

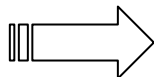
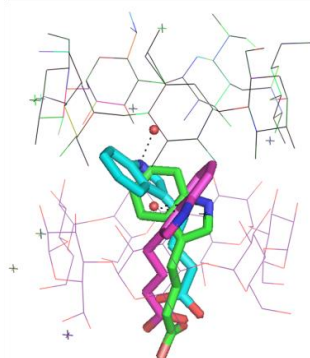


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ:
ΜΕΛΕΤΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ



Κατερίνα Κ. Φουρτάκα
Χημικός

Επιβλέπων καθηγητής: Κ. Μπεθάνης, Επίκουρος Καθηγητής,
Γενικό Τμήμα, Εργ. Φυσικής, ΓΠΑ.

ΑΘΗΝΑ 2012

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ:
ΜΕΛΕΤΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

Κατερίνα Κ. Φουρτάκα
Χημικός

Επιβλέπων καθηγητής: Κ. Μπεθάνης, Επίκουρος Καθηγητής, Γενικό
Τμήμα, Εργ. Φυσικής, Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2012

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ**

Κατερίνα Κ. Φουρτάκα

**Επιβλέπων καθηγητής: Κ. Μπεθάνης, Επίκουρος Καθηγητής, Γενικό
Τμήμα, Εργ. Φυσικής, Γ.Π.Α.**

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

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

Εισηγητής

Π. Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργ. Χημείας Γ.Π.Α.,

Μέλος

Χ. Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργ. Χημείας Γ.Π.Α., Μέλος

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Φυσικής και Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Μπεθάνη Κωνσταντίνου. Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε στο εργαστήριο Φυσικής και όλα τα φάσματα λήφθηκαν στο εργαστήριο Χημείας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή Κ.Μπεθάνη για την ηθική και επιστημονική υποστήριξή του καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Χρήστο Παππά και Πέτρο Ταραντίλη για τις παρατηρήσεις και τη διόρθωση της εργασίας αυτής. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομ. Καθ. Δημήτριο Μεντζαφό, για την εισαγωγή στον κόσμο των κυκλοδεξτρινών καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Ηλία Χριστοφορίδη για την επιστημονική και ηθική βοήθεια και υποστήριξή του κατά τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας. Τέλος, ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου Φυσικής (Δρ. Φραντζέσκα Τσορτέκη, Δρ. Αρετή Κοκκίνου, Δρ. Βασιλική Τριανταφυλλοπούλου), εργαστηρίου Χημείας (Δρ. Χάρη Κανάκη, Υπ. Διδ. Ειρήνη Αναστασάκη) και εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών (Δρ. Αιμιλία-Ελένη Νικολοπούλου, προπτυχιακή φοιτήτρια Στέλλα Τσαγκαροπούλου) που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της μελέτης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I. Κατάλογος Συντημήσεων	2
II. Σκοπός	3
III. Περίληψη	4
IV. Abstract.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	8
1.1. Φυτορμόνες.....	8
1.2. Αυξίνες.....	9
1.3. Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA).....	10
2.1. Κυκλοδεξτρίνες.....	12
2.2. Σχηματισμός προϊόντων εγκλεισμού ξενιζομένων μορίων σε κυκλοδεξτρίνες....	14
2.3. Δυνάμεις εγκλεισμού	16
2.4. Εφαρμογές του μοριακού εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο - Φασματοσκοπικές μέθοδοι	25
3.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου.....	25
3.1.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier	25
3.1.2 Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης.....	26
3.1.3 Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR.....	27
3.2 Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ	29
3.3. Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού (UV-Vis).....	31
3.3.1. Διαγράμματα Διαλυτότητας.....	31
3.3.2. Εκτίμηση στοιχειομετρίας	34
3.4. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου (¹ H NMR) ..	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	37
4.1 Κυκλοδεξτρίνες και η επίδρασή τους στη βλαστικότητα	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	38
5.1 Υλικά και Μέθοδοι	38
5.1.1 Αντιδραστήρια – Διαλύτες - Βιολογικό υλικό.....	38
5.1.2 Όργανα.....	38
5.2 Παρασκευές	40
5.2.1 Παρασκευή του προϊόντος εγκλεισμού IBA σε β-CD.....	40
5.2.2 Παρασκευή κρυστάλλων	40
5.3. Δομική μελέτη του προϊόντος εγκλεισμού IBA / β-CD με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ	41
5.4. Απόδοση φασμάτων Υπερύθρου	45
5.4.1. Αποσυνέλιξη στην περιοχή του φάσματος 1700-1800 cm ⁻¹	49
5.5. Μελέτη διαλυτότητας με φασματοφωτομετρία UV-Vis	54
5.6. Μελέτη του του συμπλόκου IBA/β-CD με φασματοσκοπία ¹ H NMR.....	58
6. Εφαρμογή του προϊόντος εγκλεισμού σε σπέρματα του είδους <i>Zoysia japonica</i>	60
6.1. Συνθήκες βλάστησης	61
6.2. Απολύμανση σπερμάτων	62
6.3. Εγκατάσταση πειραμάτων ελέγχου βλάστησης.....	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο	63
6.3.1. Πειράματα ελέγχου βλαστικότητας σε ιδανικές για την ποικιλία συνθήκες .	63
6.3.2. Πειράματα ελέγχου βλαστικότητας σε μη ιδανικές για την ποικιλία συνθήκες	64
Αποτελέσματα-Συζήτηση	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	72

I. Κατάλογος Συντμήσεων

Ελληνικός όρος	Αγγλικός όρος	Σύντμηση
Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ ή Ινδολοβουτυρικό οξύ	Indole-3-butyric acid	IBA
β -κυκλοδεξτρίνη	β -cyclodextrin	β -CD
Ινδολο-3-οξικό οξύ ή Ινδολοξικό οξύ	Indole-3-acetic acid	IAA
Φυτικοί ρυθμιστές αύξησης	Plant Growth Regulators	PGRs
Φασματοσκοπία Υπεριώδους-ορατού	Ultra Violent-Visible spectroscopy	UV-Vis
Σταθερά σύνδεσης / σταθερότητας	Stability constant	Ks
Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier	Fourier Transform Infrared spectroscopy	FT-IR
Φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης με μετασχηματισμό Fourier	Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transform Spectroscopy	DRIFTS
Φασματοσκοπία Ολικής Ανάκλασης	Attenuated Total Reflectance	ATR
Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού πρωτονίου	Nuclear Magnetic Resonance	^1H NMR

II. Σκοπός

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη των κυκλοδεξτρινών ως παράγοντες εγκλεισμού διαφόρων βιοδραστικών ουσιών γεωπονικού ενδιαφέροντος και των πλεονεκτημάτων που προσφέρει αυτός ο εγκλεισμός στις φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων που βρίσκονται ενθυλακωμένα στην κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση-συμπλοκοποίηση της φυσικής β-κυκλοδεξτρίνης με την φυτική αυξίνη, ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA). Το IBA έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός παράγοντας βλαστικότητας και ριζοβολίας των φυτών. Στόχος, λοιπόν, αυτής της ενθυλάκωσης είναι η βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της αυξίνης, όπως η αύξηση της διαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητάς της καθώς και η αργή αποδέσμευσή της σε ένα μικροπεριβάλλον γεωπονικών εφαρμογών. Μια τέτοια ιδέα, που κινείται προς την κατεύθυνση της μειούμενης χρησιμοποιούμενης ποσότητας αγροχημικών στη γεωργική πρακτική, αναμένεται να συμβάλλει όχι μόνο στην υγεία του καταναλωτή αλλά και στην προστασία του περιβάλλοντος. Ειδικότερα, το προϊόν της ενθυλακωμένης φυτορμόνης σε κυκλοδεξτρίνη εφαρμόζεται σε σπέρματα χλοοτάπητα του είδους *Zoysia japonica* cv Zenith[®] προκειμένου να εξετασθεί η επίδρασή της στο ρυθμό βλαστικότητας και στην τελική βλαστικότητα των σπερμάτων.

III. Περίληψη

Το ινδόλο-3-βουτυρικό οξύ (IBA) είναι μία αυξίνη που ανήκει στην οικογένεια των φυτικών ρυθμιστών αύξησης και προάγει τη ριζοβολία. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι μακροκυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που εμφανίζουν τη μοναδική ιδιότητα να εγκλωβίζουν υδρόφοβα μόρια στην κοιλότητά τους. Ο εγκλεισμός του IBA σε β -CD παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον στη γεωργική πρακτική χάρη στο γεγονός ότι προσφέρει ωφέλιμες τροποποιήσεις στις φυσικο-χημικές του ιδιότητες, όπως αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας και της διαλυτότητας, καθώς και βραδεία αποδέσμευσή του.

Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκε το προϊόν εγκλεισμού του IBA/ β -CD και μελετήθηκε με διάφορες μεθόδους. Η επανάληψη προηγούμενων κρυσταλλογραφικών πειραμάτων (Μάζη, μεταπτυχιακή διατριβή 2012), βελτίωσε τα δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X σε κρυσταλλική κατάσταση και επαλήθευσε το σχηματισμό διμερών β -κυκλοδεξτρίνης, με προσανατολισμό κεφαλής-κεφαλής (head-to-head) που εγκλωβίζουν στην σχηματιζόμενη κοιλότητα του διμερούς ένα μόριο IBA. Τα προϊόντα εγκλεισμού IBA/ β -CD βρέθηκαν και πάλι να κρυσταλλώνουν σε ομάδα χώρου C_2 σχηματίζοντας διμερή στοιχειομετρίας 1/2 (ξενιζομένου/ξενιστή) και να διευθετούνται στο χώρο σχηματίζοντας στρώσεις τύπου καναλιού κατά τον άξονα c .

Ο σχηματισμός του προϊόντος εκλεισμού IBA/ β -CD επιβεβαιώθηκε επίσης, στη στερεή κατάσταση, συγκρίνοντας τα φάσματα FT-IR του IBA, της β -CD, του μίγματος αυτών των ουσιών και του συμπλόκου τους IBA/ β -CD αντίστοιχα. Συγκεκριμένα η κορυφή που εμφανίζεται με τη μορφή ώμου στα 1734cm^{-1} φαίνεται να είναι ένδειξη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της β -CD και του μορίου του IBA. Επιπλέον, σε αυτή την εργασία η φασματοσκοπία FT-IR χρησιμοποιήθηκε, για πρώτη φορά, προκειμένου να αντλήσουμε ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με την αποδέσμευση του ξενιζομένου μορίου από τον ξενιστή. Αφού πραγματοποιήθηκε αποσυνέλιξη της περιοχής $1700\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ στα φάσματα του συμπλόκου βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ IBA και β -CD ελαττώνεται με την πάροδο των ημερών.

Μελέτη του συμπλόκου IBA/ β -CD πραγματοποιήθηκε και σε μορφή διαλύματος πραγματοποιώντας πειράματα διαλυτότητας με τη βοήθεια της φασματοφωτομετρίας UV-Vis. Τα αποτελέσματα που διεξήχθησαν σύμφωνα με τη μέθοδο Higuchi-Connors σε δύο διαφορετικές τιμές pH έδωσαν μία εκτίμηση της

σταθεράς σύνδεσης του IBA με τη β -CD απ' όπου βρέθηκε η $K_{1:1} = 5985\text{M}^{-1}$ ενώ η $K_{1:1} = 792\text{M}^{-1}$ σε pH = 3 και pH = 5.3 αντίστοιχα. Η γραμμικότητα του διαγράμματος του Higuchi-Connors έδειξε ότι η στοιχειομετρία του σχηματιζόμενου συμπλόκου στο διάλυμα είναι 1/1(ξενιζομένου/ξενιστή) ενώ στην κρυσταλλική κατάσταση είναι 1/2(ξενιζομένου/ξενιστή).

Προκειμένου να επιλυθεί αυτή η ασάφεια, λήφθηκε φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H NMR) αποκλειστικά σε σχηματισμένους κρυστάλους του συμπλόκου σε διάλυμα DMSO. Η φασματοσκοπία ^1H NMR έδειξε μια στοιχειομετρία 1/1(ξενιστή/ξενιζομένου) και έτσι επιβεβαιώθηκε η υπόθεση ότι η στοιχειομετρική αναλογία 1/2(ξενιστή/ξενιζομένου) εμφανίζεται αποκλειστικά την κρυσταλλική κατάσταση.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου βλαστικότητας σε σπέρματα του είδους *Zoysia japonica* cv Zenith[®] σε ιδανικές και μη ιδανικές για το είδος συνθήκες. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν διαλύματα IBA 25 και 50 ppm καθώς και τα σύμπλοκα αυτών με β -CD και με αυτά πραγματοποιήθηκε προκατεργασία των σπερμάτων. Βρέθηκε λοιπόν ότι οι επεμβάσεις στα σπέρματα, του προϊόντος εγκλεισμού του IBA 25 ppm, αύξησε σημαντικά το ρυθμό βλαστικότητας καθώς και την τελική βλαστικότητα σε μη ιδανικές συνθήκες βλάστησης.

IV. Abstract

The indole-3-butyric acid (IBA) is an auxin which belongs to the Plant Growth Regulators (PGRs) family and is used for the induction of root formation. Cyclodextrins are macrocyclic oligosugars that are known for their unique ability to act as molecular containers. The inclusion of IBA in β -Cyclodextrin (β -CD) is of particular interest in agriculture as it offers beneficial modifications in its physico-chemical properties, such as enhanced bioavailability and improved solubility, and a controlled release.

In the present work, the IBA/ β -CD inclusion compound has been prepared and studied with different methods. The repetition of previous conducted crystallographic experiments (Vasiliki Mazi, Master Thesis, 2012), has given improved crystallographic data and has verified the formation, in the crystalline state, of head-to-head β -CD dimers encapsulating an IBA molecule within their dimeric cavity. In accordance with the previous results, the IBA/ β -CD complexes was found crystallize in the C_2 space group and the formed dimers at stoichiometry 1/2 guest/host are packed in a channel mode across the c -axis.

The formation of the IBA/ β -CD inclusion compound has also been verified, in the solid state, by comparing the FT-IR spectra of IBA, β -CD, mixture of the two and the complex IBA/ β -CD respectively. Especially, the peak in 1734 cm^{-1} revealed the coupling between the β -CD and IBA molecule. Moreover, in this work, FT-IR was used for the first time, in order to obtain quantitative results of the slow release of the guest from the complex. After the deconvolution of the region $1700\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ of the spectra, it was found that the characteristic peak of the coupling was decreasing over the passage of days.

The formation of the IBA/ β -CD complex was also verified, in solution, by conducting phase solubility experiments using UV-Vis spectrophotometry. The data obtained from these experiments were used, according the Higuchi-Connors method in two different pH values, to estimate the binding constant of the formed complex. The values obtained are $K_{1:1} = 5985\text{M}^{-1}$ and $K_{1:1} = 792\text{ M}^{-1}$ for $\text{pH} = 3$ and $\text{pH} = 5.3$ respectively. The linearity of the Higuchi-Connors diagram indicates that the guest/host stoichiometry of the formed complex in solution is 1/1 whereas in the crystalline state a 1/2 stoichiometry was found. In order to resolve this ambiguity, an

NMR experiment of complexed crystals dissolved in DMSO was performed. The NMR spectrum indicates a stoichiometry of about 1/1 and thus verifies the existence of the 1/2 IBA/ β -CD dimers only in the crystalline state.

The stoichiometry and the binding constant of the formed complex is essential for the preparation of the solutions conducted on turfgrass seeds. In particular, we have ensured that in the prepared solutions the IBA in its complexed form is in excess, compared to its free form.

On the basis of the above results, experiments on *Zoysia japonica cv Zenith*[®] turfgrass seeds were applied under favorable and unfavorable germination conditions. For this purpose, solutions of 25 and 50ppm of uncomplexed IBA, as well as complexed IBA/ β -CD were prepared in order to dip the seeds into. It was found that the intervention of the seeds into the solution of complexed IBA (25 ppm) / β -CD (50 ppm), increased significantly the germination rate as well as the final germination under unfavorable conditions.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1.1. Φυτορμόνες

Η ορμόνη (από την ελληνική ορμή – ώθηση) είναι μια χημική ουσία που απελευθερώνεται από ένα ή περισσότερα κύτταρα και επηρεάζει τα κύτταρα σε άλλα μέρη του οργανισμού. Είναι ουσιαστικά μία αγγελιοφόρος χημική ουσία που μεταφέρει ένα σήμα από ένα κύτταρο στο άλλο.

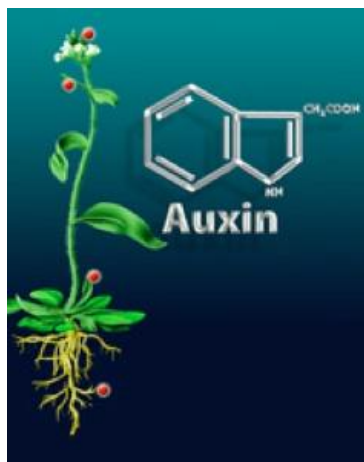
Οι φυτικές ορμόνες είναι χημικές ενώσεις που σε μικρές ποσότητες προάγουν και επηρεάζουν την αύξηση, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση κυττάρων και ιστών. Η διακίνησή τους γίνεται με τέσσερις τρόπους:

- 1) κυτοπλασμική ροή εντός των κυττάρων,
- 2) αργή διάχυση μεταξύ των κυττάρων,
- 3) διακίνηση μέσω ηθμών από τα φύλλα προς τις ρίζες και τα άνθη και τέλος
- 4) διακίνηση νερού και μέσω των ξυλωδών αγγείων από τις ρίζες προς το φύλλωμα.

Οι φυτικές ορμόνες προσδίδουν σχήμα στο φυτό, επηρεάζοντας την έκπτυξη του σπόρου, το χρόνο της άνθησης, το φύλλο του άνθους, τη μακροβιότητά του, την ωρίμανση των φύλλων και των καρπών, τον τροπισμό διαφόρων ιστών, το σχηματισμό των φύλλων και την αύξηση του βλαστού, ακόμη και τον κυτταρικό θάνατο (Bari and Jones, 2009). Οι ορμόνες είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των φυτών και έλλειψή τους καθιστά τα φυτά μια ακαθόριστη μάζα μη διαφοροποιημένων κυττάρων. Τα φυτά χρειάζονται τις ορμόνες σε πολύ συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και σε συγκεκριμένα σημεία του φυτού, αλλά θα πρέπει και να απαλλάσσονται από τις επιδράσεις τους, όταν πια δεν τις χρειάζονται. Γι' αυτό μετά τη σύνθεση τους, οι ορμόνες, μετακινούνται σε εκείνο το μέρος του φυτού όπου προκαλούν άμεσες δράσεις ή αποθηκεύονται στα κύτταρα ώστε να απελευθερωθούν αργότερα. Οι μηχανισμοί ελέγχου της συγκέντρωσης της ορμόνης στους φυτικούς ιστούς είναι αρκετά πολύπλοκοι και περιλαμβάνουν πολλές διεργασίες. Τα φυτά έχουν την ικανότητα επίσης να χρησιμοποιούν διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια για να ρυθμίσουν εσωτερικά τις ποσότητες των ορμονών και να μετριάσουν τις επιδράσεις τους. Η συγκέντρωση των ορμονών που απαιτείται για να ανταποκριθεί το φυτό είναι πολύ χαμηλή και κυμαίνεται συνήθως από 10^{-6} έως 10^{-5} mol/L.

Οι κυριότερες κατηγορίες φυτικών ορμονών είναι οι εξής:
το αμπισικό οξύ, οι αυξίνες, οι κυτοκίνες, το αιθυλένιο και οι γιββερελίνες (Santner et al., 2009).

1.2. Αυξίνες



Το πιο σημαντικό μέλος της οικογένειας των αυξινών είναι το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA). Συμμετέχει στην πλειοψηφία των αυξητικών επιδράσεων στα νεαρά φυτά, καθώς αποτελεί την ισχυρότερη φυσική αυξίνη. Ωστόσο, τα μόρια του IAA είναι χημικά ασταθή σε υδατικά διαλύματα, κι έτσι το IAA δεν έχει εμπορική εφαρμογή ως φυτικός ρυθμιστής αύξησης.

Οι φυσικές αυξίνες περιλαμβάνουν, εκτός από το IAA, το ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA), το 4-χλωρο-ινδολοξικό οξύ και φαινοξυοξικό οξύ (PAA) (Ludwig-Müller, 2000). Αντίθετα, οι συνθετικές αυξίνες περιλαμβάνουν το 1-ναφθαλινοξικό οξύ (α -NAA), το 2-ναφθαλινοξικό οξύ (β -NAA), το 4-χλωροφαινοξυ-οξικό οξύ (4-CPA), 2,4-διχλωροφαινοξυ-οξικό οξύ (2,4-D), το τριχλωροφαινοξυ-οξικό οξύ (2,4,5-T) και άλλα.

Η βιοσύνθεση των αυξινών πραγματοποιείται στους φυτικούς ιστούς και η πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση αυτών στα φυτά είναι το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Η μετακίνηση των αυξινών μέσα στο φυτό γίνεται βασιπέταλα δηλαδή μεταφέρονται από ακραία μεριστώματα προς τις ρίζες.

Οι αυξίνες, ανάλογα με τη λειτουργία τους, επιδρούν στις διάφορες λειτουργίες του φυτού όπως: α) στην κατά μήκος αύξηση, β) στη ριζοβολία, γ) στη δραστηριοποίηση του καμβίου, δ) στην κυριαρχία της κορυφής, ε) στο σχηματισμό του καρπού στ) στην παραγωγή του αιθυλενίου και στους ζ) τροπισμούς.

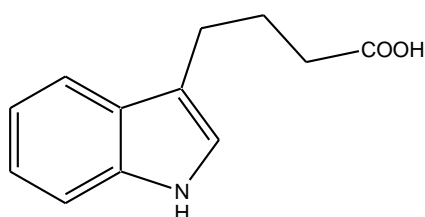
Μία από τις πρώτες χρήσεις των φυτορρυθμιστικών αυτών ουσιών στη γεωργική πράξη ήταν η χρησιμοποίηση κυρίως του ινδολοβουτυρικού οξέος (IBA) για τη βελτίωση της ριζοβολίας μοσχευμάτων σε συνδυασμό με το ναφθυλοξικό οξύ (NAA) και το ναφθυλακεταμίδιο (NAD).

Οι αυξίνες αυτές αποδείχθηκαν πολύ αποτελεσματικές στη ριζοβολία μοσχευμάτων κωνοφόρων και καλλωπιστικών ειδών, στα οποία εμφανίζεται δυσχέρεια στον αγενή πολλαπλασιασμό. Υπάρχουν διάφορες μορφές σκευασμάτων αυτών των συνθετικών αυξινών (Πασπάτης Ε. 1988).

1.3. Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA)

Το ινδολο-3-βουτυρικό οξύ είναι ένα υποκίτρινο κρυσταλλικό στερεό με πολύ μικρή υδατοδιαλυτότητα (0,01 mg / mL) και ανήκει στις ορμόνες που ρυθμίζουν την φυτική αύξηση, που είναι γνωστές ως φυτορυθμιστικές ουσίες αύξησης (plant growth regulators, PGRs).

Η ορμόνη αυτή (Σχήμα 1) χρησιμοποιείται για την προώθηση της ριζοβολίας διαφόρων φυτών κατά τον πολλαπλασιασμό, για μοσχεύματα, συνεισφέρει στην επιτυχία των εμβολιασμών αλλά και ως συμπαράγοντας βλάστησης σε συνδυασμό με άλλες αυξίνες.



Σχήμα 1: Χημική δομή του ινδολο-3-βουτυρικού οξέος.

Το IBA χρησιμοποιείται γι' αυτούς τους σκοπούς είτε με τη μορφή διαλύματος είτε σκόνης. Οι συγκεντρώσεις που εφαρμόζονται για ριζοβολία μοσχευμάτων ποικίλουν από 10 έως 20000 ppm IBA ανάλογα με το είδος, την εποχή και γενικότερα τις συνθήκες ανάπτυξης του φυτού.

Τα διαλύματα του IBA που διατίθενται στο εμπόριο περιέχουν πάνω από 99,5% αλκοόλη και 1,03% IBA. Αντίθετα αυτά που βρίσκονται υπό τη μορφή υδατοδιαλυτής ταμπλέτας περιέχουν 20% IBA και μετατρέπονται σε διάλυμα από τους ίδιους τους καλλιεργητές πριν την εφαρμογή. Η μορφή του υδατοδιαλυτού IBA είναι πιο αποτελεσματική σε σχέση με το IBA σε αλκοόλη. Ένα μειονέκτημα βέβαια που υπεισέρχεται χρησιμοποιώντας τα διαλύματα IBA / αλκοόλης είναι ότι, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε αλκοόλη, αυτό που απομένει μετά την εξάτμισή της είναι υψηλή συγκέντρωση IBA που ως αυξίνη, μπορεί να δράσει ανασταλτικά (International Plant Propagators Society 1992).

Για πολλά χρόνια η IBA αντιμετωπιζόταν ως μία συνθετική αυξίνη, όμως πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αποτελεί ένα από τα φυσικά συστατικά των φυτών (Rashotte et al., 2003). Βρέθηκε, επίσης, ότι συμβαίνει αλληλομετατροπή μεταξύ του IBA και του IAA (ινδολο-3-οξικό οξύ) μέσω β-οξειδωσης, της πρώτης φυσικής

αυξίνης που απομονώθηκε στα φυτά και έχει μελετηθεί διεξοδικά(Liu et al., 2012). Θεωρείται ότι υπάρχει μία βιοχημική σχέση μεταξύ τους(Ludwig-Müller, 2000). Η κρυσταλλική δομή και η φυσιολογική δράση του IAA και πλήθους παραγώγων του έχουν μελετηθεί εκτενώς (Nigovic *et al.*, 2000). Όμως, δεν έχει βρεθεί καμία συσχέτιση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και των δομικών παραμέτρων με τη βιολογική τους δράση.

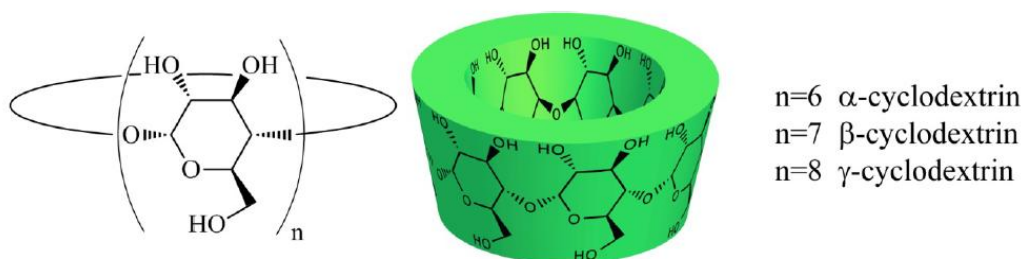
Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε σπέρματα χλοοτάπητα διαφόρων ποικιλιών, βρέθηκε ότι το IBA σε συνδυασμό με το γιββερελλικό οξύ (GA) αυξάνει το μήκος του βλαστού και της ρίζας έπειτα από 21 ημέρες ανάπτυξης στους σε διάφορες θερμοκρασίες από τους 10°C έως τους 30°C. (Longer D. et al., 2001).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

2.1. Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που παράγονται από την ενζυμική υδρόλυση του αμύλου. Οι συχνά χρησιμοποιούμενες φυσικές CDs περιέχουν έξι, επτά και οκτώ μονάδες γλυκοπυρανόζης, συνδεδεμένες με α-(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό, και αναφέρονται ως α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνη αντίστοιχα (Valle, 2004) (Σχήμα 2). Κυκλοδεξτρίνες με λιγότερες από έξι γλυκοπυρανόζες δεν υπάρχουν, πιθανόν για στερικούς λόγους. CDs όμως με περισσότερες μονάδες γλυκοπυρανόζης έχουν ήδη αναφερθεί ως δ-, ε-, ζ-, η- και θ- CDs με 9, 10, 11, 12 και 13 γλυκοπυρανόζες αντίστοιχα (Marques, 2010). Ωστόσο, οι αποδόσεις τους είναι μικρές και οι ιδιότητες “συμπλοκοποίησης” όχι τόσο καλές όσο στις φυσικές CDs.

Η σημαντικότερη ιδιότητα των CDs είναι η ικανότητα να αναπτύσσουν εξειδικευμένες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις –μοριακός εγκλεισμός- με μια ποικιλία μορίων, γι’ αυτό άλλωστε διαθέτουν ένα αρκετά ευρύ πεδίο εφαρμογών. Αυτά τα παράγωγα αμύλου είναι μη-τοξικά συστατικά, δεν απορροφούνται από το γαστρεντερικό σύστημα και μεταβολίζονται πλήρως από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Valle, 2004).

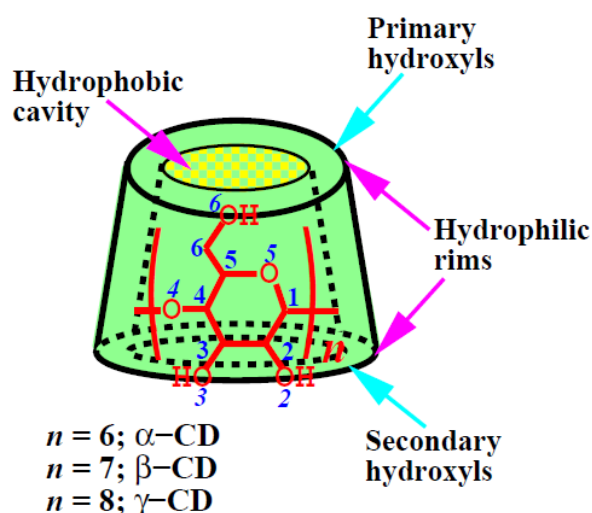


Σχήμα 2: Χημικές δομές α-, β-, γ- κυκλοδεξτρίνης.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο εγκλεισμός και σε τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες (αλκυλιωμένες και πολυμερή CDs), στην προσπάθεια να σχεδιαστούν καλύτερα μόρια-μεταφορείς. Έτσι, οι μεθυλιωμένες, αιθυλιωμένες, υδροξυπροπυλιωμένες, υδροξυαιθυλιωμένες, ακετυλιωμένες, σουλφοαιθυλιωμένες, σουλφοπροπυλιωμένες και σουλφοβουτυλιωμένες CDs και πολυμερή της β-CD χρησιμοποιούνται κατά κόρον στον σχεδιασμό διαφόρων συστημάτων μεταφοράς (Valle, 2004).

Οι CDs έχουν σχήμα κόλουρου κώνου, όπου οι υδροξυλομάδες της δευτεροταγούς πλευράς των ατόμων C₂ και C₃ εντοπίζονται στην φαρδιά πλευρά του

κώνου, ενώ εκείνες των C₆ ατόμων είναι τοποθετημένες στην αντίθετη πλευρά του κώνου (στενή) με κατεύθυνση έξω από την σχηματιζόμενη κοιλότητα (Σχήμα 3), με εξαίρεση όταν συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους προκειμένου να περικλείουν το ξενιζόμενο μόριο σχηματίζοντας προϊόντα εγκλεισμού. Το εξωτερικό περιβάλλον του κώνου είναι υδρόφιλο λόγω των υδροξυλομάδων. Το εσωτερικό του προσφέρει ένα περιβάλλον χαμηλής πολικότητας και έτσι μπορεί να θεωρηθεί ως «υδρόφοβη κοιλότητα», που ευθυγραμμίζεται από τους δυο δακτυλίους των CH ομάδων (H₃ και H₅) και με αυτόν των οξυγόνων-γεφυρών των γλυκοζιτικών μονάδων, «αιθερικά οξυγόνα» (O₄ και O₅). Τα H₆ σχηματίζουν το στενότερο άκρο του κώλου κώνου. Το αποτέλεσμα αυτής της διττής ιδιότητας είναι πως οι CDs μπορούν να σχηματίσουν διαλυτά, αναστρέψιμα προϊόντα εγκλεισμού με ενώσεις χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, συμβάλλοντας στην αύξησή της.



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση των φυσικών κυκλοδεξτρινών.

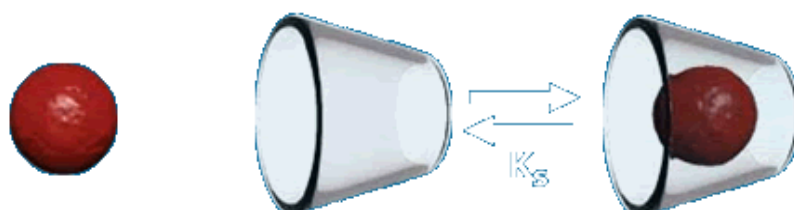
Σε σχέση με τις υπόλοιπες φυσικές κυκλοδεξτρίνες, η β -CD είναι εκείνη που παρουσιάζει τη χαμηλότερη υδατοδιαλυτότητα. Προκειμένου να βελτιωθεί η ιδιότητα αυτή, η δομή της β -CD έχει τροποποιηθεί μέσω αλκυλίωσης και υδροξυαλκυλίωσης.

Οι υδροξυλομάδες των C₂, C₃ και C₆ είναι τα πιθανά σημεία τροποποίησης χωρίς να εξουδετερώνεται το «κεντρικό κενό». Οι υδροξυλομάδες των C₆ είναι οι πιο δραστικές ενώ εκείνες των C₂ και C₃ λιγότερο. Κατά συνέπεια, με διάφορους μοριακούς χειρισμούς, οι CDs μπορεί να μεταμορφωθούν σε παράγωγα με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Είναι εφικτή ακόμη η συσσωμάτωση σχηματίζοντας πολυμερή κυκλοδεξτρινών. Το σημείο τήξης των CDs δεν έχει καθοριστεί πλήρως, αλλά τα μόρια αρχίζουν να αποσυντίθενται σε θερμοκρασίες άνω των 270°C (Zhang et al., 1994).

2.2. Σχηματισμός προϊόντων εγκλεισμού ξενιζομένων μορίων σε κυκλοδεξτρίνες

Το προϊόν εγκλεισμού είναι μια ξεχωριστή μορφή χημικού συμπλόκου στην οποία ένα μόριο εγκλείεται μέσα σε ένα άλλο μόριο ή συσσωμάτωμα μορίων. Το βασικό κριτήριο είναι το εγκλεισμένο-ξενιζόμενο μόριο να είναι κατάλληλου μεγέθους και σχήματος ώστε να προσαρμοσθεί μες στην κοιλότητα της CD. Η στεreoχημεία, και πιθανόν, η πολικότητα τόσο του ξενιστή όσο και του ξενιζομένου μορίου καθορίζουν την επίτευξη ή μη του εγκλεισμού. Η μεγαλύτερη συνεισφορά στην συμπλοκοποίηση CD και ξενιζομένου μορίου είναι η γεωμετρική διεύθετηση κι επομένως μπορούμε να πούμε πως η συμπλοκοποίηση είναι ένα στερεοεξειδικευμένο φαινόμενο (Dodziuk H., 2006). Οι χωρικές απαιτήσεις για τον σχηματισμό ενός προϊόντος εγκλεισμού σε CDs θυμίζουν τον μηχανισμό «κλειδιού-κλειδαριάς» της ενζυμικής κατάλυσης η οποία λαμβάνει χώρα αν το υπόστρωμα-ξενιζόμενο μόριο διευθετηθεί κατάλληλα σε σχέση με το ενεργό κέντρο-ξενιστή.

Ο σχηματισμός προϊόντων εγκλεισμού περιλαμβάνει πολλά βήματα. Γενικά, όσο μικρότερο είναι το ξενιζόμενο μόριο, τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα συμπλοκοποίησής του, εφόσον υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ξενιζομένου μορίου και την κοιλότητα του ξενιστή. Αν και ο βαθμός δραστηκότητας για τα μεγάλα μόρια εξαρτάται από την παρουσία μιας κατάλληλης ομάδας ή δακτυλίου ικανού να εισέλθει στον θύλακα, μόνο τα λιπόφιλα τμήματα αυτών των μορίων δύνανται να εγκλωβιστούν στην λιπόφιλη κοιλότητα της CD και όχι ολόκληρα τα μόρια. Ενώσεις με την χαμηλότερη υδατικοδιαλυτότητα γενικά παρουσιάζουν την μεγαλύτερη % αύξηση σε διαλυτότητα σε σχέση με την συγκέντρωση των CDs. Ελάχιστη ή καθόλου επίδραση παρατηρήθηκε όταν εξετάστηκαν υδρόφιλα και υδατοδιαλυτά μόρια (Marques, 2010).



Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση του εγκλεισμού.

Όταν ξενιζόμενα μόρια έχουν παρόμοιες διαστάσεις, τα πιο υδρόφοβα μόρια έχουν την μεγαλύτερη συγγένεια με την κοιλότητα των CDs σε υδατικό διάλυμα, επειδή η κοιλότητα παρέχει ένα υδρόφοβο μικρο-περιβάλλον. Η μοριακή ενθυλάκωση-εγκλεισμός από τις CDs συχνά βελτιώνει τις διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες των εγκλεισμένων μορίων όπως την υδατοδιαλυτότητα και τη σταθερότητα (Carrier et al., 2007).

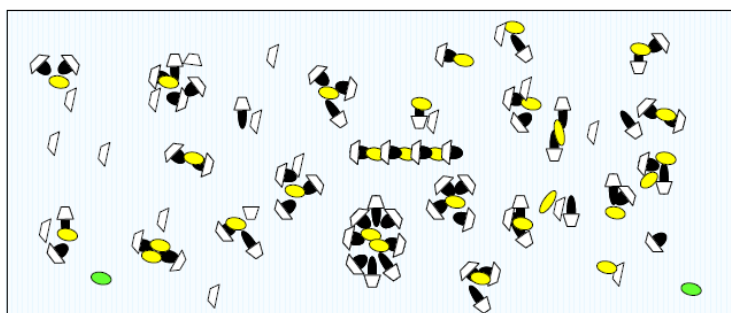
Αρκετοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη δημιουργία ενός προϊόντος εγκλεισμού όπως: ο τύπος της κυκλοδεξτρίνης, το μέγεθος της κοιλότητας, το pH, η θερμοκρασία και η μέθοδος προετοιμασίας.

2.3. Δυνάμεις εγκλεισμού

Το πεδίο των φαινομένων εγκλεισμού καθώς επίσης και ο τρόπος σύνδεσης ξενιστή - ξενιζόμενου μορίου αναπτύχθηκε δραματικά τα τελευταία τριάντα χρόνια. Σε ότι αφορά τα διαλύματα η συγγένεια του ξενιστή με κάποιο ξενιζόμενο μόριο εξαρτάται από διάφορες ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που εξαρτώνται από το είδος του μορίου ξενιστή (χημική δομή, μέγεθος, φορτίο) και τον διαλύτη κάτω από δεδομένες συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης και συγκέντρωσης.

Συνοπτικά λοιπόν, οι δυνάμεις στις οποίες στηρίζεται ο εγκλεισμός του ξενιζόμενου μορίου στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης περιλαμβάνουν:

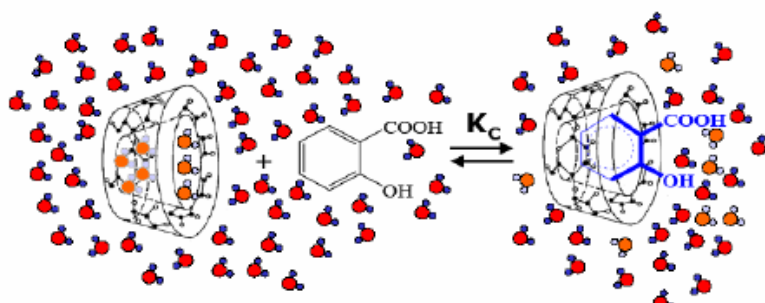
1. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις
2. Δυνάμεις van der Waals
3. Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις
4. Δεσμοί υδρογόνου
5. Προσαρμογή της διαμόρφωσης του μορίου ξενιστή έτσι ώστε να επιτευχθεί ο εγκλεισμός και να προκύψει προϊόν χαμηλότερης ενέργειας – απελευθέρωση των μορίων νερού υψηλής ενθαλπίας, που περιέχονται στην κοιλότητα και υποκατάσταση αυτών με χαμηλότερης ενέργειας μόρια της ξενιζόμενης ουσίας
6. Αλληλεπιδράσεις λόγω μεταφοράς φορτίου(Liu and Guo, 2002).



- Μόρια δραστικής ουσίας σε ελεύθερη μορφή
- Δραστική ουσία συμλοκοποιημένη με μη συμβατικό τρόπο
- Δραστική ουσία μέσα σε συμβατικό σύμπλοκο εγκλεισμού
- Αδειο μόριο CD
- Συμβατικό σύμπλοκο (δραστική ουσία/CD)

Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση ενός οποιουδήποτε διαλύματος με κυκλοδεξτρίνες και μια δραστική ουσία.

Ο συνηθέστερος διαλύτης που χρησιμοποιείται στην παρασκευή τέτοιων προϊόντων εγκλεισμού είναι το νερό (Σχήμα 6). Έτσι λοιπόν, η ημιπολική κοιλότητα της CD γεμίζει με μόρια νερού, τα οποία είναι σχετικά υψηλής ενέργειας λόγω του περιορισμού τους από τις αλληλεπιδράσεις με τα τοιχώματα της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης. Έχει προταθεί πως, σε υδατικά διαλύματα, η μεγαλύτερη συνεισφορά στην συμπλοκοποίηση με τα ξενιζόμενα μόρια είναι η εκδίωξη αυτών των υψηλής ενέργειας μορίων νερού από την κοιλότητα και κατ' επέκταση η αντικατάστασή τους από ξενιζόμενα μόρια.



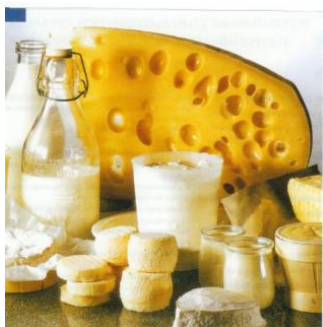
Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση εγκλεισμού

2.4. Εφαρμογές του μοριακού εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες

Οι CDs βρίσκουν εφαρμογή στη βιοτεχνολογία, τη χημεία, τη γεωργία, τη φαρμακευτική, τη βιομηχανία τροφίμων, την κοσμετολογία και διάφορες άλλες βιομηχανικές χρήσεις.

Στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών

Οι κυκλοδεξτρίνες ως πολυλειτουργικά συστατικά τροφίμων μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς για μοριακό εγκλεισμό εξασφαλίζοντας ή και βελτιώνοντας την σταθερότητα κάποιων συστατικών (π.χ. πτητικών, ευοξειδωτών συστατικών), οδηγώντας έτσι σε προϊόντα με μεγάλη διάρκεια ζωής. Η αυξημένη ανάγκη για αποθήκευση κάποιων ευαίσθητων συστατικών των τροφίμων σε CDs υπερνικά τις παραδοσιακές μεθόδους αποθήκευσης. Οι βασικοί στόχοι του εγκλεισμού είναι: να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητα κάποιων ουσιών που είναι αδιάλυτες ή εμφανίζουν περιορισμένη διαλυτότητα, να ελαττωθεί η πτητικότητα, να εξασφαλισθεί η περιβαλλοντική προστασία, καθώς να ελεγχθεί και η απελευθέρωση των συστατικών (slow release) (Lu et al., 2009). Έτσι, οι CDs ως παράγοντες συμπλοκοποίησης σχηματίζουν προϊόντα εγκλεισμού με αιθέρια έλαια και πτητικές ενώσεις σε τρόφιμα και ποτά, προκειμένου να βελτιώσουν τα χαρακτηριστικά τους, προσφέροντάς τους τα απαιτούμενα πλεονεκτήματα. Οι CDs βρίσκουν εφαρμογές ως γλυκαντικοί παράγοντες αφού με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ο χαμηλός γλυκαιμικός δείκτης στα τρόφιμα, γεγονός ωφέλιμο σε διαβητικούς (Σχήμα 7).



Ευρεία είναι και η χρήση των κυκλοδεξτρινών στην προσπάθεια της απόκρυψης δυσάρεστων οσμών και γεύσεων στα τρόφιμα. Οι CDs μπορεί να χρησιμεύσουν στη μετατροπή ή/και εξάλειψη πικρών και άσχημων γεύσεων και οσμών σε τρόφιμα και ποτά (Szejtli, J. 1998). Σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες και υψηλές συγκεντρώσεις

CDs, δυσάρεστες οσμές και γεύσεις μπορεί να καλυφθούν με την συμπλοκοποίηση. Πικρά και στυπτικά συστατικά τροφίμων και ποτών (π.χ. ναρινγκίνη σε χυμό πορτοκαλιού, ή χλωρογενικό οξύ και πολυφαινόλες σε καφέ) μπορούν επίσης να σχηματίσουν προϊόντα εγκλεισμού με αποτέλεσμα, η ίσως ανεπιθύμητη γεύση τους, να μειωθεί ή και να εξαλειφθεί.

Τα τελευταία χρόνια, μια ιδέα η οποία εξελίσσεται, είναι η χρήση των CDs προκειμένου να παρασκευασθούν «έξυπνες συσκευασίες τροφίμων». Οι Szente και Szejtli έχουν βρει ειδικές εφαρμογές των CDs σε συσκευασίες τροφίμων που περιέχουν CDs. Οι CDs ή σύμπλοκα αυτών με αντιμικροβιακούς παράγοντες που ενσωματώνονται σε πλαστικά φιλμ συσκευασιών τροφίμων μειώνουν αποτελεσματικά την απώλεια των αρωματικών συστατικών και αυξάνουν τα όρια συντήρησης κατά την αποθήκευση. Πολλά σύμπλοκα CDs μπορεί να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα ως αντισηπτικά ή ακόμη και συντηρητικά. Εδώδιμα φιλμ με CDs και σάκχαρα έχουν επίσης κατασκευαστεί.

Στη βιομηχανία φαρμάκων

Στη βιομηχανία φαρμάκων οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται για:

2. μείωση πτητικότητας
3. μετατροπή των υγρών ενώσεων σε κρυσταλλική μορφή
4. κάλυψη δυσάρεστων οσμών ή γεύσεων κάποιων φαρμάκων
5. αποφυγή ανεπιθύμητων ασυμβατοτήτων
6. αύξηση βιοδιαθεσιμότητας
7. αύξηση της σταθερότητας ενός φαρμάκου παρουσία φωτός, αυξημένης



θερμοκρασίας και παραγόντων οξείδωσης (Bhaskara-Amrit, U.R. *et al.* 2011)

Με τη χρήση των CDs ο χρόνος ζωής των φαρμάκων καθώς και οργανοληπτικές ιδιότητες, όπως η ευχάριστη γεύση, μπορούν να βελτιωθούν. Η χρήση των κυκλοδεξτρινών στη φαρμακοβιομηχανία μπορεί να παρακινήσει επανεξέταση ενός πλήθους δραστικών ουσιών, που λόγω προβλημάτων σταθερότητας, ασυμβατότητας ή απορρόφησης δεν χρησιμοποιούνται σήμερα. Η αύξηση της διαλυτότητας και της βιοδιαθεσιμότητας κάποιων φαρμάκων, του ρυθμού

απελευθέρωσής τους αλλά και η στοχευμένη θεραπεία μπορεί να επιτευχθούν μέσω των κυκλοδεξτρινών (Wen et al., 2004).

Ο εγκλεισμός των φαρμάκων σε CDs βρέθηκε στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος αρχικά κυρίως χάρη στην ικανότητα αργής απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας. Στην προσπάθεια σχεδιασμού αποτελεσματικών μεταφορέων φαρμάκων, οι αλκυλιωμένες CDs έχουν εγκριθεί για φαρμακευτικές χρήσεις. Μεθυλιωμένες, υδροξυπροπυλιωμένες, ακετυλιωμένες και πολυμερή των β -CD χρησιμοποιούνται στη σύνθεση υδατοδιαλυτών ή αδιάλυτων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων όπως απαιτείται. Η δραστηριότητα και αποτελεσματικότητα λοιπόν των φαρμάκων αυξάνεται με τον εγκλεισμό και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η τοξικότητά τους, ελαττώνοντας έτσι την απαιτούμενη ποσότητα για αποτελεσματική δράση. Παράλληλα ο εγκλεισμός των φαρμάκων σε CDs, αποτρέπει την άμεση επαφή του φαρμάκου με βιολογικές μεμβράνες και μειώνει τις παράπλευρες επιδράσεις (μειώνοντας την είσοδο του φαρμάκου στα κύτταρα των ιστών που δεν αποτελούν στόχους) και τους τοπικούς ερεθισμούς χωρίς να χάνει την δραστηριότητά του. Η σχετικά μικρή ή και αμελητέα τοξικότητα των CDs (ανάλογα με το είδος της CD κάθε φορά), (Bar and Ulitzur, 1994) είναι ένας σημαντικός παράγοντας που τις κάνει από τους πιο δημοφιλείς φαρμακο-μεταφορείς.

Η δράση αυτή των CD έχει βρει επιτυχή εφαρμογή στα υδατικά σκευάσματα για το δέρμα (Loftsson and Masson, 2001), σε διαλύματα για στοματικές πλύσεις, σε ρινικά εκνεφώματα και οφθαλμικές σταγόνες (Loftsson and Stefánsson, 2002).

Στη βιομηχανία καλλυντικών

Αρκετές βιομηχανίες καλλυντικών και κυρίως καλλυντικών φυσικής προελεύσεως χρησιμοποιούν τις CDs για μοριακό εγκλεισμό κάποιων δραστικών συστατικών στα προϊόντα τους. Με την πάροδο των ετών η χρήση των CDs στις καλλυντικές βιομηχανίες αυξάνεται ραγδαία. Χρησιμοποιούν τις CDs ως σταθεροποιητές, γαλακτωματοποιητές σε κρέμες ευρείας κατανάλωσης καθώς και σε αποσμητικά και σπρέϊ.

Οι κυκλοδεξτρίνες λοιπόν ως ξενιστές:

- προστατεύουν το δραστικό συστατικό από την οξείδωση ή την αποικοδόμηση
- λόγω του ότι η αντίδραση εγκλεισμού είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία και τα σχηματιζόμενα «σύμπλοκα» έχουν κρυσταλλική δομή, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητάς τους σε περιβάλλον πίεσης και στρες.
- Ο εγκλεισμός αναστέλλει την φυσική αποικοδόμηση των εγκλεισμένων συστατικών ενισχύοντας τη δράση τους με την πάροδο του χρόνου.
- Με τον προσωρινό εγκλεισμό επιτυγχάνεται η αργή απελευθέρωση γεγονός που αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών αυτών.
- Αυξάνεται η διαλυτότητα των δυσδιάλυτων συστατικών.



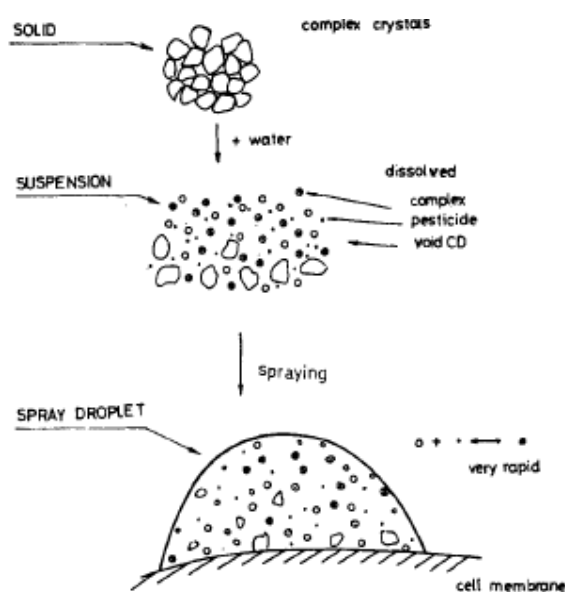
Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο εγκλεισμός της δ-τοκοφερόλης σε a-CD, Ακόμη χρησιμοποιούνται και σε στερεά αρώματα (πχ αρώματα χώρου), σε απορρυπαντικά, σε σαμπουάν, οδοντόκρεμες κτλ.

Οι CDs έχουν φυσική προέλευση και είναι αβλαβείς ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό [U. Citernes and M. Sciacchitano].

Στη γεωργία - προστασία περιβάλλοντος

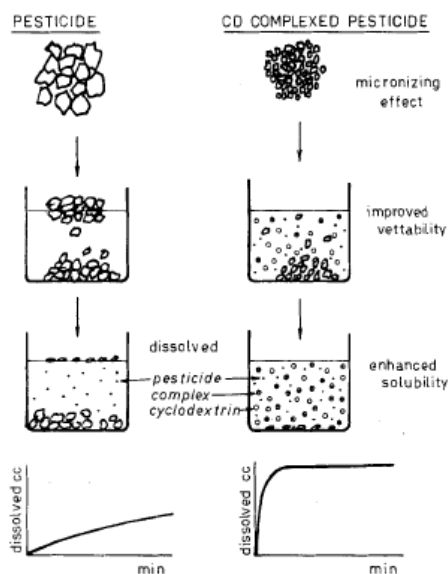
Οι CDs σχηματίζουν σύμπλοκα με μια μεγάλη ποικιλία αγροχημικών όπως φυτορρυθμιστικές ουσίες, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, εντομοαπωθητικά, μυκητοκτόνα και φερομόνες. Ο σκοπός του εγκλεισμού τους είναι ότι μπορούν να καταναλωθούν μικρότερες ποσότητες των δραστικών ουσιών αφού ο εγκλεισμός προσφέρει βραδεία αποδέσμευση άρα και μεγαλύτερη διάρκεια από τη στιγμή της εφαρμογής. Παράλληλα, ουσίες ελάχιστα διαλυτές στο νερό (η πλειονότητα των αγροχημικών), μπορούν να γίνουν πιο ευδιάλυτες, να υπάρξει ομοιογενής κατανομή σε μία μεγάλη επιφάνεια και να μεταφερθεί το μεγαλύτερο τμήμα τους στο εσωτερικό του κυττάρου.

Στο Σχήμα 7 φαίνεται ο τρόπος δράσης των συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης στους φυτικούς ιστούς. Τα «σύμπλοκα», υπό μορφή εναιωρήματος, ύστερα από ψεκασμό, έρχονται σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη. Στο υδατικό εναιώρημα συνυπάρχουν: σύμπλοκα της δραστικής ουσίας με κυκλοδεξτρίνη, διαλυμένα μόρια αγροχημικού και μόρια κυκλοδεξτρίνης. Όταν, διαλυμένα μόρια περάσουν από τη μεμβράνη, μειώνεται η συγκέντρωση των διαλυμένων μορίων στο εξωτερικό, και επιπλέον μόρια δραστικής ουσίας απελευθερώνονται από τα σύμπλοκα και εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Έτσι, τα «συμπλοκοποιημένα» μόρια, μπορούν να θεωρηθούν «αποθήκες» του φυτοφαρμάκου.



Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης της βιοδιαθεσιμότητας μίας σταγόνας (spray-drop), δυσδιάλυτου στο νερό φυτοφαρμάκου, μετά από συμπλοκοποίησή του με CD (Szejtli, 1985) .

Το καθοριστικό βήμα της απορρόφησης, είναι η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο υδατικό διάλυμα. Στο Σχήμα 7, φαίνεται, ότι η συμπλοκοποίηση πλεονεκτεί έναντι της χρήσης διαλυμάτων φυτοφαρμάκων, που σε στερεή κατάσταση έχουν υποστεί μηχανικούς χειρισμούς, (π.χ. λειοτρίβηση, κ.λ.π.) λόγω αύξησης της διαβρεκτικότητας, της διαλυτότητας και, άρα, της βιοδιαθεσιμότητας των ουσιών.



Σχήμα 8. Απεικόνιση της διάλυσης φυτοφαρμάκου και του συμπλόκου του με κυκλοδεξτρίνη (Szejtli J., 1985)

Κατά την διάλυση των συμπλόκων των κυκλοδεξτρινών στο νερό, η σύσταση του σχηματιζόμενου συστήματος εξαρτάται:

- A) Από τη διαλυτότητα της ελεύθερης ουσίας,
- B) Από τη διαλυτότητα των συμπλόκων της κυκλοδεξτρίνης
- Γ) Από τη σταθερά της συμπλοκοποίησης
- Δ) Από τη μοριακή αναλογία των συστατικών (φυτοφάρμακο/CD)
- E) Από την αναλογία στερεού/ νερού

Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, το σύμπλοκο διαλύεται εντελώς. Στο διάλυμα είναι παρόντα, μόνο, τα ευδιάλυτα σύμπλοκα και τα συστατικά τους (ελεύθερη κυκλοδεξτρίνη και φυτοφάρμακο). Αδιάλυτη στερεή ουσία παραμένει στο διάλυμα όταν υφίσταται είτε ως αδιάλυτο σύμπλοκο, είτε ως μίγμα φυτοφαρμάκου και κυκλοδεξτρίνης

Οι CDs μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του περιβάλλοντος-απορύπανση διότι με τη συμπλοκοποίηση μπορούν να διαλυτοποιήσουν, να συμπυκνώσουν και να απομακρύνουν από το έδαφος, το νερό και την ατμόσφαιρα οργανικούς ρυπαντές και βαρέα μέταλλα. Επίσης ελαττώνουν την τοξικότητα των υδρογονανθράκων επιταχύνοντας την βιοαποδόμησή τους στο έδαφος, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν από τα φυτά αλλά και από τον μικροβιακό πληθυσμό του εδάφους ως πηγή άνθρακα-ενέργειας

Στην αναλυτική χημεία

Σημαντική ικανότητα των CD στη χημική ανάλυση είναι η χρήση τους για το διαχωρισμό εναντιομερών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται στήλες με πληρωτικό υλικό φυσικές ή κυρίως τροποποιημένες CDs (Li and Purdy, 1992). Στα μονο- ή δις- υποκατεστημένα παράγωγα των CDs η ικανότητα της μοριακής αναγνώρισης αυξάνεται λόγω της μεγαλύτερης ασυμμετρίας. Έτσι η DIMEB δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα στο διαχωρισμό μορίων και ενθαρρύνει τη χρήση της στο πεδίο αυτό (Tsoucaris, 1996). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η παγίδευση μόνο του S εναντιομερούς της σπιροακετάλης στη DIMEB (S-spiroacetal).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο - Φασματοσκοπικές μέθοδοι

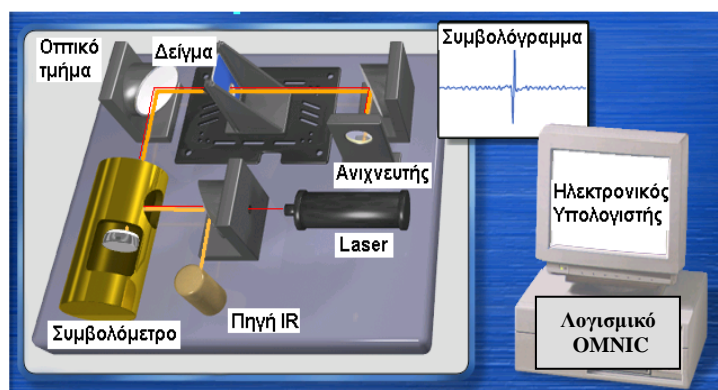
3.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Infra Red Spectroscopy, **IR**) είναι μία σύντομη και απλή τεχνική που χρησιμοποιείται στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε είδους ουσίας. Οι εφαρμογές της ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, με βάση τις τρεις περιοχές του υπέρυθρου φάσματος. Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη περιοχή είναι η μέση υπέρυθρη περιοχή (Mid IR), η οποία εκτείνεται περίπου από τα **4000** έως **600** cm^{-1} .

3.1.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red Spectroscopy, **FT-IR**), είναι μία από τις πιο σημαντικές σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές. Τα φάσματα λαμβάνονται σχετικά εύκολα και στη συνέχεια συγκρίνονται, είτε ολόκληρα είτε ορισμένες ταινίες απορρόφησής τους, με άλλα ήδη γνωστά. Με αυτό τον τρόπο, είναι δυνατή, σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, η ταυτοποίηση άγνωστων οργανικών ουσιών και η πιστοποίηση της καθαρότητας τους. Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας, διακρίνουμε δύο κυρίως περιοχές, 1) την περιοχή των **χαρακτηριστικών ομάδων** που εκτείνεται από τα 4000 έως τα 1400 cm^{-1} (οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων) και 2) η περιοχή των **δακτυλικών αποτυπωμάτων** που εκτείνεται από τα 1400 έως τα 600 cm^{-1} (οι απορροφήσεις οφείλονται στις δονήσεις ολόκληρου του μορίου).

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο FT-IR, αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα: **α)** Την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, **β)** την πηγή λέιζερ, **γ)** το συμβολόμετρο Michelson και **δ)** τον ανιχνευτή



Σχήμα 9 : Οργανολογία ενός φασματοφωτόμετρου FT-IR.

Το συμβολόγραμμα που λαμβάνεται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (στην παρούσα μελέτη με το OMNIC 7.3 της εταιρίας Nicolet, 750 Magna series), υφίσταται μετασχηματισμό κατά Fourier και τελικά εμφανίζεται σαν τυπικό φάσμα FT-IR.

Η καταγραφή φασμάτων με μετασχηματισμό κατά Fourier παρουσιάζει, εκτός από την υψηλή ταχύτητα καταγραφής, τα πλεονεκτήματα της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και του χαμηλού «θορύβου». Ως «θόρυβος» ορίζονται τα σήματα που δεν αντιστοιχούν σε πραγματικές απορροφήσεις του δείγματος και ο οποίος καθορίζει την ποιότητα και κατ' επέκταση την αξιολόγηση ενός φάσματος. Για την αξιολόγηση των σημάτων, χρησιμοποιείται ο όρος «λόγος σήματος προς θόρυβο, Signal to Noise Ratio, **RSN**».

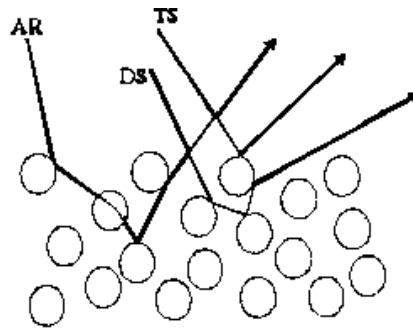
3.1.2 Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης

Η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης με μετασχηματισμό κατά Fourier (Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transform Spectroscopy, **DRIFTS**), είναι μία από τις τεχνικές λήψης φασμάτων FT-IR σε στερεά δείγματα, συνήθως υπό τη μορφή σκόνης και χωρίς την προσθήκη άλλου υλικού (Fuller and Griffiths, 1978). Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα για την υποδοχή του δείγματος (Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος και καψίδια για τη λήψη φασμάτων με τεχνική DRIFTS.

Η υπέρυθη ακτινοβολία υπόκειται σε τριών ειδών ανακλάσεις (σχήμα 11), την **απορροφητική**, τη **διαχυτική** και την **αληθινή** ανάκλαση. Από τα τρία αυτά είδη ανάκλασης, μόνο η απορροφητική περιέχει πληροφορίες για το δείγμα.



Σχήμα 11 : Τα τρία είδη ανάκλασης υπέρυθρης ακτινοβολίας σε στερεό δείγμα υπό τη μορφή σκόνης (**AR** : Απορροφητικά ανακλώμενη, **DS** : Διαχυτικά ανακλώμενη, **TS** : Αληθινά ανακλώμενη).

Το μέρος της ακτινοβολίας που θα απορροφηθεί και στη συνέχεια θα ανακλαστεί, δηλαδή η απορροφητική ανάκλαση, εξαρτάται από : **α)** το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος, **β)** τη μετωπική επιφάνεια και την πυκνότητα πακεταρίσματος του δείγματος στον υποδοχέα, **γ)** το δείκτη διάθλασης του δείγματος και **δ)** από τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας πάνω στο δείγμα.

Η τεχνική DRIFTS χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια γιατί είναι απλή, γρήγορη και δεν απαιτεί προκατεργασία του δείγματος. Όταν εξετάζονται μίγματα, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην **ομογενοποίηση** τους. Η λήψη των φασμάτων γίνεται είτε με το δείγμα ως έχει, είτε με ανάμειξη σε αναλογία 1:100 (Pappas et al., 1998), καθώς αυτές οι δύο ενώσεις απορροφούν στα 320 και 400 cm^{-1} αντίστοιχα, εκτός δηλαδή της μέσης υπέρυθρης περιοχής.

3.1.3 Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR

Οι συνηθέστερες επεξεργασίες που γίνονται στα φάσματα FT-IR είναι η εξομάλυνση του σήματος, η διόρθωση της βασικής γραμμής και η αποσυνέλιξη. Στοχεύουν στη βελτίωση του φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς.

Αυτόματη εξομάλυνση (Automatic Smooth) : Με την εξομάλυνση δεν εξαλείφεται ο θόρυβος, αλλά μειώνεται σε μεγάλο βαθμό με τη βοήθεια μιας μαθηματικής επεξεργασίας, χωρίς να αλλοιώνεται η εικόνα του φάσματος, με αποτέλεσμα να βελτιώνεται ο λόγος RSN. Με τη χρήση ενός αλγόριθμου, ο οποίος χρησιμοποιεί ένα πολωνυμικό μοντέλο, τις πληροφορίες για το RSN κάποιων επιλεγμένων σημείων και με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων,

προσαρμόζει την καμπύλη του φάσματος. Η λειτουργία «αυτόματη εξομάλυνση» του λογισμικού OMNIC 7.3 εταιρίας Nicolet, εκτελεί αυτόματα την παραπάνω διαδικασία.

Αυτόματη διόρθωση της βασικής γραμμής (Automatic baseline correct) : Η βασική γραμμή των φασμάτων FT-IR συνήθως αποτελείται και από σημεία των οποίων η ένταση δεν είναι μηδέν, γι' αυτό είναι απαραίτητο να γίνει διόρθωση της. Η διόρθωση της βασικής γραμμής δεν γίνεται μόνο για λόγους εμφάνισης των φασμάτων, αλλά είναι αναγκαία όταν πρόκειται να συγκριθούν δύο φάσματα ή να χρησιμοποιηθούν για ποσοτική ανάλυση. Η διόρθωση της βασικής γραμμής γίνεται με αυτόματη διαδικασία, από το λογισμικό OMNIC 7.3.

Αποσυνέλιξη (Deconvolution) : Όταν καταγράφονται φάσματα μειγμάτων ή φυσικών προϊόντων, τις περισσότερες φορές υπάρχει αλληλοεπικάλυψη κορυφών με αποτέλεσμα να εμφανίζονται σαν μία κορυφή. Για να αντιμετωπισθεί το πρόβλημα αυτό, οι κορυφές αποσυνελίσσονται χρησιμοποιώντας μαθηματικές τεχνικές. Ανεξάρτητα από την τεχνική λήψης φάσματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά, υπάρχει ένα βασικό ερώτημα. Πόσες είναι οι αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές που βρίσκονται να είναι συνελιγμένες σε μία; Το ερώτημα δεν είναι εύκολο να απαντηθεί κάθε φορά. Μια καλή τεχνική, είναι αυτή της **δευτέρας παραγώγου**. Υπολογίζοντας τη δεύτερη παράγωγο της συνάρτησης της καμπύλης απορρόφησης (γίνεται αυτόματα μέσω του λογισμικού OMNIC 7.3), προκύπτει καμπύλη της οποίας τα ελάχιστα είναι πιθανόν να αντιστοιχούν στα μέγιστα των αλληλοεπικαλυπτόμενων κορυφών. Έπειτα, πραγματοποιείται αποσυνέλιξη της αρχικής κορυφής στις πιθανές κορυφές που την αποτελούν, είτε με τη διαδικασία της αποσυνέλιξης κατά Fourier, είτε με αυτή της εξομοίωσης της καμπύλης.

Η εξομοίωση της καμπύλης, είναι ιδιαίτερα σύνθετη και για να γίνει απαιτείται η χρήση αλγόριθμων αναπαραγωγής μοντέλων προσαρμογής ιδεατών κορυφών, σε πολύπλοκα συστήματα αλληλοεπικαλυπτόμενων κορυφών, όπως στα φάσματα. Η προσαρμογή των καμπυλών γίνεται όχι μόνο με τη συνάρτηση Lorentzian, αλλά και με άλλες συναρτήσεις όπως Gaussian, Log normal, Gaussian / Lorentzian και Voight (Σάλτας Δ. μεταπτυχιακή διατριβή, 2012).

3.2 Κρυσταλλογραφία ακτίνων-X

Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες-X αποτελεί την απόλυτη μέθοδο προσδιορισμού της μοριακής στερεοδομής. Τα αποτελέσματά της οδηγούν στον καθορισμό των σχετικών ατομικών θέσεων, των γεωμετρικών μοριακών χαρακτηριστικών καθώς και στην εξαγωγή πληροφοριών για τη διευθέτηση των μορίων στον κρύσταλλο.

Η κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες-X είναι σήμερα μία από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τη διερεύνηση της δομής μικρών και μεγάλων μορίων. Με τη μέθοδο αυτή, ακτίνες X προσπίπτουν στον υπό εξέταση κρύσταλλο και μετράται η σκεδαζόμενη από τον κρύσταλλο ένταση ακτινοβολίας. Για την κρυσταλλογραφική ανάλυση απαιτούνται: η πηγή των ακτίνων X, ο κρύσταλλος και ένας ανιχνευτής (Stryer L., 1997).

Η δέσμη των ακτίνων X (μήκος κύματος $1,54\text{\AA}$) παράγεται από ηλεκτρόνια που επιταχύνονται προς ένα στόχο χαλκού. Μία δέσμη ακτίνων X προσκρούει στον κρύσταλλο, μέρος της οποίας διαπερνά τον κρύσταλλο και η υπόλοιπη περιθλάται προς διάφορες κατευθύνσεις. Η δέσμη που σκεδάζεται ή περιθλάται μπορεί να ανιχνευθεί σε φιλμ ακτίνων X, ή από έναν ηλεκτρονικό ανιχνευτή στερεάς κατάστασης, όπου η ένταση των κηλίδων είναι ανάλογη προς την ένταση των ακτίνων (Thomas, M. *et al.* 1992, Jonathan, S.W. *et al.* 2000).



X-ray crystallography system Bruker d8 venture

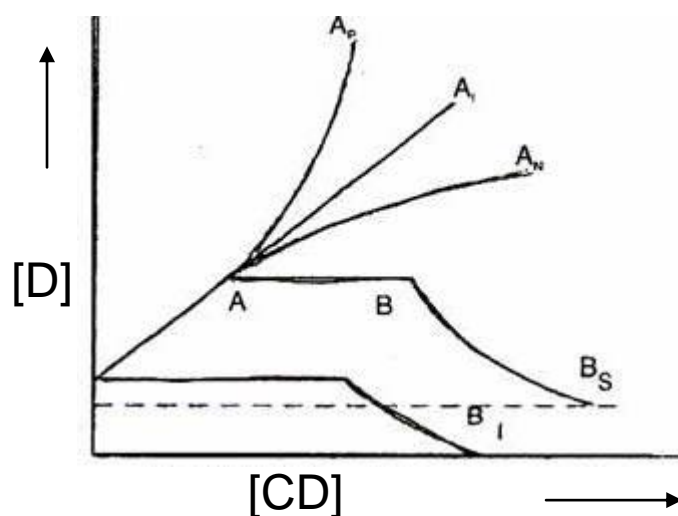
Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής των μορίων από τα δεδομένα περίθλασης των ακτίνων-Χ στο μονοκρυστάλλο γίνεται με τη χρήση υπολογιστικών μεθόδων. Οι μέθοδοι αυτοί αφορούν σε όλα τα βήματα ανάλυσης των πειραματικών δεδομένων από τη συλλογή και την αρχική επεξεργασία τους ως την παραγωγή τελικών παραμετροποιημένων μοντέλων που αποδίδουν με ικανοποιητική πιστότητα την πραγματική στερεοδομή. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί υπολογιστικά προγράμματα, τα περισσότερα από τα οποία διατίθενται ελεύθερα στο διαδίκτυο (Bethanis *et al*, 2010).

3.3. Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού (UV-Vis)

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ξενιζόμενων μορίων που βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή τροποποιούνται μετά τον σχηματισμό του προϊόντος εγκλεισμού. Το ίδιο συμβαίνει και με τις κυκλοδεξτρίνες. Από τις μεταβολές ιδιοτήτων όπως: διαλυτότητα, φθορισμός, θερμοδομετρικοί προσδιορισμοί κ.ά. μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα σχετικά με τη στοιχειομετρία και τη σταθερά σταθερότητας (K_s) του προϊόντος εγκλεισμού. Στην πράξη όμως, πολύ λίγες από αυτές τις μεθόδους μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τη δομή των προϊόντων εγκλεισμού.

3.3.1. Διαγράμματα Διαλυτότητας

Οι Higuchi & Connors (1965) στην προσπάθειά τους να εκμαιεύσουν πληροφορίες από τις μεταβολές διαλυτότητας έχουν κατατάξει τα συμπλοκα με CD σε Τύπου A και B, ανάλογα με τα προφίλ διαλυτότητάς τους, όπως δίνονται στο σχήμα 12 (Loftsson. T., 1965)



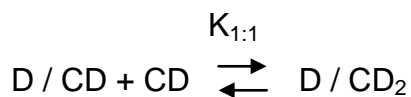
Σχήμα 12: Μεταβολή της διαλυτότητας των προϊόντων εγκλεισμού της κυκλοδεξτρίνης [CD] συναρτήσει του ξενιζόμενου μορίου [D].

Γενικά, τα διαγράμματα διαλυτότητας δεν δίνουν ακριβή στοιχεία για τον σχηματισμό των συμπλόκων. Περιγράφουν απλώς τη μεταβολή της διαλυτότητας της δραστικής ουσίας κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της CD. Τα προφίλ διαλυτότητας A-τύπου προκύπτουν όταν η διαλυτότητα του ξενιζόμενου μορίου αυξάνεται με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του μορίου ξενιστή – κυκλοδεξτρίνη. Όταν

το προϊόν εγκλεισμού είναι 1^{ης} τάξης όσον αφορά την κυκλοδεξτρίνη και παράλληλα 1^{ης} ή και ανώτερης τάξης ως προς το guest προκύπτει προφίλ διαλυτότητας τύπου -A_L. Σε περίπτωση που το σύμπλοκο είναι 1^{ης} τάξης ως προς το guest και 2^{ης} ή ανώτερης τάξης ως προς την κυκλοδεξτρίνη, προκύπτουν τα λεγόμενα A_P – τύπου διαγράμματα διαλυτότητας. Όσο για τα διαγράμματα τύπου A_N, είναι δύσκολο να ερμηνευθούν. Τα προφίλ διαλυτότητας B–τύπου υποδηλώνουν σύμπλοκα περιορισμένης διαλυτότητας. Γενικά οι κυκλοδεξτρίνες με σχετικά υψηλή υδατοδιαλυτότητα σχηματίζουν προϊόντα εγκλεισμού με προφίλ διαλυτότητας A–τύπου ενώ οι κυκλοδεξτρίνες με μειωμένη υδατοδιαλυτότητα (φυσικές κυκλοδεξτρίνες) προφίλ B–τύπου.

Τα περισσότερα σύμπλοκα των CDs υποτίθεται πως έχουν σχηματισθεί με τον μηχανισμό του εγκλεισμού, αλλά είναι γνωστό πως οι CDs σχηματίζουν επίσης μη συμβατικά (με εγκλεισμό) σύμπλοκα, καθώς και άλλου είδους ομαδοποιήσεις ξενιστών-ξενιζομένων μορίων έτσι ώστε να προάγουν την διάλυτοποίηση των τελευταίων.

Ο συνήθης τύπος εγκλεισμού είναι εκείνος με αναλογία guest / host = 1 : 1 κατά τον οποίο ένα ξενιζόμενο μόριο (guest) συναρμόζεται με ένα μόριο κυκλοδεξτρίνης (host) όπως φαίνεται στην ισορροπία (Al-Sou'od, 2008):



όπου: CD η κυκλοδεξτρίνη, D το ξενιζόμενο μόριο, CD·D το σύμπλοκο και K_c, η σταθερά συμπλοκοποίησης, που δίνεται από τη σχέση:

$$K_c = \frac{[D-CD]}{[D][CD]} \quad (1)$$

όπου [D-CD] η συγκέντρωση του συμπλόκου στο διάλυμα, [D] η συγκέντρωση της ελεύθερης δραστικής ουσίας στο διάλυμα και [CD] η συγκέντρωση της ελεύθερης CD στο διάλυμα (Higuchi & Connors, 1965).

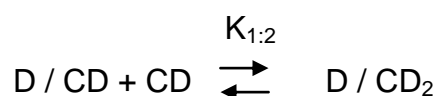
Υπό αυτές τις συνθήκες παρατηρείται διάγραμμα διαλυτότητας, που αντιστοιχεί σε σύμπλοκο Τύπου A_L, με κλίση μικρότερη της μονάδας και επομένως η σταθερά συμπλοκοποίησης (K_{1:1}) μπορεί να υπολογιστεί από την κλίση και την εσωτερική διαλυτότητα (S₀) του ξενιζομένου μορίου στο υδατικό διάλυμα συμπλοκοποίησης (π.χ. την διαλυτότητα της ουσίας απουσία κυκλοδεξτρίνης):

$$K_{1:1} = \frac{\text{Κλίση}}{S_0 (1 - \text{κλίση})} \quad (2)$$

Για τα 1:1 σύμπλοκα, η ικανότητα συμπλοκοποίησης (CE, Complexation Efficiency) μπορεί να υπολογιστεί από την κλίση του διαγράμματος διαλυτότητας:

$$CE = \frac{[D / CD]}{[CD]} = S_0 K_{1:1} = \frac{\text{Κλίση}}{(1 - \text{Κλίση})}$$

Όταν επιλέγουμε κυκλοδεξτρίνες ή συνθήκες συμπλοκοποίησης κατά την διάρκεια σχηματισμού του συμπλόκου, είναι συνήθως πιο βολικό να συγκρίνουμε τις τιμές της CE από ότι αυτές της σταθεράς $K_{1:1}$. Η πιο συνηθισμένη αναλογία μεταξύ ξενιζόμενου μορίου-ξενιστή στο σύμπλοκο (μετά την 1:1 στοιχειομετρία) είναι 1:2. Το διάγραμμα διαλυτότητας αντιστοιχεί σε σύμπλοκο τύπου AP. Τα σύμπλοκα με την παραπάνω στοιχειομετρία, φαίνεται να σχηματίζονται από την συμπλοκοποίηση ενός ήδη σχηματισμένου (σε αναλογία ξενιζόμενου μορίου-ξενιστή=1:1) συμπλόκου με ένα επιπλέον μόριο κυκλοδεξτρίνης:



Η τιμή της σταθεράς $K_{1:2}$ συχνά κυμαίνεται μεταξύ 10 και 500 M^{-1} , ή είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτήν της $K_{1:1}$.

Μεγαλύτερες στοιχειομετρίες, στις οποίες ο σχηματισμός συμπλόκου πραγματοποιείται σε αναλογία 1:2, 2:1, 2:2 ή σε πιο πολύπλοκους συνδυασμούς, είναι συχνές και παρατηρούνται πάντα ταυτόχρονα.

3.3.2. Εκτίμηση στοιχειομετρίας

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του ελεύθερου ξενιζόμενου μορίου στο διάλυμα είναι διαφορετικές από εκείνες που παρουσιάζει όταν βρίσκεται με την μορφή συμπλόκου με κυκλοδεξτρίνη στο διάλυμα. Ομοίως, οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεύθερης κυκλοδεξτρίνης στο διάλυμα είναι διαφορετικές από τις αντίστοιχες στο σύμπλοκο. Θεωρητικά κάθε μέθοδος, που χρησιμοποιείται για την παρατήρηση αυτών των μεταβολών στις ιδιότητες, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στον καθορισμό της στοιχειομετρίας των σχηματιζόμενων συμπλόκων και των αριθμητικών τιμών των σταθερών συμπλοκοποίησης. Αυτές περιλαμβάνουν αλλαγές στην διαλυτότητα, στην χημική δραστηριότητα, στην απορρόφηση, στον φθορισμό, την μετατόπιση του NMR, στον χρόνο έκλυσης της ουσίας (π.χ. στην υγρή χρωματογραφία), στις τιμές pK_a, ποτενσιομετρικές μετρήσεις, αλλαγές στην χημική σταθερότητα και επιδράσεις στην ικανότητα περατότητας της ουσίας από τεχνητές μεμβράνες (Loftsson, 2005). Επιπλέον, και αφού η συμπλοκοποίηση επηρεάζει το υδατικό μέσο στο οποίο επιτελείται, μέθοδοι, με τις οποίες ανιχνεύονται αυτές οι αλλαγές μπορούν να εφαρμοστούν στη μελέτη της συμπλοκοποίησης. Για παράδειγμα, αλλαγές στην ένδειξη της αγωγιμότητας, στον καθορισμό της πτώσης του σημείου τήξης, στην ένδειξη του ιξώδους και στην θερμομετρική τιτλοδότηση. Ωστόσο, μόνο λίγες από αυτές τις μεθόδους μπορεί να εφαρμοστούν ώστε να εκμαιεύσουμε πληροφορίες σχετικά με την δομή των συμπλόκων ξενιζόμενου μορίου-κυκλοδεξτρίνης.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως προαναφέρθηκε η στοιχειομετρία της συμπλοκοποίησης μπορεί να υπολογιστεί με την τεχνική του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), αλλά αυτό συμβαίνει συνήθως σε αραιά διαλύματα σε αντίθεση με τις μελέτες των διαγραμμάτων διαλυτότητας που πραγματοποιούνται με κορεσμένα διαλύματα.

Θεωρητικά μοντέλα που προκύπτουν από επεξεργασία στον ηλεκτρονικό υπολογιστή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν στην προσπάθεια κατανόησης των χωρικών αλληλεπιδράσεων της συμπλοκοποίησης και μάλιστα έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στην πρόβλεψη της φύσης της αλληλεπίδρασης ξενιζόμενου μορίου-κυκλοδεξτρίνης τόσο σε ιδανικά όσο και σε μη ιδανικά διαλύματα. Αν και αυτές οι θεωρητικές προσεγγίσεις συνεχίζουν να βελτιώνονται, προς το παρόν εξακολουθούν να αποτελούν υπεραπλουστευμένες περιγραφές και να αγνοούν σημαντικές

παραμέτρους που αφορούν τον σχηματισμό των συμπλόκων των κυκλοδεξτρινών και την δομή τους, ειδικά σε μη ιδανικά διαλύματα.

Επιπροσθέτως, στα σύγχρονα μοντέλα συμπλοκοποίησης ο σχηματισμός μη συμβατικών (με εγκλεισμό) συμπλόκων γενικά αγνοείται. Ακόμη, τα μοντέλα σχηματίζονται με δεδομένο το πως άπαξ και δημιουργούνται τα έγκλειστα σύμπλοκα, βρίσκονται σε ιδανικό διάλυμα ως ξεχωριστές και απολύτως διακριτές μεταξύ τους μονάδες. Ωστόσο, πολλοί ερευνητές έχουν δείξει πως τόσο οι CDs όσο και τα σύμπλοκά τους μπορεί να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να ενωθούν σε σχηματισμούς των δυο ή περισσότερων μορίων CD με σύμπλοκα. Σε ειδικές περιπτώσεις, ο σχηματισμός φέρει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ιριδισμού σε υδατικά διαλύματα κυκλοδεξτρινών, αλλά τις περισσότερες φορές η διάμετρος του σχηματισμού είναι πολύ μικρότερη από το μήκος κύματος του ορατού φωτός και συνεπώς μόνο καθαρά διαλύματα παρατηρούνται.

Η φασματοσκοπία υπερύθρου είναι μία τεχνική που βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας (μήκη κύματος από 1 έως 100 μm) από το προς εξέταση μέσο. Είναι μία απλή μέθοδος από την οποία αντλούμε πληροφορίες για τις χαρακτηριστικές ομάδες που περιέχονται σε μια ένωση (δονήσεις τάσης, κάμψης κτλ).

3.4. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$)

Η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ είναι μία από τις χρησιμότερες τεχνικές διότι παρέχει πληροφορίες για τη δομή των ενώσεων στο διάλυμα.

Η τεχνική χρησιμοποιείται από το '70 για τα σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών με χαρακτηριστικό παράδειγμα την εφαρμογή της μεθόδου $^1\text{H-NMR}$ για τον χαρακτηρισμό του τρόπου εγκλεισμού διαφόρων αρωματικών ουσιών σε β -CD. Η πιο ισχυρή ένδειξη εγκλεισμού του ξενιζόμενου μορίου στην άπολη κοιλότητα της CD σε διάλυμα προέρχεται από δεδομένα με την μέθοδο NMR, η οποία αποκαλύπτει την αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο μορίων (Dodziuk et al., 1996).

Όταν ένα ξενιζόμενο μόριο εγκλειστεί στην κοιλότητα της CD, τα άτομα υδρογόνου στο εσωτερικό της κοιλότητας της CD (C-3-H και C-5-H) προστατεύονται από το μόριο και παρουσιάζουν σημαντική μετατόπιση της κορυφής τους σε υψηλότερα πεδία, ενώ τα αντίστοιχα υδρογόνα στην εξωτερική επιφάνεια (C-2-H, C-4-H και C-6-H) παραμένουν ανεπηρέαστα ή εμφανίζουν μικρή μετατόπιση της κορυφής τους σε υψηλότερα πεδία. Τα υδρογόνα των ξενιζόμενων μορίων εμφανίζουν μετατόπιση της κορυφής τους σε χαμηλότερα πεδία (Ramusino and Pichini, 1994).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

4.1 Κυκλοδεξτρίνες και η επίδρασή τους στη βλαστικότητα

Με τον όρο βλαστικότητα εννοούμε τον εκφρασμένο επί τις εκατό (%) αριθμό σπερμάτων που βλαστάνουν σε ιδανικές για το συγκεκριμένο είδος συνθήκες, σε συγκεκριμένο για το κάθε είδος χρονικό διάστημα.

Έχει βρεθεί ότι η παρουσία α - και β -CD επηρεάζει ανασταλτικά το ρυθμό βλαστικότητας σε σπέρματα κριθαριού, λόγω του ότι οι CDs εγκλωβίζουν τους παράγοντες βλάστησης του φυτού και με αυτό τον τρόπο καθυστερεί η ανάπτυξή τους (Salminen et al., 1990a).

Αντίθετα, η εφαρμογή ενθλακωμένων PGRs σε πολύ-αιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE) παρουσίασε αισθητή αύξηση στη ριζοβολία και στην ανάπτυξη των μοσχευμάτων πολλών καλλωπιστικών φυτών σε σχέση με τους PGRs στην ελεύθερη μορφή τους. Η προώθηση αυτή της ριζοβολίας αποδίδεται στην αργή αποδέσμευση των PGRs από τον «θήλακα»-LDPE (Wiesman et al., 2002).

Σε ότι αφορά το IBA έχουν αναφερθεί αρκετές εφαρμογές του, μία από τις οποίες είναι η χρήση του στην ανάπτυξη σπερμάτων χλοοτάπητα, σε συνδυασμό με το γιβερελλικό οξύ. Βρέθηκε λοιπόν ότι ο συνδυασμός των δύο ορμονών προάγει σε χαμηλό ή υψηλό ποσοστό τη βλάστηση και το ξηρό βάρος του ριζικού συστήματος ανάλογα με τη θερμοκρασία (10 έως 30°C) (Longer et al., 2001).

Παρ'όλ'αυτά η ταχύτητα της βλάστησης, ιδιαίτερα σε μη ιδανικές συνθήκες, αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για τη χρήση μιας εμπορικής ποικιλίας. Για την αξιολόγηση της επίδρασης του IBA και του εγκλεισμού του στη βλαστικότητα σπερμάτων εμπορικών ειδών, έγινε εφαρμογή σε σπέρματα είδους που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία χλοοτάπητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

5.1 Υλικά και Μέθοδοι

5.1.1 Αντιδραστήρια – Διαλύτες - Βιολογικό υλικό

Οι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν όπως παραλήφθηκαν από την εταιρία Applichem σε βαθμό καθαρότητας «χημικώς καθαρά» χωρίς επιπλέον καθαρισμό. Η β-κυκλοδεξτρίνη και το ινδολοβουτυρικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν όπως παραλήφθηκαν από την εταιρία Fluka. Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάστηκε αναμιγνύοντας 39.8 mL κιτρικού οξέος (0.1M) και 10.2 mL διϋδρο-φωσφορικό νάτριο (0.2M)

Για την παραγματοποίηση των δοκιμών βλαστικότητας χρησιμοποιήθηκαν σπέρματα του είδους *Zoysia japonica* cv Zenith[®] (comp)

Για την παραγματοποίηση των δοκιμών βλαστικότητας των σπερμάτων, εφαρμόστηκε απολύμανσή τους με τη χρήση των κάτωθι:

α) Υδατικού διαλύματος χλωρίνης εμπορίου (Klinex, Unilever Hellas, Αθήνα) με περιεκτικότητα σε υποχλωριώδες νάτριο (NaClO) 4,5%.

β) Προσκολλητικής ουσίας Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate) (Merck KGaA, Germany).

5.1.2 Όργανα

Τα δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X λήφθηκαν χρησιμοποιώντας περιθλασίμετρο D8 Venture της εταιρίας Bruker.

Τα φάσματα FT-IR λήφθηκαν στην περιοχή 400-4000 cm^{-1} σε φασματόμετρο Nicolet FT-IR 6700 με τις εξής παραμέτρους:

Σαρώσεις (scans): 100

Διακριτική ικανότητα (resolution): 4cm^{-1}

Ταχύτητα κινούμενου κατόπτρου (optical velocity): $0,6329\text{ mm s}^{-1}$

Ανιχνευτής (detector): Δευτεριωμένη θειϊκή γλυκίνη (Deuterated triGlycine Sulfate, DTGS).

Επεξεργασία Φασμάτων:

1) Εξομάλυνση με χρήση της λειτουργίας «Automatic Smoothing» του λογισμικού OMNIC 7.3 της Nicolet 750 Magna series, που συνοδεύει το φασματοφωτόμετρο.

2) Διόρθωση της βασικής γραμμής με χρήση της λειτουργίας «Automatic Baseline Correct».

- Τα φάσματα UV-Vis λήφθηκαν στην περιοχή 200-700nm σε φασματοφωτόμετρο V-550 της JASCO.

5.2 Παρασκευές

5.2.1 Παρασκευή του προϊόντος εγκλεισμού IBA σε β -CD

Σε 10mL απιονισμένο H_2O διαλυτοποιήθηκαν 0,0565g β -CD και προστέθηκαν 0,01g IBA (αναλογία moles 2:1, β -CD:IBA). Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24h και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους $-20^\circ C$ για άλλες 24h πριν τοποθετηθεί στο λυοφυλιωτή. Στο προϊόν που συλλέχθηκε μετά τη λυοφυλίωση λήφθηκε το φάσμα FT-IR.

5.2.2 Παρασκευή κρυστάλλων

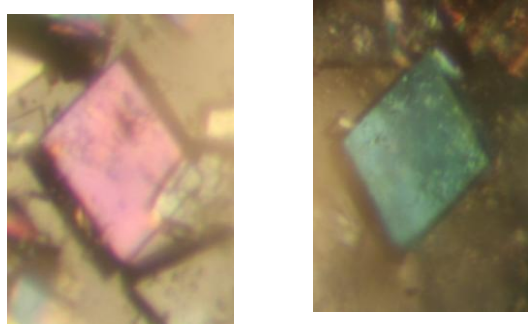
Η διαδικασία της κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αργής ψύξης. Για το σκοπό αυτό, σε 1mL απιονισμένο νερό διαλυτοποιήθηκαν 0.0279g β -CD στους $70^\circ C$ και στη συνέχεια προστέθηκαν 0,01g IBA. Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση στους $70^\circ C$ μέχρι να διαυγάσει και τέλος έγινε απόχυση αυτού σε δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για επώαση. Ρυθμίστηκε η αρχική θερμοκρασία του υδατόλουτρου στους $65^\circ C$ και ακολούθησε σταδιακή ελάττωση της θερμοκρασίας έως τους $25^\circ C$ σε διάρκεια 8 ημερών. Τις πρώτες τρεις ημέρες η θερμοκρασία μειωνόταν κατά $5^\circ C/12$ ώρες, ενώ τις επόμενες ημέρες μειωνόταν $3^\circ C/8$ ώρες περίπου, ώσπου η θερμοκρασία του υδατόλουτρου να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου ($25^\circ C$). Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι αφού παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες, μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας στους $18^\circ C$, ώστε οι κρύσταλλοι να αναπτυχθούν σε κατάλληλο μέγεθος.

Η διαδικασία της κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από τους Bethanis *et al.*(2012) και για τις αναλογίες 1:1 και 1:1,5 IBA: β -CD. Τελικά όμως βρέθηκε ότι το 1:2 (IBA: β -CD) έδινε περισσότερους και καλύτερης ποιότητας κρυστάλλους, οι οποίοι μελετήθηκαν και με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Οι πιο καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι επελέγησαν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου για τη λήψη φάσματος FT-IR και για την επανάληψη πειραμάτων περίθλασης ακτίνων-X.

5.3. Δομική μελέτη του προϊόντος εγκλεισμού IBA / β -CD με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X

Ο κρυσταλλογραφικός προσδιορισμός του προϊόντος εγκλεισμού IBA/ β -CD έχει παρουσιαστεί αναλυτικά σε προηγούμενη μελέτη (Μάζη Β., 2012). Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης επαναλήφθηκαν τα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X στους σχηματισμένους μονοκρυστάλλους του συμπλόκου. Η συλλογή δεδομένων έγινε από μέλη του εργαστηρίου Φυσικής του ΓΠΑ στις εγκαταστάσεις της εταιρείας Bruker στην Καρλσρούη και με σύστημα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X Bruker d8 venture (βλέπε παράγραφο 3.2). Τα δεδομένα περίθλασης που ελήφθησαν αυτή τη φορά ήταν σαφώς βελτιωμένα. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1, η διακριτικότητα τους φθάνει τα 0.85\AA με υψηλή πληρότητα 98.8%. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την εισαγωγή περισσότερων παραμέτρων στο τελικό μοντέλο (π.χ. ανισοτροπικοί παράγοντες για όλα τα άτομα) και επομένως οδηγούν σε βελτίωση της λύσης που δίνεται από το (Μάζη. Β., μεταπτυχιακή διατριβή, 2012).

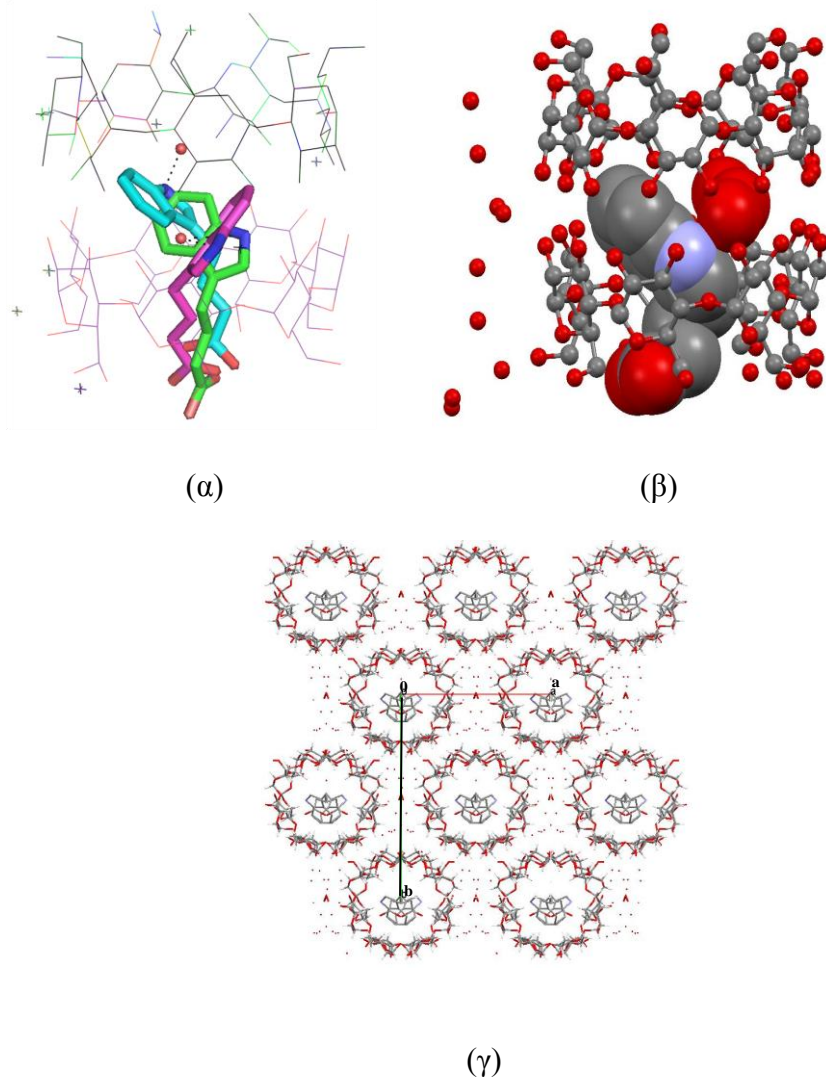
Η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Shelx97 (Sheldrick, 2008)) μέσα από το πακέτο προγραμμάτων Wingx (Farrugia, 1999). Η λύση βρέθηκε με τη μέθοδο ισόμορφης αντικατάστασης, χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο εκείνο που προέκυψε από την προηγούμενη μελέτη (Μάζη. Β., 2012), και διαδοχικές βελτιστοποιήσεις με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων και χαρτών διαφορικής ηλεκτρικής πυκνότητας (difference electron density Fourier maps). Σύμφωνα με το βέλτιστο μοντέλο που προκύπτει από αυτήν την ανάλυση, το προϊόν εγκλεισμού IBA/ β -CD κρυσταλλώνει και πάλι σε συμμετρία ομάδας χώρου C_2 και μοναδιαία κυψελίδα παρομοίων διαστάσεων με αυτή που παρατηρήθηκε σε προηγούμενη κρυσταλλογραφική μελέτη (Μάζη. Β., 2012).



Σχήμα 13: κρύσταλλοι προϊόντος εγκλεισμού IBA/ β -CD

Πίνακας 1: Κρυσταλλογραφικά δεδομένα

Πειραματικά δεδομένα	
Θερμοκρασία συλλογής δεδομένων	298 (2)K
Μήκος κύματος Cu	1.54178 Å
Διαστάσεις κρυστάλλου	0.010x0.080x0.220 mm
Κρυσταλλικό Σύστημα, Ομάδα χώρου	Μονοκλινές, C ₂
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	$a= 18.7563(10)\text{Å}$ $\alpha=90^\circ$ $b=24.5350(13)\text{Å}$ $\beta=110.056(2)^\circ$ $c= 15.7059(7)\text{Å}$ $\gamma=90^\circ$
Όγκος μοναδιαίας κυψελίδας	6789.3(6) Å ³
Πλήθος συνολικών / ανεξαρτήτων ανακλάσεων	30696 / 11201 [R(int) = 0.0502]
Πληρότητα ως προς $\theta=66.59$	98.8%
Διακριτικότητα	0.85Å
Z, Υπολογισμένη πυκνότητα	4, 1.262 g/cm ³
Συντελεστής απορρόφησης	0.982mm ⁻¹
F(000)	2718
Δεδομένα / Περιορισμοί / Παράμετροι	11201 / 52 / 778
Δείκτης καλής προσαρμογής (Goodness of fit)	1.196
Τελικοί δείκτες αξιοπιστίας R [I>2sigma(I)]	R ₁ = 0.0997, wR ₂ = 0.2784
Τελικοί δείκτες αξιοπιστίας R (όλα τα δεδομένα)	R ₁ = 0.1199, wR ₂ = 0.3018

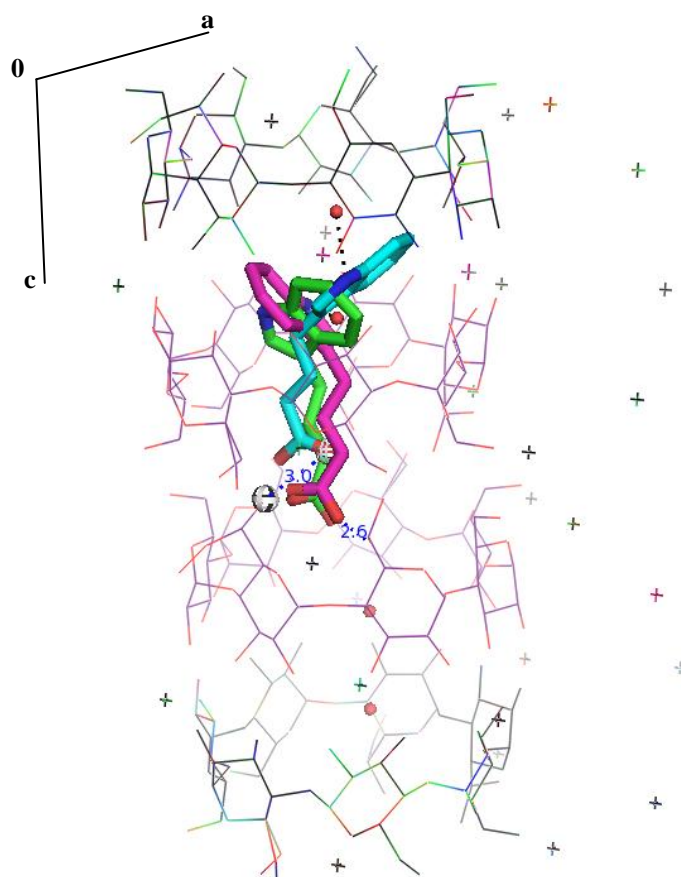


Σχήμα 14: Σχηματική αναπαράσταση (α) του διμερούς, (β) του χωροπληρωματικού μοντέλου και (γ) της κρυσταλλικής μοριακής διεύθετησης του συμπλόκου β -CD/IBA. Για το σχεδιασμό αυτών των μοντέλων χρησιμοποιούνται τα προγράμματα: για το (α) Rymol και για το (β) Mercury (Macrae *et al*, 2006).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 14 (α) και (β) οι β -κυκλοδεξτρίνες σχηματίζουν διμερές τύπου κεφαλής-κεφαλής μέσω υδρογονικών δεσμών μεταξύ των απέναντι υδροξυλίων των δευτεροταγών ανθράκων. Μέσα στη σχηματιζόμενη κοιλότητα του διμερούς εγκλείεται ένα έντονα αποδιατεταγμένο μόριο IBA (στοιχειομετρία ξενιστή/ξενιζομένου 2/1). Στο Σχήμα 14 (α) φαίνεται ότι το εγκλεισμένο μόριο IBA καταλαμβάνει 3 πιθανές θέσεις G1, G2 και G3 με αριθμούς κατάληψης 40%, 30% και 30% στη μοναδιαία κυψελίδα. Όταν το IBA καταλαμβάνει τις θέσεις G2 και G3 φαίνεται να κατακρατεί μέσα στην κοιλότητα του διμερούς και ένα μόριο νερού (με

αντίστοιχο αριθμό κατάληψης) συνδεδεμένο με δεσμό υδρογόνου με το N του ινδολικού δακτυλίου του ξενιζόμενου μορίου.

Η διεύθυνση των διμερών β -CD στον κρύσταλλο γίνεται σε στρώσεις κατά τον κρυσταλλογραφικό άξονα c και παράλληλα στο άξονα b της μοναδιαίας κυψελίδας. Τα διμερή διευθετούνται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν αυλούς κάθετα στο επίπεδο ab (K. Fourtaka *et al.* 2012).

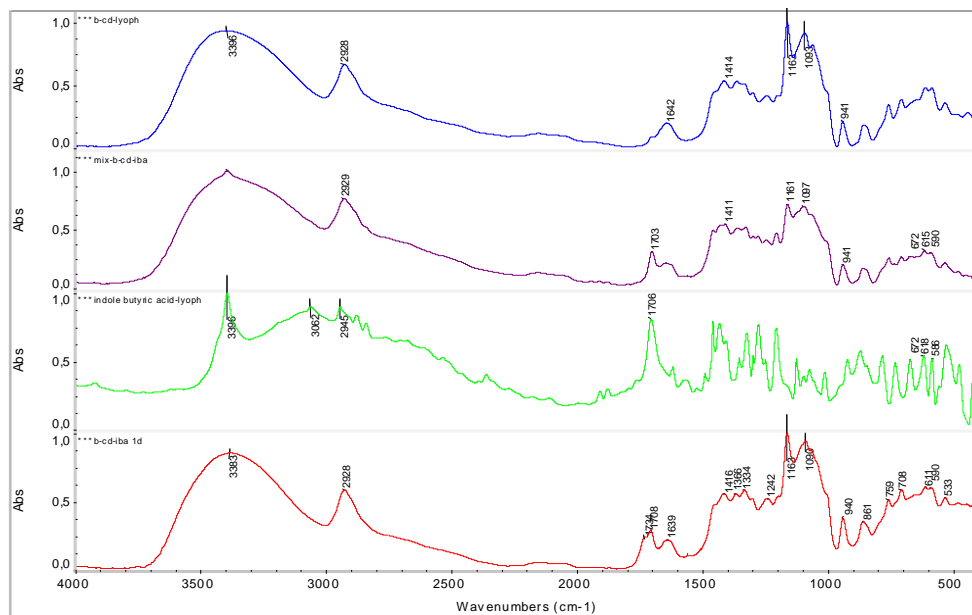


Σχήμα 15: Υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ γειτονικών στρωμάτων διμερών του ίδιου αυλού – Σχηματισμός νανοκαλωδίου. Στο σχήμα σημειώνεται για λόγους ευκρίνειας το ξενιζόμενο μόριο (IBA) μόνο στο «επάνω» διμερές του αυλού.

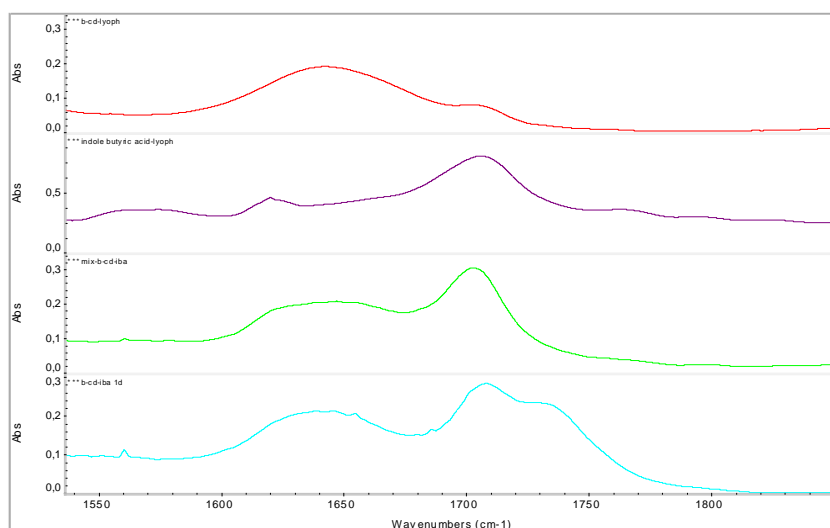
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 15 η καρβοξυλομάδα του εγκλεισμένου IBA σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την υδροξυλομάδα της β -CD του γειτονικού διμερούς του κατώτερου στρώματος του ίδιου αυλού. Με τον τρόπο αυτό συνδέονται τα γειτονικά διμερή σε κάθε αυλό σχηματίζοντας έτσι μια συναρμογή που χαρακτηρίζεται ως νανο-καλώδιο, αφού θεωρητικά μπορεί να εκτείνεται στη μακροδιάσταση όλου του μονοκρυστάλλου.

5.4. Απόδοση φασμάτων Υπερύθρου

Τα φάσματα FT-IR των ενώσεων λήφθηκαν με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης στην περιοχή $400\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξομάλυνση και διόρθωση της βασικής γραμμής με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού.



Σχήμα 16: Φάσματα FT-IR της β -CD, του IBA, του μίγματος και του προϊόντος εγκλεισμού από λυοφυλίωση στην περιοχή $400\text{-}4000\text{cm}^{-1}$.



Σχήμα 17: Φάσματα FT-IR της β -CD, του IBA, του μίγματος και του προϊόντος εγκλεισμού από λυοφυλίωση στην περιοχή $400\text{-}2000\text{cm}^{-1}$.

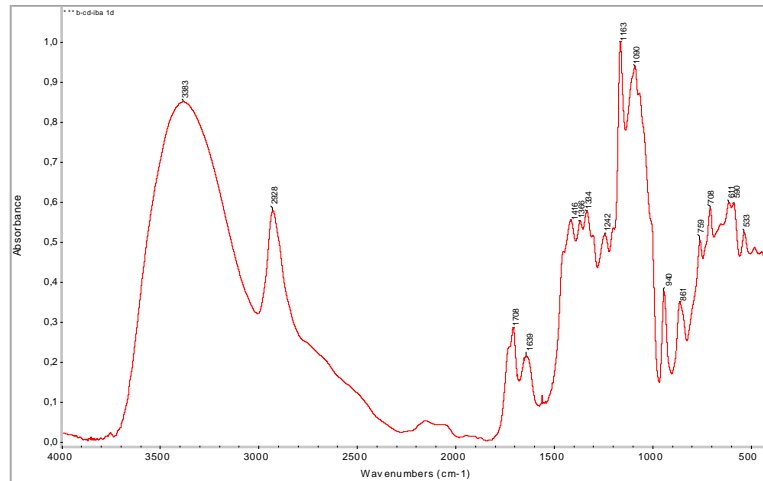
Πίνακας 2: Αποτίμηση κορυφών των φασμάτων FT-IR της β-κυκλοδεξτρίνης στη φασματική περιοχή 400-4000cm⁻¹ (Norasiha et al., 2006).

β-κυκλοδεξτρίνη (cm⁻¹)	Απόδοση
3397	ν (O-H)
2928	ν (C-H) αλειφατικά
1414	δ (O-C-H-), (C-C-H)
1163, 1093	ν (C-C), ν (C-O) και δ (C – OH)
941	δόνηση τάσης που οφείλεται στον α-1,4 δεσμό μεταξύ των γλυκοζιτικών μονάδων

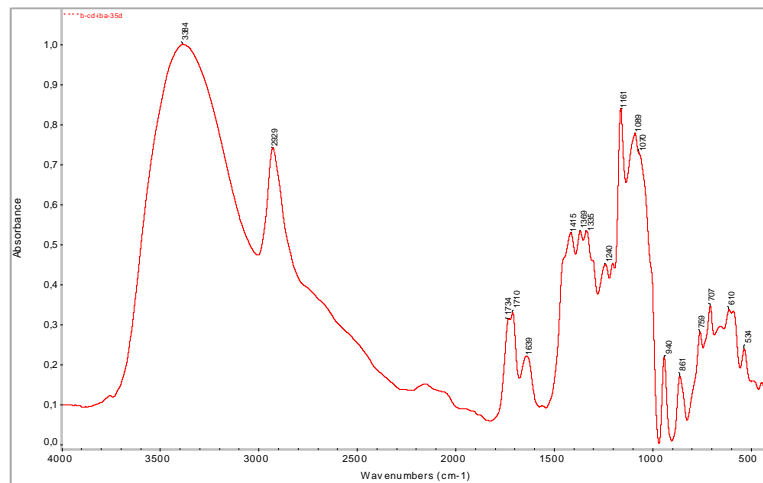
Πίνακας 3: Αποτίμηση κορυφών των φασμάτων FT-IR του IBA στη φασματική περιοχή 400-4000cm⁻¹ (Warren et al., 1965).

IBA (cm⁻¹)	Απόδοση
3394	ν (O-H)
1706	ν (C=O)
3063	ν (C-H) αρωματικά
2946	ν (C-H) αλειφατικά
586, 618, 672	Χαρακτηριστικές κορυφές του ινδολικού δακτυλίου

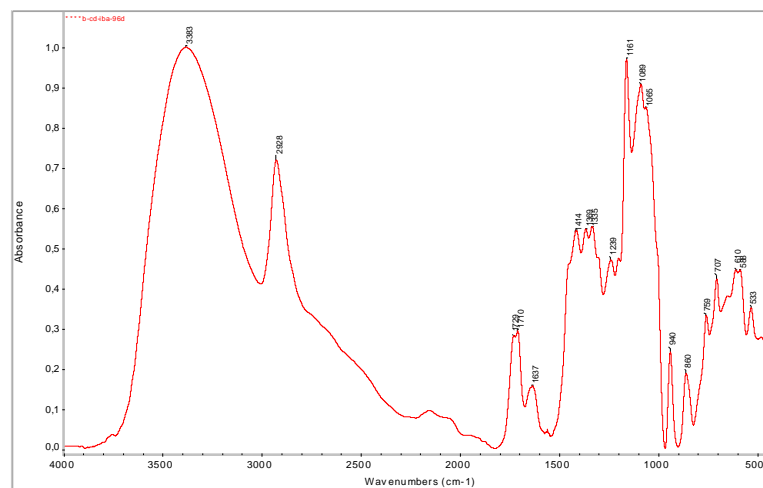
Στα 1734 cm⁻¹ του φάσματος του προϊόντος εγκλεισμού φαίνεται μία κορυφή με τη μορφή ώμου, η οποία δεν εμφανίζεται στο φάσμα του μίγματος, γεγονός που υποδηλώνει αλληλεπίδραση μεταξύ της κυκλοδεξτρίνης και του IBA. Επειδή το pK_a του IBA είναι 4,7 ενώ το pH του διαλύματος του προϊόντος εγκλεισμού κυμαινόταν μεταξύ των τιμών 5,19 έως 5,24, το καρβοξύλιο του IBA βρίσκεται και με τη μορφή –COOH και με τη μορφή –COO⁻. Από τις κρυσταλλογραφικές παρατηρήσεις φαίνεται ότι το καρβοξύλιο του IBA βρίσκεται κοντά στα υδροξύλια της β-CD. Επομένως η κορυφή στα 1734 cm⁻¹ μπορεί να αποδοθεί στην αλληλεπίδραση του καρβοξυλίου με τα υδροξύλια της β-CD. Η διαφορά αυτή οδηγεί στο ότι το φάσμα του μίγματος παρουσιάζει ομοιότητα ως προς αυτό του συμπλόκου κατά 87,99%.



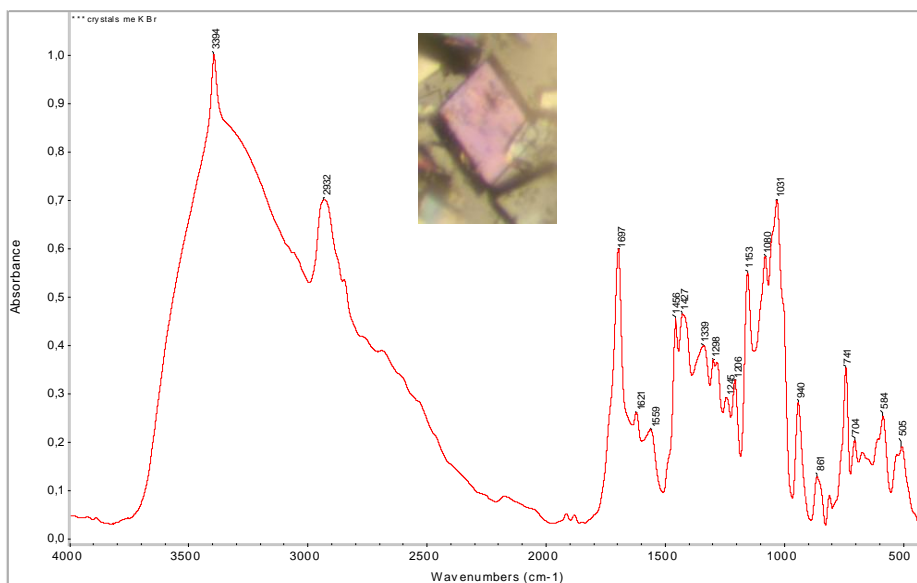
Σχήμα 18: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 1^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



Σχήμα 19: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 35^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



Σχήμα 20: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 96^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



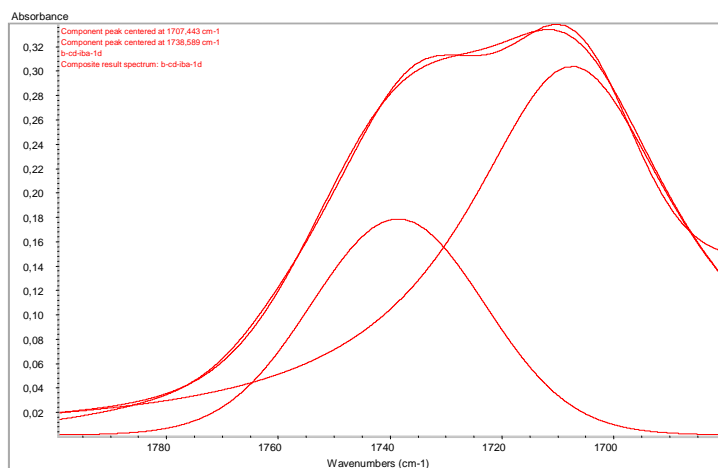
Σχήμα 21: Φάσμα FT-IR σε κρυστάλλους IBA-β-CD

Το φάσμα FT-IR των κρυστάλλων (Σχήμα 21) βρέθηκε ότι έχει ομοιότητα 55% σε σχέση με αυτό του συμπλόκου της 1^{ης} ημέρας.

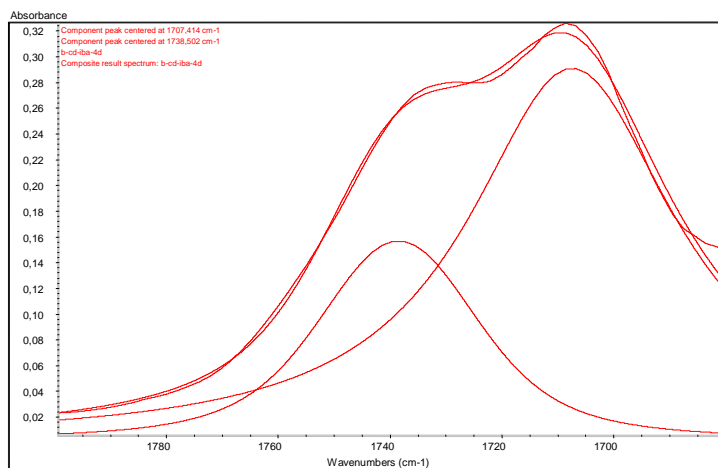
Το φάσμα ATR πραγματοποιήθηκε στο υδατικό διάλυμα πριν τη λυοφυλίωση, όμως δεν έδωσε ανιχνεύσιμο σήμα πιθανόν λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των συστατικών του μίγματος.

5.4.1. Αποσυνέλιξη στην περιοχή του φάσματος 1700-1800 cm^{-1}

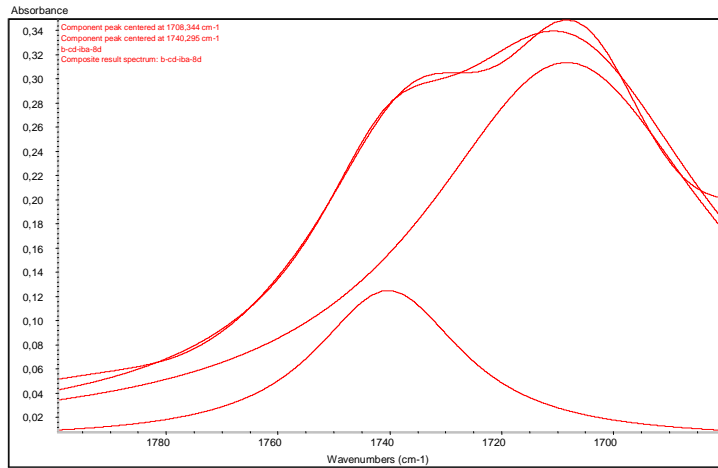
Στην περιοχή 1700-1800 cm^{-1} , των φασμάτων FT-IR που λήφθηκαν την 1^η, 4^η, 8^η, 13^η, 19^η, 22^η, 26^η, 35^η, 46^η και 96^η ημέρα από τη δημιουργία του συμπλόκου, πραγματοποιήθηκε αποσυνέλιξη χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Voigt. Δοκιμάστηκαν και οι αλγόριθμοι Gaussian και Lorentzian των οποίων τα στατιστικά αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα παρουσίασαν μεγαλύτερο τυπικό σφάλμα κατά μέσο όρο (4,32 και 7,15) έναντι του αλγορίθμου Voigt (2,11) κατά μέσο όρο.



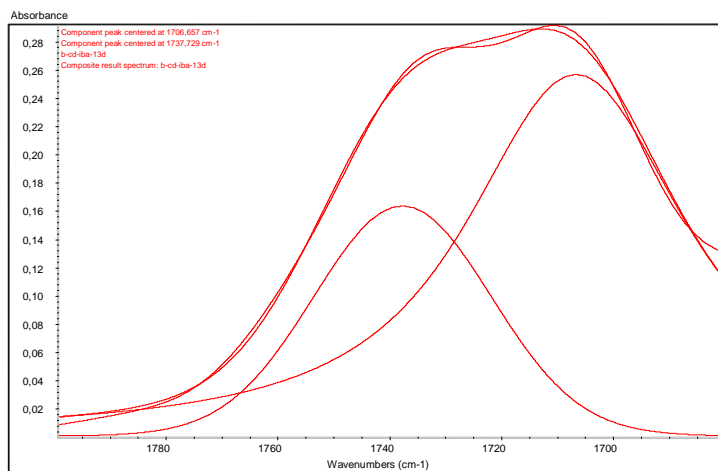
Σχήμα 22: Αποσυνέλιξη στο φάσμα 1^{ης} ημέρας



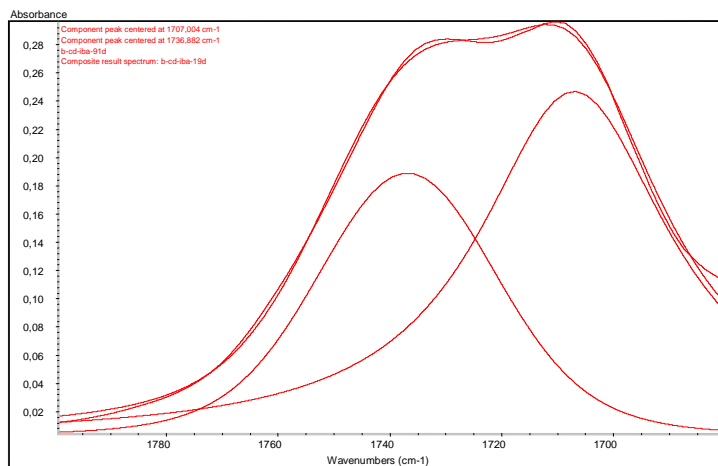
Σχήμα 23: Αποσυνέλιξη στο φάσμα 4^{ης} ημέρας



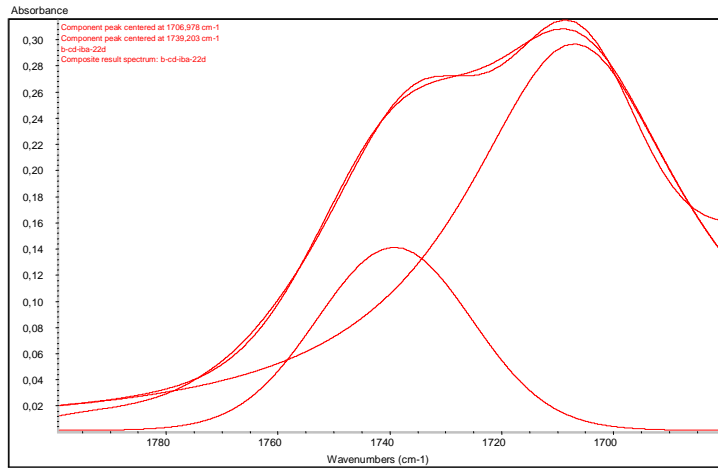
Σχήμα 24: Αποσυνέλιξη στο φάσμα 8^{ης} ημέρας



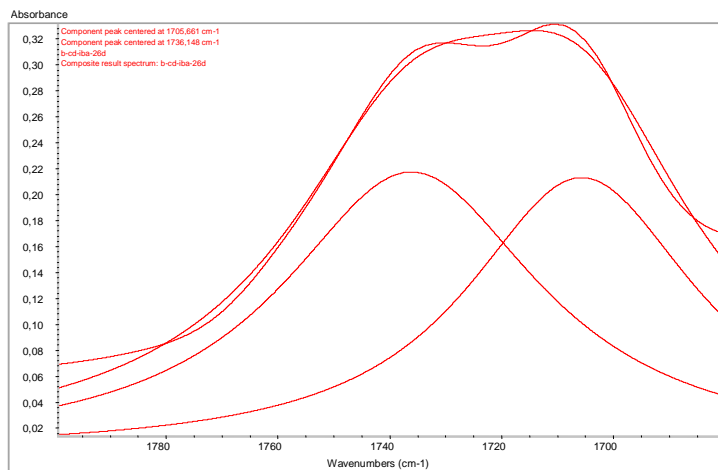
Σχήμα 25: Αποσυνέλιξη στο φάσμα 13^{ης} ημέρας



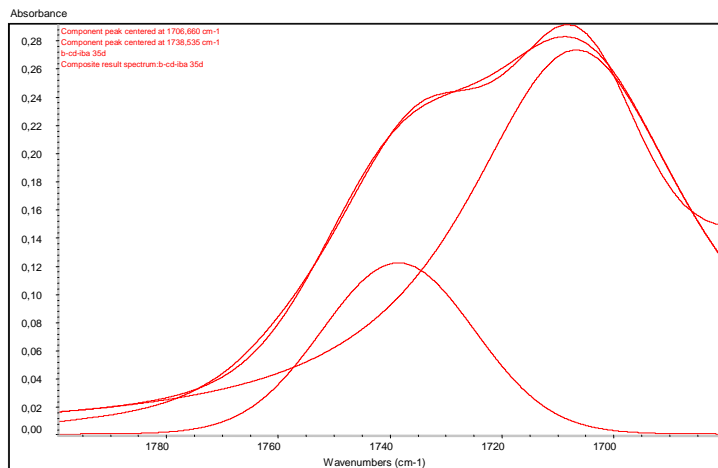
Σχήμα 26: Αποσυνέλιξη στο φάσμα 19^{ης} ημέρας



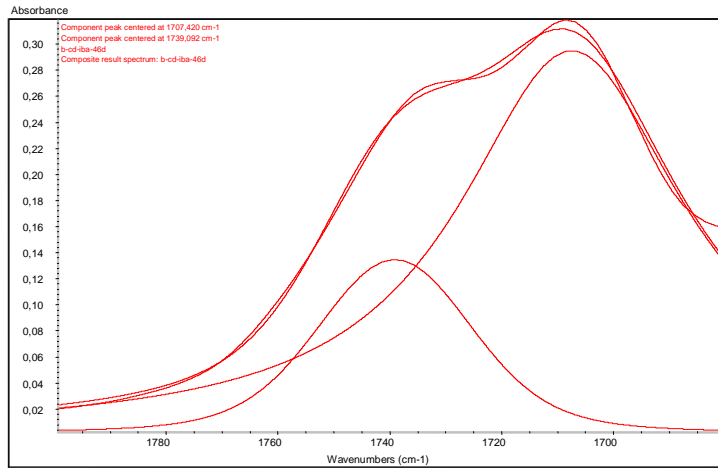
Σχήμα 27: Αποσυνέλιξη στο φάσμα 22^{ης} ημέρας



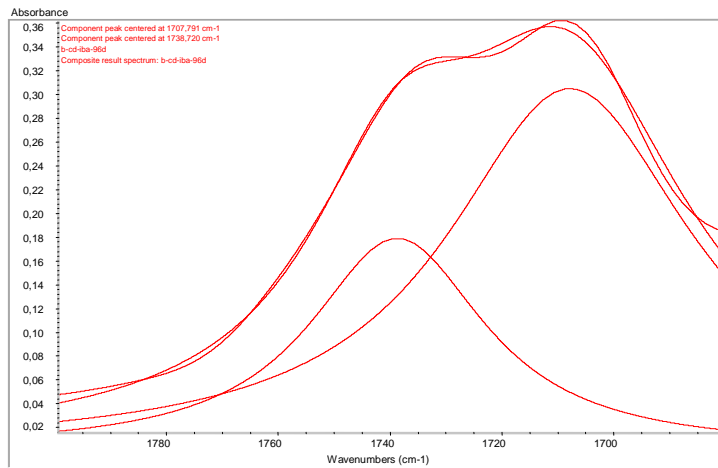
Σχήμα 28: Αποσυνέλιξη στο φάσμα 26^{ης} ημέρας



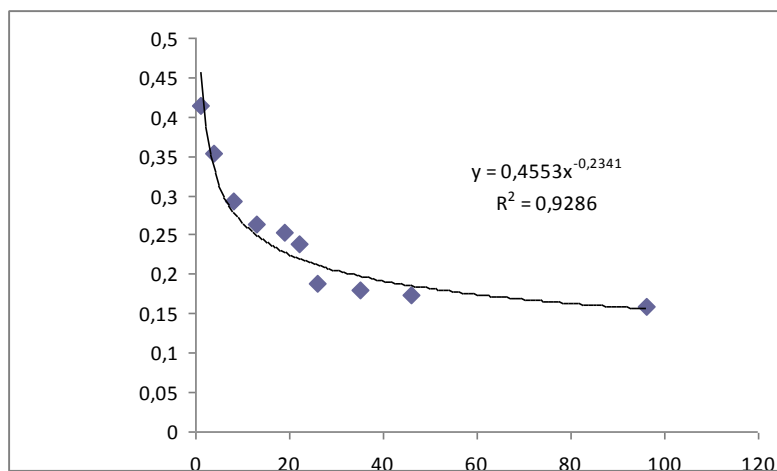
Σχήμα 29: Αποσυνέλιξη στο φάσμα 35^{ης} ημέρας



Σχήμα 30: Αποσυνέλιξη στο φάσμα 46^{ης} ημέρας



Σχήμα 31: Αποσυνέλιξη στο φάσμα 96^{ης} ημέρας



Σχήμα 32: Διάγραμμα του λόγου του εμβαδού της κορυφής στα 1734cm^{-1} συναρτήσει των ημερών

Από το διάγραμμα του σχήματος 32 παρατηρούμε ότι ο λόγος του εμβαδού της κορυφής στα 1734cm^{-1} προς το άθροισμα των εμβαδών των επιμέρους κορυφών, ελαττώνεται με την πάροδο των ημερών. Πιο συγκεκριμένα, ο λόγος αυτός, παρουσιάζει έντονη μείωση από την 1^η έως την 30^η ημέρα περίπου, ενώ στη συνέχεια παραμένει σχεδόν σταθερός. Αυτό υποδηλώνει ότι το IBA ελευθερώνεται για περίπου 30 ημέρες.

5.5. Μελέτη διαλυτότητας με φασματοφωτομετρία UV-Vis

Το πείραμα διαλυτότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Higuchi & Connors. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν διαλύματα 10mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH = 3) της β -CD, με συγκεντρώσεις 0.88 10^{-3} , 1.76 10^{-3} , 1.79 10^{-3} , 2.64 10^{-3} , και 3.52 10^{-3} M, αντίστοιχα. Στη συνέχεια προστέθηκε περίσσεια IBA (15 mg), στο κάθε διάλυμα και τα μίγματα τοποθετήθηκαν σε shaker (200 rpm), σε θερμοκρασία δωματίου, για χρονικό διάστημα 48h, προκειμένου να αποκατασταθεί η ισορροπία της αντίδρασης. Τέλος, τα διαλύματα διηθήθηκαν υπό κενό, με ηθμό 0.45 μ m PTFE και λήφθηκε το φάσμα απορρόφησής τους, με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

Με αντίστοιχη διαδικασία προετοιμάστηκαν και σε pH = 5.3 τα διαλύματα 4.4 10^{-4} , 8.8 10^{-4} , 1.76 10^{-3} , 2.64 10^{-3} , 3.52 10^{-3} M β -CD στα οποία προστέθηκε περίσσεια IBA (15 mg).

Η αποτίμηση των φασμάτων υπεριώδους-ορατού των συμπλόκων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με την εύρεση του μήκους κύματος της κάθε κορυφής και την αντίστοιχη απορρόφηση A, η οποία χρησιμοποιήθηκε στον τύπο Lambert-Beer και κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς.

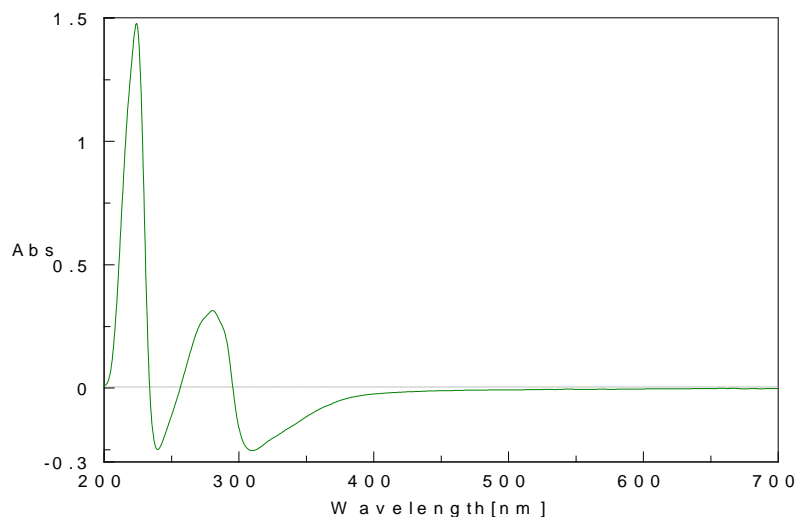
$$A = \epsilon c d \text{ (Νόμος Lambert-Beer)}$$

A = απορρόφηση στο λ_{\max}

ϵ = μοριακός συντελεστής απορρόφησης ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

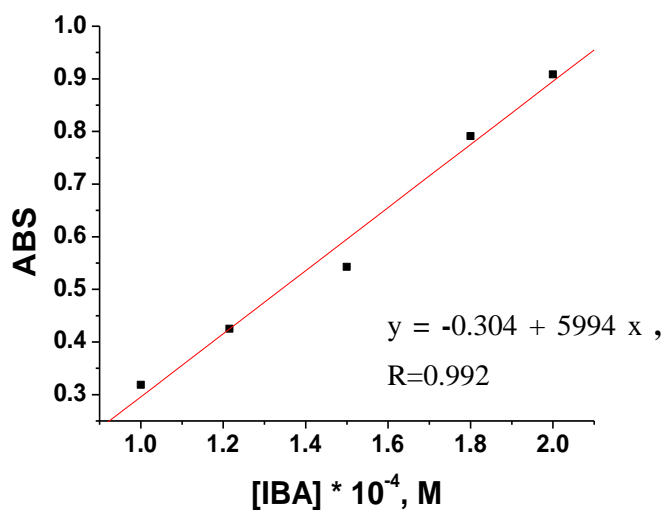
c = συγκέντρωση ουσίας στο διάλυμα (M)

d = μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας στην κυβελίδα (cm)



Σχήμα 33: Φάσμα UV-Vis του IBA σε διαλύτη MeOH.

Η καμπύλη αναφοράς του IBA παρασκευάστηκε από διαλύματα IBA γνωστής συγκέντρωσης (10^{-4} , $1.2 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $1.8 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$ M)

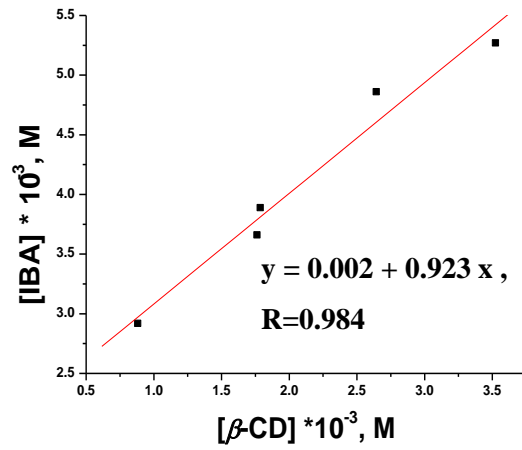


Σχήμα 34: Καμπύλη αναφοράς του IBA

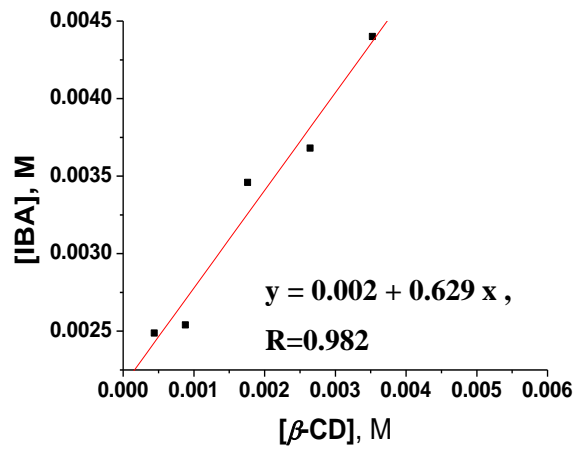
σε διαλύτη μεθανόλη μετρώντας την απορρόφηση στο $\lambda_{\max}=281\text{nm}$ και από την εξίσωση της ευθείας :

$$y = -0.304 + 5994 x,$$

υπολογίσθηκαν οι συγκεντρώσεις του IBA στα διαλύματα και κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα του σχήματος 35,

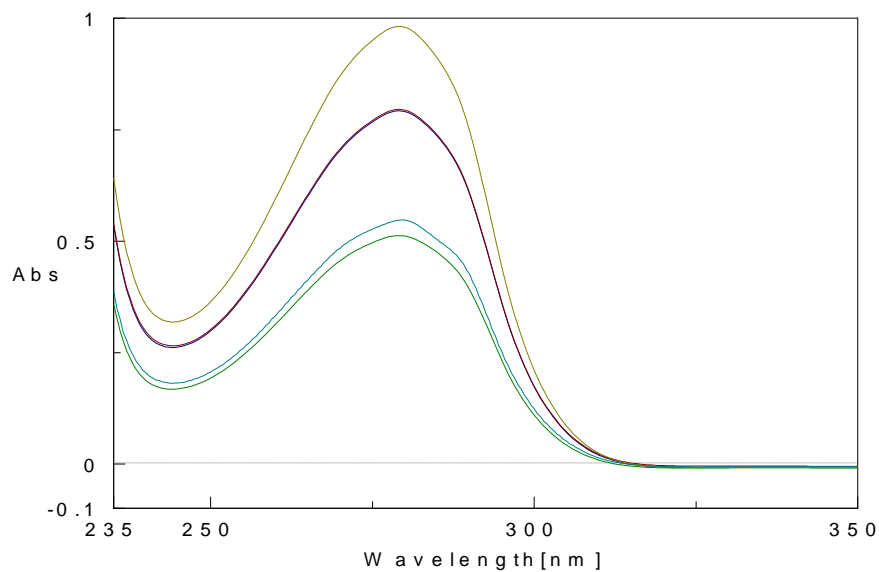


(α)



(β)

Σχήμα 35: Διάγραμμα διαλυτότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο Higuchi & Connors
(α) pH = 3 και β) σε pH = 5,3.



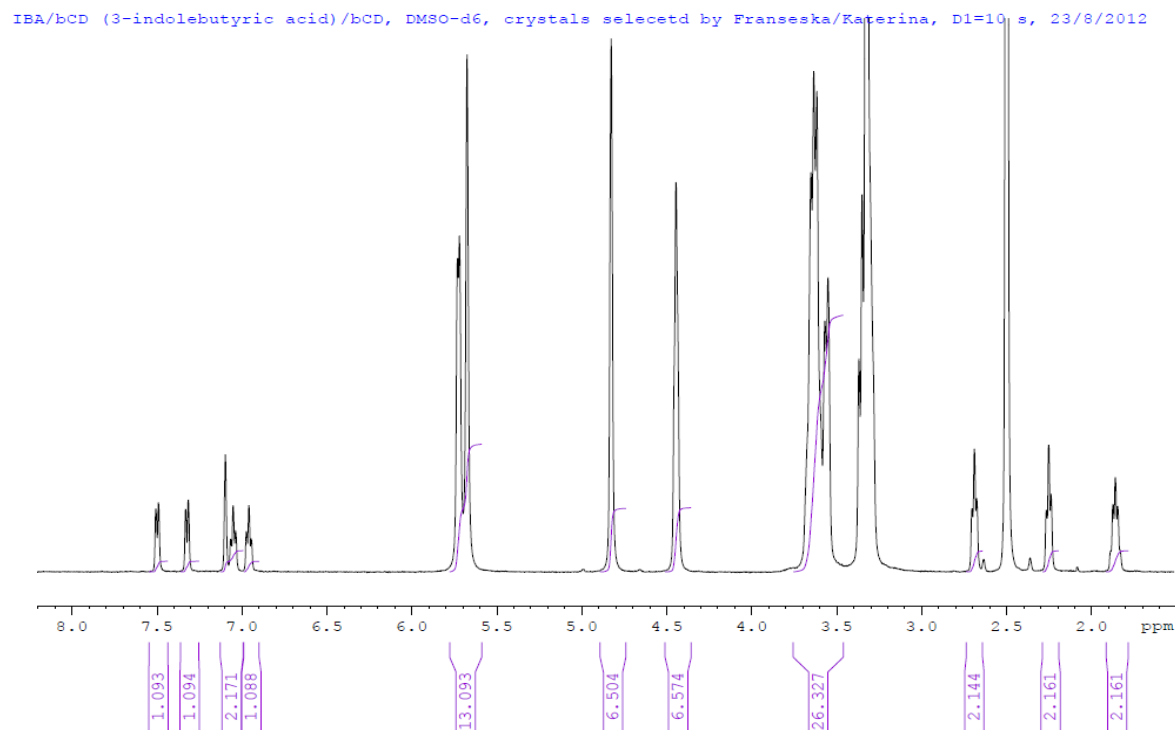
Σχήμα 36: Φάσματα UV-Vis του IBA με αυξανόμενες ποσότητες β-CD.

Από το Σχήμα 36 παρατηρούμε ότι παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων β-κυκλοδεξτρίνης αυξάνεται και η ποσότητα του IBA στο διάλυμα. Ενισχύεται δηλαδή η διαλυτότητα του ξενιζόμενου μορίου-IBA στο νερό.

Από την εξίσωση 2 υπολογίσθηκε η σταθερά συμπλοκοποίησης $K_{1:1} = 5985 \text{ M}^{-1}$ σε $\text{pH} = 3$ ενώ σε $\text{pH} = 5.2$ η τιμή της σταθεράς συμπλοκοποίησης φθάνει την $K_{1:1} = 792 \text{ M}^{-1}$.

5.6. Μελέτη του του συμπλόκου IBA/β-CD με φασματοσκοπία ^1H NMR

Προκειμένου να ληφθεί το φάσμα ^1H NMR του σχήματος 37, πραγματοποιήθηκε η κρυστάλλωση και επελέγησαν, με ειδική θηλιιά, αποκλειστικά κρύσταλλοι συμπλόκου, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Αυτοί τοποθετήθηκαν σε ανοικτό δοχείο μέχρις ότου εξατμιστεί το μητρικό υγρό και έπειτα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε διαλύτη διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO).



Σχήμα 37: Φάσμα ^1H NMR του συμπλόκου IBA/β-CD σε διαλύτη DMSO.

Παρατηρούμε από το φάσμα του 'σχήματος 37' ότι τα υδρογόνα της β-κυκλοδεξτρίνης βρίσκονται στην περιοχή 3-6ppm ενώ γύρω στα 7,5ppm σχάζονται τα αρωματικά υδρογόνα του IBA. Τέλος, τα αλειφατικά υδρογόνα της βουτυρικής αλυσίδας εμφανίζονται στο εύρος 1,8 – 2,8 ppm. Η ολοκλήρωση των κορυφών στο φάσμα $^1\text{H NMR}$ έδειξε την αναλογία $\text{IBA}/\beta\text{-CD} = 1/0.85$, δηλαδή κοντά στο 1:1, σε διάλυμα DMSO. (Ali et al., 2006), (Pessime, F. *et al.*, 2012).

6. Εφαρμογή του προϊόντος εγκλεισμού σε σπέρματα του είδους *Zoysia japonica*

Η ταχύτητα βλάστησης ιδιαίτερα σε μη ιδανικές συνθήκες αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για τη χρήση μιας εμπορικής ποικιλίας. Για την αξιολόγηση της επίδρασης του IBA και του εγκλεισμού του στη βλαστικότητα σπερμάτων εμπορικών ειδών, έγινε εφαρμογή σε σπέρματα είδους που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία χλοοτάπητα.

Για την προώθηση της βλάστησης των σπερμάτων, εξετάστηκε η εξωγενής εφαρμογή του IBA σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις 25 και 50 ppm και εγκλεισμένων των ιδίων συγκεντρώσεων σε β-κυκλοδεξτρίνη (Salminen et al., 1990b). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν σπέρματα χωρίς καμιά προμεταχείριση. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι επεμβάσεις:

Πίνακας 4. Επεμβάσεις που εφαρμόστηκαν για την εξέταση της επίδρασης εγκλεισμένης και μη αυξίνης στη βλάστηση των σπερμάτων της ποικιλίας Zenith®

Επέμβαση	Ποσότητες
Μάρτυρας	Control
Νερό απιονισμένο	Water
25 ppm ορμόνης IBA	$1.25 \cdot 10^{-4}$ M (IBA ₁)
25 ppm ορμόνης IBA + β-κυκλοδεξτρίνη	$1.25 \cdot 10^{-4}$ M + $2.5 \cdot 10^{-4}$ M (IBA ₁ +CD ₁)
β-κυκλοδεξτρίνη	$2.5 \cdot 10^{-4}$ M (CD ₁)
50 ppm ορμόνης IBA	$2.5 \cdot 10^{-4}$ M (IBA ₂)
50 ppm ορμόνης IBA και β-κυκλοδεξτρίνη	$2.5 \cdot 10^{-4}$ M + $5 \cdot 10^{-4}$ M (IBA ₂ +CD ₂)
β-κυκλοδεξτρίνη	$5 \cdot 10^{-4}$ M (CD ₂)

Το pH των διαλυμάτων και του απιονισμένου νερού που χρησιμοποιήθηκαν ως επεμβάσεις μετρήθηκε όπως φαίνεται στον Πίνακα 5:

Πίνακας 5: Μέτρηση pH των επεμβάσεων που εφαρμόστηκαν σε σπέρματα της ποικιλίας Zenith®

Επέμβαση	pH
Νερό απιονισμένο	5,34
IBA ₁	5,21
IBA ₂	5,08
IBA _A	5,24
IBA _B	5,19
CD _A	5,45
CD _B	5,41

Εξαιτίας της χαμηλής τιμής του pH, προηγήθηκαν δοκιμαστικά πειράματα με ρύθμιση αυτού και μη ώστε να εξεταστεί πιθανή επίδραση του στη βλαστικότητα. Επίσης πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικά πειράματα για να εξεταστεί ο χρόνος παραμονής των σπερμάτων στα διαλύματα (12 ή 24h) και πιθανή επίδραση αυτού στη βλαστικότητα. Από τα προπειράματα φάνηκε ότι ούτε η τιμή του pH, ούτε ο χρόνος παραμονής επηρέασαν τη βλαστικότητα σπερμάτων του είδους.

6.1. Συνθήκες βλάστησης

Ο έλεγχος βλάστησης πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, υπό $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ φως φθορισμού, με φωτοπερίοδο 16/8 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασία ημέρας $30 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ και νύχτας $16 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, για το πείραμα σε ιδανικές συνθήκες. Εξετάστηκε επίσης η επίδραση των παραπάνω προμεταχειρίσεων όταν οι συνθήκες βλάστησης ήταν $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ φως φθορισμού, με φωτοπερίοδο 12/12 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασία σταθερή $24 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, οι οποίες θεωρούνται μη ιδανικές για τη βλάστηση του είδους.

6.2. Απολύμανση σπερμάτων

Για την αποφυγή μυκητολογικών προσβολών πραγματοποιήθηκε απολύμανση με 20% υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου με προσθήκη τριών σταγόνων προσκολλητικής ουσίας Tween-20 ανά 100 mL διαλύματος απολύμανσης και οι χρόνοι παραμονής των σπερμάτων στο διάλυμα ήταν 10 min. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα των σπερμάτων με αποστειρωμένο νερό.

6.3. Εγκατάσταση πειραμάτων ελέγχου βλάστησης

Ο έλεγχος της βλαστικότητας των σπερμάτων, πραγματοποιήθηκε με νερό βρύσης, αφού είχε προηγηθεί απολύμανση και εμβάπτιση των σπερμάτων –εκτός του μάρτυρα- στα διαλύματα των επεμβάσεων που περιγράφονται στον Πίνακα 4, για 24h. Για κάθε επέμβαση και αφού είχε προηγηθεί ξεπλύμα, τοποθετήθηκαν 50 σπέρματα σε διηθητικό χαρτί ανά τριβλίο και σε κάθε πειραματική επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα τριβλία ανά επέμβαση.

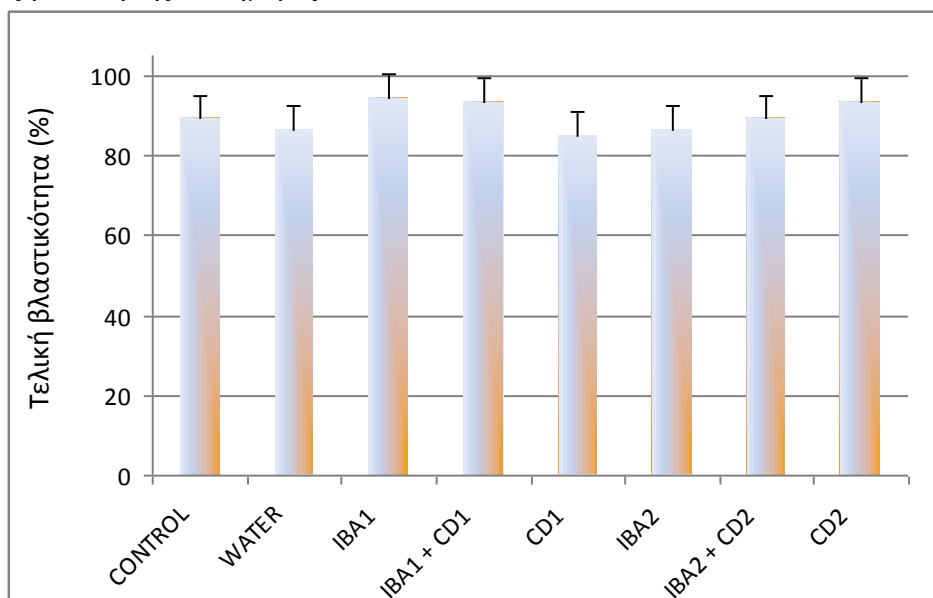
Κατά τη διάρκεια της δοκιμής βλαστικότητας γινόταν προσθήκη 0,5 mL νερού βρύσης εντός των τριβλίων όταν αυτό κρινόταν απαραίτητο, ώστε το υπόστρωμα βλάστησης να παραμένει υγρό καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Στο τέλος των 21 ημερών υπολογίστηκαν η συνολική βλαστικότητα και ο ρυθμός βλάστησης των σπερμάτων (% d⁻¹).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°

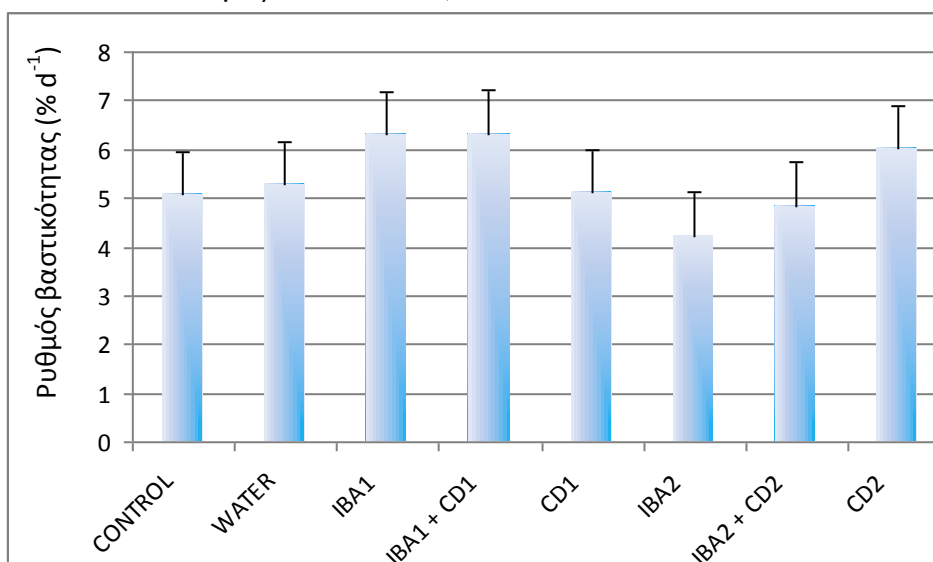
6.3.1. Πειράματα ελέγχου βλαστικότητας σε ιδανικές για την ποικιλία συνθήκες

Συνθήκες βλάστησης: $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ φως φθορισμού, φωτοπερίοδος 16/8 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασία ημέρας $30 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ και νύχτας $16 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$

Χρόνος βλάστησης: 21 ημέρες



Σχήμα 38: Βλαστικότητα σπερμάτων του γένους *Zoysia* cv. *Zenith*[®] σε $\theta=25^\circ\text{C}$ (Control = μάρτυρας, Water = εμβάπτιση σε νερό, IBA₁= διάλυμα IBA $1.25 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₁+ CD₁= διάλυμα συμπλόκου $1.25 \cdot 10^{-4}$ M + $2.5 \cdot 10^{-4}$ M , CD₁= διάλυμα β -CD $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₂= διάλυμα IBA $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₂+ CD₂= διάλυμα συμπλόκου $2.5 \cdot 10^{-4}$ M + $5 \cdot 10^{-4}$ M, CD₂= διάλυμα β -CD $5 \cdot 10^{-4}$ M).

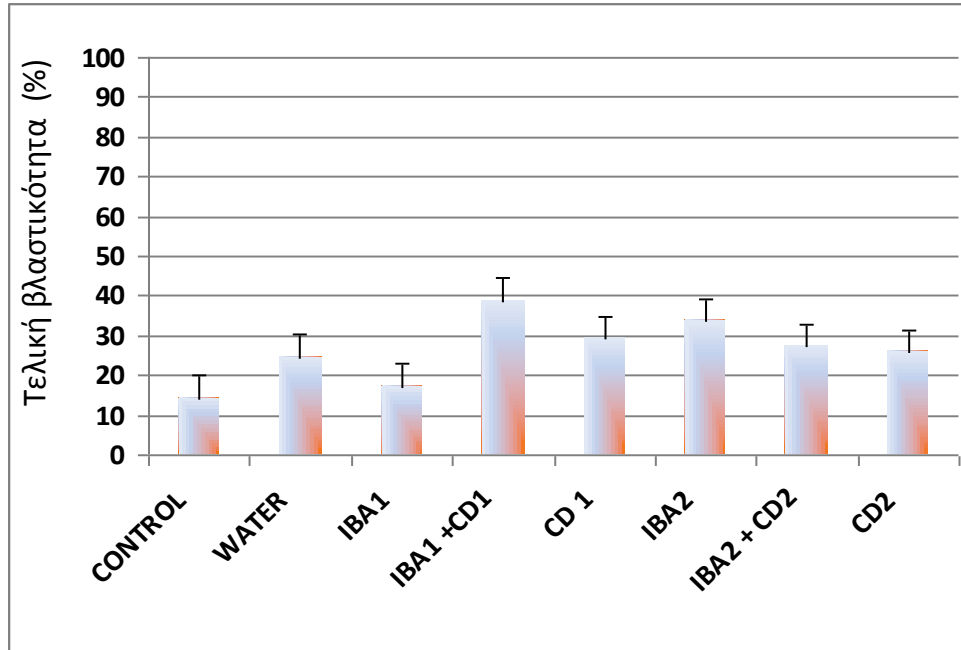


Σχήμα 39: Ρυθμός βλάστησης σπερμάτων του γένους *Zoysia* cv. *Zenith*[®] σε $\theta=25^\circ\text{C}$ (Control = μάρτυρας, Water = εμβάπτιση σε νερό, IBA₁= διάλυμα IBA $1.25 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₁+ CD₁= διάλυμα συμπλόκου $1.25 \cdot 10^{-4}$ M + $2.5 \cdot 10^{-4}$ M , CD₁= διάλυμα β -CD $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₂= διάλυμα IBA $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₂+ CD₂= διάλυμα συμπλόκου $2.5 \cdot 10^{-4}$ M + $5 \cdot 10^{-4}$ M, CD₂= διάλυμα β -CD $5 \cdot 10^{-4}$ M).

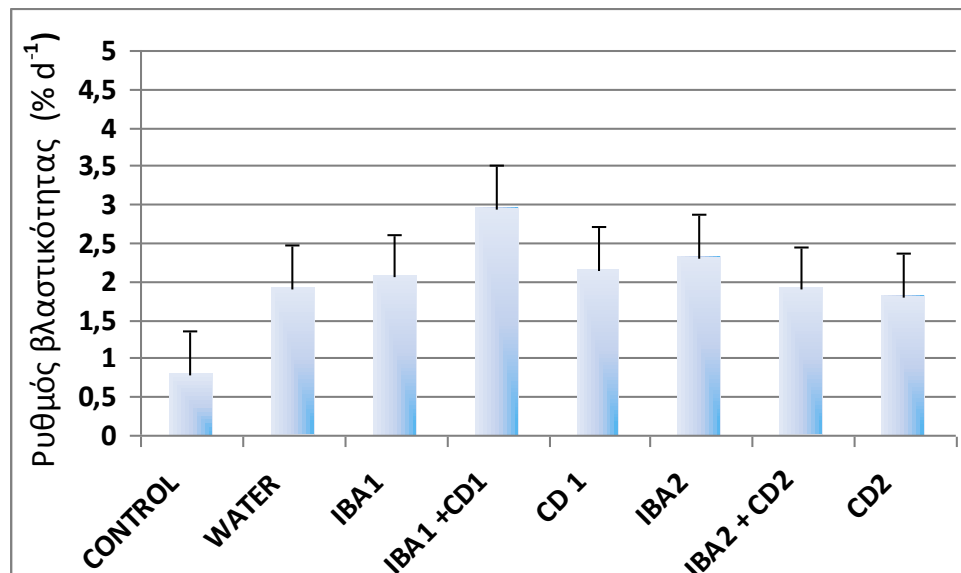
6.3.2. Πειράματα ελέγχου βλαστικότητας σε μη ιδανικές για την ποικιλία συνθήκες

Συνθήκες βλάστησης των σπερμάτων: $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ φως φθορισμού, φωτοπερίοδος 12/12 h φως/σκοτάδι και θερμοκρασία σταθερή $24 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ 25°C

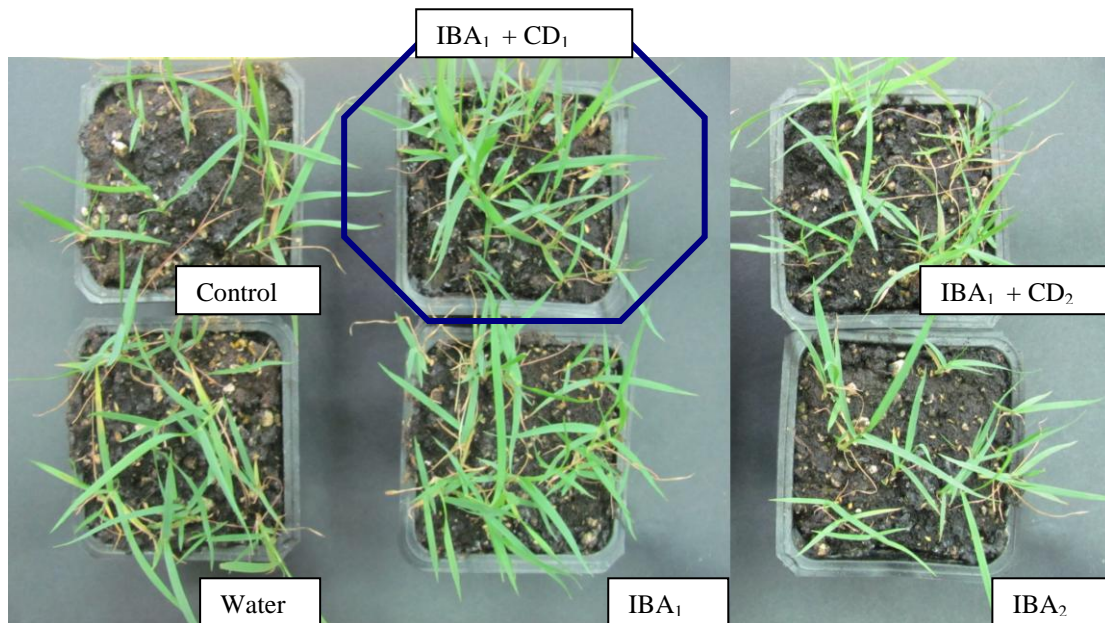
Χρόνος βλάστησης: 21 ημέρες



Σχήμα 40: Βλαστικότητα σπερμάτων του γένους *Zoysia* cv. *Zenith*[®] σε $\theta=25^\circ\text{C}$ (Control = μάρτυρας, Water = εμβάπτιση σε νερό, IBA₁= διάλυμα IBA $1.25 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₁+ CD₁= διάλυμα συμπλόκου $1.25 \cdot 10^{-4}$ M + $2.5 \cdot 10^{-4}$ M , CD₁= διάλυμα β-CD $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₂= διάλυμα IBA $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₂ + CD₂= διάλυμα συμπλόκου $2.5 \cdot 10^{-4}$ M + $5 \cdot 10^{-4}$ M, CD₂= διάλυμα β-CD $5 \cdot 10^{-4}$ M).



Σχήμα 41: Ρυθμός βλάστησης σπερμάτων του γένους *Zoysia* cv. *Zenith*[®] σε $\theta=25^\circ\text{C}$ (Control = μάρτυρας, Water = εμβάπτιση σε νερό, IBA₁= διάλυμα IBA $1.25 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₁+ CD₁= διάλυμα συμπλόκου $1.25 \cdot 10^{-4}$ M + $2.5 \cdot 10^{-4}$ M , CD₁= διάλυμα β-CD $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₂= διάλυμα IBA $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, IBA₂ + CD₂= διάλυμα συμπλόκου $2.5 \cdot 10^{-4}$ M + $5 \cdot 10^{-4}$ M, CD₂= διάλυμα β-CD $5 \cdot 10^{-4}$ M).



Σχήμα 42: Φυτά που προέκυψαν από σπορά προμεταχειρισμένων σπερμάτων (Control = μάρτυρας, Water = εμβάπτιση σε νερό, IBA₁= διάλυμα IBA 1.25 10⁻⁴ M, IBA₁+ CD₁= διάλυμα συμπλόκου 1.25 10⁻⁴ M + 2.5 10⁻⁴ M , CD₁= διάλυμα β-CD 2.5 10⁻⁴ M, IBA₂= διάλυμα IBA 2.5 10⁻⁴ M, IBA₂+ CD₂= διάλυμα συμπλόκου 2.5 10⁻⁴ M + 5 10⁻⁴M, CD₂= διάλυμα β-CD 5 10⁻⁴M).

Στο Σχήμα 38 απεικονίζεται η τελική βλαστικότητα των σπερμάτων του γένους *Zoysia* σε ιδανικές για το πείραμα συνθήκες, μετά από προμεταχείριση για 24h με διαλύματα του πίνακα 4. Φαίνεται ότι η χρήση 25ppm του IBA ή 25ppm του προϊόντος εγκλεισμού του IBA αύξησε οριακά το τελικό ποσοστό βλάστησης των σπερμάτων (Σχήμα 38), χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι σημαντική.

Σημαντικά αυξημένος εμφανίστηκε ο ρυθμός βλάστησης των σπερμάτων στις επεμβάσεις με IBA₁ και IBA₁+CD₁ σε σύγκριση με το μάρτυρα (Σχήμα 39). Χαρακτηριστική ήταν η ελάττωση του ρυθμού βλάστησης στη μεταχείριση IBA₂, υποδεικνύοντας πιθανή παρεμπόδιση της συγκέντρωσης 50ppm στη βλάστηση.

Στο Σχήμα 40 εμφανίζεται αύξηση της τελικής βλαστικότητας από την επίδραση με της προμεταχείρισης IBA₁ + CD₁. Με εξαίρεση την επέμβαση IBA₁, όλες οι προμεταχειρίσεις αύξησαν την τελική βλαστικότητα των σπερμάτων, όταν η δοκιμή πραγματοποιήθηκε σε μη ιδανικές συνθήκες, αν και σε καμιά επέμβαση το ποσοστό βλαστικότητας δεν έφτασε το 50%.

Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο ρυθμό βλάστησης (Σχήμα 41), με αύξηση αυτού σε όλες τις προμεταχειρίσεις με το μεγαλύτερο ρυθμό βλάστησης να εμφανίζεται σε σπέρματα που είχαν δεχθεί την επίδραση του IBA₁ + CD₁ (Τσαγκαροπούλου. Σ., 2012).

Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία παρασκευάστηκε και μελετήθηκε το προϊόν εγκλεισμού β -CD/IBA τόσο σε στερεή κατάσταση όσο και σε μορφή διαλύματος. Αρχικά το σύμπλοκο αυτό μελετήθηκε και χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία FT-IR τόσο στη στερεή όσο και στην κρυσταλλική κατάσταση, και δομικά με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X σε μονοκρυστάλλο. Από τη μελέτη του συμπλόκου με φασματοσκοπία FT-IR επιβεβαιώθηκε ο εγκλεισμός με αποτίμηση των φασμάτων του IBA, της β -CD, του μίγματος των προαναφερθέντων και του προϊόντος εγκλεισμού IBA/ β -CD. Απόδειξη αυτού του εγκλεισμού φαίνεται να είναι μια κορυφή στο φάσμα του συμπλόκου στα 1734 cm^{-1} η οποία εμφανίζεται ως ώμος και υποδηλώνει την αλληλεπίδραση μεταξύ του IBA και της β -CD. Εκτός από τον εγκλεισμό, ελέγχθηκε και η πιθανή βραδεία αποδέσμευση του IBA από την υδρόφοβη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης με μια σταδιακή διαδικασία λήψης φασμάτων FT-IR για ένα χρονικό διάστημα 148 ημερών από την παρασκευή του συμπλόκου. Με αποσυνέλιξη της περιοχής $1700\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ των φασμάτων φάνηκε λοιπόν ότι εξασθενούν οι διαμοριακές δυνάμεις με την πάροδο των ημερών και πιο συγκεκριμένα ο λόγος του εμβαδού της κορυφής-ώμου στα 1734cm^{-1} προς το άθροισμα των εμβαδών των επιμέρους κορυφών της περιοχής $1700\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ μετά την αποσυνέλιξη. Βρέθηκε τελικά μία σταδιακή ελάττωση του λόγου αυτού για τις πρώτες 30 ημέρες, ενώ από την 30^η-148^η ημέρα, ο ίδιος λόγος, παραμένει σχεδόν σταθερός.

Το φάσμα FT-IR που λήφθηκε από μονοκρυστάλλους του συμπλόκου παρουσιάζει ομοιότητα 55% σε σχέση με το προϊόν εγκλεισμού που παρασκευάστηκε με συγκαταβύθιση. Αυτό πιθανότατα είναι ένδειξη κάποια διαφοράς στην αναλογία β -CD/IBA μεταξύ της στερεής και της κρυσταλλικής κατάστασης του συμπλόκου. Το γεγονός αυτό ίσως να απορρέει από τη διαδικασία παρασκευής των συμπλόκων σε στερεά κατάσταση. Από τη μία πλευρά, η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αργής ψύξης και οι κρύσταλλοι σχηματίστηκαν σε χρονικό διάστημα 7 ημερών ενώ στην συγκαταβύθιση η ψύξη είναι ακαριαία. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X έδωσε πληροφορίες για τις ατομικές θέσεις μέσα στον κρύσταλλο και απέδειξε πως ένα μόριο IBA μπορεί να βρίσκεται μέσα στην κοιλότητα του διμερούς με αναλογία ξενιστή/ξενιζομένου 2/1. Κατά τη κρυσταλλική μοριακή διευθέτηση τα διμερή που σχηματίζονται από τις β -CD, διευθετούνται σε στρώσεις κατά τον άξονα c και παράλληλα στο άξονα b της

μοναδιαίας κυψελίδας. Τα διμερή διευθετούνται κατά τέτοιον τρόπο ώστε να σχηματίζουν αυλούς κάθετα στο επίπεδο *ab*. Από την άλλη πλευρά, η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ σε κρυστάλλους που διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO, υπέδειξε μία αναλογία 1/1. Αυτό σημαίνει ότι το διμερές 2/1 είναι αποτέλεσμα της μοριακής διευθέτησης στον κρύσταλλο ενώ στο διάλυμα η αναλογία είναι 1/1, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα διαλυτότητας αφού υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ IBA και β -CD, σύμφωνα με τους Higuchi-Connors. Από τη φασματοφωτομετρία UV-Vis φαίνεται ότι με αυξανόμενες ποσότητες β -CD αυξάνεται και η συγκέντρωση του IBA στο διάλυμα και η σταθερά σύνδεσης μεταξύ των δύο υπολογίστηκε σε $\text{pH} = 3$ και σε $\text{pH} = 5.3$ ίση με 5985 M^{-1} και 792 M^{-1} αντίστοιχα. Η σημαντική αυτή διαφορά στις σταθερές σύνδεσης πιθανόν να αποδίδεται στο γεγονός ότι το IBA σε $\text{pH} 3$ βρίσκεται στην πρωτονιωμένη μορφή του ($\text{pK}_a = 4.7$), ενώ σε $\text{pH} 5.3$ υπερισχύει η αποπρωτονιωμένη μορφή του IBA. Έχει βρεθεί λοιπόν ότι η β -CD δημιουργεί πιο σταθερά σύμπλοκα με την αδιάστατη μορφή των οξέων σε σχέση με τα αποπρωτονιωμένα οξέα (Csernak, O., 2008) Η σταθερά σύνδεσης είναι αρκετά υψηλή και γι' αυτό το σύμπλοκο εφαρμόστηκε σε πειράματα ελέγχου βλαστικότητας σε σπόρους του είδους *Zoysia japonica* cv Zenith[®] προκειμένου να ελεγχθεί η δράση του αφού ο λόγος $[\text{IBAcomplexed}] \geq 20\% [\text{IBAUncomplexed}]$.

Βρέθηκε λοιπόν ότι σε ιδανικές για το είδος συνθήκες, η χρήση του IBA (25 ppm) και του προϊόντος εγκλεισμού του IBA (25 ppm) με β -CD αύξησε οριακά το τελικό ποσοστό βλάστησης των σπερμάτων. Αντίθετα, σε μη ιδανικές συνθήκες, παρατηρείται σημαντική αύξηση της τελικής βλαστικότητας αλλά και του ρυθμού βλαστικότητας μετά από προμεταχείριση των σπερμάτων με διάλυμα του συμπλόκου IBA 25ppm με β -CD 50ppm. Η παρατήρηση αυτή πιθανόν υποδεικνύει μία αργή αποδέσμευση του IBA από την κοιλότητα της β -CD κατά τη διάρκεια των 21ημερών και επομένως η αυξίνη προάγει καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος τη βλαστικότητα σε μη ιδανικές συνθήκες βλάστησης, όπως περιγράφηκε και από τις μελέτες FT-IR σε ότι αφορά τον απεγκλωβισμό.

Σημαντική μπορεί επίσης είναι η παρατήρηση ότι η εμφάνιση σε β -CD, σε συγκεντρώσεις $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ και $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της βλαστικότητας καθώς και του ρυθμού βλάστησης των σπερμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε αντίθεση με την παρατήρηση των Salminen et al. (1990), οι οποίοι

αναφέρουν παρεμπόδιση στη βλάστηση σπερμάτων κριθαριού που είχαν προμεταχειριστεί σε υδατικό διάλυμα 1% β -CD.

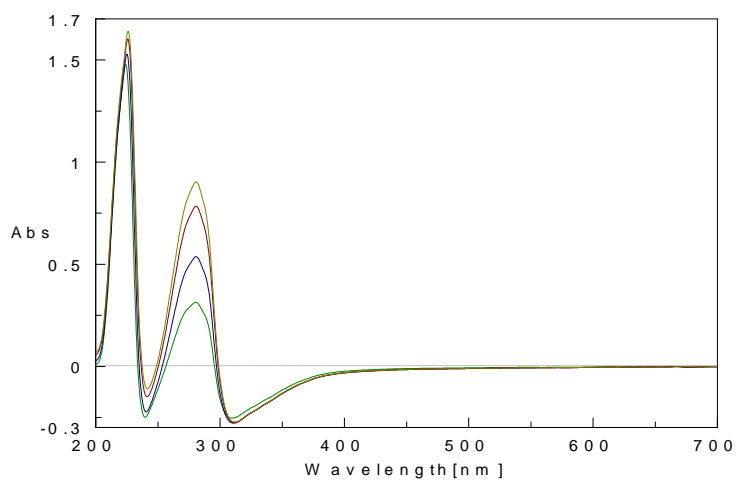
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ali, S.M., Maheshwari, A., Asmat, F., and Koketsu, M. (2006). Complexation of enalapril maleate with β -cyclodextrin: NMR spectroscopic study in solution. *Química Nova* 29, 685 – 688.
- Al-Sou'od, K. (2008). Investigation of the Hydrocortisone- β -Cyclodextrin Complex by Phase Solubility Method: Some Theoretical and Practical Considerations. *Journal of Solution Chemistry* 37, 119–133.
- Bar, R., and Ulitzur, S. (1994). Bacterial toxicity of cyclodextrins: Luminous *Escherichia coli* as a model. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41, 574–577.
- Bari, R., and Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69, 473–488.
- Carrier, R.L., Miller, L.A., and Ahmed, I. (2007). The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release* 123, 78 – 99.
- Csernak, O. (2008). The effect of protonation on the stability of cyclodextrin inclusion complexes, Summary.
- Dodziuk, H., Sitkowski, J., Stefaniak, L., Sybilska, D., and Jurczak, J. (1996). Structure of cyclodextrins and their complexes. Part 5.1 The NMR observation of separate signals of host and guest pertaining to 1 : 1 and 1 : 2 complexes of acenaphthene with β -cyclodextrin. *Supramolecular Chemistry* 7, 33–35.
- Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* (1999). 32, 837–838.
- Fuller, M.P., and Griffiths, P.R. (1978). Diffuse reflectance measurements by infrared Fourier transform spectrometry. *Analytical Chemistry* 50, 1906–1910.
- K. Fourtaka, E. Christoforides, D. Mentzafos, C. Pappas, A. E. Nikolopoulou, S. Tsagaropoulou and K. Bethanis (2012) Inclusion compound of IBA in β -cyclodextrin. Preparation, characterization, crystal structure determination and application in plant seeds and vegetative material. 6th Hellenic Crystallography Association Meeting, Athens 2012
- K. Bethanis, P. Giastas, T. Thireou and V. Atlamazoglou (2010). *Handbook of Research on Biocomputation and Biomedical Informatics: Case Studies and Applications* Chapter 18: “Macromolecular crystallographic computing” Editor: Athina Lazakidou, Publishers: Medical Information Science Reference, , ISBN: 978-1-60566-768-3
- Li, S., and Purdy, W.C. (1992). Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. *Chemical Reviews* 92, 1457–1470.
- Liu, L., and Guo, Q.-X. (2002). The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 42, 1–14.

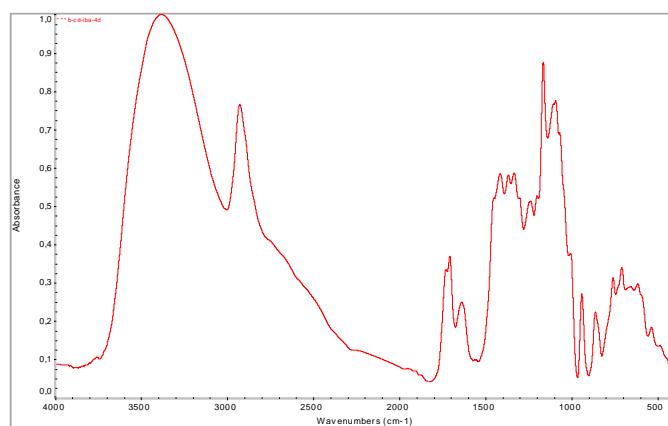
- Liu, X., Barkawi, L., Gardner, G., and Cohen, J.D. (2012). Transport of Indole-3-Butyric Acid and Indole-3-Acetic Acid in Arabidopsis Hypocotyls Using Stable Isotope Labeling. *Plant Physiology* 158, 1988–2000.
- Loftsson, T., and Masson, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *International Journal of Pharmaceutics* 225, 15 – 30.
- Loftsson, T., and Stefánsson, E. (2002). Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 80, 144–150.
- Longer D.E., Ph.D; Oosterhuis, Ph.D; and Nanayakkara R. (2001). Growth Hormones can affect seedling growth. -*Research-Golf Course Management*.
- Lu, Z., Cheng, B., Hu, Y., Zhang, Y., and Zou, G. (2009). Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. *Food Chemistry* 113, 17 – 20.
- Ludwig-Müller, J. (2000). Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 32, 219–230.
- Marques, H.M.C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 313–326.
- Mercury: visualization and analysis of crystal structures C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler and J. van de Streek. (2006). *J. Appl. Cryst.*, 39, 453-457,
- Pappas, C., Tarantilis, P.A., and Polissiou, M. (1998). Determination of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Lignin in Crude Plant Material Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 52, 1399–1402.
- Ramusino, M.C., and Pichini, S. (1994). A ¹H NMR study of inclusion complex formation between β -cyclodextrin and monohydroxypyridines. *Carbohydrate Research* 259, 13 – 19.
- Rashotte, A.M., Poupart, J., Waddell, C.S., and Muday, G.K. (2003). Transport of the Two Natural Auxins, Indole-3-Butyric Acid and Indole-3-Acetic Acid, in Arabidopsis. *Plant Physiology* 133, 761–772.
- Salminen, L., Uosukainen, M., Mattsson, P., and Korpela, T. (1990a). Action of Cyclodextrins on Germinating Seeds and on Micropropagated Plants. *Starch - Stärke* 42, 350–353.
- Salminen, L., Uosukainen, M., Mattsson, P., and Korpela, T. (1990b). Action of Cyclodextrins on Germinating Seeds and on Micropropagated Plants. *Starch - Stärke* 42, 350–353.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A., and Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol* 5, 301–307.
- Sheldrick, G.M. (2008): A short history of shelx. *Acta Crystallogr. A* 64,112–122

- Szejtli, J. (1985). Cyclodextrins in Pesticides. *Starch - Stärke* 37, 382–386.
- Valle, E.M.M.D. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 39, 1033 – 1046.
- Warren, R.J., Eisdorfer, I.B., Thompson, W.E., and Zarembo, J.E. (1965). Infrared identification of indole ring in indoles and indole alkaloids in the 700 to 400 cm.⁻¹ region. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 54, 1806–1807.
- Wen, X., Tan, F., Jing, Z., and Liu, Z. (2004). Preparation and study the 1:2 inclusion complex of carvedilol with β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34, 517 – 523.
- Wiesman, Z., Markus, A., Wybraniec, S., Schwartz, L., and Wolf, D. (2002). Promotion of rooting and development of cuttings by plant growth factors formulated into a controlled-release system. *Biology and Fertility of Soils* 36, 330–334.
- Zhang, N., Li, J.-H., Cheng, Q.-T., and Zhu, M.-W. (1994). Kinetic studies on the thermal dissociation of β -cyclodextrin—benzyl alcohol inclusion complex. *Thermochimica Acta* 235, 105 – 116.
- Μάζη, Β. (2012). Σχηματισμός, Κρυσταλλογραφική μελέτη και Βιοδοκιμές του Προϊόντος Εγκλεισμού της Φυτορμόνης IBA (Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ) σε β -κυκλοδεξτρίνη.
- Σάλτας, Δ. (2012). Προσδιορισμός του Ροσμαρινικού Οξέος σε Βότανα με την Εφαρμογή της Υγρής Χρωματογραφίας, της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου και της Χημειομετρίας, Μεταπτυχιακή διατριβή.
- Τσαγκαροπούλου Σ. (2012-2013), πτυχιακή μελέτη.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC

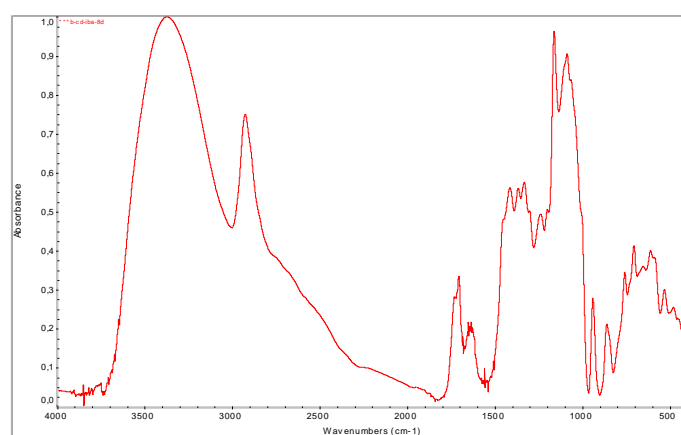
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



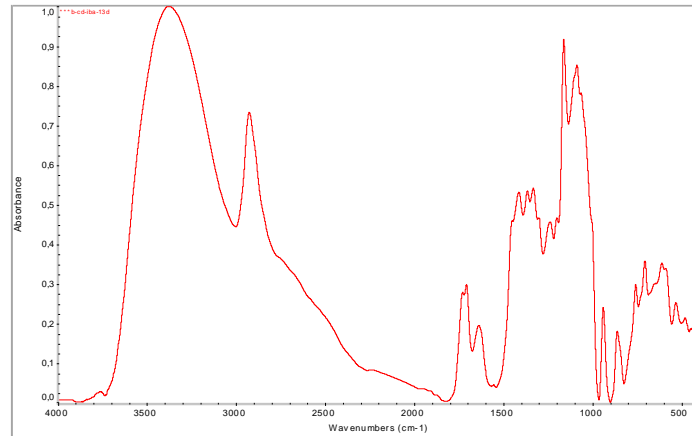
Σχήμα 43: Φάσματα UV-Vis IBA σε MeOH (καμπύλη αναφοράς).



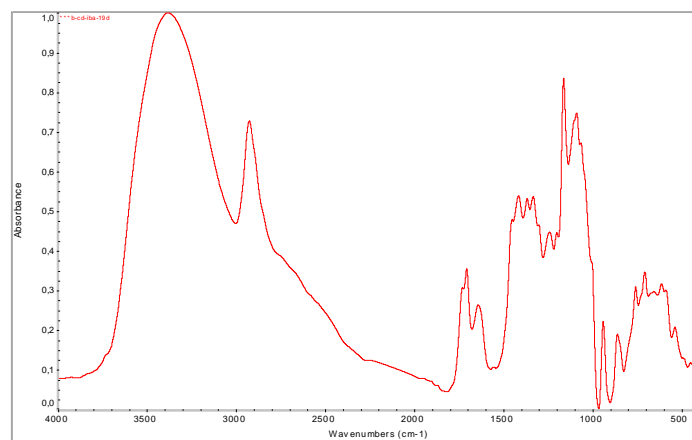
Σχήμα 44: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 4^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



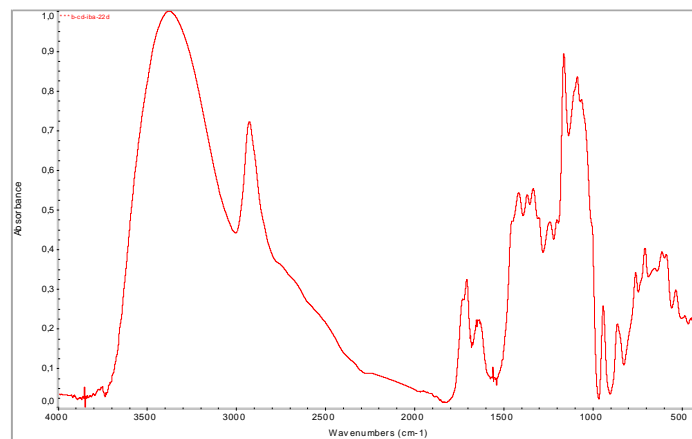
Σχήμα 45: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 8^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



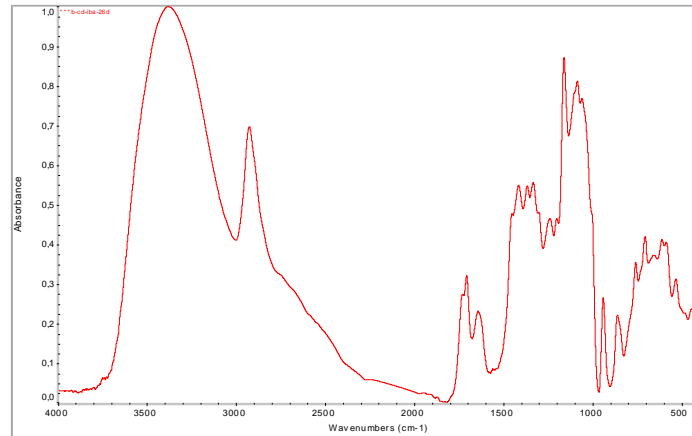
Σχήμα 46: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 13^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



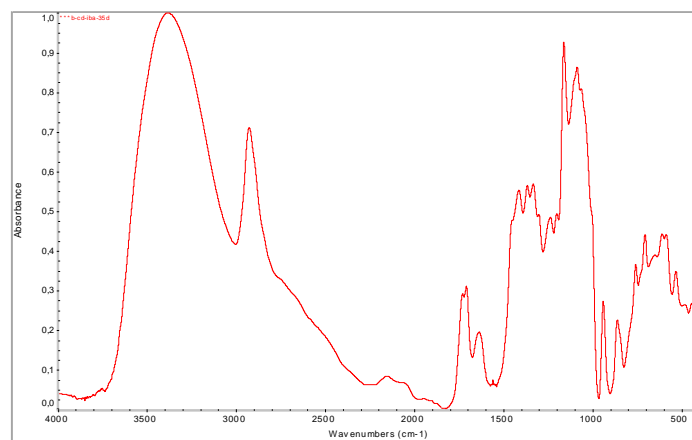
Σχήμα 47: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 19^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



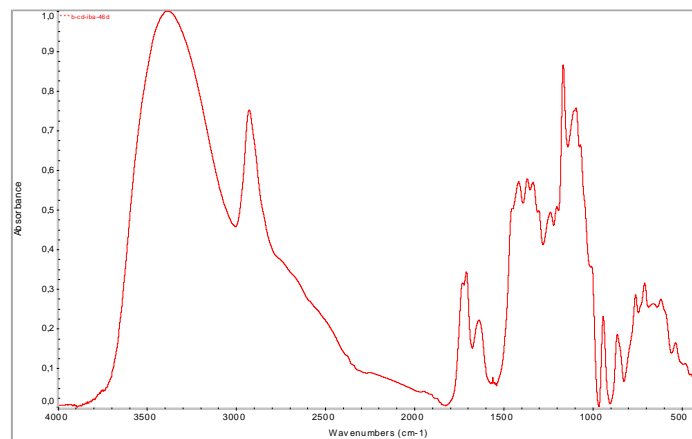
Σχήμα 48: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 22^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



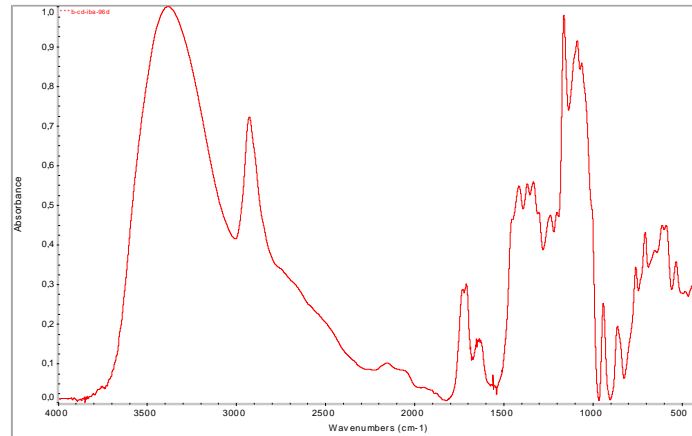
Σχήμα 49: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 26^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



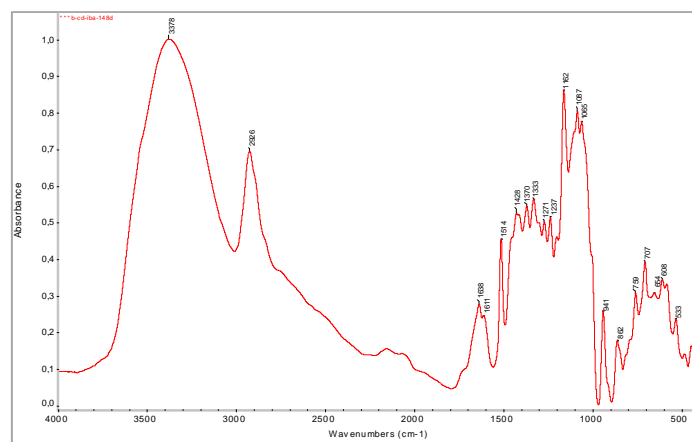
Σχήμα 50: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 36^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



Σχήμα 51: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 46^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



Σχήμα 52: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 96^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.



Σχήμα 53: Φάσμα FT-IR του προϊόντος εγκλεισμού την 148^η ημέρα μετά τη λυοφυλίωση.