



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ « ΤΡΟΦΙΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ»
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Φυσικοχημική μελέτη και έλεγχος αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης, αιθερίου ελαίου Βασιλικού (*Ocimum basilicum*) και των προϊόντων εγκλεισμού του, σε κυκλοδεξτρίνες»



Άγγελος Μπάλλιος

Επιβλέπων Καθηγητής:

Κωσταντίνος Μπεθάνης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2023

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Φυσικοχημική μελέτη και έλεγχος αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης, αιθερίου ελαίου Βασιλικού (*Ocimum basilicum*) και των προϊόντων εγκλεισμού του, σε κυκλοδεξτρίνες»

"Physical-chemical study and evaluation of the antioxidant and antimicrobial action of Basil (*Ocimum basilicum*) essential oil and its encapsulated products in cyclodextrins"

Άγγελος Μπάλλιος

Εξεταστική επιτροπή:

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α

Χρήστος Παππάς, Καθηγητής Γ.Π.Α

Κωσταντίνος Μπεθάνης Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές Πέτρο Ταραντίλη και Χρήστο Παππά, που μου έδωσαν την ευκαιρία να ενταχθώ στην ομάδα του εργαστηρίου γενικής χημείας, καθώς και για τις καθοριστικές συμβουλές τους. Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Κωσταντίνο Μπεθάνη, που χωρίς την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του η παρούσα εργασία θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί. Επιπλέον θα ήθελα να αποδώσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στον ακαδημαϊκό ερευνητή Ηλία Χριστοφορίδη και στην διδακτορική ερευνήτρια Ελευθερία Καπαράκου για την πολύτιμη βοήθειά τους, τον εμπλουτισμό των γνώσεων μου και τις συμβουλές τους, που διαμόρφωσαν τον τρόπο σκέψης μου. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου γενικής χημείας και φυσικής καθώς και τα παιδιά που κάνουν την διπλωματική τους εκεί, για την αμέριστη συμπαράσταση και την άριστη συνεργασία που είχα μαζί τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια και εξακολουθεί να με στηρίζει μέχρι και σήμερα.

Φυσικοχημική μελέτη και έλεγχος αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης, αιθερίου ελαίου Βασιλικού (*Ocimum basilicum*) και των προϊόντων εγκλεισμού του, σε κυκλοδεξτρίνες

ΠΜΣ Τρόφιμα Διατροφή & Υγεία, Εξειδίκευση Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Περίληψη

Οι πτητικές ενώσεις είναι τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων και είναι αυτά που ευθύνονται για το χαρακτηριστικό άρωμα και για τα θεραπευτικά οφέλη που προσφέρει το εκάστοτε αιθέριο έλαιο. Η πτητικότητα αυτών των ενώσεων ωστόσο αποτελεί σημαντική πρόκληση για την αποθήκευση και την διατήρηση των αιθερίων ελαίων, καθώς υπάρχουν πολλοί παράγοντες, όπως η οξείδωση ή εξάτμισή τους μόλις εκτεθούν στον αέρα, που μπορεί να οδηγήσει σε σταδιακή μείωση της ποιότητας και της αποτελεσματικότητάς τους. Η ενθυλάκωση και ο εγκλεισμός των πτητικών ενώσεων των αιθερίων ελαίων σε μη δραστικά μέσα, όπως είναι οι κυκλοδεξτρίνες, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την προστασία και την βελτίωση της δράσης των ενώσεων αυτών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παραλαβή και η ανάλυση της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων δύο ποικιλιών βασιλικού (*Ocimum basilicum*), και στη συνέχεια η παρασκευή και μελέτη των προϊόντων εγκλεισμού των συστατικών αυτών των αιθερίων ελαίων σε β -κυκλοδεξτρίνη (β -CD) και υδροξυπροπυλ- β -κυκλοδεξτρίνη (HP- β -CD). Αρχικά έγινε παραλαβή αιθερίου ελαίου από ξηρή δρόγη πλατύφυλλου και σγουρού βασιλικού με υδροαπόσταξη Clevenger. Τα έλαια που παραλήφθηκαν αναλύθηκαν χρωματογραφικά με GC-MS. Ταυτοποιήθηκαν συνολικά 15 ουσίες για το έλαιο του σγουρού βασιλικού και 7 ουσίες για το έλαιο του πλατύφυλλου βασιλικού. Το κύριο συστατικό, και για τις δύο ποικιλίες, ήταν η λιναλοόλη, ενώ ανιχνεύθηκε υψηλό ποσοστό ευγενόλης στο σγουρό βασιλικό και εστραγκόλης στον πλατύφυλλο βασιλικό. Με σκοπό να ελεγχθεί η ικανότητα εγκλεισμού της λιναλοόλης, χρησιμοποιήθηκε καθαρή ουσία από το εμπόριο και παρασκευάστηκαν προϊόντα εγκλεισμού και μίγματά της με β -CD και HP- β -CD. Ο χαρακτηρισμός αυτών των προϊόντων εγκλεισμού, η εκτίμηση της υδατοδιαλυτότητας και της μέσης σταθερας σύνδεσης τους στο διάλυμα έγινε με πειράματα που απόδωσαν διαγράμματα φάσης διαλυτότητας και σύμφωνα με τη μέθοδο των Higuchi-Conners. Επιπλέον, η δομή του συμπλόκου εγκλεισμού λιναλοόλης σε β -CD προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ και αναλύθηκε εκτεταμένα η μοριακή διευσθέτηση ξενιστή-ξενιζομένου αλλά και των γειτονικών συμπλόκων στην κρυσταλλική κατάσταση. Βάσει της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου λιναλοόλης/ β -CD και της προτεινόμενης δομής από μεθόδους Μοριακού Ελλιμενισμού (Molecular Docking) του συμπλόκου λιναλοόλης/HP- β -CD, έγιναν συμπληρωματικές υπολογιστικές προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής ώστε να προκύψουν χρήσιμα συμπεράσματα που

αιτιολογούν φυσικοχημικές ιδιότητες (όπως η παρατηρούμενη χαμηλή διαλυτότητα) των συμπλόκων στο διάλυμα.

Παράλληλα παρασκευάστηκαν προϊόντα εγκλεισμού και μίγματα των αιθερίων ελαίων του βασιλικού, τα οποία μετά τη λυοφιλίωσή τους, ελέγχθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση τους συγκριτικά με τα καθαρά αιθέρια έλαια.. Από την φασματοσκοπία υπερύθρου FT – IR φάνηκε πως υπήρχαν μικρές διαφορές στα φάσματα των μιγμάτων σε σχέση με αυτά των συμπλόκων κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα πως έλαβε χώρα η συμπλοκοποίηση των κυριότερων συστατικών του βασιλικού. Οι δοκιμές αντιοξειδωτικής δράσης και ολικών φαινολικών έδειξαν πως η ποικιλία του σγουρού βασιλικού έχει βελτιωμένη δράση σε σχέση με αυτή του πλατύφυλλου, ενώ ο εγκλεισμός των ουσιών του αιθέριου ελαίου σε ορισμένες περιπτώσεις βελτιώνει ενώ σε άλλες διατηρεί την δράση των ουσιών. Τέλος, ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δραστηριότητας *in vitro* αποκάλυψε υψηλή δράση για τα καθαρά αιθέρια έλαια, αλλά μηδενική για τα προϊόντα εγκλεισμού.

Επιστημονική περιοχή: Υπερμοριακή Χημεία, Φαινόμενα Εγκλεισμού,

Αντιοξειδωτικές ουσίες, Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ, Φασματοσκοπία

Λέξεις-Κλειδιά: Βασιλικός, Λιναλοόλη, Κυκλοδεξτρίνες, Προϊόντα εγκλεισμού

Physical-chemical study and evaluation of the antioxidant and antimicrobial action of Basil (*Ocimum basilicum*) essential oil and its encapsulated products in cyclodextrins

*MSc Food Science, Nutrition & Health, Study and Utilization of Natural Products
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Chemistry*

Abstract

The volatile compounds are the main constituents of essential oils and are responsible for the characteristic aroma and therapeutic benefits of each essential oil. However, the volatility of these compounds presents a significant challenge for the storage and preservation of essential oils, as there are many factors, such as oxidation or evaporation upon exposure to air, that can lead to a gradual reduction in their quality and effectiveness. Encapsulation and trapping of the volatile compounds of essential oils in non-reactive carriers, such as cyclodextrins, are a promising strategy for protecting and improving the action of these compounds.

The aim of the present work was to obtain and analyze the chemical composition of the essential oils of two basil (*Ocimum basilicum*) cultivars, and then to prepare and study the products of the encapsulation of these essential oil constituents in β -cyclodextrin (β -CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD). Initially, essential oil was obtained from dry dew of broadleaf and curly basil by Clevenger hydrodistillation. The oils obtained were analyzed chromatographically by GC-MS. A total of 15 substances were identified for curly basil oil and 7 substances for broadleaf basil oil. The main component, for both varieties, was found to be linalool, while a high percentage of eugenol was detected in curly basil and estrangol in flat-leaf basil. To test the encapsulation ability of linalool, commercially available pure substances were used and inclusion complexes and physical mixtures of linalool with β -CD and HP- β -CD were prepared. The characterization of these inclusion complexes and the estimation of their aqueous solubility and the overall binding constant in solution, were performed by phase solubility studies according to the Higuchi-Connors method. In addition, the structure of the linalool inclusion complex in β -CD was determined by X-ray crystallography and the molecular arrangement of the guest-host within the complex as well as that of neighboring complexes in the crystal state was extensively analyzed. Based on the crystal structure of the linalool/ β -CD complex and the predicted by Molecular Docking calculations structure of the linalool/HP- β -CD complex, complementary computational Molecular Dynamics simulations were performed to draw useful conclusions that account for physicochemical properties (such as the observed low solubility) of the complexes in solution. In addition, inclusion complexes and physical mixtures of the essential oils of basil with β -CD and HP- β -CD were prepared, which after lyophilization were tested for their antioxidant and antimicrobial activity compared to pure essential oils. FT-IR spectroscopy showed that

there were slight differences in the spectra of the mixtures compared to those of the complexes, which leads to the conclusion that complexation of the main constituents of basil took place. Antioxidant and total phenolic activity tests showed that the curly basil variety has improved activity compared to the broadleaf variety, while the inclusion of the essential oil substances in some cases improves the activity of the substances and in others maintains the activity of the substances. Finally, in vitro antimicrobial activity testing revealed high activity for pure essential oils, but no activity for the encapsulation products within 12 hours.

Scientific area: Supramolecular Chemistry, Inclusion Phenomena, Macrocyclic Chemistry, Antioxidant substances, X-ray Crystallography, Spectroscopy

Keywords: Basil, Linalool, Cyclodextrins, Inclusion complexes

Συντμήσεις - Ξερόγλωσσοι όροι/Abbreviations - Glossary:

β-κυκλοδεξτρίνη	β-CD
Διμεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη	DM-β-CD
Τριμεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη	TM-β-CD
Τυχαία μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη	RM-β-CD
2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη	HP-β-CD
Λιναλόλη	lin
Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους	UV-Vis
Βασιλικός Σγουρός	ΒΣ
Βασιλικός Πλατύφυλλος	ΒΠ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Abstract	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ	2
1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΓΗ	4
1.3 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ	5
1.3.1 ΚΥΡΙΟΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ	7
1.4 ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ	10
1.5 ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ	12
1.5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ.....	12
1.5.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ	16
1.6 ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ	18
1.7 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ	21
1.8 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ	22
1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ (ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ)	25
2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	26
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ - ΥΔΡΟΑΠΟΣΤΑΞΗ CLEVENGER.....	26
2.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	28
2.3.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC).....	29
2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	29
2.4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS)	29
2.4.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR).....	31
2.5 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ	32
2.6 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ – Χ.....	33
2.6.1 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΝΟΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ	33
2.6.2 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ, ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΣΕ ΣΚΟΝΗ.....	35
2.6.2 ΣΥΛΛΟΓΗ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΘΛΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΥΣΗ ΔΟΜΗΣ.....	36
2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΦΑΣΗΣ	43
2.7.1 ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗΣ ΣΕ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ	44
2.7.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ	45

2.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	46
2.8.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΔΟΚΙΜΗ DPPH.....	47
2.8.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΔΟΚΙΜΗ ABTS.....	47
2.8.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΔΟΚΙΜΗ FOLIN CIOCALTEU	48
2.9 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ <i>IN VITRO</i>	49
2.9.1 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	50
2.9.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ	50
2.9.3 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΖΩΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	51
2.9.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ	52
2.9.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΖΩΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΜΕΘΟΔΟΣ KIRBY – BAUER.....	53
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
3.1 ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ ΜΕ ΥΔΡΟΑΠΟΣΤΑΞΗ CLEVINGER.....	55
3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΤΥΠΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (GS-MS).....	56
3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ ΣΕ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ	62
3.4 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ.....	63
3.4.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ β -ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ΜΕ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗ	63
3.4.2 ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗΣ ΜΕ β -CD ΚΑΙ HP- β -CD	66
3.4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΦΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ	71
3.4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ β -ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ΜΕ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗ ΚΑΙ ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR)	75
3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ	83
3.5.1 ΔΟΚΙΜΗ DPPH.....	83
3.5.2 ΔΟΚΙΜΗ ABTS.....	85
3.5.3 ΔΟΚΙΜΗ FOLIN CIOCALTEU	88
3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΤΟΥ	91
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	95
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	102
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	109

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ

Τα αρωματικά φυτά αποτελούν πηγή βιοενεργών συστατικών με ποικίλες φαρμακευτικές ιδιότητες και για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται από αρχαιοτάτων χρόνων στην παραδοσιακή ιατρική όπως επίσης και στον τομέα των τροφίμων και των καλλυντικών [1]. Πλέον υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την χρήση τους στην θεραπεία ασθενειών για τις οποίες τα συνθετικά αντιβιοτικά γίνονται όλο και λιγότερο αποτελεσματικά, ή στη βιομηχανία των τροφίμων, για την συντήρησή τους έναντι της οξείδωσης, ως εναλλακτικά των χημικών συντηρητικών [2].

Ανάμεσα στα είδη φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (πάνω από 3000 είδη) βρίσκεται και το φυτό του γένους *Ocimum*, συλλογικά γνωστό ως βασιλικός, ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*, στην υποοικογένεια *Narretoidase* και είναι γνωστό από την αρχαιότητα για τις πλούσιες φαρμακολογικές του ιδιότητες [1]. Στο γένος *Ocimum* συγκαταλέγονται 65 ταξινομικά αποδεκτά είδη τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία. Τα πιο γνωστά όμως και ευρέως διαδεδομένα ανά τον κόσμο είναι ο *O. sanctum*, γνωστός και ως ιερός βασιλικός, ο *O. gratissimum*, ως βασιλικός του γαρύφαλλου ή αφρικάνικος βασιλικός, ο *O. kilimandscharicum* ή βασιλικός της καμφοράς, ο *O. americanum*, ως αμερικάνικος βασιλικός και ο *O. basilicum*, γνωστός και ως γλυκός βασιλικός (sweet basil) που είναι και το πιο κοινό είδος στην ευρωπαϊκή ήπειρο [3] και το είδος που θα μελετηθεί στην παρούσα εργασία.

Ο γλυκός βασιλικός είναι ένα κοινό βότανο που ανήκει στην ίδια οικογένεια με την μέντα και είναι γνωστό σε όλες τις κουζίνες ανά τον κόσμο παρ' όλες τις διαφορές τους. Έχει χαρακτηριστική γλυκιά, αρωματική γεύση, η οποία πολλές φορές παρομοιάζει αυτή του γλυκάνισου και ανάλογα με την ποικιλία μπορεί να αλλάζει, χρησιμοποιείται σε διάφορα πιάτα, όπως σάλτσες ζυμαρικών, σούπες και σαλάτες. Χρησιμοποιείται επίσης σε ορισμένες πρακτικές της παραδοσιακής ιατρικής για τα πιθανά οφέλη του στην υγεία. Σαν φυτό είναι ενδημικό στην τροπική ζώνη της Ασίας και στην κεντρική Αφρική και Αμερική, ωστόσο πλέον έχει εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο και καλλιεργείται ευρέως σε γλάστρες και σε κήπους στην Ευρώπη, τη νοτιοδυτική Ασία και την Αμερική [4]. Λόγο της μεγάλης του χρήσης, υπάρχουν πολλές ποικιλίες βασιλικού όπως και διάφορα υβρίδια. Οι περισσότερες όμως εμπορικά διαθέσιμες ποικιλίες βασιλικού είναι του γλυκού βασιλικού, καθώς υπάρχουν πάνω από 160 κατονομασμένες ποικιλίες διαθέσιμες, με καινούργιες να εμφανίζονται κάθε χρόνο. Η κυριότερη ποικιλία που αναφέρεται ως γλυκός βασιλικός (Sweet Basil) είναι ο πλατύφυλλος βασιλικός, οποίος χρησιμοποιείται κατά κόρον στα ιταλικά φαγητά, ενώ μια άλλη σημαντική ποικιλία του *Ocimum basilicum* χαρακτηριστική του Ελληνικού τοπίου είναι ο μικρόφυλλος ή σγουρός βασιλικός (Εικόνα 1). Άλλες συχνά χρησιμοποιούμενες ποικιλίες στην Μεσόγειο είναι οι: "Genovese", "Purple Ruffles", "Mammoth", "Cinnamon", "Lemon", "Globe" και η "African Blue" [5][6].

Ο βασιλικός μπορεί να είναι είτε ετήσιο είτε πολυετές φυτό που καλλιεργείται κυρίως για τα φύλλα και τα άνθη του. Το ύψος των φυτών μπορεί να φτάσει από 30 έως 150 εκατοστά, ανάλογα με την ποικιλία [7]. Τα φύλλα του είναι ωοειδή, λεία και συνήθως έχουν σκούρο πράσινο χρώμα αλλά ποικίλλουν σε μέγεθος και σχήμα ανάλογα με την ποικιλία[6]. Είναι τοποθετημένα αντίθετα στο στέλεχος και συχνά είναι ελαφρώς μυτερά στην άκρη. Τα μεγέθη των φύλλων κυμαίνονται από 3 έως 11 εκατοστά μήκος και 1 έως 6 εκατοστά πλάτος. Το ριζικό σύστημα του βασιλικού είναι μικρό και αποτελείται από μία κεντρική ρίζα επομένως είναι κατάλληλο για καλλιέργεια σε γλάστρες ή ρηγά εδάφη, ενώ τα άνθη του είναι μικρά και λευκά ή μοβ και αναπτύσσονται από μια κεντρική ταξιανθία, ή ακίδα, που αναδύεται από τον κεντρικό βλαστό του φυτού. Τα άνθη είναι αμφίπλευρα συμμετρικά και έχουν τέσσερα πέταλα. ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό του βασιλικού που το διαφοροποιεί από τα άλλα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* είναι πώς στο άνθος οι τέσσερις στήμονες και ο ύπερος δεν σπρώχνονται κάτω από το άνω χείλος της στεφάνης, αλλά βρίσκονται πάνω από το κάτω χείλος. Μετά την εντομοφιλική επικονίαση, η στεφάνη πέφτει και τέσσερις στρογγυλές αχένες αναπτύσσονται μέσα στον δίοβο κάλυκα. Με το τέλος της ανθοφορίας εμφανίζονται οι σπόροι, οι οποίοι είναι μικροί μαύροι και ελαφρώς με επίμηκες σχήμα, ενώ το μέγεθός τους δεν ξεπερνάει το 1 χιλιοστό. Συνολικά, ο βασιλικός έχει μια χαρακτηριστική εμφάνιση που τον καθιστά εύκολο να αναγνωριστεί, ειδικά όταν είναι πλήρως ώριμος και σε κατάσταση ανθοφορίας.



Εικόνα 1: Διαφοροποίηση σε ποικιλίες Βασιλικού (*Ocimum basilicum*). (A) Σγουρός Βασιλικός με μικρά φύλλα που σχηματίζουν ένα συμπαγή θάμνο χαρακτηριστικό καλλωπιστικό φυτό της Ελληνικής αγοράς. (B) Γλυκός Βασιλικός (*Sweet Basil*) πολύ κοινή ποικιλία του είδους *Ocimum basilicum* με μεγάλα πλατιά φύλλα, χρησιμοποιείται στην μαγειρική για το χαρακτηριστικό του άρωμα και γεύση και κυρίως στην ιταλική κουζίνα.

1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΓΗ

Ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*) είναι οικονομικά από τα πιο σημαντικά αρωματικά βότανα της οικογένειας Lamiales, λόγω της πολύ διαδομένης χρήσης του σε πολλές κουζίνες σαν φρέσκο ή ξηρό μπαχαρικό, καθώς και για το αιθέριο έλαιό του που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα και επίσης στα καλλυντικά, τα αρώματα και την αρωματοθεραπεία. Επομένως η καλλιέργεια του βασιλικού μπορεί να είναι ένα κερδοφόρο εγχείρημα αν γίνει με τις σωστές τεχνικές και την σωστή αναζήτηση αγοράς [8].

Ο βασιλικός καλλιεργείται στην Ευρώπη ως βραχύβια ετήσια καλλιέργεια. Πρόκειται για ένα πολύ ευαίσθητο φυτό στις χαμηλές θερμοκρασίες και επομένως οι φυτείες εγκαθίστανται συχνά σε θερμοκήπια και φυτώρια όπου γίνεται η εκβλάστησή και η εκτροφή των φυτών και στη συνέχεια η μεταφύτευσή τους στον αγρό, η οποία πραγματοποιείται συνήθως το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Μαΐου [9]. Το φυτό είναι επίσης ευαίσθητο στο στρες του νερού και απαιτείται σταθερή παροχή νερού ειδικά στα πρώτα στάδια ανάπτυξης για την απόκτηση υψηλής ποιότητας φυτικού υλικού [10]. Εντούτοις, η ενταταμένη άρδευση, ιδίως μέσω ψεκαστήρων, μπορεί να προκαλέσει ορισμένες επικίνδυνες ασθένειες με αποτέλεσμα την μείωση της περιεκτικότητας του αιθέριου ελαίου. Ο βασιλικός, όπως και άλλα αρωματικά φυτά που εκτρέφονται για τη νωπή δρόγη τους, καλλιεργούνται κυρίως σε ένα σύστημα συμβατικής παραγωγής, συμπεριλαμβανομένης της υδροπονίας. Σε τέτοιου είδους παραγωγή, η εφαρμογή φυτοφαρμάκων κατά κοινών παθογόνων του εδάφους, όπως *Rhizium*, *Alternaria*, και *Rhizoctonia*, που προκαλούν σήψη των ριζών, ή άλλων μυκήτων που συνδέονται με την υψηλή υγρασία του αέρα, όπως ο *Botrytis*, είναι απαραίτητη [11]. Παρόλο που η καλλιέργεια βασιλικού σε θερμοκήπιο ή σε ελεγχόμενο περιβάλλον μπορεί να βοηθήσει στην παράταση της καλλιεργητικής περιόδου και στη βελτίωση των αποδόσεων. Η χρήση φυτοφαρμάκων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία επιβλαβών υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων πάνω στο φυτό [12].

Η καλλιέργεια των φυτών βασιλικού σαν βιολογική παραγωγή έξω στον αγρό φαίνεται να είναι μια πιο επιθυμητή προσέγγιση ιδιαίτερα στις νότιες χώρες της Ευρώπης που το μεσογειακό κλίμα το επιτρέπει. Για εκτροφή σε μεγαλύτερη κλίμακα τόσο για φρέσκα και ξηρά βότανα, το φυτό μπορεί να καλλιεργηθεί σε ανοιχτό χωράφι, γεγονός που καθιστά την παραγωγή φθηνότερη. Τα πλεονεκτήματα αυτής της παραγωγής περιλαμβάνουν τη δυνατότητα καλλιέργειας φυτών σε τεράστιες εκτάσεις, την εύκολη εφαρμογή λιπασμάτων ή άρδευσης και απλή, μηχανική συγκομιδή. Από την άλλη πλευρά, σε τέτοιες συνθήκες, είναι αδύνατον να ελεγχθούν περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η ποιότητα του φωτός, ο άνεμος ή η θερμοκρασία. Για τον λόγο αυτό προκειμένου να παραχθούν φυτά υψηλής ποιότητας σε αιθέριο έλαιο καθώς και για την εφαρμογή βιολογικής καλλιέργειας απαλλαγμένων από φυτοφάρμακα υπάρχει η τάση να καλλιεργούνται αρωματικά φυτά σε τεχνητά θερμοκήπια από φύλλα αλουμινίου στον αγρό και τα οποία προσφέρουν ένα ελεγχόμενο περιβάλλον. Σύμφωνα με έρευνα

[9] η καλλιέργεια φυτών βασιλικού σε τέτοιου είδους εγκαταστάσεις προσφέρουν σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις στην παραγωγή.

Ο βασιλικός είναι ένα δημοφιλές βότανο στην Ελλάδα λόγω της κουλτούρας και της σημαντικότητας που έχει στην θρησκεία του Χριστιανισμού [13] και καλλιεργείται στη χώρα εδώ και αιώνες. Το θερμό μεσογειακό κλίμα της Ελλάδας, ευνοεί την ανάπτυξη του βασιλικού, γεγονός που την καθιστά ιδανική τοποθεσία για την καλλιέργειά του. Ο βασιλικός απαιτεί άφθονο ηλιακό φως και ζεστές θερμοκρασίες και αναπτύσσεται καλά σε καλά στραγγιζόμενα εδάφη. Το κλίμα της Ελλάδας με ζεστά και ξηρά καλοκαίρια και τους ήπιους, υγρούς χειμώνες, παρέχει ένα ιδανικό περιβάλλον. Είναι σημαντικό ωστόσο το τακτικό πότισμα, ιδίως κατά τη διάρκεια του ζεστού καιρού, για να διατηρείται το έδαφος υγρό. Εντούτοις, πρέπει να αποφεύγεται το υπερβολικό πότισμα, λόγω ανάπτυξης παθογόνων που μπορεί να προκαλέσουν σήψη των ριζών. Υπάρχουν διάφορες ποικιλίες βασιλικού που μπορούν να καλλιεργηθούν στην Ελλάδα, όπως ο Genovese, ο γλυκός βασιλικός, ο σγουρός, ο οποίος ως καλλωπιστικό φυτό συναντάται σε πολλές τοπικές αγορές, ο Sweet Thai, ο Lemon και ο Purple Basil. Στην Ελλάδα η συγκομιδή του βασιλικού γίνεται κυρίως κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, όταν το φυτό βρίσκεται σε πλήρη ανάπτυξη. Τα φύλλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν φρέσκα ή μπορούν να αποξηραθούν για μεταγενέστερη χρήση στο μαγείρεμα. Με το ιδανικό κλίμα και τις κατάλληλες εδαφικές συνθήκες, η Ελλάδα είναι μια προνομιακή τοποθεσία για την καλλιέργεια βασιλικού [14].

1.3 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ

Οι φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί προκειμένου να προστατευτούν από τους κινδύνους που ενέχει το περιβάλλον τους αλλά και να ανταπεξέλθουν στις συνθήκες που επικρατούν σε αυτό έχουν αναπτύξει ένα βιοχημικό οπλοστάσιο από ενώσεις που ονομάζονται δευτερογενείς μεταβολίτες. Πρόκειται για χημικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που δεν εμπλέκονται στις πρωτογενείς διαδικασίες του οργανισμού όπως οι πρωτογενείς μεταβολίτες και κατά συνέπεια δεν είναι άμεσα απαραίτητες για την ανάπτυξή τους. Η απουσία τους επομένως δεν προκαλεί τον θάνατο, ωστόσο μπορεί να προκαλέσει μακροπρόθεσμη βλάβη ή διαφοροποίηση στον φαινότυπο του οργανισμού [15]. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες χαρακτηρίζονται από μεγάλη γενετική ποικιλότητα και διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος του οργανισμού (φυτό ή ζώο) καθώς και, ανάλογα τον ιστό στον οποίο θα παραχθούν. Η παραγωγή τέτοιων προϊόντων στα φυτά είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε σχέση με τους υπόλοιπους οργανισμούς καθώς δεν διαθέτουν την ικανότητα της κίνησης και επομένως οι επιδράσεις από το περιβάλλον τους είναι περισσότερες [16]. Έτσι υπάρχουν δευτερογενείς μεταβολίτες που συμμετέχουν στην άμυνα του φυτού απέναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς για το φυτό αλλά και στην αποτροπή φυτοφάγων ζώων. Δεδομένου αυτού οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται κυρίως σε ιστούς των φυτών οι οποίοι είναι περισσότερο εκτεθειμένοι στο περιβάλλον. Ως γραμμή άμυνας απέναντι σε μικρόβια και

παράσιτα, αλλά επίσης για την σηματοδότηση αλλαγών του περιβάλλοντος και επομένως συμβάλλουν στην επικοινωνία του φυτού με το περιβάλλον του. Λόγο της μεγάλης βιολογικής σημασίας που έχουν για τον άνθρωπο, αντιμικροβιακές ιδιότητες, αντικαρκινικές ιδιότητες, αναστολή ενζύμων, αποτελούν μεγάλο κομμάτι της φαρμακολογικής έρευνας. Επίσης λόγω των επιφανειοδραστικών και γαλακτωματοποιητικών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται ευρύτατα στο τομέα των τροφίμων και των καλλυντικών [17][18].

Ο βασιλικός περιέχει διάφορους τέτοιους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι συντίθενται από τα φυτά για συγκεκριμένες λειτουργίες, χρησιμοποιώντας διάφορες δευτερογενείς μεταβολικές οδούς. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες του βασιλικού οι οποίοι αποτελούν και τα βιοενεργά συστατικά του συνήθως συλλέγονται από τα φύλλα και τις ανθισμένες κορυφές των φυτών [19]. Οι πιο κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες που παραλαμβάνουμε από τον βασιλικό, αλλά και ως επί το πλείστον από τα περισσότερα αρωματικά φυτά, είναι τα πτητικά συστατικά των αιθέριων ελαίων τους με την διαδικασία της απόσταξης. Ο βασιλικός περιέχει αιθέρια έλαια που του δίνουν το χαρακτηριστικό άρωμα και τη γεύση του. Τα αιθέρια έλαια που αποστάζονται από διάφορες ποικιλίες βασιλικού μπορεί να περιέχουν αλκοόλες, ένα κύριο συστατικό είναι η Λιναλόλη, τα οξείδια, όπως η 1,8-Κινεόλη, φαινόλες, που περιλαμβάνουν την Ευγενόλη, την μεθυλο Ευγενόλη, την Μεθυλο ισοευγενόλη και την θυμόλη, οι εστέρες όπως ο κινναμικός μεθυλεστέρας και αλδεΐδες όπως η κιτράλη και καμφορά. Υπεύθυνα για το ξεχωριστό άρωμα του βασιλικού είναι η 1,8-Κινεόλη, ο κινναμικός μεθυλεστέρας η μεθυλ Καβικόλη (Εστραγκόλη) και η Λιναλόλη [20][21]. Ωστόσο τα πτητικά συστατικά που χαρακτηρίζουν το αιθέριο έλαιο του βασιλικού διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία και την γενετική και ρυθμιστική ικανότητα της κάθε ποικιλίας να παράγει διαφορετικά σύνολα αυτών των χημικών συστατικών. Το αιθέριο έλαιο βασιλικού έχει ταξινομηθεί σε τέσσερις χημειότυπους ανάλογα με τη χημική του σύνθεση και τη γεωγραφική του προέλευση. Ο ευρωπαϊκός τύπος, που καλλιεργείται στην Ευρώπη, τις ΗΠΑ και την Αφρική, περιλαμβάνει Λιναλόλη και μεθυλ Καβικόλη ως κύρια συστατικά του ελαίου. Ο τύπος Reunion, που βρίσκεται στις Κομόρες και στις Σεϋχέλλες, στην Αφρική και στη νήσο Reunion, χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση σε μεθυλ Καβικόλη. Ο τροπικός τύπος που προέρχεται από την Ινδία, το Πακιστάν, τη Γουατεμάλα, την Αϊτή και την Αφρική είναι πλούσιος σε κινναμικό μεθυλεστέρα. Ενώ τέλος ο χημειότυπος, με κύριο συστατικό την Ευγενόλη, είναι κοινός στη Βόρεια Αφρική, Ρωσία, την Ανατολική Ευρώπη και τμήματα της Ασίας[6][22].

Εκτός από τα συστατικά του αιθέριου ελαίου του ο βασιλικός περιέχει και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες που προσφέρουν πολλά οφέλη. Κάποια συστατικά που χαρακτηρίζουν τους δευτερογενείς μεταβολίτες του βασιλικού είναι το ροσμαρινικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το κιχωρικό οξύ, συστατικά με πλούσια αντιοξειδωτική ικανότητα που ανήκουν στις φαινολικές ενώσεις του φυτού. Τα φλαβονοειδή είναι επίσης μια κατηγορία που περιέχονται στον βασιλικό με κύριες ουσίες την απιγκενίνη, την κερκετίνη και την καεμπφερόλη. Αυτές οι ενώσεις έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και μπορεί επίσης να έχουν πιθανά οφέλη για την υγεία. Ο

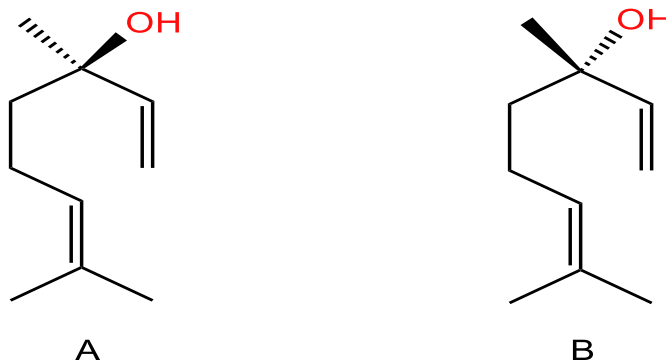
βασιλικός περιέχει επίσης τριτερπενοειδή όπως το ουρσολικό οξύ και το ολεανολικό οξύ. Οι ενώσεις αυτές έχουν αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μπορεί να έχουν πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές. Ο βασιλικός περιλαμβάνει επίσης μικρές ποσότητες αλκαλοειδών όπως η τρυπταμίνη και η σεροτονίνη. Αυτές οι ενώσεις επιδρούν σε φυσιολογικές διεργασίες του φυτού και μπορεί να συμβάλλουν στην άμυνα του έναντι φυτοφάγων και παθογόνων οργανισμών [23].

1.3.1 ΚΥΡΙΟΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ

Οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες του βασιλικού είναι τα συστατικά που βρίσκονται στο αιθέριο έλαιο του φυτού. Είναι τα βιοενεργά συστατικά που βρίσκονται στην μεγαλύτερη περιεκτικότητα μέσα στον βασιλικό και είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό άρωμα και την γεύση του βασιλικού, καθώς επίσης και για τις περισσότερες θεραπευτικές ιδιότητές του.

ΛΙΝΑΛΟΟΛΗ

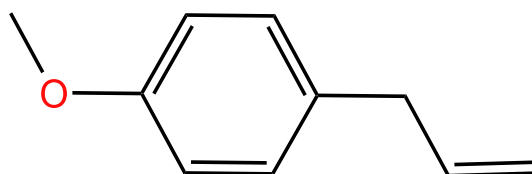
Η λιναλόλη με ονομασία κατά IUPAC (3,7-διμεθυλ-1,6-οκταδιεν-3-όλη) είναι μια μονοτερπενική αλκοόλη με χαρακτηριστικό άρωμα που συναντάται σε πολλά λουλούδια, παράγεται από το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος και μπορεί να συντεθεί χημικά από το α , β Πινένιο ή από άλλα τερπένια όπως η γερανιόλη, η νερόλη, το μυρκένιο ή μέσω της οδού της 2-μεθυλ-2-επτεν-6-όνης. Η Λιναλόλη είναι ένα άχρωμο υγρό, σχετικά διαλυτό στο νερό (1590 mg/L στους 25 °C) και πολύ διαλυτό σε διάφορους οργανικούς διαλύτες. Αυτή η τριτοταγής τερπενική αλκοόλη έχει ένα χειρικό κέντρο στον άνθρακα C3, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται σε δύο εναντιομερείς μορφές στη φύση: (S)-λιναλόλη και (R)-λιναλόλη. Η επικρατούσα ωστόσο μορφή στο βασιλικό είναι το (R) – εναντιομερές της λιναλόλης όπως και στα περισσότερα φυτά που παράγουν λιναλόλη [24][25].



Εικόνα 2: Χημική δομή της λιναλόλης A) R - εναντιομερές B) S – εναντιομερές

ΜΕΘΥΛ ΚΑΒΙΚΟΛΗ (ΕΣΤΡΑΓΚΟΛΗ)

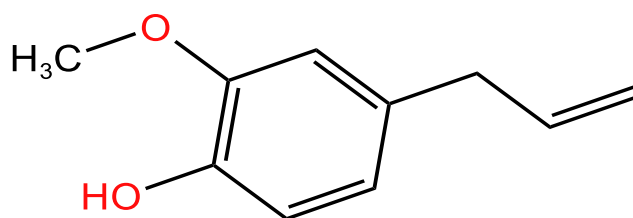
Η μεθυλ Καβικόλη ή κατά IUPAC [2-(5-μεθυλ-2-προπαν-2-υλκυκλοεξυλ)-4-προπ-2-ενυλφαινόλη] όπως και ένα άλλο παράγωγο του αιθερίου ελαίου του βασιλικού η μεθυλ ευγενόλη είναι φαινυλοπροπανοειδή που παράγονται από την οδό του σικιμικού οξέος. Πρόκειται για άχρωμη ουσία σχετικά αδιάλυτη στο νερό (3mg/L στους 25°C), αλλά είναι περισσότερο διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες όπως η αιθανόλη, ο αιθέρας και το χλωροφόρμιο. Προσδίδει στον βασιλικό το γλυκό, πικάντικο άρωμα, παρόμοιο με γλυκάνισο ή γλυκόριζα. Η εστραγκόλη χρησιμοποιείται ως αρωματικός παράγοντας σε τρόφιμα και ποτά, ιδίως σε προϊόντα με άρωμα γλυκόριζας, ενώ επίσης αναφέρεται ότι είναι ιδιαίτερα τοξική για τα έντομα και τα μικρόβια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας σε διάφορα σκευάσματα. Ωστόσο, είναι επίσης γνωστό ότι ενέχει πιθανούς κινδύνους για την υγεία. Μελέτες έχουν δείξει ότι η εστραγκόλη μπορεί να είναι καρκινογόνος και γενετοξική, δηλαδή μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA. Λόγω των πιθανών κινδύνων για την υγεία, η χρήση της σε τρόφιμα και ποτά έχει απαγορευτεί ή περιοριστεί σε ορισμένες χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Από την άλλη πλευρά ο βασιλικός ως φυσική πηγή μεθυλ Καβικόλης περιέχει σχετικά χαμηλά επίπεδα της ένωσης και γενικά δεν θεωρείται ότι αποτελεί κίνδυνο για την υγεία όταν καταναλώνεται με μέτρο [19][26].



Εικόνα 3: Χημική δομή εστραγκόλης

ΕΥΓΕΝΟΛΗ

Η ευγενόλη με ονομασία κατά IUPAC (2-μεθοξυ-4-προπ-2-ενυλφαινόλη) είναι ένα βασικό συστατικό ορισμένων ποικιλιών βασιλικού, τα φύλλα και τα άνθη του φυτού, περιέχουν συνήθως σημαντικές ποσότητες ευγενόλης, όπως και τα υπόλοιπα συστατικά του βασιλικού η ποσότητα ευγενόλης στο αιθέριο έλαιο μπορεί να διαφέρει ανάλογα με διάφορους παράγοντες, όπως το είδος του βασιλικού, τις συνθήκες καλλιέργειας και τις μεθόδους συγκομιδής. Όπως και η εστραγκόλη ανήκει στην ομάδα των φαινυλοπροπανοϊδών και πρόκειται για ένα διαυγές έως ανοιχτό κίτρινο ελαιώδες υγρό που έχει πικάντικη, οσμή και γεύση παρόμοια με αυτή του γαρύφαλλου. Η ευγενόλη έχει περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό, αλλά είναι διαλυτή σε πολλούς οργανικούς διαλύτες. Η διαλυτότητα της ευγενόλης στο νερό είναι περίπου 30 mg/L σε θερμοκρασία δωματίου, πράγμα που σημαίνει ότι είναι σχετικά αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα. Η ευγενόλη θεωρείται περισσότερο διαλυτή σε πολικούς οργανικούς διαλύτες από ό,τι σε μη πολικούς διαλύτες λόγω των πολικών λειτουργικών ομάδων, όπως η ομάδα υδροξυλίου (-OH) και η μεθοξυομάδα (-OCH₃) που διαθέτει. Η ευγενόλη βρίσκεται εφαρμογή συνήθως ως αρωματικός παράγοντας σε τρόφιμα και ποτά και ως άρωμα σε αρώματα και καλλυντικά. Εκτός από τη χρήση της σε αρωματικές ύλες και αρώματα, η ευγενόλη χρησιμοποιείται επίσης για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες. Έχει αντισηπτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και αξιοποιείται συχνά ως αναλγητικό για την ανακούφιση του πόνου. Ενώ ακόμα χρησιμοποιείται ως τοπικό αναισθητικό και αποτελεί κοινό συστατικό σε οδοντιατρικά προϊόντα, όπως σε οδοντόκρεμα και στοματικά διαλύματα [27][28].



Εικόνα 4: Χημική δομή ευγενόλης

1.4 ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ ΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ

Ο γλυκός βασιλικός (*Ocimum basilicum*) θεωρείται ότι έχει πολλά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου και χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα στην παραδοσιακή ιατρική για τις διάφορες φαρμακολογικές του ιδιότητες. Όπως αναφέρθηκε υπεύθυνοι για τις θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού είναι ορισμένοι βασικοί δευτερογενείς μεταβολίτες του, οι οποίοι χάρη στις φυσικοχημικές ιδιότητες που τους χαρακτηρίζουν προσδίδουν στο βασιλικό ορισμένες ιδιότητες όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές, με σημαντικά οφέλη για τον άνθρωπο.

Η λιναλόολη ως το κύριο βιοενεργό συστατικό πολλών ποικιλιών του βασιλικού έχει μεγάλη συνεισφορά στην βιολογική δραστηριότητα του φυτού ως αντιμικροβιακός, αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτικός παράγοντας, ενώ συμμετέχει και στην αντιμετώπιση της λειψμανίας. Σε σχέση με την αντιμικροβιακή δράση της Λιναλόολης και λόγω της δομής της αλειφατικής αλκοόλης, έχει παρατηρηθεί η ικανότητά της να δεσμεύεται σε διαφορετικές μοριακές δομές, όπως πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες, χαρακτηριστικό της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων. Ως εκ τούτου, η λιναλόολη έχει υψηλή συγγένεια με τις κυτταρικές μεμβράνες και υψηλή δυνατότητα διείσδυσης μέσα από τα τοιχώματα, διευκολύνοντας την διαρροή κυτταροπλασματικού υλικού από το κύτταρο, με αποτέλεσμα τον θάνατο των μικροβίων [29]. Ως αντιφλεγμονώδες η λιναλόολη φαίνεται να λειτουργεί μειώνοντας τα επίπεδα των προ φλεγμονωδών κυτταροκινών στο σώμα[25]. Ακόμα ρυθμίζει τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών όπως η σεροτονίνη και το GABA στον εγκέφαλο, τα οποία μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση του άγχους λειτουργώντας έτσι ως αγχολυτικό[30]. Τέλος σε έρευνες που έγιναν, αποδείχθηκε πως η Λιναλόολη έχει νευροπροστατευτικά αποτελέσματα καθώς μειώνει το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή στον εγκέφαλο, γεγονός που μπορεί να συμβάλει στην προστασία από νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson [31].

Στην αντιφλεγμονώδη δράση του βασιλικού βοηθάνε επίσης οι δραστικές ουσίες της ευγενόλης και του ροσμαρινικού οξέος Η ευγενόλη είναι μια φαινολική ένωση που έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την παραγωγή προ φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-α). Αυτές οι κυτταροκίνες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη φλεγμονώδη απόκριση του σώματος και συχνά είναι αυξημένες σε καταστάσεις όπως η αρθρίτιδα και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Παράλληλα το ροσμαρινικό οξύ ως μια πολυφαινόλη που έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδη δράση, λειτουργεί αναστέλλοντας τη δραστηριότητα ενζύμων όπως η κυκλοοξυγενάση (COX) και η λιποξυγενάση (LOX) που εμπλέκονται στην παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια [32]. Αναστέλλοντας την παραγωγή αυτών των μεσολαβητών, η ευγενόλη και το ροσμαρινικό οξύ συμβάλλουν στη μείωση της φλεγμονής και στην ανακούφιση του πόνου και των συμπτωμάτων .

Τόσο η ευγενόλη όσο και το ροσμαρινικό οξύ έχουν επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες συμβάλλουν στην προστασία του οργανισμού από το οξειδωτικό στρες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο ο βασιλικός περιέχει και άλλα βιοενεργά συστατικά που η συνεργιστική δράση όλων συμβάλει στην αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτού. Όπως έχει αναφερθεί ο βασιλικός περιέχει αρκετές φαινολικές ουσίες πέραν του ροσμαρινικού οξέος, όπως το καφεϊκό οξύ και η ρουτίνη. Ο βασιλικός περιέχει επίσης φλαβονοειδή, όπως η οριεντίνη, η βικενίνη και η απιγκενίνη. Ενώ σημαντική συνεισφορά έχουν και τα άλλα συστατικά του αιθερίου ελαίου του φυτού όπως η λιναλόολη και η εστραγκόλη. Αυτές οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που περιέχονται στον βασιλικό μπορούν να βοηθήσουν στην πρόληψη των βλαβών στα κύτταρα και τους ιστούς που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες είναι εξαιρετικά αντιδραστικά μόρια που μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες και να συμβάλουν στην ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιακές παθήσεις και η νόσος του Alzheimer. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του βασιλικού μπορούν επίσης να βοηθήσουν στην επιβράδυνση της διαδικασίας γήρανσης και στη βελτίωση της συνολικής υγείας και της ευεξίας του σώματος.

Η ευγενόλη, το ροσμαρινικό οξύ και η απιγκενίνη του βασιλικού θεωρείται επίσης, ότι συμβάλλουν στις αντικαρκινικές επιδράσεις του φυτού. Αυτές οι ενώσεις του βασιλικού έχουν αποδειχθεί ότι έχουν αντικαρκινική δράση σε μελέτες σε ζώα και κύτταρα. Μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και να προκαλέσουν απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερες έρευνες για να προσδιοριστούν οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί με τους οποίους οι ενώσεις αυτές ασκούν τις αντικαρκινικές τους επιδράσεις και να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητά τους στον άνθρωπο. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι ενώ ο βασιλικός μπορεί να έχει πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο των συμβατικών φαρμάκων για την θεραπεία του καρκίνου.

Η πλούσια θεραπευτική δράση του βασιλικού δεν είναι αποτέλεσμα της μεμονωμένης δράσης αυτών των βιοενεργών συστατικών του αλλά αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης τους, που δρώντας συνεργιστικά ενισχύσουν τις συνολικές φαρμακολογικές ιδιότητες του βασιλικού. Για παράδειγμα, έρευνες έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός του ροσμαρινικού οξέος και της λιναλόολης στον βασιλικό είχε μεγαλύτερη αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση από ό,τι κάθε ένωση μόνη της. Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ότι ο συνδυασμός ευκαλυπτόλης και καμφοράς στον βασιλικό είχε συνεργιστικές αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές δράσεις. Η συνεργιστική δράση των χημικών ενώσεων του βασιλικού μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά τους να δρουν σε διαφορετικούς μοριακούς στόχους στο σώμα. Για παράδειγμα, ορισμένες ενώσεις μπορεί να δρουν σε μονοπάτια φλεγμονής, ενώ άλλες μπορεί να δρουν στο νευρικό σύστημα ή στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Επιπλέον, οι διάφορες χημικές ενώσεις του βασιλικού μπορεί να συνεργάζονται μεταξύ τους για να αυξήσουν την απορρόφηση και τη βιοδιαθεσιμότητα η μία της άλλης. Για παράδειγμα, μια μελέτη διαπίστωσε ότι η παρουσία ευγενόλης στον βασιλικό βελτίωσε την απορρόφηση και τη βιοδιαθεσιμότητα του ροσμαρινικού οξέος. Συνολικά, η συνεργιστική δράση των χημικών ενώσεων του βασιλικού μπορεί να ενισχύσει τις συνολικές φαρμακολογικές του ιδιότητες και να προσφέρει μεγαλύτερα οφέλη για την υγεία [33][34]. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο η κατανάλωση ολόκληρων φύλλων βασιλικού ή η χρήση βασιλικού στο μαγείρεμα ή σε παρασκευάσματα βοτάνων μπορεί να είναι πιο ευεργετική από τη λήψη απομονωμένων ενώσεων σε μορφή συμπληρώματος [35].

1.5 ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

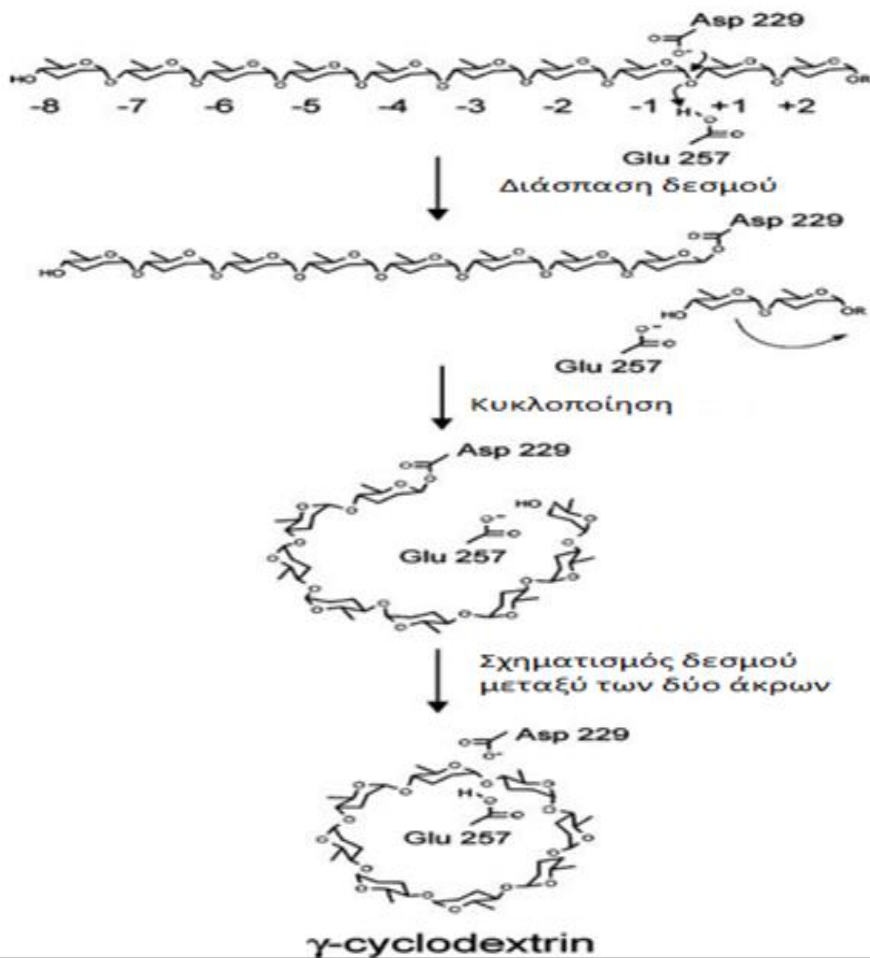
Ένα βασικό μειονέκτημα που σχετίζεται με τα αιθέρια έλαια είναι πως τις περισσότερες φορές τα βιοενεργά συστατικά που τα αποτελούν, είναι πολύ δραστικές ουσίες οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στον ανθρώπινο οργανισμό με την απευθείας εφαρμογή τους ως φαρμακευτικά προϊόντα. Η λιναλόλη ως κύριο συστατικό του γλυκού βασιλικού αποτελεί μια τέτοια ουσία και προκαλεί ερεθισμούς στο δέρμα και τα μάτια, βήχα, πόνο, πνιγμό και αναπνευστικές δυσκολίες. Το πρόβλημα αυτό θα μπορούσε να επιλυθεί με τον μοριακό εγκλεισμό της σε κυκλοδεξτρίνες (CDs). Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη βιομηχανία τροφίμων για τη βελτίωση της σταθερότητας και της βιωσιμότητας των αιθέριων ελαίων [36].

1.5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι κυκλικά πολυμερή σάκχαρα ικανά να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με πλήθος κατάλληλων μορίων, καθώς διαθέτουν υδρόφοβη κοιλότητα που μπορεί να παγιδεύσει ορισμένα συστατικά των αιθέριων ελαίων και υδρόφιλη επιφάνεια, που τα καθιστά διαλυτά στο νερό. Αυτή η μοναδική ιδιότητα των CDs διέπεται από μια σταθερά ισορροπίας (K_c) και παρέχει πολλές εφαρμογές ενδιαφέροντος στη φαρμακευτική, τη βιομηχανία τροφίμων ή την αναλυτική χημεία [36]. Ως πολυμερή σάκχαρα, αποτελούνται από μόρια α -D γλυκόζης που συνδέονται με 1-4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων C1 και O4 των γειτονικών μορίων γλυκόζης.

Πιο συγκεκριμένα οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι ημι-φυσικά προϊόντα, παραγόμενες από ένα ανανεώσιμο φυσικό υλικό, το άμυλο. Πρόκειται για προϊόντα που η παραγωγή τους είναι σχετικά απλή και φιλική προς το περιβάλλον και γίνεται μέσω ενζυματικής διάσπασης του αμύλου από βακτηριακά ένζυμα τις γλυκοτρανσφεράσες, οι οποίες παράγονται κυρίως από στελέχη του βακίλου *Bacillus macerans*, *Alcaliphilic bacilli*, αλλά και από άλλους μικροοργανισμούς [37]. Για τον λόγο αυτό παράγονται σε χιλιάδες τόνους ανά έτος, ενώ η τιμή τους έχει κατέβει σε επίπεδα αποδεκτά για τους περισσότερους βιομηχανικούς σκοπούς. Οι τοξικές επιδράσεις τους είναι αμελητέες και

ως εκ τούτου μπορούν να καταναλωθούν από τους ανθρώπους ως συστατικά φαρμάκων, τροφίμων ή καλλυντικών [38][39].

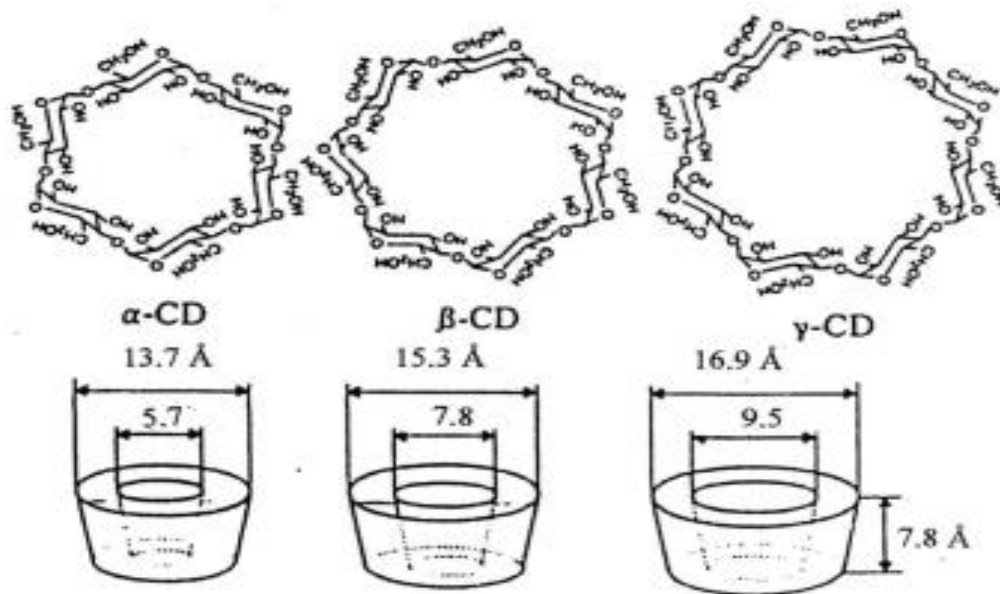


Εικόνα 5: Η ενζυματική διάσπαση του αμύλου από τα ένζυμα γλυκοζοτρανσφεράσες (ένζυμα τύπου αμυλάσης), περιλαμβάνει αποκοπή ορισμένου μήκους της αλυσίδας του αμύλου και επανασύνδεση των άκρων του τμήματος που διασπάστηκε, δημιουργώντας το κυκλικό μόριο των κυκλοδεξτρινών.

Η μοριακή δομή των κυκλοδεξτρινών, χαρακτηρίζεται από μια υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και μία εσωτερική υδρόφοβη κοιλότητα και ως εκ τούτου, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να εγκλείσουν στην κοιλότητα τους (μόρια ξενιστές - hosts) υδρόφοβα μόρια ή μέρη μορίων (ξενιζόμενα - guests) σχηματίζοντας, λόγω των υδρόβιων εξωτερικών περιοχών τους, υδατοδιαλυτά σύμπλοκα εγκλεισμού. Τα ξενιζόμενα μόρια, πέραν της αυξημένης υδατοδιαλυτότητας τους απολαμβάνουν και άλλες σημαντικές βελτιώσεις των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, όπως αυξημένη σταθερότητα (από οξείδωση και άλλα) και βιοδιαθεσιμότητα. Επιπλέον, τα σύμπλοκα εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες προσφέρουν αργή απελευθέρωση του ξενιζόμενου μορίου από αυτές, συντηρώντας έτσι για περισσότερο χρονικό διάστημα την δράση των μορίων και μειώνοντας ανεπιθύμητες παρανέργειες λόγω της μειωμένης απαιτούμενης δοσολογίας τους. Η

τελευταία ιδιότητα των κυκλοδεξτρινών βρίσκει εφαρμογή στην βελτίωση των φυσικών εντομοαπωθητικών αυξάνοντας τον χρόνο δραστηριότητάς τους [40].

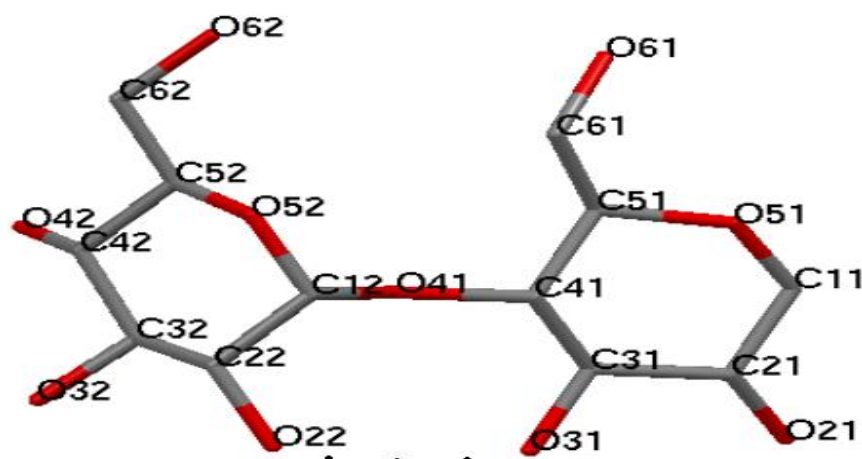
Στη φύση απαντώνται στο μεγαλύτερο ποσοστό τρεις κύριοι τύποι κυκλοδεξτρινών που έχουν ταξινομηθεί ανάλογα με το πόσες γλυκοζιτικές μονάδες έχουν στο μόριό τους. Η α -κυκλοδεξτρίνη αποτελείται από έξι μονάδες, η β -κυκλοδεξτρίνη από επτά μονάδες και η γ -κυκλοδεξτρίνη από οκτώ μονάδες. Οι κυκλοδεξτρίνες αυτές έχουν διαφορετικά μεγέθη δακτυλίων και φυσικοχημικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα η διάμετρος της κοιλότητας της α -κυκλοδεξτρίνης, της β -κυκλοδεξτρίνης και της γ -κυκλοδεξτρίνης είναι περίπου 5,0, 6,3 και 8,0 Å, αντίστοιχα (Εικόνα 6). Οι γλυκοζιτικές μονάδες που σχηματίζουν τα 3 κυκλικά αυτά μόρια έχουν, εκτός σπανίων εξαιρέσεων, τη διαμόρφωση ανακλίντρου. Λόγω της διαμόρφωσης αυτής, οι κυκλοδεξτρίνες εμφανίζουν ένα σχήμα κόλουρου κώνου με τα τα πρωτοταγή υδροξύλια των γλυκοζιτικών μονάδων να βρίσκονται στη “στενή” πλευρά του, ενώ τα δευτεροταγή στην αντίστοιχη “ευρεία”. Πέραν από τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες, είναι κοινές στο εμπόριο και παράγωγα κυκλοδεξτρινών, όπως οι μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες παρουσιάζουν βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες (ενισχυμένη υδατοδιαλυτότητα, επιμηκυμένη κοιλότητα και καλύτερη ικανότητα εγκλεισμού), αλλά και σημαντικά μεγαλύτερη τοξικότητα από τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες. Η κυκλοδεξτρίνη με τις περισσότερες εφαρμογές και μελέτες σε σύμπλοκα εγκλεισμού είναι η β -κυκλοδεξτρίνη (β -CD), η οποία αν και λιγότερο διαλυτή από τις άλλες, είναι μη τοξική αλλά και ιδιαίτερα οικονομική ώστε να συναντάται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών σε πολλούς τομείς όπως, στη φαρμακευτική στα καλλυντικά και τα τρόφιμα [41]. Επιπλέον η εφαρμογή της β -κυκλοδεξτρίνης στα εντομοαπωθητικά θεωρείται ασφαλής, επειδή δεν προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.



Εικόνα 6: Οι τρεις διαφορετικοί τύποι κυκλοδεξτρινών ανάλογα με τις γλυκοζιτικές μονάδες που τους αποτελούν α -CD, β -CD και γ -CD. Παρατηρούμε πως όσο μεγαλώνει ο αριθμός των γλυκοζιτικών μονάδων στο μόριο μεγαλώνει και το μέγεθος και η εσωτερική κοιλότητα του μορίου.

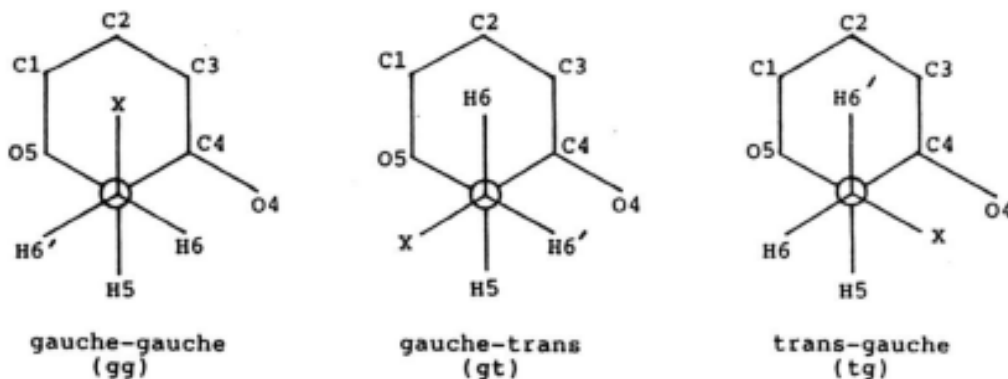
1.5.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ

Η αρίθμηση των ατόμων της γλυκόζης αρχίζει από το αιθερικό οξυγόνο του δακτυλίου της. Τα άτομα O4 ορίζουν το επίπεδο της κυκλοδεξτρίνης, λόγο του γλυκοζιτικού δεσμού και η απόκλισή τους από αυτό δεν είναι σημαντική (μικρότερη από 0.25 Å) για τις α - και β -CD, ενώ για τις γ -CD είναι λίγο μεγαλύτερη. Το άνοιγμα της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης καθορίζεται από ένα πολύγωνο που συντίθεται από τα γλυκοζιτικά O4 άτομα. Τα άτομα αυτά σχηματίζουν παραμορφωμένα κανονικά εξάγωνα, επτάγωνα και οκτάγωνα, αντίστοιχα για τις α -, β -CD και γ -CD (Εικόνα 6). Τα δευτεροταγή γλυκοζιτικά υδροξύλια O2 και O3 γειτονικών γλυκοζιτικών μονάδων του μορίου της κυκλοδεξτρίνης συνδέονται με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου, ενώ τα πρωτοταγή υδροξύλια O6 είναι στραμμένα προς τα έξω προς την “στενή” πλευρά του μορίου (Εικόνα 7). Οι δομές των φυσικών κυκλοδεξτρινών είναι άκαμπτες εξαιτίας των ενδομοριακών υδρογονικών δεσμών ανάμεσα στο O2 και το O3 των γειτονικών μονάδων γλυκόζης. Οι αποστάσεις των υδρογονικών αυτών δεσμών αυξάνονται από τη γ - προς την α -CD, και αντίστοιχα οι υδρογονικοί δεσμοί γίνονται ασθενέστεροι [42].



Εικόνα 7: Δομή και σύνδεση των γλυκοζιτικών μονάδων μιας κυκλοδεξτρίνης. Τα άτομα υδρογόνου παραλείπονται για λόγους ευκρίνειας

Η δυνατότητα συστροφής γύρω από τους γλυκοζιτικούς δεσμούς είναι αρκετά περιορισμένη. Αντίθετα τα πρωτοταγή οξυγόνα O6 μπορούν να στραφούν γύρω από το δεσμό O5-O6. Υπάρχουν τρεις πιθανές διαμορφώσεις της γωνίας συστροφής O6-C6-C5-O5: gauche-trans, trans-gauche και gauche-gauche. Η διαμόρφωση gauche-trans δεν ευνοείται και εμφανίζεται μόνον όταν το απαιτεί η σταθερότητα της κρυσταλλικής δομής ή όταν τα O6 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το ξενιζόμενο μόριο ή με μόρια νερού (Εικόνα 8). Στην πλευρά που βρίσκονται τα δευτεροταγή υδροξύλια, η διάμετρος της κοιλότητας είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτήν των πρωτοταγών υδροξυλίων, αφού η ελεύθερη περιστροφή των τελευταίων μειώνει την αποτελεσματική διάμετρο της κοιλότητας (Εικόνα 6)[43].



Εικόνα 8: Γωνίες συστροφής των πρωτοταγών οξυγόνων O6 στην κυκλοδεξτρίνη.

Τα υδροξύλια καθιστούν υδρόφιλη την CD, με αποτέλεσμα να είναι ευδιάλυτη στο νερό. Η διαλυτότητα των α -, β - και γ -CD διαφέρει. Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζουν τα οξυγόνα O2 και O3 των γειτονικών γλυκοζών στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης. Μια πλήρης δευτεροταγής ζώνη σχηματίζεται από αυτούς τους δεσμούς υδρογόνου επομένως η β -CD είναι μια μάλλον άκαμπτη δομή. Αυτός ο ενδομοριακός σχηματισμός του δεσμού υδρογόνου είναι πιθανώς η εξήγηση για την παρατήρηση ότι η β -CD έχει τη χαμηλότερη στο νερό διαλυτότητα από όλες τις CD. Η ζώνη δεσμού - υδρογόνου είναι ελλειπής στο μόριο της α -CD, διότι μια μονάδα γλυκοπυρανόζης είναι σε μια στρεβλωμένη θέση. Συνεπώς, αντί για τους έξι πιθανούς δεσμούς υδρογόνου, μονάχα 4 μπορούν να δημιουργηθούν πλήρως. Η γ -CD είναι μια μη συνεπίεδη, περισσότερο εύκαμπτη δομή, επομένως, είναι η περισσότερο διαλυτή από την α -CD και την β -CD [44]. Αντίθετα, η εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών είναι λιπόφιλη εξ' αιτίας της παρουσίας των ομάδων C-H και των αιθερικών οξυγόνων O4 και O5. Αυτή η δυσπρόστατη ιδιότητά τους είναι πολύ σημαντική για το σχηματισμό υπερμοριακών συστημάτων.

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι δυνατόν να τροποποιηθούν χημικά, με υποκατάσταση των υδροξυλίων τους, δίνοντας μια σειρά παραγώγων με διαφορετικές ιδιότητες ως προς τη συμπλοκοποίηση και τη διαλυτότητα. Από τις πιο ενδιαφέρουσες και ευρέως χρησιμοποιούμενες υποκαταστάσεις των CD είναι αυτές της αλκυλίωσης και υδροξυαλκυλίωσης που προκύπτουν από τη τροποποίηση των ελεύθερων υδροξυλίων των γλυκοζιτικών μονάδων. Οι πιο σημαντικές τροποποιήσεις των ελεύθερων υδροξυλίων των κυκλοδεξτρινών είναι η μεθυλίωση και η υδροξυπροπυλίωση τους. Η αντικατάσταση γίνεται είτε στις θέσεις 2 και 6 είτε στις 2, 3 και 6, όπου υπάρχουν ελεύθερα υδροξύλια (Εικόνα 7). Η μεθυλίωση στις δύο θέσεις (2 και 6) οδηγεί στον σχηματισμό των διμεθυλιωμένων CDs, ενώ στις τρεις (2, 3 και 6) στον σχηματισμό των υπερμεθυλιωμένων CDs. Τρεις τύποι είναι οι πιο γνωστοί: η 2,6-δι-Ο-μεθυλ- β -κυκλοδεξτρίνη (DIMEB ή DM- β -CD), η 2,3,6-υπερ-Ο-μεθυλ- β -κυκλοδεξτρίνη (TRIMEB ή

TM- β -CD) και η τυχαία-μεθυλιωμένη β -κυκλοδεξτρίνη (RAMEB), όπου η διαλυτότητα εξαρτάται από τον αριθμό των μεθυλικών ομάδων που είναι προσκολλημένες σε κάθε γλυκοζιτική μονάδα. Οι μεθυλιωμένες β -CD χαρακτηρίζονται από ελαστικότερη εσωτερική κοιλότητα, λόγω της απουσίας των δεσμών υδρογόνου των γειτονικών O2 και O3 που παρατηρούνται στη μη υποκατεστημένη β -CD. Εξάλλου λόγω της παρουσίας των μεθυλιών η υδρόφοβη κοιλότητα της CD είναι βαθύτερη. Άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό, που τις διαφοροποιεί από τις μη υποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες, είναι ότι η διαλυτότητα αυξάνει όταν ελαττώνεται η θερμοκρασία [37].

1.6 ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

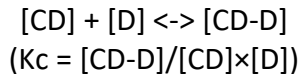
Ο ρυθμός σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα και την υδροφοβικότητα του φιλοξενούμενου μορίου, καθώς και από το μέγεθος και το σχήμα της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης. Η εσωτερική κοιλότητα της CD είναι αρκετά ευρεία ώστε να μπορεί να φιλοξενήσει σειρά μορίων, σχηματίζοντας υπερμοριακά συστήματα. Το μόριο της CD λειτουργεί σε αυτή την περίπτωση ως ξενιστής (host) περικλείοντας το ξενιζόμενο (guest) ή τα ξενιζόμενα μόρια. Η δημιουργία ενός συμπλόκου εγκλεισμού προϋποθέτει να υπάρχει γεωμετρική συμβατότητα μεταξύ του ξενιστή και του ξενιζόμενου μορίου. Γενικά, τα μικρότερα και πιο υδρόφοβα μόρια τείνουν να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με τις κυκλοδεξτρίνες ταχύτερα. Η σταθερότητα του συμπλόκου εγκλεισμού επηρεάζεται επίσης από την κινητική του συστήματος. Ο ρυθμός διάσπασης του συμπλόκου εγκλεισμού εξαρτάται από την ισχύ και τον αριθμό των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ξενιζόμενου μορίου και της κυκλοδεξτρίνης, καθώς και από τον βαθμό αλλαγής της διαμόρφωσης του συμπλόκου.

Η συμπλοκοποίηση γίνεται με την είσοδο του υδρόφοβου ξενιζόμενου μορίου ή του υδρόφοβου τμήματός του στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, ενώ οι υδρόφιλες πολικές ομάδες του εξέρχουν από αυτήν και εκτίθενται στην υδρόφιλη περιοχή που περιβάλλει την CD, όπου και αλληλεπιδρούν με μόρια νερού. Με την είσοδο των υδρόφοβων ομάδων του ξενιζόμενου στην κοιλότητα του ξενιστή δρόφοβομόριο αντικαθίστανται τα εγκλεισμένα σε αυτήν, υψηλής ενθαλπίας μόρια νερού τα οποία απελευθερώνονται στο υδατικό περιβάλλον όπου σχηματίζουν υδρογονικούς δεσμούς με άλλα μόρια νερού και κινούνται ελεύθερα, μειώνοντας την ενθαλπία και αυξάνοντας την εντροπία του συστήματος. Επομένως, η συμπλοκοποίηση είναι θερμοδυναμικά ευνοούμενη και γίνεται αυθόρμητα. Η αναλογία ξενιστή και ξενιζόμενου μορίου συχνά είναι 1:1 αλλά μπορεί ένα ή και περισσότερα ξενιζόμενα μόρια να περιέχονται σε κοιλότητες που σχηματίζονται από μία δύο ή τρεις κυκλοδεξτρίνες. [37].

Οι δυνάμεις που οδηγούν στη συμπλοκοποίηση των ξενιζόμενων μορίων (guest) με τις κυκλοδεξτρίνες οφείλονται κυρίως σε έναν συνδυασμό δυνάμεων van der Waals και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, καθώς επίσης και δεσμών υδρογόνου κυρίως μεταξύ

των πρωτοταγών οξυγόνων O6 του ξενιστή με τα ξενιζόμενα μόρια [45]. Αυτές οι δυνάμεις παίζουν καθοριστικό ρόλο στον σχηματισμό και τη σταθερότητα του συμπλόκου [46]. Η υδρόφοβη κοιλότητα του μορίου της κυκλοδεξτρίνης παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για το ξενιζόμενο μόριο ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επαφή του με τον περιβάλλοντα διαλύτη, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό ενός συμπλόκου εγκλεισμού. Όπως επίσης, οι δυνάμεις Van der Waals είναι ασθενείς ελκτικές δυνάμεις που προκύπτουν από τις διακυμάνσεις της ηλεκτρονιακής πυκνότητας των δύο μορίων. Οι δυνάμεις αυτές σχηματίζουν ήπιους δεσμούς μεταξύ του ξενιζόμενου μορίου (guest) και της κυκλοδεξτρίνης (host) και όχι μόνιμους με αποτέλεσμα το σύμπλοκο εγκλεισμού να προστατεύει το ξενιζόμενο μόριο αλλά παράλληλα να προσφέρει και την απελευθέρωσή του προκειμένου να είναι βιολογικά ενεργό.

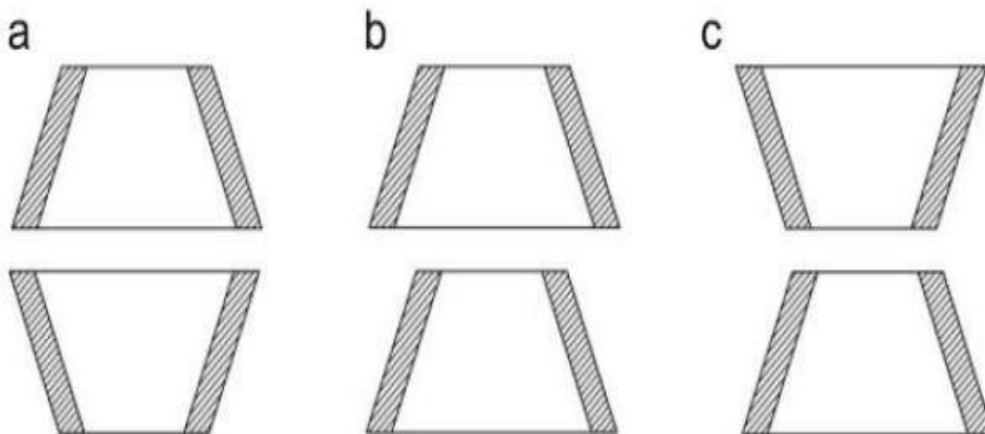
Ένα μέτρο της ισχύος της σύνδεσης μεταξύ ενός μορίου κυκλοδεξτρίνης και ενός ξενιζόμενου μορίου αποτελεί η σταθερά συμπλοκοποίησης (Kc). Κατά τη διάλυση των συμπλοκών εγκαθίσταται μία ισορροπία μεταξύ των συμπλόκων και των επιμέρους μορίων (ξενιστή-ξενιζόμενου) που βρίσκονται στον διαλύτη. Η σταθερά συμπλοκοποίησης (Kc) ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης του συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης-ξενιζόμενου προς το γινόμενο των συγκεντρώσεων της ελεύθερης κυκλοδεξτρίνης και των ελεύθερων ξενιζόμενων μορίων. Για την απλή περίπτωση σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού με στοιχειομετρία ξενιστή:ξενιζόμενου 1:1, ο σχηματισμός των συμπλοκών περιγράφεται από την ισορροπία:



όπου CD η κυκλοδεξτρίνη, D το ξενιζόμενο μόριο, CD-D το σύμπλοκο και K η σταθερά συμπλοκοποίησης. επίσης οι αντιδράσεις συμπλοκοποίησης είναι εξώθερμες και οδηγούν σε αύξηση της εντροπίας του συστήματος, αλλά επίσης μείωση της σταθερά συμπλοκοποίησης (Kc) μεταβάλλεται από περίπτωση σε περίπτωση [46].

Οι φυσικοχημικές επίσητες ενός μορίου, συχνά μεταβάλλονται κατά τον εγκλεισμό του σε μόρια εγκλεισμού. Με τον εγκλεισμό συνήθως παρατηρείται αύξηση της διαλυτότητας του ξενιζόμενου μορίου καθώς οι υδρόφοβες ομάδες του τοποθετούνται μέση επίσητην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης και έτσι δεν σχηματίζει επίσητες σωματώματα. Επίσης φαίνεται να επηρεάζεται η χημική ενεργότητα. Σε ορισμένες περιπτώσεις η CD ενεργεί ως ένζυμο, καταλύοντας επίσητά χημικές αντιδράσεις στις οποίες συμμεπίσησι το ξενιζόμενο μόριο και στις οποίες διαφορετικά το μόριο θα αντιδρούσε δυσκολότερα [37]. Ακόμα ο εγκλεισμός του μορίου επηρεάζει επίσητες φάσματα απορρόφησης επίσηταλλαγή επίσητες ορυφές και την ένταση της απορρόφησης της εγκλεισμένης ουσίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι φασματοσκοπικές τεχνικές να αποτελούν επίσητες μεθόδους ανίχνευσης και μελέτης της συμπλοκοποίησης.

Η κρυσταλλική δομή και η μοριακή διεπίσηςτων συμπλόκων εγκλεισμού στο χώρο μπορεί επίσης να ποικίλλει ανάλογα με το ξενιζόμενο μόριο και τη κυκλοδεξτρίνη που χρησιμοποιείται. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές, τα σύμπλοκα εγκλεισμού σχηματίζουν συνήθως ένα κρυσταλλικό πλέγμα στο οποίο τα μόρια κυκλοδεξτρίνης είναι διατεταγμένα σε ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οι α - και β -κυκλοδεξτρίνες κατά την συμπλοκοποίηση σχηματίζουν σε στερεά κατάσταση διμερή τα οποία επαναλαμβάνονται στο χώρο. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα διμερή σχηματίζονται σύμφωνα με τις ακόλουθες μοριακές διατάξεις: . (i) «κεφαλής-κεφαλής» (“head-to-head”) όπου τα δύο μόρια α - ή β -CD διευθετούνται έτσι ώστε οι πλευρές τους με τη μεγαλύτερη διάμετρο, που φέρουν τα δευτεροταγή υδροξύλια O2 και O3, να αντικρίζουν η μία την άλλη. Αυτή η διάταξη διευρύνει την υδρόφοβη κοιλότητα. Τα άτομα O3 των CD του κάθε διμερούς συνδέονται μεταξύ τους με υδρογονικούς δεσμούς, οι οποίοι σταθεροποιούν το διμερές. (ii) «κεφαλής-ουράς» (“head-to-tail”) όπου τα πρωτοταγή οξυγόνα O6 της μιας κυκλοδεξτρίνης (tail rim) είναι προσανατολισμένα προς τα δευτεροταγή υδροξύλια των γλυκοζών της δεύτερης κυκλοδεξτρίνης (head rim). (iii) Τέλος τα διμερή κυκλοδεξτρινών μπορούν σχηματίσουν την διάταξη «ουράς-ουράς» (“tail-to-tail”) όπου δύο μονάδες γλυκόζης προσανατολίζονται με τα πρωτοταγή άκρα των γλυκοζών τους να είναι αντικριστά. Αυτή η διάταξη είναι λιγότερο συχνή από τις άλλες διατάξεις και έχει παρατηρηθεί κυρίως σε κυκλοδεξτρίνες με μεγαλύτερα μεγέθη δακτυλίων.



Εικόνα 9: Διαμορφώσεις στον χώρο διμερών κυκλοδεξτρίνης. (a) «κεφαλής-κεφαλής» (“head-to-head”) (b) «κεφαλής-ουράς» (“head-to-tail”) και (c) «ουράς-ουράς» (“tail-to-tail”).

1.7 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ

Τα προϊόντα εγκλεισμού σε κυκλοδεξτρίνες, εξαιτίας της βελτίωσης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ξενιζομένων ουσιών και της αργής τους απελευθέρωσης, βρίσκουν ευρείες εφαρμογές στις βιομηχανίες φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών αλλά και σε άλλους τομείς όπως ο αγροτικός τομέας και ο τομέας του περιβάλλοντος και ως εκ τούτου εμφανίζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Η χρήση των συμπλόκων με κυκλοδεξτρίνες στη βιομηχανία έχει επιφέρει ήδη αρκετές βελτιώσεις, όπως η σταθεροποίηση των ουσιών που είναι ευαίσθητες στο φως ή στο οξυγόνο. Ακόμα ο εγκλεισμός προσφέρει προστασία σε χημικά ενεργές ουσίες ώστε να μπορούν να αναμιχθούν με άλλες ουσίες χωρίς κάποιο κίνδυνο. Ενώ επίσης τα μόρια της κυκλοδεξτρίνης μπορούν να δράσουν ως καταλύτης ή ως αναστολέας λόγω του εγκλεισμού των λειτουργικών ομάδων του ξενιζόμενου μορίου και έτσι να προωθήσουν την αντίδραση ή να την παρεμποδίσουν αντίστοιχα.

Η βελτίωση της διαλυτότητας των ξενιζόμενων ουσιών λόγω της προστασίας των υδρόφοβων τμημάτων τους από της κυκλοδεξτρίνες είναι μια ιδιότητα που βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στην βιοτεχνολογία και την βιομηχανία φαρμάκων. Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της διαλυτότητας και της σταθερότητας των δυσδιάλυτων φαρμάκων και για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Τα σύμπλοκα εγκλεισμού μπορούν επίσης να προστατεύσουν τα φάρμακα από την αποικοδόμηση και να βελτιώσουν τη στοχευμένη χορήγησή τους σε συγκεκριμένα σημεία του σώματος. Ακόμα η συμπλοκοποίηση μπορεί να προσφέρει την αργή απελευθέρωση του φαρμάκου στον οργανισμό, μια ιδιότητα που βρίσκει εφαρμογή σε ιδιαίτερα δραστικά φάρμακα τα οποία επιθυμούμε την βραδεία εφαρμογή τους καθώς η απευθείας χρήση τους μπορεί να αποβεί τοξική για τον οργανισμό. Επίσης πολλές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα έχουν δυσάρεστη γεύση με αποτέλεσμα να αποκλείεται το φάρμακα από την απευθείας κατανάλωση, η συμπλοκοποίηση με κυκλοδεξτρίνες μπορεί να εξαλείψει ή και να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου.

Τα σύμπλοκα των CD έχουν πολλές δυνατότητες εφαρμογής και στη βιομηχανία τροφίμων. Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν εγκριθεί για χρήση σε προϊόντα τροφίμων από ρυθμιστικούς οργανισμούς σε πολλές χώρες. Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων για τη βελτίωση της διαλυτότητας, της σταθερότητας και της γεύσης των συστατικών τροφίμων. Τα συμπλέγματα εγκλεισμού μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ενώσεων, όπως η χοληστερόλη, από τα τρόφιμα. Η χρήση των κυκλοδεξτρινών στα τρόφιμα μπορεί να περιλαμβάνει εγκλεισμό λιπαρών υλών, προσθετικών γεύσης, χρωστικών και αρωματικών υλών, σταθεροποίηση γαλακτωμάτων και ελαίων, κάλυψη οσμών και αφαίρεση της πικρής γεύσης με τον εγκλεισμό ουσιών υπευθύνων για αυτό το χαρακτηριστικό.

Στα καλλυντικά η χρήση των κυκλοδεξτρινών γίνεται για τη βελτίωση της διαλυτότητας και της σταθερότητας των δραστικών συστατικών και για τη βελτίωση της μεταφοράς τους στο δέρμα. Για παράδειγμα, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενθυλάκωση βιταμινών ή αντιοξειδωτικών σε καλλυντικά προϊόντα για την προστασία τους από την αποικοδόμηση και την ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς τους. Ακόμα η προστασία των ουσιών ενδιαφέροντος κατά τον εγκλεισμό και η ιδιότητα της βραδείας απελευθέρωσής τους έχει ιδιαίτερη σημασία στα προϊόντα των καλλυντικών διότι μπορεί να οδηγήσει στην βελτίωση της απόδοσης του αρώματος καθώς και της διάρκειάς του.

Στη γεωργία, χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας μιας ευρείας ποικιλίας αγροχημικών όπως φυτορρυθμιστικές ουσίες, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, εντομοαπωθητικά, μυκητοκτόνα και φερομόνες, ενώ σημαντική είναι και η συμβολή τους στην μείωση της τοξικότητας των βιομηχανικών και οικιακών αποβλήτων, μέσω της συμπλοκοποίησης και απομάκρυνσης των επικίνδυνων ουσιών από το περιβάλλον. Πιο ειδικά, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση ρύπων από το νερό ή το έδαφος, σχηματίζοντας σύμπλοκα εγκλεισμού με τα μόρια-στόχους και διευκολύνοντας έτσι την απομάκρυνση ή την αποικοδόμησή τους. Για παράδειγμα, οι κυκλοδεξτρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση οργανικών ρύπων, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, από μολυσμένο έδαφος.

Εκτός από τις εφαρμογές που αναφέρονται παραπάνω, οι κυκλοδεξτρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλους τομείς, όπως η αναλυτική χημεία και η επιστήμη των υλικών. Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της εκλεκτικότητας και της ευαισθησίας των αναλυτικών μεθόδων, ως πρόσθετα στην κινητή ή την σταθερή φάση, στις χρωματογραφικές τεχνικές βελτιώνοντας την ικανότητα διαχωρισμού και την ταχύτητα ανάλυσης της τεχνικής, καθώς επίσης και για τη βελτίωση της σταθερότητας και της δραστηριότητας των ενζύμων και για την τροποποίηση των ιδιοτήτων υλικών όπως τα πολυμερή και τα νανοσωματίδια. Στη χημική σύνθεση βρίσκουν εφαρμογές ως καταλύτες αντιδράσεων και ως χειρικά μόρια, σχηματίζοντας σύμπλοκα εγκλεισμού με αντιδρώντα ή ενδιάμεσα προϊόντα.

1.8 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ

Ο εγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών που έχουμε απομονώσει σε μόρια-ξενιστές, είναι μια διαδικασία που έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην βιομηχανία, γιατί μπορεί να ενισχύσει την διαλυτότητα την σταθερότητα και την βιοδιαθεσιμότητα τους. Ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*) ως φαρμακευτικό φυτό, περιέχει διάφορους δευτερογενείς μεταβολίτες όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, τερπενοειδή και αλκαλοειδή. Αυτές οι ενώσεις είναι γνωστό ότι διαθέτουν διάφορα οφέλη για την υγεία, όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες.

Λόγο του μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες εγκλεισμού των βιοδραστικών ουσιών του βασιλικού κυρίως του αιθερίου ελαίου του, σε συστήματα προστασίας για την βελτίωση των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Το

2020 ο Mohammed Chenni *et al* [47] διερευνήσαν την εντομοκτόνο δράση ενθυλακωμένων ουσιών αιθέριου ελαίου βασιλικού σε μίγματα μαλτοδεξτρίνης και κόμμεως ακακίας. Οι δοκιμές έγιναν έναντι τριών εντόμων παρασίτων (*Rhizopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* και *Tribolium castaneum*) που εμφανίζονται σε αποθηκευμένα τρόφιμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα σχηματισθέντα προϊόντα ενθυλάκωσης των ουσιών του βασιλικού ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικά έναντι των δύο παρασίτων *Rhizopertha dominica* και *Sitophilus oryzae* και επομένως το αιθέριο έλαιο του βασιλικού, μετά τον κατάλληλο μοριακό εγκλεισμό του, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πηγή φυσικών εντομοκτόνων για τη συντήρηση τροφίμων.

Ακόμα έχει μελετηθεί ο εγκλεισμός της εστραγκόλης, μιας από τις κύριες βιοδραστικές ουσίες του βασιλικού, σε μια σειρά κυκλοδεξτρινών (α -CD, β -CD, HP- β -CD και RAMEB) σε μικρό ποσοστό μεθυλιωμένη- β -κυκλοδεξτρίνη (CRYSMEB) και γ -κυκλοδεξτρίνη). Οι σταθερές συμπλοκοποίησης (Kc) προσδιορίστηκαν σε υδατικό διάλυμα με αέρια χρωματογραφία (SH-GC) και φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Η έρευνα έδειξε πως για όλες τις κυκλοδεξτρίνες που μελετήθηκαν η στοιχειομετρία ήταν 1:1 (κυκλοδεξτρίνη: εστραγκόλη), ενώ η β -CD και τα παράγωγά της παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές Kc,. Επίσης μετρήθηκε η ελεγχόμενη απελευθέρωση του μορίου της εστραγκόλης και παρατηρήθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή DPPH, όπως και βελτίωση της φωτοσταθερότητας [26]. Τέλος το αιθέριο έλαιο του βασιλικού μελετήθηκε κατά την ενθυλάκωσή του σε νανογαλακτώματα σε μορφή υδρογέλης, ενσωματώνοντας αιθέριο έλαιο βασιλικού, span 60 και νερό. Τα νανογαλακτώματα υδρογέλης βασιλικού έδειξαν ενισχυμένη αντιβακτηριακή δράση έναντι του *Bacillus subtilis* και του *Staphylococcus aureus* με την ικανότητά τους να μειώνουν τη συνοχή της κυτταρικής μεμβράνης. Οι έρευνες αυτές δείχνουν την δυνατότητα του εγκλεισμού των δευτερογενών μεταβολιτών του βασιλικού σε μόρια ενθυλάκωσης και την βελτίωση των ιδιοτήτων τους σε τομείς ενδιαφέροντος [48].

1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι αρχικά η παραλαβή αιθερίου ελαίου από δύο ποικιλίες βασιλικού (*Ocimum basilicum*): πλατύφυλλου (sweet basil) και σγουρού, και ο προσδιορισμός της χημειοτυπικής τους σύστασης με αέρια χρωματογραφία. Στη συνέχεια, με σκοπό τη προστασία και τη βελτιστοποίηση των συστατικών αυτών των αιθερίων ελαίων, εξετάζεται η παρασκευή προϊόντων εγκλεισμού τους σε κυκλοδεξτρίνες. Ιδιαίτερα μελετάται ο εγκλεισμός της λιναλοόλης, που αποτελεί την κύρια ουσία αυτών των αιθερίων ελαίων, σε κυκλοδεξτρίνες κατάλληλες για εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και στη φαρμακοβιομηχανία. Φασματοσκοπικές τεχνικές FT-IR και UV-Vis χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των παραγομένων προϊόντων εγκλεισμού και η δομή του συμπλόκου λιναλόλη/ β -κυκλοδεξτρίνη προσδιορίζεται αναλυτικά με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και μελετάται περαιτέρω με υπολογιστικές μεθόδους. Ελέγχεται τέλος, η αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση των παραληφθέντων αιθερίων ελαίων και των προϊόντων εγκλεισμού τους.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ (ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ)

2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Δείγματα βασιλικού (*Ocimum basilicum*) των δυο ποικιλιών πλατύφυλλου και σγουρού συλλέχθηκαν από καλλιεργητή σε περιοχή της Πελοποννήσου. Τα δείγματα παραλήφθηκαν μαζί με το στέλεχος τα φύλλα και το άνθος σε ξηρή μορφή, και τους δόθηκε η ονομασία ΒΣ για την ποικιλία του σγουρού και ΒΠ για την ποικιλία του πλατύφυλλου (**Εικόνα 2.1**).



Εικόνα 2.1: Ξηρή δρόγη (φύλλα και άνθη) Α) Σγουρού (ΒΣ) και Β) πλατύφυλλου βασιλικού (ΒΠ).

Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του φυτικού υλικού από το στέλεχος για την παραλαβή των φύλλων και του άνθους (δρόγη) και ζυγίστηκαν 600 g αντίστοιχα για κάθε ποικιλία, τα οποία χωρίστηκαν σε τρία δείγματα των 200 g με αρίθμηση για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου κάθε ποικιλίας με υδροαπόσταξη Clevenger.

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ - ΥΔΡΟΑΠΟΣΤΑΞΗ CLEVENGER

Η παραλαβή του αιθερίου ελαίου από τις ποικιλίες πλατύφυλλου και σγουρού βασιλικού πραγματοποιήθηκε με την διαδικασία της απόσταξης και συγκεκριμένα με υδροαπόσταξη σε συσκευή Clevenger. Στην υδροαπόσταξη, το προς απόσταξη φυτικό υλικό, τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με νερό, η οποία συνδέεται με ψυκτήρα και με θερμαντική συσκευή. Το χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι ότι το νερό και το φυτικό υλικό είναι σε άμεση επαφή. Στην υδροαπόσταξη πρέπει να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού, ώστε να μην συμβαίνει θερμική διάσπαση διαφόρων συστατικών του αιθερίου ελαίου. Με αυτή την μέθοδο αποστάζονται άνθη, καρποί, πέταλα, ρίζες. Η μέθοδος της απόσταξης έχει το πλεονέκτημα του μικρού κόστους ενώ αποτελεί και εξαιρετικά απλή μέθοδο που χρησιμοποιείται για την παραλαβή αιθερίου ελαίου σχεδόν από όλα τα φαρμακευτικά φυτά.

Πιο συγκεκριμένα 200 g δείγματος για κάθε ποικιλία βασιλικού αντίστοιχα τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη των 5 L και αναμείχθηκαν με 1 L απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια συναρμολογούμε την συσκευή Clevenger με τον ψυκτήρα και την σφαιρική φιάλη και προσθέτουμε στην συσκευή Clevenger απεσταγμένο νερό μέχρι την ανακύκλωση του.

Εφαρμόζουμε σταθερή παροχή νερού για την σταθερή ψύξη του συστήματος και διοχετεύουμε δυνατή θέρμανση στην αρχή ώστε να θερμάνουμε την σφαιρική φιάλη μέχρι βρασμού του δείγματος. Η παραλαβή του αιθερίου ελαίου θα αρχίσει μετά από λίγο. Μετά από 3 ώρες κλείνουμε τον θερμομανδύα και αφήνουμε το σύστημα να ηρεμήσει για 20 λεπτά.

Μετράμε τον όγκο του αιθερίου ελαίου σε mL και το παραλαμβάνουμε εφόσον το απομονώσουμε από το υδρόλυμα του. Προσθέτουμε άνυδρο $MgSO_4$ για την περεταίρω αφυδάτωση του ελαίου από το υδρόλυμα. Παραλαμβάνουμε το αιθέριο έλαιο με πιπέτα και το καθαρίζουμε περαιτέρω με φίλτρο (Econoflitr PTFE 25 m 0,45 nm) για την συγκράτηση των πολικών συστατικών και την παραλαβή του καθαρού αιθερίου ελαίου.

2.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Η αναζήτηση των βιοδραστικών συστατικών του αιθερίου ελαίου του βασιλικού γίνεται με τον διαχωρισμό των κύριων ενώσεων από το απόσταγμα του αιθερίου ελαίου με σκοπό αφενός την ταυτοποίησή τους και αφετέρου την εξέταση της βιοδραστικότητάς τους με διάφορες μεθόδους. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές διαχωρισμού για αυτόν τον σκοπό, αλλά αυτές που έχουν επικρατήσει είναι κυρίως οι χρωματογραφικές μέθοδοι. Στις χρωματογραφικές τεχνικές ο διαχωρισμός γίνεται με την κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής που βρίσκεται μέσα στην χρωματογραφική στήλη και μιας κινητής (φέρουσας) η οποία διέρχεται από την χρωματογραφική στήλη.

Ο διαχωρισμός των συστατικών στην στήλη επιτυγχάνεται βάσει των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, όπως είναι η πολικότητα, το μέγεθος των μορίων και η διαλυτότητα τους. Η κινητή φάση καθώς διέρχεται μέσα από την χρωματογραφική στήλη προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος επάνω στην στατική φάση, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος και την έξοδό τους από την στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Στην έξοδο της στήλης υπάρχει ανιχνευτής όπου προσδιορίζει ποιοτικά και πολλές φορές ποσοτικά το κάθε συστατικό.

Την ισορροπία κατανομής μιας ουσίας ανάμεσα στη στατική και κινητή φάση καθορίζουν κάποιες χρωματογραφικές παράμετροι, όπως ο συντελεστής κατανομής, ο χρόνος έκλουσης (t_R) και η διαχωριστική ικανότητα της χρωματογραφικής στήλης. Ο συντελεστής κατανομής περιγράφεται από τον λόγο της συγκέντρωσης της ουσίας στη στατική φάση (C_s) προς τη συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση (C_m).

$$K=C_s/C_m$$

Κάθε ένωση έχει διαφορετικό συντελεστή κατανομής και με αυτό το τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος αφού εξ' αιτίας των διαφορετικών συντελεστών κατανομής αυτά κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα στη στήλη και εξέρχονται από αυτήν σε διαφορετικούς χρόνους. Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος και της εμφάνισης του μεγίστου κάθε κορυφής, δηλαδή της έκλουσης του κάθε συστατικού στο άλλο άκρο της στήλης ονομάζεται χρόνος έκλουσης (t_R). Η ικανότητα κάθε οργάνου να διαχωρίζει αποτελεσματικά τα συστατικά ενός μίγματος προσδιορίζεται από την διαχωριστική ικανότητα της χρωματογραφικής στήλης η οποία μεταβάλλεται ανάλογα τα χαρακτηριστικά της.

Η αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας επιτυγχάνεται με αύξηση του μήκους της στήλης, κατάλληλη επιλογή του μέσου πλήρωσης της στατικής φάσης και κατάλληλη επιλογή της κινητής φάσης. Ελάττωση του πλάτους των κορυφών έχουμε με το ομοιόμορφο γέμισμα του υλικού πλήρωσης στη στήλη, καθώς και τη χρήση μικρότερων σωματιδίων πλήρωσης, ενώ ακόμα η μεταβολή της θερμοκρασίας και της φύσης της

κινητής φάσης στο σύστημα έχουν ως αποτέλεσμα την βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας του οργάνου [49].

2.3.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC)

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την ανάλυση πτητικών ενώσεων. Περιλαμβάνει το διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος που επιτυγχάνεται με βάση τις διαφορικές αλληλεπιδράσεις των συστατικών του δείγματος με μια σταθερή φάση και μια κινητή αέρια φάση εφόσον τα συστατικά του δείγματος είναι πτητικά και βρίσκονται στην αέρια φάση.

Η βασική διάταξη της αέριας χρωματογραφίας αποτελείται από μια θύρα έγχυσης δείγματος, μια στήλη διαχωρισμού, έναν ανιχνευτή και ένα σύστημα καταγραφής δεδομένων. Η στατική φάση είναι συνήθως ένα υγρό υψηλού σημείου ζέσεως (Αέρια-Υγρή χρωματογραφία) ή ένα στερεό υλικό επικαλυμμένο σε στερεό φορέα (Αέρια-Στερεή χρωματογραφία), συσκευασμένο σε στήλη ή επικαλυμμένο στα τοιχώματα τριχοειδούς στήλης. Η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο, όπως το ήλιο ή το άζωτο, το οποίο μεταφέρει το δείγμα μέσω της στήλης και δεν αντιδρά με την στατική φάση ή με τις προς διαχωρισμό ενώσεις. Η διαδικασία αρχίζει με την έγχυση μικρού όγκου δείγματος στο όργανο. Το δείγμα εξατμίζεται στη θύρα έγχυσης και μεταφέρεται από το ρέον αέριο στη στήλη. Όπου γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών με την κατανομή τους στις δύο φάσεις. Πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας είναι η μεγάλη ευαισθησία και η ταχύτητα, ενώ τα συστατικά μπορούν να επανακτηθούν όπως στην μορφή τους στο αρχικό μίγμα [49].

2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Οι φασματοσκοπικές και φασματομετρικές τεχνικές ανάλυσης αποτελούν ένα ευρύ πεδίο μελέτης που αφορά την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Υπάρχουν διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση διαφόρων πτυχών των ουσιών και των ιδιοτήτων τους.

2.4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS)

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί τη μεγαλύτερη σε οικονομικά μεγέθη και την πλέον αναπτυσσόμενη αναλυτική τεχνική. Η Βιοαναλυτική χημεία βασίζεται κατά μεγάλο ποσοστό στη συνεχή τεχνολογική ανάπτυξη της φασματομετρίας μάζας. Πρόκειται για μια μέθοδο ταυτοποίησης ουσιών, κατά την οποία ηλεκτρόνια σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης προσκρούουν σε μόρια μιας ένωσης, που βρίσκεται στην αέρια φάση και παράγουν ιόντα με θετικό συνήθως φορτίο. Τα παραγόμενα ιόντα διαχωρίζονται στη συνέχεια με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους, m/e . Στο φασματόμετρο μαζών το δείγμα που βρίσκεται σε αέρια κατάσταση «βομβαρδίζεται» από ηλεκτρόνια που κινούνται με μεγάλη ταχύτητα και προκαλούν τον ιονισμό των

μορίων του. Πολλά από τα ιονιζόμενα μόρια αποκτούν τέτοια ενέργεια ώστε μετά την διάσπασή τους να σχηματίζουν ιόντα μικρότερης μάζας, θραύσματα ιόντων, καθώς και ουδέτερα μόρια. Το πρώτο ιόν που ταυτοποιείται είναι το μοριακό ιόν. Από την κορυφή του μοριακού ιόντος και των ισοτοπικών κορυφών του υπολογίζεται το μοριακό βάρος της ουσίας. Η μεγαλύτερη κορυφή ονομάζεται βασική κορυφή και με βάση αυτή μετρούνται τα ύψη των υπολοίπων κορυφών.

Η φασματομετρία μαζών συνδυάζεται συχνά με την αέρια χρωματογραφία (GC-MS). Ο συνδυασμός των δύο αποτελεί ένα ισχυρό μέσο ταυτοποίησης ουσιών που προέρχονται από πολύπλοκα μίγματα, με τον διαχωρισμό των ουσιών από την αέρια χρωματογραφία και την ταυτοποίηση τους από το φασματόμετρο μαζών. Η τεχνική GC-MS αποτελεί ίσως το καλύτερο αναλυτικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών ουσιών.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ ΜΕ (GC-MS)

Δείγματα αιθερίου ελαίου βασιλικού από τις δύο ποικιλίες αραιώνονται 1/100 σε διαιθυλαιθέρα (10 μL ελαίου σε 990 μL διαιθυλαιθέρα). Από την πρώτη αραιώση παίρνουμε 10 μL και τα αραιώνουμε σε 980 μL διαιθυλαιθέρα και τοποθετούμε και 10 μL κυκλοεξανόνη που αποτελεί το εσωτερικό πρότυπο. Τα δείγματα εισάγονται σε Αέριο χρωματογράφο (SCIION) συζευγμένο με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών (MS) και αυτόματο δειγματολήπτη (CP-8400), της εταιρείας Brucker. Η στήλη του χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν OptiMA-5 MS μη πολική, με μήκος 30m, εσωτερική διάμετρο 0,25mm και πάχος υλικού επίστρωσης 0,25μm (στατική φάση). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He), με ταχύτητα ροής 1,0 mL/min σε σταθερή πίεση. Η θερμοκρασία στον εισαγωγέα ήταν 220°C και στην πηγή ιονισμού 230°C. Η πηγή λειτούργησε με ηλεκτρική τάση 70 eV. Το πρόγραμμα ανάλυσης, το οποίο είχε διάρκεια 63,33 min, περιλάμβανε άνοδο της θερμοκρασίας της στήλης, η οποία αρχικά ήταν στους 60°C και τελικά αυξανόταν βαθμιαία μέχρι τους 250°C με ρυθμό 3°C/min στην τελική θερμοκρασία παραμένει το δείγμα για 10 min. Η διαδικασία διαρκεί συνολικά 70 min. Ο όγκος του προς ανάλυση δείγματος που εισέρχεται στον χρωματογράφο είναι 1μL. Η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου έγινε με σύγκριση των φασμάτων μάζας και των χρόνων έκλουσης με αυτών των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών NIST που υπάρχουν στο λογισμικό του οργάνου και με δεδομένα της βιβλιοθήκης Adams και της βιβλιογραφίας.

2.4.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR)

Η φασματοσκοπία IR αποτελεί μια από τις καλύτερες τεχνικές στην ποιοτική ανάλυση για τη διερεύνηση της μοριακής δομής και την ταυτοποίηση οργανικών ενώσεων. Η υπέρυθρη φασματοσκοπία αποδίδει μοριακά φάσματα απορρόφησης που απαιτούν μεγαλύτερο μήκος κύματος απ' ό,τι τα φάσματα υπεριώδους - ορατού, δηλαδή μικρότερο ποσό ενέργειας και οφείλονται σε διεγέρσεις δόνησης (τάσης και κάμψης) των δεσμών του μορίου και σε διεγέρσεις περιστροφής του μορίου. Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος χωρίζεται σε τρεις βασικές περιοχές: Εγγύς υπέρυθρη (Near IR, 13.300 – 4.000 cm^{-1}), μέσω υπέρυθρη (Mid IR, 4.000 – 400 cm^{-1}), και άπω υπέρυθρη (Far IR, 400 – 10 cm^{-1}). Όλες οι χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες και οι πολλαπλοί δεσμοί απορροφούν στο υπέρυθρο (δονήσεις τάσης), στη περιοχή 4000-1250 cm^{-1} που καλείται “περιοχή λειτουργικών ομάδων” ενώ στην περιοχή 1250 - 400 cm^{-1} η οποία καλείται περιοχή “περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος” παρατηρούνται οι δονήσεις κάμψης του μορίου συνολικά.

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση στερεών, υγρών αλλά και αέριων δειγμάτων. Τα στερεά δείγματα πολλές φορές λόγω της ανομοιογένειάς τους χρειάζονται περεταίρω επεξεργασία. Συνήθως το δείγμα κονιοποιείται και αναμειγνύεται με κονιοποιημένο και καλά ξηραμένο KBr. Στη συνέχεια το δείγμα πιέζεται σε ειδικό υδραυλικό πιεστήριο ώστε να πάρει τη μορφή λεπτού δισκίου. Τα υγρά δείγματα τοποθετούνται απευθείας σε κατάλληλη πλάκα στο όργανο για την λήψη του φάσματος ωστόσο απαιτείται προσοχή στο διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί καθώς οι διαλύτες δεν πρέπει να απορροφούν πάνω από 65% της εισερχόμενης ακτινοβολίας, διότι η ακτινοβολία εξασθενίζει και δεν παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για τη λήψη φάσματος.

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΘΡΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ Fourier (Fourier Transform InfraRed Spectroscopy, FT-IR)

Τα FT-IR φάσματα όλων των δειγμάτων ελήφθησαν με φασματοφωτόμετρο FT-IR Ostec IROS- 05 5017 (Simex Co.,Ltd, Russia) συνοδευόμενο από το λογισμικό ZAIR 3,5. Τα φάσματα των υγρών δειγμάτων καταγράφηκαν με την τεχνική της αποσβένουσας ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR), μιας ανάκλασης, ενώ των στερεών με την τεχνική του δισκίου. Η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν 4 cm^{-1} και πραγματοποιήθηκαν 64 σαρώσεις. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τις τεχνικές DRIFTS (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared spectroscopy) και ATR (Attenuated Total Reflectance spectroscopy) καθώς επρόκειτο και για υγρά δείγματα (αιθέριο έλαιο), αλλά και για λυοφιλιωμένα μίγματα σε σκόνη (σύμπλοκα εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου σε β -κυκλοδεξτρίνη).

Κάθε δισκίο παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας 2 mg δείγματος και 48 mg ξηρού KBr. Το μίγμα κονιορτοποιήθηκε και ομογενοποιήθηκε σε ιγδίο και μετατράπηκε σε δισκίο με χρήση υδραυλικής πρέσας (2 tn, 3 min).

Καταγράφηκαν τα φάσματα τριών υπο-δειγμάτων κάθε δείγματος (τρεις επαναλήψεις). Πριν από την καταγραφή των φασμάτων κάθε δείγματος λαμβάνονταν το φάσμα υποβάθρου το οποίο ήταν ή δισκίο KBr (τεχνική δισκίου) ή ο καθαρός κρύσταλλος (διαμάντι) του οργάνου.

Ακολούθησε η επεξεργασία των φασμάτων, η οποία πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονικό υπολογιστή που περιείχε το ειδικό λογισμικό OMNIC ver. 9.1.24 λογισμικό (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Η επεξεργασία περιλάμβανε την εξομάλυνση του θορύβου μέσω της λειτουργίας “automatic smoothing” και τη διόρθωση της βασικής γραμμής “automatic baseline correction”. Ακολούθως υπολογίστηκε το μέσο φάσμα κάθε δείγματος από τα τρία φάσματα των αντίστοιχων υποδειγμάτων.

2.5 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

Κατά την δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού η απαραίτητη προϋπόθεση είναι το εγκλεισμένο μόριο (guest) να έχει το κατάλληλο μέγεθος και σχήμα, ώστε να εφαρμόζει κατάλληλα στην κοιλότητα των ξενιστών (host). Ακόμα η πολικότητα τόσο του ξενιστή, αλλά κυρίως αυτή του ξενιζόμενου μορίου καθορίζουν την επίτευξη ή μη του εγκλεισμού. Επομένως η συμπλοκοποίηση μορίων καθορίζεται από την στερεοδιάταξη και την φύση των μορίων περισσότερο από τους χημικούς δεσμούς που θα σχηματιστούν μεταξύ τους. Όπως έχει αναφερθεί κατάλληλα μόρια ξενιστές για εγκλεισμό ξενιζόμενων μορίων αποτελούν οι κυκλοδεξτρίνες (CDs). Ο μοριακός εγκλεισμός επιτυγχάνεται καθώς τα ξενιζόμενα μόρια απομονώνονται το ένα από το άλλο στο χώρο και εγκλωβίζονται στις CDs λόγω της φύσης τους. Μεταξύ μορίων με παρόμοιες διαστάσεις, αυτά που έχουν μεγαλύτερη υδροφοβικότητα τείνουν να σχηματίζουν πιο εύκολα σύμπλοκα εγκλεισμού με CDs σε υδατικό περιβάλλον, αφού η κοιλότητα των CDs παρέχει ιδανικό υδρόφοβο μικροπεριβάλλον. Κατά την συμπλοκοποίηση συμβαίνει μια ποικιλία ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, καθώς και δεσμούς υδρογόνου που επηρεάζουν την διαμόρφωση των συμπλόκων και καθορίζουν τον βαθμό απελευθέρωσης των ξενιζόμενων μορίων.

Η παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους. Στην παρούσα εργασία, στηρίχθηκε στη δημιουργία υπερκορεσμένου διαλύματος, όπου η συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης και του φιλοξενούμενου μορίου υπερβαίνει το όριο διαλυτότητάς τους και τη συνεχή ανάδευση τους για χρονικό διάστημα 24-48 h. Στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η ανάπτυξη κρυστάλλων των συμπλόκων εγκλεισμού,

κατάλληλων για μελέτη με περίθλαση ακτίνων-Χ, γίνονται δοκιμές με μεταβολή διάφορων συνθηκών, όπως η θερμοκρασία και η συγκέντρωση. Καθώς το διάλυμα ψύχεται ή εξατμίζεται, τα πλεονάζοντα μόρια κυκλοδεξτρίνης ενώνονται, σχηματίζοντας ένα κρυσταλλικό πλέγμα. Ταυτόχρονα, τα μόρια του ξενιζόμενου μορίου, που είναι υδρόφοβα, εγκλωβίζονται μέσα στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού.

2.6 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ – Χ

Με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας, είναι δυνατό να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι σχετικές θέσεις των ατόμων ενός μορίου ή ενός συμπλόκου στον τρισδιάστατο χώρο, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή μια λεπτομερής ανάλυση της δομής τους. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην περίθλαση της ακτινοβολίας-Χ από μονοκρυστάλλους.

Η διαδικασία της κρυσταλλογραφικής μελέτης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- 1. Κρυστάλλωση του Δείγματος**
- 2. Συλλογή και Επεξεργασία Δεδομένων Περίθλασης**
- 3. Καθορισμός της Δομής**

2.6.1 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΝΟΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ

Η κρυστάλλωση αποτελεί το πρώτο βασικό βήμα σε μια κρυσταλλογραφική μελέτη. Στην περίπτωση των προϊόντων εγκλεισμού ουσιών σε κυκλοδεξτρίνες, η κρυστάλλωση περιλαμβάνει το σχηματισμό διατεταγμένων, τρισδιάστατων διατάξεων τόσο των ξενιστών όσο και των εγκλωβισμένων σε αυτούς μορίων. Το αρχικό στάδιο της κρυστάλλωσης είναι η πυρήνωση, όπου αρχίζουν να σχηματίζονται μικρές συστάδες ή πυρήνες της κρυσταλλικής φάσης από τα διαλυμένα βιομόρια. Η πυρήνωση μπορεί να προκύψει αυθόρμητα ή να προκληθεί με την προσθήκη ενός κρυστάλλου σπόρου ή μιας ξένης ουσίας (κρυσταλλοποϊητής) που χρησιμεύει ως πρότυπο για την ανάπτυξη κρυστάλλων. Μόλις σχηματιστούν οι πυρήνες, λειτουργούν ως θέσεις για περαιτέρω ανάπτυξη. Άτομα, ιόντα ή μόρια στην υγρή ή αέρια φάση συνεχίζουν να ενώνονται με τους υπάρχοντες πυρήνες, προκαλώντας την αύξηση του μεγέθους των κρυστάλλων. Η ανάπτυξη πραγματοποιείται προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση και ακολουθεί τη δομή του κρυσταλλικού πλέγματος, με αποτέλεσμα το χαρακτηριστικό σχήμα του κρυστάλλου.

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία κρυστάλλωσης. Η θερμοκρασία παίζει καθοριστικό ρόλο, καθώς επηρεάζει τη διαλυτότητα του υλικού και

τον ρυθμό ανάπτυξης των κρυστάλλων. Η ψύξη ενός κορεσμένου διαλύματος ή ενός υλικού που λιώνει μπορεί να προωθήσει την κρυστάλλωση. Η συγκέντρωση παίζει επίσης ρόλο, καθώς οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της διαλυμένης ουσίας τείνουν να ευνοούν τον σχηματισμό κρυστάλλων. Άλλοι παράγοντες όπως η ανάδευση, οι προσμίξεις και η παρουσία πρόσθετων ουσιών μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος, το σχήμα και την καθαρότητα των κρυστάλλων που προκύπτουν. Το σχήμα και η μορφή ενός κρυστάλλου εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της διάταξης των ατόμων ή των μορίων μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα, των συνθηκών ανάπτυξης και της παρουσίας προσμίξεων. Διαφορετικά κρυσταλλικά συστήματα, όπως το κυβικό, το τετραγωνικό, το ορθορομβικό και άλλα, παρουσιάζουν διακριτά γεωμετρικά σχήματα.

ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΡΓΗΣ ΨΥΞΗΣ

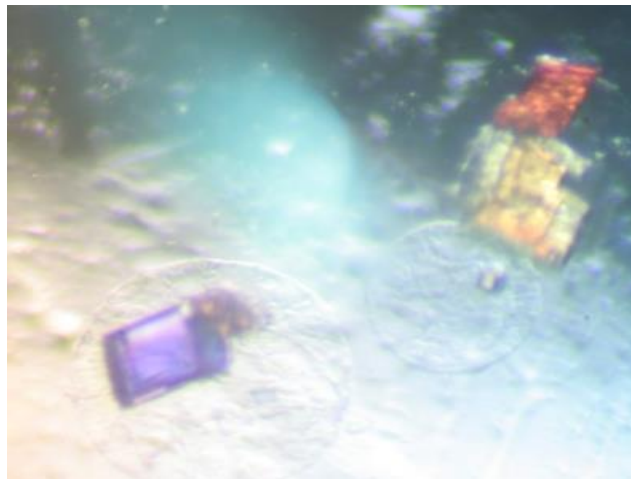
Υπάρχουν πολυάριθμοι τρόποι για την κρυστάλλωση βιομορίων, αλλά όλοι αποσκοπούν σε μια κατάσταση υπερκορεσμού του διαλύματος που βρίσκονται τα βιομόρια. Η διάχυση ατμών, η διάλυση, η άμεση προσθήκη ενός παράγοντα καταβύθισης (batch) και η διάχυση διεπιφάνειας είναι οι κύριες διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για στην κρυστάλλωση βιομορίων. Παράλληλα, η σταδιακή ψύξη ενός παρόμοιου διαλύματος μπορεί να οδηγήσει στην κρυστάλλωση μικροσκοπικών ή μεσαίου μεγέθους βιομορίων όπως συμβαίνει με τα υπερμοριακά σύμπλοκα κυκλοδεξτρίνης κατά την μέθοδο της αργής ψύξης.

Στο παρών πείραμα η συμπλοκοποίηση και η κρυστάλλωση των ενώσεων του αιθερίου ελαίου βασιλικού πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της αργής ψύξης (slow cooling crystallization). Ως ξενιστές χρησιμοποιήθηκαν οι κυκλοδεξτρίνες β -CD, DM- β -CD και TM- β -CD. Αιθέριο έλαιο βασιλικού και καθαρή λιναλόλη διαλυθήκαν σε υδατικό διάλυμα 2 mL με τους αντίστοιχους ξενιστές σε στοιχειομετρική αναλογία ξενιστή: ξενιζόμενου μορίου 2:1 (πίνακας 2.1) σύμφωνα με την εξίσωση (1). Πραγματοποιείται ανάδευση του διαλύματος σε θερμοκρασία του περιβάλλοντος επί τουλάχιστον 15 λεπτά και στη συνέχεια τα διαλύματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 70°C. Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με βαθμιαία ψύξη του διαλύματος του συμπλόκου από τους 70°C μέχρι τη θερμοκρασία δωματίου σε χρονικό διάστημα 8 ημερών. Η ελάττωση της θερμοκρασίας γινόταν με ρυθμό 5°C ανά 12 ώρες για τις πρώτες 3 μέρες, που ελαττώθηκε στη συνέχεια στους 4°C με 3°C. Μετά το πέρας του σταδίου ψύξης, τα δείγματα τοποθετήθηκαν για μια ημέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 18°C. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές για χάρη επαναληψιμότητας του πειράματος.

$$\frac{30}{MW_{host}} = \frac{x}{MW_{guest}} \quad (1)$$

Πίνακας 2.1 : Αναλογίες του αιθερίου ελαίου και της λιναλόλης και των κυκλοδεξτρινών β -CD, DM- β -CD και TM- β -CD που χρησιμοποιήθηκαν για την συμπλοκοποίηση και κρυστάλλωση τους, όπως υπολογίστηκαν από την εξίσωση (1).

	β CD	DM β CD	TM β CD
Όγκος νερού (ml)	2	2	2
Ποσότητα κυκλοδεξτρίνης (mg)	56	58	63
Όγκος αιθερίου ελαίου ή Λιναλόλης (μ l)	4	4	4



Εικόνα 2.2: Πρισματικοί κρύσταλλοι λιναλόλης/ β -CD σε υδατικό μέσο.

2.6.2 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ, ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΣΕ ΣΚΟΝΗ

Για την μελέτη του εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου του βασιλικού με φασματοσκοπία υπερύθρου πραγματοποιήθηκε η παραγωγή συμπλοκών εγκλεισμού του βασιλικού τα οποία παραλαμβάνονται υπό τη μορφή σκόνης, μετά από λυοφιλίωση. Η λυοφιλίωση, είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του νερού από διάφορες ουσίες, διατηρώντας παράλληλα τη δομή και τις ιδιότητές τους. Περιλαμβάνει την κατάψυξη του υλικού και στη συνέχεια την υποβολή του σε κενό για την απομάκρυνση του παγωμένου νερού με εξάχνωση, η οποία είναι η άμεση μετατροπή του πάγου σε υδρατμούς χωρίς να περάσει από την υγρή φάση.

Το υλικό καταψύχεται πρώτα σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, συνήθως μεταξύ -50°C έως -80°C σε θάλαμο κενού. Η κατάψυξη συμβάλλει στη διατήρηση της δομής και της ακεραιότητας της ουσίας. Στη συνέχεια η πίεση μειώνεται στο θάλαμο κενού. Αυτή η χαμηλότερη πίεση προκαλεί την εξάχνωση του παγωμένου νερού μέσα στο υλικό,

μετατρέποντάς το απευθείας από στερεό σε ατμό χωρίς να περάσει από την υγρή φάση. Αυτή η διαδικασία απαιτεί προσεκτικό έλεγχο της θερμοκρασίας και της πίεσης για να αποφευχθεί ο σχηματισμός μεγάλων κρυστάλλων πάγου και να εξασφαλιστεί η αποτελεσματική ξήρανση. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται πρωτογενής ξήρανση (εξάχνωση). Το μεγαλύτερο μέρος του νερού έχει απομακρυνθεί μέσω της εξάχνωσης. Στη συνέχεια, κατά την δευτερογενή ξήρανση (εκρόφηση), η θερμοκρασία αυξάνεται ελαφρώς για να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείναντα δεσμευμένα μόρια νερού. Το στάδιο αυτό συμβάλλει στην περαιτέρω μείωση της περιεκτικότητας σε νερό και στην ενίσχυση της σταθερότητας και της διάρκειας ζωής του τελικού προϊόντος.

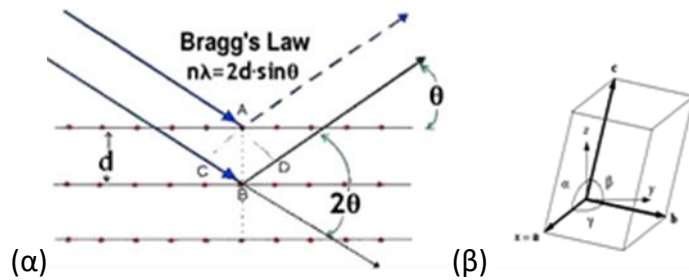
Τα διαλύματα εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου βασιλικού σε β -CD, RM β CD και HP β CD προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τον **πίνακα 2.2** και στη συνέχεια αναδευτήκαν για 24h στους 25°C. Μετά το πέρας των 24 ωρών τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε φιάλες λυοφιλίωσης και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη για άλλες 24 ώρες. Ακολούθησε η διαδικασία της λυοφιλίωσης στο μηχάνημα του εργαστηρίου (Virtis 25 EL Freemobile) για 72h για την απομάκρυνση του νερού και παραλήφθηκαν τα δείγματα σε σκόνη.

***Πίνακας 2.2:** Αναλογίες του αιθερίου ελαίου και της Λιναλόλης και των κυκλοδεξτρινών β -CD, RM- β -CD και HP- β -CD που χρησιμοποιήθηκαν για την συμπλοκοποίηση και την παραλαβή τους σε σκόνη.*

	β CD	HP β CD	RM β CD
Όγκος νερού (ml)	2	2	2
Ποσότητα κυκλοδεξτρίνης (mg)	56	48	45
Όγκος αιθερίου ελαίου ή Λιναλόλης (μ l)	4	4	4

2.6.2 ΣΥΛΛΟΓΗ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΘΛΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΥΣΗ ΔΟΜΗΣ

Αρχικά, επιλέγουμε έναν κατάλληλο μονοκρυστάλλο, ο οποίος πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια: να έχει κατάλληλο μέγεθος μεταξύ 0.09 έως 0.8 χιλιοστών σε κάθε διάσταση, να μην έχει ρωγμές, να είναι σταθερός στο κρυσπροστατευτικό διάλυμα (συνήθως παραφινέλαιο), και να μην εμφανίζει διδυμία. Ο κατάλληλος μονοκρυστάλλος τοποθετείται απέναντι από την πηγή της μονοχρωματικής ακτινοβολίας-Χ. Από την περίθλαση αυτής της ακτινοβολίας προκύπτει πλήθος δευτερευουσών δεσμών. Μπορούμε να θεωρήσουμε ότι αυτές οι δέσμες είναι αποτέλεσμα της ανάκλασης της αρχικής ακτινοβολίας στα επίπεδα hkl του κρυστάλλου, σύμφωνα με τον νόμο Bragg (**Εικόνα 2.3**).



Εικόνα 2.3: (α) Σχηματική απεικόνιση του νόμου Bragg και (β) οι διαστάσεις μιας μοναδιαίας κυψελίδας, θεωρούνται οι τιμές των ακμών a, b, c και γωνιών α, β, γ αυτής

Για τη συλλογή δεδομένων με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας, επιλέγουμε αρχικά έναν κρύσταλλο που πληροί συγκεκριμένα κριτήρια. Αυτά περιλαμβάνουν τον κατάλληλες διαστάσεις, ώστε κατά τη συλλογή δεδομένων να διατηρείται μόνιμα υπό μια δέσμη ακτινοβολίας σταθερής έντασης. Η περιστροφή του κρυστάλλου γίνεται από μια ακίδα, που ονομάζεται γωνιομετρική κεφαλή, κάθε σημείο του πρέπει να λαμβάνει σταθερή και αμείωτη ένταση ακτινοβολίας. Η συλλογή των δεδομένων γίνεται με χρήση ενός ανιχνευτή, ο οποίος καταγράφει τις εντάσεις των ανακλάσεων. Ο αριθμός αυτών των ανακλάσεων εξαρτάται από την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, την ποιότητα του κρυστάλλου και τη στρατηγική που επιλέγεται για τη συλλογή δεδομένων, όπως το κρυσταλλικό σύστημα, η επαναληψιμότητα, και ο χρόνος έκθεσης του δείγματος σε κάθε προσανατολισμό. Με την ολοκλήρωση της συλλογής δεδομένων, το σύνολο των ανακλάσεων υποβάλλεται σε επεξεργασία, κατά την οποία προσδιορίζεται η ομάδα χώρου και εφαρμόζονται διορθώσεις απορροφήσεως. Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήθηκε το εργαστηριακό περιθλασίμετρο D8 Venture της εταιρείας Bruker.

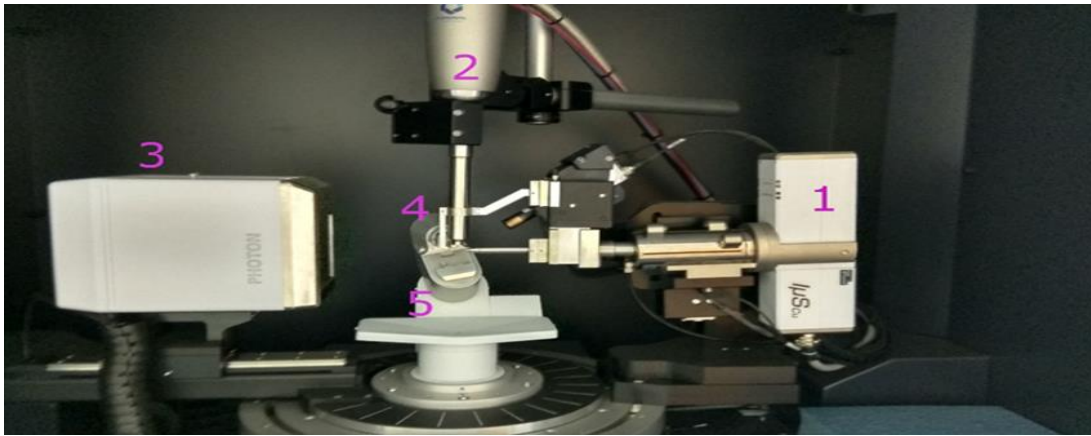
Σε ένα τέτοιο όργανο, οι ακτίνες-X παράγονται με το να βομβαρδίζεται μια μεταλλική επιφάνεια με ηλεκτρόνια που κινούνται με μεγάλη ταχύτητα. Η μεταλλική επιφάνεια αποτελείται συνήθως από διάφορα μέταλλα, αλλά στην περίπτωση μας, το κύριο μέταλλο είναι ο χαλκός (Cu). Η πρόσκρουση των ηλεκτρονίων στην μεταλλική επιφάνεια οδηγεί στην παραγωγή ακτινοβολίας Κ α ή Κ β . Στην περίπτωση του χαλκού το μήκος κύματος της παραγόμενης ακτινοβολίας είναι 1,5418Å. Η διαδικασία υπόκειται σε συνθήκες κενού σε κατάλληλους σωλήνες παραγωγής ακτίνων – Χ. Ένα τυπικό περιθλασίμετρο περιλαμβάνει τα εξής στοιχεία:

1. Μια πηγή ακτινοβολίας που εξοπλίζεται με μονοχρωμάτορα για την επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος και σχισμές που καθορίζουν το σχήμα της ακτίνας.
2. Ένα σύστημα αδιάκοπης παροχής αζώτου (N $_2$), προκειμένου ο κρύσταλλος να διατηρείται συνεχώς σε σταθερή θερμοκρασία (συνήθως 100 ή 120K) κατά την συλλογή των δεδομένων.

3. Έναν ανιχνευτή που καταγράφει τις εντάσεις των ανακλάσεων από τη σκέδαση των ακτίνων-Χ από το δείγμα.
4. Μια ειδική παγίδα (beamstop) προκειμένου να μειωθεί η ένταση της ακτινοβολίας που δεν έχει σκεδαστεί από το δείγμα.
5. Μια γωνιομετρική κεφαλή για τον προσανατολισμό του δείγματος και των θέσεων του ανιχνευτή.

Στο περιθλασίμετρο D8 Venture της εταιρείας Bruker, η πηγή ακτινοβολίας ελέγχεται από το σύστημα μ S Microfocus X-ray Source, ο ανιχνευτής είναι ο PHOTON 50 (τύπου CMOS). Η διατήρηση της απαιτούμενης θερμοκρασίας γίνεται από το σύστημα CryoStream 800series της Oxford CryoSystems.

A)



B)



Εικόνα 2.4: Απεικόνιση των τμημάτων του περιθλασίμετρου D8 Venture της Bruker, με τον την πηγή των ακτίνων (1), τη συσκευή παροχής ρεύματος αζώτου (2), τον ανιχνευτή PHOTON 50 (3), την ειδική παγίδα

των ακτίνων (4) και την γωνιομετρική κεφαλή (5) και (B) μέρη της συσκευής Cryostream 800series της Oxford CryoSystems (δύο δεξαμενές αποθήκευσης, σύστημα ελέγχου παροχής αζώτου και αντλία)

Επεξεργασία δεδομένων από σκέδαση ακτίνων-Χ

Με την συλλογή των εικόνων περίθλασης ξεκινάει η επεξεργασία των δεδομένων. Μια διαδικασία που σκοπό έχει την δημιουργία ενός αρχείου που περιέχει την ένταση κάθε ανάκλασης που καταγράφηκε στον ανιχνευτή. Η επεξεργασία των δεδομένων αυτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό APEX3 της εταιρείας Bruker και περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια:

1. Δεικτοδότηση (Indexing): Καταρχάς, πραγματοποιήθηκε η δεικτοδότηση των εικόνων περίθλασης και η εύρεση της κατάλληλης μοναδιαίας κυψελίδας στο πλέγμα.
2. Ολοκλήρωση (Integration): Τα δεδομένα περίθλασης ολοκληρώθηκαν για να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις διαστάσεις της κυψελίδας. Αυτή η διαδικασία περιλάμβανε τη χρήση του προγράμματος SAINT (APEX 3, 2012).
3. Εύρεση Ομάδας Χώρου (Space Group Determination): Η ομάδα χώρου εντοπίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα XPREP (APEX 3, 2012), το οποίο αναγνώρισε τα στοιχεία συμμετρίας που καθορίζουν την ομάδα χώρου.
4. Κανονικοποίηση και Συγχώνευση (Scaling and Merging): Τα δεδομένα ανακλάσεων ακολούθησαν μια διαδικασία κανονικοποίησης και συγχώνευσης, προκειμένου να ευθυγραμμιστούν όλες οι ανακλάσεις σε μια κοινή κλίμακα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν διορθώσεις λόγω φυσικών παραγόντων του πειράματος για να εκτιμηθεί ακριβώς η ένταση.
5. Διόρθωση Απορρόφησης (Absorption Correction): Η διόρθωση απορρόφησης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SADABS (APEX 3, 2012).

Στο τέλος αυτής της διαδικασίας, προήλθε ένα αρχείο τύπου hkl που περιείχε τους δείκτες Miller, τις εντάσεις και τα αντίστοιχα σφάλματά τους.

Για τον πλήρη προσδιορισμό της δομής, απαιτείται η ανάκτηση των φάσεων, και αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της Μεθόδου Dual Space, όπου οι φάσεις ανακτώνται από επαναλαμβανόμενες τροποποιήσεις του μοντέλου τόσο στον ευθύ χώρο (ηλεκτρονική πυκνότητα) όσο και στον αντίστροφο χώρο (παράγοντες δομής). Η διαδικασία βελτιστοποίησης αφορά την προσαρμογή των παραμέτρων της δομής με μαθηματικές μεθόδους στατιστικής προσαρμογής, γνωστές ως ελάχιστα τετράγωνα (Least Squares, L.S), με σκοπό το τελικό μοντέλο να συμφωνεί όσο το δυνατό καλύτερα με τα πειραματικά δεδομένα. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιεί το πρόγραμμα SHELXL [50].

Σημαντικά κριτήρια αξιολόγησης για την ποιότητα της βελτιστοποίησης είναι οι τιμές των δεικτών αξιοπιστίας R_1 και wR_2 . Αυτοί οι δείκτες αντικατοπτρίζουν την συμφωνία μεταξύ των πειραματικών τιμών $|F_o|$ και των αντίστοιχων υπολογιζόμενων $|F_c|$ και υπολογίζονται ως εξής:

$$R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|} \quad (2) \quad wR_2 = \left[\frac{\sum (F_o^2 - F_c^2)^2}{\sum w F_o^2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Αυτοί οι δείκτες αξιολογούν την ποιότητα της δομής και το βαθμό συμφωνίας με τα πειραματικά δεδομένα, όπου w το στατιστικό βάρος.

Κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης της κρυσταλλικής δομής, είναι αναγκαίο να ελέγχονται επίσης οι παράμετροι και οι περιορισμοί-εξαναγκασμοί (restraints – constraints), καθώς αυτοί συμβάλλουν στην επίτευξη μιας φυσικά εφικτής και φυσικοχημικά αιτιολογημένης δομής. Οι παράμετροι του μοντέλου περιλαμβάνουν:

1. Ανεξάρτητες συντεταγμένες x, y, z : Αυτές μπορεί να είναι είτε κλασματικές είτε πραγματικές συντεταγμένες.
2. Θερμικοί παράγοντες: Οι θερμικοί παράγοντες μπορούν να είναι ιστροπικοί (Isotropic) ή ανιστροπικοί (Anisotropic), και αντικατοπτρίζουν την κίνηση των ατόμων.
3. Αριθμός κατάληψης: Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως σε σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών, τα μικρά ξενιζόμενα μόρια είναι σχεδόν πάντα αποδιατεταγμένα.

Σε κάθε βήμα της διαδικασίας βελτιστοποίησης, είναι σημαντικό να ελέγχονται και να εφαρμόζονται περιορισμοί (restraints) και εξαναγκασμοί (constraints) που βασίζονται σε γεωμετρικές αρχές. Αυτοί οι περιορισμοί αφορούν στα ακόλουθα:

- Μήκη δεσμών.
- Γωνίες μεταξύ των δεσμών.
- Χειρομορφία.
- Δεσμούς Van der Waals.
- π-π αλληλεπιδράσεις.
- Υδρογονικούς δεσμούς.
- Γενικότερη μοριακή διάταξη στον χώρο.

Κάθε περιορισμός πρέπει να εφαρμόζεται κατάλληλα και συνήθως συνοδεύεται από ένα στατιστικό βάρος (weight) που επηρεάζει τον τρόπο υπολογισμού των πειραματικών δεδομένων. Στο τέλος κάθε βήματος, πρέπει να αξιολογείται η ποιότητα του μοντέλου.

Η βελτιστοποίηση της κρυσταλλικής δομής θεωρείται ότι έχει ολοκληρωθεί εάν ικανοποιούνται οι παρακάτω όροι:

1. Όλα τα άτομα της ασύμμετρης μονάδας έχουν βρεθεί, και η υπολειπόμενη ηλεκτρονική πυκνότητα είναι μικρότερη από $0.63 \text{ e}/\text{\AA}^3$ για ανάλυση σε διακριτική ικανότητα περίπου 1 \AA .
2. Ο λόγος της μέγιστης μετατόπισης (με εφαρμογή ελαχίστων τετραγώνων) προς το μέγιστο σφάλμα είναι σημαντικά μικρότερος της μονάδας.
3. Ο συντελεστής αξιοπιστίας R_1 έχει τη μικρότερη δυνατή τιμή. Αποδεκτή τιμή για υπερμοριακά σύμπλοκα (π.χ. σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών) είναι κοντά κάτω από το 0.1 ή 10%. Ο συντελεστής wR_2 πρέπει να είναι περίπου τριπλάσιος του R_1 , δηλαδή να έχει την τιμή 0,3.

Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την καταχώριση των ατομικών συντεταγμένων και των παραγόντων δομής σε βάσεις δεδομένων όπως η Cambridge Structural Database CSD για περαιτέρω ανάλυση και αναφορά [51].

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε ένας καθαρός, διαφανής κρύσταλλος διαστάσεων $0.050 \text{ mm} \times 0.100 \text{ mm} \times 0.200 \text{ mm}$ (**Εικόνα 2.2**) για την δομική μελέτη. Το μήκος κύματος ήταν $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2.3**. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε στο μονοκλινές σύστημα όπου καταγράφηκαν 41872 ανακλάσεις με μια μέγιστη γωνία σάρωσης θ ίση με 44.66° , που αντιστοιχεί σε διακριτικότητα ίση με 1.10 \AA . 5281 από τις παραπάνω ανακλάσεις ήταν ανεξάρτητες (με επαναληπτικότητα (average redundancy) 7.935, πληρότητα δεδομένων 99.6%, δείκτη R_{int} 5.27%,) και 5107 εντοπίστηκαν να πληρούν το κριτήριο $2\sigma(F^2)$.

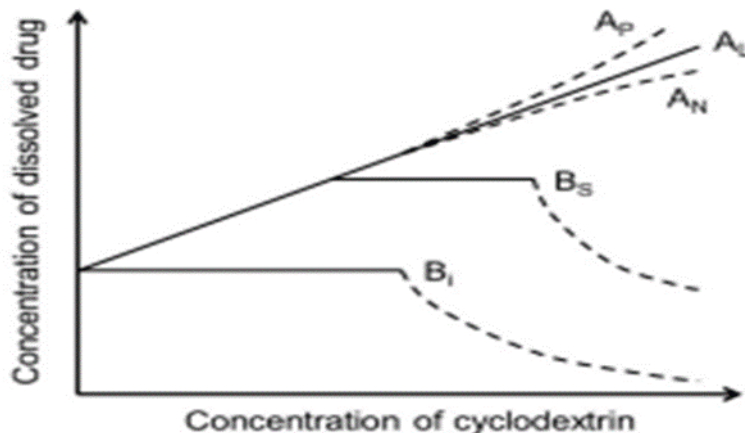
Η δομή επιλύθηκε με το πρόγραμμα *ShelXD* και η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση τα ελάχιστα τετράγωνα (πρόγραμμα *SHELXL*) για τα F^2 με 441 παραμέτρους και έδωσε δείκτες αξιοπιστίας $R_1 = 11.16 \%$, και $wR_2 = 25.7 \%$. Ο δείκτης προσαρμογής (goodness-of-fit, S) ήταν 1,09. Στον **πίνακα 2.3** εμφανίζονται όλες οι παράμετροι της κρυσταλλογραφικής μελέτης.

Πίνακας 2.3: Χαρακτηριστικά κρυστάλλου, συλλογή-επεξεργασία δεδομένων και βελτιστοποίηση της δομής.

Λιναλοόλη β-CD	
Πειραματικά δεδομένα	
Χημικός Τύπος	$C_{42}H_{70}O_{35} \cdot C_{10}H_{18}O \cdot 8.5(O)$
Μοριακό Βάρος	1425.22
Κρυσταλλικό Σύστημα, Ομάδα χώρου	Μονοκλινές, C2
Θερμοκρασία (K)	100
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	a=18.8815 (17), b= 24.343 (2), c=15.5896 (13)
β (°)	110.260 (4)
Όγκος μοναδιαίας κυψελίδας (Å ³)	6722.0 (10)
Z, Υπολογισμένη πυκνότητα	4, 1.345 g/cm ³
Πηγή ακτινοβολίας	Cu K α
Συντελεστής απορρόφησης μ (mm ⁻¹)	1.09
Διαστάσεις κρυστάλλου (mm ³)	0.2 × 0.1 × 0.05
Συλλογή δεδομένων	
Περιθλασίμετρο	Bruker APEX-II
T_{min}, T_{max}	0.618, 0.749
Αριθμός ανακλάσεων: καταγεγραμμένων / ανεξάρτητων / παρατηρούμενων με κριτήριο [$I > 2\sigma(I)$]	41872, 5281, 5107
R_{int}	0.053
θ_{max} (°)	44.7
$(\sin \theta/\lambda)_{max}$ (Å ⁻¹)	0.456
Βελτιστοποίηση	
Τελικοί δείκτες αξιοπιστίας $R[F^2 > 2s(F^2)], wR(F^2), S$	0.112, 0.257, 1.09
Αριθμός Ανακλάσεων	5281
Αριθμός Παραμέτρων	441
Περιορισμοί	51
Προσδιορισμός ατόμων H	Υπολογιστικά
$\Delta\rho_{max}, \Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	0.70, -0.47

2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΦΑΣΗΣ

Οι μελέτες φάσης διαλυτότητας είναι μια συνηθισμένη προσέγγιση στη φαρμακευτική και τη φυσικοχημεία για να εξεταστεί η συμπεριφορά διαλυτότητας ενός φαρμάκου σε διάφορους διαλύτες ή υπό διάφορες συνθήκες. Η συμπεριφορά της διαλυτότητας των μορίων που εγκλείονται σε κυκλοδεξτρίνες αναλύεται από τα διαγράμματα διαλυτότητας φάσης. Κατά το σχηματισμό του συμπλόκου δεν διασπώνται ούτε σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί και, σε υδατικά διαλύματα, τα μόρια του φαρμάκου που είναι δεσμευμένα στο σύμπλοκο βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία με μη δεσμευμένα μόρια, όπου τα σύμπλοκα σχηματίζονται και διαλύονται συνεχώς σε χρονική κλίμακα χιλιοστών έως μικροδευτερολέπτων. Η ταξινόμηση των συμπλόκων ξενιζόμενου μορίου/CD βασίζεται στο έργο των Higuchi και Connors και στις μελέτες τους για τα προφίλ διαλυτότητας φάσης. Σύμφωνα με τους Higuchi και Connors. Τα υδατοδιαλυτά σύμπλοκα σχηματίζουν τύπου A προφίλ διαλυτότητας. Στα προφίλ τύπου A_L παρατηρείται γραμμική αύξηση της διαλυτότητας του φαρμάκου με την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλυτοποιητικού παράγοντα (δηλαδή της κυκλοδεξτρίνης). Αυτό υποδηλώνει το σχηματισμό συμπλόκου φαρμάκου-διαλυτοποιητικού παράγοντα 1:1. Προφίλ που εμφανίζουν θετική απόκλιση από τη γραμμικότητα (δηλαδή, προφίλ τύπου A_p) συνήθως σχηματίζουν σύμπλοκα πρώτης τάξης σε σχέση με το φάρμακο και δεύτερης ή ανώτερης τάξης σε σχέση με τον ξενιστή (π.χ. σύμπλοκο φαρμάκου/CD 1:2). Στα γραμμικά προφίλ τύπου A_N παρατηρείται αρνητική απόκλιση από τη γραμμικότητα δηλαδή ο ξενιστής παρουσιάζει αναλογικά μικρότερη αποτελεσματικότητα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις). Τα προφίλ διαλυτότητας φάσης τύπου B παρατηρούνται όταν το σύμπλοκο έχει περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό. Η διαλυτότητα αυξάνει αρχικά και στη συνέχεια φτάνει σε ένα πλατό. Αυτό υποδηλώνει το σχηματισμό συμπλόκων ανώτερης τάξης τα οποία οδηγούν στην καταβύθιση της περίσσειας των συμπλόκων [52].



Εικόνα 2.5: Ταξινόμηση των προφίλ διαλυτότητας φάσης ξενιζόμενου μορίου/κυκλοδεξτρίνης, σύμφωνα με τους Higuchi και Connors.

2.7.1 ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗΣ ΣΕ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

Η περιορισμένη υδατοδιαλυτότητα της λιναλόολης μπορεί να προκαλέσει την κακή κατανομή της σε ένα προϊόν με βάση το νερό. Για την διερεύνηση της διαλυτότητας της λιναλόολης σε υδατικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις διαλυτότητας σε συστήματα εγκλεισμού της λιναλόολης με κυκλοδεξτρίνες. Αρχικά παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα β -CD (0 – 15 mM) και HP- β -CD (0 – 60mM). Τα διαλύματα β -CD παρασκευάστηκαν μέχρι 15 mM ώστε να μην ξεπερνάει το όριο διαλυτότητας του συγκεκριμένου μορίου στο νερό που είναι περίπου 16,3 mM. Στη συνέχεια περίσσεια (50 mg) λιναλόολης (97%, Sigma Aldrich) προστέθηκε στα διαλύματα CD για το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού. Τα μείγματα ανακινήθηκαν σε επωαστήριο στους 25°C και 160 rpm για 72 h. Μετά το πέρας των 72 ωρών τα διαλύματα διηθήθηκαν μέσω φίλτρου νάilon μεμβράνης 0,20 μ m (Sterile – R – No 83.182.001) για την απομάκρυνση της περίσσειας λιναλόολης. Η ποσότητα της λιναλόολης που διαλύθηκε στο διήθημα αναλύθηκε στη συνέχεια με φασματοσκοπία υπεριώδους (UV) στα 192 nm για τα διαλύματα β -CD και στα 207 nm για τα διαλύματα HP- β -CD. Για τις μετρήσεις απορρόφησης στο UV πραγματοποιήθηκε αραίωση των αρχικών διαλυμάτων 1:100. Η σταθερά Kc (binding constant) και η απόδοση συμπλοκοποίησης CE (complexation efficiency) υπολογίστηκαν με τη μέθοδο των Higuchi & Connors (1965)[53] για σύμπλοκα στοιχειομετρίας ξενιστή προς ξενιζόμενο μόριο 1:1 από την κλίση (slope) του γραμμικού τμήματος των διαγραμμάτων διαλυτότητας και τη διαλυτότητα S₀ της λιναλόολης στο νερό απουσία κυκλοδεξτρίνης, σύμφωνα τις εξισώσεις:

$$Kc = \text{slope} / S_0 (1 - \text{slope}) \quad (\text{Lmol}^{-1}) \quad (4)$$

$$CE = \text{slope} / (1 - \text{slope}) \quad (5)$$

2.7.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

Η μοριακή δυναμική (MD) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται στο πεδίο της υπολογιστικής χημείας για να προβλέπει την κίνηση των ατόμων και των μορίων ενός συστήματος, όπως για παράδειγμα ενός συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης, με τη χρήση υπολογιστικών προσομοιώσεων (*in silico* τεχνική). Συγκεκριμένα, τα άτομα του συστήματος αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και με το περιβάλλον τους (που αποτελεί κυρίως το νερό) και υπολογίζεται η δύναμη που δρα πάνω σε κάθε άτομο. Με βάση αυτές τις δυνάμεις, μπορούμε να προβλέψουμε την τροχιά της κίνησης των ατόμων με την πάροδο του χρόνου, επιλύοντας τις εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα.

Στην διατριβή αυτή, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα AMBER 12 για προσομοιώσεις που εκτείνονται πέραν των 10 ns [54]. Στο σημείο αυτό πρέπει να δώσουμε τον ορισμό του πεδίου δυνάμεων (force field), το οποίο παρέχει μια μαθηματική περιγραφή της συνολικής δυναμικής ενέργειας του συστήματος με βάση τις θέσεις των μορίων του στο χώρο. Οι δυνάμεις που δρουν μεταξύ των ατόμων υπολογίζονται με βάση παραμέτρους που βασίζονται σε ημι-εμπειρικές μεθόδους κβαντικής μηχανικής ή πειραματικά δεδομένα, όπως τα δεδομένα από πειράματα NMR.

Κάθε πεδίο δυνάμεων προσδιορίζει διαφορετικές παραμέτρους με σκοπό την καλύτερη περιγραφή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων και την πιο ακριβή πρόβλεψη της συνολικής δυναμικής ενέργειας. Για παράδειγμα, όσον αφορά τις κυκλοδεξτρίνες, το πεδίο δυνάμεων GLYCAM [55] αποτελεί την πιο κατάλληλη επιλογή, καθώς λαμβάνει υπόψη όλες τις επιτρεπτές αποστάσεις και γωνίες μεταξύ των γλυκοζών που αλληλοεπιδρούν στην προσομοίωση.

Για την περιγραφή της κίνησης των μορίων του διαλύτη (στην περίπτωση σας, του νερού) και της επίδρασής τους στο σύστημα, χρησιμοποιούνται θεωρητικά μοντέλα. Αυτά τα μοντέλα μπορούν να είναι "άμεσα" (explicit) ή "έμμεσα" (implicit). Στα "άμεσα" μοντέλα, τα ατομικά στοιχεία του διαλύτη λαμβάνονται υπόψη με συγκεκριμένο τρόπο, ενώ στα "έμμεσα" μοντέλα, οι ιδιότητες του διαλύτη αντικαθίστανται από ένα ομοιογενές μέσο με ισοδύναμες ιδιότητες.

Συγκεκριμένα για το νερό, το μοντέλο TIP3P είναι ένα δημοφιλές "άμεσο" μοντέλο [56], το οποίο χαρακτηρίζεται από απλότητα και αποτελεσματικότητα. Αυτό το μοντέλο λαμβάνει υπόψη τη γεωμετρία των μορίων νερού και καθορίζει φορτία για κάθε άτομο.

Επίσης, καθορίζονται οι διαστάσεις και η γεωμετρία του συστήματος (box size) που χρησιμοποιείται στην προσομοίωση. Αυτές οι παράμετροι πρέπει να επιλεγούν με προσοχή, έτσι ώστε να αποφευχθούν παραπλανητικές εκτιμήσεις που μπορεί να προκύψουν από τις αλληλεπιδράσεις με γειτονικά μόρια που βρίσκονται εκτός των ορίων του ορισμένου περιβάλλοντος του συστήματος.

Επιπλέον, είναι απαραίτητο να διασφαλιστεί ότι το σύστημα παραμένει σταθερό απέναντι σε διάφορες μεταβολές, όπως ο αριθμός των μορίων (N), το όγκο (V), η ενέργεια (E), η θερμοκρασία (T) και η πίεση (P). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της επιλογής ενός κατάλληλου συνόλου παραμέτρων (ensemble). Τα τρία κύρια σύνολα είναι το μικροκανονικό (microcanonical) με σταθερά (N), (V), (E), το κανονικό (canonical) με σταθερά (N), (V), (T) και το ισόθερμο-ισοβαρικό (isothermal-isobaric) με σταθερά (N), (P), (T).

Κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, παράγονται στιγμιότυπα (frames) που καταγράφουν την κίνηση και την ταχύτητα των σωματιδίων του συστήματος καθώς ο χρόνος προχωρά (trajectories). Αυτά τα δεδομένα μπορούν να απεικονιστούν και να εξεταστούν με τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων (όπως το Visual Molecular Dynamics - VMD) [57].

Επιπλέον, με τη βοήθεια μεθόδων μοριακής μηχανικής (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann ή Generalised Born Surface Area continuum solvation - MM/PBSA, MM/GBSA) [58], καθίσταται εφικτός ο θεωρητικός υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης (binding - ΔG_{GB}) για τη διαδικασία εγκλεισμού. Αυτή η ενέργεια πρόσδεσης αποτελεί το άθροισμα των αντίστοιχων ενεργειών της αέριας (gas) και της διαλυτοποιημένης (solvation) φάσης, δηλαδή $\Delta G_{GB} = \Delta G_{gas} + \Delta G_{solv}$.

Επίσης, με τη χρήση προγραμμάτων όπως το CCPTRAJ [59] του AMBER12, υπολογίζεται η εντροπία (ΔS) και συνεπώς, ο εντροπικός όρος ($T \cdot \Delta S$). Έτσι, η ελεύθερη ενέργεια του συστήματος (ΔG_{bind}) υπολογίζεται ως $\Delta G_{bind} = \Delta G_{GB} - T \cdot \Delta S$.

ενώ η εντροπία της διαμόρφωσης είναι σημαντικός παράγοντας στην πραγματική διαδικασία εγκλεισμού, η παραδοσιακή μέθοδος υπολογισμού της ΔG_{GB} δεν την λαμβάνει υπόψη. Επομένως, οι συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών εναλλακτικών δεσμών βασίζονται κυρίως στην ενέργεια Gibbs (ΔG_{GB}) που υπολογίζεται και δεν λαμβάνουν υπόψη την εντροπία διαμόρφωσης [60].

2.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Οι δοκιμές αντιοξειδωτικών και ολικών φαινολικών χρησιμοποιούνται συνήθως για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά διαφόρων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των φυσικών προϊόντων, των δειγμάτων τροφίμων και των φυτικών εκχυλισμάτων. Οι δοκιμές αυτές παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τα πιθανά οφέλη για την υγεία και την οξειδωτική σταθερότητα αυτών των ουσιών.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά αντιδραστικά μόρια που μπορούν να βλάψουν τα κύτταρα και να συμβάλουν σε διάφορες ασθένειες και διαδικασίες γήρανσης. Οι αντιοξειδωτικές δοκιμές μας βοηθάνε να μετρήσουμε την ικανότητα μιας ουσίας να αναστέλλει ή να εξουδετερώνει τις επιβλαβείς επιδράσεις των ελεύθερων ριζών. Αντίθετα η δοκιμή ολικών φαινολικών προσδιορίζει την περιεκτικότητα ενός δείγματος σε φαινόλες. Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που βρίσκονται στα φυτά και είναι γνωστές για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και τα πιθανά οφέλη για την υγεία. Βρίσκονται σε αφθονία στα φρούτα, τα λαχανικά, τους ξηρούς καρπούς και διάφορα προϊόντα φυτικής προέλευσης.

2.8.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΔΟΚΙΜΗ DPPH

Το 2,2-διφαινυλο -1- πικρυλυδραζύλιο: DPPH είναι μία σταθερή ρίζα που διατίθεται στο εμπόριο. Τα οργανικά του διαλύματα απορροφούν στα 517 nm και παρουσιάζουν ένα έντονο ιώδες χρώμα. Η δοκιμή βασίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αντιδρούν με το διάλυμα του DPPH και να το αποχρωματίζουν. Αυτή η φασματοφωτομετρική δοκιμή χρησιμοποιεί τη ρίζα του DPPH ως αντιδραστήριο. Μετά από επώαση αντιδραστήριου και δείγματος στους 25 °C, για 1 h, μετράται η απορρόφηση στα 525 nm. Στην συνέχεια υπολογίζεται το ποσοστό της παρεμποδιστικής δράσης κάθε δείγματος με την χρήση του τύπου: $I \% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$,

όπου: $I \% = \eta \%$ παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας, $A_0 = \eta$ απορρόφηση του τυφλού, $A = \eta$ απορρόφηση του δείγματος.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH. Αρχικά ζυγίζονται 4 mg από το εμπορικό σκεύασμα DPPH, τα οποία διαλύονται σε μεθανόλη. Στην συνέχεια, 30 mL δείγματος και 3 mL διαλύματος DPPH τοποθετούνται σε φυαλίδια και μετά από επώαση για 1 h σε σκοτεινό περιβάλλον, ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 517 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού UV – Vis μοντέλο V-1200 (VWR Spectrophotometers) και πραγματοποιείται ο προσδιορισμός του ποσοστού της παρεμπόδισης (I%). Όλα τα δείγματα μετρούνται τρεις φορές. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox (6 - υδροξυ - 2,5,7,8 - τετραμεθυλωχρωμαν - 2 - καρβοξυλικό οξύ), που είναι ένα υδατοδιαλυτό, ισχυρό αντιοξειδωτικό, ανάλογο της βιταμίνης E. Παρασκευάζονται διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων Trolox, ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με αυτή των δειγμάτων και κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη.

2.8.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΔΟΚΙΜΗ ABTS

Το 2,2' - αζινο - δις- (3 - αιθυλοβενζοθειαζολινο - 6 - σουλφονικό οξύ): ABTS διατίθεται στο εμπόριο με τη μορφή αμμωνιακού άλατος. Η ρίζα ABTS^{•+}, που παρασκευάζεται από

την οξείδωση του ABTS²⁻ με υπερθειικά ιόντα (S₂O₈²⁻), έχει ένα έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα και απορροφάται στα 734 nm.

Η δοκιμή βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να αντιδρούν με το έγχρωμο διάλυμα του ABTS⁺ και να το αποχρωματίζουν. Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιεί το διάλυμα του ABTS⁺ ως αντιδραστήριο. Μετά από επώαση αντιδραστηρίου και δείγματος στους 30°C, για 6 min, μετράται η απορρόφηση στα 734 nm. Στην συνέχεια υπολογίζεται το ποσοστό της παρεμποδιστικής δράσης κάθε δείγματος με την χρήση του τύπου:

$$I\% = [(A_0 - A) / A_0] * 100.$$

Για να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα παρασκευάστηκε διάλυμα αμμωνιακού άλατος ABTS 7 mM, ζυγίζοντας 38,4 mg ABTS σε 10 mL απεσταγμένο νερό. Η ρίζα ABTS⁺ παρασκευάζεται από την αντίδραση 7 mM αμμωνιακού άλατος ABTS με 2,45 mM υπερθειικό κάλιο (K₂S₂O₈). Η οξείδωση του ABTS αρχίζει αμέσως αλλά σταθεροποιείται μετά από 12 ώρες. Το διάλυμα της ρίζας που φτιάχτηκε παρέμεινε για 16 – 18 ώρες στο σκοτάδι και μετά αραιώθηκε με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης, ώστε η απορρόφηση του στα 734 nm να είναι στα 0,700 ± 0,005 σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού UV – Vis μοντέλο V-1200 (VWR Spectrophotometer. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε γυάλινα vial, 30 μL δείγματος και 3 mL του διαλύματος της ρίζας και μετά από επώαση για 6 min σε σκοτεινό περιβάλλον, ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στα 734 nm στο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού UV – Vis και ο προσδιορισμός του ποσοστού της παρεμπόδισης (I %). Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν τρεις φορές. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox και για αυτό τον λόγο κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη. Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων Trolox και πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στα δείγματα.

2.8.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΔΟΚΙΜΗ FOLIN CIOCALTEU

Η δοκιμή Folin – Ciocalteu χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά (H₃PMO₁₂O₄₀) και φωσφοβολφραμικά (H₃PW₁₂O₄₀) ετεροπολυμερή οξέα. Η δοκιμή βασίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων, σε αλκαλικό περιβάλλον, να οξειδώνονται με παράλληλη αναγωγή των οξέων σε μείγμα οξειδίων του βολφραμίου και του μολυβδαινίου, χαρακτηριστικού κυανού χρώματος. Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 725 nm και είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων. Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιεί το διάλυμα του Folin – Ciocalteu ως αντιδραστήριο. Μετά από επώαση αντιδραστηρίου, Na₂CO₃, νερού και δείγματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 2 ώρες, μετράται η απορρόφηση στα 725 nm.

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά παρασκευάζεται διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na₂CO₃, 20% w/v, για την δημιουργία

αλκαλικού περιβάλλοντος κατά την αντίδραση του δείγματος με το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu. Σε φυαλίδια τοποθετούνται 1,5 mL H₂O, 25 μL δείγματος και 125 μL αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu, ύστερα από 3 min προστίθενται 375 μL Na₂CO₃ και 475 μL απιονισμένο νερό και μετά από επώαση 2 ωρών στο σκοτάδι, ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 725 nm στο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού UV – Vis μοντέλο V-1200 (VWR Spectrophotometers). Όλα τα δείγματα μετρώνται τρεις φορές. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalent), για αυτό κατασκευάζεται και πρότυπη καμπύλη (παρασκευάζονται διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος και ακολουθεί η ίδια διαδικασία με αυτή των δειγμάτων).

2.9 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ *IN VITRO*

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης *in vitro* περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των αντιμικροβιακών παραγόντων έναντι των μικροοργανισμών σε ελεγχόμενο εργαστηριακό περιβάλλον. Οι μέθοδοι αυτές είναι σημαντικές για την αξιολόγηση της δυνατότητας αντιμικροβιακών ουσιών, όπως αντιβιοτικά ή φυσικές ενώσεις, να αναστέλλουν ή να σκοτώνουν μικροοργανισμούς. Σε πολλές περιπτώσεις, υπάρχει ανάγκη για συγκριτική μελέτη της δράσης αυτών των ουσιών προκειμένου να προσδιοριστεί ποια ουσία έχει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση, σε ποια συγκέντρωση έχουμε επαρκή αντιμικροβιακή δράση ή ποια είναι η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για αντιμικροβιακή δράση.

Από τις πιο χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ (μέθοδος Kirby-Bauer). Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει τον εμβολιασμό ενός τυποποιημένου εναιωρήματος του μικροοργανισμού της δοκιμής σε πλάκα άγαρ και την τοποθέτηση χάρτινων δίσκων που περιέχουν τον αντιμικροβιακό παράγοντα στην επιφάνεια. Ο παράγοντας διαχέεται στο άγαρ, δημιουργώντας μια βαθμίδα συγκέντρωσης, και οι ζώνες αναστολής μετρώνται μετά την επώαση. Το μέγεθος της ζώνης αναστολής χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιμικροβιακής δραστηριότητας. Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της μεθόδου για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης αιθερίου ελαίου βασιλικού. Αντί για χάρτινα δισκία, το αιθέριο έλαιο τοποθετήθηκε σε πηγαδάκια μέσα στο άγαρ για καλύτερη διάχυσή του στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η μέτρηση της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC) και Ελάχιστης Θανατηφόρου Συγκέντρωσης (MLC). Σε αυτή τη μέθοδο, παρασκευάζονται διάφορες συγκεντρώσεις του αντιμικροβιακού παράγοντα σε ένα υγρό μέσο ανάπτυξης. Στη συνέχεια, ο μικροοργανισμός εμβολιάζεται στο μέσο και επωάζεται. Η χαμηλότερη συγκέντρωση του παράγοντα που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη προσδιορίζεται ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC). Οι σειριακές αραιώσεις μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της ελάχιστης

θανατηφόρου συγκέντρωσης (MLC), η οποία είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση που σκοτώνει τον μικροοργανισμό.

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθερίου ελαίου πλατύφυλλου και σγουρού βασιλικού και των προϊόντων εγκλεισμού τους (σύνολο 6 δείγματα) μελετήθηκαν με την μέθοδο της διάχυσης σε άγαρ (μέθοδος Kirby-Bauer) έναντι τροφιμογενών βακτηρίων (+) και (-) Gram βακτηρίων. Και κατόπιν μετρήθηκαν οι ζώνες αναστολής των μικροβίων από τους 6 αντιμικροβιακούς παράγοντες.

2.9.1 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Επιλέχθηκαν τα συνήθη τροφιμογενή βακτήρια, από τα (+) κατά Gram στελέχη βακτηρίων *Staphylococcus aureus* B134 και *Bacillus subtilis* B109 και από τα (-) κατά Gram βακτήρια οι *E.coli* B16 και *Pseudomonas fluorescens* B29. Οι μικροοργανισμοί ελέγχθηκαν για την ζωτικότητα τους κατόπιν καλλιέργειας και επίστρωσής τους σε τρυβλία petri για τον οπτικό έλεγχο της ζωτικότητάς τους.

Πίνακας 2.4: Μικροβιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

(+) κατά Gram στελέχη βακτηρίων	(-) κατά Gram στελέχη βακτηρίων
<i>Staphylococcus aureus</i> B134	<i>E.coli</i> B16
<i>Bacillus subtilis</i> B109	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B29

Τα μικροβιακά στελέχη προέρχονται από την συλλογή απομονωθέντων βακτηρίων που διατηρεί το Εργαστήριο Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας (EMBT). Η συντήρηση των μικροβιακών στελεχών γίνεται με την κατάψυξή τους στους -20 °C σε Nutrient broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου.

2.9.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Τα θρεπτικά υποστρώματα και υλικά αποτελούν τα μέσα καλλιέργειας των μικροοργανισμών και είναι ουσίες ή μείγματα που χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της μελέτης μικροοργανισμών ή κυττάρων σε εργαστηριακό περιβάλλον. Παρέχουν τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες και συνθήκες για την ανάπτυξη και επιβίωση διαφόρων οργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες, ιοί και κύτταρα που προέρχονται από φυτά, ζώα ή ανθρώπους. Τα καλλιεργητικά μέσα συνήθως διαμορφώνονται έτσι ώστε να μιμούνται το φυσικό περιβάλλον ή τις ειδικές απαιτήσεις των οργανισμών που καλλιεργούνται. Ανάλογα με την χρήση τους μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριους τύπους: στερεά μέσα και υγρά μέσα. Η διαφορά μεταξύ των δύο τύπων είναι πως στα στερεά υποστρώματα έχει προστεθεί ένας πηκτικός παράγοντας συνήθως άγαρ –έναν πολυσακχαρίτη που εκχυλίζεται από θαλάσσια φύκη- το οποίο λειτουργεί ως πηκτική ουσία και όχι ως

θρεπτικό συστατικό. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν και υγρά και στερεά υποστρώματα (Tryptone soy broth) όπως φαίνεται παρακάτω.

Θρεπτικά Υλικά

- Tryptone Soy Broth (15g/500ml απιονισμένο νερό, ήπια ανάδευση και καθόλου θέρμανση)
- Tryptone Soy Broth Double Strength (15g/250ml απιονισμένο νερό, ήπια ανάδευση και καθόλου θέρμανση)
- Σωληνάκια με 10ml Tryptone Soy Broth
- Tryptone Soy Agar για streaking και spreading (Θέρμανση για πήξη του άγαρ με την αποστείρωση)

Αραιωτικά Υγρά

Στη μικροβιολογία, τα αραιωτικά, είναι διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την αραιώση μικροβιακών δειγμάτων ή ουσιών ενδιαφέροντος. Η αραιώση είναι μια συνήθης τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μείωση της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών σε ένα δείγμα σε επίπεδο κατάλληλο για απαρίθμηση ή περαιτέρω ανάλυση. Εξυπηρετούν διάφορους σκοπούς, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης του αριθμού των μικροοργανισμών, της διατήρησης της βιωσιμότητας των οργανισμών και της παροχής κατάλληλου περιβάλλοντος για επακόλουθη ανάλυση. Τα αραιωτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνονται παρακάτω.

- Ringer Solution (2 ταμπλέτες/1 L απιονισμένο νερό)
- Σωληνάκια με 9ml Ringer

2.9.3 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΖΩΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η ανανέωση και ο καθαρισμός των μικροοργανισμών μεσολαβεί πριν τον ενοφθαλμισμό τους σε κάποιο θρεπτικό υπόστρωμα, προκειμένου να ανακτήσουν τη ζωτικότητά τους και να καταστούν άμεσα ικανοί για ανάπτυξη κατά την ανανέωση, οι μικροοργανισμοί τοποθετούνται σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (Tryptone Soy Broth) και επώάζονται στους 37 °C για 18-24 h. Συγκεκριμένα τοποθετούμε σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, 10 mL TSB μαζί με ποσότητα από την αρχική καλλιέργεια του υπό μελέτη μικροοργανισμού (stock) και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 18-24 ώρες. Πριν τον ενοφθαλμισμό πραγματοποιούνται δύο σειρές ανανεώσεων για την επίτευξη της καλύτερης δυνατής ζωτικότητας των μικροβίων.

Πιο συγκεκριμένα κατά την πρώτη ανανέωση παραλήφθηκαν 100 μL κυττάρων από το stock και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στις κατάλληλες συνθήκες και τους κατάλληλους χρόνους ανάπτυξης για τον εκάστοτε μικροοργανισμό, όπως παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.5**. Η δεύτερη ανανέωση περιλάμβανε τη μεταφορά 100 μL από τους δοκιμαστικούς σωλήνες της πρώτης ανανέωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 mL αποστειρωμένου TSB και

εν συνεχεία επώαση στην βέλτιστη θερμοκρασία για τον κάθε μικροοργανισμό για 18 ώρες. Μετά την δεύτερη ανανέωση ο αριθμός των κυττάρων κάθε μικροοργανισμού αναμένεται στα 10^7 με 10^6 CFU/mL. Μετά την πρώτη ανανέωση, έγινε γραμμική επίστρωση (spreading) των μικροοργανισμών σε τρυβλία με TSA (Tryptone Soy Agar) με σκοπό τον σχηματισμό μεμονωμένων αποικιών των μικροβίων για τον έλεγχο της ζωτικότητας τους. Για τον καθαρισμό του εμβολίου οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τα δείγματα υφίστανται ανάμιξη (vortex).

Πίνακας 2.5: Βέλτιστη θερμοκρασία και χρόνος επώασης για την ανάπτυξη των υπό μελέτη μικροοργανισμών.

Μικροοργανισμοί	Θερμοκρασία επώασης (°C)	Χρόνος επώασης
<i>Staphylococcus aureus</i> B134	37	24
<i>Bacillus subtilis</i> B109	30-35	24
<i>E.coli</i> B16	37	24
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B29	25	48

Έπειτα τα διαλύματα μεταφέρονται σε αποστειρωμένους περιέκτες falcon, για να πραγματοποιηθεί Φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 10 min στους 4 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 mL ισοτονικού διαλύματος ¼ strength Ringer's solution. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται και μετά ακολουθούν εκπλύσεις για την απομάκρυνση του θρεπτικού υποστρώματος και των μεταβολικών προϊόντων των μικροοργανισμών, επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 10 mL Ringer, και αναδεύουμε με vortex. Τέλος, όλα τα στελέχη τοποθετούνται σε αποστειρωμένη φιάλη duran, το οποίο αποτελεί και το τελικό εμβόλιο.

2.9.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ

Μετά την 2^η ανανέωση ο αριθμός των μικροβιακών κυττάρων είναι 10^7 με 10^6 CFU/ml, ακολουθούν δύο με τρεις διαδοχικές αραιώσεις, ώστε να καταλήξουμε στον ζητούμενο αριθμό κυττάρων ανά ml στα 10^4 CFU/ml. Αρχικά 1 mL από την πρώτη δεκαδική αραιώση αραιωνόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 mL διαλύματος Ringer. Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, δημιουργήθηκε η απαιτούμενη, κατά περίπτωση, σειρά διαδοχικών αραιώσεων ως τα 10^4 CFU/mL. Στη συνέχεια πραγματοποιείται δειγματοληψία των διαδοχικών αραιώσεων σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες των 9ml Ringer και επίστρωσης σε τρυβλία με TSA και επώασης αυτών στους 37 °C, για 24 ώρες, για την εξακρίβωση του αρχικού πληθυσμού του κάθε μικροοργανισμού.

2.9.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΖΩΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΜΕΘΟΔΟΣ KIRBY – BAUER

Μετά την προετοιμασία του εμβολίου του κάθε μικροοργανισμού στην επιθυμητή αραιώση κυττάρων (10^4 CFU/ml), σειρά έχει η συγκριτική μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του αιθερίου ελαίου σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού καθώς και των προϊόντων εγκλεισμού τους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιούμε τη μέθοδο της μέτρησης των ζωνών αναστολής, η οποία μας δίνει ποιοτικό αλλά και ποσοτικό αποτέλεσμα, σε ότι αφορά την ουσία με τη μεγαλύτερη αναστολή.

Αρχικά σε τρυβλία με κατάλληλο πλούσιο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, TSA επιστρώνουμε ή ενσωματώνουμε 0,1 mL εναιωρήματος καθαρής καλλιέργειας από τον μικροοργανισμό-στόχο και έπειτα ανοίγουμε τρεις τρύπες (πηγαδάκια ή βοθρία) διαμέτρου 0,5 cm κυκλικά του στερεοποιημένου υποστρώματος όπου τοποθετούμε 20 μL του καθαρού αιθερίου ελαίου και 20 μL υδατικού διαλύματος του προϊόντος εγκλεισμού 0,2% αιθερίου ελαίου βασιλικού. Επωάζουμε στις βέλτιστες θερμοκρασίες χρόνου για τον κάθε μικροοργανισμό και στη συνέχεια μετράμε στα τρυβλία τις λεγόμενες ζώνες αναστολής, δηλαδή τα mm της διαμέτρου της ζώνης πέρα από το άκρο του πηγαδιού (βοθρίου) στην οποία δεν παρατηρείται εξάπλωση των αποικιών του μικροοργανισμού. Αυτή η μέθοδος ονομάζεται Well-Diffusion Assay, καθώς έχει να κάνει με την διάχυση της αντιμικροβιακής ουσίας από το βοθρίο στο κέντρο του τρυβλίου προς το υπόλοιπο υπόστρωμα [61].

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ ΜΕ ΥΔΡΟΑΠΟΣΤΑΞΗ CLEVENGER

Για την παραλαβή αιθερίου ελαίου ποικιλιών σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού της περιοχής του Αίγιου χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υδροαπόσταξης με τον αποστακτήρα Clevenger. Ζυγίστηκαν 200 g φύλλα και άνθη για κάθε ποικιλία αντίστοιχα και τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη 5 λίτρων μαζί με απεσταγμένο νερό, μέχρι απορρόφησής του από το φυτικό υλικό. Στη συνέχεια συνδέουμε τον αποστακτήρα Clevenger με την φιάλη και κάθετο ψυκτήρα και θερμαίνουμε μέχρι το σημείο ζέσεως του νερού. Η απόσταξη διαρκεί 3 ώρες, όπου και παραλαμβάνουμε το αιθέριο έλαιο.

Παραλαμβάνουμε 1,8 mL αιθερίου ελαίου σγουρού βασιλικού. Η απόδοση είναι $1,8 \text{ mL}/208 \text{ g} = 0,87\%$. Πλένουμε με ακετόνη τον αποστακτήρα και προσθέτουμε άνυδρο MgSO_4 για απομάκρυνση υπαρχόντων μορίων νερού στο έλαιο. Για τον πλατύφυλλο βασιλικό παραλαμβάνουμε 1,2 mL αιθερίου ελαίου. Η απόδοση είναι $1,2 \text{ mL}/1,6 \text{ g} = 0,75\%$. Αντίστοιχα προσθέτουμε άνυδρο MgSO_4 για αφυδάτωση του ελαίου.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές αντίστοιχα για τις δύο ποικιλίες και λαμβάνονται οι αποδόσεις του αιθερίου ελαίου στα 100 g φυτικού υλικού και τέλος ο μέσος όρος της απόδοσης του αιθερίου ελαίου για τις τρεις μετρήσεις κάθε ποικιλίας. Το αιθέριο έλαιο βασιλικού φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -20°C . Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται παρακάτω (**Πίνακας 3.1**).

Πίνακας 3.1: Απόδοση αιθερίου ελαίου των δύο ποικιλιών βασιλικού που μελετήθηκαν, (BΣ) Σγουρός βασιλικός, (BΠ) Πλατύφυλλος βασιλικός.

Απόδοση αιθερίου ελαίου Βασιλικού				
Δείγματα	Φυτικό υλικό (g)	Όγκος αιθερίου ελαίου (mL)	Απόδοση (%)	Μέσος όρος (%)
BΣ1	208	1,8	0,87	0,81 ± 0,05
BΣ2	200	1,6	0,8	
BΣ3	206	1,6	0,78	
BΠ1	160	1,2	0,75	0,78 ± 0,08
BΠ2	177	1,3	0,73	
BΠ3	208	1,8	0,87	

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως η ποικιλία του σγουρού βασιλικού (Μέση απόδοση=0,81%) έχει σχετικά καλύτερη απόδοση από αυτή του πλατύφυλλου (Μέση απόδοση=0,78%) αλλά η διαφορά είναι πολύ μικρή. Ωστόσο οι αποδόσεις των δειγμάτων μας από τις δύο ποικιλίες είναι σημαντικά μικρότερες από τα αποτελέσματα των Oralchenova and Obreshkova [62] όπου παρατήρησαν απόδοση της τάξης 1,21%. Η διαφορά αυτή ίσως να οφείλεται στην διαφορετική μέθοδο απόσταξης για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου, καθώς με την υδρο – ατμό – απόσταξη, που χρησιμοποίησαν στο πείραμά τους παρατηρούνται μεγαλύτερες αποδόσεις από ότι η υδροαπόσταξη που χρησιμοποιήσαμε εμείς στο πείραμά μας [63]. Ακόμα διαφορές μπορεί να παρατηρούνται λόγω διαφορετικής χρήσης ποικιλίας βασιλικού, αλλά και διαφορετικών καλλιεργητικών και περιβαλλοντικών συνθηκών παραγωγής του φυτικού υλικού [64].

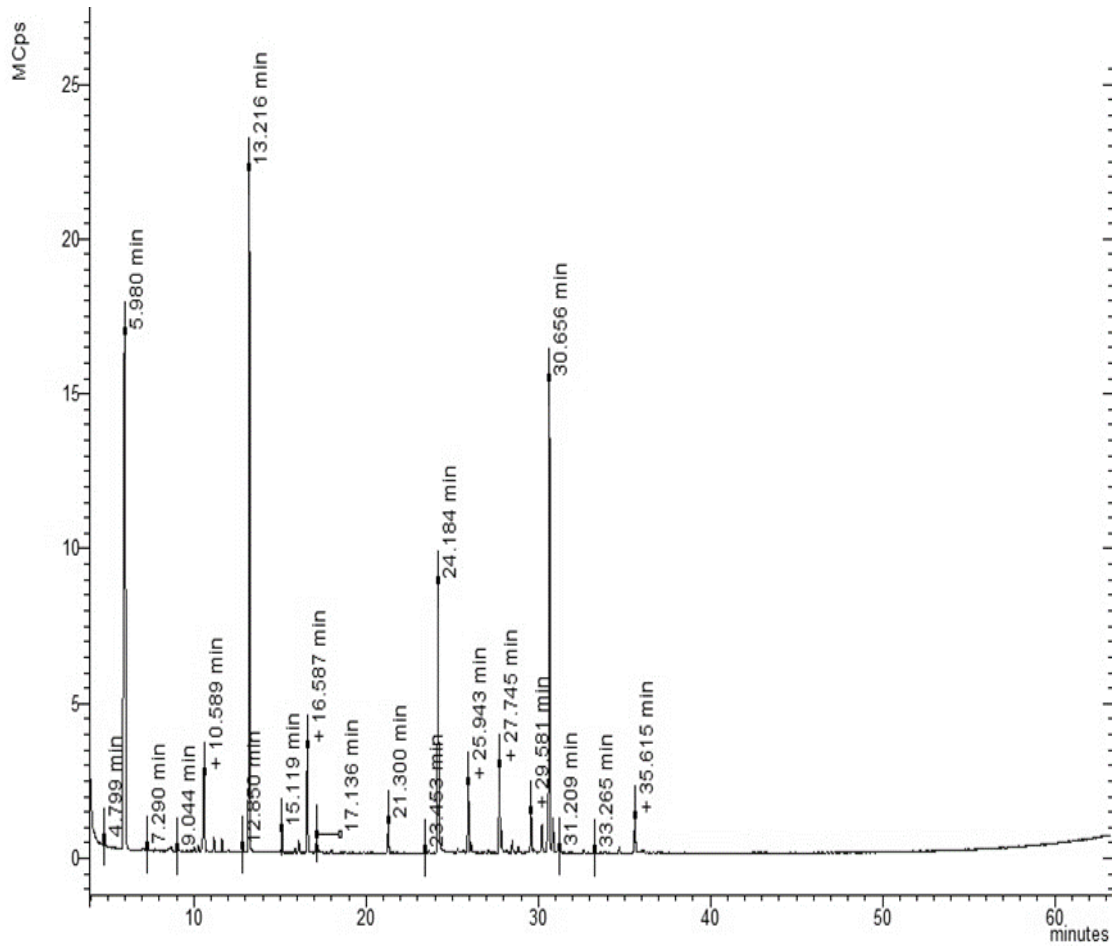
3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΤΥΠΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (GS-MS)

Τα δείγματά μας από αιθέριο έλαιο σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (GC-MS). Η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών για τις δύο ποικιλίες, έγινε με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης στα χρωματογραφήματα και των φασμάτων μαζών των συστατικών με αυτών των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών NIST που υπάρχουν στο λογισμικό του οργάνου και με δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Για την ποικιλία του σγουρού βασιλικού ταυτοποιήθηκαν συνολικά 15 ουσίες με ποσοστό πάνω από 1%. Οι ενώσεις που κυριαρχούν ανήκουν στα μονοτερπένια και συσκιτερπένια. Η μονοτερπενική αλκοόλη λιναλόλη είναι το πιο άφθονο συστατικό στο αιθέριο έλαιο του σγουρού βασιλικού με ποσοστό 40% και ακολουθεί η ευγενόλη, που ανήκει στην ίδια κατηγορία με την λιναλόλη, με 16,4%. Αυτό καθιστά την ποικιλία του σγουρού βασιλικού μικτού χημειότυπου λιναλόλης και ευγενόλης. Στο αιθέριο έλαιο τα συστατικά με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα απαντώνται στην κατηγορία των μονοτερπενικών αλκοολών, με συνολικό ποσοστό 73,6%. Ακόμα ταυτοποιήθηκαν συστατικά όπως το α-μπεργαμοντένιο που ανήκει στην κατηγορία των συσκιτερπενίων (συνολικό ποσοστό 17,2%) και η τ-καδινόλη που τοποθετείται στις συσκιτερπενικές αλκοόλες (συνολικό ποσοστό 2,49%) (**Πίνακας 3.2**).

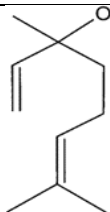
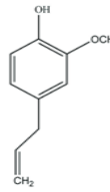
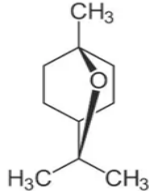
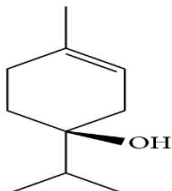
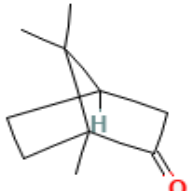
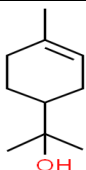
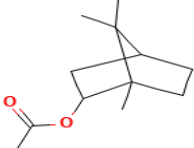
Αντίστοιχα για την ποικιλία του πλατύφυλλου βασιλικού ταυτοποιήθηκαν 7 ουσίες με ποσοστό πάνω από 1%. Και στην περίπτωση αυτή κυρίαρχη ένωση ήταν η λιναλόλη με ποσοστό 57,8%, γεγονός που καθιστά τον πλατύφυλλο βασιλικό χημειότυπου λιναλόλης. Στην συγκεκριμένη ποικιλία βρέθηκε σε μεγάλο ποσοστό (16,32%) η μονοτερπενική αλκοόλη μεθυλ – καβικόλη ή εστραγκόλη. Όπως και στην ποικιλία του σγουρού, κυριάρχησαν οι μονοτερπενικές αλκοόλες που βρέθηκαν και στον σγουρό βασιλικό, ενώ ανιχνεύθηκαν και τα αντίστοιχα συσκιτερπένια και συσκιτερπενικές αλκοόλες (**Πίνακας 3.3**). Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω στα

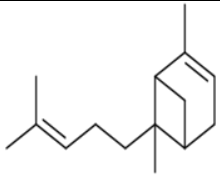
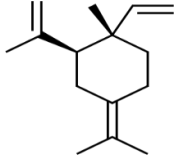
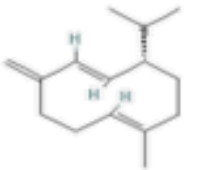
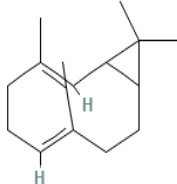
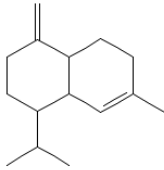
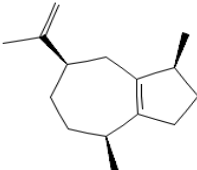
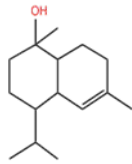
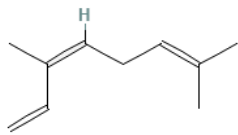
χρωματογράφημα των αιθερίων ελαίων και στους πίνακες με τα πτητικά συστατικά που παρατηρήθηκαν σε κάθε ποικιλία.

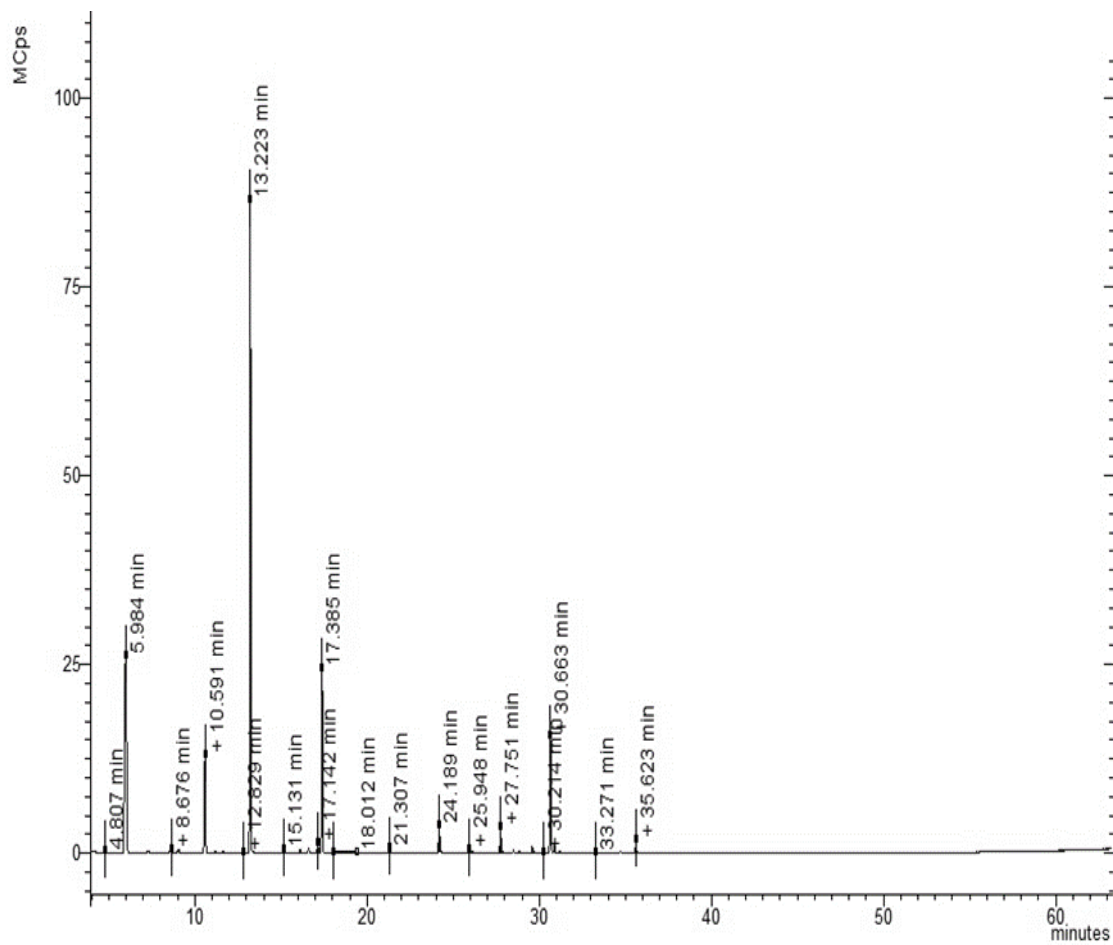


Εικόνα 3.1: Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου Σγουρού Βασιλικού.

Πίνακας 3.2: Χημική σύσταση αιθερίου ελαίου Σγουρού Βασιλικού.

Κορυφή	t _R (min)	Ένωση	(%)	Μοριακός τύπος	Δομή	RI
Οξυγονωμένα Μονοτερπένια						
8	13,22	Λιναλόλη	40,01	C ₁₀ H ₁₈ O		1096
14	24,18	Ευγενόλη	16,43	C ₁₀ H ₁₂ O ₂		1352
5	10,59	Ευκαλυπτόλη	6,31	C ₁₀ H ₁₈ O		1030
10	16,59	Τερπινέν-4-ολη	6,31	C ₁₀ H ₁₈ O		1175
9	15,12	Καμφορά	1,58	C ₁₀ H ₁₆ O		1140
11	17,14	α- Τερπινόλη	1,09	C ₁₀ H ₁₈ O		1187
12	21,30	Οξικός βορνυλεστέρας	1,90	C ₁₂ H ₂₀ O ₂		1283

Συσκίτερπένια						
16	27,75	α- Μπεργαμοντένιο	5,11	C ₁₅ H ₂₄		1437
15	25,94	β- Ελεμένιο	4,46	C ₁₅ H ₂₄		1393
18	29,58	D- Γερμακρένιο	2,48	C ₁₅ H ₂₄		1482
19	30,21	Δίκυκλο-Γερμακρένιο	2,01	C ₁₅ H ₂₄		1498
21	30,89	γ- Καδινένιο	1,96	C ₁₅ H ₂₄		1515
17	27,87	α-Γουαϊένιο	1,22	C ₁₅ H ₂₄		1440
Οξυγονωμένα Συσκίτερπένια						
24	35,62	τ- Καδινόλη	2,49	C ₁₅ H ₂₆ O		1640
Μονοτερπένια						
6	11,17	β-cis-οκιμένιο	1,04	C ₁₀ H ₁₆		1044



Εικόνα 3.2: Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου Πλατύφυλλου Βασιλικού.

Πίνακας 3.3: Χημική σύσταση αιθερίου ελαίου Πλατύφυλλου Βασιλικού

Κορυφή	t _R (min)	Ένωση	(%)	Μοριακός Τύπος	Δομή	RI
Οξυγονωμένα Μονοτερπένια						
5	13,22	Λιναλόλη	57,80	C ₁₀ H ₁₈ O		1096
9	17,39	Εστραγκόλη	16,32	C ₁₀ H ₁₂ O		1194
4	10,59	Ευκαλυπτόλη	11,11	C ₁₀ H ₁₈ O		1030
12	24,19	Ευγενόλη	2,93	C ₁₀ H ₁₂ O ₂		1352
8	17,14	α- Τερπινόλη	1,04	C ₁₀ H ₁₈ O		1187
Συσκιτερπένια						
14	27,75	α- Μπεργαμοντένιο	2,49	C ₁₅ H ₂₄		1437
Οξυγονωμένα Συσκιτερπένια						
18	35,62	τ- Καδινόλη	1,32	C ₁₅ H ₂₆ O		1640

3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ ΣΕ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

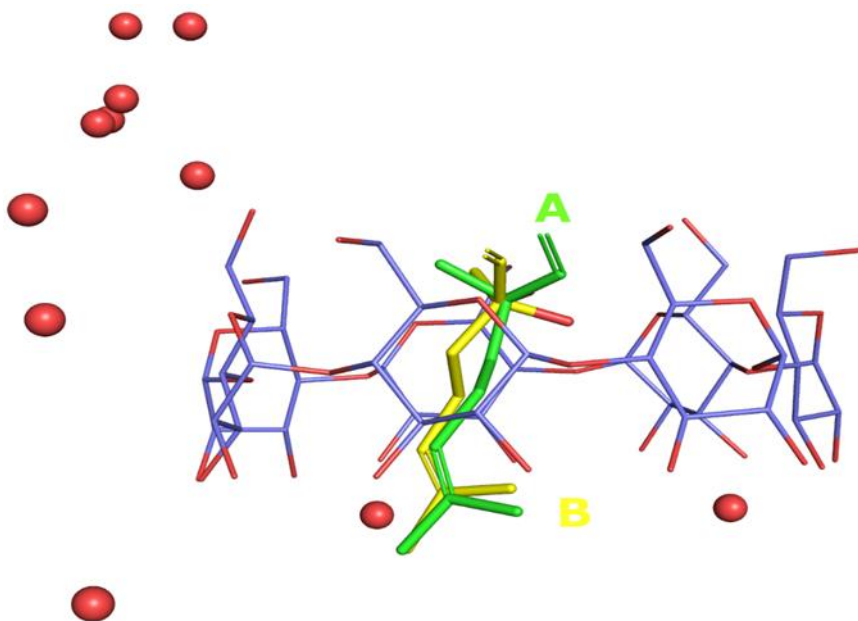
Η ανάλυση του χρωματογραφήματος αιθερίου ελαίου των δύο ποικιλιών βασιλικού έδειξε πως η λιναλόολη είναι η επικρατέστερη ουσία και στις δύο ποικιλίες. Με γνώμονα αυτό πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός καθαρής λιναλόολης, αλλά και αιθερίου ελαίου σε κυκλοδεξτρίνες για τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό τόσο του συμπλόκου της κύριας καθαρής ουσίας αλλά και την σύγκριση με το προϊόν εγκλεισμού των ουσιών του αιθερίου ελαίου που κατάφεραν να εγκλειστούν στις κυκλοδεξτρίνες. Για κρυστάλλωση ως ξενιστές χρησιμοποιήθηκαν οι κυκλοδεξτρίνες β -CD, DM- β -CD και TM- β -CD, οι οποίες σχηματίζουν ομοιόμορφους κρυστάλλους και κατά συνέπεια μπορούν να μελετηθούν με περίθλαση ακτίνων-X από μονοκρυστάλλους. Ενώ για την παρασκευή των συμπλόκων σε σκόνη χρησιμοποιήθηκαν οι κυκλοδεξτρίνες β -CD, RM- β -CD και HP- β -CD για την μελέτη του εγκλεισμού με φασματοσκοπία υπεριώθρου.

Ο εγκλεισμός και η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο της αργής ψύξης (slow cooling crystallization), όπου η υπό εξέταση ουσία αναδεύεται αργά με την κυκλοδεξτρίνη με διαλύτη νερό σε θερμοκρασία που μειώνεται σταδιακά κάτω από 70°C μέχρι να φτάσει την θερμοκρασία δωματίου. Για τον έλεγχο της συμπλοκοποίησης πραγματοποιήθηκε και η παρασκευή μιγμάτων της λιναλόολης και των αιθερίων ελαίων με τις αντίστοιχες κυκλοδεξτρίνες και έγινε η σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα προϊόντα εγκλεισμού. Για την παρασκευή των μιγμάτων έγινε απλή ανάμειξη των εξεταζόμενων ουσιών με τις κυκλοδεξτρίνες σε ιγδίο με αναλογίες 1:2 (ξενιζόμενου μορίου: ξενιστή) όπως και για τα σύμπλοκα εγκλεισμού (Πίνακες 2.1 και 2.2). Στο τελικό προϊόν εγκλεισμού η ποσοστιαία αναλογία αιθερίου ελαίου σε υδατικό διάλυμα του προϊόντος εγκλεισμού ήταν 0,2% v/v (E.O).

3.4 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

3.4.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ β -ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ΜΕ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗ

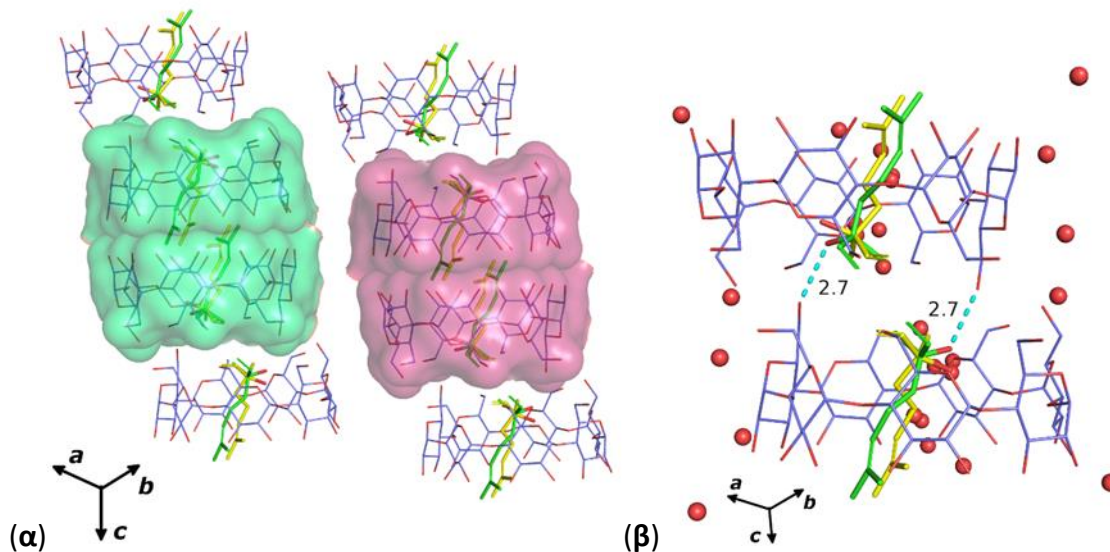
Η κρυσταλλική δομή των μορίων εγκλεισμού της λιναλοόλης σε β -κυκλοδεξτρίνη, μελετήθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Πιο συγκεκριμένα το σύμπλοκο της λιναλοόλης (lin) σε β -κυκλοδεξτρίνη (lin/ β -CD) κρυσταλλώνει σε μονοκλινές σύστημα και συγκεκριμένα στην ομάδα χώρου C2. Η ασύμμετρη μονάδα περιέχει ένα μόριο λιναλοόλης, εγκλεισμένο σε ένα μόριο β -κυκλοδεξτρίνης, το οποίο βρίσκεται αποδιατεταγμένο σε δύο θέσεις (A και B) μέσα στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, με αριθμό κατάληψης για την θέση A 60% και 40% για την θέση B, αντίστοιχα (**Εικόνα 3.3**). Στην ασύμμετρη μονάδα περιέχονται επίσης και 8 μόρια νερού καταναμεημένα σε 13 θέσεις.



Εικόνα 3.3: Η ασύμμετρη μονάδα του συμπλόκου της λιναλοόλης σε β -κυκλοδεξτρίνη (lin/ β -CD) που χαρακτηρίζεται από στοιχειομετρία ξενιζόμενου μορίου: ξενιστή ίση με 1:1 και την παρουσία οκτώ μορίων νερού (κόκκινες σφαίρες). Το μόριο της λιναλοόλης εντοπίζεται κατά 60% στη θέση A (πράσινο) και κατά 40% στην θέση B (κίτρινο) στον μονοκρύσταλλο. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το PyMol.

Τα παραπάνω σύμπλοκα διατάσσονται στο κρύσταλλο σχηματίζοντας διμερή τύπου κεφαλής-κεφαλής (head-to-head) μεταξύ των δύο δευτεροταγών πλευρών δύο μορίων β -CD με την βοήθεια των υδροξυλίων των δευτεροταγών πλευρών της β -CD (άτομα O2n ή O3n) που σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους. Επιπλέον, οι αλειφατικές αλυσίδες των δυο μορίων της λιναλοόλης βρίσκονται ενθυλακωμένες στο

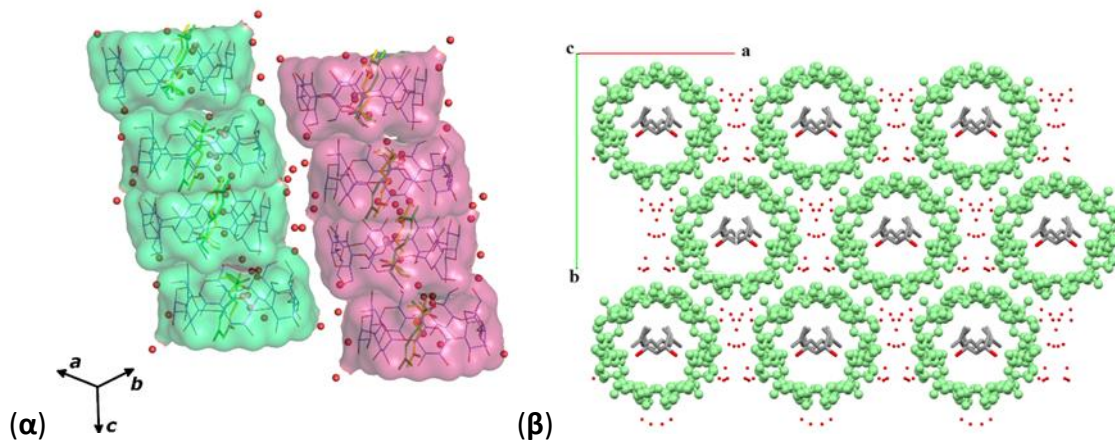
υδρόφοβο περιβάλλον που δημιουργεί το διμερές και σταθεροποιούνται με αλληλεπιδράσεις H-H. Αντίθετα τα υδροξύλιά τους εντοπίζονται κοντά στην πρωτοταγή πλευρά της β -CD και σχηματίζουν δεσμούς H με γειτονικά διμερή (**Εικόνα 3.4β**). Έτσι σχηματίζονται σύμπλοκα τύπου ουράς-ουράς (tail-to-tail). Τον σχηματισμό του tail-to-tail συμπλόκου υποβοηθάει ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλίου της λιναλοόλης του ενός συμπλόκου με τα υδροξύλια O6nH της β -CD του άλλου συμπλόκου (**Εικόνα 3.4α**). Σχεδόν όλα τα πρωτοταγή υδροξύλια της β -κυκλοδεξτρίνης έχουν τη διαμόρφωση gauche-gauche (gg) επομένως δείχνουν προς το εξωτερικό της κοιλότητας της β -κυκλοδεξτρίνης, όπου και σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με μόρια νερού που γεφυρώνουν το κρυσταλλικό πλέγμα με τις γειτονικές κυκλοδεξτρίνες. Εξαιρούνται δύο πρωτοταγή υδροξύλια που έχουν τη διαμόρφωση gauche-trans (gt), δείχνοντας προς το εσωτερικό της κοιλότητας. Είναι αυτά τα υδροξύλια που είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τα γειτονικά ξενιζόμενα μόρια της λιναλοόλης και οδηγούν έτσι στο σχηματισμό tail-to-tail συμπλόκων (**Εικόνα 3.4**).



Εικόνα 3.4: Το σύμπλοκο lin/ β -CD σχηματίζει (α) διμερή head-to-head με σχηματισμό δεσμών H μεταξύ των δευτεροταγών O2n και O3n υδροξυλίων, ενώ παράλληλα ευνοείται και ο σχηματισμός (β) tail-to-tail διμερών, λόγω των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η λιναλοόλη με τα πρωτοταγή O6n υδροξύλια γειτονικών συμπλόκων. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το PyMol.

Τα σύμπλοκα lin/ β -CD που σχηματίζουν ταυτόχρονα από την μια πλευρά head-to-head διμερή και από την άλλη tail-to-tail, στοιβάζονται κατά μήκος του άξονα c σχηματίζοντας κανάλια. Λόγω του δεσμού υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ της λιναλοόλης και των O6nH του γειτονικού συμπλόκου, παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση ανάμεσα στα head-to-head διμερή με αποτέλεσμα η μορφή του καναλιού να ομοιάζει με την γνωστή δομή του ενδιάμεσου καναλιού (Intermediate Channel, IM) (**Εικόνα 3.5α**). Παρόμοια δομή παρουσιάζεται και σε άλλα αντίστοιχα μονοτερπένια, όπως η κιτρονελοόλη. Στην

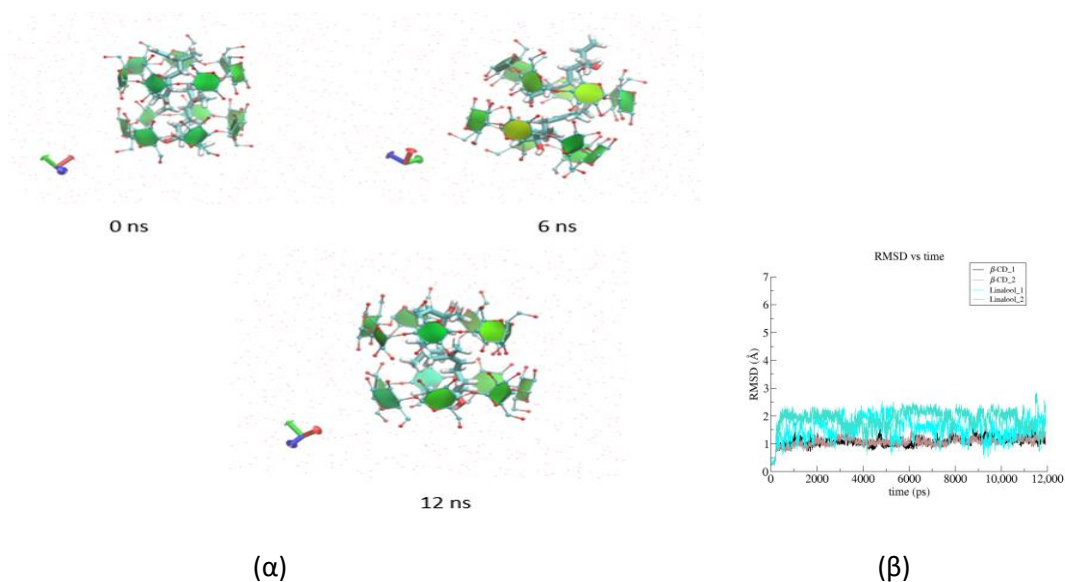
περίπτωση αυτή στα σύμπλοκα κιτρονελοόλης β -CD(*cl*/ β -CD), στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης βρίσκονται δύο μόρια κιτρονελοόλης (τα δύο εναντιομερή της) αριθμό κατάληψης 0,5. Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση το μονοτερπένιο της κιτρονελοόλης προτιμάει να εγκλείεται στην β -CD, με την αλειφατική της ουρά προς την δευτεροταγή πλευρά της β -CD, ενώ η υδροξυλομάδα του μορίου προεξέχει από την πρωτοταγή στενή πλευρά του ξενιστή σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου είτε απευθείας με τα υδροξύλια γειτονικών μορίων β -κυκλοδεξτρίνης είτε έμμεσα με μόρια νερού που βρίσκονται στον ενδιάμεσο χώρο [65]. Φαίνεται πως αυτή η διαμόρφωση ευνοείται, όπως και στην περίπτωση της λιναλοόλης, λόγω του σχηματισμού διμερών head to head μεταξύ δύο β -CD, καθώς δημιουργούν κατάλληλο υδρόφοβο περιβάλλον, στο οποίο βρίσκονται τα υδρόφοβα τμήματα (αλειφατικές αλυσίδες) του ξενιζόμενου μορίου. Στην αντίθετη περίπτωση όπου το ξενιζόμενο μόριο εγκλωβιζόταν ανάποδα τότε το υδρόφιλο τμήμα του (η υδροξυλομάδα) θα βρισκόταν σε υδρόφοβο περιβάλλον, γεγονός που δεν ευνοείται εντροπικά και επομένως αυτός ο σχηματισμός δεν παρατηρείται.



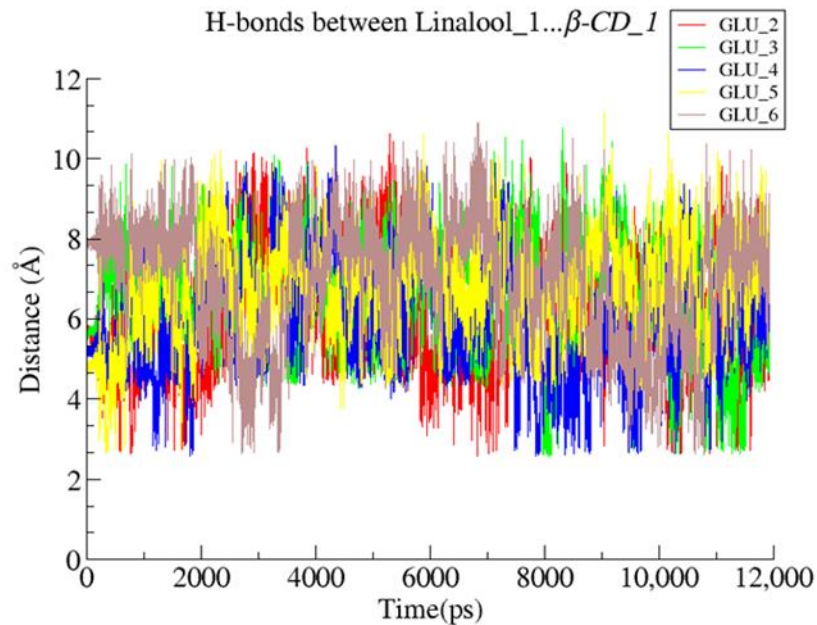
Εικόνα 3.5: Το σύμπλοκο lip/ β -CD στοιβάζεται κατά μήκος του άξονα *c*. (α) Απεικόνιση πακεταρίσματος κατά μήκος του άξονα *a* και (β) κατά μήκος του άξονα *c*. Οι εικόνες σχεδιάστηκαν με το PyMol και Mercury, αντίστοιχα.

3.4.2 ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗΣ ΜΕ β -CD ΚΑΙ HP- β -CD

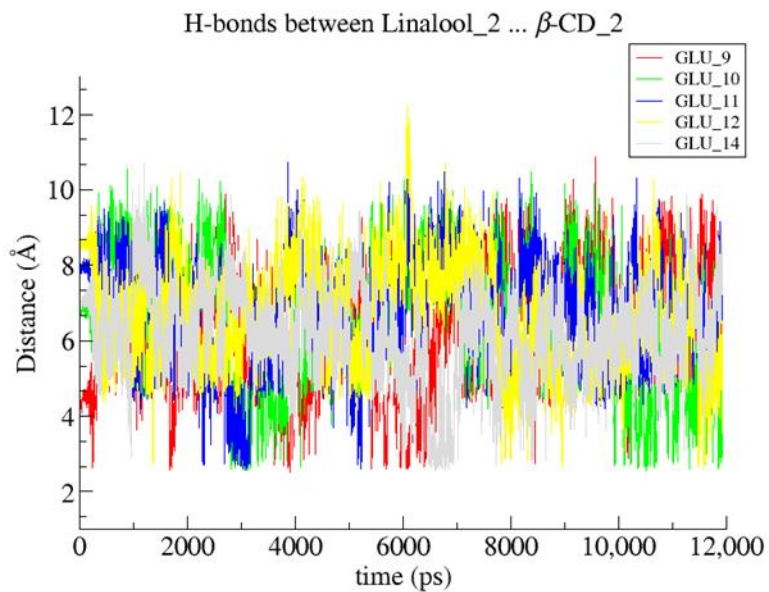
Στην περίπτωση της β -CD, το αρχικό μοντέλο αποτελούνταν από δυο κυκλοδεξτρίνες και δύο μόρια λιναλόλης τοποθετημένα σύμφωνα με το μοντέλο του διμερούς τύπου κεφαλής-κεφαλής, όπως το αποκάλυψε η κρυσταλλογραφική μελέτη της Ceborska *et. al.* [66]. Αναλύοντας τα καταγεγραμμένα στιγμιότυπα (frames) από την προσομοίωση, παρατηρούμε ότι το διμερές μοριακό σύστημα διατηρεί την σταθερότητά του καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (**Εικόνα 3.6**). Αυτό το φαινόμενο οφείλεται κυρίως στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί H) μεταξύ των υδροξυλίων των δευτεροταγών πλευρών των δύο ξενιστών, τα οποία συμβάλλουν στη δημιουργία του διμερούς τύπου κεφαλής-κεφαλής. Επιπλέον, συμβάλλουν και οι δεσμοί H μεταξύ των υδροξυλίων των δύο μορίων της λιναλόλης με τα υδροξύλια των δύο πρωτοταγών περιοχών των κυκλοδεξτρινών (**Εικόνα 3.7**).



Εικόνα 3.6: α. Αντιπροσωπευτικά στιγμιότυπα της προσομοίωσης της δυναμικής συμπεριφοράς του προϊόντος εγκλεισμού lin/ β -CD (α) στα 0 ns, (β) στα 6 ns και (γ) στα 12 ns σε υδατικό περιβάλλον και στους 300 K. Τα μόρια νερού απεικονίζονται ως σφαίρες. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το VMD. β. Η μέση τετραγωνική ρίζα της απόκλισης όλων των ατόμων των μορίων από την αρχική θέση σε συνάρτηση με το χρόνο



(α)

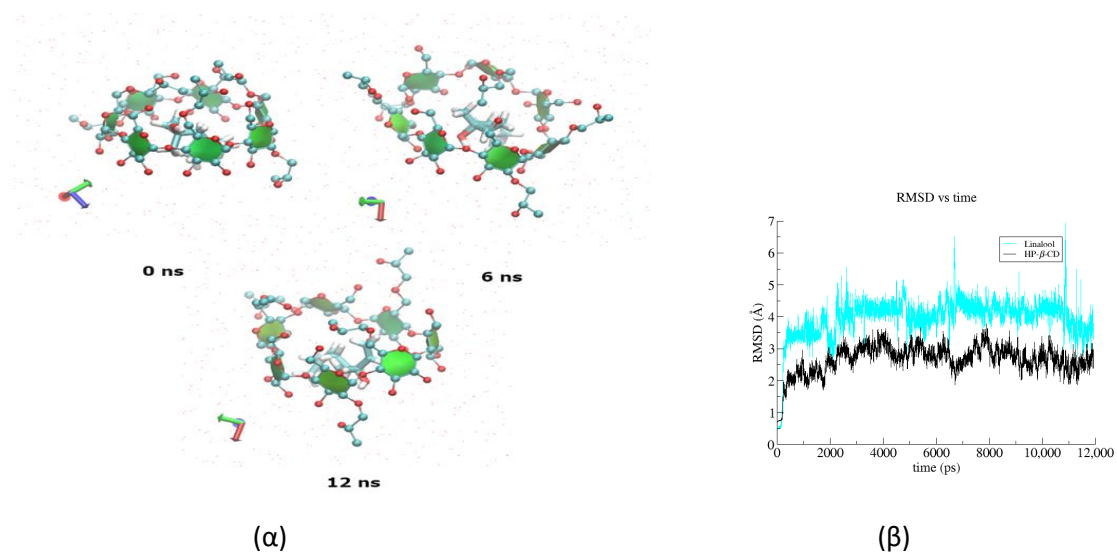


(β)

Εικόνα 3.7: Δεσμοί H μεταξύ του υδροξυλίου της λιναλοόλης και εκείνων της πρωτοταγούς πλευράς της β -CD_1 και (β) Δεσμοί H μεταξύ του υδροξυλίου της λιναλοόλης και εκείνων της πρωτοταγούς πλευράς της β -CD_2

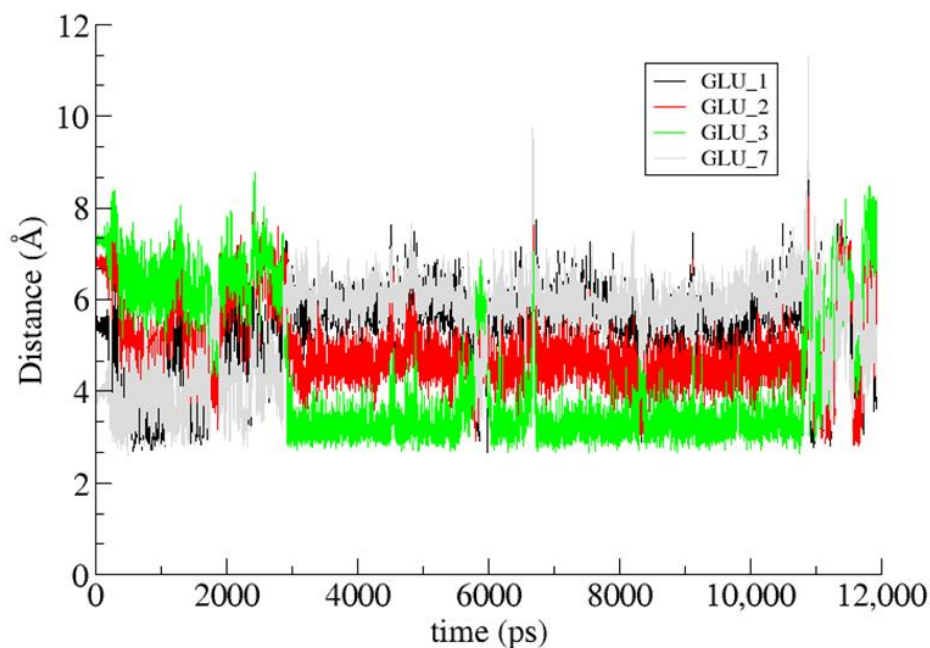
Στην περίπτωση της HP- β -CD, το αρχικό μοντέλο αποτελούνταν από μια κυκλοδεξτρίνη και μία λιναλοόλη σύμφωνα με το μοντέλο που προέκυψε από την μελέτη μοριακού ελλιμενισμού. Πιο ειδικά, οι αρχικές συντεταγμένες του συμπλόκου δημιουργήθηκαν το πρόγραμμα Autodock Vina [67], όπου το πλαίσιο προσομοίωσης ορίστηκε γύρω από τις

συντεταγμένες του κέντρου της κυκλοδεξτρίνης με μέγεθος 40 Å σε κάθε κατεύθυνση και απόσταση πλέγματος 0,375 Å. Ο γενετικός αλγόριθμος Lamarckian μέσα στο AutoDockTools χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό, επιτρέποντας την αποτελεσματική διαχείριση πολλών βαθμών ελευθερίας. Η τρισδιάστατη δομή της λιναλοόλης ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων PubChem (Compound CID: 6549) [68], ενώ οι συντεταγμένες της HP-β-CD αντιστοιχούν σε εκείνες της β-CD όπως εμφανίζεται στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της λιναλοόλης με την β-CD. Πιο συγκεκριμένα, το μόριο HP-β-CD με Βαθμό Υποκατάστασης (DS) 5 κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας VEGAZZ [69] προσθέτοντας τυχαία πέντε 2-υδροξυπροπυλ ομάδες και στα άκρα της β-CD. Πραγματοποιήθηκαν 10 προσπάθειες ελλιμενισμού και το τελικό μοντέλο με την πιο ευνοϊκή ενέργεια δέσμευσης (-4,1 Kcal/mol) επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση. Αναλύοντας τα καταγεγραμμένα στιγμιότυπα (frames) από την προσομοίωση, παρατηρούμε ότι το μονομερές μοριακό σύστημα διατηρεί την σταθερότητά του καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (**Εικόνα 3.8**). Αυτό οφείλεται κυρίως στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί H) μεταξύ του υδροξυλίου της λιναλοόλης με τα αιθερικά οξυγόνα O4n του ξενιστή (**Εικόνα 3.9**).



Εικόνα 3.8: α) Αντιπροσωπευτικά στιγμιότυπα της προσομοίωσης της δυναμικής συμπεριφοράς του προϊόντος εγκλεισμού lin/HP-β-CD (α) στα 0 ns, (β) στα 6 ns και (γ) στα 12 ns σε υδατικό περιβάλλον και στους 300 K. Τα μόρια νερού απεικονίζονται ως σφαίρες. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το VMD και β) Η μέση τετραγωνική ρίζα της απόκλισης όλων των ατόμων των μορίων από την αρχική θέση σε συνάρτηση με το χρόνο

H-bonds between Linalool ... HP- β -CD



Εικόνα 3.9: Δεσμοί H μεταξύ του υδροξυλίου της λιναλοόλης και εκείνων των O4n της HP- β -CD

Οι συγγένειες δέσμευσης για τα δυο εξετασθέντα προϊόντα εγκλεισμού εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area (MM/GBSA) και οι τιμές των διαφόρων όρων της συνολικής ενέργειας πρόσδεσης παρατίθενται στον Πίνακα 1. Σε κάθε περίπτωση, οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals κυριαρχούν. Η σύγκριση των τιμών των ενεργειών πρόσδεσης των δύο προϊόντων εγκλεισμού δείχνει ότι η υπολογισμένη τιμή ΔG_{bind} για το διμερές lin/ β -CD είναι σημαντικά υψηλότερη από εκείνη του μονομερούς, καθώς η παρουσία ενός δεύτερου μορίου ξενιστή αυξάνει σημαντικά τις αλληλεπιδράσεις Van der Waals με την λιναλοόλη. Το σύμπλοκο lin/HP- β -CD εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για την λιναλοόλη ΔG_{bind} , γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τις υψηλές τιμές για την σταθερά K_c και το CE που προκύπτει από τη μελέτη διαλυτότητας φάσης (Πίνακας 1). Εντούτοις ο υπολογισμός του εντροπικού όρου $T \cdot \Delta S$ συχνά δεν είναι ακριβής και η παρουσία δεύτερου μορίου ξενιστή στην περίπτωση του συμπλόκου lin/ β -CD οδηγούν στα συγκεκριμένα αποτελέσματα.

Πίνακας 3.4: Οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης και οι αποκλίσεις τους (σε kcal/mol) που προκύπτουν από την ανάλυση MM/GBSA των συμπλόκων της λιναλοόλης (lin1 και lin2) με την β -κυκλοδεξτρίνη σε αναλογία ξενιστής: ξενιζόμενου 2:2 και HP- β -κυκλοδεξτρίνη σε αναλογία ξενιστής: ξενιζόμενου 1:1

	lin1/ β -CD	lin2/ β -CD	lin/HP- β -CD
ΔE_{vdW}	-28,74 \pm 2,03	-28,88 \pm 2,01	-21,46 \pm 2,36
ΔE_{ele}	-1,42 \pm 1,66	-2,01 \pm 2,08	-4,18 \pm 2,46
ΔE_{MM}^a	-30,16 \pm 2,43	-30,86 \pm 2,62	-25,64 \pm 3,49
ΔG_{GB}	12,88 \pm 1,91	13,60 \pm 2,09	20,18 \pm 2,83
$\Delta G_{nonpolar}$	-3,72 \pm 0,18	-3,75 \pm 0,18	-3,03 \pm 0,25
$\Delta G_{solvation}^b$	9,15 \pm 1,83	9,86 \pm 2,01	17,15 \pm 2,75
ΔH^c	-21,01 \pm 1,92	-21,01 \pm 1,87	-8,49\pm2,90
$T \cdot \Delta S^d$	-15,82 \pm 2,34	-15,76 \pm 2,84	-13,70 \pm 1,48
ΔG_{bind}^e	-5,19 \pm 3,03	-5,19 \pm 3,4	+5.21 \pm 3.25

ΔE_{vdW} = η συνεισφορά των αλληλεπιδράσεων van der Waals από μοριακή μηχανική;

ΔE_{ele} = ηλεκτροστατική ενέργεια όπως υπολογίζεται από το πεδίο δυνάμεων της μοριακής μηχανικής;

ΔG_{GB} = Η ηλεκτροστατική ενέργεια διαλύσεως (πολική συνεισφορά) που υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το μοντέλο GB (Generalized Born);

$\Delta G_{nonpolar}$ = Η μη πολική συνεισφορά στην ενέργεια διαλύσεως, που υπολογίζεται με τη μέθοδο επιφάνειας προσπέλασης του διαλυτικού μέσου (SASA);

^a $\Delta E_{MM} = \Delta E_{vdW} + \Delta E_{ele}$;

^b $\Delta G_{solvation} = \Delta G_{GB} + \Delta G_{nonpolar}$.

^c $\Delta H = \Delta G_{solvation} + \Delta E_{MM}$;

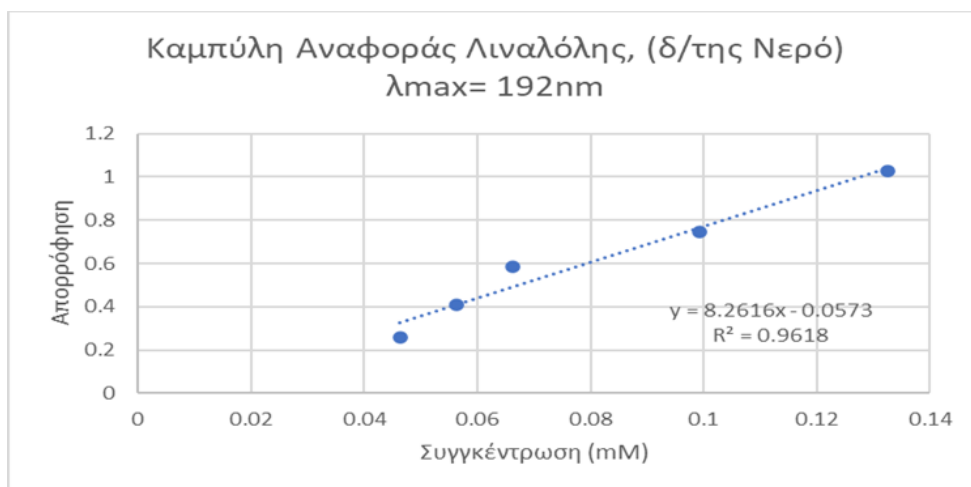
^d $T \Delta S$ Ο εντροπικός όρος που υπολογίζεται μέσω ανάλυσης normal mode.

^e $\Delta G_{bind} = \Delta H - T \cdot \Delta S$.

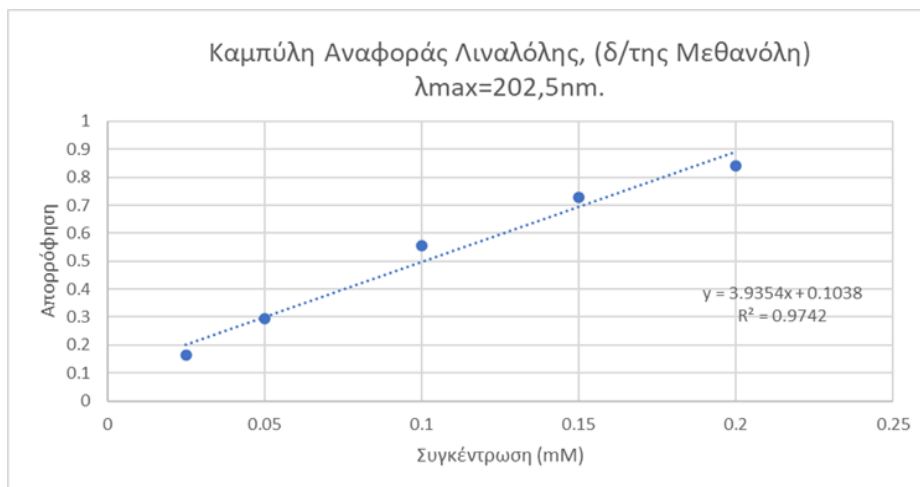
3.4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΦΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ

Πραγματοποιήθηκε μελέτη για την αξιολόγηση της διαλυτότητας της Λιναλόολης μετά τον εγκλεισμό της σε β -CD και HP- β -CD. Η συγκέντρωση λιναλόολης στα υδατικά διαλύματα των κυκλοδεξτρινών βρέθηκε από τις μετρήσεις απορρόφησης σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Συγκεκριμένα, αρχικά υπολογίστηκε η μοριακή απορροφητικότητα της λιναλόολης σε μεθανόλη και σε νερό από τον νόμο των Beer και Lambert και για δεδομένο μήκος κυψελίδας (0,01 m). Παρατηρήθηκε μετατόπιση του λ_{max} από 192 nm στο νερό σε 202,5 nm στη μεθανόλη. Η μοριακή απορροφητικότητα υπολογίστηκε ίση με $e = 8,26$ για το νερό και $e = 3,94$ για την μεθανόλη αντίστοιχα από την κλίση της καμπύλης αναφοράς και για δεδομένο μήκος κυψελίδας ίσο με 0,01 m. Παρακάτω φαίνονται οι καμπύλες αναφοράς της Λιναλόολης στο νερό και στην μεθανόλη αντίστοιχα.

(α)



(β)

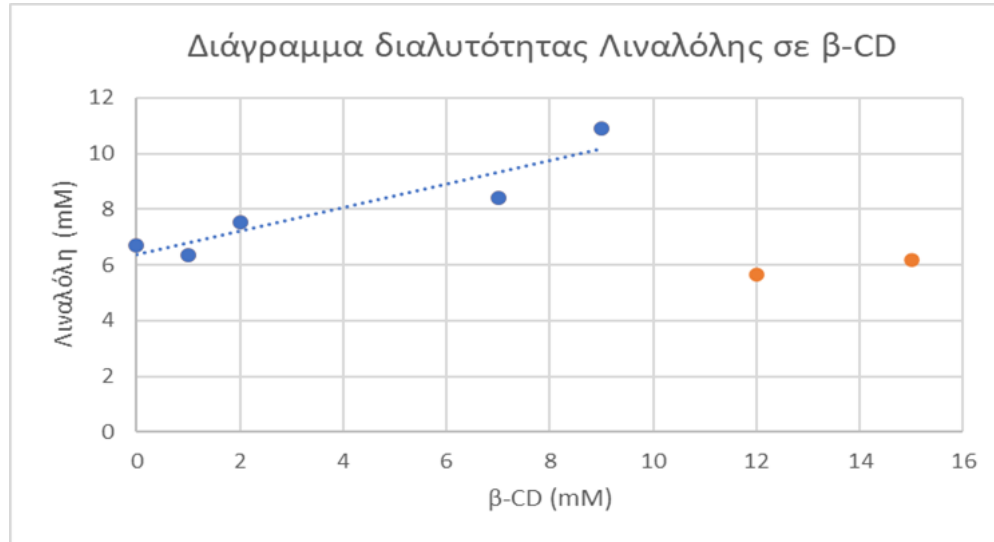


Εικόνα 3.10: Καμπύλες αναφοράς (standard curve) της λιναλόλης (α) στο νερό και (β) στη μεθανόλη.

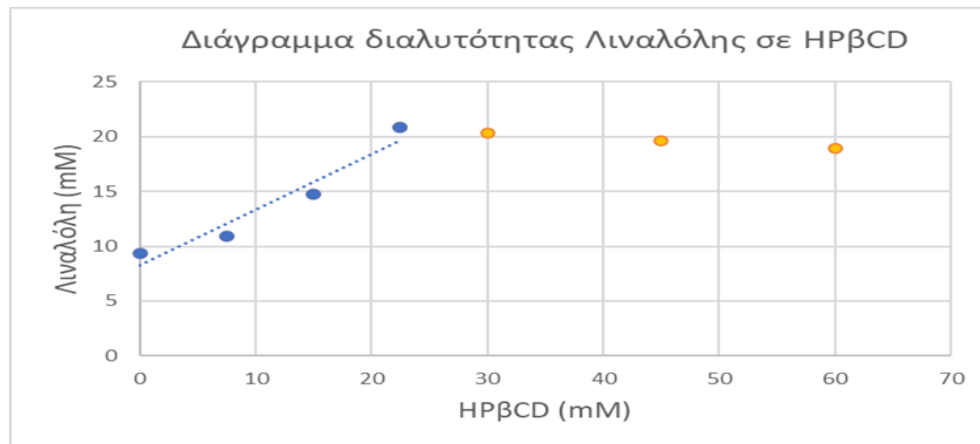
Για τα σύμπλοκα λιναλόλης σε β -CD οι μετρήσεις απορρόφησης έγιναν σε $\lambda_{\max} = 192$ nm. Οπότε για την εύρεση της συγκέντρωσης της διαλυμένης λιναλόλης σε διαλύματα β -CD αυξανόμενων συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκε η μοριακή απορροφητικότητα της Λιναλόλης στο νερό ($\lambda_{\max} = 192$ nm). Αντίστοιχα για τα σύμπλοκα Λιναλόλης σε ΗΡβCD παρατηρήθηκε μετατόπιση του λ_{\max} στα 207 nm και οι μετρήσεις απορρόφησης έγιναν για $\lambda_{\max} = 207$ nm. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε η μοριακή απορροφητικότητα της Λιναλόλης στη μεθανόλη ($\lambda_{\max} = 202,5$ nm), καθώς το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης της Λιναλόλης στα διαλύματα ΗΡ- β -CD μετατοπίζεται στα 207 nm, που είναι πιο κοντά με την απορρόφηση της Λιναλόλης στην μεθανόλη.

Στην **εικόνα 3.11** παρουσιάζεται η συγκέντρωση της διαλυμένης Λιναλόλης σε σχέση με τη συγκέντρωση κάθε διαλύματος CD. Παρατηρείται πως η διαλυτότητα της Λιναλόλης εγκλεισμένης σε σύμπλοκα με την β -CD (**Εικόνα 3.11A**) αυξάνεται γραμμικά έως τα 9 mM β -CD ενώ μετά τα 10 mM παρατηρείται μείωση της διαλυτότητάς της και η δημιουργία ενός σταθερού πλατό. Κάτι αντίστοιχο παρατηρείται και στο διάγραμμα διαλυτότητας της λιναλόλης (**Εικόνα 3.11B**) ενθυλακωμένης σε ΗΡ- β -CD, όπου η διαλυτότητα αυξάνει και πάλι γραμμικά έως τα 22,5 mM ΗΡ- β -CD και στη συνέχεια σταθεροποιείται όσο και αν αυξήσουμε την συγκέντρωση της ΗΡ- β -CD στο διάλυμα. Το προφίλ συγκέντρωσης της λιναλόλης ενθυλακωμένης σε β -CD και ΗΡ- β -CD είναι συγκρίσιμο με το διάγραμμα τύπου Β από τους τύπους διαλυτότητας φάσεων των Higuchi και Connors [53]. Το διάγραμμα τύπου Β που εμφανίζει μια αρχική γραμμική αύξηση ακολουθούμενη από ένα πλατό υποδεικνύει το σχηματισμό συμπλόκων τα οποία περιορίζουν την περαιτέρω βελτίωση της υδατικής διαλυτότητας.

A)



B)



Εικόνα 3.11: Διαγράμματα διαλυτότητας της λιναλόλης σε υδατικά διαλύματα Α) β -CD και Β) ΗΡ- β -CD. Οι μετρήσεις απορρόφησης για τα διαλύματα της β -CD έγιναν στα 192 nm και για τα διαλύματα της ΗΡ- β -CD στα 207 nm.

Από τα αρχικά γραμμικά τμήματα των διαγραμμάτων που προσομοιάζουν διαγράμματα τύπου A_L και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί η εξίσωση (4) υπολογίστηκαν η σταθερά συμπλοκοποίησης (K_c) και το complexation efficiency (CE) των συμπλόκων β -CD/λιναλόλης και ΗΡ- β -CD/λιναλόλης που υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της συμπλοκοποίησης της Λιναλόλης με τις CDs. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5: Διαλυτότητα λιναλόλης σε υδατικό διάλυμα S_0 , σταθερές συμπλοκοποίησης και complexation efficiency (CE) στα σύμπλοκα της λιναλόλης με β -CD και HP- β -CD.

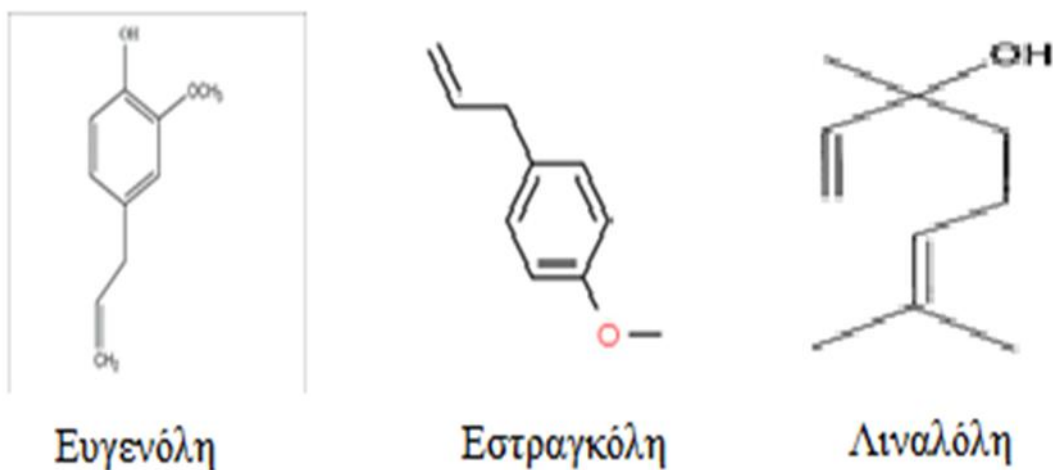
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ	S_0 (mM)	K_c (L/mol)	CE (%)
β -CD	$6,7 \pm 1,2$	120 ± 30	70 ± 20
HP- β -CD	$9,4 \pm 0,2$	130 ± 30	100 ± 20

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.4, η λιναλόλη σχηματίζει πιο εύκολα σύμπλοκο με την HP- β -CD (CE=103%) από ότι με την β -CD (CE = 74%). Οι διαφορές αυτές ίσως να οφείλονται στα άτομα υδρογόνου από τις ομάδες υδροξυπροπυλίου στην περίπτωση της HP- β -CD που ευνοούν τον εγκλεισμό της λιναλόλης. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά των Rodríguez-López, et.al [29], όπου σε τιμές pH από 6,5 έως 7, παρατηρούν αρχική διαλυτότητα (S_0) από 8,16 έως 7,37 mM, καθώς και K_c από 91 έως 241 L/mol και αντίστοιχα CE (74 – 177%) για την β -CD. Παρατήρησαν πως ακόμα και μια μικρή αλλαγή στο pH μπορεί να επιφέρει αρκετά μεγάλες αλλαγές στην αποτελεσματικότητα συμπλοκοποίησης της λιναλόλης στις CDs με καλύτερη συμπλοκοποίηση να παρατηρείται σε ουδέτερο pH.

3.4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ΜΕ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗ ΚΑΙ ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR)

Το υπέρυθρο φάσμα του αιθέριου ελαίου βασιλικού τυπικά εμφανίζει χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στις λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στη χημική σύσταση του ελαίου. Το αιθέριο έλαιο του βασιλικού αποτελείται από ένα μείγμα διαφόρων ενώσεων και το φάσμα IR του αντανακλά τις δονήσεις των δεσμών μέσα σε αυτά τα μόρια. Όπως είδαμε από την ανάλυση του χρωματογραφήματος των δύο ποικιλιών βασιλικού, οι κύρια ένωση και στις δύο ποικιλίες είναι η λιναλοόλη. Ενώ ακολουθείται από υψηλά ποσοστά εστραγκόλης, στην ποικιλία του πλατύφυλλου βασιλικού, και ευγενόλης στην ποικιλία του σγουρού βασιλικού.

Η στεreoχημική δομή της λιναλοόλης, της εστραγκόλης και της ευγενόλης φαίνονται στην **Εικόνα 3.12**.



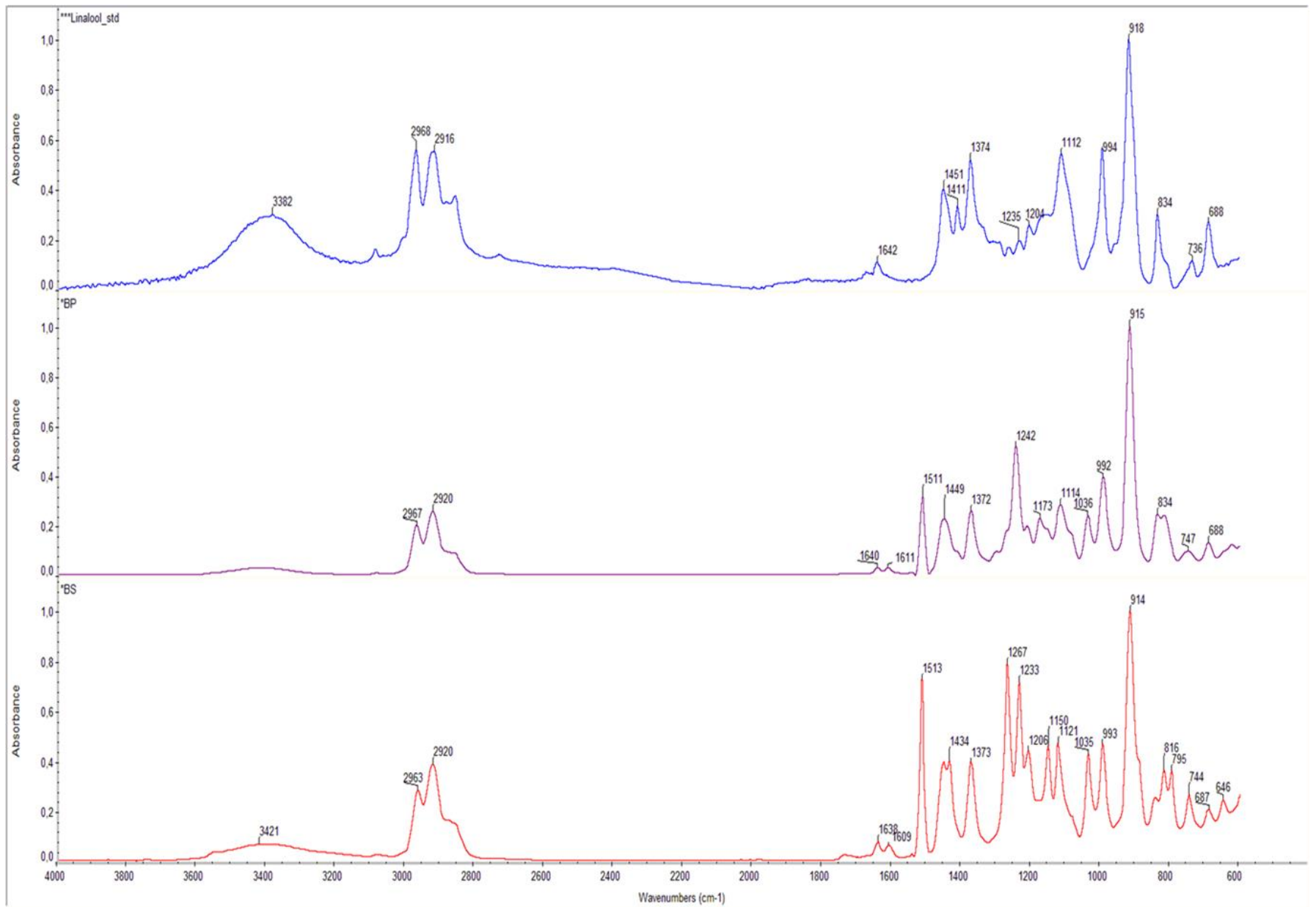
Εικόνα 3.12: Στεreoχημικός τύπος των κύριων ενώσεων του βασιλικού.

Φάσματα IR Βασιλικού και λιναλοόλης

Στην **Εικόνα 3.13** παρουσιάζονται τα φάσματα IR της λιναλοόλης, καθώς και των αιθερίων ελαίων των ποικιλιών πλατύφυλλου και σγουρού βασιλικού. Η σύγκριση των φασμάτων της καθαρής λιναλοόλης με τα αιθέρια έλαια των δύο ποικιλιών βασιλικού δείχνει πως οι κορυφές που αντανακλούν στις δονήσεις του μορίου της λιναλοόλης, κυριαρχούν και στα φάσματα του αιθερίου ελαίου του βασιλικού. Γεγονός που αναμένεται εφόσον η λιναλοόλη είναι η κύρια ένωση στα δείγματά μας και καθορίζει και το φασματικό αποτύπωμα του βασιλικού.

Το φάσμα IR της λιναλοόλης αποτελείται από τρεις σημαντικές ζώνες απορρόφησης με κύριες κορυφές στα 3382 cm^{-1} που οφείλεται στις δονήσεις τάσης του υδροξυλίου της λιναλοόλης (O – H). Στα 2968 και 2916 cm^{-1} κορυφές που αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των αλειφατικών C – H. Μια χαρακτηριστική κορυφή στα 1642 cm^{-1} που συσχετίζεται με τη δόνηση τάσης των διπλών δεσμών C=C. Ενώ η περιοχή από $600 - 1500\text{ cm}^{-1}$ χαρακτηρίζεται από τις δονήσεις κάμψης C – H και τις δονήσεις τάσης του C – O στην περιοχή των 1100 cm^{-1} . Χαρακτηριστική κορυφή της Λιναλοόλης αποτελεί η πολύ έντονη κορυφή στα 917 cm^{-1} που οφείλεται στις δονήσεις κάμψης των δεσμών C – H [70].

Αντίστοιχα για τα φάσματα των αιθερίων ελαίων των δυο ποικιλιών βασιλικού, επικρατεί το φασματικό αποτύπωμα της λιναλοόλης και χωρίζονται και αυτά σε τρεις ζώνες απορρόφησης. Ωστόσο ορισμένες διαφορές που παρατηρούμε με το φάσμα της λιναλοόλης είναι η διπλή κορυφή που παρατηρείται στα $1610 - 1640\text{ cm}^{-1}$ και οφείλεται στους διπλούς δεσμούς C=C των αρωματικών δακτυλίων της ευγενόλης και της εστραγκόλης και συμπληρώνεται από την έντονη κορυφή στα 1511 cm^{-1} για τον πλατύφυλλο και 1513 cm^{-1} για τον σγουρό βασιλικό αντίστοιχα, που επιβεβαιώνει την ύπαρξη των αρωματικών δακτυλίων. Διαφορές στα φάσματα μεταξύ των δύο ποικιλιών φαίνεται να υπάρχουν στην περιοχή από $1000 - 1300\text{ cm}^{-1}$. Όπου παρουσιάζουν και τα δύο, έντονες κορυφές που οφείλονται στην ύπαρξη αιθερικών και αλκοολικών C – O δεσμών. Ωστόσο ο σγουρός βασιλικός πλούσιος σε λιναλοόλη και ευγενόλη παρουσιάζει μια πιο έντονη κορυφή στα 3421 cm^{-1} λόγω της επιπλέον ομάδας υδροξυλίου από την ευγενόλη. Η κορυφή αυτή είναι πολύ λιγότερο έντονη στην ποικιλία του πλατύφυλλου βασιλικού καθώς η ευγενόλη απουσιάζει από αυτή την ποικιλία, η οποία είναι πλούσια σε εστραγκόλη που δεν μπορεί να αποδώσει παρόμοια κορυφή [71].



Εικόνα 3.13: FT-IR Φάσματα λιναλόλης, Πλατύφυλλου βασιλικού (BP) και Σγουρού βασιλικού (BS).

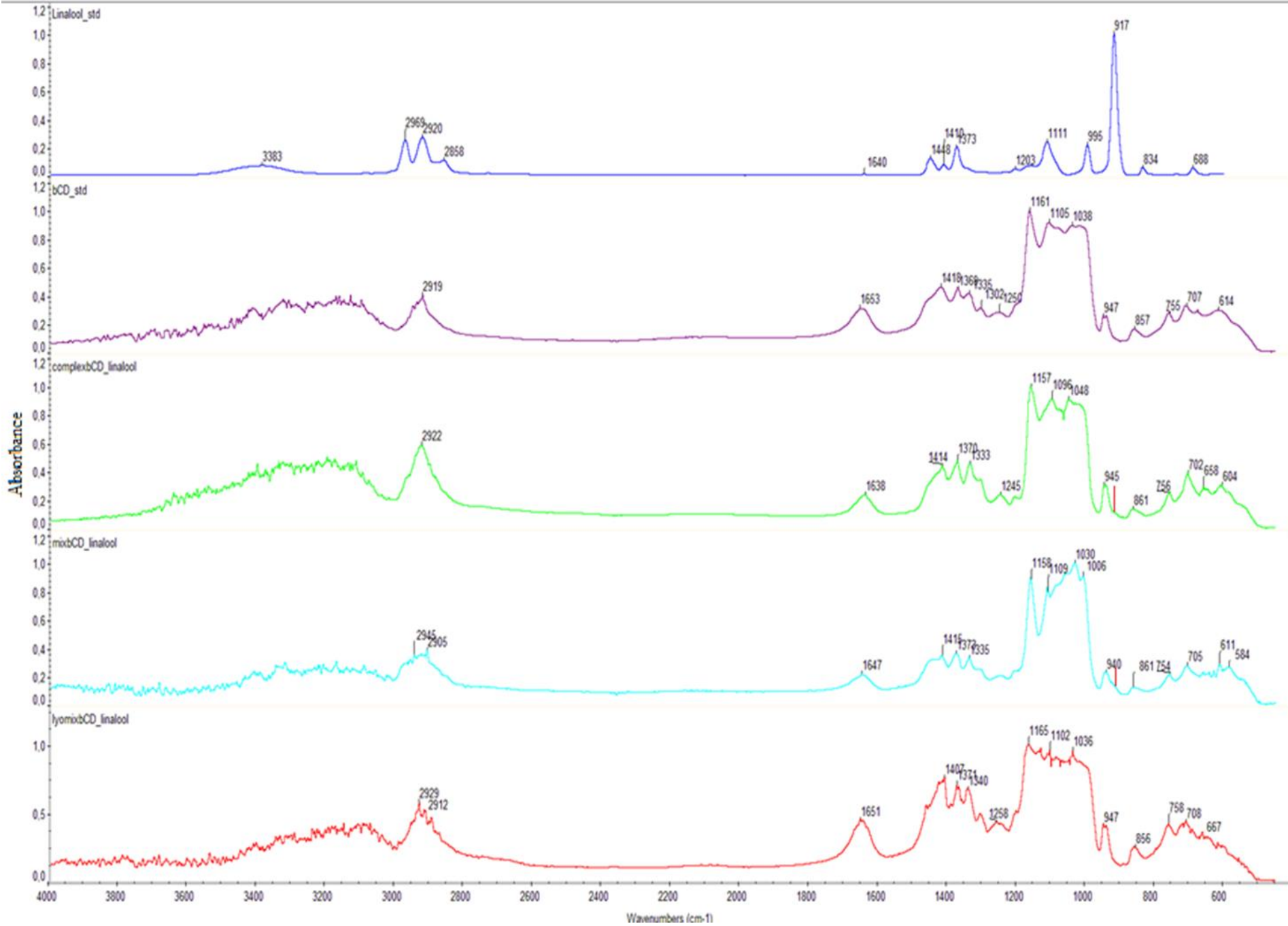
Προϊόν εγκλεισμού λιναλοόλης σε β -κυκλοδεξτρίνη (β -CD)

Τα φάσματα IR της Λιναλοόλης, της β -κυκλοδεξτρίνης, του προϊόντος εγκλεισμού τους, του μίγματος και του λυοφιλιωμένου μίγματος, παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.14**. Οι αποδόσεις των κορυφών της καθαρής β -κυκλοδεξτρίνης παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.6**

Πίνακας 3.6: Ανάλυση κορυφών φάσματος IR, καθαρής β -κυκλοδεξτρίνης [70].

Κυματαριθμός (cm^{-1})	Απόδοση κορυφής
Ευρεία μπάντα στην περιοχή 3600 – 3100	Τάση O – H των υδροξυλίων
1653	Κάμψη των ελεύθερων υδροξυλίων
2919	Ασυμμετρική τάση των $-\text{CH}_2$
Περιοχή 1418 - 1250	Κάμψη του δεσμού C – H
Περιοχή 1161 - 1000	Τάση των αιθερικών και αλκοολικών C – O
Περιοχή 1000 - 700	Κάμψη εκτός επιπέδου του C – H Και σκελετικές δονήσεις C – C στον γλυκοκυρανοζικό δακτύλιο

Στην **Εικόνα 3.14** γίνεται ξεκάθαρο πως οι κορυφές της β -CD κυριαρχούν στα φάσματα του προϊόντος εγκλεισμού με την λιναλοόλη, καθώς και στα απλά μίγματά τους. Κορυφές της λιναλοόλης δεν μπορούν να παρατηρηθούν ξεκάθαρα. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην πολύ μικρή ποσότητα λιναλοόλης (4 μL) που χρησιμοποιήθηκε σε σύγκριση με την κατά πολύ μεγαλύτερη ποσότητα β -κυκλοδεξτρίνης (56 mg), για την κατάλληλη αναλογία 1:2 (ξενιζόμενου μορίου: ξενιστή), κατά τον εγκλεισμό. Ωστόσο μπορούμε να παρατηρήσουμε ορισμένες διαφορές μεταξύ του προϊόντος εγκλεισμού, του μίγματος και του λυοφιλιωμένου μίγματος. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μια μετατόπιση στην κορυφή 1653 cm^{-1} της καθαρής β -CD, στα 1638 cm^{-1} στο προϊόν εγκλεισμού, η οποία όμως εμφανίζεται στα 1647 cm^{-1} και 1651 cm^{-1} για το απλό μίγμα και το λυοφιλιωμένο αντίστοιχα. Η κορυφή αυτή στην καθαρή β -CD οφείλεται στην δόνηση κάμψης των ελεύθερων υδροξυλομάδων της β -CD του δεσμού C – O – H. Η μετατόπιση αυτή για το προϊόν εγκλεισμού, ίσως να υποδεικνύει τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου της λιναλοόλης με τις εσωτερικές υδροξυλομάδες της β -CD. Αντίθετα στα απλά μίγματα αυτό δεν συμβαίνει και η κορυφή δεν μετατοπίζεται αισθητά. Μια ακόμα ένδειξη είναι, η εμφάνιση μιας μικρής κορυφής στην περιοχή 917 cm^{-1} για το προϊόν εγκλεισμού και το απλό μίγμα της β -CD με την λιναλοόλη, που όμως απουσιάζει στο λυοφιλιωμένο μίγμα. Η παρουσία της πιο έντονης κορυφής της λιναλοόλης στο προϊόν εγκλεισμού και στο απλό μίγμα, υποδηλώνει την παρουσία της σε αυτά, καθώς και η απουσία της από το λυοφιλιωμένο μίγμα υποδηλώνει την εξάτμισή της κατά την λυοφιλίωση στα απλά μίγματα αλλά όχι κατά την λυοφιλίωση του προϊόντος εγκλεισμού. Οι διαπιστώσεις αυτές συνηγορούν στο ότι σχηματίστηκε προϊόν εγκλεισμού λιναλοόλης σε β -CD.

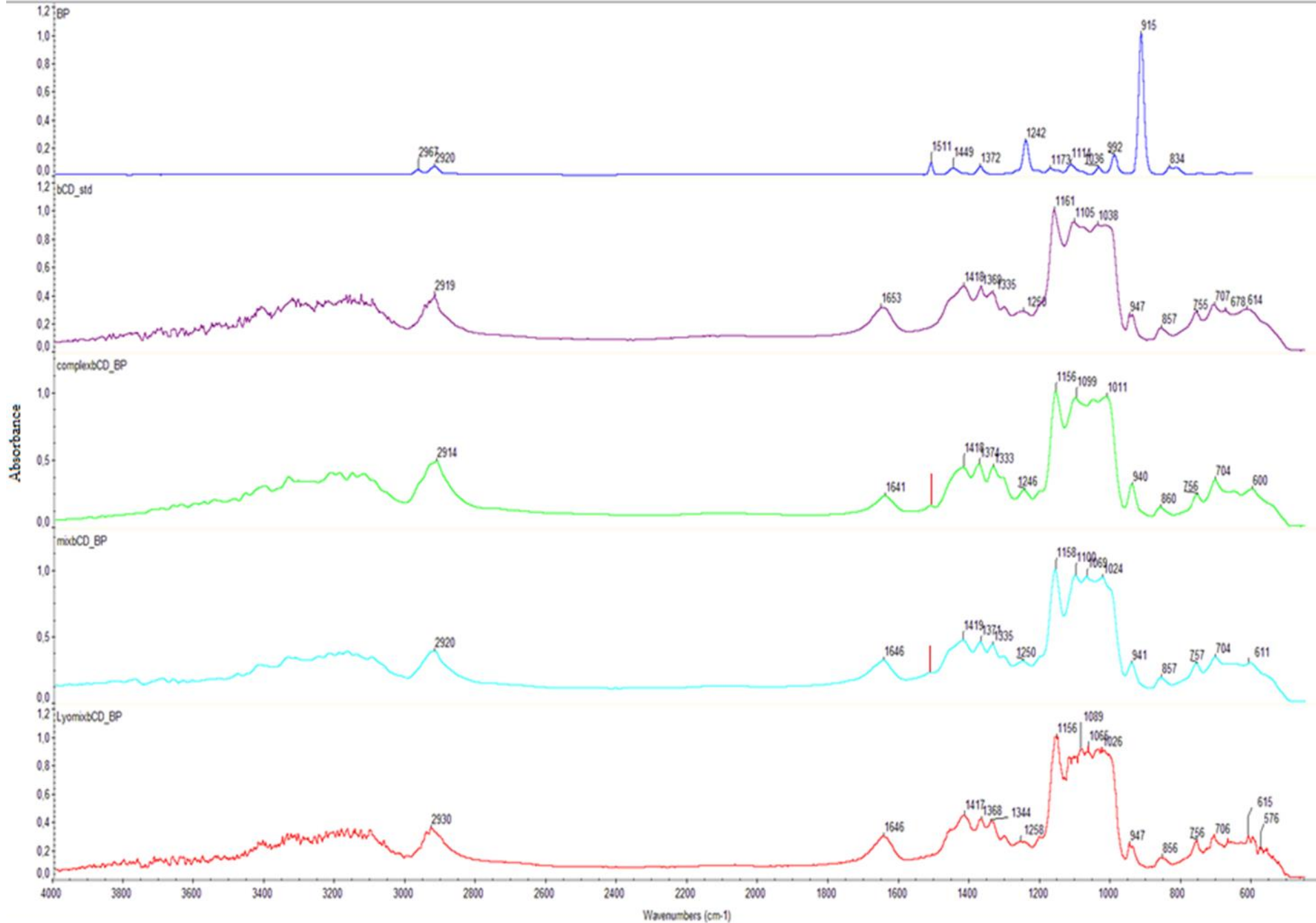


Εικόνα 3.14: FT IR Φάσματα λιναιλόλης, β-κυκλοδεξτρίνης, του συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνης – λιναιλόλης, του μίγματος β-κυκλοδεξτρίνης – λιναιλόλης, και του λυοφιλιωμένου μίγματος

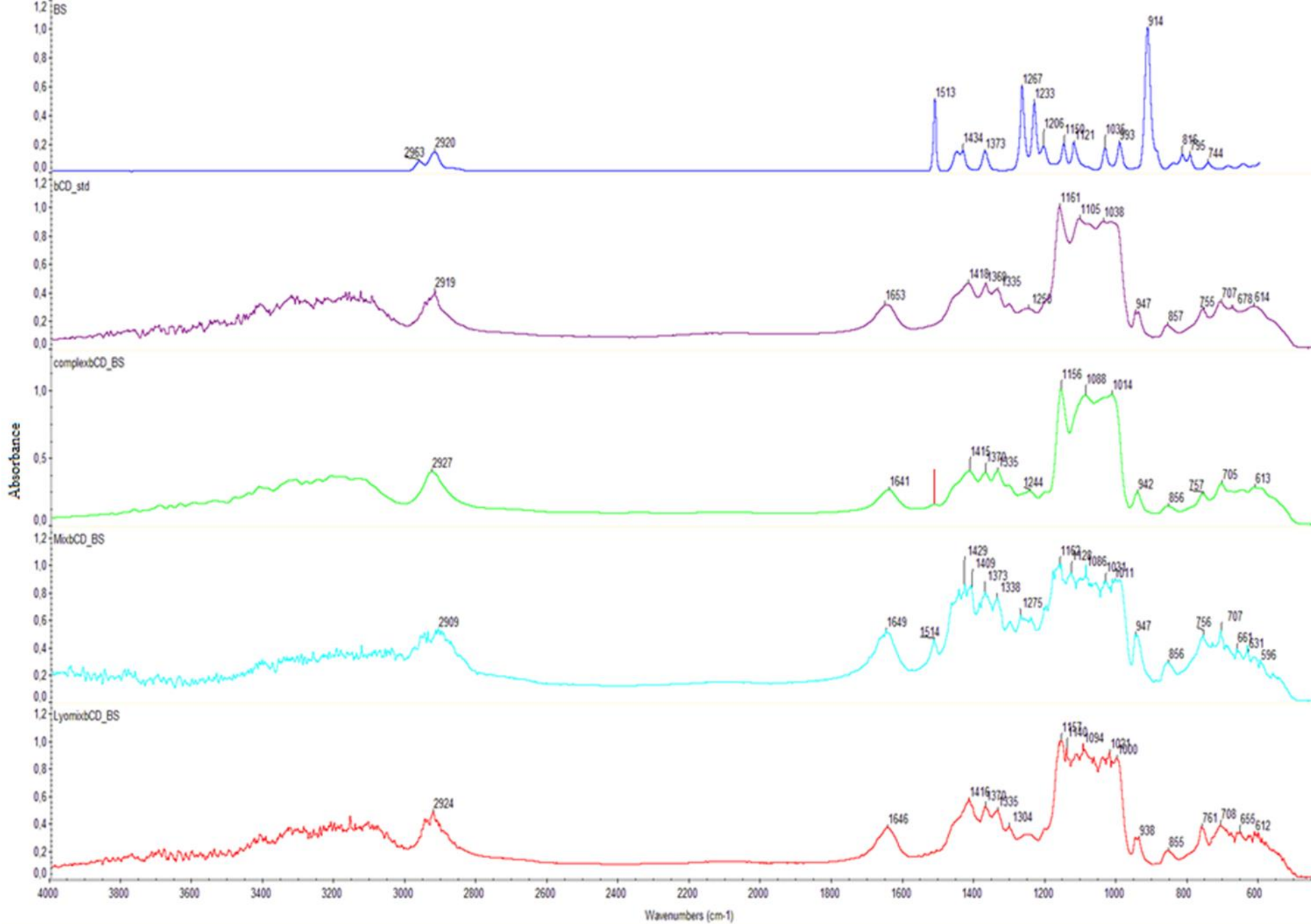
Προϊόν εγκλεισμού αιθερίων ελαίων βασιλικού σε β -κυκλοδεξτρίνη (β -CD)

Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στις **Εικόνες 3.15 και 3.16** που αφορούν τα προϊόντα εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου της ποικιλίας πλατύφυλλου και σγουρού βασιλικού αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις το φασματικό αποτύπωμα της β – κυκλοδεξτρίνης κυριαρχεί στα φάσματα του προϊόντος εγκλεισμού, αλλά και των απλών και λυοφιλιωμένων μιγμάτων τους. Ωστόσο και εδώ φαίνεται να υπάρχει αντίστοιχη μετατόπιση στην κορυφή 1653 cm^{-1} της β -CD, στα 1641 cm^{-1} και για το προϊόν εγκλεισμού του πλατύφυλλου αλλά και του σγουρού βασιλικού. Η μετατόπιση αυτή δεν παρατηρείται τόσο έντονα στα απλά μίγματα, όπου για τον πλατύφυλλο βασιλικό έχουμε μια μετατόπιση στα 1646 cm^{-1} και για τον σγουρό βασιλικό στα 1649 cm^{-1} . Επίσης δεν υπάρχει σημαντική μετατόπιση ούτε στα λυοφιλιωμένα μίγματα, όπου η κορυφή παρατηρείται στα 1646 cm^{-1} και για τις δύο ποικιλίες. Η μετατόπιση στο προϊόν εγκλεισμού, πιθανώς να οφείλεται στην δημιουργία δεσμών υδρογόνου των συστατικών του αιθερίου ελαίου με της ελεύθερες υδροξυλομάδες της β -CD.

Μια ακόμα ένδειξη της δημιουργίας εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων στη β -CD, που όμως δεν παρατηρείται στο προϊόν εγκλεισμού της λιναλοόλης, είναι η εμφάνιση μιας μικρής κορυφής στα 1514 cm^{-1} , στα προϊόντα εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου αλλά και των απλών μιγμάτων τους. Η έντονη αυτή κορυφή στα 1514 cm^{-1} που εμφανίζεται μόνο στα φάσματα IR των καθαρών αιθερίων ελαίων βασιλικού και όχι στην καθαρής λιναλοόλης, υποδηλώνει την ύπαρξη αρωματικών δακτυλίων που προφανώς υπάρχουν στο αιθέριο έλαιο λόγω του υψηλού ποσοστού εστραγκόλης στον πλατύφυλλο και ευγενόλης στον σγουρό βασιλικό. Η εμφάνιση αυτής της κορυφής στα προϊόντα εγκλεισμού και στα απλά μίγματα, απουσιάζει στα λυοφιλιωμένα μίγματα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την παρουσία του αιθερίου ελαίου στα προϊόντα εγκλεισμού και στα απλά μίγματα, αλλά και την εξάτμισή της κατά την λυοφιλίωση στα απλά μίγματα, κάτι που όπως παρατηρούμε δεν συνέβη κατά την λυοφιλίωση του προϊόντος εγκλεισμού. Οι παρατηρήσεις αυτές αποτελούν ισχυρές ενδείξεις του επιτυχούς εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων βασιλικού και της λιναλοόλης σε β -κυκλοδεξτρίνη.



Εικόνα 3.15: FT IR Φάσματα Πλατύφυλλου βασιλικού (BP), β -Κυκλοδεξτρίνης, του συμπλόκου β -κυκλοδεξτρίνης – Πλατύφυλλου βασιλικού, του μίγματος β -κυκλοδεξτρίνης – Πλατύφυλλου βασιλικού, και του λυοφιλιωμένου μίγματος.



Εικόνα 3.16: FT IR Φάσματα Σγυρού βασιλικού (BS), β -Κυκλοδεξτρίνης, του συμπλόκου β -κυκλοδεξτρίνης – Σγυρού βασιλικού, του μίγματος β -κυκλοδεξτρίνης – Σγυρού βασιλικού, και του λυοφιλωμένου μίγματος.

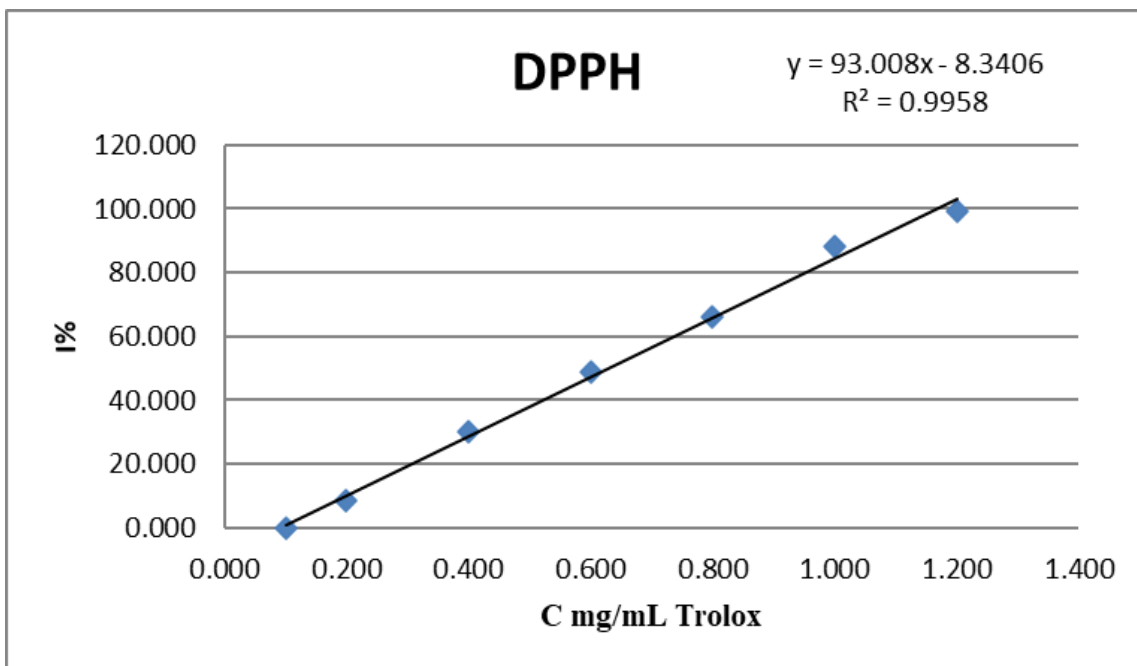
3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ

3.5.1 ΔΟΚΙΜΗ DPPH

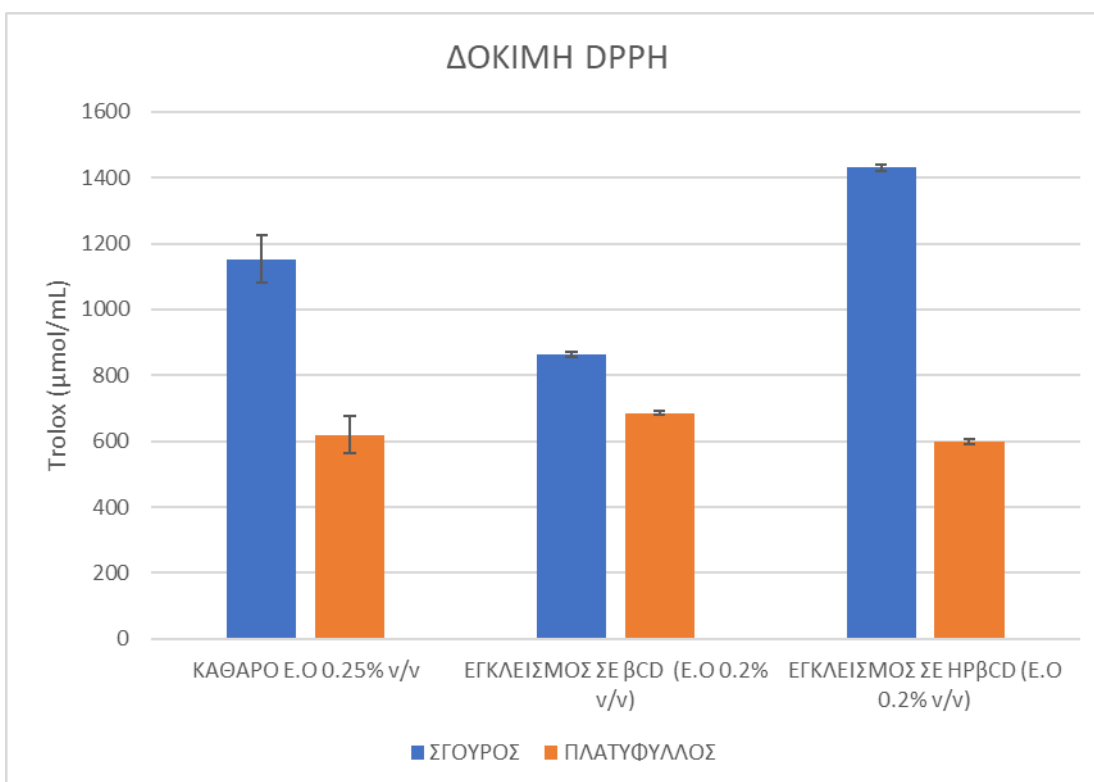
Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH, σε καθαρό αιθέριο έλαιο, των δύο ποικιλιών βασιλικού, όπως και στα προϊόντα εγκλεισμού τους με τις κυκλοδεξτρίνες β -CD και HP- β -CD. Για τον εγκλεισμό του αιθερίου ελαίου στις κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένη ποσότητα αιθερίου ελαίου (0,2% Essential Oil). Επομένως παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα καθαρού αιθερίου ελαίου (0,25% v/v E.O), για την σύγκριση μεταξύ του καθαρού αιθερίου ελαίου και των προϊόντων εγκλεισμού. Στον πίνακα περιγράφονται τα αποτελέσματα της παρεμπόδισης 1 % του καθαρού αιθερίου ελαίου, καθώς και των προϊόντων εγκλεισμού του. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox ($\mu\text{mol/mL}$) για την σύγκρισή τους με την βιβλιογραφία, από πρότυπη καμπύλη αναφοράς γνωστών συγκεντρώσεων Trolox (Εικόνα 3.17).

Πίνακας 3.7: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιλικού με την δοκιμή DPPH.

ΔΟΚΙΜΗ DPPH		
ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΣΤΟΥΡΟΣ	1%	Trolox ($\mu\text{mol/mL}$)
ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ Δ/ΜΑ ΚΑΘΑΡΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ (E.O 0,25% v/v)	59	1153 \pm 71
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ β CD (E.O 0,2% v/v)	32	864 \pm 9
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ HP β CD (E.O 0,2% v/v)	59	1430 \pm 10
ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΠΛΑΤΥΦΥΛΛΟΣ		
ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ Δ/ΜΑ ΚΑΘΑΡΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ (E.O 0,25% v/v)	28	619 \pm 57
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ β CD (E.O 0,2% v/v)	24	686 \pm 5
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ HP β CD (E.O 0,2% v/v)	20	599 \pm 8



Εικόνα 3.17: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox.



Εικόνα 3.18: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιλικού με την δοκιμή DPPH, εκφρασμένα σε Trolox (μmol/mL).

Από τα πειραματικά αποτελέσματα φαίνεται πως το αιθέριο έλαιο του σγουρού βασιλικού παρουσιάζει πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με αυτό του πλατύφυλλου βασιλικού (**Εικόνα 3.18**). Παρατηρούμε επομένως πως η αντιοξειδωτική δράση ανάλογα με την ποικιλία του βασιλικού διαφέρει. Στην βιβλιογραφία παρουσιάζεται ένα μεγάλο εύρος αντιοξειδωτικής ικανότητας για τις διαφορετικές ποικιλίες του βασιλικού, με τιμές ισοδύναμων Trolox από 17 μmol Trolox ανά mL αιθερίου ελαίου για τον *Cinnamom basil* έως 2040 μmol Trolox/mL για τον μικρόφυλλο βασιλικό [72]. Τα δείγματά μας παρουσιάζουν μικρότερες τιμές ισοδύναμων Trolox από τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας με 1153 μmol Trolox/mL για τον σγουρό βασιλικό και 619 μmol Trolox/mL για τον πλατύφυλλο αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ξεκάθαρα ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και για τις δύο ποικιλίες, βάσει των βιβλιογραφικών αναφορών.

Όσον αφορά τα εγκλεισμένα προϊόντα παρουσιάζεται βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης στην περίπτωση του εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου σγουρού βασιλικού σε υδροξυπροπυλ- β -κυκλοδεξτρίνη, ενώ η αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να μειώνεται κατά τον εγκλεισμό σε β -CD. Αντίθετα στην περίπτωση του πλατύφυλλου βασιλικού παρουσιάζεται μικρή αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης κατά τον εγκλεισμό σε β -κυκλοδεξτρίνη ενώ γενικά ο εγκλεισμός συστατικών του αιθερίου ελαίου πλατύφυλλου βασιλικού φαίνεται να διατηρεί την αρχική αντιοξειδωτική δράση του αιθερίου ελαίου και στις δύο περιπτώσεις (**Εικόνα 3.18**).

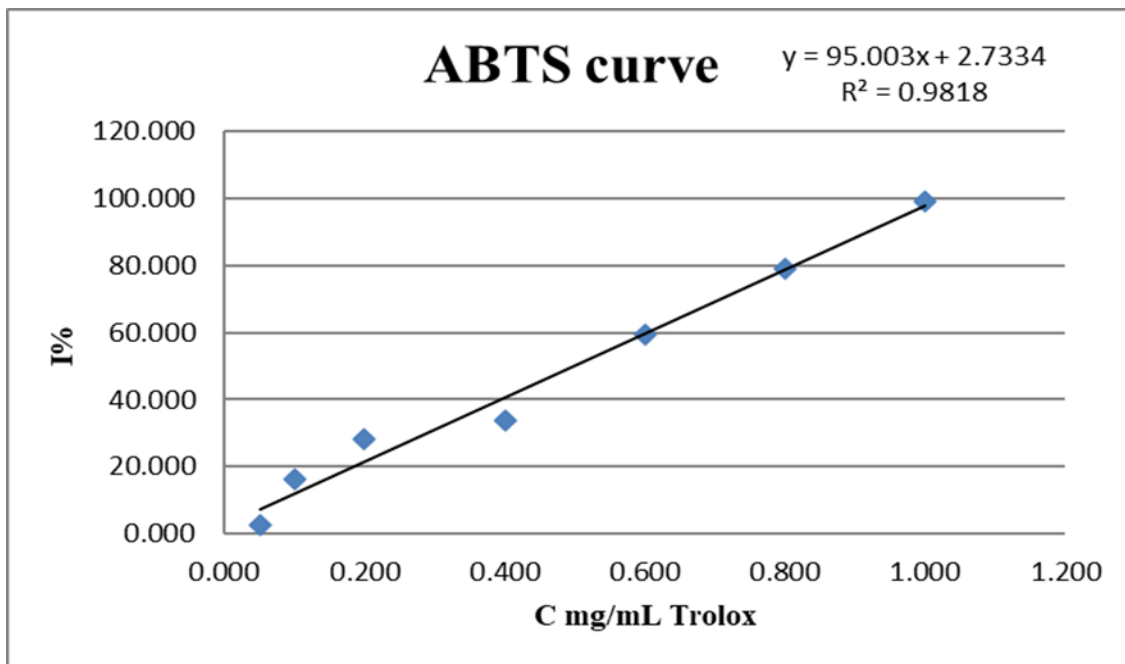
Συγκριτικά με τα προϊόντα εγκλεισμού σε σχέση με το καθαρό αιθέριο έλαιο, οι Kfoury et. al. το 2015 παρατήρησαν πως τα εγκλεισμένα προϊόντα της εστραγκόλης και του αιθερίου ελαίου βασιλικού είχαν βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με την καθαρή εστραγκόλη και το αιθέριο έλαιο. Αυτό ίσως να οφείλεται στον σχηματισμό υδρογονικών δεσμών μεταξύ της κυκλοδεξτρίνης και των συστατικών του αιθερίου ελαίου που εγκλειστήκαν σε αυτή με αποτέλεσμα τα ξενιζόμενα μόρια να γίνονται καλύτεροι δότες ηλεκτρονίου και κατά συνέπεια καλύτερα αντιοξειδωτικά μέσα [26].

3.5.2 ΔΟΚΙΜΗ ABTS

Στον πίνακα αναγράφονται τα αποτελέσματα της παρεμπόδισης (I %) καθαρού αιθερίου ελαίου σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού συγκριτικά με τα προϊόντα εγκλεισμού τους. Στην δοκιμή ABTS, επίσης πραγματοποιήθηκε αραίωση του καθαρού αιθερίου ελαίου σε περιεκτικότητα 0,25% για την επιτυχή σύγκριση με τα προϊόντα εγκλεισμού. Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) από πρότυπη καμπύλη (Εικόνα) γνωστών συγκεντρώσεων Trolox (0 – 1 mg/mL) συναρτήσεως της παρεμπόδισης (I %).

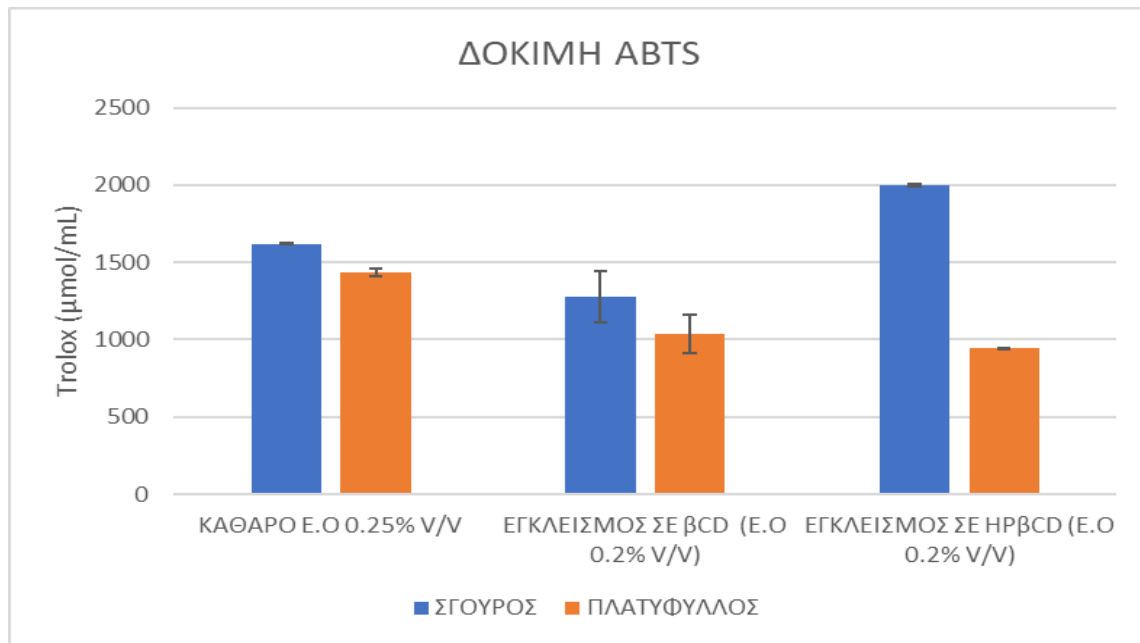
Πίνακας 3.8 : Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιλικού με την δοκιμή ABTS.

ΔΟΚΙΜΗ ABTS		
ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΣΓΟΥΡΟΣ	I%	Trolox (μmol/mL)
ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ Δ/ΜΑ ΚΑΘΑΡΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ (Ε.Ο 0,25% v/v)	99	1620 ± 4
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ βCD (Ε.Ο 0,2% v/v)	64	1277 ± 167
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ ΗΡβCD (Ε.Ο 0,2% v/v)	99	2001 ± 8
ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΠΛΑΤΥΦΥΛΛΟΣ		
ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ Δ/ΜΑ ΚΑΘΑΡΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ (Ε.Ο 0,25% v/v)	88	1437 ± 26
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ βCD (Ε.Ο 0,2% v/v)	52	1034 ± 125
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ ΗΡβCD (Ε.Ο 0,2% v/v)	47	947 ± 2



Εικόνα 3.19 : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox.

Στη εικόνα που ακολουθεί εμφανίζονται οι μετρήσεις της δοκιμής σε ισοδύναμα Trolox (μmol/mL) υπό την μορφή ραβδογράμματος, ώστε να διακρίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα καλύτερα.



Εικόνα 3.20: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιλικού με την δοκιμή ABTS εκφρασμένα σε Trolox (μmol/mL).

Τα δείγματα αιθερίου ελαίου των δύο ποικιλιών βασιλικού που μελετήθηκαν εμφανίζουν τιμές Trolox που κυμαίνονται από 930 μmol/mL Trolox έως 2023 μmol/mL Trolox. Με το καθαρό αιθέριο έλαιο σγουρού βασιλικού να έχει τιμή ισοδύναμων Trolox 1618 μmol/mL ενώ του πλατύφυλλου 1433 μmol/mL Trolox αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό που μπορούμε να παρατηρήσουμε και από το ραβδόγραμμα της εικόνας ..., σημαίνει πως ο σγουρός βασιλικός έχει καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τον πλατύφυλλο. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από τα προϊόντα εγκλεισμού, όπου και σε αυτά φαίνεται πως τα προϊόντα εγκλεισμού του σγουρού βασιλικού εμφανίζουν καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Επιπλέον γίνεται εμφανές πως ο εγκλεισμός αιθερίου ελαίου σγουρού βασιλικού στις κυκλοδεξτρίνες και ιδιαίτερα στην υδροξυπροπυλ β – CD, είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης του. Γεγονός που δεν φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση του πλατύφυλλου βασιλικού, που η αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων εγκλεισμού του πέφτει κατά πολύ.

Τα δείγματά μας φαίνεται να παρουσιάζουν τιμές Trolox, ελαφρώς μεγαλύτερες από αυτές της βιβλιογραφίας. Για τον πλατύφυλλο βασιλικό (sweet basil) στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η συγκέντρωση σε Trolox είναι 1105 μmol/mL, δηλαδή μικρότερης

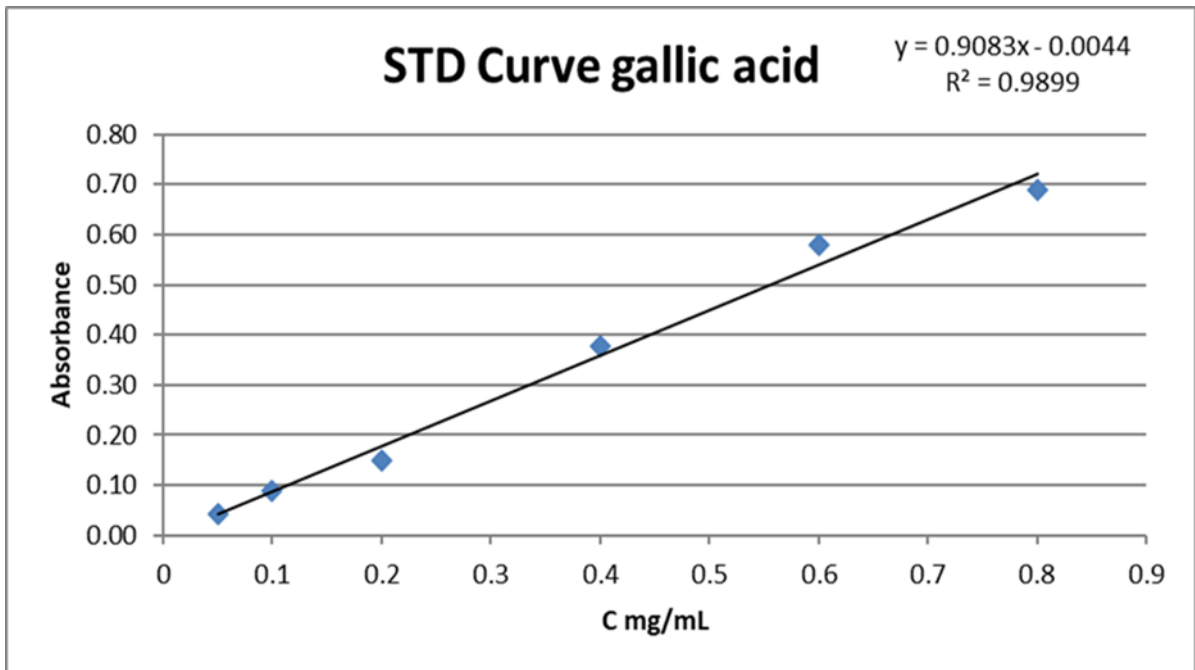
αντιοξειδωτικής δράσης σε σχέση με το δείγμα μας [73]. Ακόμα αναφέρεται πως ο sweet basil είναι μικρότερης αντιοξειδωτικής δράσης από τον ελληνικό τύπο βασιλικού, που ως επί το πλείστον θεωρείται ο σγουρός βασιλικός [74]. Το γεγονός αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει τα δικά μας αποτελέσματα.

3.5.3 ΔΟΚΙΜΗ FOLIN CIOCALTEU

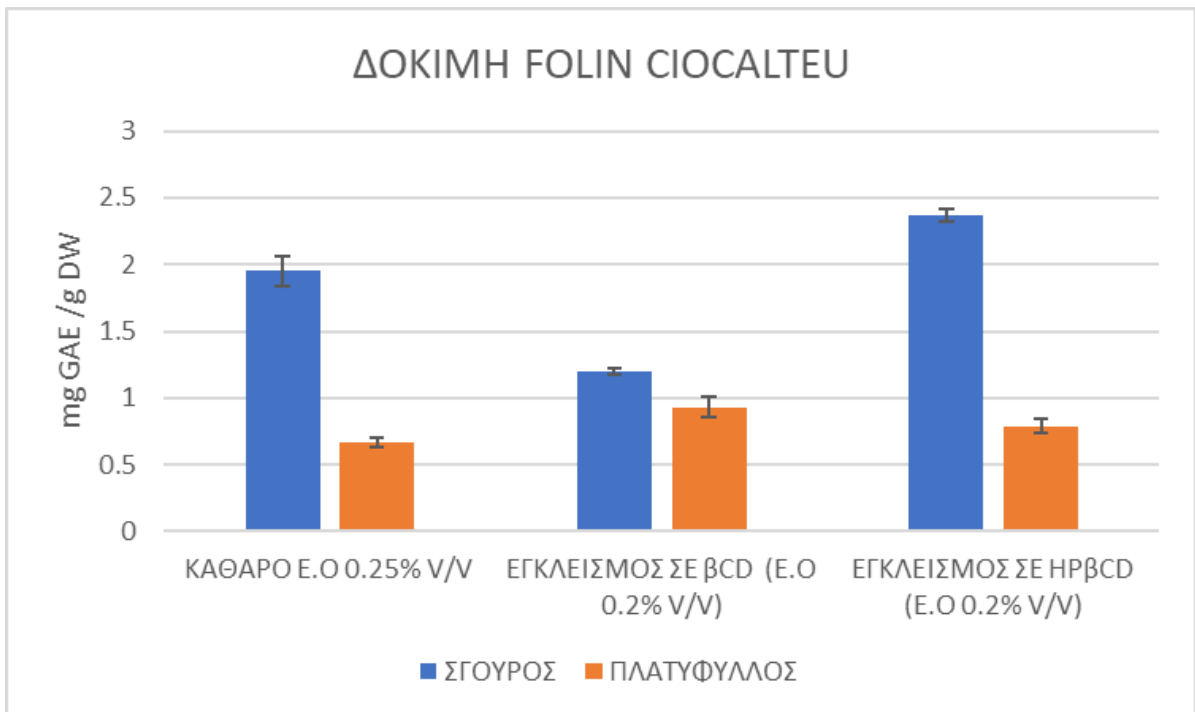
Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά πραγματοποιήθηκε με την δοκιμή Folin Ciocalteu. Στον πίνακα ... αναγράφονται οι απορροφήσεις των καθαρών αιθέριων ελαίων σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού καθώς και των προϊόντων εγκλεισμού τους σε β -CD και HP- β -CD. Στα καθαρά αιθέρια έλαια πραγματοποιήθηκε αραιώση σε μεθανολικό διάλυμα (0,25 % v/v E.O) για την σύγκριση μεταξύ του καθαρού αιθέριου ελαίου και των προϊόντων εγκλεισμού. Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξηρής φυτικής μάζας (mg GAE/g D.W) και δίνονται επίσης στον πίνακα 2. Οι μετρήσεις των δειγμάτων παρουσιάζονται επιπλέον και σε μορφή ραβδογράμματος (**Εικόνα 3.22**) για την συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 3.9 : Αποτελέσματα ολικών φαινολικών συστατικών βασιλικού με την δοκιμή Folin Ciocalteu.

ΔΟΚΙΜΗ FOLIN CIOCALTEU		
ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΣΓΟΥΡΟΣ	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ	mg GAE/g DW
ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ Δ/ΜΑ ΚΑΘΑΡΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ (E.O 0,25% v/v)	0,542	1,95 ± 0,11
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ β -CD (E.O 0,2% V/V)	0,265	1,2 ± 0,02
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ HP- β -CD (E.O 0,2% V/V)	0,527	2,37 ± 0,05
ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΠΛΑΤΥΦΥΛΛΟΣ		
ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ Δ/ΜΑ ΚΑΘΑΡΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ (E.O 0,25% v/v)	0,191	0,67 ± 0,03
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ β -CD (E.O 0,2% V/V)	0,213	0,93 ± 0,08
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ HP- β -CD (E.O 0,2% V/V)	0,179	0,79 ± 0,05



Εικόνα 3.21: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.



Εικόνα 3.22: Ραβδόγραμμα ολικών φαινολικών βασιλικού εκφρασμένα σε mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά g ξηρής φυτικής μάζας.

Οι τιμές ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων μας κυμαίνονται από 0,67 έως 2,37 mg GAE/g DW. Από τα πειραματικά αποτελέσματα μπορούμε να παρατηρήσουμε πως από τις δύο ποικιλίες βασιλικού, ο σγουρός βασιλικός παρουσιάζει πολύ υψηλότερο περιεχόμενο ολικών φαινολικών συστατικών σε σχέση με τον πλατύφυλλο (1,95 mg GAE/g DW για τον σγουρό και 0,67 mg GAE/g DW για τον πλατύφυλλο αντίστοιχα). Οι τιμές των αποτελεσμάτων μας ήταν ελαφρώς μικρότερες από αυτές που παρατηρούνται στην βιβλιογραφία και κυμαίνονται από 3,07 έως 4,99 mg GAE/g DW [75]. Ακόμα σε ερευνά που πραγματοποιήθηκε το 2022, οι Hes et. al, παρατήρησαν πως με κατάλληλη λίπανση ο πλατύφυλλος βασιλικός μπορεί να αποδώσει υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο από τον σγουρό βασιλικό [74].

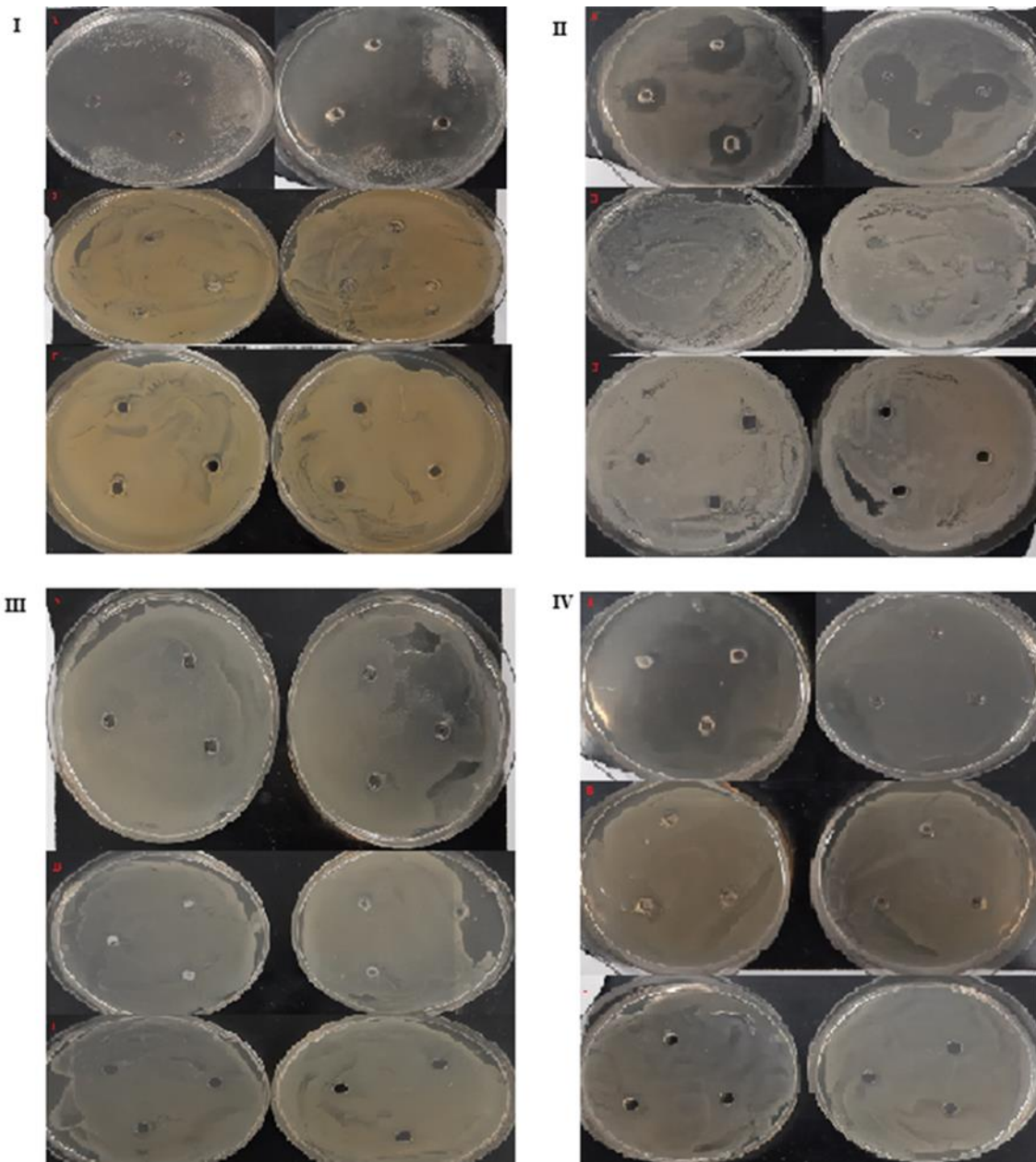
Από το ραβδόγραμμα επίσης παρατηρείται πως τα εγκλεισμένα προϊόντα και των δύο ποικιλιών βασιλικού εμφανίζουν ποσοστά φαινολικού περιεχομένου. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως κατά τον εγκλεισμό των αιθερίων ελαίων και των δύο ποικιλιών σχηματίστηκε ένα ποσοστό συμπλόκων εγκλεισμού με φαινολικά συστατικά της κάθε ποικιλίας αντίστοιχα. Μάλιστα φαίνεται πως ο εγκλεισμός βοήθησε στη συντήρηση των φαινολικών συστατικών με αποτέλεσμα στην περίπτωση του πλατύφυλλου βασιλικού να παρατηρείται μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο στα εγκλεισμένα προϊόντα από ότι στο καθαρό αιθέριο έλαιο. Στην περίπτωση του σγουρού βασιλικού αυτό παρατηρείται κατά τον εγκλεισμό σε HP- β -CD, με πολύ υψηλή τιμή ισοδύναμων γαλλικού οξέος (2,37 mg GAE/g DW), αλλά όχι στον εγκλεισμό με β -CD.

3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΤΟΥ

Η μέθοδος ζωνών αναστολής με βοθρία (well – diffusion assay), χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της αντιμικροβιακής δράσης του αιθερίου ελαίου σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού, καθώς και των προϊόντων εγκλεισμού τους σε β -CD και HP- β -CD. Μελετήθηκε μια ποικιλία μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένου θετικών (+), αλλά και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (**Πίνακας 3.10**). Όπου εξετάστηκε η ικανότητα των αιθερίων ελαίων των δυο ποικιλιών και κάθε προϊόντος εγκλεισμού, να παρεμποδίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων σε τρυβλία μετά από 24 ώρες (**Εικόνα 3.23**). Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι ζώνες αναστολής σε χιλιοστά (mm) για τα υπό εξέταση δείγματα, για καθένα από τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκε.

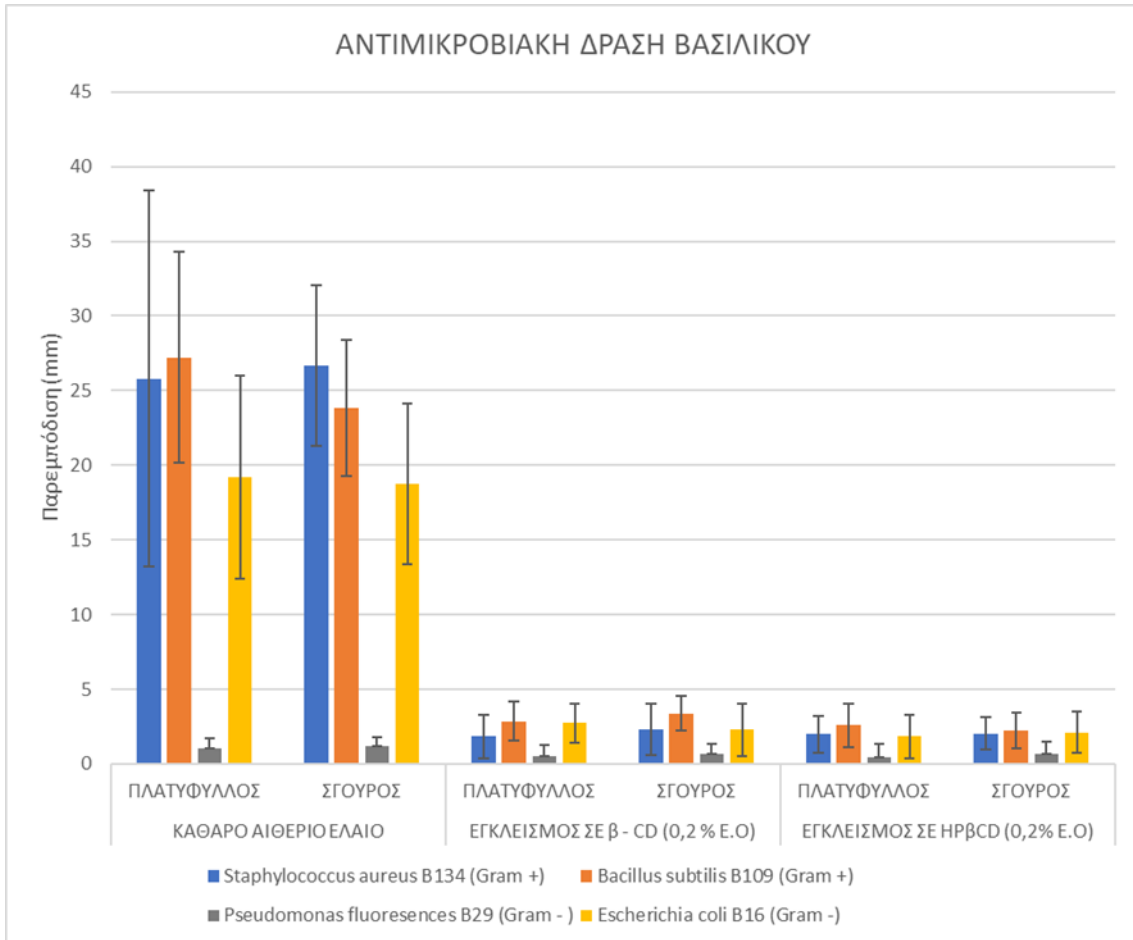
Πίνακας 3.10: Παρεμποδιστική δράση καθαρού αιθερίου ελαίου και των προϊόντων εγκλεισμού τους.

ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ (mm)	ΚΑΘΑΡΟ ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ		ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ β - CD (0,2 % Ε.Ο)		ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ ΗΡ β CD (0,2% Ε.Ο)	
	ΠΛΑΤΥΦΥΛΛΟΣ	ΣΓΟΥΡΟΣ	ΠΛΑΤΥΦΥΛΛΟΣ	ΣΓΟΥΡΟΣ	ΠΛΑΤΥΦΥΛΛΟΣ	ΣΓΟΥΡΟΣ
<i>Staphylococcus aureus</i> B134 (Gram +)	25,799 ± 12,593	26,671 ± 5.347	1,832 ± 1,468	2,314 ± 1,694	1,996 ± 1,229	2,043 ± 1,098
<i>Bacillus subtilis</i> B109 (Gram +)	27,219 ± 7,077	23,844 ± 4,568	2,842 ± 1,299	3,374 ± 1,156	2,580 ± 1,440	2,214 ± 1,193
<i>Pseudomonas fluorescences</i> B29 (Gram -)	1,012 ± 0,732	1,172 ± 0,602	0,536 ± 0,717	0,698 ± 0,622	0,509 ± 0,895	0,666 ± 0,791
<i>Escherichia coli</i> B16 (Gram -)	19,194 ± 6,800	18,725 ± 5,371	2,746 ± 1,311	2,274 ± 1,765	1,834 ± 1,433	2,092 ± 1,385



Εικόνα 3.23: Αντιμικροβιακή δράση αιθερίου ελαίου, δεξιά Σγουρού, αριστερά Πλατύφυλλου βασιλικού σε I) *Staphylococcus aureus* II) *Bacillus subtilis* III) *Pseudomonas fluorescences* IV) *Escherichia coli*. A) Καθαρό αιθέριο έλαιο B) Εγκλεισμός σε β -CD (0,2% E.O) Γ) Εγκλεισμός σε HP- β -CD (0,2% E.O).

Η συγκριτική μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης μεταξύ του αιθερίου ελαίου πλατύφυλλου και σγουρού βασιλικού αναπαρίσταται στο παρακάτω ραβδόγραμμα (Εικόνα 3.24). Επίσης στο ραβδόγραμμα μπορεί να φανεί και η σύγκριση της αντιμικροβιακής δράσης μεταξύ του καθαρού αιθερίου ελαίου και των προϊόντων εγκλεισμού.



Εικόνα 3.24: Παρεμποδιστική δράση αιθερίου ελαίου βασιλικού και των προϊόντων εγκλεισμού του, ενάντι 4 τροφιμογενών βακτηριών.

Παρατηρούμε πως στην περίπτωση του καθαρού αιθερίου ελαίου και οι δύο ποικιλίες παρουσίασαν πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, στους περισσότερους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς. Στην περίπτωση των θετικών (+) κατά Gram βακτηριών τα αιθέρια έλαια παρουσίασαν σχεδόν ολοκληρωτική παρεμπόδιση ανάπτυξης των βακτηρίων στο τρυβλίο (Ζώνες αναστολής > 25 mm, μέσος όρος). Όπως και στην περίπτωση του αρνητικού (-) κατά Gram βακτηρίου *Escherichia coli* με πολύ υψηλή παρεμποδιστική δράση (Ζώνες αναστολής > 18 mm, μέσος όρος). Από την άλλη πλευρά το αρνητικό (-) κατά Gram βακτήριο *Pseudomonas fluorescences* δεν έδειξε καμία ευαισθησία ούτε στη ποικιλία του πλατύφυλλου ούτε στη ποικιλία του σγουρού βασιλικού. Από την

σύγκριση των δύο αιθερίων ελαίων βασιλικού, φαίνεται πως η ποικιλία του πλατύφυλλου βασιλικού έχει ελάχιστα καλύτερη αντιμικροβιακή δράση από αυτή του σγουρού βασιλικού. Παρόλα αυτά τα αιθέρια έλαια και των δύο ποικιλιών αποτελούν αναμφίβολα ισχυρούς αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Από το ραβδόγραμμα (**Εικόνα 3.24**) επίσης παρατηρούμε πως τα προϊόντα εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων, είχαν πολύ μικρότερη παρεμποδιστική δράση σε σύγκριση με τα καθαρά αιθέρια έλαια. Αυτό βέβαια συμβαίνει διότι η ποσοστιαία αναλογία αιθερίου ελαίου μέσα στο προϊόν εγκλεισμού αντιστοιχεί σε 0,2% v/v, γεγονός που σημαίνει πως η παρεμποδιστική δράση του προϊόντος εγκλεισμού μειώνεται κατά πολύ και δεν αρκεί για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βακτηρίων σε ένα 24ωρο.

Εξετάζοντας τις τυπικές αποκλίσεις των μέσων για τα δύο αιθέρια έλαια, παρατηρούμε πως η ποικιλία του σγουρού βασιλικού έχει μικρότερες τυπικές αποκλίσεις σε κάθε εξεταζόμενο μικροοργανισμό. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως ο σγουρός βασιλικός έχει καλύτερη επαναληψιμότητα (τιμές πιο κοντά στο μέσο) από ότι ο πλατύφυλλος βασιλικός. Γενικά παρατηρούμε τυπικές αποκλίσεις αρκετά υψηλές, δηλαδή υπάρχουν τιμές παρεμπόδισης που ξεφεύγουν αρκετά από τον μέσο. Αυτό φαίνεται κυρίως στις περιπτώσεις των εγκλεισμένων προϊόντων όπου σε πολλά βοθρία δεν παρατηρείται καθόλου παρεμπόδιση (τιμή παρεμπόδισης ίση με μηδέν). Το γεγονός των υψηλών τυπικών αποκλίσεων ίσως μπορεί να εξηγηθεί από την άνιση διάχυση του αιθερίου ελαίου στο τρυβλίο λόγω της διαφορετικότητας των βοθρίων.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα έρευνα έγινε μελέτη σε δύο πολύ συνήθεις ποικιλίες βασιλικού (*Ocimum basilicum*) του ελληνικού τοπίου. Στην ποικιλία του σγουρού βασιλικού με μικρά χαρακτηριστικά φύλλα που σχηματίζουν συμπαγή θάμνο και στην ποικιλία του πλατύφυλλου βασιλικού ή αλλιώς γλυκός βασιλικός (Sweet basil) μια πολύ κοινή ποικιλία του είδους *Ocimum basilicum* με μεγάλα πλατιά φύλλα. Αρχικά έγινε απομόνωση και παραλαβή του αιθερίου ελαίου των δύο ποικιλιών, όπου παρατηρήθηκαν παρόμοιες αποδόσεις για τις δύο ποικιλίες με ελαφρά καλύτερη απόδοση για τον σγουρό βασιλικό 0,81% και 0,78% για τον πλατύφυλλο βασιλικό. Η απόδοση ήταν σχετικά μικρή και στις δύο ποικιλίες βασιλικού σε σχέση με την βιβλιογραφία όπου δίνεται η απόδοση για τον πλατύφυλλο βασιλικό να είναι πάνω από 1,3%. Φυσικά όπως παρατηρούν και οι ερευνητές η απόδοση εξαρτάται κατά μεγάλο ποσοστό από την σοδειά, τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν ανά την σοδειά καθώς και την γεωγραφική τοποθεσία που θα καλλιεργηθεί [64]. Παράλληλα μεγάλο ρόλο έχει και η μέθοδος απομόνωσης του αιθερίου ελαίου. Το 2016 οι Shiwakoti et al. διαπίστωσαν πως η υδρο – ατμοαπόσταξη είχε πολύ καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση του αιθερίου ελαίου βασιλικού σε σχέση με τη υδροαπόσταξη, η οποία και χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα [63].

Η ποιοτική σύσταση και η μελέτη του χημειότυπου των αιθερίων ελαίων των δύο ποικιλιών (*Ocimum basilicum*) που καλλιεργούνται στον ελληνικό χώρο προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (GS – MS). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο σγουρός βασιλικός είναι μικτού χημειότυπου λιναλοόλης (40%) ευγενόλης (16,4%), ενώ στην σύστασή του ταυτοποιήθηκαν συνολικά 15 ουσίες με ποσοστό πάνω από 1%. Αντίθετα στην ποικιλία του πλατύφυλλου βασιλικού παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό λιναλοόλης (57,8%), υψηλότερο από το 50% τον συνολικών συστατικών, κάτι που τον καθιστά αποκλειστικά χημειότυπου λιναλοόλης. Στην ποικιλία του πλατύφυλλου ανιχνεύθηκαν συνολικά 7 ουσίες με ποσοστό πάνω από 1%, όπου παρατηρήθηκε σε μεγάλο ποσοστό εστραγκόλη με ποσοστό 16,32%.

Το αιθέριο έλαιο του βασιλικού ανάλογα με την ποικιλία του, έχει ταξινομηθεί σε τέσσερις χημειότυπους σύμφωνα με τη χημική του σύνθεση και τη γεωγραφική του προέλευση. Ο ευρωπαϊκός τύπος, που καλλιεργείται στην Ευρώπη, τις ΗΠΑ και την Αφρική, χαρακτηρίζεται από τη λιναλοόλη και τη μεθυλ - καβικόλη ως τα κύρια συστατικά του ελαίου. Ο δεύτερος τύπος, που βρίσκεται στις Κομόρες και στις Σεϋχέλλες, στην Αφρική και στη νήσο Ρεουνιόν, χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση μεθυλ - Καβικόλης. Ο τροπικός τύπος που προέρχεται από την Ινδία, το Πακιστάν, τη Γουατεμάλα, την Αϊτή και την Αφρική είναι πλούσιος σε μεθυλ - κινναμικό. Ένας άλλος χημειότυπος βασιλικού, με κύριο συστατικό την ευγενόλη, είναι κοινός στη Βόρεια Αφρική, Ρωσία, την Ανατολική Ευρώπη και μέρη της Ασίας. Μελέτες που διεξήχθησαν σχετικά με τη σύνθεση του αιθερίου ελαίου του βασιλικού αποκάλυψε μια τεράστια ποικιλομορφία στα συστατικά του ελαίου του με διαφορετικούς χημειότυπους από πολλές περιοχές του κόσμου. Ωστόσο τα κύρια συστατικά που έχουν απομονωθεί από διάφορες ποικιλίες *Ocimum basilicum* περιλαμβάνουν λιναλοόλη, μεθυλ Καβικόλη,

ευγενόλη, μεθυλ κινναμικό, 1,8-κινεόλη, μπεργαμοντένιο, λιμονένιο, καμφορά, ακαδινόλη, γερανιόλη. Στα δείγματά μας παρουσιάζονται οι ποικιλίες του σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού (sweet basil), δύο κλασσικές ποικιλίες στο ελληνικό τοπίο. Οι ποικιλίες αυτές φαίνεται να παρομοιάζουν αρκετά στον ευρωπαϊκό χημειότυπο. Συγκεκριμένα ο σγουρός βασιλικός, με υψηλά ποσοστά λιναλόολης και ευγενόλης παρομοιάζει με τις ποικιλίες που απαντώνται στην Τσεχία, την Γουινέα και την νήσο Reunion. Από την άλλη πλευρά η χημική σύσταση του πλατύφυλλου βασιλικού φαίνεται να ομοιάζει με τον ιταλικό τύπο που είναι πλούσιος σε λιναλόολη, εστραγκόλη και ευγενόλη. Άλλωστε ο sweet basil (πλατύφυλλος βασιλικός) καλλιεργείται κυρίως στην Ιταλία. Ωστόσο το δείγμα μας πλατύφυλλου βασιλικού φαίνεται να παρομοιάζει περισσότερο με τον αιγυπτιακό τύπο που μοιάζει πολύ με τον ευρωπαϊκό και χαρακτηρίζεται από πλούσια περιεκτικότητα σε λιναλόολη και μεθυλ – καβικόλη [2].

Το κύριο μέρος του πειράματος ήταν η παρασκευή προϊόντων εγκλεισμού του αιθερίου ελαίου των δύο ποικιλιών βασιλικού καθώς και της κύριας ένωσής τους της λιναλοόλης σε β -κυκλοδεξτρίνη και υδροξυπροπυλ- β -κυκλοδεξτρίνη, με σκοπό τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των συμπλόκων και την μελέτη της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης του καθαρού αιθερίου ελαίου συγκριτικά με αυτά τα προϊόντα εγκλεισμού. Αρχικά πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφική μελέτη και ανάλυση της δομής των συμπλόκων λιναλοόλης με β -κυκλοδεξτρίνη. Το σύμπλοκο λιναλοόλης με υδροξυπροπυλ- β -κυκλοδεξτρίνη δεν μπορεί να μελετηθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, καθώς λόγω της τυχαίας υποκατάστασης με υδροξυ-προπυλομάδες στην κυκλοδεξτρίνη, αυτή αδυνατεί να σχηματίσει ομοιόμορφο κρύσταλλο. Έτσι ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός και η δομική μελέτη του συμπλόκου της λιναλοόλης με την υδροξυπροπυλ- β -κυκλοδεξτρίνη καθώς και η σύγκριση του με το σύμπλοκο της λιναλοόλης σε β -κυκλοδεξτρίνη, έγινε αντίστοιχα με μελέτες διαλυτότητας φάσης και υπολογιστικά χρησιμοποιώντας μεθόδους μοριακού ελλιμενισμού και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου λιναλοόλης β -κυκλοδεξτρίνης (lin/ β -CD), όπως προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, μας έδωσε πληροφορίες για την δομή και τον τρόπο ενθυλάκωσης της λιναλοόλης στην κοιλότητα της β -κυκλοδεξτρίνης. Σύμφωνα με αυτές, ένα μόριο λιναλοόλης βρέθηκε εγκλεισμένο στην κοιλότητα της β -κυκλοδεξτρίνης, αποδιατεταγμένο σε δύο θέσεις (Α και Β), με ποσοστά κατάληψης 60 και 40 %, αντίστοιχα. Το σύμπλοκο σχηματίζει head-to-head διμερή, όπου στις υδροφοβικές κοιλότητες εγκολπώνονται οι αλειφατικές αλυσίδες των μορίων της λιναλοόλης. Η υδροξυλομάδα της λιναλοόλης τοποθετείται κοντά στη πρωτοταγή στενή πλευρά της β -κυκλοδεξτρίνης και σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με γειτονικά διμερή. Έτσι τα διμερή στοιβάζονται κατά μήκος του άξονα c σχηματίζοντας αυλούς τύπου ενδιάμεσου καναλιού (IM). Οι δεσμοί υδρογόνου της εγκλεισμένης λιναλοόλης με τα πρωτοταγή OH των γειτονικών διμερών οδηγούν στο σχηματισμό «υπερ-συμπλόκων» τα οποία έχουν την τάση να συσσωματώνονται περαιτέρω. Η δημιουργία τέτοιων

συσσωματωμάτων στο διάλυμα και η γρήγορη καθίζηση τους, δίνει μια πιθανή ερμηνεία για τη χαμηλή υδατοδιαλυτότητα του $\text{lip}/\beta\text{-CD}$. από πού παρατηρείται στα διαγράμματα διαλυτότητας φάσης (εμφανίζονται διαγράμματα διαλυτότητας τύπου B₁) για τα συμπλοκα λιναλοόλης σε $\beta\text{-CD}$ και HP- $\beta\text{-CD}$.

Από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής σε υδατικό περιβάλλον διαπιστώσαμε πως ο εγκλεισμός της λιναλοόλης σε $\beta\text{-CD}$ και ο σχηματισμός head-to-head διμερών είναι δυναμικά σταθερός. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις τιμές για τις ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης ΔG_{bind} της λιναλοόλης στους ξενιστές ($\beta\text{-CD}$). Επίσης φαίνεται πως η υδροξυλομάδα της λιναλοόλης σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα υδροξύλια της πρωτοταγούς πλευράς, γεγονός που οδηγεί σε πιο σταθερό σύμπλοκο. Ωστόσο υπάρχουν χρονικά διαστήματα που η λιναλοόλη δεν φαίνεται να σχηματίζει δεσμό με κάποιο από τα υδροξύλια O6n των γλυκοζών, στα χρονικά διαστήματα αυτά ίσως η λιναλοόλη μετατοπίζεται στην πρώτη θέση και δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα O6nH των γειτονικών κυκλοδεξτρινών όταν σχηματίζεται η tail-to-tail διαμόρφωση. Αντίθετα το σύμπλοκο $\text{lip}/\text{HP-}\beta\text{-CD}$ αν και παραμένει σταθερό στο υδατικό περιβάλλον, χαρακτηρίζεται από μικρότερες απόλυτες τιμές ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης ΔG_{bind} της λιναλοόλης στον ξενιστή.

Η φασματοσκοπική μελέτη του συμπλόκου δείχνει ενίσχυση της υδατικής διαλυτότητας της λιναλοόλης μετά τον εγκλεισμό της τόσο στην φυσική όσο και την τροποποιημένη $\beta\text{-CD}$. Συγκεκριμένα η ποσότητα της διαλυμένης λιναλοόλης αυξήθηκε έως τα 11 mM με την συμπλοκοποίηση της με $\beta\text{-CD}$ και μέχρι τα 21 mM κατά την συμπλοκοποίηση της με HP- $\beta\text{-CD}$, κάτι που οφείλεται στον πιο αποτελεσματικό εγκλεισμό της λιναλοόλης στην HP- $\beta\text{-CD}$ ($K_c = 125 \text{ L/mol}$) από την $\beta\text{-CD}$ ($K_c = 117 \text{ L/mol}$), καθώς και στην υψηλότερη υδατοδιαλυτότητα της HP- $\beta\text{-CD}$ που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας της ενθυλακωμένης λιναλοόλης στο νερό. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις μετά από μια ορισμένη τιμή της συγκέντρωσης της CD και συγκεκριμένα 10mM για $\beta\text{-CD}$ και 22,5mM για την HP- $\beta\text{-CD}$, δεν παρατηρείται αύξηση της διαλυτότητας της λιναλοόλης. Αυτό γίνεται εμφανές από τα διαγράμματα διαλυτότητας της λιναλοόλης στις $\beta\text{-CD}$ και HP- $\beta\text{-CD}$, όπου φαίνεται πως η διαλυτότητα της λιναλοόλης αυξάνει γραμμικά για μικρές συγκεντρώσεις των CDs, όπου η μοριακή αναλογία λιναλοόλης:CD ευνοεί την λιναλοόλη και στη συνέχεια σταθεροποιείται σε ένα πλατό. Στην περίπτωση της $\beta\text{-CD}$ πρώτα μειώνεται και μετά σταθεροποιείται. Αυτό υποδηλώνει πως τα σύμπλοκα εγκλεισμού της λιναλοόλης με τις $\beta\text{-CD}$ και HP- $\beta\text{-CD}$ είναι δυσδιάλυτα, όταν ο εγκλεισμός της λιναλοόλης έχει γίνει πλήρως στο διάλυμα (διαγράμματα διαλυτότητας τύπου B) και προκαλούν την καταβύθισή τους. Το γεγονός αυτό όπως είδαμε από την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής οφείλεται στα υδροξύλια της λιναλοόλης που βρίσκονται στην πρωτοταγή μεριά της $\beta\text{-CD}$ και σχηματίζουν δεσμούς με άλλα διμερή $\beta\text{-CD}$ /λιναλοόλης, δημιουργώντας έτσι συσσωματώματα τα οποία καταβυθίζονται ως ίζημα. Εν κατακλείδι

μπορούμε να συμπεράνουμε πως ο εγκλεισμός της λιναλοόλης με CDs βελτιώνει την υδατική διαλυτότητα και τη σταθερότητα της λιναλοόλης η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και καλύτερη κατανομή της λιναλοόλης σε προϊόντα με βάση το νερό. Αν και μικρότερης διαλυτότητας, η β -CD λόγω του χαμηλού κόστους παραγωγής της καθώς και της διαπιστευμένης μη τοξικότητάς της κατά την χρήση της από τον άνθρωπο, αποτελεί συνηθέστερο μόριο ξενιστή για την ενθυλάκωση της λιναλοόλης.

Η μελέτη με φασματοσκοπία FT-IR παρουσίασε επίσης σαφείς ενδείξεις του επιτυχούς εγκλεισμού αιθερίου ελαίου πλατύφυλλου και σγουρού βασιλικού καθώς και της κύριας χημικής τους ένωσης της λιναλοόλης, σε β -κυκλοδεξτρίνη. Στα φάσματα των προϊόντων εγκλεισμού και των μιγμάτων τους κυριαρχεί κυρίως η φασματική απορρόφηση της β -κυκλοδεξτρίνης. Ξεκάθαρη απεικόνιση φασματικών κορυφών που να αποδίδονται στο αιθέριο έλαιο ή στη λιναλοόλη δεν είναι εφικτή.

Οι διαφορές ανάμεσα στα προϊόντα εγκλεισμού και στα μίγματά τους εντοπίζονται κυρίως στην μετατόπιση μιας συγκεκριμένης κορυφής της β -κυκλοδεξτρίνης που αποδίδεται στην κάμψη των ελεύθερων υδροξυλομάδων που συμβαίνει στο δεσμό C – O – H. Η μετατόπιση αυτή είναι αισθητή στα προϊόντα εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων και της λιναλοόλης (μετατόπιση μεγαλύτερη από 10 cm^{-1}) αλλά όχι στα μίγματά τους. Πιθανώς κατά τον σχηματισμό συμπλόκου σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων της β -κυκλοδεξτρίνης και των εκάστοτε χημικών ενώσεων, που προκαλούν την εν λόγω μετατόπιση.

Επιπλέον και στην περίπτωση της καθαρής λιναλοόλης και των αιθερίων ελαίων του βασιλικού εντοπίζονται στα προϊόντα εγκλεισμού μικρές κορυφές χαρακτηριστικές της λιναλοόλης και ενώσεων του αιθερίου ελαίου του βασιλικού. Ο εντοπισμός των χαρακτηριστικών αυτών κορυφών στα προϊόντα εγκλεισμού και στα απλά μίγματα αλλά όχι στα μίγματα που υπέστησαν λυοφιλίωση, υποδηλώνει αφενός την παρουσία του αιθερίου ελαίου ή της λιναλοόλης σε αυτά και αφετέρου την εξάτμισή τους από τα λυοφιλιωμένα μίγματα. Το γεγονός αυτό αποτελεί σαφή ένδειξη του επιτυχή εγκλεισμού, της λιναλοόλης ή των άλλων χημικών ενώσεων του αιθερίου ελαίου, καθώς και τα προϊόντα εγκλεισμού υπέστησαν την διαδικασία της λυοφιλίωσης και παρόλα αυτά παρατηρούμε της χαρακτηριστικές κορυφές των συστατικών.

Τα αποτελέσματα μας αυτά έρχονται να συνηγορήσουν με αυτά των Menezes et. al. [70] και Kfoury et. al. [26], στους οποίους δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές οπτικές διαφορές ανάμεσα στα σύμπλοκα και τα μίγματά τους. Και στις δύο περιπτώσεις κυριαρχούσε το φασματικό αποτύπωμα της β -κυκλοδεξτρίνης. Ωστόσο παρατήρησαν την εμφάνιση σε μικρή ένταση χαρακτηριστικών κορυφών της λιναλοόλης και της εστραγκόλης αντίστοιχα με μια μικρή μετατόπιση. Η μη εμφάνιση κορυφών της εστραγκόλης στο φάσμα του

συμπλόκου αποδίδεται κυρίως από τους Kfoury et. al. [26] στην πολύ χαμηλότερη ποσότητα εστραγκόλης σε σχέση με αυτή της κυκλοδεξτρίνης, αλλά και στο γεγονός του επιτυχή εγκλεισμού της μέσα στην κοιλότητα της β -κυκλοδεξτρίνης. Ως γενικό συμπέρασμα μπορούμε να παρατηρήσουμε πως η φασματοσκοπία IR μας δίνει σαφείς ενδείξεις για τον επιτυχή εγκλεισμό της λιναλοόλης και των υπολοίπων συστατικών του αιθερίου ελαίου βασιλικού σε β -κυκλοδεξτρίνη.

Από τις αντιοξειδωτικές δοκιμές DPPH και ABTS, παρατηρήθηκε πως το αιθέριο έλαιο του σγουρού βασιλικού εμφανίζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από αυτό του πλατύφυλλου. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται στα υψηλά ποσοστά ευγενόλης στον σγουρό βασιλικό, η οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ουσία [73][76]. Σε αντίθεση με τον πλατύφυλλο βασιλικό που δεν εντοπίστηκε ευγενόλη. Η ίδια εικόνα φαίνεται και στη δοκιμή Folin Ciocalteu, όπου ο σγουρός βασιλικός εμφανίζει ισχυρή υπεροχή στο φαινολικό του περιεχόμενο σε σχέση με τον πλατύφυλλο βασιλικό. Πάλι η απουσία της ευγενόλης από τον πλατύφυλλο βασιλικό, έχει ως αντίκτυπο το χαμηλότερο φαινολικό περιεχόμενο.

Φάνηκε επίσης πως ο εγκλεισμός των αιθερίων ελαίων και των δύο ποικιλιών οδήγησε στην διατήρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Γεγονός που σημαίνει πως κατά τον εγκλεισμό των αιθερίων ελαίων πραγματοποιήθηκε σε κάποιο ποσοστό εγκλεισμός σε φαινολικά συστατικά του αιθερίου ελαίου βασιλικού. Επιπλέον στην περίπτωση του σγουρού βασιλικού παρατηρήθηκε καλύτερη αντιοξειδωτική δράση στο προϊόν εγκλεισμού με την υδροξυπροπυλ- β -CD σε σχέση με το καθαρό αιθέριο έλαιο. Υποδεικνύοντας πως ο εγκλεισμός του αιθερίου ελαίου βασιλικού, σε ορισμένες κυκλοδεξτρίνες, μπορεί να βελτιώσει την αντιοξειδωτική του δράση.

Ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των αιθερίων ελαίων των δύο ποικιλιών βασιλικού έδειξε επίσης ικανοποιητικά αποτελέσματα απέναντι σε τροφιμογενή βακτήρια. Στα αιθέρια έλαια και των δύο ποικιλιών παρατηρήθηκε μεγάλη αναστολή ανάπτυξης των βακτηρίων στο διάστημα των 24 ωρών. Τα δείγματα παρουσίασαν καλύτερη δράση απέναντι στα θετικά (+) κατά Gram βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis*, αλλά μπόρεσαν να καταστείλουν ικανοποιητικά την ανάπτυξη και του αρνητικού (-) κατά Gram βακτηρίου *Escherichia coli*. Τουναντίον δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμποδιστική δράση απέναντι στο αρνητικό (-) κατά Gram βακτήριο *Pseudomonas fluorescences*. Το 1998 οι Wan et. al [77], εξετάζοντας την βακτηριοκτόνο δράση του αιθερίου ελαίου βασιλικού παρατήρησαν πως τα είδη του γένους *Pseudomonas* συμπεριλαμβανομένου και του *Pseudomonas fluorescences* ήταν ιδιαίτερα ανθεκτικά απέναντι στο αιθέριο έλαιο σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης οι Eriotou, et. al [72], το 2015 έδειξαν πως τρεις τύποι αιθερίου ελαίου βασιλικού παρουσίασαν στατιστικά αυξημένη αντιμικροβιακή δράση σε θετικά (+) κατά Gram βακτήρια σε σχέση με τα αρνητικά (-) κατά Gram βακτήρια. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό

το αποτέλεσμα μπορεί να είναι οι σημαντικές διαφορές στην εξωτερική μεμβράνη μεταξύ των δύο τύπων βακτηρίων [78].

Ακόμα ορισμένοι ερευνητές θεωρούν πως η αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων είναι άμεσα συνυφασμένη με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο τους [79]. Πράγματι μελέτη του 2022 στα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου βασιλικού έδειξε πως το κύριο συστατικό του βασιλικού η λιναλοόλη έχει βακτηριοκτόνο δράση μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις και μόνο κατά το πρώτο 24ωρο. Αντιθέτως τα συστατικά όπως η εστραγκόλη και η ευγενόλη, που αποτελεί φαινόλη, παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλλά και την διατήρησαν για διάστημα τριών ημερών [80]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η αντιμικροβιακή δράση του αιθερίου ελαίου του βασιλικού ίσως να μην οφείλεται κατά κύριο λόγο στο βασικό συστατικό του την λιναλοόλη αλλά στα φαινολικά συστατικά του. Στο παρόν πείραμα και οι δύο ποικιλίες βασιλικού που μελετήσαμε ήταν χημειότυπου λιναλοόλης, ωστόσο η ποικιλία του πλατύφυλλου είχε υψηλά ποσοστά εστραγκόλης (16,32%), ενώ η ποικιλία του σγουρού βασιλικού είχε υψηλά ποσοστά ευγενόλης (16,43%).

Από την άλλη πλευρά τα προϊόντα εγκλεισμού των αιθερίων ελαίων και των δύο ποικιλιών σε β -CD και HP- β -CD, δεν παρουσίασαν βακτηριοκτόνο δράση σε κανένα από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς ή παρουσίασαν πολύ μικρή δραστηριότητα σε σχέση με τα καθαρά αιθέρια έλαια. Το γεγονός αυτό αφενός οφείλεται στην πολύ μικρή ποσότητα αιθερίου ελαίου που περιέχουν τα προϊόντα εγκλεισμού (0,2% v/v E.O) και αφετέρου πιθανώς στον ίδιο τον εγκλεισμό αφού η αργή απελευθέρωση των συστατικών που εγκλειστήκαν δεν βοηθάει σε σύγκριση με την ταχύτατη ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Με βάση τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η βασική ένωση του αιθερίου ελαίου του βασιλικού, η λιναλοόλη, εγκλείεται αποτελεσματικά στην β -CD και την HP- β -CD. Ωστόσο τα σύμπλοκα lin/ β -CD, είναι δυσδιάλυτα στο νερό και καθιζάνουν. Το γεγονός αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση λιναλοόλης από το αιθέριο έλαιο του βασιλικού, παραλαμβάνοντας το ίζημα. Ακόμα φάνηκε από την φασματοσκοπία υπερύθρου καθώς και από την δοκιμή ελέγχου για τα ολικά φαινολικά πως κατά την παρασκευή προϊόντων εγκλεισμού από το αιθέριο έλαιο του βασιλικού, εγκλείεται κάποιο ποσοστό από τις άλλες ενώσεις του βασιλικού.

Με βάση τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, προτεινόμενες μελέτες για το μέλλον θα μπορούσαν να αφορούν στον αναλυτικό ποσοτικό έλεγχο με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) των συστατικών αιθερίου ελαίου βασιλικού που εγκλείονται όταν αυτό αναμειχθεί με υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών. , Εφόσον τα σύμπλοκα με β -CD έχουν την τάση να καταβυθίζονται ως ίζημα, μπορεί να γίνει παραλαβή του εναιωρήματος και έλεγχός του με HPLC, για τα συστατικά του αιθερίου ελαίου που δεν

εγκλείστηκαν. Επίσης έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των προϊόντων εγκλεισμού βασιλικού, με πιο ευαίσθητες και συγκεκριμένες μεθόδους όπως Μέτρηση της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC) και Ελάχιστης Θανατηφόρου Συγκέντρωσης (MLC), για την διαπίστωση της δράσης τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Sharma *et al.*, “Effect of solvents extraction on phytochemical profile and biological activities of two *Ocimum* species: A comparative study,” *J Appl Res Med Aromat Plants*, vol. 25, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.jarmap.2021.100348.
- [2] M. Chenni, D. El Abed, N. Rakotomanomana, X. Fernandez, and F. Chemat, “Comparative study of essential oils extracted from egyptian basil leaves (*ocimum basilicum* L.) Using hydro-Distillation and solvent-Free microwave extraction,” *Molecules*, vol. 21, no. 1, Jan. 2016, doi: 10.3390/molecules21010113.
- [3] P. Prakash and N. Gupta, “Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: A short review,” *Indian J Physiol Pharmacol*, vol. 49, no. 2, pp. 125–131, 2005.
- [4] S. Kokkini, R. Karousou, and E. Hanlidou, “Herbs of the Labiatae,” 2003.
- [5] Gernot Katzer, “Spice Pages: Basil (*Ocimum basilicum*/*sanctum*/*tenuiflorum*/*canum*),” *gernot-katzers-spice-pages.com*.
- [6] J. E. Simon, M. R. Morales, W. B. Phippen, R. F. Vieira, and Z. Hao, “Basil: A Source of Aroma Compounds and a Popular Culinary and Ornamental Herb*.”
- [7] S. Sayed Ahmed, “Herbal and essential oil yield of Genovese basil (*Ocimum basilicum* L.) grown with mineral and organic fertilizer sources in Egypt”, doi: 10.5073/JfK.2009.12.03.
- [8] B. Purushothaman, R. Prasannasrinivasan, P. Suganthi, B. Ranganathan, J. Gimbin, and K. Shanmugam, “A comprehensive review on *Ocimum basilicum*,” *Journal of Natural Remedies*, vol. 18, no. 3, pp. 71–85, Jul. 2018, doi: 10.18311/jnr/2018/21324.
- [9] K. Baczek, O. Kosakowska, M. Gniewosz, I. Gientka, and Z. Weglarz, “Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) productivity and raw material quality from organic cultivation,” *Agronomy*, vol. 9, no. 6, 2019, doi: 10.3390/agronomy9060279.
- [10] C. A. Damalas, “Improving drought tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum*) with salicylic acid,” *Sci Hortic*, vol. 246, pp. 360–365, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.SCIENTA.2018.11.005.
- [11] G. Sharabani, D. Shtienberg, Y. Elad, and A. Dinoor, “Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Sweet Basil and Implications for Disease Management,” 1999.
- [12] I. P. K. B. G. K. V. B. Ingars Reinholds, “Mycotoxins, pesticides and toxic metals in commercial spice and herbs,” *Food Addit Contam*, vol. 10, no. 1, pp. 5–14, 2017.

- [13] Jerusalem Patriarchate, "Jerusalem Patriarchate." http://www.jerusalem-patriarchate.info/gr/an_tim_staurou.html (accessed Feb. 21, 2023).
- [14] K. Roubos, "Basil cultivation in Greece," *Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 2005.
- [15] Ι.Β. Τσέκου, *Φυσιολογία Φυτών, τόμος Ι. Θεσσαλονίκη : Εκδοτικός οίκος Αδερφών Κυριακίδη α.ε*, 2003.
- [16] Γ. Καραμπουρνιώτης, "Η άμυνα των φυτών ενάντι βιοτικών παραγόντων καταπόνησης ," in *Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών, οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες*, 2003.
- [17] C. Y. Cheok, H. A. K. Salman, and R. Sulaiman, "Extraction and quantification of saponins: A review," *Food Research International*, vol. 59. pp. 16–40, May 2014. doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.057.
- [18] A. Roidaki *et al.*, "Superfoods and superherbs: Antioxidant and antifungal activity," *Current Research in Nutrition and Food Science*, vol. 4, no. SpecialIssue2, pp. 138–145, Oct. 2016, doi: 10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.19.
- [19] A. Avetisyan *et al.*, "Chemical composition and some biological activities of the essential oils from basil *Ocimum* different cultivars," *BMC Complement Altern Med*, vol. 17, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1186/s12906-017-1587-5.
- [20] E. Klimánková, K. Holadová, J. Hajšlová, T. Čajka, J. Poustka, and M. Koudela, "Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions," *Food Chem*, vol. 107, no. 1, pp. 464–472, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.07.062.
- [21] SB. W. B. Z. H. Kruger, "The chemical variability of *Ocimum* species," *Herbs Spices Med Plants*, pp. 9335–44, 2002.
- [22] R. J. Grayer, G. C. Kite, F. J. Goldstone, S. E. Bryan, A. Paton, and E. Putievsky, "Infraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*," *Phytochemistry*, vol. 43, no. 5, pp. 1033–1039, Nov. 1996, doi: 10.1016/S0031-9422(96)00429-3.
- [23] S. Radha, "A review on phytochemical and pharmacological activities of selected *Ocimum* species," ~ 100 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 10, no. 3, 2021, [Online]. Available: www.phytojournal.com
- [24] T. Özek, N. Tabanca, F. Demirci, D. E. Wedge, and K. Hüsnü Can Başer, "Enantiomeric Distribution of Some Linalool Containing Essential Oils and Their Biological Activities," 2010. [Online]. Available: www.acgpubs.org/RNP
- [25] A. T. Peana, P. S. D'Aquila, F. Panin, G. Serra, P. Pippia, and M. D. L. Moretti, "Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils," *Phytomedicine*, vol. 9, no. 8, pp. 721–726, Jan. 2002, doi: 10.1078/094471102321621322.

- [26] M. Kfoury, L. Auezova, S. Ruellan, H. Greige-Gerges, and S. Fourmentin, "Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins," *Carbohydr Polym*, vol. 118, pp. 156–164, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.10.073.
- [27] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, "Biological effects of essential oils – A review," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 2, pp. 446–475, Feb. 2008, doi: 10.1016/J.FCT.2007.09.106.
- [28] G. P. Kamatou, I. Vermaak, and A. M. Viljoen, "Eugenol - From the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule," *Molecules*, vol. 17, no. 6, pp. 6953–6981, Jun. 2012. doi: 10.3390/molecules17066953.
- [29] M. I. Rodríguez-López *et al.*, "Comprehensive Characterization of Linalool-HP-β-Cyclodextrin Inclusion Complexes," *Molecules*, vol. 25, no. 21, Nov. 2020, doi: 10.3390/molecules25215069.
- [30] M. Komiya, T. Takeuchi, and E. Harada, "Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice," *Behavioural Brain Research*, vol. 172, no. 2, pp. 240–249, Sep. 2006, doi: 10.1016/J.BBR.2006.05.006.
- [31] V. de M. Linck *et al.*, "Inhaled linalool-induced sedation in mice," *Phytomedicine*, vol. 16, no. 4, pp. 303–307, Apr. 2009, doi: 10.1016/J.PHYMED.2008.08.001.
- [32] C. Luo *et al.*, "A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Feb. 28, 2020. doi: 10.3389/fphar.2020.00153.
- [33] K. Narendra Babu *et al.*, "Phytochemicals, polyphenols, prebiotic effect of *Ocimum sanctum*, *Zingiber officinale*, *Piper nigrum* extracts," *J Herb Med*, vol. 13, pp. 42–51, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.HERMED.2018.05.001.
- [34] F. Mohamed Abdoul-Latif *et al.*, "Essential Oils of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum americanum* L. from Djibouti: Chemical Composition, Antimicrobial and Cytotoxicity Evaluations," *Processes*, vol. 10, no. 9, Sep. 2022, doi: 10.3390/pr10091785.
- [35] H. R. Nadeem *et al.*, "Toxicity, Antioxidant Activity, and Phytochemicals of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Leaves Cultivated in Southern Punjab, Pakistan," *Foods*, vol. 11, no. 9, May 2022, doi: 10.3390/foods11091239.
- [36] M. I. Rodríguez-López *et al.*, "Evaluation of monoterpene-cyclodextrin complexes as bacterial growth effective hurdles," *Food Control*, vol. 108, p. 106814, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.FOODCONT.2019.106814.
- [37] J. Szejtli, *Cyclodextrins Technology*. Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, 1988.
- [38] S. Songkro, N. Hayook, J. Jaisawang, D. Maneenuan, T. Chuchoe, and N. Kaewnopparat, "Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with b-

- cyclodextrin for mosquito repellent," *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, vol. 72, no. 3–4, pp. 339–355, Apr. 2012, doi: 10.1007/s10847-011-9985-7.
- [39] B. G. Poulson *et al.*, "Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications," *Polysaccharides*, vol. 3, no. 1, pp. 1–31, Dec. 2021, doi: 10.3390/polysaccharides3010001.
- [40] K. Cal and K. Centkowska, "Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 68, no. 3, pp. 467–478, Mar. 2008, doi: 10.1016/J.EJPB.2007.08.002.
- [41] G. Astray, C. Gonzalez-Barreiro, J. C. Mejuto, R. Rial-Otero, and J. Simal-Gándara, "A review on the use of cyclodextrins in foods," *Food Hydrocolloids*, vol. 23, no. 7, pp. 1631–1640, Oct. 2009. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.01.001.
- [42] K. Harata, "Structural aspects of stereodifferentiation in the solid state," *Chem*, pp. 1803–1827, 1998.
- [43] W. Saenger, "Structure and Dynamics of Water Surrounding Biomolecules," *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, vol. 16, pp. 93–114, Jul. 1987.
- [44] K.J. Naidoo, J. Y. J. Chen, Jansson. JLM, Windmalm G, and Maliniak A, "Molecular Properties Related to the Anomalous Solubility of β -Cyclodextrin," *J. Phys. Chem.*, vol. 108, no. 14, pp. 4236–4238, 2004.
- [45] W. Saenger, "Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry," *Angew, Chem. Int. Ed, Engl.*, vol. 19, pp. 344–362, 1980.
- [46] M. Rekharsky and Y. Inoue, "Complexation thermodynamics of cyclodextrins," *Chem. Rev*, pp. 1875–1917, 1998.
- [47] M. Chenni, D. El Abed, S. Neggaz, N. Rakotomanomana, X. Fernandez, and F. Chemat, "Solvent free microwave extraction followed by encapsulation of *O. basilicum* L. essential oil for insecticide purpose," *J Stored Prod Res*, vol. 86, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jspr.2020.101575.
- [48] S. K. Chinnaiyan, R. Pandiyan, S. Natesan, S. Chindam, A. K. Gouti, and A. Sugumaran, "Fabrication of basil oil Nanoemulsion loaded gellan gum hydrogel—evaluation of its antibacterial and anti-biofilm potential," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 68, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.jddst.2022.103129.
- [49] M. Πολυσιού and Π. Ταραντίλης, *Ενόργανη Ανάλυση Φυσικῶν Προϊόντων*. Αθήνα, 2007.
- [50] G. M. Sheldrick, "Crystal structure refinement with SHELXL," *Acta Crystallogr C Struct Chem*, vol. 71, pp. 3–8, Jan. 2015, doi: 10.1107/S2053229614024218.
- [51] C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot, and S. C. Ward, "The Cambridge structural database," *Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater*, vol. 72, no. 2, pp. 171–179, Apr. 2016, doi: 10.1107/S2052520616003954.

- [52] T. Loftsson, H. H. Sigurdsson, and P. Jansook, "Anomalous Properties of Cyclodextrins and Their Complexes in Aqueous Solutions," *Materials*, vol. 16, no. 6, p. 2223, Mar. 2023, doi: 10.3390/ma16062223.
- [53] T. Higuchi and Connors K.A., "Phase solubility techniques," *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, vol. 4, pp. 117–212, 1965.
- [54] R. Salomon-Ferrer, D. A. Case, and R. C. Walker, "An overview of the Amber biomolecular simulation package," *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*, vol. 3, no. 2, pp. 198–210, Mar. 2013, doi: 10.1002/wcms.1121.
- [55] K. N. Kirschner *et al.*, "GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. carbohydrates," *J Comput Chem*, vol. 29, no. 4, pp. 622–655, Mar. 2008, doi: 10.1002/jcc.20820.
- [56] P. Mark and L. Nilsson, "Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 105, no. 43, pp. 9954–9960, Nov. 2001, doi: 10.1021/jp003020w.
- [57] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, "VMD: Visual Molecular Dynamics," 1996.
- [58] B. R. Miller, T. D. McGee, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke, and A. E. Roitberg, "MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations," *J Chem Theory Comput*, vol. 8, no. 9, pp. 3314–3321, Sep. 2012, doi: 10.1021/ct300418h.
- [59] D. R. Roe and T. E. Cheatham, "PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data," *J Chem Theory Comput*, vol. 9, no. 7, pp. 3084–3095, Jul. 2013, doi: 10.1021/ct400341p.
- [60] S. Genheden and U. Ryde, "The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities," *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 10, no. 5. Informa Healthcare, pp. 449–461, May 01, 2015. doi: 10.1517/17460441.2015.1032936.
- [61] Bauer AW, Perry DM, and Kirby WM, "Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci: An analysis of technique and results," *Archives of internal Medicine*, vol. 104, no. 2, pp. 208–216, 1959.
- [62] G. Opalchenova and D. Obreshkova, "Comparative studies on the activity of basil - An essential oil from *Ocimum basilicum* L. - Against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods," *J Microbiol Methods*, vol. 54, no. 1, pp. 105–110, Jul. 2003, doi: 10.1016/S0167-7012(03)00012-5.
- [63] S. Shiwakoti, O. Saleh, S. Poudyal, A. Barka, Y. Qian, and V. D. Zheljzkov, "Yield, Composition and Antioxidant Capacity of the Essential Oil of Sweet Basil and Holy Basil as Influenced by Distillation Methods," *Chem Biodivers*, vol. 14, no. 4, Apr. 2017, doi: 10.1002/cbdv.201600417.
- [64] E. Wogiatzi, A. Papachatzis, H. Kalorizou, A. Chouliara, and N. Chouliaras, "Evaluation of essential oil yield and chemical components of selected basil cultivars," *Biotechnology*

and *Biotechnological Equipment*, vol. 25, no. 3, pp. 2525–2527, 2011, doi: 10.5504/bbeq.2011.0067.

- [65] K. Fourtaka, E. Christoforides, D. Mentzafos, and K. Bethanis, “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,” *J Mol Struct*, vol. 1161, pp. 1–8, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.molstruc.2018.02.037.
- [66] M. Ceborska, “Structural investigation of the β -cyclodextrin complexes with linalool and isopinocampheol - Influence of monoterpenes cyclicity on the host-guest stoichiometry,” *Chem Phys Lett*, vol. 651, pp. 192–197, May 2016, doi: 10.1016/j.cplett.2016.03.051.
- [67] J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, and S. Forli, “AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings,” *J Chem Inf Model*, vol. 61, no. 8, pp. 3891–3898, Aug. 2021, doi: 10.1021/acs.jcim.1c00203.
- [68] S. Kim *et al.*, “PubChem 2023 update,” *Nucleic Acids Res*, vol. 51, no. D1, pp. D1373–D1380, Jan. 2023, doi: 10.1093/nar/gkac956.
- [69] A. Pedretti, A. Mazzolari, S. Gervasoni, L. Fumagalli, and G. Vistoli, “The VEGA suite of programs: an versatile platform for cheminformatics and drug design projects”, doi: 10.1093/bioinformatics/btaa774/5903733.
- [70] P. P. Menezes *et al.*, “Inclusion complex of (-)-linalool and β -cyclodextrin,” *J Therm Anal Calorim*, vol. 115, no. 3, pp. 2429–2437, Mar. 2014, doi: 10.1007/s10973-013-3367-x.
- [71] M. Sultan, A. A. Abdelhakim, M. Nassar, and Y. R. Hassan, “Active packaging of chitosan film modified with basil oil encapsulated in silica nanoparticles as an alternate for plastic packaging materials,” *Food Biosci*, vol. 51, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.fbio.2022.102298.
- [72] E. E. Anastasiadou K, “Antimicrobial and Free Radical Scavenging Activities of Basil (*Ocimum basilicum*) Essential Oil Isolated from Five Plant Varieties Growing in Greece,” *J Nutr Food Sci*, vol. 05, no. 03, 2014, doi: 10.4172/2155-9600.1000367.
- [73] H. R. Juliani, J. E. Simon, H. R. Juliani, and J. E. Simon, “Antioxidant Activity of Basil Protein and enzyme functionality View project Appropriate Method for Soil analysis in Liberia View project Antioxidant Activity of Basil,” ASHS Press, 2002. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/241195552>
- [74] M. Heś, A. Golcz, A. Gramza-Michałowska, A. Jędrusek-Golińska, K. Dziejczak, and S. Mildner-Szkodlarz, “Influence of Nitrogen Fertilizer on the Antioxidative Potential of Basil Varieties (*Ocimum basilicum* L.),” *Molecules*, vol. 27, no. 17, Sep. 2022, doi: 10.3390/molecules27175636.
- [75] E. M. Bajomo, M. S. Aing, L. S. Ford, and E. D. Niemeyer, “Chemotyping of commercially available basil (*Ocimum basilicum* L.) varieties: Cultivar and morphotype influence phenolic acid composition and antioxidant properties,” *NFS Journal*, vol. 26, pp. 1–9, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.nfs.2022.01.001.

- [76] I. Gülçin, "Antioxidant activity of eugenol: A structure-activity relationship study," *J Med Food*, vol. 14, no. 9, pp. 975–985, Sep. 2011, doi: 10.1089/jmf.2010.0197.
- [77] J. Wan *et al.*, "The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*," 1998.
- [78] C. G. Silva, E. D. C. Yudice, P. A. L. Campini, and D. S. Rosa, "The performance evaluation of Eugenol and Linalool microencapsulated by PLA on their activities against pathogenic bacteria," *Mater Today Chem*, vol. 21, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.mtchem.2021.100493.
- [79] A. Macari *et al.*, "Antimicrobial effects of basil, summer savory and tarragon lyophilized extracts in cold storage sausages," *Molecules*, vol. 26, no. 21, Nov. 2021, doi: 10.3390/molecules26216678.
- [80] C. Stan *et al.*, "Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Essential Oils Extracted from Two New *Ocimum basilicum* L. Varieties," *Diversity (Basel)*, vol. 14, no. 12, Dec. 2022, doi: 10.3390/d14121048.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

checkCIF/PLATON report

Structure factors have been supplied for datablock(s) linalool_2_0m

THIS REPORT IS FOR GUIDANCE ONLY. IF USED AS PART OF A REVIEW PROCEDURE FOR PUBLICATION, IT SHOULD NOT REPLACE THE EXPERTISE OF AN EXPERIENCED CRYSTALLOGRAPHIC REFEREE.

No syntax errors found. CIF dictionary Interpreting this report

Datablock: linalool_2_0m

Bond precision: C-C = 0.0303 Å Wavelength=1.54178

Cell: a=18.8815 (17) b=24.343 (2) c=15.5896 (13)

 alpha=90 beta=110.260 (4) gamma=90

Temperature: 100 K

Calculated	Reported
Volume 6722.2 (10)	6722.0 (10)
Space group	C 2 C 2
Hall group	C 2y C 2y
4 (C42 H70 O35), 4 (C10 H18 C42 H70 O35, C10 H18 O,	
Moiety formula	
O), O2, 32 (O)	8.5 (O)
Sum formula	C208 H352 O178 C52 H88 O44.50
Mr 5700.91	1425.22
Dx, g cm ⁻³	1.408 1.408
Z 1	4
Mu (mm ⁻¹)	1.087 1.087
F000 3024.0	3024.0
F000' 3036.24	
h, k, lmax	17, 22, 14 17, 22, 14
Nref 5329 [2754]	5281

Tmin,Tmax

0.878,0.947

0.618,0.749

Tmin' 0.805

Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.618 Tmax=0.749

AbsCorr = MULTI-SCAN

Data completeness= 1.92/0.99 Theta(max)= 44.661


wR2(reflections)=

R(reflections)= 0.1118(5107)


0.2566(5281)

S = 1.089 Npar= 441


The following ALERTS were generated. Each ALERT has the format **test-name_ALERT_alert-type_alert-level**. Click on the hyperlinks for more details of the test.

 **Alert level A**

THETM01_ALERT_3_A The value of sine(theta_max)/wavelength is less than 0.550
Calculated sin(theta_max)/wavelength = 0.4559
PLAT201_ALERT_2_A Isotropic non-H Atoms in Main Residue(s) 77
Report O21_1 O31_1 O41_1 O51_1 O61_1
etc.

 **Alert level B**

PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow1
Check
PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow2
Check
PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow3
Check
PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow9
Check PLAT340_ALERT_3_B Low Bond Precision on C-C Bonds
0.03029 Ang. PLAT430_ALERT_2_B Short Inter D...A Contact Ow1 ..Ow7B .
2.61 Ang. x,y,z =
1_555 Check PLAT430_ALERT_2_B Short Inter D...A Contact Ow1 ..Ow7A .
2.84 Ang. x,y,z =
1_555 Check PLAT430_ALERT_2_B Short Inter D...A Contact Ow2 ..Ow6A .
2.71 Ang.
2-x,y,2-z = 2_757 Check
PLAT430_ALERT_2_B Short Inter D...A Contact Ow2 ..Ow3 . 2.82
Ang. x,y,z = 1_555
Check PLAT430_ALERT_2_B Short Inter D...A Contact Ow2 ..Ow4A . 2.83
Ang.
1+x,y,z = 1_655 Check
PLAT430_ALERT_2_B Short Inter D...A Contact Ow5A ..Ow9 . 2.79
Ang. x,y,-1+z = 1_554
Check PLAT430_ALERT_2_B Short Inter D...A Contact Ow8 ..Ow9 . 2.61
Ang. x,y,-1+z = 1_554
Check PLAT927_ALERT_1_B Reported and Calculated wR2 Differ by -
0.0167 Check

 **Alert level C**

DIFMX02_ALERT_1_C The maximum difference density is > 0.1*ZMAX*0.75
The relevant atom site should be identified.

PLAT042_ALERT_1_C	Calc. and Reported MoietyFormula Strings Differ							Please
PLAT082_ALERT_2_C	High R1 Value						0.11
PLAT084_ALERT_3_C	High wR2 Value (i.e. > 0.25)						0.26
PLAT089_ALERT_3_C	Poor Data / Parameter Ratio (Zmax < 18)						6.21
PLAT097_ALERT_2_C	Large Reported Max. (Positive) Residual Density							0.70
PLAT202_ALERT_3_C	Isotropic non-H Atoms in Anion/Solvent						15
	Check	O10B_2 C1B_2 C2B_2 C3B_2 C4B_2 C5B_2						
		etc.						
PLAT220_ALERT_2_C	NonSolvent Resd 1 C	Ueq(max)/Ueq(min) Range						4.3
PLAT220_ALERT_2_C	NonSolvent Resd 1 O	Ueq(max)/Ueq(min) Range						3.8
PLAT222_ALERT_3_C	NonSolvent Resd 1 H	Uiso(max)/Uiso(min) Range						7.6
PLAT241_ALERT_2_C	High 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of							O57_1
PLAT241_ALERT_2_C	High 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of							C61_1
PLAT241_ALERT_2_C	High 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of							C42_1
PLAT242_ALERT_2_C	Low 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of							C32_1
PLAT242_ALERT_2_C	Low 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of							C52_1
PLAT242_ALERT_2_C	Low 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of							C63_1
PLAT242_ALERT_2_C	Low 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of							C66_1
PLAT242_ALERT_2_C	Low 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of							C17_1
PLAT260_ALERT_2_C	Large Average Ueq of Residue Including	Ow9						0.131
PLAT414_ALERT_2_C	Short Intra D-H..H-X	H22_1 ..H22A_1						.
	1.99 Ang.							x,y,z =
PLAT417_ALERT_2_C	Short Inter D-H..H-D	H25A_1 ..H35A_1						.
	2.14 Ang.							
								1-x,y,2-z = 2_657 Check
PLAT906_ALERT_3_C	Large K Value in the Analysis of Variance						3.082
PLAT911_ALERT_3_C	Missing FCF Refl Between Thmin & STh/L=	0.456						12
PLAT926_ALERT_1_C	Reported and Calculated R1 Differ by						-0.0043
PLAT975_ALERT_2_C	Check Calcd Resid. Dens.	0.69Ang From O62_1						0.60
PLAT975_ALERT_2_C	Check Calcd Resid. Dens.	1.10Ang From Ow1						0.41
PLAT975_ALERT_2_C	Check Calcd Resid. Dens.	1.02Ang From O31_1						0.41
PLAT976_ALERT_2_C	Check Calcd Resid. Dens.	0.64Ang From O33_1						-0.46
PLAT976_ALERT_2_C	Check Calcd Resid. Dens.	0.81Ang From O62_1						-0.45
PLAT977_ALERT_2_C	Check Negative Difference Density on H61B_1							-0.32

PLAT977_ALERT_2_C Check Negative Difference Density on H62_1 . -0.41
eA-3
PLAT977_ALERT_2_C Check Negative Difference Density on H330_1 . -0.36
eA-3

Alert level G

PLAT002_ALERT_2_G Number of Distance or Angle Restraints on AtSite 22
Note
PLAT003_ALERT_2_G Number of Uiso or Uij Restrained non-H Atoms ... 22
Report PLAT005_ALERT_5_G No Embedded Refinement Details Found in the CIF
Please Do !
PLAT007_ALERT_5_G Number of Unrefined Donor-H Atoms 23
Report
PLAT045_ALERT_1_G Calculated and Reported Z Differ by a Factor ... 0.250
Check PLAT083_ALERT_2_G SHELXL Second Parameter in WGHT Unusually Large
173.53 Why ?
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of O10B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C1B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C2B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C3B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C4B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C5B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C6B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C7B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C8B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C9B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C11B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H1D_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H1E_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H1F_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H3B_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H4C_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H4D_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H5C_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H5D_2 Constrained at 0.6
Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H7D_2 Constrained at 0.6
Check

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H7E_2 Check	Constrained at	0.6
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H7F_2 Check	Constrained at	0.6
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H8B_2 Check	Constrained at	0.6
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H9C_2 Check	Constrained at	0.6
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H9D_2 Check	Constrained at	0.6
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H10B_2 Check	Constrained at	0.6
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H11D_2 Check	Constrained at	0.6
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H11E_2 Check	Constrained at	0.6
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H11F_2 Check	Constrained at	0.6
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of O10A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C1A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C2A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C3A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C4A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C5A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C6A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C7A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C8A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C9A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C11A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H1A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H1B_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H1C_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H3_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H4A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H4B_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H5A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H5B_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H7A_2 Check	Constrained at	0.4

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H7B_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H7C_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H8A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H9A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H9B_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H10A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H11A_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H11B_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H11C_2 Check	Constrained at	0.4
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow5A Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow4A Check	Constrained at	0.7
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow6A Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow7A Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow5B Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow6B Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow7B Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow8 Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow4B Check	Constrained at	0.3
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 2) Note		100%
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 3) Note		100%
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 4) Note		100%
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 8) Note		100%
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 9) Note		100%
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 10) Note		100%
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 11) Note		100%
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 12) Note		100%
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 13) Note		100%
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 14) Note		100%
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 16) Note		100%

PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in	(Resd 2)	17.40
Check		
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in	(Resd 3)	11.60
Check		
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in	(Resd 8)	0.70
Check		
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in	(Resd 9)	0.50
Check		
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in	(Resd 10)	0.50
Check		
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in	(Resd 11)	0.50
Check		
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in	(Resd 12)	0.50
Check		
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in	(Resd 13)	0.50
Check		
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in	(Resd 14)	0.50
Check		
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in	(Resd 16)	0.30
Check PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)		
Ow5A Check		
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)		Ow4A
Check		
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)		Ow6A
Check		
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)		Ow7A
Check		
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)		Ow5B
Check		
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)		Ow6B
Check		
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)		Ow7B
Check		
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)		Ow8
Check		
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)		Ow4B
Check		
PLAT380_ALERT_4_G Incorrectly? Oriented X(sp ²)-Methyl Moiety		C1B_2
Check		
PLAT380_ALERT_4_G Incorrectly? Oriented X(sp ²)-Methyl Moiety		C11B_2
Check PLAT411_ALERT_2_G Short Inter H...H Contact H31_1 ..H3_2 .		
1.66 Ang.		x,y,z =
1_555 Check PLAT411_ALERT_2_G Short Inter H...H Contact H56_1 ..H9A_2 .		
1.68 Ang.		x,y,z =
1_555 Check PLAT413_ALERT_2_G Short Inter XH3 .. XHn H52_1 ..H7C_2 .		
1.63 Ang.		x,y,z =
1_555 Check PLAT413_ALERT_2_G Short Inter XH3 .. XHn H36_1 ..H11F_2 .		
2.12 Ang.		x,y,z =
1_555 Check PLAT417_ALERT_2_G Short Inter D-H..H-D H67_1 ..H10B_2 .		
2.12 Ang.		
	1-x,y,1-z =	2_656 Check
PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact O67_1 ..C7A_2 .		2.86
Ang.		
	1-x,y,1-z =	2_656 Check
PLAT720_ALERT_4_G Number of Unusual/Non-Standard Labels		218
Note PLAT773_ALERT_2_G Check long C-C Bond in CIF: C11A_2 --C11A_2		
1.91 Ang.		

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # Note	9
0	
PLAT860_ALERT_3_G Number of Least-Squares Restraints	51
Note	
PLAT909_ALERT_3_G Percentage of I>2sig(I) Data at Theta(Max) Still Note	88%
PLAT910_ALERT_3_G Missing # of FCF Reflection(s) Below Theta(Min). Note	2
PLAT978_ALERT_2_G Number C-C Bonds with Positive Residual Density. Info	1

2 **ALERT level A** = Most likely a serious problem - resolve or explain
13 **ALERT level B** = A potentially serious problem, consider carefully
32 **ALERT level C** = Check. Ensure it is not caused by an omission or oversight
118 **ALERT level G** = General information/check it is not something unexpected

5 ALERT type 1 CIF construction/syntax error, inconsistent or missing data
55 ALERT type 2 Indicator that the structure model may be wrong or deficient
11 ALERT type 3 Indicator that the structure quality may be low 92 ALERT
type 4 Improvement, methodology, query or suggestion
2 ALERT type 5 Informative message, check

It is advisable to attempt to resolve as many as possible of the alerts in all categories. Often the minor alerts point to easily fixed oversights, errors and omissions in your CIF or refinement strategy, so attention to these fine details can be worthwhile. In order to resolve some of the more serious problems it may be necessary to carry out additional measurements or structure refinements. However, the purpose of your study may justify the reported deviations and the more serious of these should normally be commented upon in the discussion or experimental section of a paper or in the "special_details" fields of the CIF. checkCIF was carefully designed to identify outliers and unusual parameters, but every test has its limitations and alerts that are not important in a particular case may appear. Conversely, the absence of alerts does not guarantee there are no aspects of the results needing attention. It is up to the individual to critically assess their own results and, if necessary, seek expert advice.

Publication of your CIF in IUCr journals

A basic structural check has been run on your CIF. These basic checks will be run on all CIFs submitted for publication in IUCr journals (*Acta Crystallographica*, *Journal of Applied Crystallography*, *Journal of Synchrotron Radiation*); however, if you intend to submit to *Acta Crystallographica Section C* or *E* or *IUCrData*, you should make sure that full publication checks are run on the final version of your CIF prior to submission.

Publication of your CIF in other journals

Please refer to the *Notes for Authors* of the relevant journal for any special instructions relating to CIF submission.

PLATON version of 06/07/2023; check.def file version of 30/06/2023

