



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

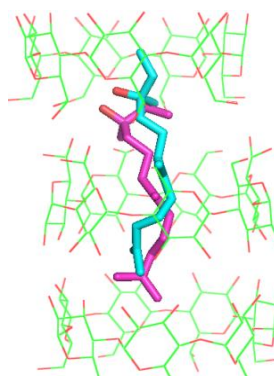
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων &

Διατροφή του Ανθρώπου»

Εργαστήριο Γεν. Χημείας

Κατεύθυνση: Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων

**« Εγκλεισμός συστατικών εκχυλίσματος πρόπολης σε
κυκλοδεξτρίνες »**



Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Γ. ΚΟΥΡΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Αναπληρωτής
Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων &

Διατροφή του Ανθρώπου»

Εργαστήριο Γεν. Χημείας

Κατεύθυνση: Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων

**« Εγκλεισμός συστατικών εκχυλίσματος πρόπολης σε
κυκλοδεξτρίνες »**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Κωνσταντίνα Γ. Κούρου

Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2018

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**« Εγκλεισμός συστατικών εκχυλίσματος πρόπολης σε
κυκλοδεξτρίνες »**

Κωνσταντίνα Γ. Κούρου

Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Γ.Π.Α.

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κωνσταντίνο Μπεθάνη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσικής, και επιβλέποντα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Ήταν τιμή μου να εργαστώ κάτω από την επίβλεψη του.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χρήστο Παππά και την Δρ. Δήμητρα Δαφερέρα για την βοήθεια και την κατανόηση που έδειξαν στη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, καθώς και για την καθοδήγηση τους σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Δρ. Χαράλαμπο Κανάκη για τη βοήθεια του στη υγρή χρωματογραφία. Επιπλέον ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Φραντζέσκα Τσορτέκη στον Δρ. Ηλία Χριστοφορίδη, και στην Κατερίνα Φουρτάκα για την πολύτιμη βοήθεια τους στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν στη διόρθωση της παρούσας μελέτης καθώς και για τις συμβουλές τους, οι οποίες συνετέλεσαν στην ολοκλήρωσή της.

Κωνσταντίνα Κούρου

Αθήνα 2018

Περίληψη

Η παρούσα μελέτη χωρίζεται σε τρία μέρη. Στο πρώτο μέρος εξετάζεται η δυνατότητα ενίσχυσης της παραλαβής αντιοξειδωτικών συστατικών της πρόπολης με υδατική εκχύλιση παρουσία κυκλοδεξτρινών. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες (με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu) και η αντιοξειδωτική ικανότητα (με τη δοκιμή DPPH*) υδατικών εκχυλισμάτων πρόπολης παρουσία αλλά και απουσία διαφορετικών κυκλοδεξτρινών. Η μελέτη αυτή υποδεικνύει ότι η παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης κατά την υδατική εκχύλιση προσφέρει τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Στο δεύτερο μέρος εξετάζεται με χρωματογραφικές τεχνικές (GC-MS, HPLC) το προφίλ των κύριων συστατικών υδρομεθανολικού (70:30) εκχυλίσματος πρόπολης από ανοιξιάτικο δείγμα που παραλήφθηκε από το εργαστήριο Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Γ.Π.Α το έτος 2017 (Απρίλιος –Μάιος).

Στο τρίτο μέρος, έγινε κατεργασία του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης με β-κυκλοδεξτρίνες με σκοπό τον εγκλεισμό σε αυτές υδρόφοβων συστατικών της πρόπολης κατάλληλου μεγέθους. Ο εγκλεισμός τέτοιων συστατικών παρατηρήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε από τις διαφορές στα GC-MS, HPLC χρωματογραφήματα πριν και μετά την κατεργασία με κυκλοδεξτρίνες. Επιπλέον, με κρυστάλλωση αργής ψύξης, παραλήφθηκαν κρύσταλλοι από το υδρομεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης. Η δομή αυτών των κρυστάλλων προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X από την οποία προέκυψε η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου εγκλεισμού νερολιδόλης σε β-κυκλοδεξτρίνη. Η δομή αυτή ταυτοποιήθηκε από την κρυστάλλωση και προσδιορισμό της δομής του συμπλόκου εγκλεισμού που προέκυψε από καθαρή νερολιδόλη (αγορασμένη από το εμπόριο) σε β-κυκλοδεξτρίνη. Από τη σύγκριση της κρυσταλλικής δομής αυτού του συμπλόκου με αντίστοιχες δομές προϊόντων εγκλεισμού άλλων σεσκιτερπενίων και μονοτερπενίων σε β-κυκλοδεξτρίνες εξάγονται χρήσιμα συμπεράσματα για τη γεωμετρία εγκλεισμού και την κρυσταλλική μοριακή διεύθυνση τους αλλά και για την παρατηρούμενη υψηλή συγγένεια (affinity) που παρατηρείται μεταξύ νερολιδόλης και β-κυκλοδεξτρίνης. Με τους σχηματισμένους κρυστάλλους του προϊόντος εγκλεισμού νερολιδόλης/β-κυκλοδεξτρίνης απευθείας από το υδρομεθανολικό εκχύλισμα της πρόπολης, επιτυγχάνεται εύκολα και αποτελεσματικά η απομόνωση της νερολιδόλης ενώ παράλληλα ο εγκλεισμός της σε β-κυκλοδεξτρίνη προσφέρει σημαντική βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της, όπως αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της και αργή αποδέσμευση.

Επιστημονική περιοχή: Κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, Φυσικά προϊόντα, Προϊόντα εγκλεισμού

Λέξεις κλειδιά: Πρόπολη, Κυκλοδεξτρίνη, Σύμπλοκο εγκλεισμού, Κρυσταλλική δομή, νερολιδόλη

Abstract

The current thesis is divided into three parts. In the first part, the possibility of receiving antioxidant substances of propolis by aqueous extraction in the presence of cyclodextrins (CDs) was examined for different types of CDs (α -CD, β -CD, Random Methylated β -CD (RAMEB)). For this purpose, it was used both Folin-Ciocalteu and DPPH* assay in order to assess the total phenolics and the antioxidant capacity of propolis extraction respectively. The results of this study indicate that the presence of β -CD in the aqueous extraction of propolis, despite its low solubility, increases significantly the total phenolics and the antioxidant activity of the extract.

In the second part, the profile of the main components of hydromethanolic (70:30) extract of propolis from a spring sample that obtained by the Sericulture and Beekeeping Laboratory of the Agricultural University of Athens (April – May 2017) was evaluated by Chromatographic techniques (GC-MS, HPLC).

In the third part, the hydromethanolic extract of propolis was treated with β -CDs in order to encapsulate propolis components having the appropriate size and physicochemical properties. The encapsulation of these components was characterized and quantified by evaluating the differences observed in GC-MS and HPLC chromatograms before and after the cyclodextrin treatment. Furthermore, the hydromethanolic propolis extract, after being treated with β -CD, was crystallized by the slow cooling method and suitable crystals for X-ray diffraction were obtained. The structure of numerous crystals taken from this batch, was determined by X-ray crystallography, revealing in every case the formation of the nerolidol inclusion complex in β -CD. In order to verify this result, crystallization and crystal structure determination of the inclusion complex of pure nerolidol (commercially purchased) in β -CD was also performed. By comparing the crystal structure of nerolidol/ β -CD complex with the structures of other sesquiterpenes and monoterpenes inclusion complexes in β -CD, useful conclusions are drawn on how the size and shape of the guest molecule affects the inclusion geometry and the molecular packing in the crystal. The binding modes observed in these crystal structures are correlated with the corresponding binding constants in aqueous solution, which have been reported in bibliography, and justify the high affinity observed between nerolidol and β -CD. Finally, it should be noted, that the formation of the nerolidol/ β -CD inclusion complex in crystalline state directly from the hydromethanolic extract of propolis, indicates that the isolation of the nerolidol from the examined propolis extract can be readily and effectively achieved, providing a product in which pure nerolidol is stored and protected from the environment, with significantly improved water solubility and the ability of being released slowly.

Scientific area: X-ray Crystallography, Natural products

Key words: Propolis, Inclusion complex, Cyclodextrin, Crystal structure, Nerolidol

Πίνακας περιεχομένων

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	12
1. Εισαγωγή.....	12
1.1. Πρόπολη	12
<i>1.1.1 Ιστορία της πρόπολης</i>	14
<i>1.1.2. Χημική σύσταση πρόπολης και παράγοντες επηρεασμού της</i>	15
<i>1.1.3. Βιοδραστικότητα πρόπολης</i>	18
<i>1.1.4. Χρήσεις πρόπολης</i>	27
<i>1.1.5. Μορφές πρόπολης</i>	28
<i>1.1.6. Μειονεκτήματα πρόπολης</i>	30
1.2. Κυκλοδεξτρίνες	31
<i>1.2.1. Εγκλεισμός ξενιζόμενων μορίων σε κυκλοδεξτρίνες</i>	34
<i>1.2.2. Δυνάμεις εγκλεισμού</i>	35
<i>1.2.3. Διαλυτότητα κυκλοδεξτρινών</i>	35
<i>1.2.4. Εφαρμογές και χρήσεις του μοριακού εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες</i>	36
<i>1.2.5. Επιτρεπτά όρια κυκλοδεξτρινών στις βιομηχανίες</i>	40
1.3. Χρωματογραφικές Τεχνικές	43
<i>1.3.1. Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS)</i>	46
<i>1.3.2. Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)</i>	48
1.4. Φασματοσκοπικές μέθοδοι	51
<i>1.4.1. Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis)</i>	52
<i>1.4.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)</i>	53
1.5. Άλλες Μέθοδοι- Κρυσταλλογραφία ακτίνων-X	55
<i>1.5.1. Κρυσταλλογραφία ακτίνων-X</i>	55
<i>1.5.2. Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης</i>	59
<i>1.5.3. Συλλογή δεδομένων</i>	61
<i>1.5.4. Επεξεργασία δεδομένων από σκέδαση ακτίνων-X</i>	63
<i>1.5.5. Καθορισμός της κρυσταλλικής δομής</i>	64

1.5.6. Βελτιστοποίηση δομής	64
1.5.7. Αξιολόγηση και κατάθεση δομής.....	66
1.6. Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας	67
1.6.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu	67
1.6.2. Δοκιμή Διφαινυλοπικρυλοδραζυλίου (DPPH*).....	68
2.1. Προμήθεια δείγματος πρόπολης.....	69
2.2. Προετοιμασία εκχυλισμάτων/δειγμάτων πρόπολης	70
2.3. Προσδιορισμός ολικού περιεχόμενου σε φαινόλες με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu.....	71
2.4. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή Διφαινυλοπικρυλο-δραζυλίου (DPPH*).....	72
2.5. Ανάλυση των πτητικών συστατικών πρόπολης με Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS)	73
2.6. Ανάλυση υδατικού κλάσματος πρόπολης με Υγρή Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC - DAD).....	75
2.7. Ανάλυση συστατικών πρόπολης με Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR) με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR).....	77
2.8. Κρυσταλλογραφική μελέτη προϊόντων εγκλεισμού πρόπολης παρουσία κυκλοδεξτρινών 77	
2.8.1. Προετοιμασία Κρυστάλλωσης προϊόντων εγκλεισμού πρόπολης.....	77
2.8.2. Πειράματα κρυστάλλωσης εκχυλίσματος πρόπολης παρουσία α - και β -CD	78
2.8.3. Πειράματα κρυστάλλωσης προϊόντος εγκλεισμού καθαρής νερολιδόλης σε β -CD	78
2.8.4. Συλλογή, επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων από περίθλαση ακτινών-X και επίλυση και βελτιστοποίηση της δομής.....	79
3.1. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων πρόπολης.....	81
3.1.1. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχόμενου - Δοκιμή Folin-Ciocalteu	81
3.1.2. Δοκιμή Διφαινυλοπικρυλοδραζυλίου (DPPH)	83
3.2. Αποτελέσματα Αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης GC-MS	84
3.3. Αποτελέσματα Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD).....	89
3.4. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR) με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) συστατικών πρόπολης	91
3.5. Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής ανάλυσης του προϊόντος εγκλεισμού της πρόπολης σε β -CD	93

3.5.1. Κρύσταλλοι συμπλόκου εγκλεισμού πρόπολης/ β -CD	93
3.5.2. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα και επίλυση της δομής.....	94
3.5.3. Προσδιορισμός δομής από κρυστάλλους που προέκυψαν από καθαρή νερολιδόλη και β -CD	99
3.5.4. Κρυσταλλική μοριακή διευθέτιση (<i>Crystal packing</i>) της νερολιδόλης/ β -CD (<i>Nrl_prop/β-CD</i>)	102
3.5.5. Περιγραφή γεωμετρίας εγκλεισμού προϊόντος εγκλεισμού - Νερολιδόλη (<i>Nrl_prop/β-CD</i>)	105
3.5.6. Περιγραφή γεωμετρίας εγκλεισμού καθαρής νερολιδόλης/ β -CD (<i>Nrl/β-CD</i>)	107
3.5.7. Σύγκριση κρυσταλλικών δομών <i>Nrl_prop/β-CD</i> και <i>Nrl/β-CD</i>	108
3.6. Σύγκριση αποτελεσμάτων κρυσταλλογραφίας με ακτίνες-X του προϊόντος εγκλεισμού νερολιδόλης/ β -CD με άλλα προϊόντα εγκλεισμού σε β -CD.....	108
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	114
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	117

Κατάλογος συντημήσεων:

Ελληνικός όρος	Αγγλικός όρος	Σύντημηση
Κυκλοδεξτρίνες	Cyclodextrins	CDs
β -κυκλοδεξτρίνη	β -cyclodextrin	β -CD
α -κυκλοδεξτρίνη	α -cyclodextrin	α -CD
Τριμεθυλιωμένη- β -κυκλοδεξτρίνη	Trimethyl- β -cyclodextrin.	TM- β -CD (TRIMEB)
Τυχαίως μεθυλιωμένη- β -κυκλοδεξτρίνη	Randomly Methylated β -cyclodextrin	RM- β -CD (RAMEB)
Διμεθυλιωμένη- β -κυκλοδεξτρίνη	Dimethyl- β -cyclodextrin	DM- β -CD (DIMEB)
Υδροξυπρόπυλο- β -κυκλοδεξτρίνη	2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin	HP- β -CD
Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-X	X-ray Crystallography	X-ray
Φασματοσκοπία Υπερύθρου	Infrared spectroscopy	IR
Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού	Ultraviolet-Visible spectroscopy	UV-Vis
Μέθοδος Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου	Diphenyl-1-picrylhydrazyl	DPPH
Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών	Gas chromatography-mass spectrometry	GC-MS
Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier	Fourier Transform Infrared spectroscopy	FT-IR
Φασματοσκοπία ολικής ανάκλασης	Attenuated Total Reflectance spectroscopy	ATR
Υγρή Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection	HPLC-DAD
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης	Propolis methanolic extract	PME
Μεθανολικό εκχύλισμα με προσθήκη β -CD	Propolis methanolic extract with β -CD	PME β -CD
Εκχύλισμα υδατικής φάσης χωρίς κυκλοδεξτρίνη	Water-phase solution propolis extract without β -CD	PMEH
Εκχύλισμα υδατικής φάσης με β -CD	Water-phase solution propolis extract with β -CD	PMEH β -CD
Προϊόν εγκλεισμού νερολιδόλης από εκχύλισμα πρόπολης σε β -CD	Complex nerolidol of propolis extract in β -CD	Nr1_prop/ β -CD
Προϊόν εγκλεισμού καθαρής νερολιδόλης σε β -CD	Complex pure nerolidol in β -CD	Nr1/ β -CD

Σκοπός μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η παρασκευή και μελέτη προϊόντων εγκλεισμού συστατικών εκχυλίσματος πρόπολης σε κυκλοδεξτρίνες με σκοπό την αποθήκευση, την προστασία τους και τη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι γνωστές για την ικανότητά τους ως μόρια ξενιστές, να εγκλείουν στο εσωτερικό της υδρόφοβης κοιλότητάς τους πλήθος μορίων (ξενιζόμενα) που έχουν κατάλληλο μέγεθος, σχήμα ή/και χαρακτηριστικές ομάδες. Ο εγκλεισμός των ξενιζόμενων μορίων σε κυκλοδεξτρίνες, προσφέρει σημαντική βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους όπως αύξηση της υδατοδιαλυτότας τους, αποθήκευση και προστασία από την έκθεσή τους στο περιβάλλον, αλλά και προστασία του περιβάλλοντος από αυτά όταν πρόκειται για επιβλαβή μόρια. Έτσι, οι κυκλοδεξτρίνες βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην βιοτεχνολογία, τη χημεία, τη γεωργία, τη φαρμακευτική, τη κοσμετολογία, τη βιομηχανία τροφίμων και σε άλλες βιομηχανικές χρήσεις. Η πιο δημοφιλής φυσική κυκλοδεξτρίνη είναι η β -CD, λόγω του χαμηλού της κόστους, του κατάλληλου μεγέθους της κοιλότητάς της και της σταθερότητας των προϊόντων εγκλεισμού σε αυτήν. Για αυτούς τους λόγους αλλά και επειδή η β -CD έχει λάβει έγκριση ασφάλειας από τους οργανισμούς ασφαλείας τροφίμων και φαρμάκων σε Ευρώπη και Αμερική, χρησιμοποιήθηκε στα περισσότερα πειράματα της παρούσας εργασίας.

Αρχικά, ερευνάται η δυνατότητα και η αποτελεσματικότητα εκχύλισης πρόπολης με υδατικό διάλυμα φυσικών ή μεθυλιωμένων κυκλοδεξτρινών (α -CD, β -CD και τυχαία μεθυλιωμένης β -κυκλοδεξτρίνης-Rameb), με έλεγχο του αντιοξειδωτικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια και αφού ληφθεί το προφίλ των συστατικών υδρομεθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης εξετάζεται η ποσοστιαία μείωση αυτών των συστατικών μετά από κατεργασία με β -CD. Η μείωση αυτή αποδίδεται κυρίως στον εγκλεισμό τους σε β -CD. Τέλος, με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X προσδιορίζεται η κρυσταλλική δομή τουλάχιστον ενός από τα προϊόντα εγκλεισμού και από την ανάλυση της γεωμετρίας εκλεισμού εξάγονται χρήσιμα συμπεράσματα για τη σταθερότητα και το σχηματισμό του προϊόντος εγκλεισμού συγκριτικά με παρόμοια προϊόντα εγκλεισμού σε β -CD.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Φυσικό προϊόν ονομάζεται ένας ολόκληρος οργανισμός, φυτικός ή ζωικός, ή τμήμα του, ο οποίος δεν έχει υποστεί επεξεργασία. Οι ιδιότητες των φυσικών προϊόντων είναι ήδη γνώστες εδώ και αρκετά χρόνια και χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική και όχι μόνο. Αυτές οι ιδιότητες τους οφείλονται κυρίως στους δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχουν, προσδίδοντας στα προϊόντα αυτά ιδιαίτερη αξία, καθώς αποτελούν σημαντική πηγή δραστικών ουσιών με ιδιαίτερες βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικές ενώσεις με μικρό μοριακό βάρος που παράγονται από τα φυτά και σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες δεν έχουν άμεση συμμετοχή σε ζωτικής σημασίας λειτουργίες του φυτού όπως, αναπνοή, φωτοσύνθεση, μετακίνηση θρεπτικών ουσιών, σύνθεση σακχάρων, πρωτεϊνών, λιπιδίων και διαφοροποίηση (Samuelsson, 2005).

Η πρόπολη αποτελεί ένα φυσικό προϊόν παραγόμενο από τις μέλισσες, έχοντας αξιοσημείωτες ευεργετικές ιδιότητες και πολλαπλές χρήσεις, κυρίως στην εναλλακτική ιατρική, στη βιομηχανία τροφίμων, στην κοσμετολογία, αλλά και στην φαρμακοβιομηχανία. Η ακατέργαστη πρόπολη με συγκεκριμένες τεχνικές και επεξεργασίες μπορεί να βελτιώσει τις ευεργετικές της ιδιότητες και τις σύγχρονες χρήσεις της, προσφέροντας θετικές επιδράσεις στην σύγχρονη ζωή των ανθρώπων.

1.1. Πρόπολη

Η πρόπολη είναι μια ιδιαίτερα κολλώδης και ρητινώδης φυσική ουσία, που συλλέγεται από τις μέλισσες, από διάφορα φυτά και δένδρα (κυρίως από λεύκες, κωνοφόρα και ιτέα) αναμειγμένη με γύρη αλλά και με ένζυμα της σιελοῦ τους που εκκρίνουν οι ίδιες (Καλογερόπουλος et al., 2009). Η λέξη «πρόπολη» ετυμολογικά σημαίνει «προ της πό-λεως». Η *Apis mellifera*, είναι το είδος της μέλισσας που συλλέγει το υλικό από το οποίο παράγεται η πρόπολη, ωστόσο τα Ασιατικά είδη *Apis* δεν παράγουν πρόπολη. Συγκεκριμένα αόφτου γίνει η μεταφορά της πρόπολης από τις μέλισσες στο εσωτερικό της κυψέλης, με τις τρίχες των ποδιών τους, καλύπτουν με την πρόπολη τα εσωτερικά και εξωτερικά μέρη της κυψέλης και έτσι ισχυροποιείται η αποικία τους, παρέχοντας στις μέλισσες ένα υγιέστερο περιβάλλον. Στη συνέχεια εμπλουτίζεται με κερί, γύρη, ένζυμα και άλλες ουσίες μέσα στην κυψέλη. Δεν αποτελεί τροφή για τις μέλισσες, αλλά χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των κηρυθρών, το σφράγισμα των ρωγμών και πολλών άλλων διαδικασιών.



Εικόνα 1: Ακατέργαστη πρόπολη

Το χρώμα της ποικίλλει ανάλογα με την φυτική της προέλευση, τις προσμίξεις και τον χρόνο παραμονής της στην κυψέλη και μπορεί να είναι κιτρινοπράσινο, καστανό ή μαύρο. Ποικίλλουν επίσης η γεύση, η οσμή και η στερεότητά της, η οποία μεταβάλλεται με την θερμοκρασία. Σε χαμηλές θερμοκρασίες μικρότερες από 15°C η πρόπολη είναι υαλοποιημένη και ιδιαίτερα σκληρή, ενώ σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 30° C αποκτά πλαστικότητα και μετατρέπεται σε κολλώδη ουσία. Η πρόπολη λιώνει στους 60-70 °C, έχει πυκνότητα περίπου 1,12 g/mL, και διαλύεται σε οργανικούς διαλύτες, ενώ είναι εντελώς αδιάλυτη στο νερό (Χαρισάνης, 1992).

Χρησιμοποιείται από τις ίδιες τις μέλισσες ως δομικό υλικό της κυψέλης για τη στεγανοποίηση και την απολύμανση του εσωτερικού της (Bankova et al., 2000).



Εικόνα 2: Η είσοδος της κυψέλης

Συγκεκριμένα σύμφωνα με τους Καλογερόπουλο et al. (2009), η πρόπολη εκτός από την εξασφάλιση της προστασίας της κυψέλης από μολύνσεις και εισβολείς, εξασφαλίζει και την απόλυτη αποστείρωση της κυψέλης, καθώς μικραίνει το άνοιγμα της εισόδου της κυψέλης και δεν επιτρέπει τους εισβολείς να εισχωρήσουν. Επίσης χρησιμοποιείται για να συντηρεί τα νεκρά σώματα των μελισσών (Dias et al., 2008). Τέλος η ίδια η μέλισσα αλείφει το σώμα της με την πρόπολη για να προστατευτεί από τους φυσικούς της εχθρούς (Χαρισάνης, 1992).

1.1.1 Ιστορία της πρόπολης

Εδώ και χιλιάδες χρόνια η πρόπολη χρησιμοποιείται ως παραδοσιακό φάρμακο και αναφέρεται ως μαύρο κερί. Γενικά η ιστορία των μελισσών και των προϊόντων τους ανιχνεύεται από το 13.000 π.Χ. σύμφωνα με απεικονίσεις της μέλισσας και της μελισσοκομίας που βρέθηκαν σε ανασκαφές. Πιο συγκεκριμένα οι αρχαίοι Έλληνες, Πέρσες, Άραβες, Ρωμαίοι και Αιγύπτιοι γνώριζαν τις θεραπευτικές της ιδιότητες και την χρησιμοποιούσαν ως φάρμακο. Στην αρχαία Ελλάδα υπήρχε ένα σύστημα υψηλής ποιότητας μελισσοκομίας και σύμφωνα με ιστορικά κείμενα η αρχαιότερη προσωπικότητα που σχετίζεται με τη μελισσοκομία, είναι ο αγροτικός θεός Αρισταίος, γιος του θεού Απόλλωνα, ο οποίος σύμφωνα με τη μυθολογία θεωρείται ο πατέρας της μελισσοκομίας. Το 350 π.Χ οι Έλληνες χρησιμοποίησαν την πρόπολη ως το κύριο συστατικό του πολυάνθου, αρώματος το οποίο συνδύαζε πρόπολη, ολίβανο, και αρωματικά βότανα. Αρκετοί Έλληνες και Ρωμαίοι συγγραφείς ανέφεραν την πρόπολη, ως το τρίτο φυσικό προϊόν των μελισσών (εκτός από το μέλι και το κερί). Ο Ιπποκράτης χρησιμοποίησε πρόπολη για να θεραπεύσει τραύματα και έλκη, τόσο εξωτερικά όσο και εσωτερικά. Ο Διοσκουρίδης περιέγραψε τις ιατρικές χρήσεις της πρόπολης στο έργο του «*De materia Medica*» και την αναφέρει ως κίτρινη κόλλα μελισσών που έχει γλυκό άρωμα και βοηθούσε στον βήχα και στην απομάκρυνση των λειχήνων. Επίσης ο Δημόκριτος ισχυρίζεται ότι η μακροζωία και η υγεία οφείλονται στην κατανάλωση των προϊόντων μέλισσας και ιδιαίτερα της πρόπολης. Ο Αριστοτέλης ο πρώτος μελισσολόγος ερευνητής περιγράφει τον 3^ο αιώνα π.Χ. στο σύγγραμμα του «*περί ζώων μορίων*» τη μελισσοκομική επιστήμη και υμνεί την ποιότητα των προϊόντων της μέλισσας. Στη Ρώμη υπήρχε μια ολόκληρη κουλτούρα αφιερωμένη στη μέλισσα και τα προϊόντα της. Κάθε Ρωμαίος λεγεωνάριος είχε πρόπολη μαζί του κατά τη διάρκεια των στρατιωτικών του εκστρατειών. Ο διάσημος ιατροφιλόσοφος Αβικέννας είχε παρατηρήσει ότι η πρόπολη δρα αποτελεσματικά στους τραυματισμούς από τα βέλη των τόξων. Στα περσικά χειρόγραφα η πρόπολη περιγράφεται ως φάρμακο κατά των εκζεμάτων, των μυαλγιών και των ρευματισμών.



Εικόνα 3: Ταρίχευση πτωμάτων με χρήση πρόπολης στην Αίγυπτο

Ιδιαίτερα διαδεδομένη ήταν και στην αρχαία Αίγυπτο, όπου την χρησιμοποιούσαν στην μουμιοποίηση λόγω των αντισηπτικών της ιδιοτήτων, αλλά και για την παραγωγή φαρμάκων και αλοιφών. Οι Αρχαίοι Αιγύπτιοι απεικόνιζαν τις μέλισσες με πρόπολη σε αγγεία και άλλα στολίδια και την χρησιμοποιούσαν για να ανακουφίσουν πολλές ασθένειες. Οι γυναίκες της βασιλικής ακολουθίας χρησιμοποιούσαν την πρόπολη ανακατεύοντας την με γάλα, για την παρασκευή διαλυμάτων ομορφιάς.

Επιπλέον κατά τον μεσαίωνα την χρησιμοποιούσαν για απολύμανση του ομφαλού των νεογέννητων, αλλά και ως φάρμακο κατά των στοματικών λοιμώξεων. Στη Γεωργιανή και Καυκάσια ιατρική του 12^{ου} αιώνα χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία των χαλασμένων δοντιών συνδυασμένη με άλλες ουσίες όπως λάδι ελιάς, και μέλι. Ακόμη οι Ίνκας τη χρησιμοποιούσαν στη θεραπεία του πυρετού. Το 1600 η πρόπολη καταχωρήθηκε ως επίσημο φάρμακο στις Φαρμακοποιίες του Λονδίνου. Στον πρώτο και στον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, η πρόπολη χρησιμοποιήθηκε από τη Σοβιετική Ένωση σε πρώτες βοήθειες για τη μείωση τραυμάτων και την ταχεία θεραπεία, έχοντας το όνομα «ρωσική πενικιλίνη». Το 1995 στην Αργεντινή, το Εθνικό Ινστιτούτο Τροφίμων αναγνώρισε την πρόπολη ως διαιτητικό συμπλήρωμα. Πλέον η πρόπολη και η μελισσοκομία είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη και έχει δημιουργηθεί ειδικός κλάδος στην ιατρική επιστήμη, γνωστός σαν μελισσοθεραπεία (Bankova et al., 2000), (Lotfy, 2006), (Gavanji et al., 2015), (Fearnely, 2001), (Kuropatnicki et al., 2013).

1.1.2. Χημική σύσταση πρόπολης και παράγοντες επηρεασμού της

Η χημική σύσταση της πρόπολης είναι ιδιαίτερα μεταβλητή και εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες :

- βοτανική προέλευση
- γεωγραφική προέλευση
- περίοδος συλλογής

Γενικά, η πρόπολη αποτελείται κυρίως από κηρός (30%), ρητίνη (50%), αιθέριο έλαιο (10%) και γύρη (5%) και άλλες ουσίες, όπως τερπένια, αλειφατικά οξέα και εστέρες τους, ανόργανες ουσίες, φλαβόνες, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες καθώς και άλλα γνωστά και άγνωστα συστατικά.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι κύριες κατηγορίες ενώσεων της πρόπολης σε ποσοστά, σύμφωνα με τον FAO (Food and Agriculture Organization):

Πίνακας 1: Χημική σύνθεση πρόπολης (Πηγή FAO, 2007)

Κατηγορία συστατικών	Ομάδες συστατικών – Ποσοτική σύσταση	Βιβλιογραφία
Ρητίνες	45-55% Φλαβονοειδή Φαινολικά οξέα και εστέρες	Pápay et al.,1987, Bankova et al.,1987, Bankova et al., 1992 , Nagy et al., 1989 , Nagy et al., 1985 , Omar, 1989, Greenaway et al., 1990 , Wang & Zhang, 1988, Mizuno et al., 1987, Wollenweber et al., 1987
Κηροί και λιπαρά οξέα	25-35%	Pápay et al., 1987
Αιθέριο έλαιο	10%	Petri et al., 1988
Γύρη	5% Δεκαέξι κύρια αργινίνη & προλίνη σε μεγαλύτερο ποσοστό	Gabrys et al., 1986
Οργανικά και ανόργανα συστατικά	5% Δεκατέσσερα ιχνοστοιχεία (Fe & Zn σε μεγαλύτερο ποσοστό), κετόνες , λακτόνες, κινόνες, στεροειδή, βενζοϊκά οξέα και εστέρες, βιταμίνη B ₃ , σάκχαρα	Scheller et al., 1989, Bankova et al., 1987, Cuellar & Rojas, 1987, Greenaway et al., 1987

Η πρόπολη περιέχει πολλά συστατικά, όπως πολυφαινόλες, τερπενοειδή, στεροειδή και αμινοξέα (Ahn et al., 2007). Έως σήμερα έχουν ανιχνευτεί παραπάνω από 300 ενώσεις στην πρόπολη (Bankova et al., 2000). Περιέχει πάνω από 40 φλαβονοειδή, αλειφατικά αρωματικά οξέα, φαινολικά, αρωματικές αλδεϋδες, αμινοξέα, σάκχαρα και πολλές βιταμίνες. Η πρόπολη που προέρχεται από Βουλγαρία, Τουρκία, Ελλάδα και Αλγερία περιέχει κυρίως φλαβονοειδή και εστέρες των καφεϊκών και φερουλικών οξέων. Σύμφωνα με έρευνες τα σημαντικότερα συστατικά που χαρακτηρίζουν την Ευρωπαϊκή πρόπολη, είναι κυρίως τα φλαβονοειδή πινοσεμπρίνη, πινομπασκίνη, χρυσίνη και γκαλαγκίνη.

Οι κυριότερες ενώσεις της πρόπολης, με τις σημαντικές βιολογικές επιδράσεις που έχουν ανιχνευθεί έως σήμερα αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Ταυτοποιημένα συστατικά πρόπολης (Magucci, 1995)

Κατηγορίες	Ενώσεις	Περιγραφή
Αμινοξέα	Πυρογλουταμινικό οξύ	
Αλειφατικά οξέα/εστέρες τους	Έχουν ταχτοποιηθεί ~ 22 οξέα (βουτυρικό οξύ, παλμιτικό οξύ, στεατικό οξύ, ελαϊκό οξύ, φουμαρικό οξύ, λινελαϊκό οξύ, ισοβουτυρικό οξύ, ακετοξικό οξύ, μυριστικό οξύ, λιγνοκερικό οξύ κ.α	Τα μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας προέρχονται από τους κηρούς ενώ τα μικρής αλυσίδας και οι εστέρες τους από τη ρητίνη
Αρωματικά οξέα και οι εστέρες τους	Πάνω από 40 ενώσεις που περιέχονται στις ρητίνες (βενζοϊκό οξύ, βανιλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερούλικό οξύ, κινναμικό οξύ κ.α.)	Εμφανίζουν μυκητοκτόνες και βακτηριοκτόνες δράσεις
Αλδεΐδες	p-υδροξυβενζαλδεΐδη, βανιλίνη, ισοβανιλίνη	Περιέχονται στις ρητίνες
Αλκοόλες	Υδροκινόνη, βενζυλική αλκοόλη, πρενυλική αλκοόλη, ισοβουτενόλη, φαιναθύλ- αιθανόλη, α και β- γλυκεροφωσφατάση, γλυκερόλη, κινναμική αλκοόλη	Από αυτές, εκτός από τις α- και β- γλυκεροφωσφατάση που παράγεται από την μέλισσα και τη γλυκερόλη που περιέχεται στο κερί, όλες οι άλλες περιέχονται στις ρητίνες
Φλαβανόλες	Πινostroμπίνη, πινοσεμπρίνη, 3-O-αίθυλ-εστέρας της πινομπαξίνης, πινομπαξίνη, ναριγκενίνη κ.α.	Μαζί με τις φλαβόνες τους αποδίδονται αντιμικροβιακές ιδιότητες
Φλαβόνες	Τεκτοχρυσίνη, 7-4-διμέθυλ-εστέρας της καμφερόλης, χρυσίνη, 3-μέθυλ-αιθέρας της γκαλαγκίνης, 7-μέθυλ-αιθέρας της απιγενίνης, γκαλαγκίνη, κερκετίνη, καμφερόλη, 3-μέθυλ-αιθέρας της καμφερόλης, κ.α	Έχουν συνήθως αντιμικροβιακές ιδιότητες.
Υδρογονάνθρακες	Βρέθηκαν υδρογονάνθρακες με περιττό αριθμό ανθράκων C ₂₁ - C ₃₃	Οι C ₂₅ και C ₂₇ περιέχονται στις ρητίνες αλλά παράγονται και προστίθενται στη πρόπολη από τη μέλισσα
Κετόνες	Ακετοφαινόνη και p-ακετοφαινόλη	
Τερπενοειδή	Βενζόλιο, μέθυλο-κυκλοεξάνιο, αιθυλένιο, φαινυλ-εξανολακτόνη, 4-μενθάνιο, 1,8-επόξυ-ναφθαλένιο, αλκοόλες σεσκιτερπενίων κ.α.	
Βιταμίνες	Βιταμίνες B ₁ (θειαμίνη), B ₅ (νικοτινικό οξύ) και προβιταμίνη A	

1.1.3. Βιοδραστικότητα πρόπολης

Η ιδιαίτερη βιοδραστικότητα της πρόπολης σχετίζεται με τη χημική της σύσταση, έχοντας πολλαπλές εφαρμογές στην θεραπεία και την πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Οι βιολογικές της δράσεις, που ξεπερνούν τις 300, είναι κυρίως η αντιοξειδωτική, αντισηπτική, αντιφλεγμονώδης, αντιμικροβιακή, ηπατοπροστατευτική, αντικαρκινική, οι οποίες οφείλονται είτε σε κάποιο συγκεκριμένο συστατικό της, είτε στο συνδυασμό περισσοτέρων. Ωστόσο, οι Kujumgiiev et al., (1999) είχαν ήδη πρότεινε ότι οι ιδιότητες της πρόπολης προσδιορίζονται από ένα μείγμα των συστατικών της, και ένα μόνο συστατικό δεν θα είχε δραστικότητα μεγαλύτερη από αυτή του συνολικού εκχυλίσματος (Banskota et al., 1998), (Burdock, 1998), (Kujumgiiev et al., 1999), (Jeng et al., 2000), (Kimoto et al., 2000), (Orsia et al., 2005).

Αντιοξειδωτική δράση πρόπολης :

Από τα τρία προϊόντα που παράγουν οι μέλισσες, η πρόπολη είναι αυτό με το υψηλότερο ποσοστό πολυφαινόλων, προσδίδοντάς της έτσι ισχυρό αντιοξειδωτικό χαρακτήρα και προστατευτική δράση στις αντιδράσεις οξείδωσης, χάρη στις αναγωγικές τους ιδιότητες, λειτουργώντας έτσι ως αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνου, αναγωγείς μετάλλων και αναστολείς ριζών οξυγόνου (Chaillou et al., 2009), (Viuda-Martos et al., 2008). Τα δείγματα πρόπολης που εκδηλώνουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, είναι αυτά που περιέχουν, σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού GC-MS, τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες. Τα συστατικά που εκδηλώνουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και κατέχουν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση οξείδωσης των λιπαρών οξέων, είναι οι φαινολικές ενώσεις και κυρίως τα φλαβονοειδή. Συγκεκριμένα τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Reactive Oxygen Species, ROS) που παράγονται στον οργανισμό εξαιτίας της έκθεσης του σε μολυσματικούς παράγοντες όπως η υπεριώδη ακτινοβολία και η κακή ποιότητα διατροφής και ζωής. Κάποια από τα αντιοξειδωτικά συστατικά, που περιέχει η πρόπολη είναι το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ και ο φαιναιθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος (Ahn et al., 2007) καθώς και τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος και τα φλαβονοειδή (Gregoris et al., 2010). Συγκεκριμένα σύμφωνα με έρευνες οι σημαντικότερες ενώσεις της πρόπολης που έχουν ισχυρό αντιοξειδωτικό χαρακτήρα είναι η πινοσεμπρίνη (pinocembrin), η χρυσίνη (chrysin) και η πινομπαξίνη (pinobanksin) (Sun et al., 2015), ενώ στις δοκιμές αντιοξειδωτικότητας DPPH και ORAC, η 3-οξικό-πινομπαξίνη αναφέρεται ως το ισχυρότερο αντιοξειδωτικό συστατικό της (Boisard et al., 2014). Η πρόπολη έχει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τη βιταμίνη C και E (Basnet, 1997).

Σε μια σειρά δοκιμών το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης από τη Βραζιλία έδειξε σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Επίσης η αντιοξειδωτική δράση της πρόπολης είναι αρκετά μεγάλη που

μπορεί να συγκριθεί με διάφορα εκχυλίσματα φυτών, ακόμη και με γνωστά αντιοξειδωτικά συστατικά που έχουν απομονωθεί, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Η αντιοξειδωτική ικανότητα της πρόπολης σε σχέση με άλλες σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες, μέσω μέτρησης του 50% της αναστολής της οξειδωτικής δράσης του χρησιμοποιούμενου συστήματος (IC₅₀) (Τρουλλίδου, 2007)

Φυτά – Ουσίες	50% αναστολή της οξειδωτικής δράσης (IC ₅₀)
Εκχύλισμα πρόπολης	0.016 μL/mL
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	0.070 μL/mL
<i>Ginkgo biloba</i>	0.05 μL/mL
<i>Isoflavin Beta</i>	0.033 μg/mL
<i>Red clover</i>	0.032 μg/mL
Καθαρή κερκετίνη	0.34 μg/mL
Καθαρή α-τοκοφερόλη	1 μg/mL

Σε μια ακόμη μελέτη σύγκρισης της παρεμποδιστικής δράσης έναντι στην αυτοοξείδωση του μεθυλ-λινελαϊκού οξέος, διαφορετικών δειγμάτων πρόπολης Κινέζικης, Ιαπωνικής, Βραζιλιάνικης και Αμερικανικής προέλευσης, απομονώθηκε το βενζυλ-καφεϊκό ως ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά συστατικά, από το δείγμα πρόπολης από την Κίνα (Ahn et al., 2007).

Σε μια άλλη μελέτη, που βασίστηκε στη μέθοδο προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης DPPH, χρησιμοποιήθηκαν υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από τη Βραζιλία, το Περού, την Κίνα και την Ολλανδία. Τα υδατικά εκχυλίσματα πρόπολης από τη Βραζιλία και την Κίνα είχαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα μεθανολικά εκχυλίσματα, ενώ τα μεθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από το Περού και την Ολλανδία έδειξαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από ότι τα υδατικά εκχυλίσματα (Banskota et al., 2000).

Επίσης έχει διαπιστωθεί σε πειραματόζωα ότι η χορήγηση της πρόπολης ως συμπλήρωμα διατροφής, ρυθμίζει τη δράση των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (AOE) και οδηγεί σε μείωση της υπεροξείδωσης του λίπους στο πλάσμα, τους πνεύμονες, το ήπαρ, και τον εγκέφαλο και ότι η επίδραση αυτή είναι δόσοεξαρτώμενη. Βρέθηκε ότι με την πρόσληψη μιας μικρότερης δόσης πρόπολης που χορηγήθηκε, εκδηλωνόταν προστατευτική δράση, παρεμποδίζοντας την οξείδωση του πλάσματος, ενώ η πρόσληψη μιας μεγαλύτερης δόσης είχε ως αποτέλεσμα προ-οξειδωτική δράση. Έτσι, εξαιτίας, της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης της, η φυσική πρόπολη μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως αντιοξειδωτικό όχι μόνο υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά και σε περιπτώσεις που απαιτούν τη λήψη της για αυξημένο χρονικό διάστημα και αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου (Sobocyanec et al., 2006).

Αντιβακτηριακή – Αντιμικροβιακή – Αντισηπτική δράση πρόπολης:

Η πρόπολη δρα εναντίον ενός μεγάλου φάσματος βακτηρίων, κυρίως έναντι των γενών *Staphylococcus* και *Streptococcus*, που είναι υπεύθυνα για μολύνσεις της στοματικής κοιλότητας. Με την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος πρόπολης σε γνωστά αντιβιοτικά, ανιχνεύτηκε δραστική αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης της αμπικιλίνης, της γενταμικίνης, της στρεπτομυκίνης, καθώς και μέτρια αύξηση στη δραστικότητα της χλωραμφενικόλης, και της βανσομυκίνης (Scazzocchio et al., 2006). Τα φλαβονοειδή, το κινναμικό οξύ, ορισμένα αρωματικά συστατικά και οι εστέρες φαινολικών οξέων, είναι τα βασικά συστατικά της πρόπολης που εκδηλώνουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Σύμφωνα με τους Kujumgiev et al., (1999) βρέθηκε ότι η πρόπολη από τροπικές περιοχές αν και δεν περιέχει τα αναφερόμενα συστατικά, επέδειξε παρόμοια αντιμικροβιακή δράση, κάτι το οποίο δηλώνει ότι είναι απαραίτητος ο συνδυασμός των περιεχόμενων συστατικών της. Οι Kedzia et al., (1990) αναφέρουν πως ο μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης της πρόπολης είναι περίπλοκος και μπορεί να αποδοθεί στη συνέργεια των υδρόξυ-οξέων των φλαβονοειδών και των σεσκιτερπενίων, καθώς επηρεάζεται και από την θερμοκρασία και την ενεργό οξύτητα (pH). Έχει διαπιστωθεί ότι η αντιμικροβιακή δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης έναντι του *S.aureus*, με την ισχυρότερη δράση, εκδηλώνεται σε pH 5,0 και σε θερμοκρασία 37°C. Σύμφωνα με αρκετούς Ιάπωνες ερευνητές που μελέτησαν τους μηχανισμούς θανάτωσης των βακτηρίων διαπιστώθηκε ότι η πρόπολη μπορεί και αναστέλλει τη μικροβιακή ανάπτυξη, προκαλώντας τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηριδίου, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου (Lu et al., 2005). Σε μια μελέτη για την Ελληνική πρόπολη από την Πρέβεζα, ανιχνεύτηκαν ότι οι: 7-Ο-πρένυλ-στρομπονίνη, 7-Ο-πρένυλ-πινοσεμπρίνη, πινοσεμπρίνη και η χρυσίνη επιδεικνύουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, με την πινοσεμπρίνη να κατέχει την ισχυρότερη δράση έναντι των παθογόνων *S. mutans* και *S. Viridans* (Melliou & Chinou, 2004). Τα αιθανολικά κυρίως εκχυλίσματα της πρόπολης, αποδίδουν τις αντιβακτηριακές δράσεις της, μέσω αναστολής της κυτταροδιαίρεσης, την αναστολή διαχωρισμού των θυγατρικών κυττάρων (δράση ανάλογη με αυτή της τριμεθοπρίμης), διαταραχών της λειτουργίας και της δομής της κυτταρικής μεμβράνης, βλαβών στο κυτταρόπλασμα, αναστολή σύνθεσης βακτηριακών πρωτεϊνών και αναστολή της DNA-εξαρτώμενης RNA-πολυμεράσης (δράση ανάλογη της ριφαμικίνης).

Αντιμυκητιακές ιδιότητες πρόπολης:

Σύμφωνα με το Εθνικό Καρδιολογικό και Πνευμονολογικό Ινστιτούτο του Λονδίνου, η πρόπολη είναι ικανή να καταστρέφει ανθεκτικά στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών, ανθεκτικών στα συνθετικά αντιβιοτικά. Ωστόσο υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν την μεγάλη ευαισθησία των μικροοργανισμών στην πρόπολη, και τη σταθερότητα της έναντι των αντιβιοτικών.

Η πρόπολη ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα, παράγοντας μεγαλύτερο αριθμό μακροφάγων, απαραίτητων για την εξολόθρευση των μυκήτων και των βακτηρίων και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική έναντι των παθογόνων μυκήτων του γένους *Candida* και *Microsporum*, που προσβάλλουν την επιδερμίδα (Januzzi, 1993). Σε μια άλλη μελέτη, που χρησιμοποιήθηκε πρόπολη από πεύκο από Τουρκία, πρόπολη από μέλι μελισσών (*Apis mellifera*), σκόνη πρόπολης, πρόπολη Αυστραλίας και πρόπολη από τις ΗΠΑ, βρέθηκε ότι επιδρά αποτελεσματικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις στην παρεμπόδιση της δράσης των *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* και *Candida krusei*, προκύπτοντας ότι η πρόπολη μπορεί να θεωρηθεί ένα φυσικό προϊόν με ισχυρή αντιμυκητιακή δράση (Kirilmaz et al., 2005). Σε μια άλλη έρευνα που έγινε στην πρόπολη από την Πρέβεζα, βρέθηκε ότι πέρα από την αντιφλεγμονώδη δράση της, η χρυσίνη που περιέχεται στην πρόπολη έχει και ισχυρή δράση έναντι παθογόνων μυκήτων, όπως ο μύκητας *P. aeruginosa* (Melliou & Chipou, 2004).

Αντιπαρασιτική δράση

Η αντιπαρασιτική δράση της πρόπολης οφείλεται στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, και είναι αποτελεσματική κυρίως για τις Τριχομονάδες και τα Τρυπανοσώματα, και συγκεκριμένα εναντίον των: *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis* και του κοκίτη. Επίσης σύμφωνα με μια κλινική μελέτη μελετήθηκε η δράση της πρόπολης κατά των παρασίτων του γένους *Giardia* και η in vitro παρεμπόδιση της ανάπτυξης των *G. duodenalis trophozoites* (Freitas et al., 2006).

Αντιφλεγμονώδης δράση πρόπολης:

Η χρήση της πρόπολης για την θεραπεία φλεγμονών του δέρματος ήταν γνωστή από την αρχαιότητα. Κυρίως το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του, αλλά και οι φαινολικές της ενώσεις ευθύνονται για αυτή τη δράση της (Marcucci et al., 1995). Μελέτες έδειξαν πως η πρόπολη προκαλεί μια εξαρτώμενη από τη δόση αναστολή του οιδήματος σε ποντίκια (Bornancin et al., 2007). Επίσης μια άλλη ανάλογη μελέτη σε ποντικούς έδειξε ότι το 20% και το 40% του διαλύματος πρόπολης (95% EtOH) εμφάνισε δόσοεξάρτηση στην αντιφλεγμονώδη δράση (Menezes et al., 1999). Ενώ σε μια άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η αντιφλεγμονώδη δράση της πρόπολης σε αλκαλικό τραύμα του κερατοειδούς των ματιών σε κουνέλια περιόρισε την φλεγμονή τόσο ισχυρά όσο η δεξαμεθαζόνη (Ozturk et al., 2000). Επιπλέον ο φαινοθυλεστέρας καφεϊκού οξέος (CAPE), που περιέχει η πρόπολη, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός στη καταστολή της προκαλούμενης από φλεγμονή δραστηριότητας της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) και της παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτοκινών ενώ ενισχύει τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού στην πειραματική κολίτιδα. Έτσι, συμπεραίνεται ότι ο CAPE θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός θεραπευτικός παράγοντας για

περαιτέρω κλινικές έρευνες για τη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών του εντέρου στους ανθρώπους (Khan et al.,2017).

Συνεργιστική δράση με αντιβιοτικά:

Η παράλληλη χορήγηση πρόπολης μαζί με αντιβιοτικά, μειώνει τις βλάβες που προκαλούν τα αντιβιοτικά στον οργανισμό. Κυρίως τα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης σε συνδυασμό με τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη, κλοξακιλλίνη, αμοξικιλίνη, αμπικιλίνη και κεφαλεξίνη, παρουσιάζουν ισχυρή συνέργεια. Σύμφωνα με έρευνες τα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης ανεξάρτητα από τη μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά, έδειξαν σημαντικές αντιμικροβιακές δραστηριότητες έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων (MIC 0,078% -1,25%) και ζυμομυκήτων (0,16% -1,25%), ενώ τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια ήταν λιγότερο ευαίσθητα (1,25% - 5%). Το *Enterococcus faecalis* ήταν το πιο ανθεκτικό θετικό κατά Gram βακτήριο, η *Salmonella spp.* το πιο ανθεκτικό αρνητικό κατά Gram βακτήριο και η *Candida albicans* η πιο ανθεκτική ζύμη. Η πρόπολη μπορεί να δράσει συνεργιστικά με επιλεγμένα αντιβιοτικά και επέδειξε την ικανότητα να ενισχύσει τις δραστηριότητες των αντιμυκητιασικών παραγόντων. Το εμφανιζόμενο αντιμικροβιακό δυναμικό της πρόπολης μόνο ή σε συνδυασμό με ορισμένα αντιβιοτικά και αντιμυκητιακά φάρμακα, αυξάνει αρκετά και ταυτόχρονα επιμηκύνει τον χρόνο επίδρασης των αντιβιοτικών, γεγονός που έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ιατρική (Antić et al , 2003), (Orsi et al, 2006).

Αναισθητική δράση πρόπολης:

Η πρόπολη λόγω των πτητικών της ελαίων έχει και αναισθητική δράση. Έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένα από τα συστατικά της, όπως η πινοσεμπρίνη, το καφεϊκό οξύ και η πινοστρομπίνη εκδηλώνουν αναισθητική δράση 3 φορές ισχυρότερη από αυτή της κοκαΐνης και 52 φορές μεγαλύτερη από την προκαΐνη, σύμφωνα με έρευνες στον κερατοειδή χιτώνα λαγών. Αυτή η χρήση της ήταν ιδιαίτερα γνωστή από την αρχαιότητα, καθώς την χρησιμοποιούσαν στη θεραπεία στοματικών προβλημάτων και πονόλαιμου (Januzzi, 1993).

Αντιϊκές ιδιότητες πρόπολης

Τα βιοφλαβονοειδή της πρόπολης παρουσιάζουν αντιϊκή δράση, η οποία εκδηλώνεται στα CD4⁺ λεμφοκύτταρα, και αφορά στην παρεμπόδιση της εισόδου του ιού. Ένας άλλος τρόπος εκδήλωσης αυτής της δράσης της είναι η επίδραση της στον αναστολέα της ανάστροφης τρανσκριπτάσης, ζιδοβουζίνης, ενώ δεν έχει βρεθεί να επιδράει με τον αναστολέα της πρωτεάσης ιντιναβίρης. Προκύπτει πως απαιτούνται περισσότερες έρευνες για τη διαπίστωση της συνεισφοράς της πρόπολης ή των περιεχόμενων συστατικών της στη θεραπεία της HIV-1 λοίμωξης (Gekker et al.,

2005). Ακόμη η πρόπολη εξαιτίας της αντιϊκής της δράσης, δρα προφυλακτικά στη γρίπη, την ηπατίτιδα Β και τον έρπητα ζωστήρα. Οι Debiaggi et al. (1990) ερεύνησαν τη δράση διαφόρων φλαβονοειδών της πρόπολης και διαπίστωσαν ότι η χρυσίνη και η καμφερόλη, είχαν ισχυρή ανασταλτική δράση εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό διαφόρων τύπων ερπητοϊών, αδενοϊών και ενός ροταϊού. Όσον αφορά στη θεραπεία του έρπητα γεννητικών οργάνων η πρόπολη έχει ισχυρότερη δράση από ότι η αντιϊκή φαρμακευτική αγωγή με ακυκλοβίρη, κάτι που δείχνει ότι με τη βοήθεια περεταίρω μελετών η χρησιμοποίηση της πρόπολης στη θεραπεία του HIV, μπορεί να θεωρηθεί ευεργετική (De Clercq, 2000). Η πρόπολη λειτουργεί και ως ανοσοδιεγερτική ουσία μέσω μεταβολής της οδού παραγωγής και απελευθέρωσης των χημικών διαβιβαστών κυτοκινών, διεγείροντας το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε τα αντιγόνα να μπορούν να δράσουν άμεσα. Τέλος η πρόπολη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν συμπλήρωμα διατροφής για την πρόληψη ασθενειών και την προαγωγή υγείας, καθώς λόγω των βιοφλαβονοειδών της που διεγείρουν την παραγωγή ιντερφερονών, μπορεί να μεταβάλλει τα συστήματα των κυτοκινών και ιντερφερονών (Vynograd et al., 2000), (De Clercq, 2000).

Αντικαρκινική δράση πρόπολης:

Έχει διαπιστωθεί ότι τα φλαβονοειδή της πρόπολης έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Από έρευνες διαπιστώθηκε ότι κυρίως η Βραζιλιάνικη πρόπολη, έχει κάποια συστατικά με ισχυρή κυτταροτοξικότητα έναντι κυττάρων καρκινώματος ανθρώπινου HT-1080 ινοσαρκώματος και καρκίνου του παχέος εντέρου, σε 26-L5 τρωκτικά. Τα απομονωμένα συστατικά που εκδήλωσαν πιθανή κυτταροτοξικότητα ήταν η betuletol, το kaempferide και η ερμανίνη (Banskota et al., 2000). Σε μια άλλη έρευνα απομονώθηκαν κάποιες ενώσεις από Κινεζική πρόπολη, οι οποίες δοκιμάστηκαν για την αντιπολλαπλασιαστική τους δράση προς πέντε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Το καφεϊκό βενζύλιο και το φαιναιθυλ-καφεϊκό άλας έδειξαν ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα έναντι των δοκιμασμένων κυτταρικών σειρών με επιλεκτική δραστηριότητα προς την κυτταρική γραμμή καρκινώματος του καρκίνου 26-L5 (Usia et al., 2002). Η πρόπολη καθώς και το συστατικό της CAPE (φαιναιθυλεστέρας καφεϊκού οξέος), έχει αναφερθεί ότι επιδεικνύουν αντικαρκινικές δράσεις, μέσω συρρίκνωσης των όγκων και επιλεκτικά καταστρέφουν και παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των κακοήθων κυττάρων διαφόρων τύπων καρκίνου. Το CAPE είναι κυτταροτοξικό ως προς τα καρκινικά κύτταρα και τα μεταλλαγμένα από ιό κύτταρα αλλά μη κυτταροτοξικό ως προς τα φυσιολογικά κύτταρα μέσω δοκιμών σε CD-1 και SENCAR ποντικών (Banskota et al., 1998). Επιπλέον, ο φαιναιθυλεστέρας καφεϊκού οξέος (CAPE), χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία των καρκινικών κυττάρων του στόματος *in vitro* (Kuo et al., 2015). Η πρόπολη και οι εκχυλισμένες ενώσεις της είναι κυτταροτοξικές σε διάφορα κύτταρα όγκου (Watanabe et al., 2011). Επιπλέον, τα ακατέργαστα εκχυλίσματα πρόπολης εξανίου και διγλωρομεθανίου του *Apis mellifera* από την Ταϊλάνδη εμφάνισε αντι-πολλαπλασιαστικές και κυτταροτοξικές δραστηριότητες σε

καρκινικές κυτταρικές σειρές που προέρχονται από το καρκίνωμα του μαστού (BT474), το πνευμονικό καρκίνωμα (ChaCo), το ηπατοβλάστωμα του ήπατος (Hep-G2), το γαστρικό καρκίνωμα και το αδενοκαρκίνωμα κόλου (SW620) (Teerasripreecha et al., 2012). Επιπλέον, η τουρκική πρόπολη ήταν κυτταροτοξική για τα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης μειώνοντας την κυτταρική τους διαίρεση (Erhan Eroglu et al., 2008).

Η συνεργιστική επίδραση των κύριων συστατικών των εκχυλισμάτων πρόπολης συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών (κερσετίνη, πικοεμπρεβίνη και καφεϊκό οξύ) και κινναμικού οξέος οδήγησε σε ισχυρή αναστολή πολλαπλασιασμού και επαγωγής απόπτωσης σε διάφορα καρκινικά κύτταρα (Catchpole et al., 2015), (Reddy et al., 2015), (Seo et al., 2016). Επιπλέον, η αντικαρκινική δραστηριότητα της ακατέργαστης αιγυπτιακής πρόπολης συσχετίστηκε με την αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή της απόπτωσης σε όγκους που είχαν προκληθεί με κυτταρική γραμμή καρκινώματος σε ποντίκια (El-khawaga et al., 2003). Μετά την αξιολόγηση της έκθεσης των κυττάρων σε κάθε εκχύλισμα με ένα αναγνωρισμένο μεταλλαξιογόνο, ταυτόχρονα, τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση στη βλάβη του DNA.

Ηπατοπροστατευτική δράση

Το υδατικό εκχύλισμα πρόπολης έχει ισχυρή ηπατοπροστατευτική δράση έναντι της CCl₄ τοξικότητας σε αρουραίους και προκαλούμενης από D-γαλακτοζαμίνη (GalN)/ λιποπολυσακχαρίτη (LPS) ηπατικής βλάβης σε ποντικούς. Το υδατικό εκχύλισμα έχει σημαντική ηπατοπροστατευτική δραστηριότητα κατά της επαγόμενης από CCl₄ ηπατικής κυτταρικής βλάβης σε καλλιεργημένα ηπατοκύτταρα αρουραίου, κάτι το οποίο αποδίδεται σε 2 ενώσεις, τον μέθυλ-3,4-δι-Ο-καφεούλεστέρα του κινικού οξέος και το 3,4-δι-Ο-καφεούλ-κινικό οξύ, οι οποίες απομονώθηκαν μέσω χημικής ανάλυσης (Basnet et al., 1996). Τα δικαφεούλκινικά οξέα είναι πιθανοί και εκλεκτικοί αναστολείς της ιντεγκράσης του ανθρώπινου ιού ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) και επίσης εμποδίζουν την αντιγραφή του HIV-1 σε μη τοξικές συγκεντρώσεις (King et al., 1999), (Basnet et al., 1996). Σύμφωνα με μια άλλη έρευνα το δείγμα πρόπολης με βοτανική προέλευση *Citrus* sp., έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγώγων του κινικού οξέος και ως εκ τούτου εκδηλώνει τη μεγαλύτερη ηπατοπροστατευτική δράση (Pereira et al., 2003). Γενικότερα τα προϊόντα της μέλισσας ενισχύουν την ανάκτηση των προκαλούμενων από το CCl₄ ηπατικών βλαβών σε αρουραίους. Το μέλι, η πρόπολη, η γύρη και ο βασιλικός πολτός ενισχύουν σημαντικά την επούλωση της προκαλούμενης από CCl₄ ηπατικής βλάβης, κυρίως λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (Aliyazicioğlu et al., 2016). Επίσης η ηπατοπροστατευτική δράση της χρυσίνης που περιέχει η πρόπολη είναι ιδιαίτερα γνωστή, ωστόσο οι μηχανισμοί με τους οποίους ασκεί αυτό το αποτέλεσμα παραμένουν ασαφείς. Οι φλεγμονώδεις οδοί ενεργοποιούνται σε επαγόμενη από το CCl₄ οξεία ηπατική βλάβη, η οποία βελτιώνεται με την προεπεξεργασία της χρυσίνης. Αυτό δείχνει ότι η χρυσίνη

είναι ένας ισχυρός ηπατοπροστατευτικός παράγοντας, όπως και η σιλυμαρίνη στην ίδια δόση, η οποία έχει τη δυνατότητα να είναι μια βιώσιμη εναλλακτική λύση σε σχέση με τις συμβατικές θεραπείες ηπατοπροστασίας (Hermenean et al., 2017).

Ανοσοποιητική δράση

Με την λήψη πρόπολης δια του στόματος, διεγείρεται το γενικό αλλά και το ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την ενδυνάμωση των ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα διεγείρεται η σύνθεση ειδικών αντισωμάτων (agglutinine, praezipitine) και αυξάνεται η περιεκτικότητα του συμπληρώματος και του τμήματος της γ-σφαιρίνης (ή ανοσο-σφαιρίνη, πρωτεϊνικό μόριο με αντισωματική δράση, που παράγεται από τα πλασματοκύτταρα) στον ορό του αίματος. Παράλληλα διαπιστώθηκε και η έλλειψη κάθε τοξικότητας της πρόπολης στον οργανισμό. Ακόμη, παρατηρήθηκε σε ορισμένες μολυσματικές ασθένειες κάποια αντιτοξική δράση, δηλαδή ενώ η ίδια η πρόπολη δεν προξενεί το παραμικρό επιβλαβές σύμπτωμα στον οργανισμό, αφαιρεί ή εξουδετερώνει οποιαδήποτε τοξική δράση από τις τοξίνες. Επίσης έχει μελετηθεί in vitro και αιματολογικά η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος πρόπολης κατά του επιφανειακού αντιγονιδίου της ηπατίτιδας Β και παρατηρήθηκε η χαρακτηριστική ανασταλτική του επίδραση (Μπίκος, 2001).

Επουλωτική δράση

Οι κατεστραμμένοι ιστοί, μπορούν να επουλωθούν γρηγορότερα με την επίδραση της πρόπολης, η οποία οφείλεται κυρίως στο περιεχόμενο των αιθερίων ελαίων της. Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν την προστατευτική δράση της πρόπολης στους ιστούς, που έχουν υποστεί ραδιενέργεια. Επιπλέον λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής της δράσης, έχει επίδραση στην αναγέννηση των κατεστραμμένων κυττάρων (Marquele et al., 2006).

Δράση κατά του σακχαρώδη διαβήτη

Έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις του αιθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος Κινέζικης πρόπολης με δόση 15 mg/mL, και 100 mg/mL, αντίστοιχα, στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης, λιπιδίων και ελεύθερων ριζών στο αίμα αρουραίων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Προέκυψε ότι εξαιτίας των φλαβονοειδών της (κερκετίνη, καμφερόλη, ισοραμνετίνη κ.α), τα δυο εκχυλίσματα, μείωσαν τα επίπεδα γλυκόζης αίματος (FBG), φρουκτοζαμίνης (FRU), μαλονδιαλδεϋδης (MDA), μονοξειδίου του αζώτου (NO), συνθετάσης μονοξειδίου του αζώτου (NOS), ολικής χοληστερόλης (TC), τριγλυκεριδίων (TG), LDL- χοληστερόλης (LDL-C), VLDL- χοληστερόλης (VLDL-C) στον ορό αρουραίων σε νηστεία. Έτσι φαίνεται πως η πρόπολη μπορεί να επιδράσει στη ρύθμιση των

επιπέδων γλυκόζης καθώς και στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων αίματος, και κατ' επέκταση στη μειωμένη οξειδωση λιπιδίων και μείωση του σχηματισμού ελευθέρων ριζών, σε πειραματόζωα. Επίσης η πρόπολη παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης στο μοντέλο του σακχαρώδη διαβήτη και της καρκινογένεσης. Τέλος τα διαλύματα πρόπολης προστατεύουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων μειώνοντας έτσι την νευρωνική τοξικότητα (Fulianga et al., 2005). Σε μια ακόμη έρευνα, κατά την οποία χορηγήθηκε ιρανική πρόπολη σε αρουραίους με σακχαρώδη διαβήτη, μειώθηκε σημαντικά το πάχος της σπειραματικής μεμβράνης και της σπειραματικής περιοχής. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα της πρόπολης μείωσαν σημαντικά την περιεκτικότητα σε μαλονιοδιαδεΐδη και αύξησαν τη δραστικότητα υπεροξειδικής δισμουτάσης και υπεροξειδάσης γλουταθειόνης ($P < 0,001$) μαζί με την ολική αντιοξειδωτική δραστικότητα στον ιστό νεφρών αρουραίων σακχαρώδους διαβήτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ιρανική πρόπολη παρεμπόδισε σημαντικά την απώλεια σωματικού βάρους σε αρουραίους σακχαρώδη διαβήτη και μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης στον ορό και το βάρος νεφρών σε αρουραίους σακχαρώδους διαβήτη ($P < 0,001$) (Bandegi, 2016).

Αντιαλλεργική δράση

Εάν υπάρχει ένδειξη αλλεργικής αντίδρασης η πρόπολη θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε μικρές συγκεντρώσεις στην αρχή και σε μεγαλύτερες στη συνέχεια. Το ποσοστό των αλλεργικών ατόμων στην πρόπολη είναι 1 στους 2000. Η εμφάνιση μιας τέτοιας αλλεργίας γίνεται αντιληπτή από την εμφάνιση κόκκινων κηλίδων, οι οποίες εξαφανίζονται μέσα σε μερικές μέρες. Επίσης ορισμένες από τις αλλεργικές αντιδράσεις κατά τη χορήγηση πρόπολης έχουν αποδοθεί στα ποσοστά γύρης που περιέχει, όμως το πλήθος των αλλεργικών αντιδράσεων σχετίζεται με τους πρενυλεστέρες και τους φαινυλεστέρες του καφεϊκού οξέος (Januzzi, 1990), (Januzzi, 1993).

Προστατευτική δράση έναντι στην ακτινοβολία

Η πρόπολη παρέχει προστασία έναντι στη γ-ακτινοβολία μετά την ενδοπεριτοναϊκή ενέσιμη χορήγηση αιθανολικού εκχυλίσματος της σε ποντίκια (Scheller et al., 1989). Σε μια μελέτη σχετικά με την επίδραση της πρόπολης στην στοματική υγεία των ασθενών με καρκίνο της κεφαλής και του αυχένα έδειξε ότι το υδατικό εκχύλισμα πρόπολης αποτρέπει αποτελεσματικά και θεραπεύει τη βλεννογονίτιδα που προκαλείται από ακτινοθεραπεία σε ασθενείς (Aledavood et al., 2015), (Orsonic et al., 2005).

Προστατευτική δράση έναντι περιοδοντικών προβλημάτων

Η πρόπολη, μπορεί να αποτρέψει τους ερεθισμούς και τις μολυσματικές αιμορραγίες που προκαλούνε εξασθένηση της δομής του οστού και απώλεια του δοντιού. Αυτό συμβαίνει λόγω των βιοφλαβονοειδών, τα οποία μπλοκάρουν τον σχηματισμό προσταγλαδινών, οι οποίες προκαλούν την αποσύνθεση. Επιπλέον ενεργοποιεί τον σχηματισμό ενζύμων, τα οποία ενδυναμώνουν τα τείχη των αιμοφόρων αγγείων των ούλων και του στόματος (Μπίκος, 2001).

1.1.4. Χρήσεις πρόπολης

Η πρόπολη είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε αρκετούς και ποικίλους τομείς. Λόγω των πτητικών της συστατικών, κάποια από τα οποία της προσδίδουν αναισθητική δράση, μπορεί να χορηγηθεί για τοπική αναισθητική χρήση, όπως για τσιμπήματα εντόμων.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τομείς της ιατρικής. Στην Ορθοπεδική για ρευματική αρθρίτιδα, εκφυλιστικές παθήσεις αρθρώσεων με χαρακτήρα φλεγμονής. Στην Πνευμονολογία για άσθμα, τραύματα αναπνευστικών οργάνων και βρογχίτιδες. Στην Χειρουργική για περίθαλψη πληγών, ανοιχτές πληγές λόγω κατάκλισης, πρόληψη και θεραπεία πυωδών δοθεινών και φλεγμονών και στην Ωτορινολαρυγγολογία για θεραπείες ρινίτιδας, ιγμορίτιδας, φαρυγγίτιδας, λαρυγγίτιδας και χρόνιας ωτίτιδας. Ακόμα η ρητίνη που περιέχει αποτελεί το βασικό συστατικό των ιατρικών παρασκευασμάτων.

Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορα σκευάσματα, όπως στοματικά διαλύματα ή ως βάμμα για την θεραπεία των στοματικών ερεθισμών και του πονόλαιμου, αλλά ακόμη και ως αλοιφή στον τομέα της οδοντιατρικής.

Ακόμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις βιομηχανίες αρωματοποιίας και καλλυντικών, με τη δημιουργία αρωμάτων, κρεμών προσώπου και χεριών, σαπουνιών, σαμπουάν πρόπολης, και άλλων σκευασμάτων προσωπικής υγιεινής. Επιπλέον είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στον κλάδο της δερματολογίας και κοσμετολογίας λόγω των αντιμυκητιακών της ιδιοτήτων. Είναι αποτελεσματική εναντίον των προσβολών της επιδερμίδας από παθογόνους μύκητες, όπως *Candida* και *Microsporum*, εξασφαλίζοντας την λάμψη και τη στιλπνότητα του δέρματος, βελτιώνοντας τα τραύματα, τα εγκαύματα, τα έλκη, τη ψωρίαση και τα εκζέματα.

Φυσικά κατέχει μια μεγάλη θέση στην βιομηχανία τροφίμων χάριν σε όλες τις ευεργετικές της ιδιότητες έναντι διαφόρων ασθενειών, με τη χρήση του ως συστατικό σε συμπληρώματα διατροφής, ποτών, κ.α. (Januzzi, 1993). Έτσι μπορεί να ληφθεί ως αντιοξειδωτικό, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης είναι περισσότερο δραστικό από τη βιταμίνη E

και δρα επίσης προστατευτικά έναντι στην οξείδωση του ηλιέλαιου. Πιθανώς να μπορεί να δράσει ως φυσικό συντηρητικό σε τρόφιμα, χωρίς όμως να υπάρχουν επιστημονικές αποδείξεις για αυτό. Αξιοσημείωτο αναφοράς είναι ότι η πρόπολη κυκλοφορεί σε ορισμένες Ευρωπαϊκές χώρες, ως φαρμακευτικό παρασκεύασμα για την καταπολέμηση της υπερπλασίας του προστάτη (Pereira et al., 2002). Έτσι αποτελεί μια εναλλακτική και φυσική μέθοδο θεραπείας και διατροφής (Salatino et al., 2005). Σύμφωνα με τον FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ήπιο συντηρητικό εξαιτίας των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων της, αυξάνοντας έτσι τον χρόνο ζωής των τροφίμων (FAO, 2007).

Μια άλλη χρήση της είναι στην κτηνιατρική, όπου έχει παρατηρηθεί βελτίωση στην πρόσληψη βάρους και μείωση της διάρροιας σε μοσχάρια τα οποία τρέφονταν με γάλα, μέσω της χορήγησης 5ml αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης 20% πρωί και βράδυ. Σε μαστίτιδα αναφέρεται επιτυχής θεραπεία ακόμα και σε φλεγμονές που ανθίστανται στη δραστηριότητα αντιβιοτικών. Επίσης η χορήγηση δια του στόματος αιθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης 3% σε κουνέλια βοήθησε στην θεραπεία του κοκίτη (coccidiosis).

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως φυτοφάρμακο, καθώς δρα αποτελεσματικά σε *in vitro* πειραματικές δοκιμές έναντι του παρασίτου *Botrytis cinerea*, που προσβάλλει τις φράουλες (Bianchi, 1991), (Μπίκος, 2001).

1.1.5. Μορφές πρόπολης

Ακατέργαστη - φυσική πρόπολη: Είναι η φυσική μορφή της χωρίς καμία επεξεργασία, εκτός του καθαρισμού της. Κατά τη μάζηση και την επαφή της με το σάλιο, γίνεται ιδιαίτερα δραστική, και η γεύση της αρκετά καυστική. Ανεξαρτήτως της μορφής της φυσικής πρόπολης, συνιστάται η μάζησή της να γίνεται 1-1/2 ώρα πριν από το φαγητό, 2-3 φορές ημερησίως (Μπίκος, 2001).

Σκόνη πρόπολης: Είναι η αλεσμένη πρόπολη. Επειδή η πρόπολη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι κολλώδης και προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερο αποτέλεσμα κατά την άλεση, συνιστάται να μπαίνει πρώτα στην κατάψυξη, όπου κρυσταλλοποιείται και κατόπιν να κονιοποιείται και στη συνέχεια μπορεί να κοσκινίζεται από ένα ψιλό κόσκινο.

Πρόπολη-πούδρα: Αυτή η μορφή συνήθως προορίζεται για εξωτερική χρήση, όπως σε περιπτώσεις πληγών.

Παστές πρόπολης: Αυτή η μορφή δημιουργήθηκε κυρίως για λόγους ευκολίας κατανάλωσης. Στην πάστα περιέχεται η πρόπολη σε σκόνη αλλά και κάποια κατά βάση ευχάριστη, εδώδιμη, συνδετική ουσία, όπως π.χ. μέλι, βούτυρο κ.α. (Μπίκος, 2001).

Βάμμα πρόπολης: Όπου από την καθαρή πρόπολη έχει αφαιρεθεί πλήρως το κερί και προστίθεται αλκοόλη. Όσον αφορά το βάμμα απαιτείται αποθήκευση σε σκοτεινόχρωμα φιαλίδια και φύλαξη σε σκοτεινό και δροσερό μέρος (Μπίκος, 2001).

Διάλυμα-εκχύλισμα πρόπολης: Τα περισσότερα δραστικά συστατικά της πρόπολης φαίνεται πως είναι διαλυτά στην αιθυλική αλκοόλη (αιθανόλη), αλλά και στη γλυκόλη. Παρά το γεγονός ότι πολύ λίγα συστατικά της πρόπολης είναι διαλυτά στο νερό, εν τούτοις ακόμη και τα υδατικά της εκχυλίσματα παρουσιάζουν κάποιες βακτηριοκτόνες και μυκητοκτόνες και επούλωτικές ιδιότητες. Τα εκχυλίσματα ακετόνης χρησιμοποιούνται για παρασκευή σαμπουάν και λοσιόν. Τα καλλυντικά συχνά δεν περιέχουν περισσότερο από 1% εκχυλίσματος πρόπολης, γεγονός που σημαίνει 0,05-0,06% ενεργά συστατικά. Τα εκχυλίσματα της γλυκόλης είναι πρακτικά για πολλές εφαρμογές που αφορούν καλλυντικά, εξαιτίας της καλύτερης διάλυσής τους σε γαλακτώματα με βάση το νερό (Μπίκος, 2001).

Γενικά η επιλογή του σωστού διαλύτη είναι πολύ σημαντική, εάν το προϊόν προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Κανονικά θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη) ή κατ' εξαίρεση γλυκόλη. Όλες οι άλλες αλκοόλες μπορούν να χρησιμοποιούνται μόνο αν τόσο οι εξωτερικές όσο και οι εσωτερικές αντιδράσεις, που ενδεχομένως παρουσιάζουν είναι επαρκώς γνωστές και ασφαλείς. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει το ενδεχόμενο οι χημικές ουσίες, που προστίθενται για τη μετουσίωση της αλκοόλης, να αντιδράσουν αρνητικά με άλλα συστατικά, μειώνοντας αφ' ενός τις ευεργετικές τους επιδράσεις, αλλά και αφ' ετέρου να προκαλέσουν ερεθισμούς, εγκαύματα ή δηλητηριάσεις. Έχουν αναφερθεί θανατηφόρα περιστατικά από εκχυλίσματα πρόπολης, λόγω χρήσης και μόνο ακατάλληλης αλκοόλης. Από την άλλη μεριά, για τα περισσότερα παρασκευάσματα, που προορίζονται για εσωτερική χρήση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα καθαρά ποτά, που αποστάζονται και παράγονται σε διάφορες χώρες, όπως π.χ. τζιν, βότκα, ρούμι, arrak, ρακί, τσίπουρο κτλ. Αυτά τα ποτά περιέχουν συνήθως λιγότερο, από το θεωρούμενο ως καλύτερο ποσοστό 70% αλκοόλη, αλλά όταν χρησιμοποιούνται για οικιακή χρήση, δίνουν αποδεκτά αποτελέσματα. Για υψηλής όμως ποιότητας εμπορικό προϊόν, σε περιπτώσεις καλλυντικών και φαρμάκων, θα πρέπει να χρησιμοποιείται υψηλής ποιότητας εργαστηριακή ή πόσιμη αλκοόλη. Ακόμη διαφορετικές συγκεντρώσεις αλκοολών, εκχυλίζουν διαφορετικά συστατικά και επηρεάζουν τη διαλυτότητα των ξηρών παραγώγων της πρόπολης. Έτσι εκχυλίσματα που παρασκευάζονται με υψηλότερες συγκεντρώσεις αλκοόλης γίνονται ιδιαίτερα διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες και έλαια. Αντίθετα, τα ξηρά εκχυλίσματα, που προέρχονται από πολύ χαμηλή συγκέντρωση αλκοόλης, είναι πολύ περισσότερο υδατοδιαλυτά (Μπίκος, 2001).

Γαλακτώματα πρόπολης: Οποιοδήποτε διάλυμα αλκοολούχου διαλύματος ή εκχυλίσματος πρόπολης, με νερό ή λάδι, αποτελεί ένα γαλακτώμα πρόπολης (υδατικό ή ελαιούχο διάλυμα

εκχυλίσματος πρόπολης). Χωρίζονται σε στα υδατικά (ρινοστοματική χρήση, λοσιόν, αφτερσείβ κ.α.) και στα ελαιούχα γαλακτώματα (Μπίκος, 2001).

Αλοιφές πρόπολης: Τα αλκοολούχα διαλύματα πρόπολης είναι ιδανικά και για εξωτερικές χρήσεις, όπου κατά την επαφή τους με το δέρμα, νιώθει κανείς ένα “κάψιμο”, το οποίο βέβαια γρήγορα εξαφανίζεται. Οι αλοιφές πρόπολης είναι κατάλληλες για μεγάλες επιφάνειες, σε αντίθεση με τα διαλύματα, και όταν έρχονται σε επαφή με τον αέρα οξειδώνονται στην επιφάνειά τους, ιδιαίτερα αν περιέχουν στη σύνθεσή τους νερό. Η οξείδωση αυτή δεν έχει καμία σχέση με μείωση ή αλλαγή της ποιότητάς τους (Μπίκος, 2001).

1.1.6. Μειονεκτήματα πρόπολης

Εκτός από τα πολλαπλά πλεονεκτήματα χρήσης της πρόπολης, υπάρχουν και μερικά μειονεκτήματα. Για παράδειγμα η πρόπολη έχει έντονη και δυσάρεστη γεύση και οσμή καθώς και υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, όταν παρασκευάζεται το αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης, που αποτελεί την πιο εύχρηστη μορφή διαλύματος. Λόγω αυτών των μειονεκτημάτων, προκύπτουν δυσκολίες στη φύλαξη, τη μεταφορά και τη μετατροπή της σε άλλη μορφή για επεξεργασία (Burdock, 1998). Η πρόπολη για να χαρακτηριστεί καλής ποιότητας πρέπει να έχει τις εξής ιδιότητες:

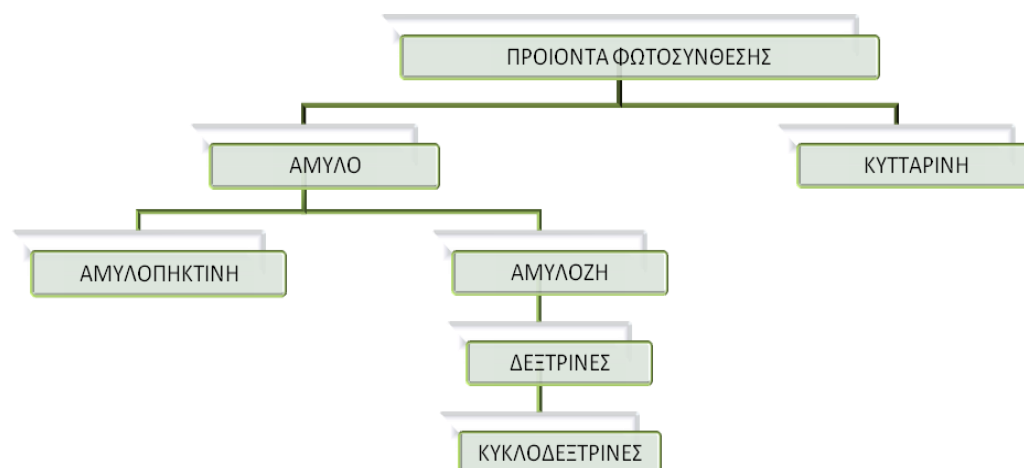
1. Να είναι φρέσκια, όχι μεγαλύτερη των δυο ετών.
2. Να είναι καθαρή.
3. Να μην περιέχει ξένα σώματα, όπως ξύλα, μπογιές κυψελών κτλ.
4. Να περιέχει ρητίνες (παχύρρευστο, άχρωμο υγρό)

Ο μελισσοκόμος μπορεί εύκολα να ελέγξει τους 3 πρώτους παράγοντες, ενώ είναι δύσκολο να ελέγξει την περιεκτικότητα σε ρητίνες και σε πτητικό έλαιο, καθώς αυτά εξαρτώνται τόσο από τις μέλισσες όσο και από την τοποθεσία, την εποχή και το είδος των δένδρων κ.α.

Επίσης έχουν αναφερθεί και μερικές περιπτώσεις αλλεργίας και δερματίτιδας μέσω επαφής. Οι μελισσοκόμοι συνήθως παρουσιάζουν ευαισθησία στην πρόπολη. Τέλος υπάρχουν και ενδείξεις για πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρόπολης και φαρμάκων, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση και σε ανθρώπους (Sforcin, 2016).

1.2. Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες ανακαλύφθηκαν τυχαία στις αρχές του 1890 από τον Γάλλο χημικό και φαρμακοποιό Antoine Villiers, κατά τη διάρκεια πειραμάτων που αφορούσαν την αποδόμηση και αναγωγή των υδατανθράκων από ένζυμα (Crini, 2014). Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι από έξι έως οκτώ μονάδες α-D-γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένες με α-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς, και παράγονται από την ενζυματική υδρόλυση αμύλου από συγκεκριμένα βακτήρια όπως το *Bacillus macerans* (Hedges et al. 1995). Υπεύθυνο για την αποδόμηση του αμύλου είναι το ένζυμο γλυκανοτρασφεράση της κυκλοαμυλόζης ή κυκλοδεξτρίνης (CGTase 4), έτσι οι CDs θεωρούνται ήμι-φυσικά προϊόντα, όπου κάθε μονάδα γλυκοπυρανόζης έχει 3 υδροξυλομάδες (Tilden, 1942).

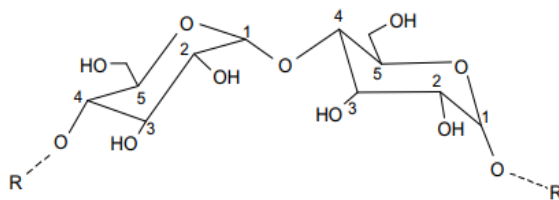


Εικόνα 4: Σχεδιάγραμμα προέλευσης κυκλοδεξτρινών.

Με τη φωτοσύνθεση των φυτών παράγεται άμυλο και κυτταρίνη. Η κυτταρίνη είναι αδιάλυτη σε αντίθεση με το άμυλο που είναι η κύρια αποθήκη ενέργειας του κυττάρου, είναι άμεσα διαλυτό και μετατρέπεται σε βιοχημικά χρήσιμες μορφές από τις οποίες προέρχονται οι κυκλοδεξτρίνες. Το άμυλο αποτελείται από δυο πολυμερή της γλυκόζης, την αμυλόζη και την διακλαδισμένη αμυλοπηκτίνη. Η αμυλόζη περιέχει μόνο 1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ η αμυλοπηκτίνη περιέχει και 1,6 δεσμούς. Με την αποδόμηση των γλυκοζιτικών δεσμών του αμύλου, μέσω διαφόρων ενζύμων, παρουσία νερού προκύπτουν οι κυκλοδεξτρίνες. Στη συνέχεια αν οι δεξτρίνες αποδομηθούν με το ένζυμο της γλυκοζυλτρασφεράσης, το κύριο προϊόν της διάσπασης της αλυσίδας υφίσταται ενδομητριακά κυκλοποίηση, χωρίς την εμπλοκή νερού δίνοντας τις κυκλοδεξτρίνες (Χριστοφορίδης, 2008).

Οι υδροξυλομάδες καθιστούν υδρόφιλη την εξωτερική επιφάνεια τους (στενό άκρο του κώνου) και είναι υπεύθυνες για την μεγάλη διαλυτότητά τους στο νερό. Ενώ το εσωτερικό τους

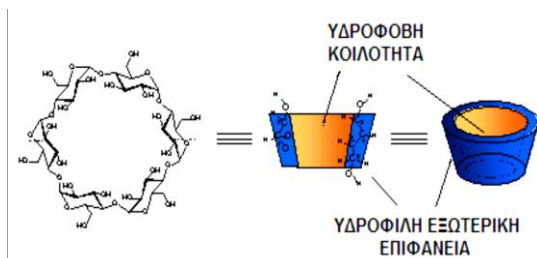
προσφέρει ένα περιβάλλον χαμηλής πολικότητας και ύπαρξης ατόμων υδρογόνου, καθιστώντας το υδρόφοβο. Έτσι οι κυκλοδεξτρίνες είναι ευδιάλυτες στο νερό αφού τα υδροξύλια βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια τους.



Εικόνα 5: Απεικόνιση α -1,4-γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ δύο μορίων γλυκοκυρανόζης.

Οι τρεις πιο σημαντικές φυσικές κυκλοδεξτρίνες είναι η α -κυκλοδεξτρίνη (α -CD), η β -κυκλοδεξτρίνη (β -CD) και η γ -κυκλοδεξτρίνη (γ -CD), οι οποίες περιέχουν έξι, επτά και οκτώ μονάδες α -D-γλυκοκυρανόζης αντίστοιχα. Η ονοματολογία τους αυτή, εξυπηρετεί στη διάκριση των μορίων με βάση μόνο το μέγεθος του δακτυλίου. Τα μόρια σχηματίζουν υδρόφοβες κοιλότητες σχήματος κόλουρου κώνου και διαμέτρου 0.6, 0.8 και 1.0 nm, αντίστοιχα. Εκτός από τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες υπάρχουν και οι τροποποιημένες με σκοπό την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων τους, τη βελτίωση της σύνδεσης-αλληλεπίδρασης των εγκλωβιζόμενων μορίων με τις κυκλοδεξτρίνες, την έκλυση συγκεκριμένων καταλυτικών ομάδων στη θέση σύνδεσης και τον σχηματισμό νανοδομών που περιέχουν κυκλοδεξτρίνες, όπως πολυμερή, γέλη και νανοσωματίδια (Szetli, 2004). Μέσω υποκατάστασης του υδρογόνου των υδροξυλομάδων της κυκλοδεξτρίνης με διάφορες άλλες ομάδες όπως άλκυλο-, υδροξυάλκυλο, καρβοξυλοάλκυλο-, αμινο-, θείο- γλυκόσυλο- και άλλες, μπορούν να παραχθούν μια σειρά από τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες. Η ποικιλία στο μέγεθος της κοιλότητας σε συνδυασμό με τον αμφίφυλο χαρακτήρα τους (υδρόφοβη κοιλότητα-πολικά άκρα) καθιστούν τις κυκλοδεξτρίνες σημαντικά συστήματα στην υπερμοριακή χημεία για την κατανόηση του μηχανισμού εγκλεισμού υδρόφοβων μορίων ή υδροφοβικών τμημάτων τους στην κοιλότητά τους προς σχηματισμό υπερμοριακών συμπλόκων (καλούνται και προϊόντα εγκλεισμού).

Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν τη μορφή κόλουρου κώνου και αποτελούν χημικά και φυσικά σταθερά μόρια έχοντας τη δυνατότητα να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού με ποικίλες οργανικές ενώσεις, οι οποίες εγκλείονται εν μέρει ή ολόκληρες εντός της σχετικά υδρόφοβης κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης, αποδεσμεύοντας ταυτόχρονα τα λίγα μόρια νερού υψηλής ενθαλπίας από το εσωτερικό της.



Εικόνα 6: Διαμόρφωση μονάδων γλυκοκυρανόζης.

Η εξωτερική επιφάνεια των κυκλοδεξτρινών είναι υδρόφιλη και η εσωτερική υδρόφοβη. Το μέγεθος της κοιλότητας των κυκλοδεξτρινών επιτρέπει επιλεκτικότητα για την συμπλοκοποίηση των φιλοξενούμενων μορίων (Szejtli 1998). Ο εγκλεισμός των μορίων στο εσωτερικό των CDs στηρίζεται σε ασθενείς διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, καθιστώντας εύκολη την απελευθέρωση τους στο περιβάλλον. Αυτή η ιδιότητα των CDs έχει διπλή σημασία. Αφενός με τον εγκλεισμό προστατεύεται το ξενιζόμενο μόριο (guest) με αποτέλεσμα να τροποποιούνται οι φυσικές, χημικές και βιολογικές του ιδιότητες και αφετέρου, εξαιτίας των ασθενών αλληλεπιδράσεων που το συγκρατούν στο εσωτερικό του ξενιστή, προκαλείται αργή απελευθέρωσή του στο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό οι CDs βρίσκουν εφαρμογή σε αρκετούς τομείς της βιομηχανίας (Astray et al., 2009).

Πίνακας 4: Περιγραφή βασικών χαρακτηριστικών της α -, β - και γ - κυκλοδεξτρίνης.

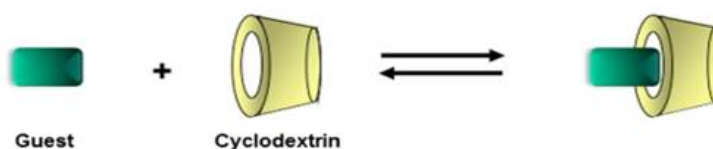
Χαρακτηριστικά	α -CD	β -CD	γ -CD
Αριθμός μονάδων γλυκοκυρανόζης	6	7	8
Μοριακό βάρος	972	1135	1297
Διαλυτότητα στο νερό (g/100 ml)	145	18,5	232
Διάμετρος κεντρικής κοιλότητας (Å)	4,7 - 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Ύψος του κώνου (Å)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Διάμετρος εξωτερικής περιφέρειας (Å)	14,6 ± 0,4	15,4 ± 0,4	17,5 ± 0,4

Η γ -CD υδρολύεται από την ανθρώπινη σιελό και τις παγκρεατικές αμυλάσες, σε αντίθεση με τις α και β -CDs, οι οποίες μπορούν να ζυμωθούν από την εντερική μικροχλωρίδα. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι μόρια μεγάλου μεγέθους και υδρόφιλα με αρκετό αριθμό ατόμων που δρουν ως δότες ή δέκτες πρωτονίων. Συνεπώς, δεν απορροφούνται από το γαστρεντερικό σύστημα στην κανονική τους μορφή. Οι υδρόφιλες κυκλοδεξτρίνες είναι μη τοξικές σε χαμηλές και μέτριες δοσολογίες, ενώ τα λιπόφιλα παράγωγα τους (μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες) απορροφούνται από το γαστρεντερικό σύστημα και πιθανώς να εμφανίζουν τοξικότητα, κυρίως μετά από παρεντερική χορήγηση. Ωστόσο οι τοξικές επιδράσεις τους είναι αμελητέες και περιορίζονται με την επιλογή του κατάλληλου τύπου CD ή παραγώγου της (Magnusdottir et al., 2002). Επίσης το σημείο τήξης των CDs δεν είναι πλήρως καθορισμένο, ωστόσο τα μόρια αρχίζουν να αποσυντίθενται σε θερμοκρασίες άνω των 270 °C (Zhang et al., 1994). Στο εμπόριο διατίθενται διάφορα παράγωγα των β -CDs, με τα

πιο σημαντικά να είναι οι ετερογενείς, άμορφες, υψηλής υδατοδιαλυτότητας μεθυλιωμένες β -CDs και 2- υδροξυπροπυλιωμένες β -CDs. Τα τροποποιημένα παράγωγα της β -CD, που έχουν μελετηθεί αρκετά είναι η επτάκις (2,6-δι-Ο-μέθυλο)- β -CD (DIMEB) και η επτάκις (2,3,6-τρι-Ο-μέθυλο)- β -CD (TRIMEB). Η DIMEB είναι αρκετά διαλυτή στο κρύο νερό αλλά αδιάλυτη στο ζεστό και επομένως ο καθαρισμός καθώς και η απομόνωση των συμπλόκων της είναι αρκετά απλή. Αν και είναι διαθέσιμη με ποσοστό καθαρότητας πάνω από 95% για την παρασκευή φαρμάκων σε ενέσιμη μορφή, εντούτοις σε πολλές βιομηχανίες προτιμάται η φθηνότερη τυχαία μεθυλιωμένη β -CD (Randomly Methylated β -CD, RAMEB).

1.2.1. Εγκλεισμός ξενιζόμενων μορίων σε κυκλοδεξτρίνες

Το προϊόν εγκλεισμού αποτελεί μια ξεχωριστή μορφή χημικού συμπλόκου όπου ένα μόριο εγκλείεται μέσα σε ένα άλλο ή σε συσσωμάτωμα μορίων μέσω μιας διαδικασίας μοριακής αναγνώρισης. Βασικό είναι το εγκλεισμένο-ξενιζόμενο μόριο να έχει κατάλληλο σχήμα και μέγεθος, ώστε να προσαρμόζεται στο εσωτερικό της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης. Η επίτευξη του εγκλεισμού καθορίζεται από τη στερεοχημεία και την πολικότητα του ξενιστή, όσο και του ξενιζόμενου μορίου. Οι χωρικές απαιτήσεις για τον σχηματισμό ενός προϊόντος εγκλεισμού σε CDs μοιάζουν με τον μηχανισμό «κλειδιού-κλειδαριάς» της ενζυμικής κατάλυσης όσον αφορά την σύνδεση του ενεργού κέντρο και του ξενιστή. Ο σχηματισμός προϊόντων εγκλεισμού περιλαμβάνει αρκετά βήματα. Όσο μικρότερο είναι το ξενιζόμενο μόριο, τόσο πιο επιτυχημένη είναι η συμπλοκοποίηση, εφόσον υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ξενιζόμενου μορίου και της κοιλότητας του ξενιστή. Το μέγεθος της κοιλότητας των κυκλοδεξτρίνων ορίζει σε μεγάλο βαθμό την επιλεκτικότητα εγκλεισμού ξενιζόμενων μορίων. Ωστόσο αρκετοί άλλοι παράγοντες επηρεάζουν τον σχηματισμό προϊόντων εγκλεισμού, όπως: οι χαρακτηριστικές ομάδες της κυκλοδεξτρίνης, η θερμοκρασία, το pH και η μέθοδος προετοιμασίας.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση εγκλεισμού.

Αρκετές φορές, παρατηρείται μερικός εγκλεισμός μεγάλων μορίων που διαθέτουν κατάλληλες ομάδες ή δακτυλίους ικανών να εισέλθουν στον θύλακα του μακρόκυκλου της κυκλοδεξτρίνης. Στις περιπτώσεις αυτές, μόνο τα λιπόφιλα τμήματα αυτών των μορίων εγκλωβίζονται στην λιπόφιλη κοιλότητα της CD και όχι ολόκληρα τα μόρια. Γενικότερα οι ενώσεις με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα παρουσιάζουν την μεγαλύτερη % αύξηση σε διαλυτότητα σε σχέση με την συγκέντρωση των CDs (Marques, 2010). Η υδροφοβικότητα του ξενιζόμενου μορίου αποτελεί την κύρια κινητήρια δύναμη για το σχηματισμό σε

υδατικό διάλυμα προϊόντων εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες αφού έχει παρατηρηθεί ότι μεταξύ υποψηφίων ξενιζομένων μορίων με παρόμοιες διαστάσεις, τα πιο υδρόφοβα εμφανίζουν την μεγαλύτερη συγγένεια με την κοιλότητα των CDs, η οποία παρέχει ένα υδρόφοβο μικρό-περιβάλλον (Carrier et al., 2007). Ο εγκλεισμός υδρόφοβων μορίων σε κυκλοδεξτρίνες προκαλεί σημαντικές μεταβολές στις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες τους. Συγκεκριμένα, η βελτίωση της υδατοδιαλυτότητας, της ταχύτητας διάλυσης, της σταθερότητας και της διαπερατότητας βιολογικών μεμβρανών αυξάνει σε σημαντικό βαθμό τη βιοδιαθεσιμότητα αυτών των ουσιών.

1.2.2. Δυνάμεις εγκλεισμού

Ο εγκλεισμός των μορίων στο εσωτερικό των CDs στηρίζεται σε ασθενείς ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, που εξαρτώνται από το είδος του μορίου ξενιστή και τον διαλύτη, καθιστώντας εύκολη την απελευθέρωση τους στο περιβάλλον. Ο εγκλεισμός του ξενιζόμενου μορίου στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, στηρίζεται στις παρακάτω δυνάμεις:

- Δυνάμεις van der Waals
- Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις
- Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις
- Δεσμοί υδρογόνου
- Αλληλεπιδράσεις λόγω μεταφοράς φορτίου
- Προσαρμογή της διαμόρφωσης του μορίου ξενιστή, ώστε να επιτευχθεί ο εγκλεισμός και να προκύψει προϊόν χαμηλότερης ενέργειας.
- Απελευθέρωση των υψηλής ενθαλπίας μορίων νερού (συνήθως χρησιμοποιείται ως διαλύτης) από την κοιλότητα και η αντικατάσταση τους από ξενιζόμενα μόρια που οδηγούν το τελικό υπερμοριακό σύστημα σε κατάσταση χαμηλότερης ενθαλπίας (Liu&Guo, 2002).

1.2.3. Διαλυτότητα κυκλοδεξτρινών

Το εσωτερικό του κόλουρου κώνου των κυκλοδεξτρινών προσφέρει ένα περιβάλλον χαμηλότερης πολικότητας από εκείνο του νερού και έτσι μπορεί να θεωρηθεί ως «υδρόφοβη κοιλότητα». Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να σχηματίσουν διαλυτά, αναστρέψιμα προϊόντα εγκλεισμού με ενώσεις χαμηλής υδατοδιαλυτότητας. Γενικά η υδατοδιαλυτότητα των CDs είναι ιδιαίτερη. Η β -CD είναι η πιο δυσδιάλυτη αφού η διαλυτότητά της είναι τουλάχιστον εννέα φορές λιγότερο διαλυτή (1,85 g / 100 mL σε θερμοκρασία δωματίου) από τις άλλες CDs (14,5 g / 100 mL και 23,2 g / 100 mL για α - και γ -CD, αντίστοιχα). Η διαλυτότητα των CD εξαρτάται έντονα από τη

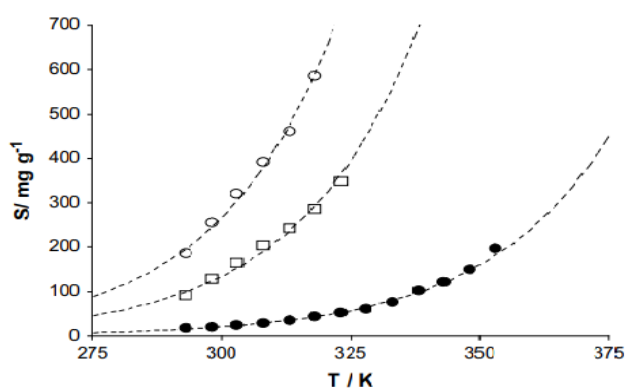
θερμοκρασία όπως παρουσιάζεται στο γράφημα της Εικόνας 8, που αποδίδει τις γραφικές παραστάσεις των εξισώσεων: (1) για α -CD, (2) για β -CD και (3) για γ -CD, όπου c είναι η συγκέντρωση CD σε mg / mL και T είναι η θερμοκρασία σε K (Astray et al., 2009).

$$c_{\alpha\text{-CD}} = (112.71 \pm 0.45)e^{-(3530 \pm 31)[(1/T) - (1/298.1)]} \quad (1)$$

$$c_{\beta\text{-CD}} = (18.3236 \pm 0.099)e^{-(14137 \pm 31)[(1/T) - (1/298.1)]} \quad (2)$$

$$c_{\gamma\text{-CD}} = (219.4 \pm 9.8)e^{-(3187 \pm 320)[(1/T) - (1/298.1)]} \quad (3)$$

Οι θερμοδυναμικές ιδιότητες των α - και γ -CD είναι παρόμοιες. Η μειωμένη διαλυτότητα της β -CD σε νερό φαίνεται ότι οφείλεται στην χαρακτηριστική δομή νερού που προκύπτει από τις αλληλεπιδράσεις νερού - β -CD, προκαλώντας αντιστάθμιση της ευνοϊκής ενθαλπίας από την δυσμενή εντροπία του διαλύματος.



Εικόνα 8: Διαλυτότητα (mg CD/g H₂O) της (□) α -CDs, (●) β -CDs και (○) γ -CDs στο νερό, συνάρτηση της θερμοκρασίας (K) (Astray et al.,2009)

1.2.4. Εφαρμογές και χρήσεις του μοριακού εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν σήμερα πάρα πολλά πεδία εφαρμογών. Η εκτεταμένη χρήση τους οφείλεται σε:

- Σταθεροποίηση ευοξειδωτων ουσιών ή ευαίσθητων στο φως, το οξυγόνο και στην θερμότητα
- Σταθεροποίηση βιοδραστικών μορίων και πτητικών ενώσεων (αιθερίων ελαίων, κ.ά)
- Κάλυψη δυσάρεστων οσμών ή γεύσεων
- Αύξηση υδατοδιαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας διαφόρων ουσιών
- Βραδεία απελευθέρωση (F. Gibbs, 1999)

- Χρήση τους στη βιομηχανία πολυμερών για τη βελτίωση αντοχής τους

Επομένως, οι βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων είναι εκείνες που χρησιμοποιούν κατά κόρον τα βιομόρια των κυκλοδεξτρινών (Valle, 2004).

Οι σημαντικότερες χρήσεις τους είναι οι εξής:

Φαρμακοβιομηχανία:

Στη βιομηχανία φαρμάκων χρησιμοποιούνται κυρίως για τους παρακάτω λόγους:

- Μετατροπή των υγρών ενώσεων σε κρυσταλλική μορφή
- Μείωση πτητικότητας
- Μείωση τοξικότητας φαρμάκων
- Κάλυψη δυσάρεστων γεύσεων, οσμών των φαρμάκων
- Αύξηση βιοδιαθεσιμότητας
- Αποφυγή ανεπιθύμητων ασυμβατοτήτων
- Αύξηση σταθερότητας φαρμάκου παρουσία φωτός, αυξημένης θερμοκρασίας και οξειδωσης

Είναι ίσως ο σημαντικότερος τομέας εφαρμογής των κυκλοδεξτρινών, καθώς με τον εγκλεισμό των ίδιων των φαρμάκων ή των πρόδρομων μορφών τους σε κυκλοδεξτρίνες θα μπορούν να διαλύονται ευκολότερα μέσω των συμπλόκων τους, αλλά και να απορροφώνται σε μεγαλύτερο βαθμό και να εξασφαλίζεται η παραμονή τους στον οργανισμό για περισσότερο χρονικό διάστημα. Επίσης οι CDs εφαρμόζονται στην παρασκευή κάποιων φαρμακευτικών ουσιών όπως τα στεροειδή, όπου είναι αδύνατο να επιτευχθούν οι επιθυμητές αντιδράσεις με συμβατική χημεία. Για παράδειγμα η χοληστερόλη προκειμένου να μετατραπεί στην τεστοστερόνη, οξειδώνεται με τη βοήθεια των ενζύμων και ειδικών μικροοργανισμών που καλλιεργούνται στις βιομηχανίες. Επειδή η χοληστερόλη είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό, στις δεξαμενές της ζύμωσης πρέπει να προστεθεί κάποιος οργανικός διαλύτης. Τότε όμως οι μικροοργανισμοί δεν αυξάνονται κανονικά και η επιθυμητή μετατροπή γίνεται σε μικρή έκταση. Έτσι η προσθήκη κυκλοδεξτρίνης κάνει την χοληστερόλη πιο υδατοδιαλυτή ώστε η οξείδωση να γίνεται γρηγορότερα και σε μεγαλύτερη απόδοση. Ακόμη η ερεθιστική επίδραση της νικοτίνης επηρεάζει την άμεση κατανάλωση της υπο τη μορφή ταμπλέτας ή τσίχλας, αλλά το σύμπλοκο νικοτίνη/ β -κυκλοδεξτρίνη εμποδίζει την άμεση επαφή της ουσίας με την βλεννογόνο μεμβράνη, αφού η πρώτη εγκλωβίζεται στο μόριο της β -CD. Για παράδειγμα το προϊόν NICORETTEMICROTAB περιέχει νικοτίνη σε μορφή συμπλόκου με β -CD (Szejtli, 2004).

Οι CDs χρησιμοποιούνται, λοιπόν ως καταλύτες για να επιταχύνουν τις αντιδράσεις μη υδατοδιαλυτών ουσιών και με τον τρόπο αυτό να ενισχυθεί η σύνδεση κάποιων ουσιών και η ταχύτητα των αντιδράσεων μπορεί έως και να δεκαπλασιαστεί. Συγκεκριμένα οι μεθυλιωμένες, υδροξυπροπυλιωμένες, ακετυλιωμένες και πολυμερή των β -CD χρησιμοποιούνται στη σύνθεση υδατοδιαλυτών και αδιάλυτων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων όπως απαιτείται. Επίσης

εφαρμόζονται στα υδατικά σκευάσματα δέρματος, και σε διαλύματα στοματικής πλύσης σε ρινικά σκευάσματα και σε οφθαλμικές σταγόνες (Loftsson & Masson, 2001).

Εφαρμογή στη διαχείριση οσμηρών ενώσεων

Ουσίες με έντονη και ανεπιθύμητη μυρωδιά μπορούν να δεσμευτούν από τις κυκλοδεξτρίνες. Επίσης κάποια αρωματικά συστατικά γεύσεων (όπως στις τσίχλες και καραμέλες) στα οποία η γεύση και το άρωμα τους απαιτεί διάρκεια, μπορούν να τοποθετηθούν σε CDs και έτσι να απελευθερώνονται αργά και σταδιακά. Επιπλέον θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και στην καπνοβιομηχανία για την βελτίωση αρώματος και γεύσης. Ακόμη τοξικές ουσίες από βιομηχανικά λύματα μπορούν να απομακρυνθούν, μετά την πρόσδεση των κυκλοδεξτρινών σε κάποιο αδιάλυτο υπόστρωμα.

Εφαρμογή στη αναλυτική χημεία

Οι CDs χρησιμοποιούνται ως καταλύτες για τη βελτίωση της εκλεκτικότητας των διαφόρων χημικών αντιδράσεων. Μια ακόμη εφαρμογή τους είναι ο διαχωρισμός ρακεμικών μιγμάτων, καθώς οι κυκλοδεξτρίνες λόγω της χειρομορφίας τους χρησιμοποιούνται ως προσροφητικά υλικά σε χρωματογραφικές τεχνικές, με σκοπό την ανάκτηση «οπτικών καθαρών» ισομερών. Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται στις χρωματογραφικές μέθοδοι όπως η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, στην αέρια χρωματογραφία, τη ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή σωλήνα και στην υψηλής απόδοση υγρή χρωματογραφία. Η παρουσία κυκλοδεξτρινών (και παραγώγων τους) είτε ως προσθετικά στην κινητή φάση, είτε ως χημικά συνδεδεμένα στην σταθερή φάση, μπορεί να βελτιώσουν την ικανότητα διαχωρισμού και την ταχύτητα της ανάλυσης και να οδηγήσουν στο διαχωρισμό στενά συνδεδεμένων ενώσεων, και ειδικά των εναντιομερών. Για το διαχωρισμό των εναντιομερών χρησιμοποιούνται στήλες με πληρωτικό υλικό φυσικές ή τροποποιημένες CDs. Έτσι η DIMEB έχει αποτελεσματική χρήση στο διαχωρισμό μορίων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα η παγίδευση μόνο του S εναντιομερούς της σπιροακετάλης στη DIMEB (S-spiroacetal) (Li&Purdy, 1992), (Tsoucaris,1996).

Εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών

Έχουν προταθεί για εφαρμογές στην επεξεργασία τροφίμων και ως πρόσθετα τροφίμων με διάφορους σκοπούς. Με την χρήση των κυκλοδεξτρινών ως πολυλειτουργικά συστατικά τροφίμων παρέχεται η προστασία των λιπόφιλων συστατικών των τροφίμων που είναι ευαίσθητα στον υποβιβασμό από το οξυγόνο, την ακτινοβολία ή τη θερμότητα, και επίτευξη ελεγχόμενης απελευθέρωσης ορισμένων συστατικών τροφίμων (Astray et al., 2009). Έτσι οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν μέσω χρήσης τους ως μεταφορείς για μοριακό εγκλεισμό να αυξήσουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων και ποτών. Βασικοί στόχοι του εγκλεισμού είναι η αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των αδιάλυτων ουσιών, η ελάττωση της πηκτικότητας, η εξασφάλιση της περιβαλλοντικής προστασίας

και ο έλεγχος της απελευθέρωσης των συστατικών. Οι CDs χρησιμοποιούνται ως γλυκαντικοί παράγοντες αφού έτσι εξασφαλίζεται ο χαμηλός γλυκαιμικός δείκτης, κάτι που είναι ωφέλιμο σε άτομα με διαβήτη. Μπορούν να εξαλείψουν ή να μειώσουν την πικρή και άσχημη γεύση των τροφίμων και ποτών. Επίσης μια άλλη εφαρμογή τους είναι σε συσκευασίες τροφίμων που να περιέχουν CDs μαζί με αντιμικροβιακούς παράγοντες μειώνοντας την απώλεια των οργανοληπτικών συστατικών και αυξάνοντας τη διάρκεια συντήρησης και αποθήκευσης του προϊόντος. (Szejtli, 1998). Επομένως οι CDs ή τα σύμπλοκά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντισηπτικά και συντηρητικά στα τρόφιμα.

Εφαρμογή στη βιομηχανία καλλυντικών

Πλέον, ο ρυθμός χρησιμοποίησης των κυκλοδεξτρινών σε αρκετές βιομηχανίες καλλυντικών και κυρίως βιομηχανίες που παράγουν φυσικά καλλυντικά για τον εγκλεισμό των δραστικών ουσιών των διαφόρων σκευασμάτων και προϊόντων, αυξάνεται ραγδαία. Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σταθεροποιητές, γαλακτωματοποιητές σε κρέμες, σπρέι αποσμητικά, αρώματα, σαμπουάν, οδοντόκρεμες και άλλα προϊόντα προσωπικής περιποίησης. Σημαντικό παράδειγμα εγκλεισμού είναι η δ-τοκοφερόλη σε α -CD, αλλά και αρκετών συστατικών εκχυλίσματος πρόπολης σε β -CD (Kalogeropoulos et al., 2009).

Έτσι οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ως ξενιστές, καθώς:

- Αυξάνουν τη διαλυτότητα των δύσκολα διαλυτών συστατικών.
- Παρέχουν προστασία στον δραστικό συστατικό από την οξείδωση και αποικοδόμηση.
- Με τον προσωρινό εγκλεισμό επιτυγχάνεται η σταδιακή και αργή απελευθέρωση, γεγονός που αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών αυτών.
- Με τον εγκλεισμό αναστέλλεται η φυσική αποικοδόμηση των εγκλεισμένων συστατικών ενισχύοντας την δράση τους με την πάροδο του χρόνου.
- Καθώς η αντίδραση εγκλεισμού είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία και τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα έχουν κρυσταλλική δομή, έτσι αυξάνεται η ανθεκτικότητα τους σε περιβάλλον πίεσης και στρες.

Γεωργία και προστασία του περιβάλλοντος

Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν σύμπλοκα με αρκετά αγροχημικά, όπως ζιζανιοκτόνα εντομοκτόνα, φωτορυθμιστικές ουσίες, μυκητοκτόνα και εντομοαπωθητικά. Με τον εγκλεισμό τους μπορούν να καταναλώνονται σε μικρότερες ποσότητες οι δραστικές ουσίες, καθώς έτσι προσφέρεται βραδεία αποδέσμευση και μεγαλύτερη διάρκεια από η στιγμή της εφαρμογής. Έτσι, τα «συμπλοκοποιημένα» μόρια, μπορούν να θεωρηθούν «αποθήκες» του φυτοφαρμάκου. Προκύπτει λοιπόν, ότι οι CDs μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην προστασία

του περιβάλλοντος και την μείωση της μόλυνσης, γιατί με τη συμπλοκοποίηση μπορούν να διαλυτοποιήσουν, να συμπυκνώσουν και να απομακρύνουν από το νερό, το έδαφος και την ατμόσφαιρα τους οργανικούς ρύπους και τα βαρέα μέταλλα. Τέλος ελαττώνουν την τοξικότητα των υδατανθράκων και επιταχύνουν την βιοαποικοδόμηση τους στο έδαφος με σκοπό να χρησιμοποιηθούν από τα φυτά και τον μικροβιακό πληθυσμό του εδάφους ως πηγή άνθρακα-ενέργειας. Επομένως η χρήση των κυκλοδεξτρινών στη γεωργία αποτελεί μια αποδοτική λύση και μια καλή επιλογή για την προστασία του περιβάλλοντος, κάτι ιδιαίτερα αναγκαίο τα τελευταία χρόνια (Szejtli,1985).

Εφαρμογή στην βιοτεχνολογία

Οι κυκλοδεξτρίνες ανάλογα με τις αντιδράσεις των ενζύμων, παρέχουν ένα υδρόφοβο μικροπεριβάλλον σε υδατικό διάλυμα. Τα ένζυμα παρέχουν επιλεκτικές υδρόφοβες κοιλότητες και καταλύουν τις αντιδράσεις των υποστρωμάτων. Η κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης λειτουργεί σαν ενεργό κέντρο και τα υδροξύλια παίζουν το ρόλο του καταλύτη (Ariaga, et al., 2006).

1.2.5. Επιτρεπτά όρια κυκλοδεξτρινών στις βιομηχανίες

Οι CDs γενικότερα έχουν φυσική προέλευση και είναι αβλαβείς ως προς τον άνθρωπο. Τα ρυθμιστικά επιτρεπτά όρια τους δεν είναι απόλυτα οριοθετημένα και διαφέρουν από χώρα σε χώρα. Πρόκειται για μη-τοξικά συστατικά, που δεν απορροφούνται από το γαστρεντερικό σύστημα και μεταβολίζονται πλήρως από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Στις ΗΠΑ οι α -, β - και γ - CDs υπάγονται στη λίστα των εγκεκριμένων ουσιών για τα πρόσθετα τροφίμων που είναι γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή που καταρτίζει η FDA, με την ένδειξη GRASS (Generally Regarded As Safe) (Loftsson et al.,2005). Στην Ιαπωνία οι α - β - και γ -CD αναγνωρίζονται ως φυσικά προϊόντα και η εμπορία τους στον τομέα των τροφίμων περιορίζεται μόνο για λόγους καθαρότητας. Αντίστοιχα στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία η α - και η γ -CD ταξινομούνται ως καινοτόμα - Novel Foods από το 2004 και το 2003. Η μέγιστη συνιστώμενη δόση της επιτροπής FAO/WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA), είναι 5 mg/kg ημερησίως για τη β -CD στα τρόφιμα. Για την α - και γ -CD δεν υπάρχει καθορισμένη αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) λόγω των ευνοϊκών τοξικολογικών προφίλ τους. Επιπλέον, το 2005, η Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (EPA) απέρριψε την ανάγκη να θεσπιστεί ένα μέγιστο επιτρεπτό επίπεδο για τα υπολείμματα α -, β - και γ -CD σε διάφορα τρόφιμα (Ομοσπονδιακό Μητρώο των ΗΠΑ, 2005) (Astray et al., 2009). Μέσω πειραμάτων εύρεσης και σχεδιασμού αποτελεσματικών φορέων φαρμάκων, οι αλκυλιωμένες CDs έχουν εγκριθεί για φαρμακευτικές χρήσεις, καθώς έχουν ελάχιστη ή αμελητέα τοξικότητα (Bar & Ulitzur,1994). Η υδροξυπροπυλ- β -CD (HP- β -CD) αναφέρεται στον κατάλογο των Φαρμακευτικών

Συμπληρωματικών Φαρμάκων της FDA. Τόσο η α -CD όσο και η β -CD παρατίθενται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποία (Ph.Eur.) Καθώς και η γ -CD αναφέρεται στον Ιαπωνικό Φαρμακευτικό Κώδικα (JPC) και συμπεριλαμβάνεται στο Ph.Eur. (Marques, 2010).

Προσφάτως, η β -CD έχει χρησιμοποιηθεί στην κοσμητική, τη φαρμακευτική και τη βιομηχανία τροφίμων και σύμφωνα με την Οδηγία 1333/2008 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, κατηγοριοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων με τον κωδικό E459. Είναι μη τοξική, εδώδιμη, μη υγροσκοπική, χημικώς σταθερή και διαχωρίζεται εύκολα από το σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Η ετήσια παραγωγή για την β -CD ανέρχεται σε 9×10^9 τόνους και η τρέχουσα τιμή στα 6 US\$ το κιλό.

Όπως και το συμπλήρωμα διατροφής η συνολική ημερήσια δια του στόματος δόση της α -CD μπορεί να φθάσει τα 6000 mg/ημέρα, για β -CD τα 500 mg/ημέρα, για γ -CD 10000 mg/ημέρα, και για HP- β -CD ως φάρμακο δια του στόματος χορήγησης τα 8000 mg/ημέρα. Οι δια του στόματος χορηγούμενες κυκλοδεξτρίνες σε υψηλές δόσεις (> 1000 mg/kg/ημέρα) μπορεί να προκαλέσουν αναστρέψιμη διάρροια και διεύρυνση του τυφλού στα ζώα και στους ανθρώπους σε μικρό βαθμό. Έχει βρεθεί ότι υπόθετα με έως και 230 mg β -CD και 12% HP- β -CD δεν προκαλούν ερεθισμό στον ορθικό βλεννογόνο στους ανθρώπους και τα κουνέλια αντίστοιχα. Ωστόσο, η α -CD ενδεχομένως προκαλεί βλάβη στο στρώμα των επιθηλιακών κυττάρων. Μελέτες σε ανθρώπινους εθελοντές έχουν δείξει ότι οι κυκλοδεξτρίνες έχουν σημαντικό περιθώριο ασφαλείας στην εφαρμογή τους στο δέρμα, στην οποία οι κυκλοδεξτρίνες σε νερό ή βαζελίνη εφαρμόστηκαν στο δέρμα για 24 ώρες.

Επιπλέον, οι β -CD είναι αποδεδειγμένο ότι δεν προκαλούν ερεθισμό ή αλλεργική δερματίτιδα εξ επαφής. Μελέτες σχετικά με την αντιγονικότητα, τη μεταλλαξιογένεση και τον τοπικό ερεθισμό έχουν αποδείξει ότι το HP- β -CD είναι εξίσου ασφαλή με αυτά τα υλικά που χρησιμοποιούνται σήμερα στα αρώματα και τα καλλυντικά. Οι κυκλοδεξτρίνες απορροφούνται ελάχιστα διαδερμικά. (Irie et al., 1997).

Οι β -CD, RM- β -CD και HP- β -CD, είναι ικανές να διαπερνούν το δέρμα κατά 12%, 43% και 53% αντίστοιχα. Συγκεντρώσεις έως και 0,1% σε α -, β - και γ -κυκλοδεξτρινών θεωρούνται ασφαλείς. Λόγω της χαμηλότερης νεφρικής λειτουργίας τους, παιδιά κάτω των 2 ετών μπορεί θεωρητικά να είναι λιγότερο ευάλωτα στην νεφρική τοξικότητα, ενώ είναι πιθανό να οδηγήσει σε υψηλότερα επίπεδα στο αίμα (βραδύτερη εξάλειψη). Ωστόσο, μερικές περιπτώσεις σχετικά με τη χρήση ενδοφλέβιων προϊόντων με υψηλές δόσεις HP- β -CD σε νεογνά και μικρά παιδιά έχουν αναφερθεί χωρίς ενδείξεις τοξικότητας. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιοι πίνακες με τις επιτρεπόμενες ημερήσιες εκθέσεις (PDEs) σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή για τους υπολειμματικούς διαλύτες (CPMP / ICH / 283/95).

Πίνακας 5: Δια του στόματος επιτρεπόμενες ημερήσιες εκθέσεις (PDEs) και επίπεδων μη παρατηρούμενης αρνητικής επίδρασης (NOAEL) των κυκλοδεξτρινών σε διαφορετικά είδη (ανθρώπινο βάρος =50 kg)

Δια στόματος χορήγηση	α -CD	β -CD	γ -CD	HP- β -CD	HP- β - CD	HP- β - CD
Είδη	άνθρωπος	άνθρωπος	άνθρωπος	ποντίκι	σκύλος	άνθρωπος
NOAEL, mg/kg/ημέρα	120	10	200	500	1000	160
PDE, mg/kg/ημέρα	120	10	200	10	10	160

Πίνακας 6: Παρεντερικές επιτρεπόμενες ημερήσιες εκθέσεις (PDEs) και επίπεδα μη παρατηρούμενης αρνητικής επίδρασης (NOAEL) των κυκλοδεξτρινών σε διαφορετικά είδη (ανθρώπινο βάρος =50 kg)

Παρεντερική χορήγηση	α -CD	γ -CD	HP- β -CD	HP- β - CD
Είδη	ποντίκι	ποντίκι	ποντίκι	άνθρωπος
NOAEL, mg/kg/ημέρα	100	200	50	320
PDE, mg/kg/ημερα	0,2	0,8	0,2	320

Πίνακας 7: Προτεινόμενα κατώτατα όρια (ΤΗ) και παρεντερικές επιτρεπόμενες ημερήσιες εκθέσεις (PDEs) άνω των οποίων μπορεί να εμφανιστούν ανεπιθύμητες ενέργειες (κίτρινο: χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικά προϊόντα, N: δεν υπάρχουν δεδομένα και ενδείξεις για την αντίστοιχη οδό χορήγησης). (European Medicine Agency, 2014)

CD/ πορεία	α -CD	β -CD	γ -CD	RM- β -CD	HP- β -CD
Δια του στόματος τοξικότητα					
PDE, mg/kg/ημέρα	120	10	200	N	160
ΤΗ ενηλίκων	120	10	200	-	160
ΤΗ νεογνών	12	1	20	-	16
Ρινική					
Ασφαλές όριο	N	1,5	N	10	10
ΤΗ ενηλίκων	-	1,5	-	10	10
ΤΗ νεογνών	-	0,15	-	1	1
Ορθική/πρωκτική					
Ασφαλής δόση, mg / kg / ημέρα ή %	N	5	N	N	12%
ΤΗ ενηλίκων	-	5	-	-	12%
ΤΗ νεογνών	-	0,5	-	-	1,2%
Δερματική					
Ασφαλής δόση, %	N	~ 0,1	~ 0,1	N	~ 0,1
ΤΗ ενηλίκων	-	0,1	0,1	-	0,1
ΤΗ νεογνών	-	0,01	0,01	-	0,01
Οφθαλμική					
Ασφαλής δόση, %	< 4	~ 0,1	N	<5	10
ΤΗ ενηλίκων	1	1	-	1	10

ΤΗ νεογνών	0,1	0,1	-	0,1	1
Παρεντερική					
PDE, mg/kg/ημέρα	0,2	N	0,8	N	300
ΤΗ ενηλίκων	0,2	-	0,8	-	300
ΤΗ νεογνών	0,02	-	0,08	-	10

1.3. Χρωματογραφικές Τεχνικές

Οι χρωματογραφικές τεχνικές καλύπτουν κυρίως την ανάγκη για αναλύσεις πολύπλοκων οργανικών μιγμάτων και αποτελούν μεθόδους διαχωρισμού. Συγκεκριμένα η χρωματογραφική ανάλυση ή κοινώς χρωματογραφία, είναι μια μέθοδος που περιλαμβάνει μια σειρά τεχνικών φυσικού διαχωρισμού και προσδιορισμού των συστατικών μίγματος ανόργανων και οργανικών ουσιών. Ο διαχωρισμός βασίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών του μίγματος μεταξύ δυο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής (φέρουσας), που βρίσκονται μέσα στην χρωματογραφική στήλη. Αποτέλεσμα αυτού είναι άλλα συστατικά του δείγματος να κατακρατούνται περισσότερο και άλλα λιγότερο στο χρωματογραφικό σύστημα. Η πρώτη μορφή χρωματογραφίας εισήχθη από το Ρώσο βοτανολόγο Tswett το 1906 και ήταν μια μορφή υγρής χρωματογραφίας σε στήλη. Η αρχή της χρωματογραφίας είναι παρόμοια με αυτήν της εκχύλισης. Ουσίες που κατανέμονται περισσότερο στην κινητή φάση διαχωρίζονται διαδοχικά από άλλες που κατανέμονται περισσότερο στην στατική φάση.

Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των συστατικών ενός μίγματος όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, το μέγεθος των μορίων κ.α. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν την φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού ως προς τις δυο φάσεις της χρωματογραφικής στήλης. Η κινητή φάση καθώς διέρχεται μέσα από τη χρωματογραφική στήλη, προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος επάνω στη στατική φάση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος και την έξοδο τους από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Στην έξοδο της στήλης υπάρχει σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης της ποσότητας κάθε συστατικού. Έτσι εκτός από το διαχωρισμό έχουμε παράλληλα και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών του μίγματος και σε μερικές περιπτώσεις ποιοτικό.

Η κατάταξη των χρωματογραφικών τεχνικών σε είδη γίνεται ανάλογα με :

1. Τη φύση της κινητής φάσης
2. Τη φύση και τη μορφή της στατικής φάσης
3. Το μηχανισμό διαχωρισμού

Αν η κινητή φάση είναι αέρια, έχουμε την αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), αν είναι υγρή, την υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) και αν είναι αέρια σε υπερκρίσιμη κατάσταση, π.χ. CO₂ στους 50 °C και πίεση μεγαλύτερη από 15 MPa, την υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία (Supercritical Fluid Chromatography, SFC). Όσον αφορά την στατική φάση, αυτή μπορεί να είναι στερεό (S) ή υγρό (L) μηχανικά ή χημικά προσδεδεμένο σε ένα στερεό υπόστρωμα. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν ανάλογα με τη φυσική κατάσταση της υγρής και αέριας φάσης, η αέρια – υγρή χρωματογραφία (GLC), η υγρή – στερεή χρωματογραφία (LSC) κλπ. Προφανώς οι χρωματογραφικές μέθοδοι θα πρέπει να συνδυαστούν με συστήματα ανίχνευσης των εκλυομένων συστατικών, π.χ. φασματοόμετρα, για την ολοκλήρωσή τους ως τεχνικές ανάλυσης.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού σε :

1. Χρωματογραφία προσρόφησης: όταν ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική προσρόφηση των συστατικών του δείγματος στην επιφάνεια της ακίνητης φάσης, που είναι συνήθως διοξείδιο του πυριτίου (σίλικα).
2. Χρωματογραφία κατανομής: η οποία στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του δείγματος μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης.
3. Χρωματογραφία ιόντων: όπου τα ιόντα του δείγματος εναλλάσσονται με τα ιόντα της στατικής φάσης.
4. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού: όπου τα μόρια του δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, με τα μεγάλα μόρια να εξέρχονται πρώτα. Αντίθετα τα μικρά μόρια «περιπλανώνται» στους πόρους του πληρωτικού υλικού και συγκρατούνται περισσότερο.

Η θεωρητική πλευρά της χρωματογραφίας μπορεί να εξηγηθεί με την «θεωρία των πλακών» κατά την οποία η κίνηση μιας ουσίας μέσα στην χρωματογραφική στήλη, μπορεί να θεωρηθεί σαν σύνολο διαδοχικών κινήσεων, μέσα από θαλάμους (ζώνες) εξισορρόπησης που είναι συνδεδεμένοι στη σειρά. Έτσι, κάθε θάλαμος αποτελεί μια θεωρητική πλάκα, η οποία είναι ο απαιτούμενος όγκος της στήλης μέσα στον οποίο αποκαθίσταται η ισορροπία κατανομής μιας ουσίας ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση. Η θεωρητική πλάκα αποτελεί μια φανταστική έννοια που δεν σχετίζεται με τις παραμέτρους της στήλης, αλλά απλά διευκολύνει την μελέτη τους.

Συντελεστής κατανομής: Η ισορροπία αυτή περιγράφεται με το λόγο κατανομής της συγκέντρωσης ή του συντελεστή κατανομής K που ορίζεται από τη σχέση:

$K = C_s/C_m$, όπου C_s και C_m είναι οι συγκεντρώσεις της ουσίας στη στατική φάση και την κινητή φάση αντίστοιχα.

Έτσι ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος, επιτυγχάνεται, καθώς οι διαφορετικοί συντελεστές κατανομής τα αναγκάζουν να κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα στη στήλη και εξέρχονται από αυτή σε διαφορετικούς χρόνους.

Ύψος ισοδύναμο προς μια θεωρητική πλάκα: Η αποτελεσματικότητα της στήλης χαρακτηρίζεται από τη «λεπτότητα» μιας θεωρητικής πλάκας ή το Ύψος Ισοδύναμο προς μια θεωρητική πλάκα, δηλαδή το μήκος της στήλης που αντιστοιχεί σε μια θεωρητική πλάκα και ισούται: $h = L/n$, όπου h είναι το Ύψος Ισοδύναμο προς μια θεωρητική πλάκα και n ο αριθμός των πλακών της στήλης. Στην θεωρία των πλακών θεωρούμε ότι ο λόγος K είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση, ότι η ισορροπία μεταξύ των δυο φάσεων αποκαθίσταται πάρα πολύ γρήγορα και ότι η ταχύτητα διάχυσης μέσα σε μια φάση κατά μήκος της στήλης είναι αμελητέα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση κατά μήκος της στήλης ακολουθεί κατανομή Gauss.

Χρόνος συγκράτησης (retention time, t_R): Είναι ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος και της εμφάνισης του μέγιστου κάθε κορυφής (κάθε ουσίας).

Ύψος κορυφής (Y): Είναι η απόσταση του μέγιστου της κορυφής από τη βασική γραμμή του χρωματογραφήματος. Το εμβαδόν της κάθε κορυφής είναι (προσεγγιστικά $[\text{βάση} * \text{ύψος}]/2$) είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της αντίστοιχης ουσίας στο δείγμα που εξετάζεται.

Πλάτος κορυφής (W_b): Είναι η απόσταση μεταξύ των σημείων τομής της βασικής γραμμής και των εφαπτομένων στα σημεία καμπής των πλευρών της κορυφής. Εφόσον η κορυφή έχει μορφή καμπύλης Gauss ισχύει η σχέση, $W_b = 4\sigma$, όπου σ είναι η τυπική απόκλιση της καμπύλης Gauss ίση με το ημιπλάτος της κορυφής στο ύψος 0.607 Y . Από το χρωματογράφημα μπορεί να υπολογιστεί ο αριθμός των θεωρητικών πλακών της στήλης που χρησιμοποιούμε με τις παρακάτω σχέσεις:

$n = 16 (t_{R,A}/W_b)^2$ ή $n = 5,54 (t_{R,A}/W_{1/2})^2$, όπου $W_{1/2}$ είναι το πλάτος της κορυφής στο μισό του ύψους.

Διαχωριστική ικανότητα: Το βασικότερο χαρακτηριστικό μιας χρωματογραφικής στήλης είναι η ικανότητα της να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μείγματος με παρόμοιο χημικό χαρακτήρα. Η δυνατότητα αυτή εκφράζεται με τον όρο διαχωριστική ικανότητα, η οποία βελτιώνεται με τους εξής τρόπους:

1. Αύξηση του $\Delta t_r = t_2 - t_1$. Επιτυγχάνεται με αύξηση του μήκους L της στήλης, αύξηση του ποσού της στατικής φάσης, εκλογή διαφορετικής στατικής φάσης, εκλογή διαφορετικής κινητής φάσης κ.α.
2. Ελάττωση του πλάτους των κορυφών. Επιτυγχάνεται με χρήση περισσότερο ομοιόμορφου υλικού πλήρωσης, περισσότερο προσεκτικό γέμισμα της στήλης, χρήση μικρότερων σωματιδίων πλήρωσης, αύξηση του εμβαδού της μεσεπιφάνειας μεταξύ των δυο φάσεων,

επιλογή βέλτιστης ταχύτητας ροής, ελάττωση του μεγέθους του δείγματος, ελάττωση της διαμέτρου της στήλης κ.α.

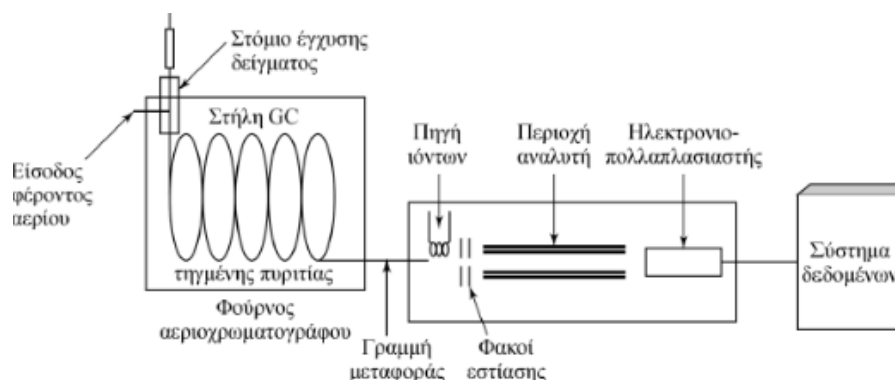
Όταν οι κορυφές αλληλεπικαλύπτονται είναι δύσκολος ο σωστός ποσοτικός προσδιορισμός, απομόνωση και ταυτοποίηση τους. Κάποιοι τρόποι βελτίωσης της διαχωριστικής ικανότητας είναι η μεταβολή της θερμοκρασίας ή της φύσης των φάσεων ώστε να επιτυγχάνεται μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των δυο κορυφών. Ένας ακόμη τρόπος βελτίωσης είναι να ελαττώσουμε το πλάτος των κορυφών, βελτιώνοντας την απόδοση της στήλης με αύξηση του n , ελάττωση του h ή και να συνδυάσουμε και τα δυο προηγούμενα, έτσι ώστε ο διαχωρισμός να είναι πιο ικανοποιητικός. Γενικά όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός n , τόσο στενότερες είναι οι κορυφές και τόσο αποτελεσματικότερη είναι η στήλη στον διαχωρισμό μιγμάτων ουσιών με παραπλήσιους χρόνους συγκράτησης. Για μια δοσμένη στήλη, το πλάτος της κορυφής είναι ανάλογο του χρόνου συγκράτησης και από αυτό συνεπάγεται ότι οι κορυφές διευρύνονται πηγαίνοντας από την αρχή προς το τέλος του χρωματογραφήματος. Ο αριθμός n μεταβάλλεται, για μια δοσμένη στήλη, με την ποσότητα της εκλουόμενης ουσίας, αλλά και με το μέγεθος της στήλης και μάλιστα γραμμικά. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, η συγκέντρωση των συστατικών του μίγματος, μετά το διαχωρισμό, υπολογίζεται με βάση το ύψος ή το εμβαδόν της κορυφής (Χατζιωάννου & Κουμπάρης, 2010), (Λιοδάκης, 2001).

1.3.1. Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία διακρίνεται σε δυο κατηγορίες:

- Χρωματογραφία αερίου-στερεού (GSC, όταν η στατική φάση είναι στερεό)
- Χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC, όταν η στατική φάση είναι υγρό, προσροφημένο επί κατάλληλου αδρανούς στερεού υλικού)

Είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων της, καθώς έχει μεγάλη ευαισθησία, ταχύτητα, απλότητα και είναι ικανή να επιτύχει δύσκολους και επίπονους διαχωρισμούς. Χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό ενώσεων σε πολύπλοκα δείγματα, και για πτητικές ενώσεις και μπορεί να εφαρμοστεί στο 95% των οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου, βιομηχανίες αρωματοποιίας κ.τ.λ.



Εικόνα 9: Σχηματικό διάγραμμα αεριοχρωματογράφου.

Τα βασικά μέρη ενός αερίου χρωματογράφου είναι τα εξής:

1. Οβίδα ή φιάλη φέροντος αερίου
2. Ρυθμιστής πίεσης-ροόμετρο
3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος
4. Θερμοστατούμενος κλίβανος
5. Στήλη χρωματογραφίας
6. Ανιχνευτής
7. Ενισχυτής
8. Καταγραφέας /Ηλεκτρονικός υπολογιστής.

Η εισαγωγή του δείγματος, συνήθως όγκου 1μL, γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και καταγράφονται τα σήματα ανίχνευσης. Χρησιμοποιεί ως φέρον αέριο κυρίως το άζωτο (N₂), το ήλιο (He) και το αργό (Ar). Το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση και πρέπει να είναι αδρανές και να μην αντιδρά με τη στατική φάση ή με τις ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφορών δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες και γι' αυτό το λόγο η στήλη είναι εγκλεισμένη σε φούρνο. Με βάση τις τιμές των χρόνων ανάσχεσης των προτύπων ουσιών επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση των ουσιών αυτών σε άγνωστα μίγματα. Επίσης, μελετάμε το διαχωρισμό και τη σειρά έκλουσής τους με βάση το σημείο ζέσεως τους, το μοριακό τους βάρος και την πολικότητά τους. Έτσι η εφαρμογή της GC περιορίζεται στο διαχωρισμό ουσιών με σχετικά μικρό μοριακό βάρος, καθώς η πτητικότητα μειώνεται στις ενώσεις με μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Συνήθως συνδυάζεται με φασματομέτρο μαζών (MS), για την πραγματοποίηση της

ταυτοποίησης των ουσιών. Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) και την καταγραφή τους. Έτσι είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος (MB) της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους (Χατζηιωάννου & Κουπάρης, 2010).

1.3.2. Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Στην υγρή χρωματογραφία στήλης, η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρό. Η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε κλασική, όταν η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση πετυχαίνεται λόγω της βαρύτητας και η στατική φάση αποτελείται από σχετικά μεγάλης διαμέτρου σωματίδια και στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) όταν η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης γίνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης και η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντιστάσεως σωματίδια υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Ανάλογα με το μηχανισμό αλληλεπίδρασης που επικρατεί ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και την στατική φάση, οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας. Συγκεκριμένα η HPLC είναι μέθοδος διαχωρισμού και όχι μέθοδος ταυτοποίησης. Όταν όμως συνδυαστεί με τη φασματομετρία μαζών γίνεται ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων.

Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνεται σε:

- Κανονικής φάσης, όπου η υγρή στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών, οι οποίες εκκλούνται τελευταίες από τη στήλη
- Ανεστραμμένης φάσης, όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά συστήματα στατικής – κινούμενης φάσης χρωματογραφίας υγρού – υγρού (LLC).

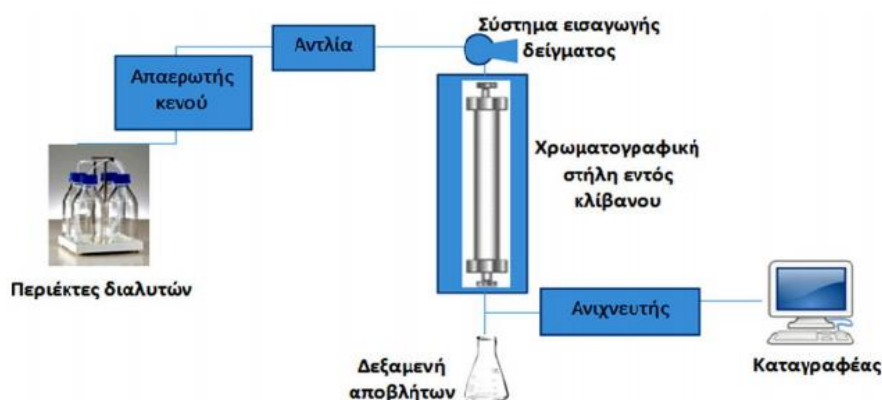
Στατική φάση	Κινούμενη φάση
α. LLC κανονικής φάσης	
Διμέθυλο σουλφοξείδιο	Ισοοκτάνιο
Αιθυλενοδιαμίνη	Εξάνιο
Νιτρομεθάνιο	CCl ₄ /εξάνιο

Νερό/αιθυλενογλυκόλη	Εξάνιο/ CCl ₄
β. LLC ανεστραμμένης φάσης κυανο αιθυλ-σιλικόνη διμέθυλοπολυσιλοεξάνιο πολυμερείς H/C	MeOH-H ₂ O MeCN-H ₂ O MeOH-H ₂ O

Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλύμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Μια συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα:

1. Δοχείο κινητής φάσης - Διαλύτης
2. Αντλία
3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος
4. Στήλη
5. Ανιχνευτής
6. Καταγραφέας/ Ηλεκτρονικός υπολογιστής/ εκτυπωτής



Εικόνα 10: Σχηματικό διάγραμμα υγρής χρωματογραφίας HPLC

Η HPLC υπερτερεί της GC, διότι αναλύει απευθείας και μη πτητικές ουσίες, παρέχει τη δυνατότητα συνδυασμού δύο φάσεων (κινούμενη, στατική) για καλύτερο διαχωρισμό έναντι της μιας (στατικής) φάσης που παρέχει η GC, λειτουργεί σε πολύ χαμηλότερες θερμοκρασίες της GC οπότε ελαχιστοποιείται η πιθανότητα αποικοδόμησης ή απώλειας μέρους του δείγματος και παρέχει δυνατότητα χρήσης ποικιλίας ανιχνευτών όπως φασματοφωτομετρικών (UV-Vis), ηλεκτροχημικών κ.α. Σε σχέση με τις άλλες τεχνικές υγρής χρωματογραφίας, όπως η χρωματογραφία στήλης, χάρτου και λεπτής στιβάδας, η HPLC παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα έχει πολύ καλύτερη επαναληψιμότητα, ακρίβεια, έχει

δυνατότητες πλήρους αυτοματοποίησης, ο διαχωρισμός επιτελείται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και παρέχει μεγαλύτερες δυνατότητες παρασκευαστικής διαδικασίας. Ωστόσο το μειονέκτημα της HPLC είναι το υψηλό κόστος των συσκευών.

Η HPLC, λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων της χρησιμοποιείται για:

- τον διαχωρισμό των συστατικών πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων
- τον ποσοτικό προσδιορισμό
- τον ποιοτικό προσδιορισμό –ταυτοποίηση (αν συνδυαστεί με UV-Vis και MS).

Η χρωματογραφία HPLC αποτελεί παραλλαγή της κλασικής χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και μειώνει πολύ σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό. Τα δείγματα που αναλύονται με HPLC βρίσκονται αποκλειστικά σε υγρή μορφή.

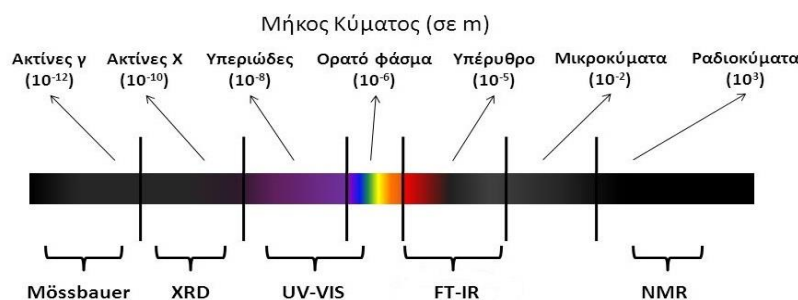
Ανάλογα με τη φύση των ουσιών που πρόκειται να αναλυθούν, οι ανιχνευτές που μπορούν να πραγματοποιηθούν είναι οι εξής:

- Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)
- Παράταξης φωτοδιόδων
- Αγωγιμομετρικοί
- Δείκτες διάθλασης
- Φασματογράφοι μάζας
- Ηλεκτροχημικοί
- Φθορισμομετρικοί
- Ραδιενέργειας
- Σκεδασμού φωτός
- Φλόγας (ιονισμού φλόγας, εκπομπής, φωτομετρικοί ανιχνευτές)

Στους ανιχνευτές ορατού - υπεριώδους η απορρόφηση ακτινοβολίας από μια χημική ένωση εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και τις ομάδες της χημικής ένωσης. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, ανάλογα με την ενέργεια (συχνότητα) που αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια, προκαλεί τη διέγερση και μεταφορά τους σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα, ή ακόμα προκαλεί δόνηση ή περιστροφή μοριακών δεσμών ορισμένων ομάδων της ένωσης (Χατζηιωάννου & Κουμπάρης, 2010).

1.4.Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Μια απλή τεχνική δεν είναι πάντα ικανή να αποδώσει όλες τις πληροφορίες για την ανάλυση και ταυτοποίηση ενός δείγματος. Γενικά ο συνδυασμός περισσοτέρων της μίας τεχνικής είναι αναγκαίος για την αποσαφήνιση και απόδοση της πλήρους δομής μιας χημικής ουσίας. Με εξαίρεση την κρυσταλλογραφία, δεν υπάρχει διαθέσιμη σήμερα μια απλή τεχνική που να είναι ικανή να αποδώσει πλήρως τη δομή μιας χημικής ουσίας. Έτσι, η αποσαφήνιση της δομής περιλαμβάνει εφαρμογές από διαφορετικές τεχνικές και η επιλογή της τεχνικής εξαρτάται από τη φύση του υλικού που πρόκειται να αναλυθεί και από τους διαθέσιμους πόρους. Τα περισσότερο σύνθετα χημικά προβλήματα είναι οργανικά και τρεις τεχνικές, υπέρυθη φασματοσκοπία (Infra Red, IR), φασματομετρία μαζών (MassSpectrometry, MS), και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR), είναι οι περισσότερες συνηθισμένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα για την ταυτοποίηση. Αυτές οι τεχνικές σε συνδυασμό και αφού προηγηθούν χρωματογραφικοί διαχωρισμοί, είναι ικανές να παρέχουν πληροφορίες για την αποσαφήνιση της δομής, οι οποίες είναι στα σίγουρα αρκετά πλησίον στην πραγματικότητα.



Εικόνα 11: Το φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και οι ανάλογες φασματοσκοπικές τεχνικές.

Οι οπτικές τεχνικές ανάλυσης περιλαμβάνουν τις τεχνικές, στις οποίες μετριέται η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η οποία πηγάζει από την ύλη ή αλληλεπιδρά με αυτή. Χρησιμοποιούνται όλες οι περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, από τις ακτίνες γ μέχρι τις ραδιοσυχνότητες. Οι οπτικές τεχνικές ανάλυσης διακρίνονται σε:

α) Φασματοσκοπικές Τεχνικές: Βασίζονται στην ικανότητα διαφόρων ουσιών να εκπέμπουν ή να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων και στη μέτρηση φασμάτων.

β) Μη Φασματοσκοπικές Τεχνικές: Δεν χρησιμοποιούνται φάσματα αλλά βασίζονται στην αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης, η οποία συνεπάγεται αλλαγή στην διεύθυνση ή τις φυσικές ιδιότητες της ακτινοβολίας.

Οι Φασματοσκοπικές Τεχνικές διακρίνονται σε:

1. Φασματοφωτομετρία (υπεριώδους, ορατού, Raman, υπέρυθρου)

2. Φθορισμομετρία
3. Φλογοφασματοφωτομετρία και Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης.
4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
5. Φασματομετρία μαζών κ.α.

Οι μη Φασματοσκοπικές Τεχνικές διακρίνονται σε:

1. Διαθλασιμετρία
2. Νεφελομετρία
3. Πολωσιμετρία κ.α.

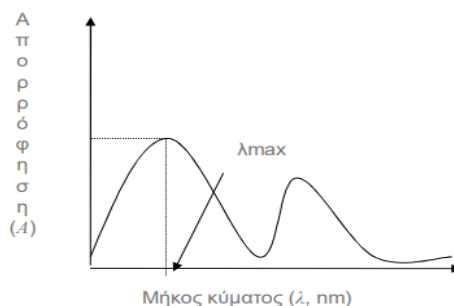
Οι φασματοσκοπικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την απόκτηση πληροφοριών για τη δομή, τη συγκέντρωση ουσιών που αλληλεπιδρούν με μια δεδομένη ακτινοβολία. Στις φασματοσκοπικές τεχνικές μετρείται η απορρόφηση (A) ή η διαπερατότητα (T) του δείγματος, ή ισχύς-ένταση της ακτινοβολίας. Με βάση αυτές τις μετρήσεις επιτελείται ποσοτική και ποιοτική ανάλυση. Η απεικόνιση A, T, ή έντασης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος (λ) ή τον κυματαριθμό παρέχει το φάσμα, το οποίο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαπίστωση της ύπαρξης χαρακτηριστικών ομάδων, για τη διευκρίνιση της δομής μιας ουσίας και για την ταυτοποίηση της.

1.4.1. Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis)

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού (Ultra violet Visible, UV-Vis) αποτελεί μια οπτική μέθοδο ανάλυσης που βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων ουσιών να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων. Ειδικότερα τα ηλεκτρόνια σθένους των στοιχείων διαφόρων μορίων, κατά την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (200- 400 nm), και ορατής ακτινοβολίας (400 - 800 nm) απορροφούν ενέργεια ($E=h\nu$) και διεγείρονται από τη βασική τους κατάσταση, σε μια αντιδεσμική κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Κάθε διέγερση απαιτεί συγκεκριμένη ενέργεια και πραγματοποιείται μόνο όταν το μόριο φωτοβοληθεί με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος. Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας καλείται χρωμοφόρο. Τα φάσματα UV-Vis δίνουν γενικές πληροφορίες για τη δομή μιας ένωσης. Κάθε ένωση που απορροφά στην ορατή περιοχή εμφανίζεται έγχρωμη. Η κάθε ουσία απορροφά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, ενώ ο ανθρώπινος οφθαλμός ανιχνεύει την ακτινοβολία η οποία δεν απορροφάται (συμπληρωματικό χρώμα).

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού (UV-Vis) έχει μια πληθώρα εφαρμογών, όπως ο προσδιορισμός της δομής και η ποιοτική ανάλυση μιας ένωσης, ο προσδιορισμός σταθερών ισορροπίας και του τύπου ενός συμπλόκου ιόντος και της σταθεράς αστάθειας του. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κινητική μελέτη αντιδράσεων, την ποσοτική ανάλυση ενός συστατικού ή μείγματος, σε φασματοφωτομετρικές ογκομετρήσεις, τον προσδιορισμό νοθείας κ.α. Ωστόσο

υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επιδρούν στην παρουσίαση των φασμάτων απορρόφησης, όπως ο διαλύτης, το pH, οι χρωμοφόρες και οι αυξόχρωμες ομάδες, η συζυγία και η στερεοχημεία.



Εικόνα 12: Φάσμα απορρόφησης.

Τα φασματοφωτόμετρα μετρούν απορροφήσεις και διακρίνονται σε απλής και διπλής δέσμης. Επίσης περιέχουν τις παρακάτω βασικές δομικές μονάδες:

1. Πηγή Ακτινοβολίας σταθερής ισχύος ή πηγή φωτός
2. Επιλογέας μήκους κύματος για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας
3. Κυψελίδα για την τοποθέτηση δείγματος
4. Ανιχνευτή ακτινοβολίας, που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό
5. Σύστημα μέτρησης, που αποτελείται από ενισχυτή σήματος και όργανο ανάγνωσης.

1.4.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

Η φασματοφωτομετρία υπερύθρου (infrared, IR) (γνωστή και ως φασματοσκοπία υπερύθρου) είναι μια από τις πιο αξιόλογες τεχνικές για την διερεύνηση της μοριακής συντάξεως και ταυτοποίησης οργανικών ενώσεων, με ευρεία εφαρμογή στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία, στη φαρμακογνωσία και στην ανάλυση φαρμάκων και τροφίμων κ.α. Τα φάσματα λαμβάνονται σχετικά εύκολα και στη συνέχεια συγκρίνονται, ολόκληρα η ορισμένες ταινίες απορρόφησης τους, με άλλα γνωστά. Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ του ορατού τμήματος και των ραδιοσυχνοτήτων (0,75-1000 μm) και χωρίζεται σε τρεις βασικές περιοχές:

1. Εγγύς Υπέρυθρο (Near IR, NIR) 0,75-2,5 μm ή 13.300 – 4.000 cm^{-1}
2. Μέσω Υπέρυθρο (Mid IR, MIR) 2,5-50 μm ή 4.000 – 400 cm^{-1}
3. Άπω Υπέρυθρο (Far IR, FIR) 50-1000 μm ή 400 – 10 cm^{-1}

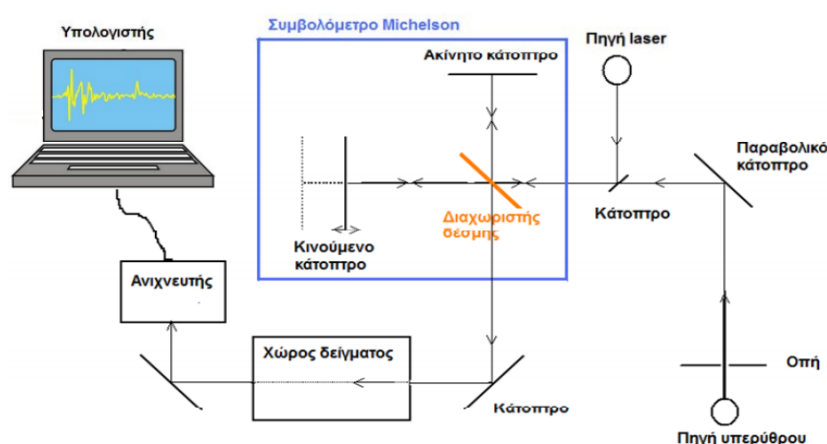
Συνήθως στο IR αντί του μήκους κύματος ή της συχνότητας χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού ο οποίος ορίζεται ως το αντίστροφο του μήκους κύματος, ή σαν το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός. Έτσι, με βάση τα παραπάνω, η συνήθης

περιοχή του MIR, καλύπτει την περιοχή $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Το πιο χρήσιμο κομμάτι της υπέρυθρης περιοχής για την φασματοσκοπία είναι αυτό μεταξύ $4000-600\text{ cm}^{-1}$. Όλες σχεδόν οι οργανικές και ανόργανες ενώσεις είναι σε θέση να απορροφήσουν ακτινοβολία σε ορισμένες συχνότητες στην παραπάνω περιοχή. Γι' αυτό η φασματοσκοπία IR θεωρείται πλέον απαραίτητη φασματοσκοπική τεχνική.

Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο στην υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος προκαλεί διεγέρσεις στις δονήσεις των ατόμων ομοσθενών δεσμών σε υψηλότερες στάθμες που είναι κβαντισμένες. Προϋπόθεση για να απορροφηθεί ακτινοβολία από ένα μόριο στην περιοχή αυτή ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) είναι :

- η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να είναι ίση με τη συχνότητα δόνησης ή περιστροφής των ατόμων του μορίου και
- να δονείται το μόριο κατά τέτοιο τρόπο ώστε η διπολική ροπή του να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργός στο υπέρυθρο.

Τα φασματοφωτόμετρα IR είναι διπλής δέσμης-μηδενισμού και αποτελούνται από τις ίδιες λειτουργικές μονάδες με τα UV-Vis. Η βασική διαφορά τους είναι η θέση του δείγματος, που στο IR είναι πριν το μονοχρωμάτορα, για να ελαχιστοποιηθεί η παρασιτική ακτινοβολία. Όσο αυξάνει η μεταβολή της διπολικής δομής τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο δεν παρατηρείται απορρόφηση ακτινοβολίας από τα πολύ συμμετρικά μόρια. Στην περιοχή από $4000-400\text{ cm}^{-1}$ που συνήθως χρησιμοποιείται στο IR, η ευαισθησία του φασματοφωτομέτρου είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων πολύ μικρές, με αποτέλεσμα ο "θόρυβος" να σκεπάζει τις ταινίες απορρόφησης. Η αδυναμία αυτή των κοινών φασματοφωτομέτρων υπερνικήθηκε με την φασματοσκοπία IR με Μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT-IR).



Εικόνα 13: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-IR.

Οργανολογία Φασματοφωτομέτρου FT-IR:

- Πηγή ακτινοβολίας: Λυχνία νικελίου – χρωμίου (Nicrome) .
- Πηγή Laser: Διέγερση ατόμων ηλίου και νέου (He-Ne).
- Συμβολόμετρο Michelson: Διαχωριστής δέσμης από KBr, κινητό και ακίνητο κάτοπτρο.
- Ανιχνευτής: Δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη (DTGS).

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας διακρίνουμε δυο κυρίως περιοχές. Την περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων (O-H, NH₂, C=O κλπ.) και αυτή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η μεν πρώτη εκτείνεται στην περιοχή 4000-1400 cm⁻¹ και οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων, η δε δεύτερη στην περιοχή 1400-600 cm⁻¹ στην οποία οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου, όπου κάθε άτομο ασκεί επίδραση στα υπόλοιπα και αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» κάθε ένωσης. Κατά την επεξεργασία των φασμάτων οι συνηθέστερες επεξεργασίες που γίνονται είναι η εξομάλυνση του σήματος, η διόρθωση της βασικής γραμμής και η αποσύζευξη, οι οποίες στοχεύουν στη βελτίωση του φάσματος και βοηθούν στους ποσοτικούς και ποιοτικούς προσδιορισμούς. Συγκεκριμένα η φασματοσκοπία εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance spectroscopy, ATR), χρησιμοποιείται για συλλογή φασμάτων από ρευστά υλικά. Επίσης χρησιμοποιείται για δείγματα σε μορφή φιλμ όπως πολυμερή, ελαστικά, υφάσματα κτλ. Γίνεται χρήση ενός εξαρτήματος που ονομάζεται ATR. Η υπέρυθρη ακτινοβολία μέσω του κατόπτρου M1 ανακλάται εσωτερικά στον κρύσταλλο από ZnSe με μία γωνία 45°. Όταν το δείγμα τοποθετείται στην επιφάνεια του κρυστάλλου απορροφά ακτινοβολία. Η εναπομένουσα ακτινοβολία ανιχνεύεται απευθείας από τον ανιχνευτή μέσω του κατόπτρου M2. Η ATR αποτελεί μέθοδο εξέτασης της επιφάνειας του δείγματος που σημαίνει ότι το εσωτερικό της μάζας του δείγματος μπορεί να έχει διαφορετική σύσταση. Η λήψη των φασμάτων με το εξάρτημα ATR είναι σχετικά εύκολη εργασία. Αρχικά λαμβάνεται το φάσμα του διαλύτη (φάσμα αναφοράς) και κατόπιν του δείγματος. Ο υποδοχέας δείγματος πρέπει να καθαρίζεται επιμελώς γιατί υπολείμματα στην κρυσταλλική επιφάνεια επηρεάζουν την ποιότητα των φασμάτων που λαμβάνονται.

1.5. Άλλες Μέθοδοι- Κρυσταλλογραφία ακτίνων-X

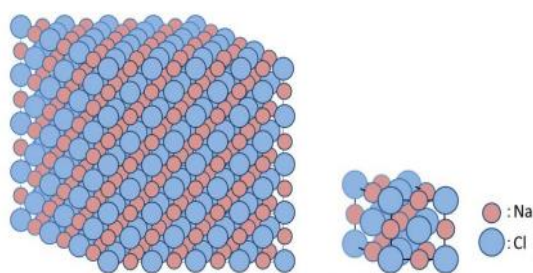
1.5.1. Κρυσταλλογραφία ακτίνων-X

Ο προσδιορισμός κρυσταλλικής δομής από την περίθλαση ακτίνων-X σε μονοκρύσταλλο έχει σε 3 στάδια:

- i) κρυστάλλωση δείγματος,

- ii) συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X,
- iii) προσδιορισμός της τριδιάστατης κρυσταλλικής δομής (επίλυση και βελτιστοποίηση).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που διακρίνει τα κρυσταλλικά από τα μη κρυσταλλικά στερεά είναι η περιοδικότητα της κρυσταλλικής δομής, στην οποία μια δομική μονάδα επαναλαμβάνεται περιοδικά σε τρεις διαστάσεις.



Εικόνα 14: Δομικό μοντέλο του NaCl κρυστάλλου και της δομικής μονάδας.

Με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας είναι δυνατόν να προσδιοριστούν οι σχετικές ατομικές θέσεις ενός μορίου ή συμπλόκου με τελικό σκοπό την όσο το δυνατό πιστή αναπαράστασή του στον τρισδιάστατο χώρο και την λεπτομερή ανάλυση της δομής του. Η περιοδικά επαναλαμβανόμενη βασική δομική μονάδα του κρυστάλλου, η μοναδιαία κυψελίδα, εκτείνεται εκ μεταφοράς προς τις τρεις διαστάσεις σχηματίζοντας τον κρύσταλλο και αποτελείται από τα μόρια/σύμπλοκα της ασύμμετρης μονάδας (μικρότερο δυνατό τμήμα της δομής που δεν επαναλαμβάνεται με καμία πράξη συμμετρίας στον χώρο) και τα συμμετρικά τους που καθορίζονται από την ομάδα χώρου της κρυστάλλωσης (McPherson, 2008).

Κρυστάλλωση-Μέθοδοι κρυστάλλωσης:

Καλής ποιότητας κρυσταλλογραφικά δεδομένα προϋποθέτουν έναν καλής ποιότητας κρύσταλλο, κατάλληλο για πειράματα περίθλασης. Αυτό επιτυγχάνεται εκτός των άλλων με τη χρήση της κατάλληλης μεθόδου κρυστάλλωσης. Απαραίτητη προϋπόθεση στο σχηματισμό κρυστάλλων είναι η δημιουργία υπέρκορου διαλύματος. Η διαδικασία της κρυστάλλωσης μπορεί να χωριστεί σε 3 στάδια: την πυρήνωση όπου μόρια ή ιόντα σχηματίζουν σταθερά συσσωματώματα (πυρήνες), την αύξηση όπου γίνεται η ανάπτυξη του κρυστάλλου στις τρεις διαστάσεις και την λήξη όπου σταματά η κρυστάλλωση. Η διαδικασία της κρυστάλλωσης μπορεί να διαρκέσει από μερικές ώρες έως αρκετές ημέρες-εβδομάδες. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι κρυστάλλωσης είναι: η εξάτμιση (evaporation), η διάχυση ατμών (vapor diffusion) και η αργή ψύξη (slow cooling) (Qiwei & Shouquan, 1990).

Κρυστάλλωση με εξάτμιση

Η εξάτμιση του διαλύτη χρησιμοποιείται συνήθως για την κρυστάλλωση ανόργανων μορίων. Ο ρυθμός εξάτμισης προσαρμόζεται έτσι ώστε να δημιουργούνται κρύσταλλοι εντός μερικών ημερών. Στην περίπτωση που ένας διαλύτης δεν αποδώσει ποιοτικούς κρυστάλλους, χρησιμοποιείται σύστημα διαλυτών.

Κρυστάλλωση με διάχυση ατμών

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε κρυστάλλωση πρωτεϊνών όπου επιτυγχάνεται έλεγχος της εξάτμισης από ένα διάλυμα άλατος μεγαλύτερης συγκέντρωσης που αποτελεί τον κατακρημνιστή. Έτσι ένα διάλυμα πρωτεΐνης με συγκέντρωση άλατος μικρότερη από αυτή που απαιτείται για κατακρήμνιση εξισορροπείται με διάχυση ατμών από ένα μεγαλύτερο και καλά κλεισμένο δοχείο. Διαλύτης μεταφέρεται σταδιακά μέσω της φάσης των ατμών από το πρωτεϊνικό διάλυμα στο πιο συγκεντρωμένο διάλυμα άλατος έως ότου επέλθει ισορροπία και οι κρύσταλλοι σχηματίζονται καθώς το πρωτεϊνικό διάλυμα αποκτά μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος διάχυσης των ατμών είναι αυτή της καθιστής (sitting drop) ή της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop).

Κρυστάλλωση με ελεγχόμενη μεταβολή της θερμοκρασίας (αργή ψύξη ή θέρμανση)

Επιτυγχάνεται είτε με τη δημιουργία κορεσμένου διαλύματος στο οποίο η θερμοκρασία μειώνεται ή αυξάνεται αργά (ανάλογα με το αν η διαλυτότητα της υπό κρυστάλλωση ουσίας μειώνεται ή αυξάνεται με την αντίστοιχη μεταβολή της θερμοκρασίας) ώστε να σχηματισθούν κρύσταλλοι. Ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας θα πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά έτσι ώστε να δημιουργηθούν καλής ποιότητας και όσο το δυνατόν μεγαλύτεροι μονοκρύσταλλοι. Στην περίπτωση που η θερμοκρασία μεταβάλλεται με γρήγορο ρυθμό, σχηματίζονται μικροκρύσταλλοι. Το σύστημα συνήθως τοποθετείται σε υδατόλουτρο για καλύτερη μόνωση και ελεγχόμενη μεταβολή της θερμοκρασίας με αργό ρυθμό. Στη δημιουργία προϊόντων εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες σημαντικό ρόλο, όπως έχει προαναφερθεί, διαδραματίζει η διαλυτότητα αυτών στο νερό. Συγκεκριμένα, η υδατοδιαλυτότητα της β -CD αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τη DIMEB και TRIMEB, η διαλυτότητα των οποίων ελαττώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (inversion solubility). Επιπλέον, οι μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες παρουσιάζουν αυξημένη υδατοδιαλυτότητα σε σχέση με τις φυσικές.

Πίνακας 9 : Η διαλυτότητα των μορίων της β -CD, α -CD, γ -CD, DIMEB και TRIMEB στο νερό.

	β -CD	α -CD	γ -CD	DIMEB	TRIMEB
25°C	18.5 g/L	110 g/L	220 g/L	600 g/L	100 g/L

Τα κρυσταλλικά συστήματα:

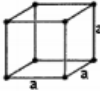


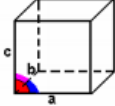






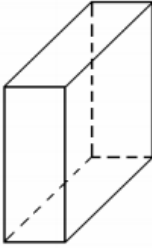





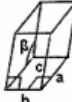




Σύμφωνα με τη γεωμετρική δόμηση του κρυστάλλου, διακρίνονται επτά κρυσταλλικά συστήματα, όσες ακριβώς και οι γεωμετρικές διατάξεις και κατά συνέπεια οι κρυσταλλικές μορφές με τις οποίες εμφανίζονται οι κρύσταλλοι. Ως κρυσταλλικό σύστημα ονομάζεται η χαρακτηριστική γεωμετρική δόμηση ενός κρυστάλλου. Κάθε κρυσταλλικό σύστημα χαρακτηρίζεται από τη στοιχειώδη κυψελίδα η οποία ορίζεται από τα μήκη και τις γωνίες των τριών αξόνων της. Ο κρύσταλλος αναπτύσσεται από την επανάληψη της στοιχειώδους κυψελίδας.

Τα 7 κρυσταλλικά συστήματα (κρυσταλλικές μορφές) δίνονται στον Πίνακα 10 και είναι τα ακόλουθα:

1. Εξαγωνικό κρυσταλλικό σύστημα, όπου δυο ίσες ακμές σχηματίζουν γωνία 120° ενώ η τρίτη άνιση ακμή είναι κάθετη στις δυο άλλες, δίνοντας την εικόνα ενός εξαγωνικού ορθογώνιου πολύεδρου.
2. Ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα, όπου οι ακμές είναι άνισες αλλά όλες οι γωνίες ορθές, δίνοντας την εικόνα ορθογώνιου παραλληλεπίπεδου.
3. Κυβικό κρυσταλλικό σύστημα, όπου όλες οι ακμές είναι ίσες και τέμνονται κάθετα, δίνοντας εικόνα κύβου.
4. Μονοκλινές κρυσταλλικό σύστημα, όπου οι ακμές είναι άνισες και δύο γωνίες ορθές δίνοντας την εικόνα πλάγιου παραλληλεπίπεδου.
5. Ρομβοεδρικό κρυσταλλικό σύστημα, στο οποίο οι ακμές είναι ίσες αλλά οι γωνίες δεν είναι ορθές, δίνοντας την εικόνα ρομβοειδούς παραλληλεπίπεδου.
6. Τετραγωνικό κρυσταλλικό σύστημα, όπου δυο ακμές είναι ίσες και όλες οι γωνίες ορθές, δίνοντας την εικόνα ορθογώνιου παραλληλεπίπεδου.
7. Τρικλινές κρυσταλλικό σύστημα στο οποίο οι ακμές είναι άνισες και οι γωνίες όχι ορθές, δίνοντας την εικόνα πρισμένου πλάγια σπριτόκουτου.

Τα κρυσταλλικά συστήματα συμπληρώνουν τα πλέγματα Bravais τα οποία, εκτός από τις κορυφές του γεωμετρικού στερεού της στοιχειώδους κυψελίδας, έχουν επιπρόσθετα πλεγματικά σημεία στις έδρες ή στο κέντρο των γεωμετρικών στερεών. Τα κρυσταλλικά πλέγματα Bravais είναι 14 και δίνονται στον ακόλουθο Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Τα 14 κρυσταλλικά πλέγματα και τα 7 κρυσταλλικά συστήματα.

ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΑ ΠΛΕΓΜΑΤΑ			ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	
			ΚΥΨΕΛΙΔΑ	
				$\hat{\alpha} = \hat{\beta} = \hat{\gamma} = 90^\circ$ $a = b = c$
ΚΥΒΙΚΟ	ΕΔΡΟΚΕΝΤΡΩΜΕΝΟ ΚΥΒΙΚΟ	ΧΩΡΟΚΕΝΤΡΩΜΕΝΟ ΚΥΒΙΚΟ	ΚΥΒΙΚΟ	
				$\hat{\alpha} = \hat{\beta} = \hat{\gamma} = 90^\circ$ $a = b \neq c$
ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΟ	ΧΩΡΟΚΕΝΤΡΩΜΕΝΟ ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΟ		ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΟ	
				$\hat{\alpha} = \hat{\beta} = \hat{\gamma} = 90^\circ$ $a \neq b \neq c$
ΟΡΘΟΡΟΜΒΙΚΟ	ΒΑΣΙΚΟΚΕΝΤΡΩΜΕΝΟ ΟΡΘΟΡΟΜΒΙΚΟ	ΕΔΡΟΚΕΝΤΡΩΜΕΝΟ ΟΡΘΟΡΟΜΒΙΚΟ		
			ΟΡΘΟΡΟΜΒΙΚΟ	
	ΧΩΡΟΚΕΝΤΡΩΜΕΝΟ ΟΡΘΟΡΟΜΒΙΚΟ			
				$\hat{\alpha} = \hat{\beta} = \hat{\gamma} = 90^\circ$ $a = b = c$
	ΡΟΜΒΟΕΔΡΙΚΟ		ΡΟΜΒΟΕΔΡΙΚΟ	
				$\hat{\alpha} = \hat{\gamma} = 90^\circ$ $\hat{\beta} \neq 90^\circ$ $a \neq b \neq c$
ΜΟΝΟΚΛΙΝΕΣ	ΒΑΣΙΚΟΚΕΝΤΡΩΜΕΝΟ ΜΟΝΟΚΛΙΝΕΣ		ΜΟΝΟΚΛΙΝΕΣ	
				$\hat{\alpha} \neq \hat{\beta} \neq \hat{\gamma} \neq 90^\circ$ $a \neq b \neq c$
	ΤΡΙΚΛΙΝΕΣ		ΤΡΙΚΛΙΝΕΣ	
				$\hat{\alpha} = \hat{\beta} = 90^\circ$ $\hat{\gamma} = 120^\circ$ $a = b \neq c$
	ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΕΞΑΓΩΝΙΚΟ		ΕΞΑΓΩΝΙΚΟ	

1.5.2. Σλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης

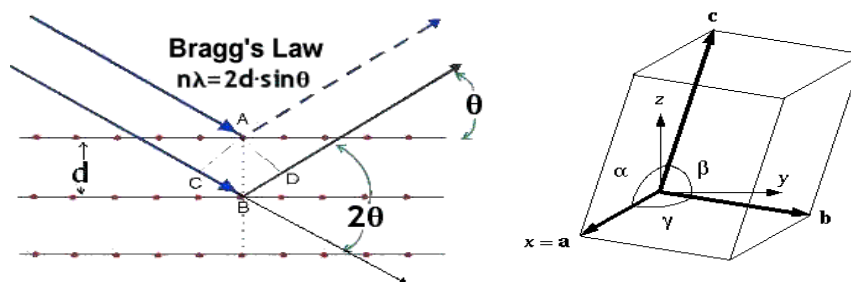
Ακτίνες-X - Γεωμετρία της περίθλασης και Νόμος Bragg - Οργανολογία:

Η ακτινοβολία-X έχει υψηλή ενέργεια, ιδιότητα που την κάνει διεισδυτική σε υλικά σώματα αναλόγως της πυκνότητάς τους. Όταν η ακτινοβολία προσπέσει σε ένα άτομο, υφίσταται σκέδαση και επανεκπέμπεται σαν σφαιρικό κύμα. Η σκέδαση αυτή οφείλεται στην αλληλεπίδραση των ακτίνων-X με τα δεσμευμένα ηλεκτρόνια στα άτομα, μόρια ή ιόντα. Η μελέτη του φαινομένου περίθλασης ακτίνων-X από μονοκρυστάλλους στηρίζεται στην παρατηρούμενη συμβολή των

σκεδαζόμενων κυμάτων από τα ηλεκτρόνια που αρχικά προσέπεσαν. Τα ελαστικά σκεδαζόμενα κύματα συμβάλλουν το ένα με το άλλο εβρισκόμενα είτε στη ίδια, είτε σε διαφορετική φάση. Αυτό εξαρτάται από την κατεύθυνση των εισερχόμενων και εξερχόμενων κυμάτων και τις σχετικές θέσεις των ηλεκτρονίων μεταξύ τους. Εάν η διαφορά στην πορεία προκύπτει από ηλεκτρόνια που απέχουν κατά ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος, τα κύματα σκεδάζουν στη ίδια φάση και τα πλάτη τους θα προστεθούν. Αντίθετα, αν απέχουν ημιακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος θα συμβάλλουν ακριβώς σε αντίθετη φάση και θα αλληλοεξουδετερωθούν. Οι συνθήκες για να βρίσκονται τα σκεδαζόμενα κύματα στην ίδια φάση μπορούν να συνοψιστούν αρκετά ικανοποιητικά εάν φανταστούμε τα κύματα να ανακλώνται σε επίπεδα που περνούν από τα άτομα. Η σχέση μεταξύ της γωνίας σκέδασης και του διαστήματος των δυο επιπέδων δίνεται από τον νόμο Bragg. Αν d είναι η απόσταση μεταξύ των επιπέδων μιας τέτοιας οικογένειας θα έχουμε ενισχυτική συμβολή των ανακλώμενων ακτίνων σε γωνίες θ , όταν η διαφορά δρόμου που ακολουθούν $2d \cdot \sin\theta$, είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας λ . Επομένως,

$$2d \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda \quad (n=1,2,3,\dots)$$

Ο νόμος του Bragg είναι θεμελιώδης στην κρυσταλλογραφία, επειδή η περιοδική διάταξη στο χώρο των κυψελίδων έχει ως συνέπεια όμοια άτομα να βρίσκονται στα ίδια επίπεδα. Άρα, καταγράφεται η συμπεριφορά σκέδασης των ακτίνων-X από τα ηλεκτρόνια όμοιων ατόμων που απαρτίζουν ένα ατομικό επίπεδο. Επομένως, εάν γνωρίζουμε το μήκος κύματος των ακτίνων-X που προσπίπτουν στον κρύσταλλο και μετρηθεί η γωνία θ που μεταξύ των προσπιπτουσών και εξερχομένων ακτίνων, τότε είμαστε σε θέση να υπολογίσουμε την απόσταση μεταξύ των ατομικών επιπέδων d .



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση του νόμου Bragg και οι διαστάσεις μιας μοναδιαίας κυψελίδας.

Ο νόμος Bragg επιτρέπει τον προσδιορισμό του μήκους κύματος, του διαστήματος μεταξύ των επιπέδων και της γωνία πρόσπτωσης και ανάκλασης της ακτινοβολίας. Ένας μονοκρύσταλλος, όπως προαναφέραμε χαρακτηρίζεται από την περιοδική επανάληψη στις 3 διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας (unit cell), που χαρακτηρίζεται από τις τιμές των ακμών a , b , c και γωνιών α , β και γ . Λόγω της μετάθεσης της μοναδιαίας κυψελίδας και στις 3 διαστάσεις, ο κρύσταλλος αποτελείται θεωρητικά από άπειρες οικογένειες παράλληλων επιπέδων, που καθορίζονται από ίδιες οικογένειες ατόμων. Τα παράλληλα επίπεδα της κάθε οικογένειας θα απέχουν μεταξύ τους την ίδια απόσταση

d_{hkl} . Τα h , k και l είναι ακέραιοι αριθμοί, αποτελούν τους δείκτες Miller και καθορίζουν τη θέση των ατομικών επιπέδων στο σύστημα συντεταγμένων του πραγματικού χώρου (Ευθύς χώρος, Direct space). Οι δείκτες αυτοί καθορίζουν τα επίπεδα Bragg που «κόβουν» την μοναδιαία κυψελίδα στις τρεις διαστάσεις της h , k και l φορές αντίστοιχα.

Αν ορίσουμε ένα διάνυσμα, που είναι κάθετο στα παραπάνω επίπεδα και έχει μέτρο ίσο με το αντίστροφο της απόστασης των επιπέδων Bragg $|d^*hkl| = 1/d_{hkl} = (hkl)$, τότε μπορούμε να ορίσουμε τον αντίστροφο χώρο (χώρο ανακλάσεων), που είναι ο χώρος που μετράμε τις εικόνες περίθλασης. Περίθλαση υπάρχει όταν επαληθεύεται ο νόμος Bragg.

1.5.3. Συλλογή δεδομένων

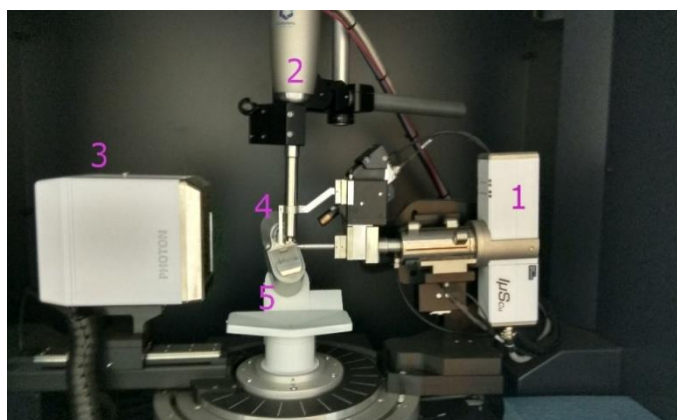
Η συλλογή δεδομένων περίθλασης από μονοκρυστάλλο γίνεται ως εξής: Αρχικά επιλέγεται ο κατάλληλος μονοκρυστάλλος, δηλαδή εκείνος έχει κατάλληλο μέγεθος τουλάχιστον 0,1 mm σε κάθε διάσταση για το περιθλασίμετρο ακτίνων-X του εργαστηρίου), δεν εμφανίζει ρωγμές, είναι σταθερός στο κρυοπροστατευτικό διάλυμα (συνήθως παραφινέλαιο) και δεν εμφανίζει διδυμία. Ένας τέτοιος επιλεγμένος μονοκρυστάλλος τοποθετείται σε διαδρομή μονοχρωματικής ακτινοβολίας-X από την περίθλαση της οποίας προκύπτει πλήθος δευτερευουσών δεσμών. Οι δέσμες αυτές μπορούμε να θεωρήσουμε, σύμφωνα με τον νόμο Bragg ότι προέρχονται από ανάκλαση της αρχικής δέσμης στα επίπεδα hkl του κρυστάλλου. Ο κρυστάλλος πρέπει να έχει κατάλληλο όγκο, ώστε κατά τη συλλογή δεδομένων να βρίσκεται μονίμως υπό δέσμη σταθερής έντασης. Κατά την περιστροφή του πάνω στη γωνιομετρική κεφαλή κάθε σημείο πρέπει να δέχεται σταθερή και αμείωτη ένταση ακτινοβολίας. Η συλλογή των δεδομένων από την έκθεση του κρυστάλλου στις ακτίνες-X γίνεται με χρήση ανιχνευτή, ο οποίος συλλέγει (καταγράφει) ουσιαστικά τις εντάσεις των ανακλάσεων. Ο αριθμός των ανακλάσεων εξαρτάται από την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, την ποιότητα του κρυστάλλου και την στρατηγική που επιλέχθηκε για την συλλογή (κρυσταλλικό σύστημα, επαναληψιμότητα, χρόνο έκθεσης του δείγματος σε κάθε προσανατολισμό) των δεδομένων. Με τη λήξη της συλλογής δεδομένων, το σύνολο των ανακλάσεων υποβάλλεται σε επεξεργασία (δεικτοδότηση και ολοκλήρωση) με την οποία προσδιορίζεται η ομάδα χώρου και εφαρμόζονται διορθώσεις απορροφήσεως (McPherson, 2008). Στην παρούσα διατριβή το όργανο μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν: το εργαστηριακό Περιθλασίμετρο (D8 Venture της Bruker).

Σε ένα τέτοιο όργανο, οι ακτίνες-X παράγονται κατά το βομβαρδισμό μιας μεταλλικής επιφάνειας με ηλεκτρόνια που κινούνται με μεγάλη ταχύτητα. Η μεταλλική επιφάνεια κατασκευάζεται από διάφορα μέταλλα, αλλά κυρίως Χαλκό, Cu ή Μόλυβδο, Mo (στην περίπτωση μας Cu). Η ακτινοβολία-X, λοιπόν, παράγεται όταν ηλεκτρόνια από την κάθοδο επιταχύνονται σε υψηλή τάση και υπό κενό (seal tubes) και προσπίπτουν στην άνοδο με μεγάλη ταχύτητα, έτσι ώστε

να υπόκεινται σε απότομη μεταβολή της κινητικής τους κατάστασης. Όταν τα ηλεκτρόνια χτυπήσουν την επιφάνεια του μετάλλου, η ταχύτητά τους μηδενίζεται και σύμφωνα με την αρχή διατήρησης, η κινητική ενέργεια των ηλεκτρονίων μετατρέπεται κατά το πιο μεγάλο της μέρος σε θερμότητα και ένα πολύ μικρό μόνο μέρος της μετατρέπεται σε ακτινοβολία-X. Άρα, η ταχεία μεταβολή της κινητικής κατάστασης των ηλεκτρονίων είναι εκείνη που παράγει φωτόνια. Η είσοδος ταχέων ηλεκτρονίων στο θετικά φορτισμένο μεταλλικό πλέγμα της ανόδου, έχει ως αποτέλεσμα τη σύγκρουσή τους με τα ηλεκτρόνια των εξωτερικών στιβάδων των ατόμων (Cu ή Mo) του μεταλλικού πλέγματος, τα οποία εκτοπίζονται από τις εξωτερικές στιβάδες και μεταπίπτουν σε χαμηλότερες ενεργειακά στιβάδες. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε παραγωγή ακτινοβολίας K α ή K β . Στην περίπτωση του χαλκού το μήκος κύματος της παραγόμενης ακτινοβολίας είναι 1,5418Å. Τα φαινόμενα αυτά λαμβάνουν χώρα υπό κενό μέσα σε ειδικούς σωλήνες παραγωγής ακτίνων-X (Εικόνα 16α). Ένα τυπικό περιθλασίμετρο αποτελείται από:

- 1) μια πηγή ακτινοβολίας εφοδιασμένη με μονοχρωμάτορα για επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος και σχισμές που καθορίζουν το σχήμα της ακτίνας,
- 2) συσκευή αδιάκοπης παροχής ρεύματος N₂, ώστε ο κρύσταλλος να βρίσκεται συνεχώς σε θερμοκρασία (100 ή 120K) κατά την συλλογή των δεδομένων,
- 3) ανιχνευτή καταγραφής των ανακλάσεων από την σκέδαση των ακτίνων-X από το δείγμα,
- 4) ειδική παγίδα (beamstop) προκειμένου να μειωθεί η ένταση της ακτινοβολίας που δεν είχε σκεδαστεί από το δείγμα και
- 5) γωνιομετρική κεφαλή για ρύθμιση προσανατολισμού του δείγματος και των θέσεων του ανιχνευτή (Εικόνα 16α).

Στο περιθλασίμετρο D8 Venture της Bruker, η πηγή ακτίνων-X ελέγχεται από το σύστημα I μ S Microfocus X-ray Source, ανιχνευτής είναι ο PHOTON 50 (τύπου CMOS) και το σύστημα CryoStream 800series της Oxford CryoSystems παρέχει την απαιτούμενη θερμοκρασία (Εικόνα 16β).



(α)



(β)

Εικόνα 16: (α) Τα βασικά μέρη του Περιθλασίμετρου D8 Venture της Bruker, με τον ανιχνευτή PHOTON 50 και (β) η συσκευή Cryostream 800series της OxfordCryoSystems

1.5.4. Επεξεργασία δεδομένων από σκέδαση ακτίνων-X

Ο όρος «Επεξεργασία Δεδομένων» χρησιμοποιείται για να περιγράψει όλη την διαδικασία από την στιγμή συλλογής των εικόνων περίθλασης έως την δημιουργία μιας λίστας εντάσεων για όλες τις ανακλάσεις που καταγράφηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό APEX3 της Bruker και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

Αρχικά πραγματοποιείται δεικτοδότηση (indexing) των εικόνων περίθλασης, δηλαδή απόδοση δεικτών Miller στις κηλίδες και εύρεση κατάλληλης μοναδιαίας κυψελίδας στο πλέγμα με παράλληλη βελτιστοποίηση όλων των παραμέτρων του πειράματος (διαστάσεις κυψελίδας, προσανατολισμός κρυστάλλου, θέση ανιχνευτή, κα). Ακολουθεί ολοκλήρωση (integration) δεδομένων περίθλασης που παρέχει πληροφορίες για τις διαστάσεις της κυψελίδας, τη γεωμετρία της περίθλασης μια πρώτη εκτίμηση του πλέγματος Bravais. Η γνώση αυτής της πληροφορίας επιτρέπει την πρόβλεψη των σχετικών θέσεων των κηλίδων στην εικόνα περίθλασης. Έτσι, δημιουργείται τρισδιάστατο προφίλ κάθε κηλίδας, που περιγράφεται από τους δείκτες hkl. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το SAINT (APEX 3, 2012). Η εύρεση της ομάδας χώρου γίνεται με το πρόγραμμα XPREP (APEX 3, n.d.). Το πρόγραμμα εντοπίζει στοιχεία συμμετρίας (π.χ. τυχόν άξονες συμμετρίας από τις συστηματικές αποσβέσεις), που οδηγούν στην εύρεση της ομάδας χώρου. Η κανονικοποίηση και συγχώνευση δεδομένων (scaling and merging) περιλαμβάνει υπολογισμούς για τις ανακλάσεις με κατάλληλα προγράμματα ώστε να είναι όλες στην ίδια κλίμακα. Εξαιτίας ενός συνδυασμού φυσικών παραγόντων του πειράματος, ένας αριθμός διορθώσεων πρέπει να εφαρμοστεί προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή εκτίμηση για την πραγματική ένταση. Διόρθωση απορρόφησης πραγματοποιείται με το πρόγραμμα SADABS (APEX 3, 2012). Το στάδιο της

συγχώνευσης, παράλληλα, παρέχει ένα μεγάλο αριθμό στατιστικών (R_{int} , R_{sigma} , completeness, redundancy) για την ποιότητα των δεδομένων, κυρίως από την συμφωνία μεταξύ των συμμετρικά-συσχετισμένων παρατηρήσεων. Έτσι δημιουργείται ένα αρχείο τύπου hkl το οποίο περιέχει τους δείκτες Miller, τις εντάσεις και τα σφάλματά τους.

1.5.5. Καθορισμός της κρυσταλλικής δομής

Για τον προσδιορισμό όμως των παραγόντων δομής είναι απαραίτητο να βρεθούν και οι φάσεις έτσι ώστε να προσδιορισθεί πλήρως η δομή. Αυτό αποτελεί το γνωστό πρόβλημα των φάσεων στην κρυσταλλογραφία και έχουν αναπτυχθεί τόσο άμεσες όσο και έμμεσες (πειραματικές) μέθοδοι επίλυσης της δομής.

Άμεσες Μέθοδοι (ShelXS, SIR): Οι άμεσες μέθοδοι δίνουν ένα αρχικό πρότυπο δομής χωρίς προγενέστερη δομική πληροφορία. Στηρίζονται στην απόδοση αυθαίρετων φάσεων σε λίγες ισχυρές ανακλάσεις από τις οποίες προκύπτουν βάσει πιθανοτήτων οι φάσεις ενός συνόλου ισχυρών ανακλάσεων. Από αυτές με μετασηματισμό Fourier υπολογίζεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα και προκύπτει το αρχικό πρότυπο δομής.

Μέθοδοι Patterson: Χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των αποστάσεων μεταξύ των κέντρων σκέδασης (άτομα) σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα όταν οι φάσεις δεν είναι γνωστές. Στηρίζονται στην ερμηνεία της συνάρτησης Patterson (εξίσωση 5), για να αποκαλύψουν τις σχετικές θέσεις των ατόμων στη μοναδιαία κυψελίδα.

Μέθοδοι DualSpace (ShelXD(Sheldrick,2010)): Οι φάσεις ανακτώνται από επαναλαμβανόμενες τροποποιήσεις του μοντέλου τόσο στον ευθύ (ηλεκτρονική πυκνότητα) όσο και στον αντίστροφο (παράγοντες δομής) χώρο.

Μέθοδοι IntrinsicPhasing: (ShelXT(Sheldrick, 2015a)) Η μέθοδος ενδογενούς φάσης είναι μια από τις άμεσες μεθόδους που επιλύει σε ομάδα χώρου $P1$. Με γνωστή την ομάδα Laue, οι συμμετρικές εντάσεις «φυτεύονται» ώστε να ικανοποιείται η ομάδα χώρου $P1$.

1.5.6. Βελτιστοποίηση δομής

Βελτιστοποίηση είναι η διαδικασία όπου οι τιμές των παραμέτρων της δομής βελτιστοποιούνται με μαθηματικές μεθόδους στατιστικής προσαρμογής [Ελάχιστα Τετράγωνα (Least Squares, L.S)], ώστε το τελικό μοντέλο να συμφωνεί όσο το δυνατό καλύτερα με τα πειραματικά δεδομένα. Σημαντικά κριτήρια αξιολόγησης της πορείας βελτιστοποίησης είναι οι τιμές

των δεικτών αξιοπιστίας R_1 και wR_2 , που αποκαλύπτουν την συμφωνία μεταξύ των πειραματικών τιμών όλων των παραγόντων δομής $|F_o|$ και των αντίστοιχων υπολογιζόμενων $|F_c|$ και δίνονται από τις σχέσεις:

$$R = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|} \quad , \quad wR = \left[\frac{\sum (F_o^2 - F_c^2)^2}{\sum w F_o^2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

όπου w : στατιστικό βάρος

Κατά την διαδικασία της βελτιστοποίησης πρέπει επίσης να ελέγχονται εκτός από τη συμφωνία πειραματικών και υπολογισθέντων δεδομένων, οι παράμετροι και οι περιορισμοί-εξαναγκασμοί (restraints – constraints). Παράμετροι ενός μοντέλου θεωρούνται:

1. Ανεξάρτητες συντεταγμένες x, y, z (κλασματικές ή πραγματικές)
2. Θερμικοί παράγοντες (ισοτροπικοί ή ανισοτροπικοί)
3. Αριθμός κατάληψης. Στα σύμπλοκα των κυκλοδεξτρινών, τα μικρά ξενιζόμενα μόρια, που εντοπίζονται στην κοιλότητα των CDs είναι σχεδόν πάντα αποδιατεταγμένα.

Σε κάθε βήμα της βελτιστοποίησης πρέπει να ελέγχονται και να εφαρμόζονται περιορισμοί, που θεωρούνται ως επιπρόσθετες παρατηρήσεις (βάσει γεωμετρίας). Οι περιορισμοί αφορούν σε μήκη δεσμών και γωνίες μεταξύ των δεσμών, χειρομορφία, δεσμούς Van der Waals, π - π αλληλεπιδράσεις, υδρογονικούς δεσμούς και γενικότερα μοριακή διάταξη στον χώρο. Κάθε περιορισμός χρειάζεται να εφαρμόζεται κατάλληλα, και οι γεωμετρικοί φέρουν επίσης ένα συνολικό στατιστικό βάρος (weight) στον υπολογισμό των πειραματικών δεδομένων. Σημαντικής σημασίας είναι η επιλογή μοντέλου παραμετροποίησης.

Κάθε άτομο χαρακτηρίζεται από τις παραμέτρους θέσης (x, y, z) και τον ισοτροπικό θερμικό συντελεστή U ή τους ανισοτροπικούς $U_{i,j}$. Στη βελτιστοποίηση με ισοτροπικό συντελεστή σε κάθε άτομο αντιστοιχούν τέσσερις μεταβλητές x, y, z, U και το σύνολο των μεταβλητών είναι $M=4N+1$ για κρύσταλλο με N άτομα στην ασύμμετρη μονάδα. Σε βελτιστοποίηση με ανισοτροπικούς θερμικούς συντελεστές, οι μεταβλητές για κάθε άτομο γίνονται εννιά και το σύνολο των μεταβλητών στην ασύμμετρη μονάδα $M=9N+1$. Οι τιμές του M καθορίζονται από τον αριθμό των ανεξάρτητων ανακλάσεων, που παρατηρήθηκαν στο πείραμα. Σε περιπτώσεις κρυσταλλογραφικών πειραμάτων, δομών μικρού-μεσαίου μεγέθους, που φτάνουν σε ατομική διακριτότητα, ο λόγος πλήθους ανεξάρτητων ανακλάσεων προς το πλήθος των χρησιμοποιούμενων μεταβλητών βελτιστοποίησης δεν πρέπει να είναι μικρότερος του 7 (επτά). Σκοπός της χρήσης της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων είναι η βελτιστοποίηση της δομής μέσω ελαχιστοποίησης του Q που δίνεται από τη σχέση

$$Q = \sum w \left(|F_o| - \frac{1}{K} |F_c| \right)^2$$

όπου: w το στατιστικό βάρος που βρίσκεται σε αντίστροφη σχέση με το σφάλμα σ (F_o) και K ένας παράγοντας κλίμακας (scale factor).

1.5.7. Αξιολόγηση και κατάθεση δομής

Σε κάθε βήμα γίνεται αποτίμηση της ποιότητας του μοντέλου. Η βελτιστοποίηση της κρυσταλλικής δομής θεωρείται ότι έχει τελειώσει εάν ικανοποιούνται οι εξής όροι:

1. Έχουν «βρεθεί» όλα τα άτομα της ασύμμετρης μονάδας και η υπολειπόμενη ηλεκτρονιακή πυκνότητα που εντοπίζεται είναι μικρότερη του $0.63 \text{ e}/\text{\AA}^3$.

2. Ο λόγος της μέγιστης μετατόπισης (με εφαρμογή ελαχίστων τετραγώνων) προς το μέγιστο σφάλμα είναι σημαντικά μικρότερος της μονάδας.

3. Ο συντελεστής αξιοπιστίας R_I έχει τη μικρότερη δυνατή τιμή. Αποδεκτή τιμή για υπερμοριακά σύμπλοκα (π.χ. σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών) είναι μία κοντά κάτω από το 0.1 ή 10%.

Ο τελικός έλεγχος της ορθότητας της κρυσταλλικής δομής μπορεί να πραγματοποιηθεί με πλήθος υπολογιστικών προγραμμάτων. Για σχετικά μικρά μόρια χρησιμοποιείται το Checkcif/PLATON (Spek, 2009). Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την κατάθεση (deposit) των ατομικών συντεταγμένων και των παραγόντων δομής σε βάσεις δεδομένων Cambridge Structural Database CSD (Groom et al., 2016) ή Crystallography Open Database COD (Grazulis et al., 2009)

Πιο συγκεκριμένα μόλις βρεθεί ένα παρόμοιο σύμπλοκο μπορούμε να πραγματοποιήσουμε την ισόμορφη αντικατάσταση, η οποία αποτελεί την διαδικασία κατά την οποία λαμβάνουμε τις συντεταγμένες x,y,z από μια λυμένη παρόμοια δομή και να τις προσαρμόσουμε στην υπό μελέτη δομή. Στη συνέχεια αν αυτές την ικανοποιούν, βάση του θεωρητικού μοντέλου για την υπό εξέταση δομή, τότε έχει βρεθεί με μεγάλη πιθανότητα μια καλή λύση της δομής. Στην περίπτωση της μοριακής αντικατάστασης χρησιμοποιούνται πιο ισχυρά προγράμματα (όπως DIRDIFF), που αναδιατάσσουν την λυμένη δομή στο χώρο ώστε να βρεθεί σε μια θέση, που να μοιάζει με την εξεταζόμενη δομή. Αυτό που συμβαίνει δηλαδή είναι να αφήνουμε ίδιους μόνο τους δυο μακρόκυκλους των β -CDs, αφαιρώντας τις πρωτοταγείς και δευτεροταγείς (-OH) ομάδες του συμπλόκου και φυσικά και του ξενιζόμενου μορίου (guest). Μετά ακολουθεί βελτιστοποίηση της δομής με το πρόγραμμα SHELXL, ώστε να βρούμε τις θέσεις όλων των ατόμων της β -CDs και του guest που εξετάζεται. Ωστόσο αν δεν βρεθεί ένα παρόμοιο σύμπλοκο, μπορούμε να καταφύγουμε στην επίλυση δομής με τη βοήθεια του προγράμματος SHELXT. Στο τέλος της διαδικασίας, το

πρόγραμμα DIRDIF δίνει ένα αρχείο τύπου ins, το οποίο χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της δομής με το SHELXL.

1.6. Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός προϊόντος ή τροφίμου οφείλεται κυρίως στην συνεργιστική δράση μεταξύ των ολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων ειδικότερα όσον αφορά τα τρόφιμα. Στα φυσικά αντιοξειδωτικά, ανήκουν οι τοκοφερόλες, τα φλαβονοειδή και οι φαινολικές ενώσεις (Κανονισμός ΕΕ αριθ.1129/2011). Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ολικής αντιοξειδωτικής δράσης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη, καθώς υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας *in vitro* και έτσι δεν υπάρχει μια μόνο αποδεκτή μέθοδος. Οι αντιοξειδωτικές μέθοδοι αναφέρονται στην αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος με την τιμή IC₅₀ (Inhibit Concentration), η οποία εκφράζει την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που πετυχαίνει την παρεμπόδιση στην οξείδωση ενός υποστρώματος κατά 50% *in vitro*. Αυτές οι μέθοδοι χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, στις μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου, όπως η ORAC, η μέθοδος LDL oxidation, και στις μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου όπως η TEAC (Trolox equivalent capacity) και η DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Ωστόσο ξεχωριστή κατηγορία αποτελεί η μέθοδος προσδιορισμού ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, καθώς μετράει τα ολικά φαινολικά συστατικά και όχι την συνολική αντιοξειδωτική δράση.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν η μέθοδος προσδιορισμού ολικών φαινολικών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu, και η δοκιμή DPPH. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στις παραπάνω μεθόδους έχουν σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του χρώματος τις οξειδωτικής ένωσης και ο βαθμός αλλαγής του χρώματος είναι ανάλογος με την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Η αντιοξειδωτική δράση του φυτικού υλικού είναι συνάρτηση της εκάστοτε συγκέντρωσης του και περιγράφεται από μια καμπύλη η οποία μπορεί να έχει τιμές παρεμπόδισης από 0 έως 100%. Η κλίση της καμπύλης δείχνει την αναγωγική ικανότητα του αντιοξειδωτικού η οποία εκφράζεται ως ισοδύναμα του αντιοξειδωτικού Trolox ή του καφεϊκού οξέος.

1.6.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu

Αποτελεί μια φωτομετρική μέθοδο, βασισμένη στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων των αλκοολικών εκχυλισμάτων από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών,

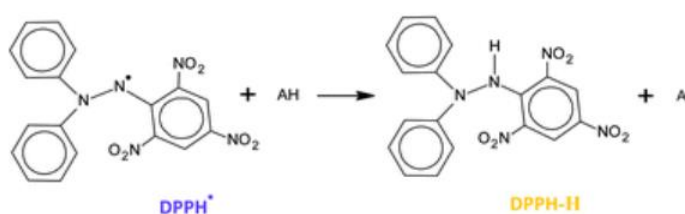
διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το Folin-Ciocalteu αποτελεί το κύριο αντιδραστήριο και είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($H_3PMO_{12}O_{40}$) και φωσφοβολφραμικά ($H_3PW_{12}O_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των οξέων προς μείγμα οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}), πιθανώς $(PMoW_{11}O_{40})^+$, χαρακτηριστικού κυανού χρώματος. Πιστεύεται ότι το μολυβδαίνιο ανάγεται πιο εύκολα σε σύμπλοκο και ότι μια αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου λαμβάνει χώρα.



Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 725 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 . Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τον δείκτη Folin-Ciocalteu εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού ή καφεϊκού οξέος.

1.6.2. Δοκιμή Διφαινολοπικρυλδραζιλίου ($DPPH^*$)

Αποτελεί την πιο χρησιμοποιούμενη φασματομετρική μέθοδο για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων δειγμάτων. Το $DPPH^*$ είναι μια σταθερή ρίζα, το οργανικό διάλυμα του οποίου παρουσιάζει έντονο ιώδες χρώμα. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των εκχυλισμάτων να αποχρωματίζουν το διάλυμα του $DPPH^*$.



Εικόνα 17: Μηχανισμός δράσης $DPPH^*$

Το κίτρινο χρώμα υποδηλώνει ότι όλο το ποσό της ελεύθερης ρίζας έχει δεσμευτεί από τα αντιοξειδωτικά του εκχυλίσματος.

Το $DPPH^*$, σύμφωνα με τους (Foti et al., 2004), αντιδρά με τις φαινολικές ενώσεις ($ArOH$), με δυο τρόπους:

α) με απόσπαση ενός φαινολικού H από τη ρίζα του $DPPH^*$ (HAT-αντίδραση).



β) με μεταφορά ηλεκτρονίου από τη φαινολική ένωση ή από το φαινολικό ανιόν προ της ελεύθερης ρίζας (ET- αντίδραση).



Σύμφωνα με μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η αντίδραση γίνεται με μηχανισμό μιας ET –αντίδρασης που γίνεται αρκετά γρήγορα, ενώ η HAT αντίδραση είναι πολύ αργή. Σε πολικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη και η αιθανόλη, τα μόρια των φαινολικών ενώσεων σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη με αποτέλεσμα να είναι αδύνατο να αντιδράσουν αυτές κάτω από το μηχανισμό μεταφοράς H στην ελεύθερη ρίζα. Μετά από επώαση αντιδραστήριου και δείγματος για 30 λεπτά, στους 25 °C, γίνεται η μέτρηση της απορρόφηση στα 517 nm. Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης του εκχυλίσματος χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$I\% = [(A_0 - A)/A_0] * 100, \quad \text{όπου}$$

I% = η παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας

A₀ = η απορρόφηση του τυφλού

A = η απορρόφηση του δείγματος

Όσο πιο χαμηλή είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο υψηλότερη είναι η ικανότητα αδρανοποίησης της ρίζας DPPH*, και κατ' επέκταση και η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός δείγματος. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το χαμηλό της κόστος, η απλότητα και η ταχύτητα της αξιολόγησης του αποτελέσματος. Ωστόσο μειονεκτεί στο γεγονός ότι η ταχύτητα της αντίδρασης μεταξύ του DPPH* και μιας αντιοξειδωτικής ένωσης εξαρτάται από τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων που βρίσκονται στο μόριο της ένωσης. (Gulcin et al., 2010).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Προμήθεια δείγματος πρόπολης

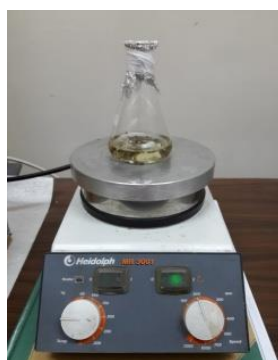
Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πρόπολης τα οποία προήλθαν από τις μέλισσες του εργαστηρίου Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Γ.Π.Α το έτος 2017 (Απρίλιος –Μάιος ανοιξιάτικη). Χρησιμοποιήθηκε στερεή ακατέργαστη πρόπολη. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία κατάψυξης και σε σκοτεινό μέρος μέχρι την χρήση τους.

2.2. Προετοιμασία εκχυλισμάτων/δειγμάτων πρόπολης

Υδρομεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης (PME): Αρχικά πραγματοποιήθηκε τεμαχισμός της ακατέργαστης πρόπολης σε μικρά κομμάτια και απομακρύνθηκαν οι ξένες ύλες που πιθανώς να περιείχε. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν σε κωνική φιάλη 2g πρόπολης και προστέθηκαν 60 mL υδροαλκοολικού διαλύματος μεθανόλης 70% (v/v) και το δείγμα τοποθετήθηκε για ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 24 ώρες σε σκοτάδι. Μετά το πέρας των 24 ωρών το δείγμα διηθείται υπό κενό σε χωνί Buchner για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων. Κατόπιν το εκχύλισμα αυτό χωρίστηκε στα δυο. Τα 30 mL χρησιμοποιήθηκαν για τις κρυσταλλογραφικές μεθόδους και τα άλλα 30 mL για τις χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές τεχνικές. Επομένως αυτό το υδρομεθανολικό εκχύλισμα των 30 mL που παρασκευάστηκε με αυτόν τον τρόπο θα αναφέρεται παρακάτω για λόγους συντομίας ως PME (Propolis methanolic extract).



Εικόνα 18: Διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner



Εικόνα 19: Ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα

Μεθανολικό εκχύλισμα με προσθήκη β -CD (PME β -CD): Προέκυψε με την προσθήκη 100 mg β -CD στο προηγούμενο εκχύλισμα PME. Μετά από την προσθήκη της β -CD, το διάλυμα αφέθηκε για 24 ώρες σε ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα σε σκοτάδι και στη συνέχεια έγινε διήθηση υπο κενό και παραλήφθηκε το διήθημα, το οποίο κατόπιν και άλλης επεξεργασίας χρησιμοποιήθηκε για την αέρια χρωματογραφία GC-MS.

Εκχύλισμα υδατικής φάσης χωρίς κυκλοδεξτρίνη (PMEH): το οποίο παραλήφθηκε με διαχωριστική χοάνη όπως περιγράφεται παρακάτω στην προετοιμασία δείγματος για GC-MS (ενότητα 2.1.5.). Το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση στην υγρή χρωματογραφία HPLC.

Εκχύλισμα υδατικής φάσης με β -CD (PMEH β -CD): το οποίο παραλήφθηκε με διαχωριστική χοάνη όπως περιγράφεται παρακάτω στην προετοιμασία δείγματος για GC-MS (ενότητα 2.1.5.). Το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση στην υγρή χρωματογραφία HPLC.

Προετοιμασία υδατικών εκχυλισμάτων για αντιοξειδωτικές δοκιμές:

- **E1:** Προστέθηκαν 0,7 g τεμαχισμένης ανοιξιιάτικης ακατέργαστης πρόπολης με 356 mg β -CD και σε 20 mL απεσταγμένου νερού και αφέθηκε για ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για τουλάχιστον 24 ώρες υπό θέρμανση στους 70 °C. Στη συνέχεια έγινε διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επεξεργασία του.
- **E2:** Προστέθηκαν 0,7 g τεμαχισμένης ανοιξιιάτικης ακατέργαστης πρόπολης με 1,5 mg α -CD και σε 20 mL απεσταγμένου νερού και αφέθηκε για ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για τουλάχιστον 24 ώρες υπό θέρμανση στους 70 °C. Στη συνέχεια έγινε διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επεξεργασία του.
- **E3:** Προστέθηκαν 0,7 g τεμαχισμένης ανοιξιιάτικης ακατέργαστης πρόπολης με 2,22 mg τυχαίας μεθυλιωμένης β -CD (Rameb) και με 20 mL απεσταγμένου νερού και αφέθηκε για ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για τουλάχιστον 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επεξεργασία του.
- **E4:** Προστέθηκε 0,7g τεμαχισμένης ανοιξιιάτικης ακατέργαστης πρόπολης σε 20 mL απεσταγμένου νερού και αφέθηκε για ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για τουλάχιστον 24 ώρες υπό θέρμανση στους περίπου 60°C. Στη συνέχεια έγινε διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επεξεργασία του.

2.3. Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου σε φαινόλες με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu

Όργανα

- Φωτόμετρο
- Vortex

Διαλύτες/ Αντιδραστήρια

- Διάλυμα Folin Ciocalteu 0.2 N
- Διαλύματα ανθρακικού νατρίου
- Πρότυπα διαλύματα καφεϊκού οξέος

Τα δείγματα που εξετάστηκαν είναι τα εξής:

- (i) E1
- (ii) E2
- (iii) E3
- (iv) E4

Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα Folin-Ciocalteu και ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 20% (w/v).

Σε καθαρό περιέκτη προστέθηκαν 1,5 mL απεσταγμένου νερού και 25 μL δείγματος (εκχύλισμα πρόπολης). Στη συνέχεια προστέθηκαν 125 μL διαλύματος Folin-Ciocalteu και μετά από 3 λεπτά κάθε περιέκτης εμβολιάστηκε με 375 μL ανθρακικού νατρίου και 475 μL απεσταγμένου νερού, προκειμένου να αναπτυχθεί αλκαλικό περιβάλλον και να λάβει χώρα αντίδραση. Ακολούθησε ανάδευση ώστε το διάλυμα να γίνει ομοιόμορφο και αφέθηκε σε ηρεμία για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι για να αναπτυχθεί και να σταθεροποιηθεί το χρώμα της αντίδρασης. Μετά την επώαση μετρείται η απορρόφηση στα 725 nm με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού UV-Vis μοντέλο Jasco V-550. Η κάθε ανάλυση έγινε εις τριπλούν για την αποφυγή σφαλμάτων. Για τον μηδενισμό του οργάνου παρασκευάστηκε για την ίδια διαδικασία τυφλό διάλυμα στο οποίο αντί για 25 μL δείγματος, προστέθηκαν 25 μL μεθανόλης (Singleton & Rossi, 1965), (Singleton et al., 1999).

Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα εκχυλίσματα καταναλώνουν το αντιδραστήριο, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του. Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων εκφράζεται σε mg καφεϊκού οξέος ανά mL εκχυλίσματος.

2.4. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή Διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου (DPPH*)

Όργανα

- Φωτόμετρο
- Vortex

Διαλύτες /Αντιδραστήρια

- Μεθανολικό διάλυμα εργασίας της σταθερής ρίζας DPPH
- Πρότυπα διαλύματα καφεϊκού οξέος

Τα ίδια εκχυλίσματα εξετάστηκαν και με αυτή τη μέθοδο. Η δοκιμή DPPH των Brand-Williams et al (1995), τροποποιήθηκε για τις ανάγκες της μελέτης. Παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα DPPH*, αναλογίας 4 mg DPPH* σε 100 mL μεθανόλης. Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH* χρησιμοποιήθηκε διφαινυλοπικρυλυδραζυλίο (Sigma). Σε καθαρό περιέκτη προστέθηκαν 3 mL του διαλύματος DPPH* και προστέθηκαν 30μL δείγματος. Μετά την ανάδευση και την επώαση σε σκοτεινό περιβάλλον σε θερμοκρασία δωματίου για 60 λεπτά μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού UV-Vis μοντέλο Jasco V-550 σε μήκος κύματος 517 nm, και προσδιορίστηκε το ποσοστό παρεμπόδισης (I%). Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν και για το τυφλό αντί για 30 μL δείγματος χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον μηδενισμό του οργάνου. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται σε μg/mL ισοδύναμα trolox και καφεϊκού οξέος.

Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης του εκχυλίσματος χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$I\% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$, όπου I% = η παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας, A_0 = η απορρόφηση του τυφλού, A = η απορρόφηση του δείγματος.

2.5. Ανάλυση των πτητικών συστατικών πρόπολης με Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS)

Τα δείγματα που εξετάστηκαν κατόπιν ακόλουθης επεξεργασίας είναι τα εξής:

- (i) PME
- (ii) PMEβ-CD

Το ένα δείγμα είναι το μεθανολικό εκχυλίσματα (PME), και το δεύτερο το μεθανολικό εκχυλίσμα μετά την κατεργασία με β-CD (PMEβ-CD) στα οποία η μεθανόλη και το νερό ήταν υψηλής καθαρότητας.

Προετοιμασία δειγμάτων πριν την αέρια χρωματογραφία GC-MS:

Για την παραλαβή του πτητικού κλάσματος των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρού-υγρού. Η ίδια επεξεργασία έγινε και στα δύο δείγματα. Έγινε προσθήκη του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος σε διαχωριστική χοάνη και προστέθηκαν επιπλέον 10 mL εξανίου (98,5% καθαρότητας). Στη συνέχεια έγινε ανακίνηση και εκτόνωση της χοάνης και

αφέθηκε για λίγα δευτερόλεπτα για να γίνει ο διαχωρισμός των φάσεων. Το εξάνιο αποτελεί έναν άπολο διαλύτη, σε αντίθεση με το νερό που είναι πολικό και την μεθανόλη που είναι μετρίως πολική και προστέθηκε με σκοπό την παραλαβή των πτητικών, άπολων συστατικών του εκχυλίσματος. Έτσι στην διαχωριστική χοάνη δημιουργούνται δυο φάσεις ανάλογα με την πυκνότητα των διαλυτών και τη διαφορετική πολικότητά τους. Η επάνω φάση, αποτελεί τη φάση του εξανίου και συλλέγεται σε ένα ποτήρι ζέσεως. Η διαδικασία της εκχύλισης με εξάνιο έγινε συνολικά τρεις φορές.

Επίσης πραγματοποιήθηκε συλλογή της κάτω φάσης (υδατική) η οποία αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυση των υδατοδιαλυτών συστατικών της με το HPLC. Επομένως όσον αφορά την υδατική φάση που θα αναλυθεί αργότερα προέκυψαν δυο δείγματα το PMEΗ (χωρίς κυκλοδεξτρίνη) και το PMEΗβ-CD (εκχύλισμα μετά την προσθήκη της β-κυκλοδεξτρίνης).



Εικόνα 20 : Η πάνω φάση (διάφανη) αποτελεί την οργανική φάση και η κάτω φάση την υδατική φάση

Μετά την παραλαβή όλης της οργανικής φάσης, αυτή τοποθετήθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary Evaporator) για συμπύκνωση μέχρι ξηρού στους 40 °C.



Εικόνα 21: Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotary Evaporator)

Στη συνέχεια στο ξηρό δείγμα προστέθηκαν 2,5 mL εξανίου για GC (καθαρότητας 99%) και άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO₄) για την απομάκρυνση της υγρασίας. Ακολουθεί φιλτράρισμα του δείγματος με τη βοήθεια σύριγγας και ενός μη πολικού φίλτρου CHROMAFILXtraPTFE -45/25 και το δείγμα είναι έτοιμο για την ανάλυση GC-MS.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αέριος χρωματογράφος (Trace GC ULTRA) εφοδιασμένος με ανιχνευτή φασματομέτρο μάζας (DSQ II), της εταιρείας Thermo Scientific. Η στήλη του χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν Thermo-5MS (30m x 0,25 mm ID, πάχος φιλμ 0,25 μm). Τα φέρον αέριο ήταν ήλιο (He), με ροή 1mL/min. Η θερμοκρασία στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος ήταν 220 °C και στη γραμμή διαβίβασης του ανιχνευτή (MS transfer line) 250 °C. Η μέθοδος ιονισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν ιονισμού ηλεκτρονίων (electron ionization). Το πρόγραμμα ανάλυσης, το οποίο είχε διάρκεια 63 min, περιλάμβανε παραμονή της θερμοκρασίας της στήλης για 4 λεπτά στους 50 °C, αύξηση στους 250 °C με ρυθμό 3 °C/min και παραμονή για 10 min. Ο όγκος του προς ανάλυση δείγματος ήταν 1μL και εισαγόταν χειροκίνητα στο σύστημα έγχυσης με ένεση, με την τεχνική εισαγωγής δείγματος, splitless. Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίζεται στη σύγκριση των φασμάτων μαζών με αντίστοιχα φάσματα πρότυπων ενώσεων που έχουν καταχωρηθεί σε βάσεις δεδομένων, όπως βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών καθώς και σχετική βιβλιογραφία, σε συνδυασμό πάντα με τον χρόνο έκλουσης της ουσίας από τη χρωματογραφική στήλη. Οι βιβλιοθήκες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι οι Adams 07, NIST 98 και Wiley 275. Τα ποσοστά επί τοις εκατό (%) των ενώσεων υπολογίζονται λαμβάνοντας υπόψη το εμβαδόν της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος και την αναγωγή του σε ποσοστό.

2.6. Ανάλυση υδατικού κλάσματος πρόπολης με Υγρή Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC - DAD)

Τα δείγματα που εξετάστηκαν είναι τα εξής:

- (i) Το PMEΗ
- (ii) Το PMEΗβ-CD

Πριν την ανάλυση τους προηγήθηκε φιλτράρισμα με φίλτρο σύριγγας πορώδους 0,20 μm και διάμετρο 15 mm (ChromafilPET- 20/15). Λόγω υψηλής πυκνότητας του δείγματος ακολούθησαν αραιώσεις με διαλύτη μεθανόλη / νερό (70 % v/v) και διαπιστώθηκε πως η πιο αποδοτική αραιώση είναι 1:10 v/v. Χρησιμοποιήθηκε υγρός χρωματογράφος Agilent Technologies HPLC 1100, εφοδιασμένος με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (diode array detector-DAD). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό Agilent Data Analysis.



Εικόνα 22: Υγρός χρωματογράφος Agilent Technologies HPLC 1100, εφοδιασμένος με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD)

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε στήλη ανάδρομης φάσεως τύπου Supelco Discovery HSC18 με μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και πορώδες 5 μm . Για την κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μείγμα διαλυτών.

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής διαλύτες:

A: νερό LC/οξικό οξύ (CH_3COOH), 99.75:0.25 (% v/v).

B: μεθανόλη LC υψηλής καθαρότητας (99.9 %).

Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 30 $^{\circ}\text{C}$. Η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη έγινε χειροκίνητα με μικροσύριγγα και ο όγκος εισαγωγής ήταν 20 μL δείγματος. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης είναι 0.5 mL/min και το πρόγραμμα έκλουσης ήταν βαθμιδωτό: 0-5 min 25% B, 30 min 65% B, 60-70 min 100% B (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Το βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε.

Χρόνος t (min)	Διαλύτης B (μεθανόλη)	Διαλύτης A (νερό/οξικό οξύ)
0	25	75
5	25	75
30	65	35
60	100	0
70	100	0

Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 294 και 324 nm. Για την ταυτοποίηση των ουσιών έγινε σύγκριση των χρόνων κατακράτησης και των φασμάτων UV-Vis των κορυφών που προέκυψαν από την ανάλυση με την υγρή χρωματογραφία, με τους αντίστοιχους χρόνους και φάσματα από τη βιβλιογραφία.

2.7. Ανάλυση συστατικών πρόπολης με Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR) με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR)

Το δείγμα που εξετάστηκε είναι το εξής:

- (i) Το PME, δηλαδή το υδρομεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης.

Η λήψη φάσματος FT-IR έγινε με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance spectroscopy, ATR). Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Φασματοφωτόμετρο FTIR της εταιρείας Nicolet, μοντέλο 6700.

Τα φάσματα λήφθηκαν με την τεχνική ATR. Συγκεκριμένα 200μL δείγματος τοποθετήθηκαν τοποθετήθηκαν σε επαφή με πλάκα εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR), με διάμετρο 2 mm. Στη συνέχεια κατεγράφη το φάσμα. Σε κάθε δείγμα γινόταν 100 σαρώσεις, η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν 4cm^{-1} , ενώ η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν $0,3125\text{ mms}^{-1}$. Η ανάλυση των φασμάτων και οι συνήθεις επεξεργασίες για την εξομάλυνση του σήματος και τη διόρθωση της βασικής γραμμής, κανονικοποίηση της κλίμακας πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού προγράμματος OMNIC (έκδοση 8.2.0.387). Οι επεξεργασίες που υπέστησαν τα φάσματα ήταν αποκοπή της κορυφής του CO_2 , εξομάλυνση και διόρθωση της βασικής γραμμής κάνοντας χρήση των αυτόματων λειτουργιών του λογισμικού, κανονικοποίηση της κλίμακας. Η ανάλυση του δείγματος επαναλήφθηκε τρεις φορές για τη μείωση σφαλμάτων.

2.8. Κρυσταλλογραφική μελέτη προϊόντων εγκλεισμού πρόπολης παρουσία κυκλοδεξτρινών

2.8.1. Προετοιμασία Κρυστάλλωσης προϊόντων εγκλεισμού πρόπολης

Η προετοιμασία των διαλυμάτων κρυστάλλωσης και η δημιουργία κρυστάλλων του συμπλόκου εγκλεισμού πρόπολης/ β -CD έγινε στο εργαστήριο Φυσικής του Γ.Π.Α. Η β -CD, η α -CD, και η καθαρή νερολιδόλη (μίγμα cis και trans νερολιδόλης, καθαρότητας 98%, CAS: 7212-44-4, MW: 222,37g/mol και πυκνότητας (d): 0,875g/mL στους 25°C) που χρησιμοποιήθηκαν, είναι εμπορικά διαθέσιμες από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Για την κρυστάλλωση ακολουθήσαμε τη μέθοδο της αργής ψύξης. Οι κρύσταλλοι του συμπλόκου εγκλεισμού της πρόπολης σε β -κυκλοδεξτρίνη (β -CD) και σε α -κυκλοδεξτρίνη (α -CD) δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο της αργής ψύξης. Το ξηρόλοφιλωμένο δείγμα πρόπολης που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από την ακόλουθη επεξεργασία: Αρχικά, 30 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης (PME), που παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται παραπάνω στην προετοιμασία των δειγμάτων και κατόπιν

δίθησης, συμπυκνώθηκαν στο Rotary evaporation για περίπου 3 ώρες με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύτη (μεθανόλη). Στη συνέχεια αφού εξατμίστηκε όλη η μεθανόλη, το εκχύλισμα πρόπολης τοποθετήθηκε στην κατάψυξη για περίπου 2 μέρες και κατόπιν ακολούθησε λυοφιλίωση για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών, το ξηρό δείγμα βγήκε από τη λυοφιλίωση και χρησιμοποιήθηκε για την κρυστάλλωση.

2.8.2. Πειράματα κρυστάλλωσης εκχυλίσματος πρόπολης παρουσία α - και β -CD

Πιο ειδικά, στο πρώτο διάλυμα προστέθηκαν 5 mg ξηρής λυοφιλιωμένης πρόπολης σε 2mL κορεσμένου υδατικού διαλύματος β -CD (35mg β -CD σε 2 mL H₂O). Επίσης γνωρίζουμε πως η υδατική διαλυτότητα της β -CD είναι 18,5 mg/mL. Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση στους 70°C για 48h και ακολούθησε σταδιακή ελάττωση της θερμοκρασίας έως τους 25°C. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός κρυστάλλων στο χρονικό διάστημα των 8 ημερών που ακολούθησε. Για τον λόγο αυτό έγινε προσθήκη 0,5 mL αιθανόλης και το μίγμα αφέθηκε ξανά υπό ανάδευση στους 70°C για άλλες 24 h και ακολούθησε σταδιακή ελάττωση της θερμοκρασίας (ημέρες 1-3: 5 °C/day, ημέρες 4-6: 2,5 °C/day, ημέρες 7-8: 1,5 °C/day) έως τους 25°C. Μέσα σε διάστημα 7 ημερών σχηματίστηκαν πρισματικοί καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι.

Στην άλλη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η α -CD. Συγκεκριμένα προστέθηκαν 10 mg ξηρής λυοφιλιωμένης πρόπολης σε 2mL υδατικού διαλύματος α -CD (83 mg α -CD σε 2 mL H₂O). Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση στους 70°C για 48h και ακολούθησε σταδιακή ελάττωση της θερμοκρασίας έως τους 25°C. Δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός κρυστάλλων ούτε μετά την προσθήκη αιθανόλης, όμοια με την επεξεργασία που περιγράφεται παραπάνω.

Τα πειράματα κρυστάλλωσης επαναλήφθηκαν τρεις φορές με το ίδιο δείγμα ανοιξιότικης πρόπολης. Η παρατήρηση των κρυστάλλων έγινε με στερεοσκόπιο EUROMEX, με πηγή ψυχρού φωτός EUROMEX LE.5210 και η φωτογράφιση με φωτογραφική μηχανή Canon EOS 350D DIGITAL. Η παρατήρηση και φωτογράφιση των κρυστάλλων έγιναν στο μητρικό υγρό.

2.8.3. Πειράματα κρυστάλλωσης προϊόντος εγκλεισμού καθαρής νερολιδόλης σε β -CD

Σε κορεσμένου υδατικό διάλυμα β -CD (44,6 mg β -CD σε 2mL H₂O στους 70°C) προσθέσαμε 10 μ L μίγματος cis και trans νερολιδόλης που αποτελεί ισομοριακή ποσότητα (0,039 mmol) δεδομένης της ποσότητας του μίγματος ($d= 0,875$ g/mL). Το μίγμα αυτό αναδεύτηκε (αεροστεγώς σφραγισμένο) για 1 ώρα στους 70 °C. Για το διαυγές διάλυμα που προέκυψε ακολούθησαμε τη

διαδικασία αργής ψύξης που περιγράφεται παραπάνω. Μετά από 7 ημέρες παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πρισματικών κρυστάλλων κατάλληλων για περίθλαση ακτίνων-X (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Εικόνα κρυστάλλων από πολωτικό στερεοσκόπιο. Πείραμα κρυστάλλωσης καθαρής νερολιδόλης παρουσία β -CD.

2.8.4. Συλλογή, επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων από περίθλαση ακτίνων-X και επίλυση και βελτιστοποίηση της δομής

Από τους κρυστάλλους που σχηματίστηκαν επιλέχθηκαν 10 ευμεγέθεις για την ακτινοβολή τους με ακτίνες-X.



Εικόνα 24: Φωτογραφία από την τοποθέτηση ρομβοειδούς κρυστάλλου που προέκυψε από εκχύλιμα πρόπολης παρουσία β -CD σε Dual Thickness Micro Mounts της MiteGen για την έκθεση του σε ακτίνες-X

Η συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X από τους μονοκρυστάλλους πραγματοποιήθηκε με το περιθλασίμετρο D8 Venture της Bruker, χρησιμοποιώντας το λογισμικό APEX 3, ανιχνευτή

PHOTON 50 (τύπου CMOS) και πηγή ακτίνων-X το σύστημα IμS Microfocus X-ray Source - Cu ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό κρυογονικές συνθήκες, σε θερμοκρασία 120 K. Οι εικόνες περίθλασης αναγνώστηκαν με το πρόγραμμα SAINT (APEX 3, 2012). Διόρθωση απορρόφησης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SADABS (Sheldrick, 2012) και η επίλυση της δομής έγινε με τη βοήθεια του SHELXT. Η βελτιστοποίηση όλων των δομών πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος SHELXL-2014 (Sheldrick, 2015) χρησιμοποιώντας το γραφικό περιβάλλον SHELXLE GUI (Hubschle et al., 2011). Προκειμένου να επιτευχθεί η βελτιστοποίηση των δομών χρησιμοποιήθηκαν κάποιοι περιορισμοί (restraints) σε μήκη δεσμών και γωνίες ξενιστών ή και ξενιζομένων μορίων, όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο. Οι περιορισμοί αυτοί έγιναν με την χρήση των εντολών DFIX, DANG και SIMU του προγράμματος SHELXL (Thorn et al., 2012). Τα υδρογόνα προστέθηκαν υπολογιστικά με την εντολή HFIX. Η εντολή ANIS χρησιμοποιήθηκε στα άτομα του ξενιστή αποφεύγοντας εκείνα που παρουσιάζουν αποδιάταξη σε περισσότερες από μία θέσεις. Γενικά η βελτιστοποίηση της δομής με ανισοτροπικούς παράγοντες θερμικής κίνησης βελτιώνει από τη μία πλευρά τον δείκτη R_1 όμως ταυτόχρονα οδηγεί σε μικρό λόγο δεδομένων/παραμέτρους, πράγμα το οποίο οδηγεί σε overfitting του τελικού μοντέλου. Τα μόρια νερού τοποθετήθηκαν σύμφωνα με τους χάρτες διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας (Fo-Fc) ύστερα από διαδοχικούς κύκλους βελτιστοποίησης. Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων (Least Squares, L.S) επί του F^2 και ολοκληρώθηκε όταν το μοντέλο εμφάνισε ικανοποιητικό (<10%) δείκτη αξιοπιστίας (R_1) ενώ η μέγιστη μεταβολή παραμέτρων δεν ξεπερνά το 0,05. Εκτός από τον τελικό δείκτη αξιοπιστίας ελέγχθηκε και ο wR_2 ο οποίος ήταν επίσης ικανοποιητικός (περίπου τριπλάσιος του R_1). Τέλος, η τιμή του τελικού δείκτη προσαρμογής επί του F^2 ($GOOF$) κυμάνθηκε γύρω στο 1.00.

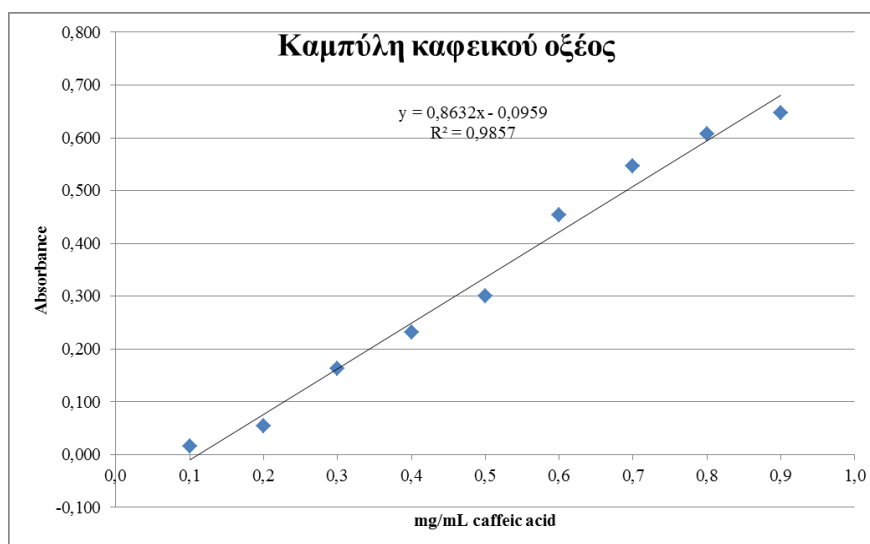
Με το πρόγραμμα MERCURY (Macrae et al., 2008) έγινε η γεωμετρική ανάλυση της δομής του συμπλόκου εγκλεισμού και η σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής ασύμμετρης μονάδας και της διεύθεσης του συμπλόκου στον κρύσταλλο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων πρόπολης

3.1.1. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχόμενου - Δοκιμή Folin-Ciocalteu

Προσδιορίστηκε ο αριθμός των ολικών φαινολικών συστατικών σε 4 υδατικά εκχυλίσματα ακατέργαστης πρόπολης, όπου στο πρώτο προστέθηκε β -CD, στο δεύτερο α -CD και στο τρίτο Rameb. Στο τέταρτο εκχύλισμα δεν προστέθηκε κυκλοδεξτρίνη και ήταν το απλό υδατικό εκχύλισμα πρόπολης. Στην συνέχεια ακολούθησε η σύγκρισή τους. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται σε mg καφεϊκού οξέος / mL εκχυλίσματος πρόπολης. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς καθώς και η εξίσωση σύμφωνα με την οποία έγινε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



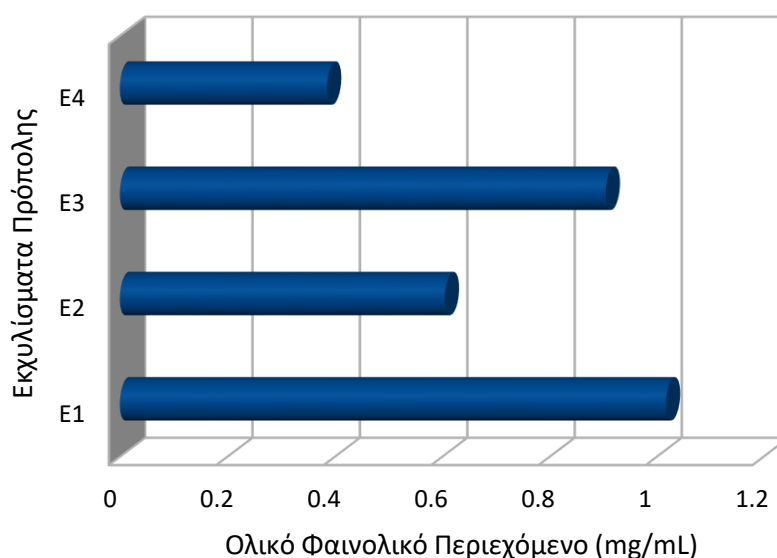
Εικόνα 25: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος.

Πίνακας 12: Φαινολικό περιεχόμενο υδατικών εκχυλισμάτων σύμφωνα με τη Δοκιμή Folin – Ciocalteu (mg καφεϊκού οξέος /mL εκχυλίσματος)

Δοκιμή Folin- ολικά φαινολικά					
Δείγματα	A	mg/mL καφεϊκού οξέος	MO	SD	MO \pm SD
E1: β -CD/πρόπολη	0,855	1,1015	1,0173	0,0839	1,02 \pm 0,0839 mg/mL
E1: β -CD/πρόπολη	0,782	1,017			
E1: β -CD/πρόπολη	0,71	0,9336			
E2: α -CD/πρόπολη	0,398	0,5721	0,6049	0,0324	0,604 \pm 0,03245 mg/mL
E2: α -CD/πρόπολη	0,427	0,6057			

E2: α -CD/πρόπολη	0,454	0,637			
E3: Rameb/πρόπολη	0,754	0,9845	0,9045	0,0692	0,904 \pm 0,069 mg/mL
E3: Rameb/πρόπολη	0,648	0,8617			
E3: Rameb/πρόπολη	0,653	0,8675			
E4: πρόπολη/H ₂ O	0,261	0,4134	0,3856	0,0376	0,3856 \pm 0,0376 mg/mL
E4: πρόπολη/H ₂ O	0,25	0,4007			
E4: πρόπολη/H ₂ O	0,20	0,3427			

Η Εικόνα 26 δείχνει σχηματικά το φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων πρόπολης όπως αυτό προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu.



Εικόνα 26: Ραβδόγραμμα σύγκρισης ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων εκφρασμένο σε mg καφεϊκού οξέος/mL εκχυλίσματος πρόπολης

Σύμφωνα με το παραπάνω ραβδόγραμμα, η ποσότητα των ολικών φαινολικών υπερಿಸχύει στο εκχύλισμα E1 με την β -CD και στο E3 με την Rameb. Τα αποτελέσματα κυμαίνονται από 0,3856 \pm 0,0376mg/mL με 1,02 \pm 0,0839 mg/mL. Το E4 υδατικό εκχύλισμα πρόπολης παρουσιάζει αναμενόμενα την μικρότερη αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο όλα τα εκχυλίσματα, ακόμη και το απλό υδατικό εκχύλισμα πρόπολης, παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση, γεγονός που προσδίδει στην πρόπολη σαν φυσικό προϊόν ιδιαίτερα αυξημένη αντιοξειδωτική δράση. Προκύπτει ότι η καλύτερη αντιοξειδωτική δράση επιτυγχάνεται στην πρόπολη όταν συνδυάζεται με την β -CD. Στα δείγματα μας δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιος οργανικός διαλύτης, καθώς τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν

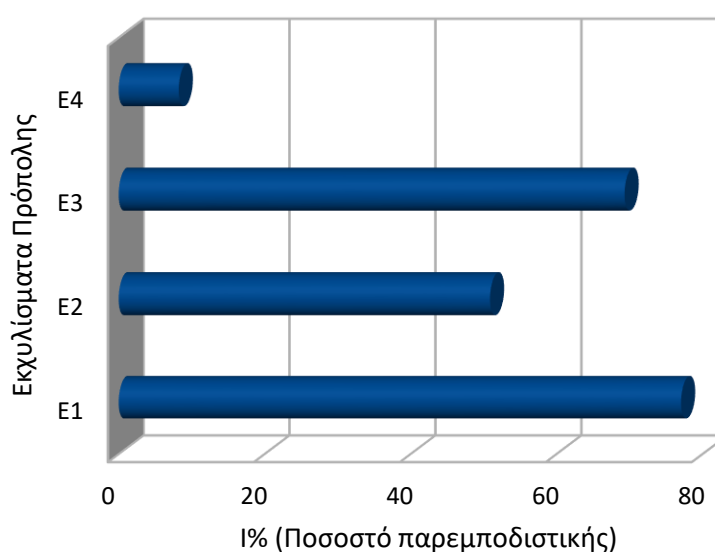
ήταν υδατικά. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με την βιβλιογραφία προκύπτει πως τα αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό φλαβονοειδών (σχεδόν διπλάσια ποσότητα) σε σχέση με τα μεθανολικά, και αρκετά περισσότερο σχέση με τα υδατικά. (Κακούρη, 2015).

3.1.2. Δοκιμή Διφαινολοπικρυλυδραζυλίου (DPPH)

Σύμφωνα με την δοκιμή DPPH, το εκχύλισμα με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση είναι και πάλι το εκχύλισμα με την β -CD. Τα ποσοστά παρεμποδιστικής δράσης των εκχυλισμάτων πρόπολης κυμαίνονται από $8,23 \pm 0,0376$ έως $77,07 \pm 8,04$. Η Εικόνα 27 δείχνει σχηματικά το φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων πρόπολης όπως αυτό προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH.

Πίνακας 13: Πίνακας ποσοστών παρεμποδιστικής δράσης των δειγμάτων.

Εκχυλίσματα πρόπολης	I% (Ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης)
E1 (β -CD/πρόπολη)	$77,07 \pm 8,04$
E2 (α -CD/πρόπολη)	$50,89 \pm 5,94$
E3 (Rameb/πρόπολη)	$69,32 \pm 8,12$
E4 (πρόπολη/H ₂ O)	$8,23 \pm 1,28$



Εικόνα 27: Ραβδόγραμμα σύγκρισης αντιοξειδωτικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων πρόπολης.

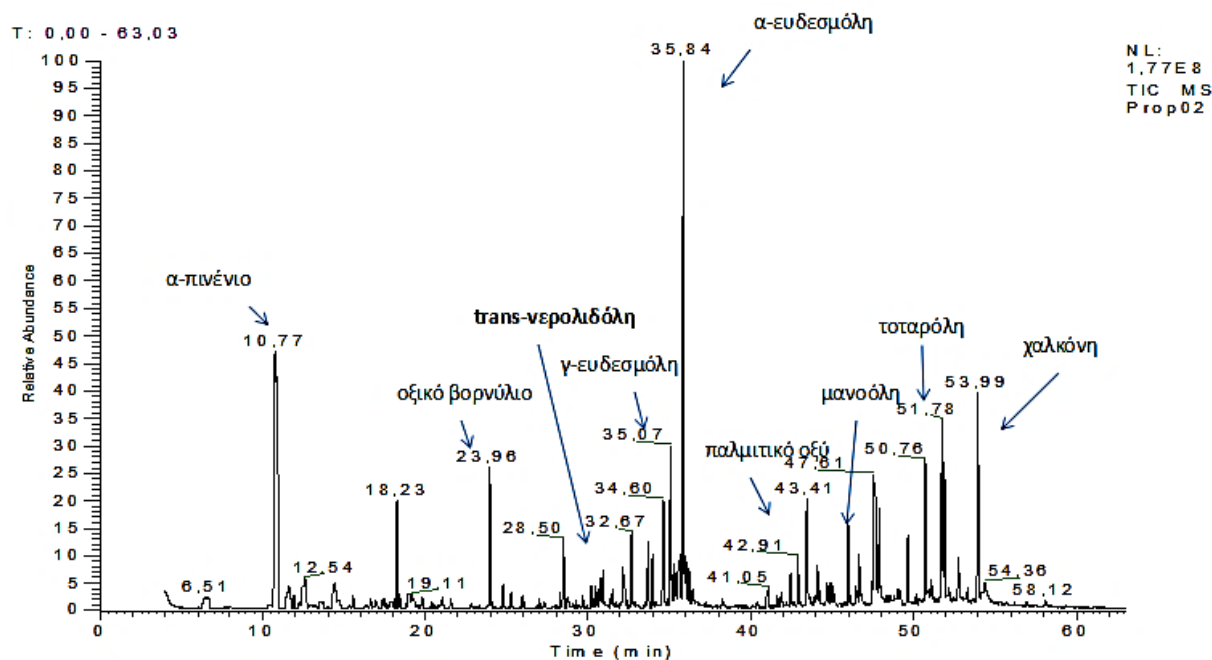
Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και σε αυτήν τη δοκιμή και προκύπτει ότι το δείγμα με το μεγαλύτερο ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης των ελευθέρων ριζών είναι και εδώ αυτό με την β -CD (E1). Ενώ αυτό με την ελάχιστη είναι το υδατικό εκχύλισμα πρόπολης χωρίς κυκλοδεξτρίνες. Επίσης αρκετά μεγάλη παρεμποδιστική δράση έχει και το δείγμα E3 που περιέχει Rameb.

Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι το δείγμα E1 έχει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη δοκιμή DPPH. Το ίδιο δείγμα έχει το μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

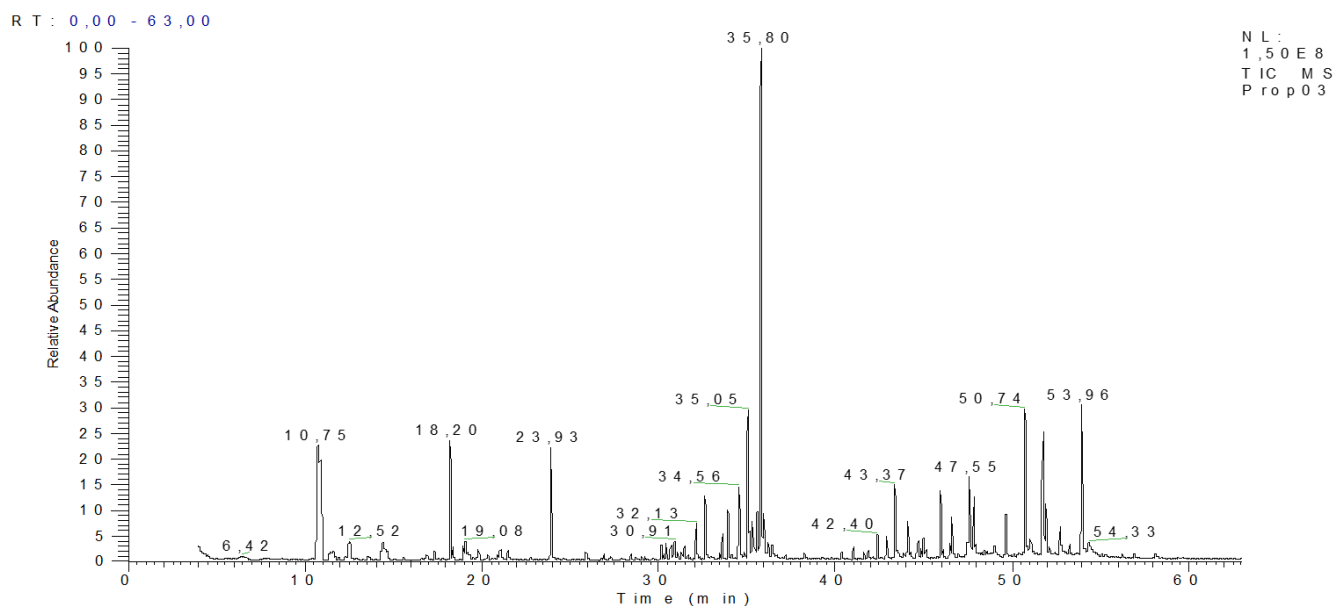
3.2. Αποτελέσματα Αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης GC-MS

Τα αποτελέσματα GC-MS αφορούν τις αναλύσεις στις φάσεις του εξανίου όπως παραλήφθηκαν από την εκχύλιση υγρού-υγρού και επεξεργάστηκαν σύμφωνα με όσα αναφέρονται στην παράγραφο 2.1.5.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αεριοχρωματογραφήματα των δειγμάτων PME και PME- β -CD, καθώς και οι ουσίες που ταυτοποιήθηκαν με το % ποσοστό μείωσής τους.



Εικόνα 28: Αεριοχρωματογράφημα πτητικών συστατικών πρόπολης – PME



Εικόνα 29: Αεριοχρωματογράφημα πτητικών συστατικών πρόπολης - PMEβ-CD.

Πίνακας 14: Συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα PME και PMEβ-CD, οι χρόνοι έκλουσης τους και το % ποσοστό μείωσης τους.

Χρόνος Κατακράτησης-RT, (min)	Ενώσεις		Μεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης (PME)	Μεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης με β-CD (PMEβ-CD)	Εμβαδόν κορυφής PME	Εμβαδόν κορυφής PMEβ-CD	Ποσοστό Μείωσης (%)
	Εμπειρική ονομασία	Ονομασία κατά IUPAC					
10.77	α-πινένιο (α-pinene)	(1R)-2,6,6-τριμεθυλοδικυκλο[3,1,1]επτ-2-ένιο	+	+	130620933 1	472228925	63,847
18.41	6-καμφενόλη (6-camphenol)	2,2-διμεθυλ-3-μεθυλιδενεδικυκλο[2.2.1]επταν-5-όλη	+	+	19924735	16625020	91,656
23.96	οξικός εστέρας βορνεόλης (l-borneylacetate)	οξική-ενδο-1,7,7-τριμέθυλο-δικυκλο[2.2.1]επταν-2-όλη	+	+	170448536	123337277	27,639
25.94	α-κουμπεμπένιο (α-cubebene)	4-ισοπροπυλο-1,3,7-διμεθυλο-3a,3b,4,5,6,7-εξάδρο-1-H-κυκλοπεντα[1,3]κυκλοπροπα[1,2]βενζένιο	+	+	13297669	8993970	32,364
26.02	οξικός εστέρας α-τερπινεόλης (α-terpinylacetate)	οξικός εστέρας-2-(4-μεθυλοκυκλοεξεν-3-ενυλ)-προπαν-2 υλο	+	+	6464765	4924386	23,827
26.97	α-κοπαένιο (α-copaene)	8-ισοπροπυλο-1,3-διμεθυλο-τρικυκλο, (1R, 2S, 6S, 7S, 8S)-[4.4.0.02,7]δέκα-3-ένιο	+	+	11500347	7871262	31,556

27.29	μπουρμπονένιο (bourbonene)	1-ισοπροπυλο-3α-μεθυλο-6-μεθυλο-δωδεκαϋδροκυκλο πεντα[3,4] κυκλοβουτα [1,2] κυκλοπεντένιο	+	+	18314490	10126374	44,708
28.5	trans-καρυοφυλλένιο (trans-caryophyllene)	4,11,11-τριμεθυλο-8-μεθυλο-δωδεκακυκλο[7.2.0]ενδεκ-4-ένιο	+		96698497		100
28.44	α-κεδρένιο (α-cedrene)	(1S,2R,5S,7R)- 2,6,6,8-τετραμεθυλ-τρικυκλο [5,3,1,01,5] ενδεκ-8-ένιο		+		10617875	0
29.2	β-φαρνεσένιο (β-farnesene)	(6Z)-7,11-διμεθυλο-3-μεθυλιδεν-δωδεκα-1,6,10-τριένιο	+	+	9888637	5188128	47,534
30.16	9-επι- (E) -καρυοφυλλένιο (caryophyllene<9-epi-(E))	(1R,4E,9R)-4,11,11-τριμέθυλ--8- μεθυλιδεν-δικυκλο [7.2.0]ενδεκ-4-ένιο	+	+	41073501	21691907	47,187
30.46	δ-γερμακρένιο (germacrene-d)	[S- (E, E)]-1,6-κυκλοδεκαδιένιο, 1-μεθυλο-5-μεθυλο-8- (1-μεθυλαίθυλο)	+	+	23383510	16617389	28,935
30.75	β-σελινένιο (β-selinene)	8α-μεθυλ-5-μεθυλιδεν-3-προπ-1-εν-2-υλ-1,2,3,4,4α, 6,7,8-οκταϋδροναφθαλένιο	+	+	39137928	21086967	46,122
30.94	α-σελινένιο (α-selinene)	(3R, 4aR, 8aR) -5,8α-διμεθυλ-3-προπ-1-εν-2-υλ- 2,3,4,4α, 7,8-εξϋδρο- 1H- ναφθαλένιο	+	+	51204066	22527147	56,005
31.34	σεσκισινεόλη (sesquicineole)	2,4-διμεθυλο-2- (4-μεθυλοπεντ-3-ενυλο) -3-οξιδικυκλο [2.2.2] οκτάνιο	+	+	10928978	6774490	38,013
31.50	δ-καδινένιο (δ-cadinene)	(1S,8aR)1-ισοπρόπυλο-4,7-διμέθυλο-1,2,3,5,6,8α-εξϋδρο-1H- ναφθαλένιο	+	+	32208441	14126421	56,140
32.67	trans-νερολιδόλη (trans-nerolidol)	3,7,11-τριμεθυλο-1,6,10-δωδεκατριεν-3-όλη	+	+	96433275	74972703	22,254
33.68	οξείδιο του καρυοφυλλενίου (caryophylleneoxide)	(1R,4R,6R,10S)- 5-οξιατρικυκλο (8.2.0.0 (4,6)) δωδεκάνιο, 4,12,12-τριμεθυλο-9-μεθυλενιο	+	+	84865164	29837667	64,841
33.97	γουαϊόλη (guaiol)	(3S-(3a,5a,8a))- 5-αζουλενομεθανόλη, 1,2,3,4,5,6,7,8-οκταϋδρο-α, α, 3,8-τετραμεθυλ-	+	+	71406650	59092715	17,244

34.60	επι-κεδρόλη (epicedrol)	1 H-3α,7-μεθανοαζουλεν-6-όλη, οκταϋδρο-3,6,8,8-τετραμεθυλ-	+	+	160961183	98241945	38,965
35.07	γ-ευδεσμόλη (γ-eudesmol)	2 - [(2R, 4aR) -4α, 8-διμεθυλ-2,3,4,5,6,7-εξαϋδρο-1H-ναφθαλεν-2-υλ] προπαν-2-όλη	+	+	228918103	201302515	12,063
35.84	α-ευδεσμόλη (α-eudesmol)	4α, 8-διμεθυλ-2,3,4,5,6,8α-εξαϋδρο-1H-ναφθαλεν-2-υλ-προπαν-2-όλη	+	+	704721924	603751209	14,327
43.41	παλμιτικό οξύ (palmitic acid)	εξαδεκανοϊκό οξύ	+	+	143244239	87637181	38,819
45.99	μανοόλη (manool)	(3R)-5-[(1S, 4aS, 8aS)-5,5,8α-τριμεθυλ-2-μεθυλιδεν-3,4,4α, 6,7,8-εξαϋδρο-1H-ναφθαλεν-1-υλ]-3-μεθυλοπεντ-1-εν-3-όλη	+	+	122564504	85819672	29,979
51.78	τοταρόλη (trans-totarol)	4b, 8,8-τριμεθυλ-1-προπαν-2-υλ-5,6,7,8α, 9,10-εξαϋδροφαινανθρεν-2-όλη	+	+	267956575	173749695	35,157
51.94	αμπιετάλη (abietal)	(1R, 4aR, 4bR, 10aR) -1,4α-διμεθυλ-7-προπαν-2-υλ-2,3,4,4b, 5,6,10,10α-οκταϋδροφαινανθρενο-1-καρβαδεϋδης	+	+	177324924	58122603	67,222
52.77	κομμουνικό οξύ (communical acid)	(1S, 4aR, 5R, 8aS) -1,4α-διμεθυλ-6-μεθυλιδεν-5-(3-μεθυλπεντα-2,4-διενυλ) -3,4,5,7,8,8α-εξαϋδρο- ναφθαλινο-1-καρβοξυλικό οξύ	+	+	66906738	36974352	44,737
53.99	χαλκόνη (chalcone)	(E) -1,3-διφαινυλοπροπ-2-εν-1-όνη	+	+	298882691	207808791	30,471

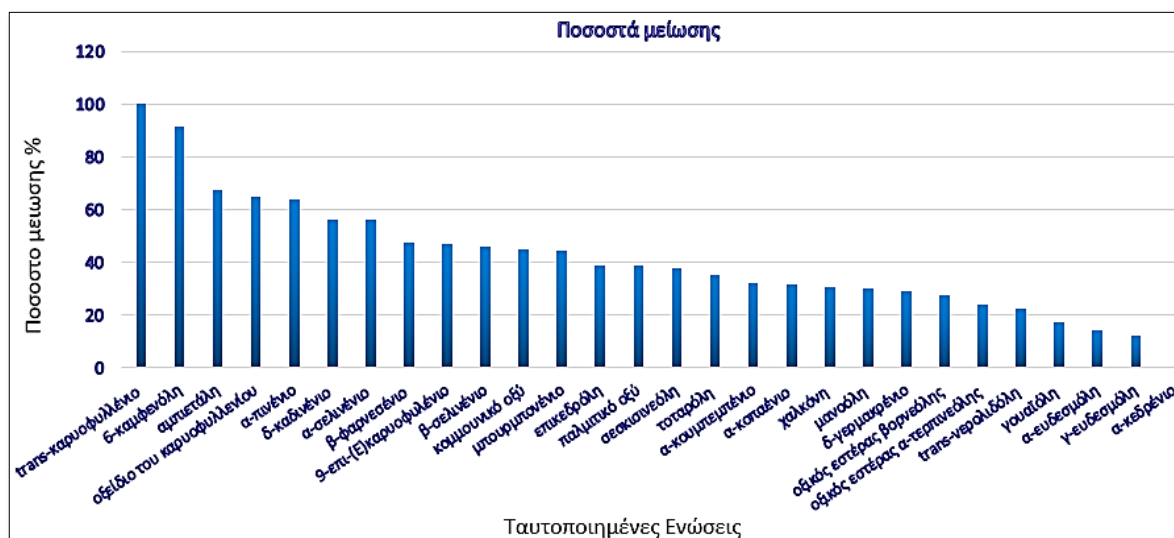
Από την σύγκριση των αέριων χρωματογραφημάτων προέκυψε ότι στα δύο διαφορετικής μεταχείρισης δείγματα πρόπολης ανιχνεύθηκαν οι ίδιες ουσίες σε διαφορετική όμως ποσότητα. Στα αέρια χρωματογραφήματα των πτητικών κλασμάτων της πρόπολης καταγράφηκαν πλήθος ενώσεων από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν 28. Οι ουσίες με την μεγαλύτερη αναλογία κατά φθίνουσα σειρά, σύμφωνα με το εμβαδόν των κορυφών τους, είναι το α-πινένιο, η α-ευδεσμόλη, η χαλκόνη, η τοταρόλη και η γ-ευδεσμόλη. Συγκεκριμένα η αναλογία του α-πινενίου στο εκχύλισμα πρόπολης είναι εμφανώς αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με τις άλλες ουσίες. Σύμφωνα με άλλες μελέτες στα πτητικά συστατικά της πρόπολης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, η κυρίαρχη ένωση που ταυτοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις και σε μεγαλύτερη αναλογία είναι το α-πινένιο. Γεγονός το οποίο συμφωνεί απόλυτα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθώς το α-πινένιο είναι σε

μεγαλύτερη αναλογία στο μεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης. Σε ελληνική πρόπολη, έχουν ταυτοποιηθεί και άλλες ουσίες, σε μικρότερα ποσοστά, τα οποία συμφωνούν με την παρούσα μελέτη, όπως η γουαϊόλη, η μανούλη, η κεδρόλη, το καδινένιο και η α-ευδεσμόλη. Επίσης σε δείγμα τουρκικής πρόπολης ταυτοποιήθηκαν κάποιες ακόμη ουσίες, από τις οποίες η α και β-ευδεσμόλη, βρέθηκαν σε αρκετά υψηλά ποσοστά στα δείγματα (15% και 19% αντίστοιχα). Ωστόσο στην δική μας μελέτη ταυτοποιήθηκαν μόνο η α και γ-ευδεσμόλη. Σε αρκετά μεγάλο ποσοστό εχει ταυτοποιηθεί και η α-κεδρόλη (33%) στην τουρκική πρόπολη, ενώ στην δική μας μελέτη ταυτοποιήσαμε μόνο την επι-κεδρόλη. Τα αποτελέσματα των χρωματογραφημάτων που βρήκαμε συμφωνούν αρκετά με την βιβλιογραφία, ωστόσο αυτά πιθανώς να διαφέρουν ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση της πρόπολης, την μέθοδο παραλαβής των πτητικών συστατικών, τις συνθήκες επεξεργασίας των δειγμάτων και τους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν (Kaşkonienè et al, 2014).

Στο χρωματογράφημα του PMEβ-CD παρατηρείται ότι για τις περισσότερες ουσίες το εμβαδόν των κορυφών που αντιστοιχούν σε αυτές, είναι μειωμένο σε σχέση με τις αντίστοιχες του δείγματος PME. Από το λογισμικό του οργάνου υπολογίζεται το εμβαδόν της κάθε κορυφής. Από τη μεταβολή του εμβαδού των κορυφών που αντιστοιχούν στις ανιχνευθείσες ουσίες υπολογίστηκε το ποσοστό μείωσης τους από το αρχικό δείγμα PME στο τελικό PMEβ-CD που προέκυψε μετά την κατεργασία με β-CD σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\% \text{ Ποσοστό μείωσης} = 100 (\text{Εκορ} - \text{Εκορ } \beta\text{-CD}) / \text{Εκορ}$$

Η μείωση αποδίδεται στον πιθανό εγκλεισμό της ουσίας στην β-CD αλλά και σε μικρότερο βαθμό στην προσκόλληση ουσιών στην εξωτερική επιφάνεια των κόκκων του ιζήματος (Al-Nasiri et al, 2018). Στο ακόλουθο ραβδόγραμμα (Εικόνα 30) δίνεται το ποσοστό μείωσης για κάθε μια από τις ουσίες.



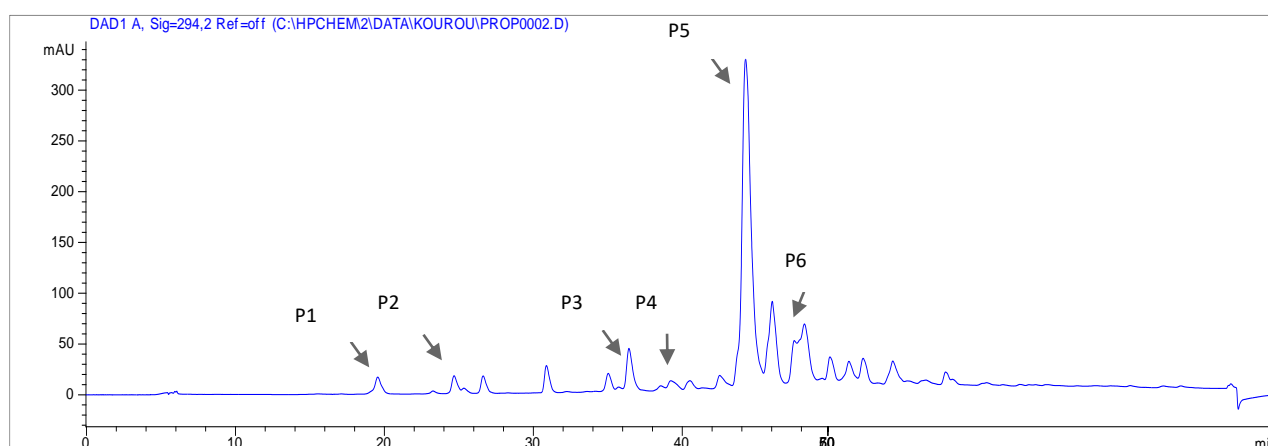
Εικόνα 30: Ραβδόγραμμα των ποσοστών μείωσης για κάθε μια από τις ουσίες που ταυτοποιήθηκαν

Έτσι, προκύπτει πως οι ενώσεις με το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης κατά φθίνουσα σειρά είναι το trans-καρνοφυλλένιο, η 6-καμφενόλη, η αμπιετάλη, το οξείδιο του καρνοφυλλενίου και το α-πινένιο.

Για την περίπτωση του trans-καρνοφυλλενίου, για το οποίο αναφέρεται στη βιβλιογραφία μια πολύ υψηλή σταθερά σύνδεσης του με τη β -CD, $K_f = 28.674 \text{ M}^{-1}$ (Kfoury et al., 2018), δικαιολογείται η παρατηρηθείσα 100% μείωση του μετά από την προσθήκη β -CD στο εκχύλισμα πρόπολης. Από τις υπόλοιπες ενώσεις που αναφέρονται στον πίνακα 14 και στην Εικόνα 31, βρέθηκε από την υπάρχουσα μέχρι τώρα βιβλιογραφία, η σταθερά συμπλοκοποίησης του α-πινενίου ($K_f = 2.588 \text{ M}^{-1}$) (Pinho et al., 2014) και της νερολιδόλης ($K_f = 1.238$) (Pinho et al., 2014) με τη β -CD. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά υψηλές και αιτιολογούν τα ποσοστά μείωσης 63,8% και 22,2% που παρατηρήθηκαν αντίστοιχα. Για τις υπόλοιπες ενώσεις δεν βρέθηκαν πληροφορίες για τη σταθερά σύδεσης τους με την β -CD (Kfoury et al., 2018), (Pinho et al., 2014).

3.3. Αποτελέσματα Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD)

Με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης έγινε ο ποιοτικός προσδιορισμός των πολικών συστατικών των εκχυλισμάτων πρόπολης. Για κάθε ένα από αυτά παρουσιάζονται σε πίνακες, οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν, το μήκος κύματος και ο χρόνος συγκράτησης αυτών. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα που λήφθηκαν στα εκχυλίσματα πρόπολης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (HPLC-DAD). Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 294 και 324 nm. Για την ταυτοποίηση των ουσιών έγινε σύγκριση των χρόνων κατακράτησης και των φασμάτων UV-Vis των κορυφών που προέκυψαν από την ανάλυση με την υγρή χρωματογραφία, με τους αντίστοιχους χρόνους και φάσματα από τη βιβλιογραφία.



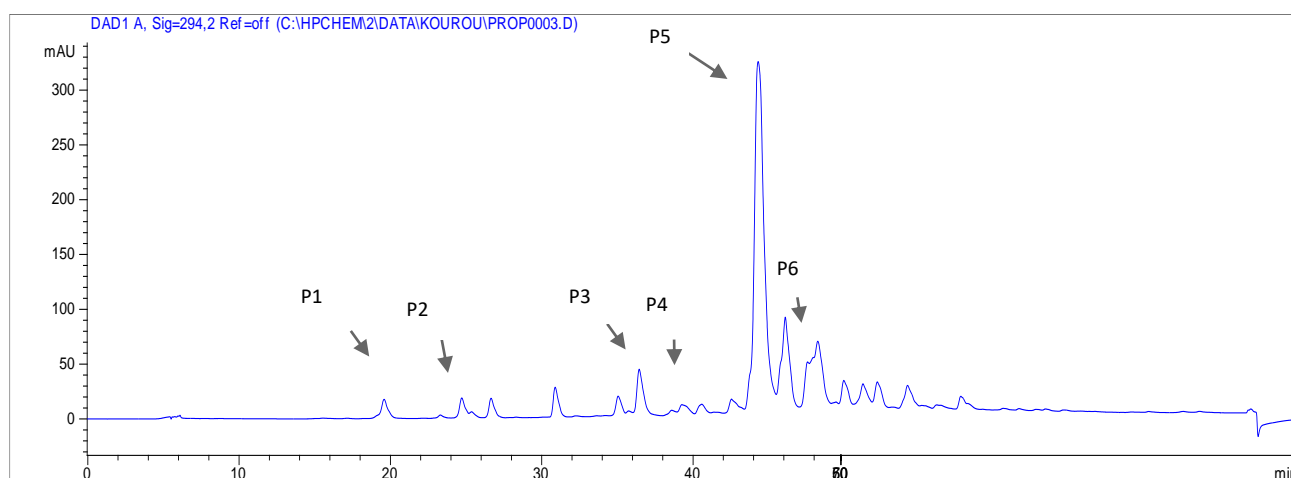
Εικόνα 31: Χρωματογράφημα συστατικών πρόπολης με Υγρή Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (HPLC-DAD) του δείγματος PMEH

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι ταυτοποιημένες κορυφές που ανιχνεύτηκαν.

Πίνακας 15: Ταυτοποιημένες κορυφές εκχυλίσματος πρόπολης χωρίς β -CD (PMEH).

Εκχύλισμα πρόπολης	Κορυφή	Ταυτοποίηση	Χρόνος t_R (min)	Μήκος κύματος λ_{max} (nm)	% area
PMEH	P1	καφεϊκό οξύ	19,6	324	1,71
	P2	p-κουμαρικό οξύ	24,7	309	1,48
	P3	ναριγενίνη	36,4	291	3,84
	P4	καμφερόλη	39,3	340	1,12
	P5	οξικός εστέρας 3-πινομπασκίνης /πινοσεμπρίνη	44,3	328	45,88
	P6	χρυσίνη	47,6	316	2,82

Τα κυριότερα συστατικά που προσδιορίστηκαν ποιοτικά ήταν το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, η καμφερόλη, η ναριγενίνη, η οξικός εστέρας 3-πινομπασκίνης, η πινοσεμπρίνη και η χρυσίνη. Συγκρίνοντας με την βιβλιογραφία τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν, ωστόσο υπάρχουν διαφορές στους χρόνους που εμφανίζονται, καθώς οι παραπάνω ενώσεις αυτού του δείγματος εμφανίζονται λίγο νωρίτερα χρονικά. Αυτό είναι λογικό καθώς οι παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα είναι πολλοί και διαφέρουν ακόμη και από μηχάνημα σε μηχάνημα.



Εικόνα 32: Χρωματογράφημα συστατικών πρόπολης με Υγρή Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (HPLC-DAD) του δείγματος PMEH/ β -CD

Πίνακας 16: Ταυτοποιημένες κορυφές εκχυλίσματος πρόπολης με β -CD (PMEH/ β -CD)

Εκχύλισμα πρόπολης	Κορυφή	Ταυτοποίηση	Χρόνος t_R (min)	Μήκος κύματος λ_{max} (nm)	% area
PMEH/ β -CD	P1	καφεϊκό οξύ	19,5	324	1,7
	P2	p-κουμαρικό οξύ	24,7	309	1,5
	P3	ναριγενίνη	36,4	291	3,75
	P4	καμφερόλη	39,2	340	1,16

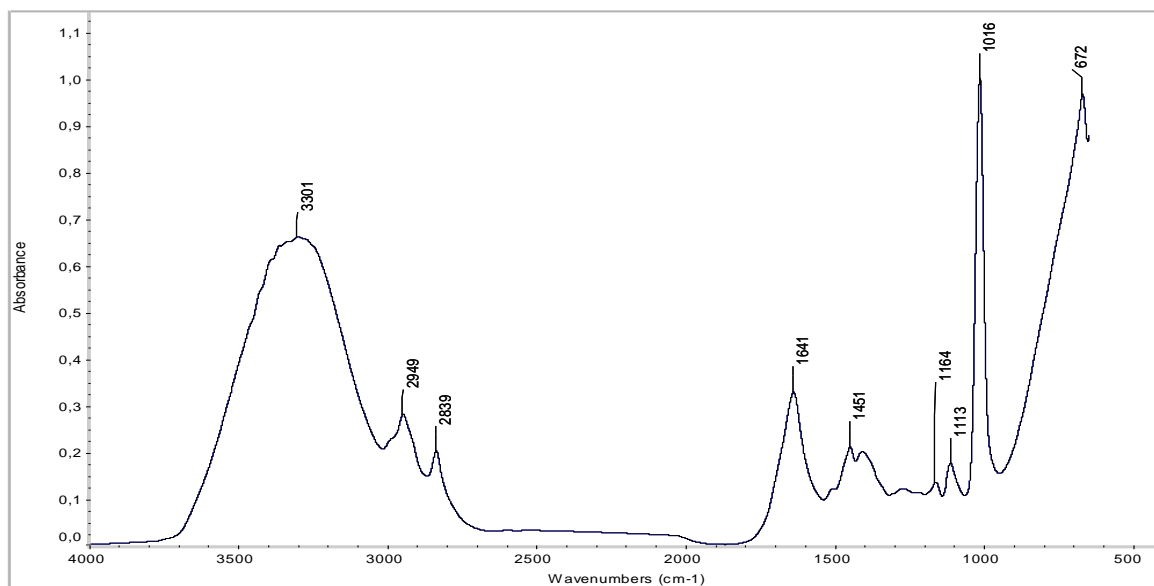
P5	οξικός εστέρας 3-πινομπασκίνης /πινοσεμπρίνη	44,3	328	45,29
P6	χρυσίνη	47,5	316	3,51

Οι παραπάνω χημικές ενώσεις προσδιορίστηκαν ποιοτικά και στο δεύτερο δείγμα με την β -CD. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Pellati et al., 2011) για τις κορυφές ανιχνεύθηκαν. Την μεγαλύτερη κορυφή την καταλαμβάνει η πινοσεμπρίνη και ο οξικός εστέρας 3-πινομπασκίνης. Σύμφωνα με τους Kalogeropoulos et al., 2009, η πινοσεμπρίνη αποτελεί το φλαβονοειδές με την μεγαλύτερη αναλογία στην ελληνική πρόπολη με προέλευση από την Κρήτη. Τα δυο δείγματα παρουσιάζουν γενικά το ίδιο προφίλ και έχουν ελάχιστες ποσοτικές διαφορές. Η χημική σύσταση της πρόπολης αλλάζει αρκετά από δείγμα σε δείγμα και σχετίζεται αρκετά με τις εκκρίσεις των φυτών και των δέντρων από τα οποία συλλέγεται. Συνεπώς, ανάλογα με την προέλευση, τη γεωγραφική περιοχή αλλά και την εποχή συλλογής της, η πρόπολη παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ. Γενικά η πρόπολη που προέρχεται από ζεστά κλίματα όπως της Ευρώπης, είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και εστέρες αυτών (Bankova et al., 2002). Στην παρούσα χρωματογραφική ανάλυση έγινε ανίχνευση φλαβονοειδών ενώσεων και φαινολικών οξέων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα αιθανολικά εκχυλίσματα ελληνικής πρόπολης, περιέχουν σημαντική ποσότητα φλαβονοειδών όπως πινομπασκίνη, χρυσίνη, γαλανίνη, καμφερόλη, απιγενίνη, ναριγενίνη, καθώς και φαινολικά οξέα όπως φερουλικό, καφεϊκό, π-κουμαρικό, συναπικό και γαλλικό οξύ (Kalogeropoulos et al., 2009).

Ετσι, τα δείγματα πρόπολης παρουσιάζουν ίδιο χρωματογραφικό προφίλ ως προς τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα και η ποιοτική σύσταση των φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων δεν διαφοροποιείται από την εποχή συλλογής της πρόπολης καθώς και από την τεχνική εκχύλισης. Τα αποτελέσματα του ποιοτικού προσδιορισμού συμφωνούν, αρκετά με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, με ελάχιστες διαφορές, οι οποίες πιθανόν να οφείλονται και στη διαφορετική συγκέντρωση.

3.4.Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR) με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) συστατικών πρόπολης

Στην Εικόνα 33 παρουσιάζεται το FTIR φάσμα του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος της πρόπολης. Τα φάσματα FTIR συλλέχθηκαν σε περιοχές συχνότητας από 4000 έως 680 cm^{-1} .



Εικόνα 33: Φάσμα FT-IR μεθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης.

Τα φάσματα παρουσιάζουν οκτώ κύριες κορυφές (Πίνακας 18). Η κορυφή στα 3301 cm^{-1} οφείλεται στην τάση του -OH , αυτή στα 2949 cm^{-1} στις τάσεις C-H , CH_3 , CH_2 . Η κορυφή στα 2839 cm^{-1} στην τάση του CH_3 και η κορυφή στα 1641 cm^{-1} στην τάση του C=O και του C=C . Η απορρόφηση στα 1451 cm^{-1} έχει συσχετιστεί με την κάμψη C-H και ειδικότερα με τις κάμψεις των -CH_3 και -CH_2 των συνδεδεμένων με αρωματικό δακτύλιο. Η κορυφή στα 1164 cm^{-1} έχει αποδοθεί στην τάση του C-O και την κάμψη C-OH . (Socrates, 2001)

(Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data Augustin Ca ̃ta ̃lin Mot , Radu Silaghi-Dumitrescu, Costel Sarbu).

Πίνακας 17: Αποδόσεις των κορυφών του FTIR φάσματος του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος της πρόπολης

Κυματαριθμός (cm^{-1})	Απόδοση κορυφών
1016	$\nu(\text{C-O})$,
1113	$\nu(\text{C-O})$, O-H , $\nu(\text{C-C})$
1164	* $\nu(\text{C-O})$, * $\delta(\text{C-OH})$
1451	$\delta(\text{C-H})$, $\nu(\text{CH}_3)$, $\nu(\text{-CH}_2)$, $\nu(\text{C=C})$
1641	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C})$
2839	$\nu(\text{CH}_3)$
2949	$\nu(\text{C-H})$, $\nu(\text{CH}_3)$, $\nu(\text{CH}_2)$
3301	$\nu(\text{-OH})$

* ν =τάση, δ =κάμψη

Η φασματοσκοπική μελέτη βρίσκεται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά αποτελέσματα των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης.

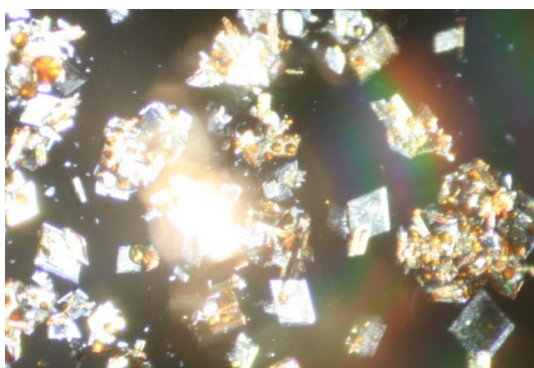
3.5. Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής ανάλυσης του προϊόντος εγκλεισμού της πρόπολης σε β -CD

3.5.1. Κρύσταλλοι συμπλόκου εγκλεισμού πρόπολης/ β -CD

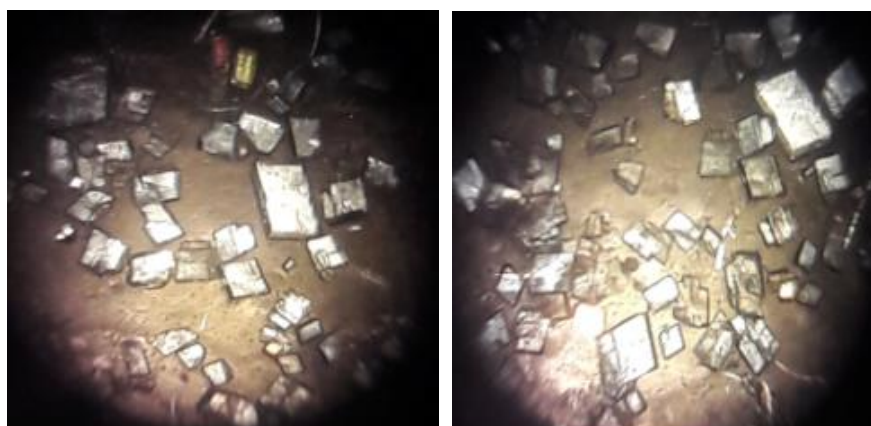
Οι κρύσταλλοι που παρατηρήθηκαν από τα πειράματα κρυστάλλωσης εκχυλίσματος πρόπολης παρουσία β -CD ήταν κυρίως δύο τύπων:

1. Άχρωμοι, πρισματικοί σε σχήμα ορθογωνίου παραλληλεπίπεδου με κομμένη την μια κορυφή. Η μορφολογία αυτών των κρυστάλλων παραπέμπει σε κρύσταλλο ένυδρης β -CD.
2. Άχρωμοι, πρισματικοί, ρομβοειδείς κρύσταλλοι που παραπέμπουν στην τυπική μορφολογία κρυστάλλων συμπλόκων της β -CD (Εικόνα 34).

Από τα πειράματα κρυστάλλωσης καθαρής νερολιδόλης με β -CD προέκυψαν οι ευμέγεθεις άχρωμοι, πρισματικοί κρύσταλλοι (Εικόνα 35). Παρατηρήθηκαν και σε αυτή την περίπτωση οι δύο τύποι κρυστάλλων που αναφέρθηκαν παραπάνω.



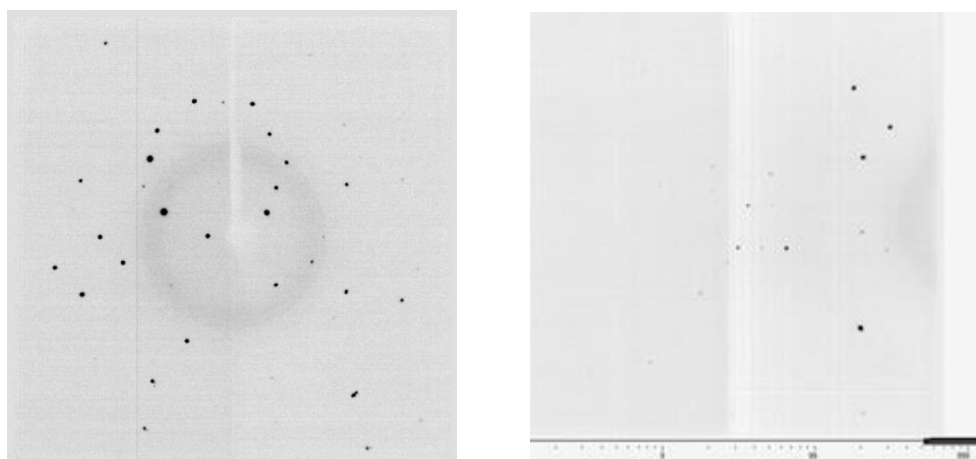
Εικόνα 34: Εικόνα κρυστάλλων από πολωτικό στερεοσκόπιο. Πείραμα κρυστάλλωσης



Εικόνα 35: Εικόνες κρυστάλλων από πολωτικό στερεοσκόπιο. Πείραμα κρυστάλλωσης καθαρής νερολιδόλης παρουσία β -CD.

3.5.2. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα και επίλυση της δομής

Η συλλογή των πειραματικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X από τους μονοκρυστάλλους που προέκυψαν από τα πειράματα κρυστάλλωσης εκχυλίσματος πρόπολης παρουσία β -CD πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσικής του Γ.Π.Α. με περιθλασίμετρο D8 Venture (Brüker). Το λογισμικό Apex 3 του οργάνου χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή δεδομένων, τον προσδιορισμό της μοναδιαίας κυψελίδας και την εκτίμηση της συμμετρίας ομάδας χώρου. Η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε σε κρυογονικές συνθήκες με ρεύμα ατμών υγρού αζώτου (120 K) και λήφθηκαν 788 εικόνες περίθλασης σε διάστημα περίπου επτά ωρών.



Εικόνα 36: Εικόνες περίθλασης με διακριτική ικανότητα 2.05 Å (αριστερά) και 0.97 Å (δεξιά)

Οι εικόνες δεικτυοδοτήθηκαν με το πρόγραμμα SAINT της Brüker, από όπου προέκυψαν 34451 ανακλάσεις σε μέγιστη διακριτική ικανότητα 0,90 Å. Η μοναδιαία κυψελίδα είχε διαστάσεις $a = 19.310$ Å, $b = 24.447$ Å και $c = 15.879$ Å και ο όγκος της υπολογίστηκε σε 7078 Å³. Η ομάδα χώρου της κρυσταλλικής δομής προσδιορίστηκε σε $C2$ (Μονοκλινές κρυσταλλικό σύστημα). Αναλυτικά κρυσταλλογραφικά δεδομένα δίνονται στον πίνακα 18.

Πίνακας 18: Κρυσταλλογραφικά δεδομένα από την περίθλαση ακτίνων-X, σε κρύσταλλο που προέκυψε από τα πειράματα κρυστάλλωσης εκχυλίσματος πρόπολης παρουσία β -CD.

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα	Νερολιδόλη/ β -CD
Πληροφορίες κρυστάλλου	
Μοριακός τύπος	$C_{42}H_{70}O_{35} \cdot C_{15}H_{26}O \cdot 10H_2O$
Μοριακό βάρος	1424.99
Κρυσταλλικό σύστημα, ομάδα χώρου	Μονοκλινές, $C2$
Θερμοκρασία (K)	120
a, b, c (Å)	19.310 (5), 24.447 (6), 15.879 (4)

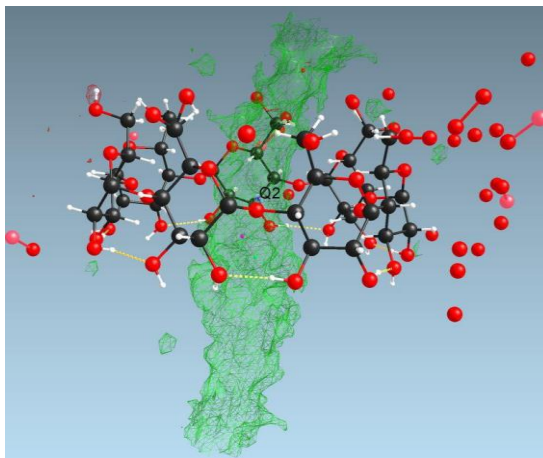
α, β, γ (°)	90, 109.2 (11), 90
V (Å ³)	7078 (3)
Πολλαπλότητα Z	4
Τύπος ακτινοβολίας	Cu $K\alpha$
Συντελεστής απορρόφησης μ (mm ⁻¹)	1.08
Μέγεθος κρυστάλλου (mm)	1.1 × 0.9 × 0.6
Συλλογή δεδομένων περίθλασης	
Περιθλασίμετρο	Bruker APEX-II
Διόρθωση απορρόφησης	Μέθοδος: Multi-scan Πρόγραμμα: SADABS2016/2 - Bruker
T_{\min}, T_{\max}	0.574, 0.751
Αριθμός συλλεχθέντων, ανεξάρτητων και παρατηρούμενων με κριτήριο [$I > 2\sigma(I)$] ανακλάσεων	51456, 8594, 6762
R_{int}	0.053
θ_{max} (°)	54.5
(ημ. θ/λ) _{max} (Å ⁻¹)	0.528

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για σειρά κρυστάλλων από το δείγμα. Στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 19) δίνονται η ομάδα χώρου και η μοναδιαία κυψελίδα που προσδιορίστηκε ενδεικτικά για πέντε κρυστάλλους. Όπως φαίνεται όλοι οι κρύσταλλοι ανήκουν στην ίδια ομάδα χώρου και με σχεδόν ίδια μοναδιαία κυψελίδα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι πρόκειται για την κρυστάλλωση του ίδιου συμπλόκου όπως θα συζητήσουμε αναλυτικότερα και στη συνέχεια. Για το λόγο αυτό δεν προχωρήσαμε στη συλλογή πλήρους συνόλου δεδομένων για τους υπόλοιπους κρυστάλλους.

Πίνακας 19: Προσδιορισθείσα ομάδας χώρου και μοναδιαίας κυψελίδας κρυστάλλου.

Κρύσταλλοι	Ομάδα χώρου	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V (Å ³)
1	C2	18.732	24.317	15.50	90	110.79	90	6604
2	C2	19.27	24.40	15.87	90	108.99	90	7054
3	C2	19.218	24.403	15.86	90	109.13	90	7029
4	C2	19.29	24.39	15.89	90	109.10	90	7062
5	C2	19.256	24.430	15.87	90	109.14	90	7053

Στη συνέχεια ακολούθησε η επίλυση και βελτιστοποίηση της κρυσταλλικής δομής. Το αρχικό μοντέλο που έδωσε το πρόγραμμα SHELXT περιείχε τις ατομικές θέσεις του ξενιστή (β -CD). Η υπολειπόμενη ηλεκτρονιακή πυκνότητα (residual electron density, $\Delta\rho$) αντιστοιχούσε σε μόρια νερού και το ξενιζόμενο μόριο. Μετά τον προσδιορισμό των θέσεων των μορίων του νερού (ατομικές θέσεις του οξυγόνου του νερού) η υπολειπόμενη ηλεκτρονιακή πυκνότητα αντιστοιχούσε καθαρά στο εγκλεισμένο μόριο μέσα στην κοιλότητα της β -CD. Από την εικόνα αυτής της πυκνότητας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για ένα γραμμικό μόριο (Εικόνα 37).

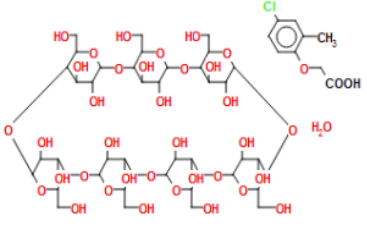
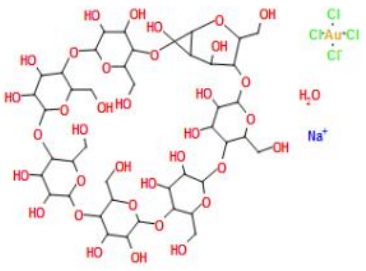
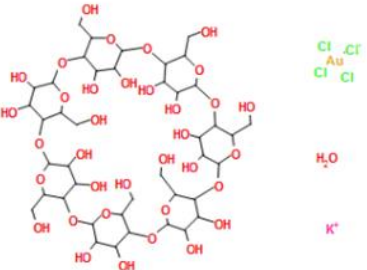
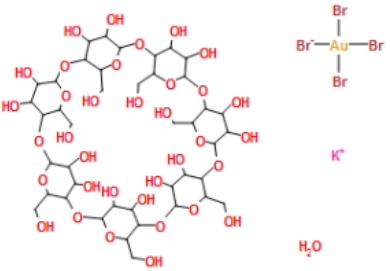


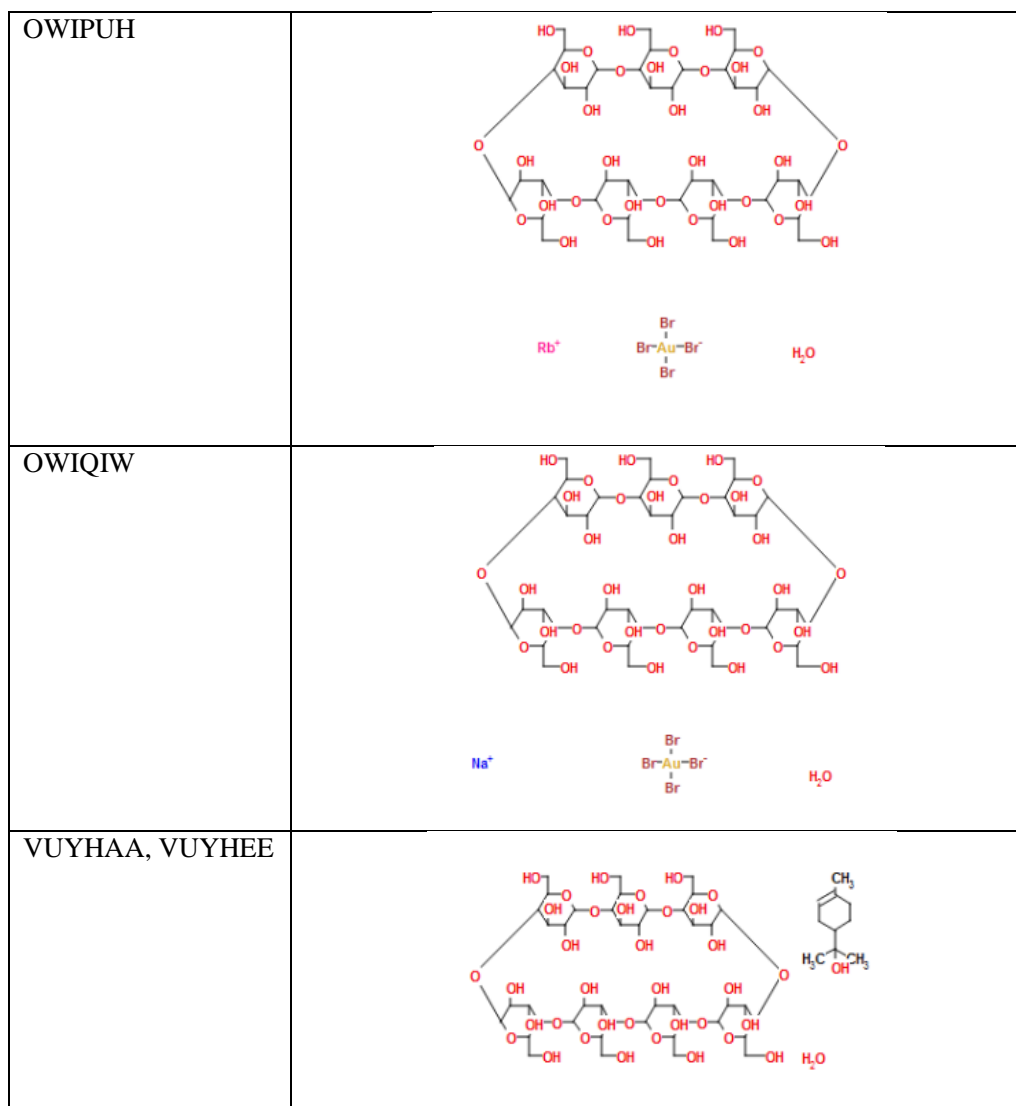
Εικόνα 37: Εικόνα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του εγκλεισμένου μορίου μέσα στην κοιλότητα της β -CD.

Εξετάζοντας τα πιθανά προς εγκλεισμό μόρια του εκχυλίσματος της πρόπολης που προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος με Αέρια Χρωματογραφία (GC-MS), καταλήξαμε στο ότι μόνο η νερολιδόλη είχε το κατάλληλο σχήμα και μέγεθος ώστε να ταιριάζει σε αυτήν την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Εξάλλου η μοναδιαία κυψελίδα και η συμμετρία του κρυστάλλου είναι παρόμοια με την κρυσταλλική δομή του προϊόντος εγκλεισμού της φαρνεσόλης σε β -CD (αδημοσίευτα αποτελέσματα από έρευνα, εργαστήριο φυσικής Γ.Π.Α.). Η φαρνεσόλη είναι επίσης ένα σεσκιτερπένιο, με αρκετά παρόμοια χημική δομή με την νερολιδόλη.

Επίσης μια αναζήτηση στην βάση δεδομένων CSD (CambridgeStructuralDatabase, <https://www.ccdc.cam.ac.uk/>) με χρήση του εργαλείου Cell check CSD της πλατφόρμας του WINGX βάσει της ομοιότητας του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας με απόκλιση ± 3 για διαστάσεις και γωνίες αποκάλυψε την παρουσία 8 δομών με ομοιότητα από 98,65 έως 93,67 %. Οι δομές αυτές εμφανίζουν space group $P21$ και έχουν κωδικούς: NATTAF, OWIZOL, YIHJEG, YIHJIK, OWIPUH, OWIQIW, VUYHAA, VUYHEE.

Πίνακας 20: Ομοιες ενώσεις βάση του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας

<p>NATTAF</p>	
<p>OWIZOL</p>	
<p>YIHJEG</p>	
<p>YIHJK</p>	



Προχωρήσαμε στην οικοδόμηση της κρυσταλλικής δομής χρησιμοποιώντας ως ξενιζόμενο το μόριο της νερολιδόλης και καταλήξαμε στα ακόλουθα αποτελέσματα (Πίνακας 21).

Πίνακας 21: Πληροφορίες για την επίλυση και βελτιστοποίηση της κρυσταλλικής δομής.

Βελτιστοποίησης λύσης	
$R[F^2 > 2s(F^2)], wR(F^2), S$	0.087, 0.230, 1.08
Αριθμός ανακλάσεων	8594
Αριθμός παραμέτρων	919
Αριθμός περιορισμών	106
Προσδιορισμός ατόμων H	Υπολογιστικά με χρήση χημικών περιορισμών
$\Delta\rho_{\max}, \Delta\rho_{\min}$ (e Å ⁻³)	0.57, -0.44

Παράγοντας Flack για τον προσδιορισμό της απόλυτης δομής (Parsons, Flack and Wagner, Acta Cryst. B69 (2013) 249-259).	0.12 (11)
---	-----------

Υπολογιστικά προγράμματα: Bruker APEX2 software, SAINT V8.37A integration software, SORTAV (Blessing, 1995), *SHELXS2013* (Sheldrick, 2008), *SHELXL2018/3* (Sheldrick, 2018), *ORTEP-3 for Windows* (Farrugia, 2012), *WinGX* publication routines (Farrugia, 2012)

3.5.3. Προσδιορισμός δομής από κρυστάλλους που προέκυψαν από καθαρή νερολιδόλη και β-CD

Για την επαλήθευση αυτής της υπόθεσης κρυσταλλώσαμε καθαρή νερολιδόλη με β-CD. Από την περίθλαση ακτίνων-Χ στους μονοκρυστάλλους που προέκυψαν πήραμε τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 22: Κρυσταλλογραφικά δεδομένα από την περίθλαση ακτίνων-X, σε κρύσταλλο που προέκυψε από τα πειράματα κρυστάλλωσης καθαρής νερολιδόλης παρουσία β -CD.

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα	Νερολιδόλη/ β -CD
Πληροφορίες κρυστάλλου	
Μοριακός τύπος	$C_{42}H_{70}O_{35} \cdot C_{15}H_{26}O \cdot H_2O$
Μοριακό βάρος	1424.99
Κρυσταλλικό σύστημα, ομάδα χώρου	Μονοκλινές, $C2$
Θερμοκρασία (K)	293 (2)
a, b, c (Å)	18.917 (11), 24.424 (15), 15.688 (10)
α, β, γ (°)	90, 110.63 (11), 90
V (Å³)	6783 (7)
Πολλαπλότητα Z	4
Τύπος ακτινοβολίας	Cu $K\alpha$ (1.54178 Å)
Συντελεστής απορρόφησης μ (mm⁻¹)	0.899
Μέγεθος κρυστάλλου (mm)	1 × 1 × 0.7
Συλλογή δεδομένων περίθλασης	
Περιθλασίμετρο	Bruker APEX-II
Διόρθωση απορρόφησης	Μέθοδος: Multi-scan Πρόγραμμα: SADABS2016/2 - Bruker
Αριθμός συλλεχθέντων, ανεξάρτητων και παρατηρούμενων με κριτήριο $[I > 2s(I)]$ ανακλάσεων	63.5271456, 11.260, 10.528
R_{int}	0.035
θ_{max} (°)	64.86
(ημ. θ/λ)_{max} (Å⁻¹)	0.5

Παρατηρούμε ότι οι κρύσταλλοι αυτοί εμφανίζουν την ίδια κρυσταλλογραφική συμμετρία και σχεδόν την ίδια μοναδιαία κυψελίδα. Η επίλυση και η βελτιστοποίηση της κρυσταλλικής δομής επιβεβαίωσε τον εγκλεισμό του μορίου νερολιδόλης στο εσωτερικό της κοιλότητας της β -CD. Τα αποτελέσματα της κρυσταλλογραφικής ανάλυσης δίνονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα 23.

Πίνακας 23: Πληροφορίες για την επίλυση και βελτιστοποίηση της κρυσταλλικής δομής νερολιδόλης/ β -CD.

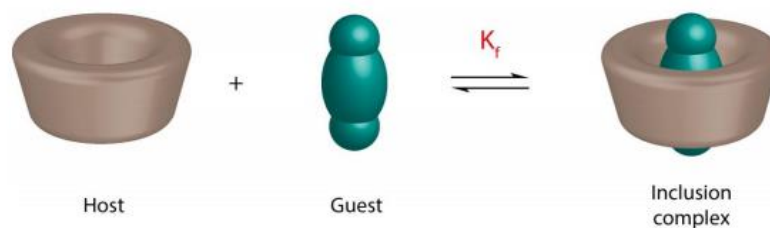
Βελτιστοποίησης λύσης	
$R[F^2 > 2s(F^2)], wR(F^2), S$	0.087, 0.230, 1.08
Αριθμός ανακλάσεων	8594
Αριθμός παραμέτρων	919
Αριθμός περιορισμών	106
Προσδιορισμός ατόμων H	Υπολογιστικά με χρήση περιορισμών
$\Delta\rho_{\max}, \Delta\rho_{\min}$ ($e \text{ \AA}^{-3}$)	0.57, -0.44
Παράγοντας Flack για τον προσδιορισμό της απόλυτης δομής (Parsons, Flack and Wagner, Acta Cryst. B69 (2013) 249-259).	0.12 (11)

Υπολογιστικά προγράμματα: Bruker APEX2 software, SAINT V8.37A integration software, SORTAV (Blessing, 1995), SHELXS2013 (Sheldrick, 2008), SHELXL2018/3 (Sheldrick, 2018), ORTEP-3 for Windows (Farrugia, 2012), WinGX publication routines (Farrugia, 2012)

Συγκρίνοντας τη δομή αυτών των κρυστάλλων με εκείνη που προέκυψε από τους κρυστάλλους που σχηματίστηκαν από εκχύλισμα πρόπολη παρουσία β -CD, καταλήγουμε ότι πρόκειται για το ίδιο προϊόν εγκλεισμού που διαφέρει μόνο ως προς το πλήθος και τη θέση των μορίων νερού που το περιβάλλουν. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται και στα διαφορετικής ποιότητας δεδομένα περίθλασης ακτίνων-Χ που συλλέχθηκαν για καθέναν από αυτούς τους κρυστάλλους. Έτσι, με τον τρόπο αυτό επαληθεύουμε ότι οι κρύσταλλοι που προέκυψαν από το εκχύλισμα της πρόπολης περιέχουν νερολιδόλη.

Ωστόσο, πιθανώς να μην έχει εγκλειστεί μόνο η νερολιδόλη στις β -CDs, αλλά και άλλες εκ των περιεχομένων ενώσεων, οι οποίες όμως μπορεί να έχουν κρυσταλλωθεί σε μικρότερη αναλογία (μικρότερο πλήθος κρυστάλλων) ή πολύ μικρότερο μέγεθος κρυστάλλων. Οπότε η επιλογή κρυστάλλου για χρήση μετρήσεων στο περιθλασίμετρο ενδεχομένως περιορίστηκε στους μεγαλύτερους εξ' αυτών που φαίνεται να ήταν οι κρύσταλλοι εγκλειστων νερολιδόλης εξαιτίας κάποιων ευνοϊκών συνθηκών δημιουργίας πλέγματος (πχ. χαμηλότερη ενέργεια και δημιουργία πιο σταθερού πλέγματος).

Μια θεμελιώδης παράμετρος για την αξιολόγηση της ενέργειας συνάφειας (binding affinity) μεταξύ της κυκλοδεξτρίνης και του ξενιζόμενου μορίου είναι ο προσδιορισμός της σταθεράς σύνδεσης (K_f) κάθε συμπλόκου εγκλεισμού.



Εικόνα 38: Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού ενός συμπλόκου εγκλεισμού μεταξύ μιας κυκλοδεξτρίνης (ξενιστή) και ενός ξενιζομένου μορίου.

Έτσι, μια ακόμη επιβεβαίωση για το ξενιζόμενο μόριο προκύπτει συγκρίνοντας τις αντίστοιχες σταθερές σύνδεσης (K_f) του εγκλεισμού σε β -CD των υπολοίπων ενώσεων που περιέχονται στην πρόπολη.

3.5.4. Κρυσταλλική μοριακή διευθέτηση (*Crystal packing*) της νερολιδόλης/ β -CD (*Nrl_prop/ β -CD*)

Η μοριακή διάταξη βάση της μετατόπισης των διμερών που σχηματίζονται κατά μήκος του κρυσταλλογραφικού άξονα c ακολουθεί τον τύπο IM (INTERMEDIATE). Τα διαδοχικά διμερή εμφανίζουν μετατόπιση ($5,23283\text{\AA}$), σχηματίζοντας ενδιάμεσα κανάλια (IM, Intermediate channels). Τα κανάλια αυτά ενώνονται μεταξύ τους με γέφυρες μορίων νερού. Η αναπαράσταση της δομής του προϊόντος εγκλεισμού της νερολιδόλης σε β -CD γίνεται με την χρήση του προγράμματος Mercury, το οποίο μας επιτρέπει να μελετήσουμε τα στοιχεία που αφορούν στην γεωμετρία των σχετιζόμενων μορίων στον χώρο, στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και στην διευθέτησή τους στην μοναδιαία κυψελίδα.

Πίνακας 24: Γεωμετρικά χαρακτηριστικά της β -CD στο προϊόν εγκλεισμού νερολιδόλης/ β -CD.

Γλυκοζιτική μονάδα	I (n=1)	II (n=2)	III (n=3)	IV (n=4)	V (n=5)	VI (n=6)	VII (n=7)
D (\AA)	4.38	4.34	4.45	4.36	4.30	4.49	4.33
Φ_h ($^\circ$)	127.0	126.8	130.9	129.0	125.9	129.3	130.7

D_K (Å)	5.12	5.12	4.94	5.02	5.17	5.02	4.94
Φ_K (°)	50.67	51.09	53.15	50.68	49.86	53.58	50.98
d (Å)	0.014	0.006	0.009	0.017	0.038	0.022	0.010
τ (°)	11.66	9.35	5.01	9.84	12.68	8.11	12.64
t (°)	82.21	82.38	86.04	81.97	85.19	84.37	78.87
d_H (Å)	2.85	2.77	2.78	2.83	2.83	2.81	2.80
τ_1	-58.37 [θέση A] 64.19 [θέση B]	-50.85[θέση A] -103.18 [θέση B]	-67.72	-54.23 [θέση A] 36.40 [θέση B]	-66.25	-59.19	22.83 [θέση A] -63.73 [θέση B]
τ_2	61.40 [θέση A] -176.00 [θέσηB]	70.59 [θέση A] 18.25 [θέσηB]	54.38	68.71[θέση A] 159.34 [θέση B]	56.15	63.17	142.11 [θέση A] 55.55 [θέση B]
C	<i>gg</i> <i>gt</i>	<i>gg</i> <i>gg</i>	<i>gg</i> <i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>	<i>gg</i>
φ	110.72	114.20	177.39	113.14	108.61	115.11	110.70
ψ	127.69	123.65	128.97	128.88	125.56	130.77	126.29

Όπου:

D = Αποστάσεις $O4n \dots O4(n+1)$

Φ_h = Γωνίες $O4(n-1) \dots O4n \dots O4(n+1)$

D_K = Αποστάσεις του κατά προσέγγιση κέντρου K του επταγώνου $O4n$ από τα άτομα $O-4n$

Φ_K = Η γωνία $O4n \dots K \dots O4(n+1)$

d = Αποκλίσεις των $O4n$ ατόμων από το μέσο επίπεδο τους (γραφικά)

τ = Γωνίες κλίσης μεταξύ του ιδανικού επιπέδου $O4n$ και του μέσου επιπέδου των ατόμων $O4(n-1)$, $C1n$, $C4n$, $O4n$

t = Γωνίες μεταξύ του μέσου επιπέδου των ατόμων $C2n$, $C3n$, $C5n$ και $O5n$ και του ιδανικού επιπέδου των $O4n$

d_H =Ενδομοριακές αποστάσεις $O3n O2(n+1)$

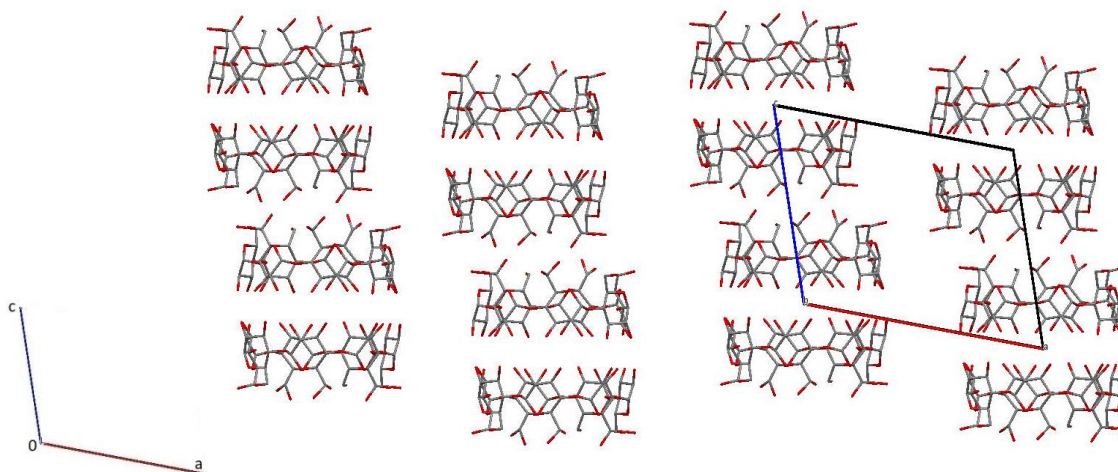
torsionangles τ_1 = Γωνίες συστροφής $O5n-C5n-C6n-O6n$

torsionangles τ_2 = Γωνίες συστροφής $C4n-C5n-C6n-O6n$

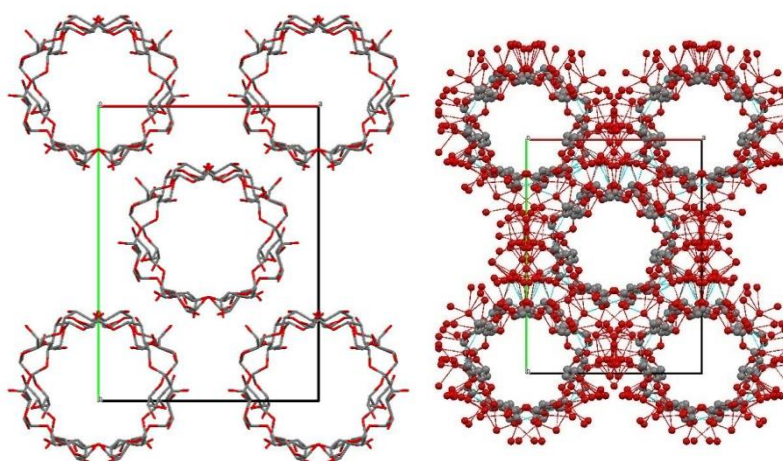
C = Προσανατολισμός των πρωτοταγών αλυσίδων

φ = Γωνίες συστροφής $O5(n+1)-C1(n+1)-O4n-C4n$

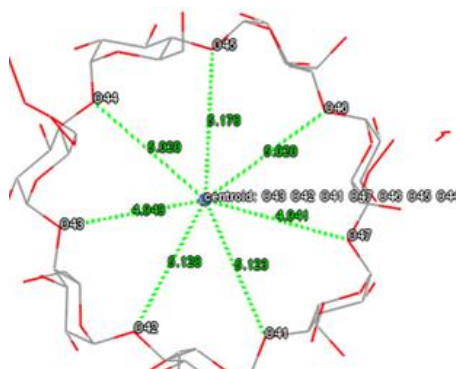
ψ = Γωνίες συστρώσης C1(n+1)-O4n-C4n-C3n



Εικόνα 39: Τρισδιάστατη απεικόνιση της μοριακής διάταξης του συμπλόκου NiI_prop/β-CD κατά το επίπεδο ac. Το ξενιζόμενο μόριο παραλείπεται για λόγους ευκρίνειας.

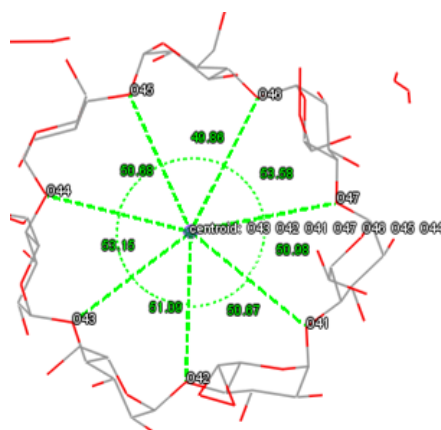


Εικόνα 40: Η κάτοψη κατά το ab επίπεδο και οι γέφυρες που σχηματίζουν τα νερά και οι δεσμοί υδρογόνου.



Εικόνα 41: Το κεντροειδές του πολυγώνου των O4n ατόμων και οι αντίστοιχες αποστάσεις D_k (Å)

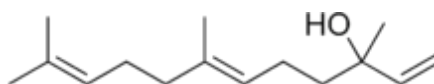
Προκύπτει ότι οι αποστάσεις του κάθε O4n της β -CD από το κέντρο του μορίου είναι περίπου κοντά στο 5Å, ωστόσο παρεκκλίνουν ελάχιστα η μια με την άλλη.



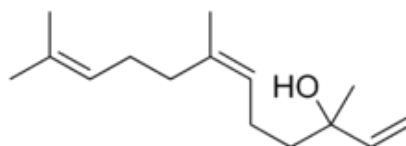
Εικόνα 42: Οι γωνίες του κάθε O4n της β -CD από το κέντρο του μορίου

3.5.5. Περιγραφή γεωμετρίας εγκλεισμού προϊόντος εγκλεισμού - Νερολιδόλη (*Nrl_prop/β-CD*)

Η νερολιδόλη (3,7,11-Trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol), γνωστή και ως περουβιόλη (peruviole) είναι μια φυσική σεσκιτερπενική αλκοόλη που εντοπίζεται στη φύση ως συστατικό των αιθέριων ελαίων πολλών φυτών και λουλουδιών.



Εικόνα 43 : Η χημική δομή του μορίου της *trans*-νερολιδόλης



Εικόνα 44: Η χημική δομή του μορίου της *cis*-νερολιδόλης

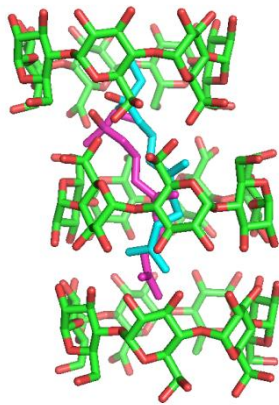
Η νερολιδόλη έχει ανιχνευτεί στην πιπερόριζα, το γιασεμί τη λεβάντα, το τειόδεντρο, την κάνναβη, και το λεμονόχορτο. Το μόριο της νερολιδόλης μοιάζει αρκετά με αυτό της φαρνεσόλης, και κατ' επέκταση και η βιολογική τους δράση. Υπάρχουν δύο ισομερή της νερολιδόλης το *cis* και το *trans*, με το *trans* να είναι το πιο άφθονο, τα οποία διαφέρουν στη γεωμετρία γύρω από τον κεντρικό διπλό δεσμό.

Πίνακας 25: Βασικά στοιχεία του μορίου της νερολιδόλης

Μοριακός τύπος	C ₁₅ H ₂₆ O
Μοριακό βάρος	222.372 g/mol
Ονομασία κατά IUPAC	3,7,11-Trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol

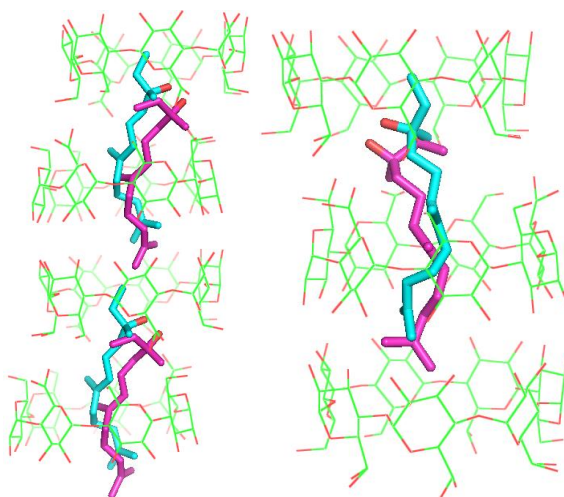
Κάποιες από τις βιολογικές της ιδιότητες είναι η αντιοξειδωτική, αντι-μυκητιακή, αντιπαρασιτική, αντικαρκινική, αντιπηκτική, αντιφλεγμονώδες, αντιμικροβιακή. Λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων που δρουν έναντι ενός φάσματος μικροοργανισμών όπως *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* και *Aspergillus niger* η νερολιδόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσική εναλλακτική λύση στα παραδοσιακά συνθετικά συντηρητικά τροφίμων. Επίσης δρα και ως ενισχυτής διείσδυσης ουσιών διά του δέρματος. Όπως και άλλες ενώσεις σесκιτερπενίου, η νερολιδόλη έχει υψηλή υδροφοβικότητα, επιτρέποντας έτσι ευκολότερη διείσδυση διαμέσου της μεμβράνης του πλάσματος και αλληλεπίδραση με ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και / ή ενδο-οργανικές θέσεις. Εξαιτίας του αρώματος της, που είναι ξυλώδες και θυμίζει φρέσκο φλοιό, χρησιμοποιείται ως αρωματικός παράγοντας και στην αρωματοποιία. Επίσης χρησιμοποιείται ευρέως σε καλλυντικά (π.χ. σαμπουάν και αρώματα), αλλά και σε μη καλλυντικά προϊόντα όπως απορρυπαντικά και καθαριστικά. Επιπλέον η νερολιδόλη διαδραματίζει πολύ ενεργό ρόλο στο αμυντικό σύστημα ορισμένων φυτών. Σύμφωνα με στατιστικές η παγκόσμια χρήση της ετησίως κυμαίνεται από 10 έως 100 μετρικούς τόνους. Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) επέτρεψε τη χρήση της νερολιδόλης ως παράγοντα γεύσης τροφίμων. Το γεγονός ότι η νερολιδόλη είναι ένα συνηθισμένο συστατικό σε πολλά προϊόντα έχει προσελκύσει τους ερευνητές να διερευνήσουν περισσότερες φαρμακευτικές ιδιότητες της που μπορούν να ασκήσουν ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Ακόμη έχει προταθεί ότι λειτουργεί ως χημειοθεραπευτικός και αντικαρκινικός παράγοντας. Έτσι, η νερολιδόλη έχει μεγάλη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως ένα νέο χημικό ή θεραπευτικό φάρμακο στον τομέα της γεωργίας και της ιατρικής. Ωστόσο, η χαμηλή της διαλυτότητα στο νερό και η ευαισθησία της περιορίζουν αρκετά τις εφαρμογές της. Έτσι προκύπτει η ανάγκη εγκλεισμού της σε κυκλοδεξτρίνες με σκοπό την προστασία της από εξωγενείς παράγοντες που την αλλοιώνουν (Azzi et al., 2017) , (Weng-KeongChan et al., 2016).

Όσον αφορά τον τρόπο εγκλεισμού του ξενιστή και του ξενιζόμενου μορίου, ο ξενιστής (φυσική β -CD) σχηματίζει διμερή και μέσα σε κάθε διμερές εισέρχεται ένα ξενιζόμενο μόριο (νερολιδόλη). Το σύμπλοκο εγκλεισμού νερολιδόλης/ β -CD κρυσταλλώνεται στην ομάδα χώρου C2 και η στοιχειομορφία είναι 2:1. Το ξενιζόμενο μόριο βρίσκεται μέσα στο διμερές αποδιατεταγμένο σε δύο θέσεις (N1,N2) με αριθμό κατάληψης 0,25 η κάθε μια.



Εικόνα 45: Η μορφή του μόριου της νερολιδόλης μέσα στο διμερές.

Αναλυτικότερα μέσα στο διμερές υπάρχει ένα μόριο νερολιδόλης το οποίο έχει εγκλιστεί με την γερανύλ-χαρακτηριστική ομάδα μέσα στο διμερές, ενώ η υπόλοιπη αλυσίδα με την υδροξυλομάδα (OH) προεξέχει από την πρωτοταγή πλευρά της κυκλοδεξτρίνης και εισέρχεται στην πρωτοταγή περιοχή του επόμενου διαδοχικού διμερούς.

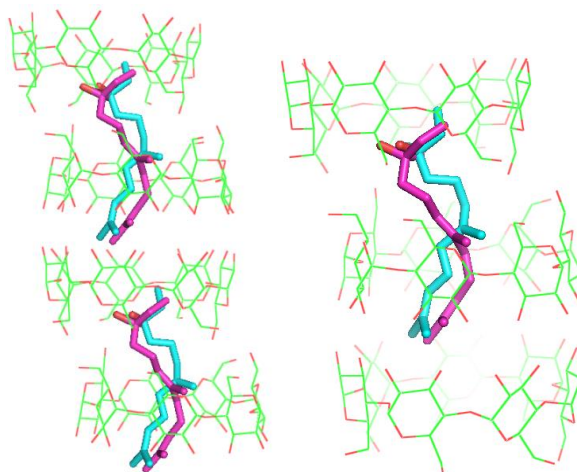


Εικόνα 46: Μοριακή διεύθεση ξενιστή:ξενιζόμενου μορίου

Η γερανύλ-ομάδα της νερολιδόλης είναι εγκλεισμένη ολόκληρη μέσα στην υδρόφοβη κοιλότητα, με τη διμέθυλ-αλλυλ-ομάδα να βρίσκεται στην διεπαφή του διμερούς των β -CD. Ενώ η υδροξυλομάδα της νερολιδόλης εισάγεται από την πρωτοταγή πλευρά της β -CD του διαδοχικού διμερούς. Με αυτόν τον τρόπο η σύνδεση των διμερών μεταξύ τους είναι αρκετά δυνατή καθώς κατά κάποιο τρόπο η νερολιδόλη τα ενώνει κάνοντας έτσι τον κρύσταλλο αρκετά σταθερό. Τον ίδιο τρόπο εγκλεισμού παρατηρούμε και στην καθαρή νερολιδόλη όπου θα αναλυθεί παρακάτω.

3.5.6. Περιγραφή γεωμετρίας εγκλεισμού καθαρής νερολιδόλης/ β -CD (Nrl/ β -CD)

Ακριβώς ο ίδιος τρόπος κρυσταλλικής μοριακής διεύθεσης παρατηρείται και στην καθαρή νερολιδόλη.



Εικόνα 47: Μοριακή διεύθετηση Nrl/β-CD

Το μόριο της νερολιδόλης, ενώνει τα διμερή μεταξύ τους με τέτοιο τρόπο που προκαλεί μετατόπιση στα διμερή δημιουργώντας ενδιάμεσα (IM) κανάλια (channels).

3.5.7. Σύγκριση κρυσταλλικών δομών *Nrl_prop/β-CD* και *Nrl/β-CD*

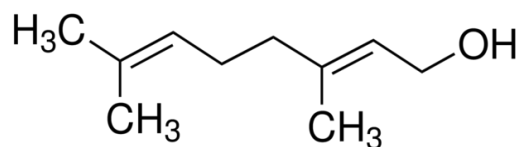
Από την σύγκριση των δύο κρυσταλλικών δομών προκύπτει ότι, οι κρύσταλλοι είναι της ίδιας μορφολογίας και πως η κρυστάλλωση έχει γίνει στην ίδια μοναδιαία κυψελίδα, με την ίδια κρυσταλλογραφική συμμετρία. Επομένως οι δυο δομές έχουν την ίδια ασύμμετρη μονάδα και στοιχειομετρία, τη ίδια γεωμετρία εγκλεισμού, και κατ'έκταση την ίδια κρυσταλλική μοριακή διεύθετηση και κρυσταλλική δομή. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αρχικά άγνωστη ουσία του εκχυλίσματος πρόπολη που βρέθηκε εγκλεισμένη σε β-CD στον κρύσταλλο ήταν πράγματι η νερολιδόλη.

3.6. Σύγκριση αποτελεσμάτων κρυσταλλογραφίας με ακτίνες-X του προϊόντος εγκλεισμού νερολιδόλης/β-CD με άλλα προϊόντα εγκλεισμού σε β-CD

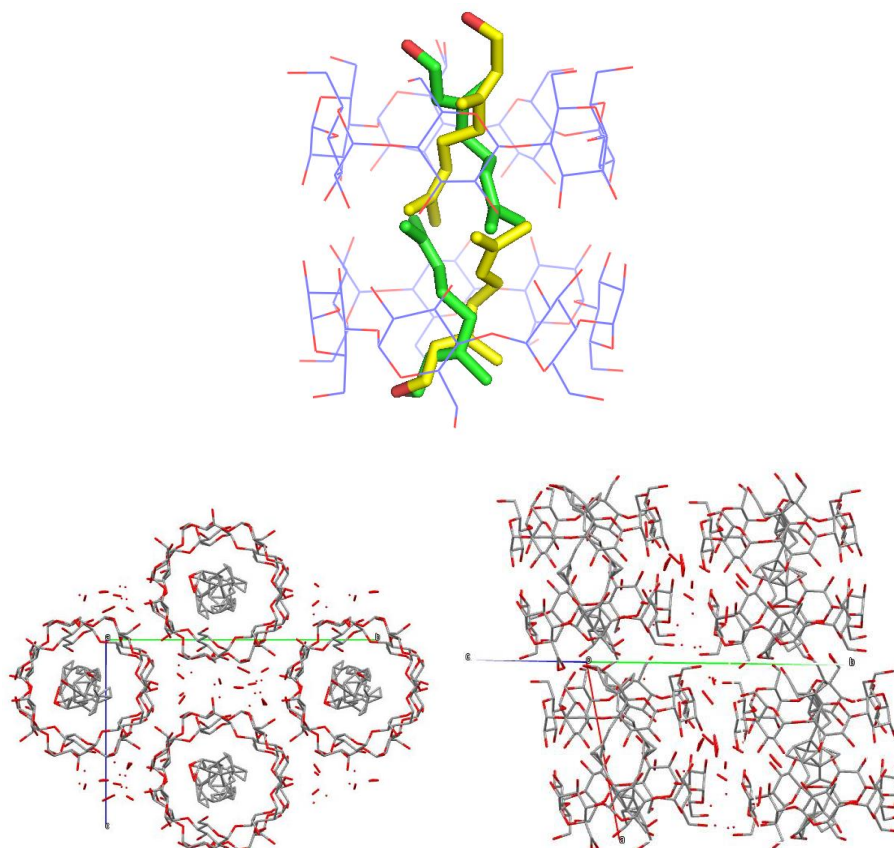
Γερανιόλη/β-CD:

Η γερανιόλη είναι ένα φυσικό άκυκλο μονοτερπένιο που εντοπίζεται στα φυτικά αιθέρια έλαια. Η οσμή και η γεύση της χρησιμοποιούνται ως άρωμα και γεύση στην βιομηχανία τροφίμων. Παρουσιάζει πολλές αξιοσημείωτες ιδιότητες όπως εντομοαπωθητική, αντιμικροβιακή,

αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική. Επίσης χρησιμοποιείται και για την διατήρηση των τροφίμων.



Εικόνα 48: Το μόριο της γερανιόλης

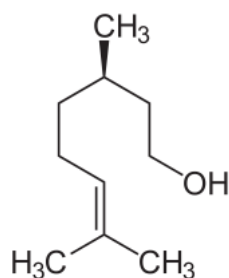


Εικόνα 49: Τομή κατά το επίπεδο bc (αριστερά) και ο σχηματισμός καναλιών κατά μήκος του άξονα a (δεξιά)

Η στοιχειομετρία του ξενιστή: ξενιζόμενο του συμπλόκου της γερανιόλης/ β -CD είναι 2:2. Η υδροξυλομάδα (-OH) βρίσκεται προς την πρωτοταγή πλευρά της κυκλοδεξτρίνης και η κρυσταλλική μοριακή διεύθυνση είναι της μορφής καναλιού (channel). (Kayaci et al.,2014), (Menezes et al., 2012)

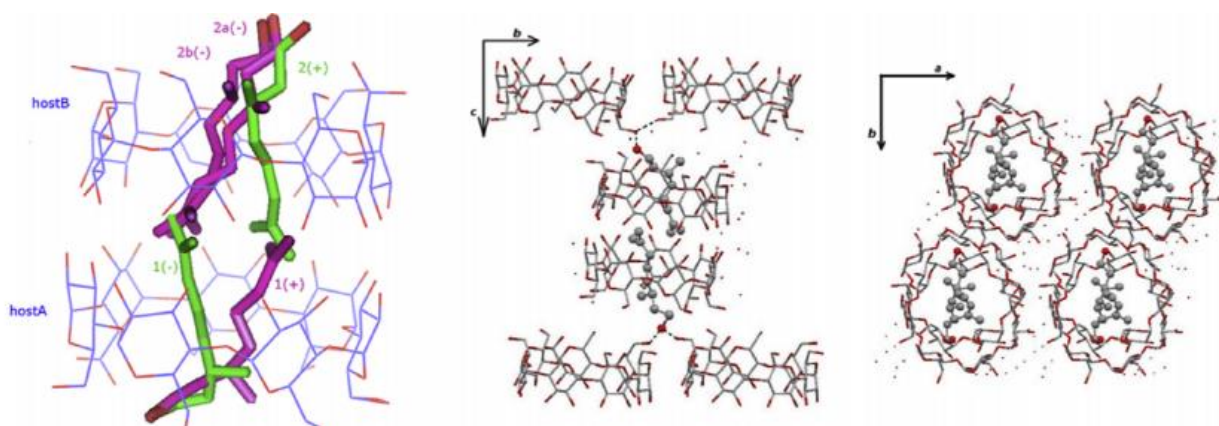
Κιτρονελλόλη/ β -CD:

Η κιτρονελλόλη αποτελεί μια άκυκλη μονοτερπενική πρωτοταγής αλκοόλη και χρησιμοποιείται κυρίως στην βιομηχανία αρωμάτων και όχι μόνο.



Εικόνα 50: Το μόριο της κιτρονελόλης

Ομοίως με την γερανιόλη η στοιχειομετρία του ξενιστή:ξενιζόμενο του συμπλόκου κιτρονελλόλης/ β -CD είναι 2:2 και η κρυσταλλική μοριακή διεύθετηση είναι της μορφής ενδιάμεσου καναλιού intermediate channel (IM).

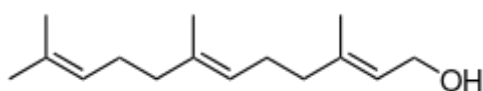


Εικόνα 51: Μοριακή διευθετηση ξενιστη: ξενιζομένου

Η υδροξυλομάδα (-OH) προεξέχει από την πρωτοταγή πλευρά αρκετά και δεν επιτρέπει στα διαδοχικά διμερή της στήλης να δημιουργήσουν κανάλι (channel). Το σύμπλοκο εγκλεισμού κιτρονελλόλης/ β -CD κρυσταλλώνεται σε ομάδα χώρου *P1*, σε κρυσταλλικό σύστημα τρικλινές και η ασύμμετρη μονάδα της περιέχει δύο μόρια ξενιστή β -CD. (Fourtaka et al.,2018)

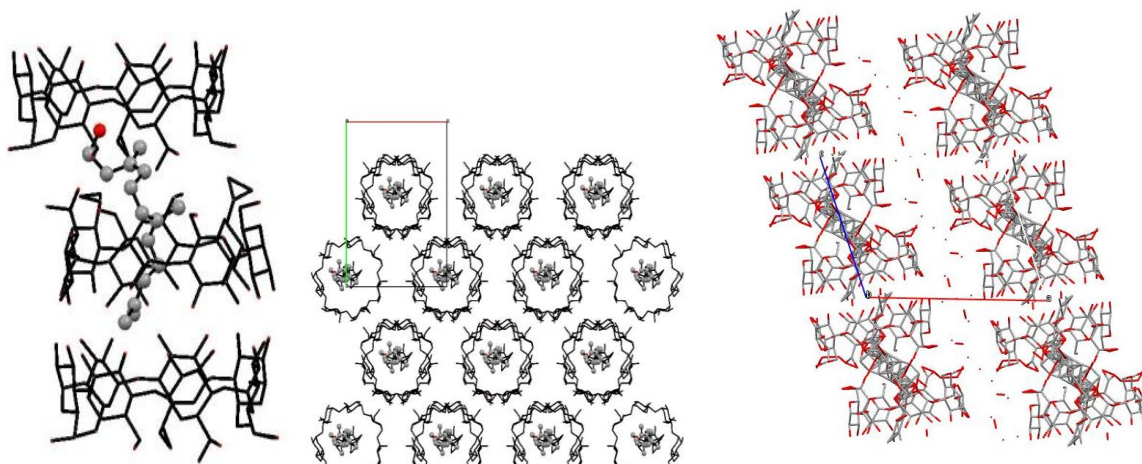
Φαρνεσόλη/ β -CD:

Η φαρνεσόλη αποτελεί μια άκυκλη σεσκιτερπενική αλκοόλη που εντοπίζεται σε πολλά αιθέρια έλαια και δρα ως ενισχυτής αρωμάτων ενώ αποτελεί και φυσικό παρασιτοκτόνο για τα ακάρεα και είναι μια φερομόνη για πολλά άλλα έντομα.



Εικόνα 52: Το μόριο της φαρνεσόλης

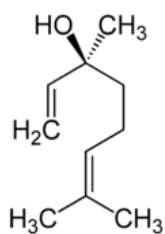
Εχει ακριβώς τον ίδιο τρόπο κρυστάλλωσης με την νερολιδόλη σχηματίζοντας κανάλια (channels) .
(Αδημοσίευτα αποτελέσματα έρευνας εργαστηρίου φυσικής Γ.Π.Α)



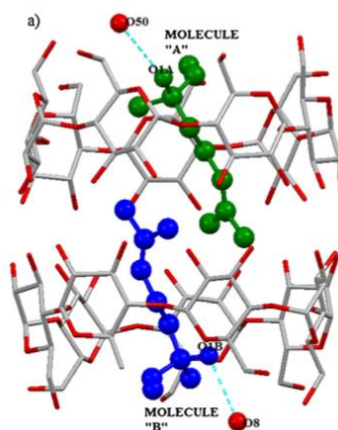
Εικόνα 53: Τομή κατά το επίπεδο ab και κατά το ac και ο σχηματισμός καναλιών κατά μήκος του άξονα c

Λιναλοόλη/ β -CD:

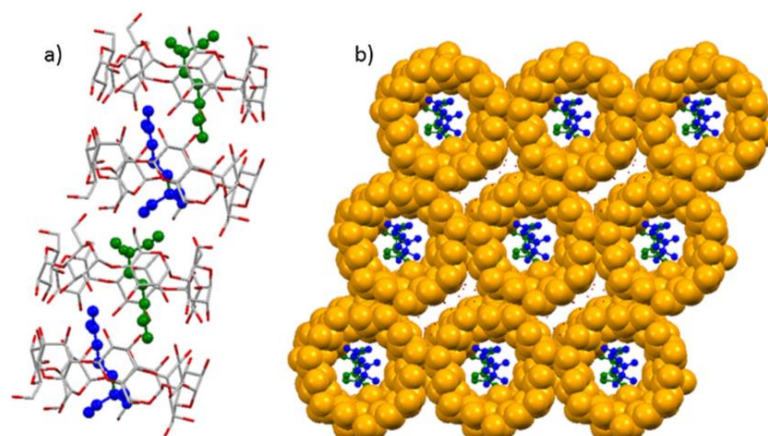
Αποτελεί μια μονοτερπενική αλκοόλη που υπάρχει σε ορισμένα αρωματικά φαρμακευτικά φυτά με αρκετές βιολογικές ιδιότητες.



Εικόνα 54: Το μόριο της λιναλοόλης.



Εικόνα 55: Κρυσταλλική δομή διμερούς 2:2 λιναλοόλης/ β -CD



Εικόνα 56: Κρυσταλλική μοριακή διεύθετηση λιναλοόλης/ β -CD. Προβολή κατά τον (a) άξονα-*a* (b) άξονα-*c*

Σύμφωνα με θεωρητικούς υπολογισμούς παρέχονται δύο δυνατές διαμορφώσεις για το σύμπλεγμα εγκλεισμού β -CD/λιναλοόλη 1:1 στο νερό, με ενέργεια δέσμευσης -4,71 και -5,61 kcal / mol και σταθερά (K_f) 366 M⁻¹. Επιπλέον και στις δύο διαμορφώσεις, το μόριο της λιναλοόλης παρατηρήθηκε ότι είναι κοντά στην ευρύτερη περιοχή της β -CD, ενώ η διμεθυλομάδα της παραμένει έξω από την κοιλότητα στην ευρύτερη περιοχή (Lawtrakul et al., 2013). Σε μια άλλη έρευνα περιγράφονται οι κρυσταλλικές δομές των συμπλοκών της β -κυκλοδεξτρίνης με δύο ασύμμετρες τερπενικές αλκοόλες. (-) - λιναλοόλης σχηματίζοντας το σύμπλοκο στοιχειομετρίας 2:2. (Ceborska, 2016)

Γενικά, τα τερπένια που εξετάζονται εδώ, εμφανίζουν τον ίδιο τρόπο εγκλεισμού, με την υδροξυλομάδα (OH) να προεξέχει προς την πρωτοταγή πλευρά της κυκλοδεξτρίνης. Τα μονοτερπένια (κιτρονελλόλη, γερανιόλη, λιναλοόλη) έχουν στοιχειομετρία 2:2, ενώ το σεσκιτερπένιο (φαρνεσόλη) 2:1 όπως και η νερολιδόλη.

Στην περίπτωση της νερολιδόλης, η οποία είναι ένα γραμμικό σεσκιτερπένιο, η παραμόρφωση του ξενιστή (β -CD) είναι μικρότερη συγκριτικά με αυτήν που παρατηρείται σε άλλα σύμπλοκα εγκλεισμού μη γραμμικών ξενιζόμενων μορίων σε β -CD. Από την άλλη πλευρά, η αλληλομάδα της ξενιζόμενης νερολιδόλης έχει εγκλειστεί στο διμερές με παρόμοιο τρόπο όπως παρατηρείται στις περισσότερες περιπτώσεις εγκλεισμού υδρόφοβων χαρακτηριστικών ομάδων των ξενιζόμενων μορίων. Η γερανιόλη και η κιτρονελλόλη ως μονοτερπένια έχουν 10 άτομα άνθρακα και το μόριο τους μπορεί να χωρέσει μέσα σε 1 διμερές χωρίς να προεξέχει. Ενώ η φαρνεσόλη και η νερολιδόλη όντας σεσκιτερπένια έχουν 15 άτομα άνθρακα και το μόριο τους είναι μεγαλύτερο και δεν χωράνε απόλυτα μέσα στο διμερές, γεγονός που εξηγεί την μετατόπιση και τα ενδιάμεσα κανάλια IM που δημιουργούνται. Έτσι μπορούμε να πούμε πως αυτά τα μόρια έχουν ισχυρότερες σταθερές σύνδεσης μεταξύ των διμερών και κατ' επέκταση έναν πιο σταθερό κρύσταλλο. Καθώς το μόριο βγαίνει και συνεχίζει μετά το διμερές μπαίνοντας στο επόμενο, κατά ένα τρόπο λειτουργεί σαν

συνδετικό μόριο μεταξύ των διμερών έχοντας έτσι ισχυρότερο δέσιμο μεταξύ τους. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί συγκρίνοντας και τις σταθερές σύνδεσης.

Πίνακας 26: Συνοπτικός πίνακας σταθερών σύνδεσης συμπλόκων διαφορών μορίων με β -CD (Kfoury et al., 2018) , (Azzie et al., 2017)

Ενώσεις	Σταθερά σύνδεσης , K_f (M^{-1})
Γερανιόλη	528 ή 334
Κιτρονελλόλη	3.141
Φαρνεσόλη	-
Λιναλοόλη	366
Νερολιδόλη	1.238

Προκύπτει πως η κιτρονελλόλη είναι η ένωση με την ισχυρότερη σταθερά σύνδεσης (K_f), και ακολουθεί η νερολιδόλη που επίσης έχει αρκετά υψηλή σταθερά. Επίσης σύμφωνα με τους Azzie et al., (2017) η *trans* νερολιδόλη έχει αρκετά μεγαλύτερη σταθερά K_f από την *cis*, δημιουργώντας έτσι σταθερότερους δεσμούς μέσα στον κρύσταλλο, κάτι απόλυτα λογικό καθώς οι *trans* μορφές των μορίων στην φύση είναι περισσότερο σταθερές από τις *cis*. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του NMR της μελέτης των Azzie et al., (2017), δεν μπορούμε να αποκλίσουμε και αυτά τα δεδομένα που προτείνουν έναν διαφορετικό προσανατολισμό της νερολιδόλης στην β -CD. Ωστόσο σύμφωνα με την δική μας μελέτη προτείνουμε πως το μόριο της νερολιδόλης είναι εγκλεισμένο στο διμερές με τέτοιο τρόπο που ενώνει τα γειτονικά διμερή, αυξάνοντας έτσι την σταθερά σύνδεσης. Επίσης έχοντας υψηλότερο K_f , δικαιολογείται και η στοιχειομετρία 2:1 που έχει (Azzie et al., 2017).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Εκτιμήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του υδατικού εκχυλίσματος πρόπολης πριν και μετά την προσθήκη κυκλοδεξτρινών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμήθηκε με την δοκιμή DPPH. Προέκυψε ότι όλα τα υδατικά εκχυλίσματα πρόπολης έχουν κάποια αντιοξειδωτική δράση, ιδιαίτερα όμως αυτά παρουσία β -CD έχουν την σημαντικότερη. Η δυνατότητα παραλαβής, μέσω υδατικού εκχυλίσματος, συστατικών της πρόπολης με αντιοξειδωτική δράση ανοίγει δρόμο προς την κατεύθυνση άμεσης εκμετάλλευσής της ως συμπληρωματικό τροφίμων. Το γεγονός αυτό ισχυροποιείται ακόμη περισσότερο δεδομένου ότι η β -CD, η οποία είναι εγκεκριμένο συμπληρωματικό τροφίμων, είχε την αποτελεσματικότερη παρουσία για την παραλαβή αντιοξειδωτικών μέσω υδατικού εκχυλίσματος της πρόπολης.
- Πραγματοποιήθηκε μελέτη σύστασης των μεθανολικών εκχυλισμάτων πρόπολης με και χωρίς β -CD στα υδατικά συστατικά της πρόπολης με χρήση της τεχνικής HPLC-MS και στα πτητικά συστατικά της με χρήση της τεχνικής GC-MS. Σύμφωνα με φάσματα μάζας προτύπων ουσιών και μέσω βιβλιογραφίας ανιχνεύθηκαν σημαντικές ποσότητες φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών και ταυτοποιήθηκαν 6 ενώσεις με την μέθοδο HPLC-MS και 28 ενώσεις με την τεχνική GC-MS. Τα αποτελέσματα του ποιοτικού προσδιορισμού συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία για τις κορυφές που μπόρεσαν να ανιχνευτούν. Ωστόσο αυτά μπορεί να εμφανίζουν κάποιες διαφορές καθώς επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες (χημική σύσταση πρόπολης, pH, συνθήκες επεξεργασίας κ.λ.π). Επίσης καταγράφηκε το FT-IR φάσμα του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος πρόπολης και η φασματοσκοπική ανάλυση επιβεβαίωσε την ύπαρξη αρκετών φαινολικών συστατικών που συμφωνούν και με την βιβλιογραφία.
- Όπως διαπιστώθηκε από την παραπάνω ανάλυση, η πρόπολη είναι πλούσια σε φλαβονοειδή και τερπενοειδή. Γι' αυτό μπορεί να συμβάλλει στον ιατρικό, φαρμακευτικό τομέα και στον τομέα της βιομηχανίας τροφίμων και να επιφέρει σημαντικά οφέλη στην οικονομική ενίσχυση της ελληνικής μελισσοκομίας και του τομέα των μελισσοκομικών προϊόντων. Ωστόσο η χρήση της και η επεξεργασία της δεν είναι τόσο εύκολη, καθώς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τρόφιμο/φάρμακο λόγω της πολύ χαμηλής υδατοδιαλυτότητας και πικρής γεύσης της. Αυτό το πρόβλημα έρχονται να λύσουν οι κυκλοδεξτρίνες και η συμπλοκοποίηση των δραστικών συστατικών της σε αυτές, καθώς έτσι είναι γνωστό ότι βελτιώνονται οι ιδιότητες τους. Συμπερασματικά η παρούσα μελέτη προσφέρει λύση στην βελτίωση της διαλυτότητας, φωτοσταθερότητας, θερμικής σταθερότητας και οξείδωσης της νερολιδόλης μέσω του εγκλεισμού της σε β -CD. Οι χρωματογραφικές μελέτες του υπερκείμενου από το μεθανολικό εκχύλισμα πρόπολης μετά την κατεργασία του με β -CD, έδειξαν σημαντικό ποσοστό μείωσης

(συγκριτικά με τα χρωματογραφήματα πριν από αυτήν την κατεργασία) σχεδόν όλων των μη πολικών ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος. Η μείωση αυτή αποδίδεται κυρίως στον εγκλεισμό τους στην υδρόφοβη κοιλότητα της β -CD, επομένως στην παραλαβή μέσω του αδιάλυτου ιζήματος, προϊόντων εγκλεισμού των συστατικών πρόπολης που χαρακτηρίζονται από βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες και αργή απελευθέρωση των βιοδραστικών ουσιών. Το σκέυασμα αυτό περιέχει όλες αυτές τις πολύτιμες ουσίες της πρόπολης, υδατοδιαλυτές, με αρκετά μεγαλύτερη απορρόφηση στον ανθρώπινο οργανισμό, χωρίς δυσάρεστη γεύση και οσμή, ιδιαίτερα σταθερές και προστατευμένες από εξωτερικούς παράγοντες.

- Η κρυστάλλωση του εκχυλίσματος πρόπολης παρουσία β -CD οδήγησε σε κρυστάλλους εκ των οποίων επιλέχθηκαν οι μεγαλύτεροι και καταλληλότεροι για τον προσδιορισμό της δομής τους μέσω περίθλασης ακτίνων-X από αυτούς. Τα κρυσταλλογραφικά αυτά πειράματα αποκάλυψαν τον εγκλεισμό σε β -CD αποκλειστικά της νερολιδόλης εκ των συστατικών του εκχυλίσματος πρόπολης. Η κρυσταλλική αυτή δομή επαληθεύτηκε με τον προσδιορισμό της δομής κρυσταλλων που προέκυψαν από πειράματα κρυστάλλωσης καθαρής νερολιδόλης παρουσία β -CD και εμφάνισαν την ίδια κρυσταλλική διεύθυνση και την ίδια δομική μονάδα, δηλ. το σύμπλοκο εγκλεισμού νερολιδόλη/ β -CD. Όλες οι εξετασθείσες κρυσταλλικές δομές εμφάνισαν συμμετρία ομάδας χώρου ήταν C2 με παρόμοιες διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας ($a = 19.310$ (5) Å, $b = 24.447$ (6) Å και $c = 15.879$ (4) Å). Μελετήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά, η γεωμετρία εγκλεισμού, η διαμόρφωση ξενιστή-ξενιζομένου, οι ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και η μοριακή διεύθυνση στην κρυσταλλική κατάσταση του προϊόντος εγκλεισμού νερολιδόλης/ β -CD. Επιπλέον, έγινε σύγκριση με τις κρυσταλλικές δομές αντίστοιχων προϊόντων εγκλεισμού μονοτερπενίων και σесκιτερπενίων σε β -CD (Γερανιόλη, Κιτρονελλόλη, Φαρνεσόλη, Λιναλοόλη). Από όλα τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο εγκλεισμός της νερολιδόλης σε β -CD είναι εφικτός και επιτυγχάνεται όπως και για τα αντίστοιχα γραμμικά μονοτερπένια στην κοιλότητα σχηματισμένων διμερών β -CD. Τα μόρια ξενιστές που σχηματίζουν το διμερές μέσω διαμοριακών υδρογονικών δεσμών μεταξύ των δευτεροταγών υδροξυλίων τους, δεν υφίστανται ιδιαίτερη παραμόρφωση και διατηρούν το σχήμα κώλου κώνου. Αντίθετα από τα μονοτερπένια Γερανιόλη, Κιτρονελλόλη και Λιναλοόλη τα οποία κρυσταλλώνουν με στοιχειομετρία ξενιστή:ξενιζομένου 2:2, το σύμπλοκο εγκλεισμού νερολιδόλης/ β -CD, όμοια με το αντίστοιχο του επίσης σесκιτερπενίου Φαρνεσόλη, έχει στοιχειομετρία ξενιστή:ξενιζομένου 2:1. Επίσης, η γεωμετρία εγκλεισμού των δύο αυτών σесκιτερπενίων σε β -CD είναι όμοια και αποκαλύπτει την προεξοχή του ξενιζομένου από την πρωτοταγή πλευρά του ξενιστή και την διείσδυση του στην πρωτοταγή περιοχή του γειτονικού διμερούς, σχηματίζοντας έτσι μια σταθερή αλληλουχία συμπλόκων εγκλεισμού. Η γεωμετρία αυτή σχετίζεται με τις υψηλές τιμές για τη σταθερά σύνδεσης νερολιδόλης με β -CD σε υδατικό διάλυμα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, συγκριτικά με αυτές αντίστοιχων συμπλόκων

εγκλεισμού μονοτερπενίων σε β -CD. Η δομή του συμπλόκου εγκλεισμού εξηγεί αυτή τη σταθερότητα και αποκαλύπτει το ρόλο των δύο επιπλέον ατόμων στην αλυσίδα του άνθρακα των σεσκιτερπενίων σε σχέση με τα μονοτερπένια στον εγκλεισμό τους σε β -CD.

- Με την κρυστάλλωση, προτείνουμε μια μέθοδο παραλαβής καθαρής νερολιδόλης προστατευμένης μέσα σε β -CD και με αρκετά ισχυρή σταθερά σύνδεσης (Kf). Η αξία της παραλαβής και απομόνωσης της νερολιδόλης από το εκχύλισμα πρόπολης και του εγκλεισμού της σε β -CD είναι ιδιαίτερα χρήσιμη και ευεργετική σε πολλούς τομείς καθώς η νερολιδόλη χρησιμοποιείται και ως καθαρή ένωση από πολλές βιομηχανίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

Ahn, M., Kumazawa, Usui, S.Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101, 1383-1392.

Aledavood, S.A., Javadzadeh Bolouri, A., Pakfetrat, A., Tonkaboni, A., Fathi Najafi, M., Delavarian, Z., Shakeri, MT., Mohtashami, A. (2015). Preventing and Therapeutic Effect of Propolis in Radiotherapy Induced Mucositis of Head and Neck Cancers: A Triple-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Iran J Cancer*, 8(5):e4019. doi: 10.17795/ijcp-4019.

Aliyazicioğlu, R., Saral, Ö., Yildiz, O., Yuluğ, E., Canpolat, S., Öztürk, F., Kolayli, S. (2016). Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. *Turk J Med Sci*. 46(1):194-202. doi: 10.3906/sag-1411-35.

Al-Nasiri, G., Cran, MJ., Smallridge, AJ., Bigger, SW. (2018). Optimisation of β -cyclodextrin inclusion complexes with natural antimicrobial agents: thymol, carvacrol and linalool. *J Microencapsul*. 35(1):26-35. doi: 10.1080/02652048.2017.1413147.

Antić, N., Dakić, I., Svabić-Vlahović, M., Stepanović, S. (2013). In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res*.158(4):353-7.

Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., R. Rial-Otero, R., Simal-Gandara, J. (2009). Review A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids* 23 1631–1640.

Azzi, J., Danjou, P.E., Land, D., Ruellan, S., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S. (2017). The effect of cyclodextrin complexation on the solubility and photostability of nerolidol as pure compound and as main constituent of cabreuva essential oil. *Beilstein J. Org. Chem.* 2017,13, 835–844.

Bandegi, A.R., Sameni, H.S., Ramhormozi, P., Taherian, A.A., Mirmohammadkhani, M., Safari, M. (2016). Effects of ethanol extract of propolis on histopathological changes and anti-oxidant defense of kidney in a rat model for type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig*, 7(4): 506–513.

Bankova, V., De Castro, S., Marcucci, M. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, Springer Verlag. 31 (1), pp.3-15.

Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A.G. (2002). Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results, *Zeitschrift fur Naturforschung, Journal of Biosciences*, 57 (5-6), 530-533.

Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. (2000). Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis., *J Nat Prod*, 63(9):1277-9.

Banskota, A.H., Tezuka, Y., Prasain, J.K., Matsushige, K., Saiki, I., Kadota, S. (1998). Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J Nat Prod*. 61:896–900.

Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S., Namba, T. (1996). Four DI-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models, *Biol. Pharm Bull*, 19, 1479-1484.

Blessing, R.H. (1995). An empirical correction for absorption anisotropy. *Acta Crystallogr. Sect. A* 51, 33–38. doi.org/10.1107/S0108767394005726.

Boisard, S., Le Ray, A.M., Gatto, J., Aumond, M.C., Blanchard, P., Derbre, S. (2014). Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis. *J. Agric. Food Chem*, 62, 1344–1351. doi: 10.1021/jf4053397.

Bornancin, A., Tubaro, A., Loggia, R.D., Sosa, S. (2007). Topical antiinflammatory activity of an innovative aqueous formulation of actichelated propolis vs two commercial propolis formulations. *Phytother Res*, 21(9):823-6.

Burdock, G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 36:347–363.

Carrier, L.R., Miller, L.A., Ahmed, I. (2007). The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, 123 78–99.

Catchpole, O., Mitchell, K., Bloor, S. (2015). Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. *Fitoterapia*, 106:167–74.

Ceborsk, M. Structural investigation of the β -cyclodextrin complexes with linalool and isopinocampheol – Influence of monoterpenes cyclicity on the host–guest stoichiometry, *Chemical Physics Letters*, Volume 651, May 2016, Pages 192-197.

Chaillou, L.L. & Nazareno, M.A. (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT- Food science and technology*, 42, 1422-1427.

Crini, G. (2014). Review: a history of cyclodextrins. *Chemical reviews*, 114(21), 10940-10975.

- De Clercq, E. (2000). Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection, *Medicinal Research Reviews*, 20(5), 323-349.
- Debiaggi, M., Tateo, F., Papagni, L., Luini, M., Romero, E. (1990). Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication, *Microbiologica*, 13, 207-213.
- Del Valle, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. (2004). *Process Biochemistry*, Volume 39, Issue 9, Pages 1033-1046.
- Dias, L.G., Estevinho, L., Moreira, L., Pereira, J.A. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 46 3482–3485.
- Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J., Howard, J.A.K., Puschmann, H. (2009). It OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr.* 42, 339–341. <https://doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
- El-khawaga, O.A., Salem, T.A., Elshal, M.F. (2003). Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clin Chim Acta*. 338:11–6.
- Erhan Eroglu, H., Ozkul, Y., Tatlisin, A. (2008). Anticarcinogenic and antimetabolic effects of Turkish propolis and mitomycin-C on tissue cultures of bladder cancer. *Nat Prod Res*, 22:1060–6.
- Farrugia, L.J., (2012). WinGX and its ORTEP for Windows: an update. *J. Appl. Crystallogr.* 45, 849–854. doi.org/10.1107/S0021889812029111.
- Fearnely, J. (2001). *Bee propolis*. Souvenir Press Ltd.London.
- Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C. (2004). Electron transfer reaction of cinnamic acids and their methylesters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J.Org.Chem.*69:2309–2314.
- Fourtaka, K., Christoforides, E., Mentzafos, D., Bethanis, K. (2018). Crystal structures and molecular dynamics studies of the inclusion compounds of β -citronellol in β -cyclodextrin, heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin and heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin *Journal of Molecular Structure*. 1161 1-8.
- Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforcin, J., M., Guimaraes, S. (2006). In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites, *Phytomedicine*, 13 (3), 170-175.

Grazulis, S., Chateigner, D., Downs, R.T., Yokochi, A.F.T., Quiros, M., Lutterotti, L., Manakova, E., Butkus, J., Moeck, P., Le Bail, A. (2009). Crystallography Open Database - an open-access collection of crystal structures. *J. Appl. Crystallogr.* 42, 726–729.

Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J. R., Peterson, P.K. (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*, 102 158–163.

Gregoris, E. & Stevanato, R. (2010). Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 76- 82.

Greenway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F., R. (1990). The composition and plant origin of propolis: A report of work at Oxford, *Bee World*, 71, 107-118.

Greenway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F., R. (1987). The analysis of bud exudates of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry, *Proc ,R.Soc.London B*, 232,249- 272.

Groom, C.R., Bruno, I.J., Lightfoot, M.P., Ward, S.C. (2016). The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr. Sect. B* 72, 171–179.

Gulcin, I., Bursal, E., Sehitoglu, M. H., Bilsel, M., Goren, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2227-2238.

Hedges, A.R., Shieh, W.J., Sikorski, C.T. (1995). Use of cyclodextrins for encapsulation in the use and treatment of food products. *ACS Symposium Series*, Vol. 590.

Hermenean, A., Mariasiu, T., Navarro-González, I., Vegara-Meseguer, J., Miutescu, E., Chakraborty, S., Pérez-Sánchez, H. (2017). Hepatoprotective activity of chrysin is mediated through TNF- α in chemically-induced acute liver damage: An in vivo study and molecular modeling. *Exp Ther Med*, 13(5):1671-1680. doi: 10.3892/etm.2017.4181.

Hubschle, C.B., Sheldrick, G.M., Dittrich, B., (2011). ShelXle: a Qt graphical user interface for SHELXL. *J. Appl. Crystallogr.* 44, 1281–1284.

Irie T. & Uekama, K. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci.* 86(2):147-62.

Januzzi, J. (1993). Propolis collectors, *Am. Bee J.*, 6, 104-107.

Januzzi, J. (1990). High profits from Lowly propolis. *Am. Bee J.*, 4, 237-238.

Jeng, S-N., Shih, M-K., Kao, C-M., Liu, T-Z., Chen, S-C. (2000). Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. *Food Chem Toxicol* 38:893–897.

Kayaci, F., Sener Sen, H., Durgun, E., Uyar, T. (2014). Functional electrospun polymeric nanofibers incorporating geraniol–cyclodextrin inclusion complexes: High thermal stability and enhanced durability of geraniol, *Food Research International* 62 424–431.

Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Mourtzinis, I., Troullidou, E., Chiou, A., Karathanos, V.T. (2009). Encapsulation of complex extracts in beta-cyclodextrin: an application to propolis ethanolic extract. *J Microencapsul*, 26(7):603-13. doi: 10.3109/02652040802586373.

Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Troullidou, E., Mourtzinis, I., Karathanos, V.T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452-461.

Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Maruška, A., Kubilienė, L. (2014). Chemometric analysis of volatiles of propolis from different regions using static headspace GC-MS. *Cent. Eur. J. Chem.* 12(6) 736-746 DOI: 10.2478/s11532-014-0521-7.

Katsuhiko Ariga & Kunitake Toyoki. (2006). *Supramolecular Chemistry - Fundamentals and Applications*. Springer.

Kedzia, B., Geppert, B., Iwaskiewicz, J. (1990). Pharmacological investigations of ethanolic extract of propolis. *Phytotherapie*, 6, 7-10.

Kfoury, M., Landy, D., Fourmentin, S. (2018). Characterization of Cyclodextrin/Volatile Inclusion Complexes: A Review. *Molecules*, 23, 1204; doi:10.3390/molecules23051204.

Khan, MN., Lane ME., McCarron, PA., Tambuwala MM. (2017). Caffeic acid phenethyl ester is protective in experimental ulcerative colitis via reduction in levels of pro-inflammatory mediators and enhancement of epithelial barrier function. *Inflammopharmacology*. doi: 10.1007/s10787-017-0364-x.

Kim, T.R. & Robinson, W. E. (1999). Structure- activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type I integrase and replication, *J. Med. Chem*, 42, 497-509.

Kimoto T, Koya S, Hino K, Yamamoto Y, Nomura Y. (2000). Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. *Pathol Int* 50:679–689.

Kirilmaz, S., SonmezLevent, Y.M., Yucel, B., Yilmaz, B. (2005). The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts, *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3), 371-376.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Yu., Bankova, V., Christov, R. & Popova, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins. *J Ethnopharmacol*, 64, 235-240.

Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E., Krol, W. (2013). Review Article: Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2013, Article ID 964149, 11 pages.

Li, S., Purdy, W.C. (1992). Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. *Chemical Reviews* 92, 1457-1470.

Linert, W., Margl, P., & Renz, F. (1992). Solute-solvent interactions between cyclodextrin and water: a molecular mechanical study. *Chemical Physics*, 161(3), 327– 338.

Liu, L., & Guo, Q.-X. (2002). The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 42,1-14.

Loftsson, T., Masson, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm*, 225(1-2):15-30.

Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., Järvinen, T. (2005). Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2(2):335-51.

Lotfy, M. (2006). Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 7, 22-31.

Lu, L.C., Chen, Y.W., Chou, C.C. (2005). Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Food Microbiology*, 10 (2), 213-220.

Macrae, C.F., Bruno, I.J., Chisholm, J.A., Edgington, P.R., McCabe, P., Pidcock, E., Rodriguez-Monge, L., Taylor, R., van de Streek, J., Wood, P.A. (2008). Mercury CSD 2.0 – new features for the visualization and investigation of crystal structures. *J. Appl. Crystallogr.* 41, 466–470.

Ma Cabral Marques, H. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Fragr. J.* 25, 313–326.

Magnúsdóttir, A., Másson, M., Loftsson, T. (2002). Cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* 44, 213-218.

Marquele, F.D., Oliveira, A.R.M., Bonato, P., S., Lara, M., G. & Fonseca, M., J., V. (2006). Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (2), 461-468.

Marques, H.M.C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25,313-326.

Marucci, M., C. (1995). Propolis: Chemical composition, biological, properties and therapeutic activity, *Apidologie*, 26, 83-99.

McPherson, A. (2008). *An Overview of Macromolecular Crystallography, in: Introduction to Macromolecular Crystallography*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–18.

McPherson, A. (2003). Introduction to Macromolecular Crystallography. *Second Edition. J. Proteome Res.* 2, 222–222.

Melliou, E., & Chinou, I. (2004). Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Medica*, 70 (6), 515-519.

Menezes, H., Alvarez, JM., Almeida, E. (1999). Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. *Arzneimittelforschung*, 49(8):705-7.

Menezes, P.P., Serafini, M.R., Santana, B.V., Nunes, R.S., Quintans, J.L., Silva, G.F., Isac, A., Medeiros, I.A., Marchioro, M., Byanka, P., FragaP., Santos, R.V.M., Araújo, A.A.S. (2012). Solid-state -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochimica Acta*, 548 45–50.

Miller, B.R. 3rd., McGee, T.D.J., Swails, J.M., Homeyer, N., Gohlke, H., Roitberg, A.E. (2012). MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* 8, 3314–3321.

Nagy, M., Suchy, V., Uhrin, D., Ubik, K., Budesinsky, M., Grancai, D. (1989). Constituents of propolis of Czechoslovak origin. *V Chem Pap*, 42, 691-696.

- Orsia, OR., Sforcin, JM, Funaria, SRC., Bankova, V. (2005). Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against Salmonella Typhimurium. *Int Immunopharmacol*, 5:359–368.
- Orsi1, R.D.O., Sforcin, J.M., Funari, S.R.C., Fernandes Junior, A., Bankova, V. (2006). Synergistic effect of propolis and antibiotics on the salmonella typhi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:108-112 ISSN 1517-8382 108.
- Orsolić, N., Basić, I. (2005). Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP), 59(10):561-70.
- Oztürk, F, Kurt, E., Cerçi, M., Emiroglu, L., Inan, U., Türker, M., Ilker, S. (2000). The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. *Ophthalmic Res*, 32(1):13-8.
- Pápay, V., Soltész, M., Csizmadia, B., Tóth, L. (1987). Chemical and pharmacological study of propolis from various locations. *Acta Pharm Hung*, 57, 143-151 (in Hungarian).
- Pellati, F., Orlandini, G., Pinetti, D., Benvenuti, S. (2011). HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 934–948.
- Pereira, D.S.A., Seixas, S., Neto, R. F. (2002). Propolis: 100 anos de pesquisa e suas prespectives futures, *Quim. Nova*, 25, 321-3226.
- Pereira, D.S.A., Farah de Miranda, A., Trugo, L., C., Neto, F.R. (2003). Distribution of Quinic Acid Derivatives and Other phenolic compounds in Brazilian propolis, *Naturforsch*, 58, 590-593.
- Petri, G., Lemberkovics, E., Foldvari, M. (1988). Examination of differences between propolis (bee glue) produced from different floral environments. In: Flavours and Fragrances: a World Perspective (BM Laurenc, BD Mookherjee, BJ Willis, eds), *Elsevier*, Amsterdam, The Netherlands, 439-446.
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., Henriques, M. (2014). Review Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers* 101 121–135.
- Polyakov, N.E., Leshina, T., Konovalova, T.A., Hand, E.O., Kispert, L.D. (2004). Inclusion complexes of carotenoids with Cyclodextrins: NMR, EPR, and optical studies. *Free Radic Biol Med* 36:872–880.
- Qiwei, W., Shouquan, J.I.A. (1990). Theoretical estimation of the crystal growth driving force during slow cooling. *J. Cryst. Growth* 102, 678–680.

Reddy, N.D., Shoja, M.H., Jayashree, B.S. (2015). In vitro and in vivo evaluation of novel cinnamyl sulfonamide hydroxamate derivative against colon adenocarcinoma. *Chem Biol Interact.*, 233:81–94.

Salatino, A., Teixeira, W., E., Negri, G. & Message, D. (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian propolis, *Evid Based Complement alternat Med*, 2 (1), 33-38.

Samuelsson, G. (2005). Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προελεύσεως. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Scazzocchio, F., D' Auriaa, F., D., Alessandrinia, D., Pantanella, F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis, *Microbiological Research*, Article in press.

Scheller, S., Aleksandrowicz, J, Nikodemowicz, E. (1989). Trials of immunoregulation in patients with chronic bronchitis. *Immunol Pol 1*.

Scheller, S., Czaundera, M., Król, W. (1989). Trace elements in propolis and in its ethanolic extract/EEP/as determined by neutron activation analysis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 44c:170–172.

Seo, H.S., Ku, J.M., Choi, H.S. (2016). Quercetin induces caspase-dependent extrinsic apoptosis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 signaling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells. *Oncol Rep*, 36:31–42.

Sforcin, J. M. (2016). REVIEW: Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis, *Phytother. Res.* 30: 8.94–905.

Sheldrick, G.M. (2015). Crystal structure refinement with it SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C* 71, 3–8.

Sheldrick, G.M., (2012). SADABS, SADABS Version 2012/1, 1, Bruker-AXS, Madison, Wisconsin, USA.

Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

SOCRATES.G. (2001). Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Tables and Charts. Third Edition, *JOHN WILEY & SONS, LTD*.

Sobocyanec, S., Syverko, V., Balog, T., Syarica, A., Likica, S., Kusyica, B., Katalinica, V., Radica, S., Marotti, T. (2006). Oxidant/Antioxidant properties of Croatian Native propolis. *J. Agric. Food Chem*, 54, 8018-8026.

Spek, A.L., (2009). Structure validation in chemical crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D* 65, 148–155.

Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., Zhang, H. (2015). Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of beijing propolis extracts. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015, 595393.

Surendraraj, A., Farvin, K.H.S., Anandan, R. (2013). Antioxidant Potential of Water Hyacinth (*Eichornia crassipes*): In Vitro Antioxidant Activity and Phenolic Composition. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22:1, 11-26.

Szejtli, J. (1985). Cyclodextrins in Pesticides. *Starch-Starke* 37, 382-386

Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev* 98:1743–1753

Szejtli, J. (2004). Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.* 76, 1825–1845.

Teerasripreecha, D., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S. In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complement Altern Med*, 12:27.

Thorn, A., Dittrich, B., Sheldrick, G.M. (2012). Enhanced rigid-bond restraints. *Acta Crystallogr. A* 68, 448–451.

Tilden, E. B., Adams, M., Hudson, C. S. (1942). Purification of the Amylase of *Bacillus macerans*. *Journal of the American Chemical Society*, 64(6), 1432-1433.

Tsoucaris, G., Atwood, J.L., Lipkowski, J. (1996). Crystallography of Supramolecular Compounds. Nato Science Series C.

Usia, T., Banskota, A., H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Kadota, S. (2002). Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *J. Nat. Prod.*, 65(5), 673-676

Vernon, L., Singleton, Rudolf ., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*. Volume 299, Pages 152-178.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J.A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J. Food Sci.* 73, R117–R124. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00966.

Vynograd, N., Vynograd, I., Sosnowski, Z. (2000). A comparative multicentre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*, 7(1),1-6.

Wang, J., Morin, P., Wang, W., Kollman, P.A. (2001). Use of MM-PBSA in Reproducing the Binding Free Energies to HIV-1 RT of TIBO Derivatives and Predicting the Binding Mode to HIV-1 RT of Efavirenz by Docking and MM-PBSA. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 5221–5230.

Watanabe, MA., Amarante, MK., Conti, BJ. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol*, 63:1378–86.

Weng-Keong Chan, Loh Teng-Hern Tan, Kok-Gan Chan, Learn-Han Lee, Bey-Hing Goh. (2016). Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. *Molecules* , 21(5), 529; doi:10.3390/molecules21050529 *Review*.

Zhang, N., Li, J.H., Cheng, Q.T., Zhu, M.W. (1994). Kinetic studies on the thermal dissociation of β -cyclodextrin-benzyl alcohol inclusion complex. *Thermochimimica Acta*, 235,105-116.

Ελληνική βιβλιογραφία

Αργυροπούλου, Ε. (2017). Μελέτη της χημικής σύστασης αλκοολικών εκχυλισμάτων πρόπολης και της βιολογικής δράσης του. Πτυχιακή μελέτη Γ.Π.Α.

Κακούρη, Γ.Ε. (2015). Μελέτη αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων από τέπαλα κρόκου, φύλλα μελισσόχορτου και πρόπολη. Μεταπτυχιακή μελέτη Γ.Π.Α.

Λυδάκης, Σ. (2001). *Αναλυτική Χημεία*. Αθήνα: Παπασωτηρίου.

Μπίκος, Θ. (2001). *Πρόπολις: Το θαύμα των μελισσών*, Αθήνα: Ψύχαλο.

Τρουλλίδου, Ε. (2007). ΠΡΟΠΟΛΗ: Χαρακτηρισμός εκκχυλισμάτων της και αξιολόγηση ενθυλακωμένων μορφών της σε βιοπολυμερή, με εφαση στις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες της και την απελευθερωσή της. Μεταπτυχιακή διατριβή.

Χαρισάνης, Π. (1992). *Η πρόπολη και πως την προετοιμάζουμε για προσωπική χρήση*, Αθήνα: Μελισσοκομική επιθεώρηση.

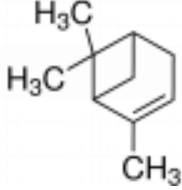
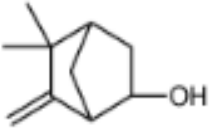
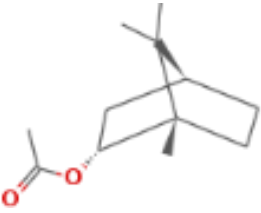
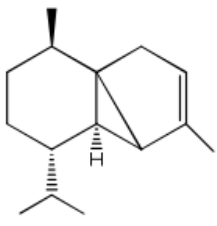
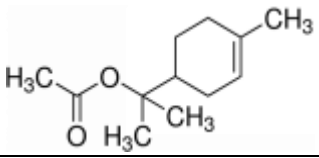
Χατζιωάννου, Θ.Π. & Κούππαρη, Μ.Α. (2010). *Ενόργανη Ανάλυση*. Αθήνα: Δ. Μαυρομάτη

Χριστοφορίδης, Η. (2008). Μελέτη Προϊόντος Εγκλεισμού β-ναφθαλένοξικό οξύ σε β-κυκλοδεξτρίνη. Μεταπτυχιακή μελέτη Γ.Π.Α.

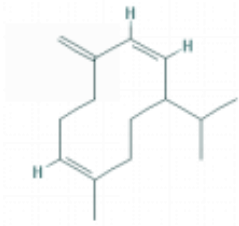
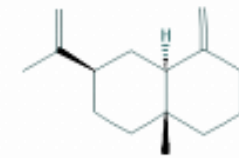
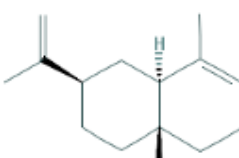
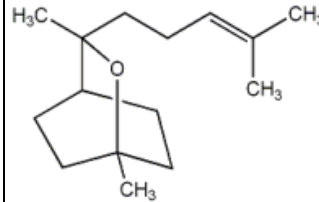
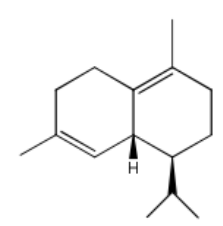
Ιστότοποι:

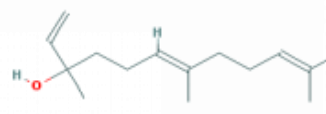
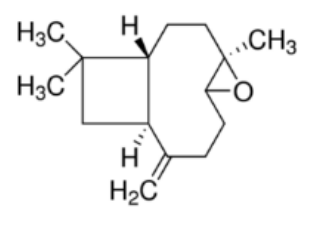
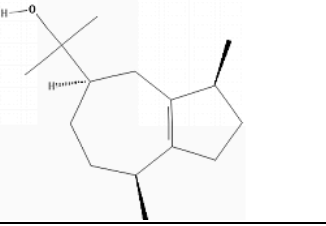
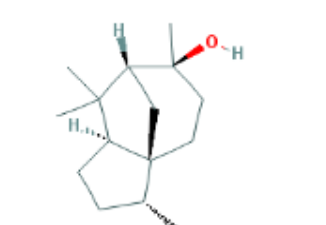
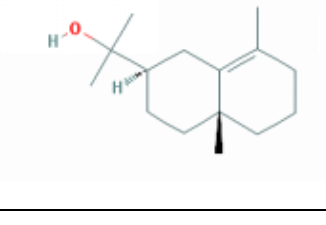
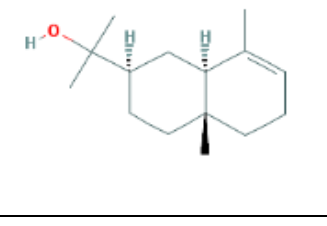
http://www.ekem.org.gr/index.php?page=propoli&hl=el_GR


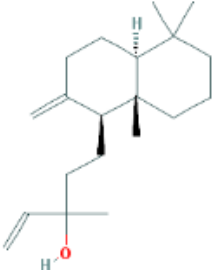
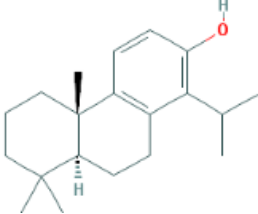
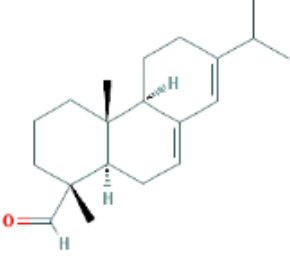
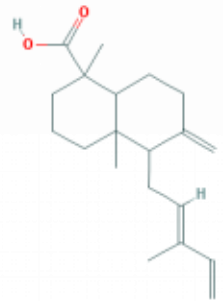
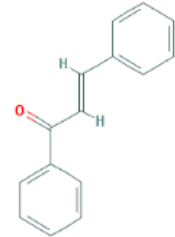
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

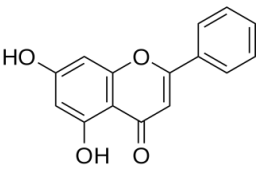
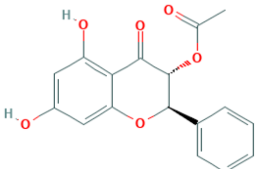
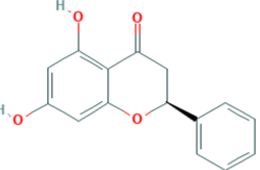
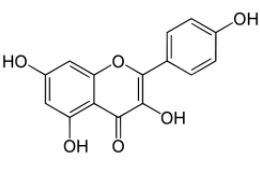
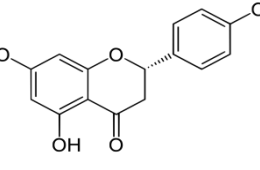
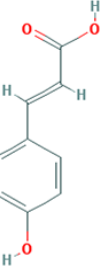
Ενώσεις			
Εμπειρική ονομασία	Αγγλική Ονομασία κατα IUPAC	Ελληνική Ονομασία κατα IUPAC	Χημική δομή
α-Πινένιο (α-pinene)	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	(1R)-2,6,6-Τριμεθυλοδικυκλο[3,1,1] επτ-2-ένιο	
6-Καμφενόλη (6-camphenol)	2,2-Dimethyl-3-methylidenebicyclo[2.2.1]heptan-5-ol	2,2-Διμέθυλ-3-μεθυλιδενεδικυκλο[2.2.1]επταν-5-όλη	
Οξικός εστέρας βορνέολης (1-bornylacetate)	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, acetate,(endo)-	Οξική-ενδο-1,7,7-τριμεθυλοδικυκλο[2.2.1]επταν-2-όλη	
α-Κουμπεμπένιο (α-cubebene)	(3aS,3bR,4S,7R,7aR)-4-Isopropyl-1-3,7-dimethyl-3a,3b,4,5,6,7-hexahydro-1H-cyclopenta[1,3]cyclopropano[1,2]benzene	4-Ισοπροπυλο- 1-3,7-διμεθυλο-3a,3b,4,5,6,7- εξαϋδρο-1-Η-κυκλοπεντα[1,3]κυκλοπροπα[1,2]βενζένιο	
Οξικός εστέρας α-τερπινεόλης (α-terpinylacetate)	2-(4-Methylcyclohex-3-enyl)propan-2-yl acetate	Οξικός εστέρας-2-(4-μεθυλοκυκλοεξεν-3-ενυλ)-προπαν-2 υλο	

α-Κοπαένιο (α-copaene)	(1R,2S,6S,7S,8S)-8-Isopropyl-1,3-dimethyltricyclo[4.4.0.02,7]dec-3-ene	8-Ισοπροπυλο-1,3-διμεθυλο-τρικυκλο, (1R, 2S, 6S, 7S, 8S)-[4.4.0.02,7]δέκα-3-ένιο	
Μπουρμπονένιο (bourbonene)	1-Isopropyl-3a-methyl-6-methylenedecahydrocyclopenta[3,4]cyclobuta[1,2]cyclopentene	1-Ισοπροπυλο-3α-μεθυλο-6-μεθυλενοδεκαϋδροκυκλοπεντα[3,4]κυκλοβουτα [1,2]κυκλοπεντένιο	
trans-Καρυοφυλλένιο (trans-caryophyllene)	Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, (1R,4E,9S)-	4,11,11-Τριμεθυλο-8-μεθυλενοδικυκλο[7.2.0]ενδεκ-4-ένιο	
α-Κεδρένιο (α-cedrene)	(1S,2R,5S,7R)-2,6,6,8-Tetramethyltricyclo[5.3.1.01,5]undec-8-ene	(1S,2R,5S,7R)- 2,6,6,8-Τετραμεθυλ-τρικυκλο [5,3,1,01,5] ενδεκ-8-ένιο	
β-Φαρνεσένιο (β-farnesene)	(6Z)-7,11-Dimethyl-3-methylenedodeca-1,6,10-triene	(6Z)-7,11-Διμεθυλο-3-μεθυλιδεν-δωδεκα-1,6,10-τριένιο	
9-επι- (E) -Καρυοφυλλένιο (caryophyllene<9-epi-(E))	(1R,4E,9R)-4,11,11-Trimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	(1R,4E,9R)-4,11,11-Τριμέθυλ--8-μεθυλιδεν-δικυκλο [7.2.0]ενδεκ-4-ένιο	

δ-Γερμακρένιο (germacrene-d)	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [S-(E,E)]-	[S- (E, E)]-1,6-Κυκλοδεκαδιένιο, 1-μεθυλο-5-μεθυλενο-8- (1-μεθυλαίθυλο)	
β-Σελινένιο (β-selinene)	8a-Methyl-5-methylidene-3-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,4a,6,7,8-octahydronaphthalene	8α-Μεθυλ-5-μεθυλιδενο-3-προπ-1-εν-2-υλ-1,2,3,4,4α, 6,7,8-οκταϋδροναφθαλένιο	
α-Σελινένιο (α-selinene)	(3R,4aR,8aR)-5,8a-Dimethyl-3-prop-1-en-2-yl-2,3,4,4a,7,8-hexahydro-1H-naphthalene	(3R, 4aR, 8aR) -5,8α-Διμεθυλ-3-προπ-1-εν-2-υλ- 2,3,4,4α, 7,8-εξϋδρο- 1Η- ναφθαλένιο	
Σεσκισινεόλη (sesquicineole)	2,4-Dimethyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-3-oxabicyclo[2.2.2]octane	2,4-Διμεθυλο-2- (4-μεθυλοπεντ-3-ενυλο) -3-οξαδικυκλο [2.2.2] οκτάνιο	
δ-Καδινένιο (δ-cadinene)	(1S,cis)-4,7-Dimethyl-1-(1-methylethyl)-1,2,3,5,6,8a-hexahydronaphthalene	(1S,8aR)1-Ισοπρόπυλο-4,7-διμέθυλο-1,2,3,5,6,8α-εξαυδροναφθαλένιο	

trans-Νερολιδόλη (trans-nerolidol)	1,6,10-Dodecatrien-3- ol,3,7,11-trimethyl-,(E)-	3,7,11-Τριμεθυλο-1,6,10- δωδεκατριεν-3-όλη	
Οξείδιο του καρυοφυλλενίου (caryophylleneoxide)	5- Oxatricyclo(8.2.0.0(4,6))d odecane, 4,12,12- trimethyl-9-methylene-, (1R,4R,6R,10S)-	(1R,4R,6R,10S)- 5-Οξατρικυκλο (8.2.0.0 (4,6)) δωδεκάνιο, 4,12,12- τριμεθυλο-9-μεθυλενιο	
Γουαϊόλη (guaiol)	5-Azulenemethanol, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro- a,a,3,8-tetramethyl-, (3S- (3a,5a,8a))-	(3S-(3a,5a,8a))- 5- Αζουλενομεθανόλη, 1,2,3,4,5,6,7,8-οκταϋδρο-α, α, 3,8- τετραμεθυλ-	
επι-Κεδρόλη (epi- cedrol)	1H-3a,7-Methanoazulen- 6-ol, octahydro-3,6,8,8- tetramethyl-	1 H-3α,7-Μεθανοαζουλεν-6-όλη, οκταϋδρο-3,6,8,8-τετραμεθυλ-	
γ-Ευδεσμόλη (γ- eudesmol)	2-[(2R,4aR)-4a,8- Dimethyl-2,3,4,5,6,7- hexahydro-1H-naphthalen- 2-yl]propan-2-ol	2 - [(2R, 4aR) -4a, 8-Διμεθυλ- 2,3,4,5,6,7-εξαϋδρο-1H- ναφθαλεν-2-υλ] προπαν-2-όλη	
α-Ευδεσμόλη (α- eudesmol)	2-[(2R,4aR,8aR)-4a,8- Dimethyl-2,3,4,5,6,8a- hexahydro-1H-naphthalen- 2-yl]propan-2-ol	4α, 8-Διμεθυλ-2,3,4,5,6,8α- εξαϋδρο-1H-ναφθαλεν-2-υλ- προπαν-2-όλη	

Παλμιτικό οξύ (palmitic acid)	Hexadecanoic acid	Εξαδεκανοϊκό οξύ	
Μανοόλη (manool)	(3R)-5-[(1S,4aS,8aS)-5,5,8a-Trimethyl-2-methylidene-3,4,4a,6,7,8-hexahydro-1H-naphthalen-1-yl]-3-methylpent-1-en-3-ol	(3R)-5-[(1S, 4aS, 8aS)-5,5,8a-Τριμεθυλ-2-μεθυλιδεν-3,4,4a,6,7,8-εξαύδρο-1H-ναφθαλεν-1-υλ]-3-μεθυλοπεντ-1-εν-3-όλη	
Τοταρόλη (trans-totarol)	4b,8,8-Trimethyl-1-propan-2-yl-5,6,7,8a,9,10-hexahydrophenanthren-2-ol	4b, 8,8-Τριμεθυλ-1-προπαν-2-υλ-5,6,7,8a, 9,10-εξαύδροφαινανθρεν-2-όλη	
Αμπιετάλη (abietal)	(1R,4aR,4bR,10aR)-1,4a-Dimethyl-7-propan-2-yl-2,3,4,4b,5,6,10,10a-octahydrophenanthrene-1-carbaldehyde	(1R, 4aR, 4bR, 10aR) -1,4a-Διμεθυλ-7-προπαν-2-υλ-2,3,4,4b, 5,6,10,10a-οκταύδροφαινανθρενο-1-καρβαλδεΐδης	
Κομμουνικό οξύ (communic acid)	(1S,4aR,5R,8aS)-1,4a-Dimethyl-6-methylidene-5-(3-methylpenta-2,4-dienyl)-3,4,5,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalene-1-carboxylic acid	(1S, 4aR, 5R, 8aS) -1,4a-Διμεθυλ-6-μεθυλιδεν-5-(3-μεθυλπεντα-2,4-διενυλ) -3,4,5,7,8,8a-εξαύδρο-ναφθαλινο-1-καρβοξυλικό οξύ	
Χαλκόνη (chalcone)	(E)-1,3-Diphenylprop-2-en-1-one	(E) -1,3-Διφαινυλοπροπ-2-εν-1-όνη	

Χρυσίνη	5,7-Dihydroxy-2-phenylchromen-4-one	5,7-Διυδροξυ-2-φαινυλοχρωμεν-4-όνη	
Οξικός εστέρας 3-πινομπασκίνης (pinobanksin-3-acetate)	[(2R,3R)-5,7-Dihydroxy-4-oxo-2-phenyl-2,3-dihydrochromen-3-yl] acetate	[(2R, 3R) -5,7-Διυδροξυ-4-οξο-2-φαινυλ-2,3-διυδροχρωμεν-3-υλ-οξικό	
Πινοσεμπρίνη (pinocembrin)	(2S)-5,7-Dihydroxy-2-phenyl-2,3-dihydrochromen-4-one	(2S) -5,7-Διυδροξυ-2-φαινυλ-2,3-διυδροχρωμεν-4-όνη	
Καμφερόλη (kaempferol)	3,5,7-Trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	3,5,7-Τριυδροξυ-2- (4-υδροξυφαινυλ) χρωμεν-4-όνη	
Ναριγενίνη (naringenin)	(2S)-5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one	(2S) -5,7-Διυδροξυ-2- (4-υδροξυφαινυλ) -2,3-διυδροχρωμεν-4-όνη	
p-Κουμαρικό οξύ (p-coumaric acid)	(E)-3-(4-Hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid	(E) -3- (4-Υδροξυφαινυλ) προπ-2-ενοϊκό οξύ	
Καφεϊκό οξύ (caffeic acid)	(E)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)prop-2-enoic acid	(E) -3- (3,4-Διυδροξυφαινυλ) προπ-2-ενοϊκό οξύ	