναι ένα υποπρόγραμμα του πακέτου Wingx, το οποίο χρησιμοποιείται για βελτιστοποίηση κρυσταλλικών δομών. Για το συγκεκριμένο πρόγραμμα απαιτείται ένα αρχείο εισαγωγής (name.hkl), το οποίο περιέχει δεδομένα ανακλάσεων ( $h$ ,  $k$ ,  $l$ ,  $F^2$  και  $\sigma(F^2)$ ). Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα, οι εντολές βελτιστοποίησης και οι συντεταγμένες των ατόμων εισάγονται ως αρχείο name.ins. Οι εντολές εμφανίζονται στο αρχείο ως λέξεις 4 χαρακτήρων, που ακολουθούνται από ονόματα ατόμων, αριθμούς θέσεων, κα. Ένας πλήρης κατάλογος των ενεργειών γράφεται σε ένα αρχείο name.lst. Μετά από κάθε κύκλο βελτιστοποίησης (ξανα) γράφεται ένα αρχείο name.res, με τις τελευταίες τιμές για όλες τις βελτιστοποιημένες παραμέτρους. Οι εντολές ACTA και CONF παράγουν αρχεία name.cif, για ηλεκτρονική δημοσίευση. Οι εντολές LIST 6 και WPDB δίνουν αρχεία name.fcf και name.pdb, από τα οποία μπορούν να σχεδιαστούν με την βοήθεια του προγράμματος SHELXPRO διαφορετικοί χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας (διαβάζονται από πρόγραμμα Rymol). Τέλος, οι εντολές FLAT, AFIX και DFIX αφορούν γεωμετρικούς περιορισμούς, που είναι απαραίτητοι για τον συγκερασμό των πειραματικών δεδομένων με το θεωρητικό μοντέλο.

### **B. Πρόγραμμα Mercury 1.4.2., 2.3**

Το πρόγραμμα *Mercury* αναπτύχθηκε από το Cambridge Crystallographic Data Centre και χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως ένα εργαλείο γραφικής αναπαράστασης δομής. Το Mercury 1.4.2. χρησιμοποιείται για οπτικοποίηση της υπο εξέταση δομής (ουσιαστικά του αρχείου name.res), αλλά και την μελέτη της κρυσταλλικής διάταξης.

---

Τα χαρακτηριστικά του προγράμματος είναι τα εξής: α) Δέχεται ως αρχεία εισόδου τα name.cif, name.pdb, κα β) Έχει την δυνατότητα αναπράστασης της δομής με διάφορες μορφές (όπως ελλείψεις) γ) Πραγματοποιεί μετρήσεις αποστάσεων, γωνιών και ροπών στρέψης τόσο ατόμων όσο και κεντροειδών (centroids) ή επιπέδων δ) Εντοπίζει και παρουσιάζει υδρογονικούς δεσμούς και άλλες αλληλεπιδράσεις (δεσμοί Van der Waals) ε) Παρουσιάζει επιπλέον πληροφορίες για την δομή, όπως χημικά διαγράμματα και ατομικές συντεταγμένες και στ) Αποθηκεύει της μετρήσεις και τις αλλαγές ως εικόνες τύπου name.jpg, name.png, name.bmp, κά

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ**

Τα αρχεία geran.ins, geran.res, geran.lst, geran.cif, geran.pdb, geran.fcf και καθώς και το κείμενο παρατίθενται ηλεκτρονικά στον επισυναπτόμενο οπτικό δίσκο.