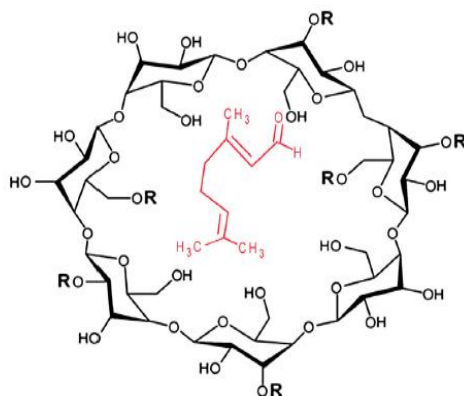


ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ ΣΤΗΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ**

ΚΟΡΟΜΠΟΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

- Αθήνα 2014 -

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ ΒΑΙΟΣ (επιβλέπων)

Καθηγητής Φυτικοχημείας και Μηχανικής Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης
Διαιτολογίας και Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Τροφίμων και Περιβάλλοντος, Τμήμα Επιστήμης
Διαιτολογίας και Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΧΙΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Χημικής Ανάλυσης και Σύνθεσης, Τμήμα Επιστήμης
Διαιτολογίας και Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

*“Αν δεν στηρίζεις το ένα σου πόδι έξω απ’ τη Γη,
ποτέ σου δεν θα μπορέσεις να σταθείς επάνω της”*

(Οδυσσέας Ελύτης)

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Βάιου Καραθάνου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τον Καθηγητή Βάιο Καραθάνο για την ανάθεση του ενδιαφέροντος θέματος, την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και την ψυχολογική και ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τον καταλυτικό ρόλο στη διαμόρφωση των ερευνητικών μου ενδιαφερόντων, για τις γνώσεις που μου μετέφερε όλα τα χρόνια των σπουδών μου καθώς και για την αμέριστη υποστήριξη και «τόνωση ηθικού» για όσες σημαντικές αποφάσεις έπρεπε να πάρω.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Χίου Αντωνία, Επίκουρη Καθηγήτρια και Καλογερόπουλο Νικόλαο, Αναπληρωτή Καθηγητή για τη φιλοξενία τους στο εργαστήριο και τη σημαντική βοήθειά τους σε ο,τι χρειάστηκα.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω σε δύο άτομα, όπου χωρίς τη βοήθειά τους δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ, λοιπόν, τον Δρ. Ιωάννη Μουρτζίνο, εμπνευστή της βασικής ιδέας της εργασίας, για την υποστήριξη και την ηθική και υλική βοήθειά του. Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω από καρδιάς τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Ηγουμενίδη για την αμέριστη συμπαράστασή του στη διεξαγωγή όλων των πειραματικών διαδικασιών και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Τον ευχαριστώ για όλον εκείνο τον χρόνο που αφιέρωσε για την εκπόνηση της εργασίας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Σ. Παπαδάκη για την παροχή του απαραίτητου εξοπλισμού στο Τ.Ε.Ι. Αθηνών. Επίσης, δεν θα ήταν δυνατή η διεκπεραίωση μέρος των πειραμάτων χωρίς την παροχή εξοπλισμού από τη σχολή των Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., και συγκεκριμένα από την υποψήφια διδάκτορα Χαρίκλεια Χρανιώτη και την Δρ. Βιργινία Γιάννου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων και όλους τους υποψήφιους διδάκτορες για το ευχάριστο κλίμα, τη θερμή φιλοξενία τους και την ειλικρινή βοήθειά τους σε ο,τι χρειάστηκα. Χάρη σε αυτούς, ένιωσα οικεία στο εργαστήριο και απήλαυσα κάθε στιγμή.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλους τους πραγματικούς φίλους που απέκτησα στα τέσσερα αυτά χρόνια και τον πρωταγωνιστικό ρόλο που έπαιξαν σε κάθε στιγμή.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, που με τις προσωπικές τους θυσίες ενισχύουν κάθε μου όνειρο και είναι πάντα θερμοί υποστηρικτές κάθε απόφασής μου.

Κωνσταντίνος Κορομπόκης,

Αθήνα 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα.....	6
Περίληψη	9
Abstract	11
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	13
1. Μικροενθυλάκωση.....	14
1.1 Γενικά για τη μικροενθυλάκωση	14
1.2 Τεχνικές ενθυλάκωσης	21
1.2.1 Ξήρανση με ψεκασμό	21
1.2.2 Λυοφιλίωση	23
1.2.3 Ψύξη με ψεκασμό	25
1.2.4 Εξώθηση	26
1.2.5 Επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη	27
1.2.6 Συγκρυστάλλωση.....	27
1.2.7 Εγκλεισμός σε λιποσώματα	28
1.2.8 Ενθυλάκωση σε ζύμες	28
1.2.9 Μοριακός εγκλεισμός.....	30
1.2.9.1 Εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνες.....	30
1.2.9.1.1 Σύμπλοκα εγκλεισμού με β-κυκλοδεξτρίνη	40
1.2.9.2 Εγκλεισμός σε τροποποιημένο άμυλο	43
1.3 Μέθοδοι μελέτης ενθυλάκωσης.....	44
1.4 «Πράσινη» εκχύλιση.....	48
2.Σιδερίτης	49
2.1 Βότανα στο πέρασμα του χρόνου	49
2.2 Σιδερίτης.....	50

2.2.1 Γενικές πληροφορίες.....	50
2.2.2 Βοτανολογική Κατάταξη	52
2.2.3 Χημική σύσταση	52
2.2.4 Φαρμακολογικές Ιδιότητες	56
2.2.4.1 Αντιοξειδωτική δράση	56
2.2.4.3 Αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση	60
2.2.4.4 Αναλγητική δράση.....	61
2.2.4.5 Αντι-ελκογόνος δράση.....	62
2.2.4.6 Αντι-HIV δράση	62
2.2.4.7 Άλλες δράσεις	62
2.2.5 <i>Sideritis scardica</i>	63
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ.....	68
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	70
3. Υλικά και μέθοδοι.....	71
3.1 Παραλαβή εκχυλισμάτων σιδερίτη (<i>Sideritis scardica</i>).....	71
3.2 Εκχύλιση πολυφαινολών από το υδατικό εκχύλισμα του <i>Sideritis scardica</i> σε διαφασικό υγρό σύστημα	72
3.3 Αντίδραση σιλυλίωσης	74
3.4 Προσδιορισμός των επιμέρους πολυφαινολών	75
3.5 Ξήρανση των εκχυλισμάτων σιδερίτη	77
3.6 Φωτομετρικός προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	78
3.7 Μελέτη ικανότητας δέσμευσης της 2,2-διφαινυλο-1-πικρυδραζύλιο ελεύθερης ρίζας DPPH [•]	81
3.8 Ενθυλάκωση εκχυλίσματος σιδερίτη σε τροποποιημένο άμυλο με τεχνική ξήρανσης με ψεκασμό	85

3.9 Έλεγχος ενθυλάκωσης των συστατικών σιδερίτη σε β-CD και HP-β-CD με τη μέθοδο της Διαφορικής Θερμοδομετρίας Σάρωσης (DSC)	87
3.10 Μελέτη οξειδωτικής σταθερότητας των συμπλόκων εγκλεισμού με χρήση DSC.....	88
3.11 Στατιστική ανάλυση.....	89
4. Αποτελέσματα και συζήτηση	90
4.1 Αποτελέσματα επιμέρους προσδιορισμού των πολυφαινολικών συστατικών του <i>Sideritis scardica</i> με GC-MS	90
4.2 Αξιολόγηση του φωτομετρικού προσδιορισμού των ολικών πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	91
4.3 Αξιολόγηση της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH [•]	94
4.4 Επιβεβαίωση εγκλεισμού των συστατικών του εκχυλίσματος <i>Sideritis scardica</i> σε β-CD και HP-β-CD με χρήση οργάνου DSC σε αδρανείς συνθήκες	97
4.5 Επιβεβαίωση ενθυλάκωσης των συστατικών του εκχυλίσματος του <i>Sideritis scardica</i> σε β-CD, HP-β-CD και οκτενυλο-ηλεκτρικό τροποποιημένο άμυλο με χρήση οργάνου DSC σε οξειδωτικές συνθήκες	106
5. Συμπεράσματα	110
Βιβλιογραφία	112

Περίληψη

Η χρήση των κυκλοδεξτρινών κατά την «πράσινη εκχύλιση» είναι μία πρόσφατη ανακάλυψη και βασίζεται στην ιδιαίτερη ικανότητα των κυκλοδεξτρινών να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού ανάμεσα στην υδρόφοβη κοιλότητά τους και τα βιοδραστικά ξενιζόμενα μόρια. Η μικροενθυλάκωση των βιοδραστικών μορίων των φυσικών προϊόντων βελτιώνει τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα έναντι συνθηκών υποβάθμισης όπως το φως, το οξυγόνο, η θερμοκρασία και το pH, καθώς και τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Επομένως, επιμηκύνει τον χρόνο ζωής του τελικού προϊόντος.

Στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκε να διερευνηθεί η «πράσινη εκχύλιση» του *Sideritis scardica*. Ο σιδερίτης κατέχει ιδιαίτερη θέση στην παραδοσιακή ιατρική των λαών της Μεσογείου και του αποδίδονται αντιφλεγμονώδεις, αντιελκωτικές, αντιμικροβιακές, καταπραϋντικές, αντιβηχικές, αντισπασμωδικές, αντιεπιληπτικές και αναλγητικές δράσεις, οι οποίες οφείλονται κυρίως στη σημαντική περιεκτικότητά του σε φλαβονοειδή και τερπένια.

Ο σιδερίτης εκχυλίστηκε με διαφορετικής συγκέντρωσης υδατικά διαλύματα β-CD και HP-β-CD, καθώς και με απιονισμένο νερό. Ο προσδιορισμός των επιμέρους φαινολικών συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος του *Sideritis scardica* με Αέρια Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας επιβεβαίωσε την παρουσία ουσιών όπως το π-κουμαρικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το πρωτοκατεχικό οξύ.

Η μελέτη του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων κατέδειξε πως επιτεύχθηκε σημαντική αύξηση των παραμέτρων αυτών, οι οποίες αυξάνονταν, παράλληλα, με αύξηση της συγκέντρωσης της β-CD και της HP-β-CD στο υδατικό διάλυμα. Συγκριμένα, το υδατικό εκχύλισμα απέδωσε συνολικό φαινολικό περιεχόμενο της τάξεως των $3,26 \pm 0,88$ mg GAE/mL εκχυλίσματος και αντιοξειδωτική ικανότητα $4,11 \pm 0,45$ mg TE/mL εκχυλίσματος, το εκχύλισμα με διάλυμα β-CD (8 mM) $3,84 \pm 0,14$ mg GAE/mL εκχυλίσματος και $4,42 \pm 0,1$ mg TE/mL εκχυλίσματος αντίστοιχα, το εκχύλισμα με διάλυμα β-CD (16 mM) $3,95 \pm 0,08$ mg GAE/mL εκχυλίσματος και $4,68 \pm 0,19$ mg TE/mL εκχυλίσματος αντίστοιχα και το εκχύλισμα με διάλυμα HP-β-CD (27 mM) $4,28 \pm 0,32$ mg GAE/mL εκχυλίσματος και $5,05 \pm 0,45$ mg TE/mL εκχυλίσματος αντίστοιχα. Επιπλέον, με

χρήση της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης σε αναγωγικές και οξειδωτικές συνθήκες φάνηκε η πιθανή μοριακή αλληλεπίδραση των συστατικών του σιδερίτη με τις κυκλοδεξτρίνες, η οποία μπορεί να ερμηνευθεί ως σημαντική ένδειξη του εγκλεισμού στην κοιλότητά τους. Βάσει της μελέτης των παραπάνω παραμέτρων, η εκχύλιση με υδατικό διάλυμα HP-β-CD (27 mM) ήταν η αποτελεσματικότερη.

Επιπρόσθετα, η ενθυλάκωση του υδατικού εκχυλίσματος σιδερίτη σε τροποποιημένο άμυλο με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό επιβεβαιώθηκε με έμμεσο τρόπο, κάνοντας χρήση μεθόδου Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης υπό οξειδωτικές συνθήκες. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε επιπρόσθετη προστασία έναντι της οξείδωσης, όταν επιχειρήθηκε διπλή ενθυλάκωση του εκχυλίσματος σιδερίτη σε HP-β-CD και τροποποιημένο άμυλο.

Συμπερασματικά, η «πράσινη εκχύλιση» του σιδερίτη μπορεί να ανοίξει το δρόμο για την εφαρμογή αποτελεσματικότερων και φιλικότερων προς το περιβάλλον μεθόδων εκχύλισης θεραπευτικών βοτάνων, αναδεικνύοντας τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Το παραγόμενο εκχύλισμα φάνηκε να παρουσιάζει ιδιαίτερη σταθερότητα έναντι των υψηλών θερμοκρασιών και της οξείδωσης, ενώ θα μπορούσε να λειτουργήσει και ως συστατικό εμπλουτισμού καινοτόμων τροφίμων με λειτουργικές ιδιότητες.

Abstract

During the last few years, the use of cyclodextrins at “green extraction” of natural products gains more attention in food processing sector. Cyclodextrins’ hydrophobic cavity presents the ability to form inclusion complexes with a wide variety of active guest molecules. The microencapsulation of bioactive ingredients enhances their solubility in water, their stability over deleterious effects of exposure in light, oxygen, temperature and pH, as well as their bioavailability. Therefore, it prolongs the shelf-life of the final product.

In this study, green extraction of *Sideritis scardica* was investigated. *Sideritis spp.* is very popular in folk medicine around the Mediterranean Sea region due to its anti-inflammatory, anti-ulcerogenic, antimicrobial, antioxidant, anti-epileptic and analgesic properties which are attributed to its herbal tea. The main ingredients which are responsible for its pharmacological activities are terpenes and a wide variety of polyphenolic compounds.

Sideritis scardica was initially extracted by pure water and aqueous solutions of different concentrations of β -CD and HP- β -CD. The results of GC-MS analysis of *Sideritis scardica* aqueous extract confirmed the presence of numerous phenol compounds such as p-coumaric acid, p-hydroxy-benzoic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, syringic acid acid and caffeic acid.

The study of total phenolic content and antioxidant capacity suggested that these parameters were increased in parallel with the increment of concentration of β -CD and HP- β -CD in the extract media. In particular, the aqueous extract of *Sideritis* presented total phenolic content of $3,26 \pm 0,88$ mg GAE/mL of extract and antioxidant capacity $4,11 \pm 0,45$ mg TE/mL of extract, the extract with solution of β -CD (8mM) $3,84 \pm 0,14$ mg GAE/mL of extract and $4,42 \pm 0,1$ mg TE/mL of extract respectively, the extract with solution of β -CD (16mM) $3,95 \pm 0,08$ mg GAE/mL of extract and $4,68 \pm 0,19$ mg TE/mL of extract respectively and the extract with solution of HP- β -CD (27mM) $4,28 \pm 0,32$ mg GAE/mL of extract and $5,05 \pm 0,45$ mg TE/mL of extract respectively. Furthermore, DSC measurements, conducted under inert and oxidative conditions, suggested the presence of a supra-molecular interaction, as well as a potential formation of inclusion complexes. Based on the analysis of these results, the

extraction with aqueous solution of HP- β -CD (27 mM) seemed to be the most effective concerning the prospect of microencapsulation.

In addition, the encapsulation of *Sideritis scardica* extract in modified starch, using the technique of spray drying, was indirectly confirmed by DSC experiments under oxidative conditions. However, no significant additional protection against oxidation was observed, when *Sideritis* extract in HP- β -CD (27 mM) solution underwent double encapsulation in modified starch, using the same technique.

In a nutshell, the green extraction of *Sideritis* using cyclodextrins paves the road for herb's eco-friendly, more effective extraction and use in food industry. In particular, it contributes to the preservation and enhancement of the herbs' valuable properties, as well as it enables the use of *Sideritis* for the production of functional foods and dietary supplements with health benefits.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

1.1 Γενικά για τη μικροενθυλάκωση

Η μικροενθυλάκωση μπορεί να οριστεί ως η διαδικασία με την οποία είναι δυνατός ο εγκλεισμός υγρών σταγονιδίων, στερεών μορίων και αέριων συστατικών σε ένα φορέα εγκλεισμού, ο οποίος μπορεί να απελευθερώνει το περιεχόμενό του με ελεγχόμενο ρυθμό υπό καθορισμένες συνθήκες. Αυτά τα στοιχεία ενσωματώνονται στο υλικό επένδυσης και το παραγόμενο προϊόν χαρακτηρίζεται ως κάψουλα, όπου το μέγεθός της, η δομή της και η μορφή της εξαρτώνται από τα υλικά και τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της. Η μικροενθυλάκωση βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, στη βιομηχανία φαρμάκων, στη βιομηχανία καλλυντικών και στην κλωστοϋφαντουργία (Shahidi and Han, 1993, Estevinho et al., 2013).

Η ενθυλακωμένη ουσία καλείται, επίσης, και πυρήνας, συμπλήρωμα, ενεργή ή εσωτερική φάση, καθώς και φάση ωφέλιμου φορτίου, ενώ ο παράγοντας ενθυλάκωσης καλείται επένδυση, μεμβράνη, κέλυφος, εξωτερικό κάλυμμα, κάψουλα, υλικό μεταφοράς, εξωτερική φάση ή μήτρα (Nedovic et al., 2011). Ο πυρήνας της κάψουλας περιέχει την ενεργή ουσία, ενώ το εξωτερικό κάλυμμα προστατεύει την ενεργή ουσία μόνιμα ή παροδικά από την εξωτερική ατμόσφαιρα. Με άλλα λόγια, το εξωτερικό κάλυμμα αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο ανάμεσα στην ενθυλακωμένη ουσία και των άλλων συστατικών του προϊόντος. Το υλικό του πυρήνα μπορεί να αποτελείται από ένα ή περισσότερα συστατικά και το εξωτερικό κάλυμμα μπορεί να έχει ένα ή δύο στρώματα (Ghosh, 2006). Η απελευθέρωση του περιεχομένου της μικροκάψουλας με συγκεκριμένο ρυθμό μπορεί να επιτευχθεί με διάτμηση του μορίου, θέρμανση, αλλαγή του pH, διαλυτοποίηση ή ενζυμική δράση (Nesterenko et al., 2013).

Περιγραφικά, η διαδικασία της μικροενθυλάκωσης περιλαμβάνει:

- τον σχηματισμό του εξωτερικού καλύμματος γύρω από το πυρηνικό υλικό
- τη διατήρηση του πυρηνικού υλικού εντός της κάψουλας, ώστε να μην διαφύγουν και να μην εισέλθουν ανεπιθύμητα συστατικά

- την απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού τον σωστό χρόνο και με προκαθορισμένο ρυθμό απελευθέρωσης (Shahidi and Han, 1993).

Η μικροενθυλάκωση βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων για λόγους, οι οποίοι αναφέρονται περιληπτικά παρακάτω:

1. προστασία του πυρηνικού υλικού από την εξωτερική ατμόσφαιρα και συγκεκριμένα από την υγρασία, το φως και το οξυγόνο, αυξάνοντας το χρόνο ζωής του προϊόντος
2. μείωση του ρυθμού εξάτμισης του πυρηνικού υλικού και γενικά μείωση του ρυθμού μεταφοράς του υλικού στο εξωτερικό περιβάλλον
3. προώθηση της ευκολότερης διαχείρισης του πυρηνικού υλικού μέσω της αποτροπής της συσσώρευσης (σβόλιασμα), της μετατροπής ενός υγρού υλικού σε στερεό και της εύκολης ανάμιξης του πυρηνικού υλικού με άλλα συστατικά του προϊόντος
4. αποτελεσματικότερος έλεγχος της απελευθέρωσης του πυρηνικού υλικού επιτυγχάνοντας τη κατάλληλη καθυστέρηση μέχρι το κατάλληλο ερέθισμα, βελτίωση της αποτελεσματικότητας των προσθέτων των τροφίμων και βελτίωση της σχέσης κόστους - αποτελεσματικότητας
5. κάλυψη της δυσάρεστης οσμής και γεύσης του πυρηνικού υλικού
6. επίτευξη της διάλυσης του πυρηνικού υλικού, όταν αυτό χρησιμοποιείται σε πολύ μικρές ποσότητες και ,παράλληλα, επίτευξη ομοιόμορφης κατανομής
7. παρεμπόδιση της αντίδρασης του πυρηνικού υλικού με τα άλλα συστατικά του συστήματος του τροφίμου
8. μεταφορά συστατικών με αντιμικροβιακές ιδιότητες σε τρόφιμα
9. αύξηση της διαλυτότητας συστατικών σε συγκεκριμένο μέσο
10. βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας έπειτα από του στόματος χορήγηση
11. αποφυγή της απώλειας συστατικών όπως οι βιταμίνες, οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα και τα ιχνοστοιχεία κατά την επεξεργασία και αποθήκευση των τροφίμων (Gharsallaoui et al., 2007, Bertolini et al., 2001, Schrooyen et al., 2001, Gouin, 2004, Nazzaro et al., 2012, Estevinho et al., 2013, Sansone et al., 2011).

Η μικροενθυλάκωση αναπτύχθηκε πρωτίστως και εκτενώς από τη βιομηχανία φαρμάκων ως μέσο για τον έλεγχο και την τροποποίηση της απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών των φαρμάκων. Πιο αναλυτικά, η μικροενθυλάκωση χρησιμοποιείται από τις φαρμακοβιομηχανίες για να βελτιώσει τη βιοδιαθεσιμότητα

των φαρμακευτικών ουσιών, να ελέγξει την απελευθέρωση των ουσιών, να ελαχιστοποιήσει τις παρενέργειες των φαρμάκων (π.χ. τον γαστρικό ερεθισμό από τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα) και να καλύψει την πικρή γεύση κάποιων φαρμακευτικών ουσιών (Kuang et al., 2010).

Η μέθοδος της μικροενθυλάκωσης χρησιμοποιείται εδώ και 60 σχεδόν χρόνια στη βιομηχανία τροφίμων και αποκτά όλο και περισσότερους υποστηρικτές, με κύρια πεδία ενδιαφέροντος τα αρώματα, τις χρωστικές, τα αντιοξειδωτικά, τους σταθεροποιητές, τα προβιοτικά, τα μέταλλα και τις βιταμίνες. Για παράδειγμα, το 2002 πάνω από 1000 πατέντες είχαν καταγραφεί σχετικά με την εφαρμογή των τεχνικών της μικροενθυλάκωσης και περίπου 300 από αυτές αφορούσαν συστατικά των τροφίμων (Estevinho et al., 2013).



Σχήμα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της κατανομής της εφαρμογής της μικροενθυλάκωσης σε διάφορους τομείς (Martins et al., 2013)

Η αύξηση της «δημοτικότητας» της μικροενθυλάκωσης στη βιομηχανία τροφίμων έγκειται στην επιθυμία των βιομηχανιών να ενσωματώσουν συστατικά με λειτουργικές ιδιότητες στα παραγόμενα τρόφιμα. Συνήθως, τα συστατικά που χρησιμοποιούνται αφορούν τον έλεγχο του αρώματος, του χρώματος, της υφής και των ιδιοτήτων συντήρησης. Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η στροφή των βιομηχανιών τροφίμων στη χρήση βιοδραστικών μορίων με πιθανές ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία (Champagne and Fustier, 2007, Nesterenko et al., 2013). Τα βιοδραστικά στοιχεία είναι συστατικά των τροφίμων και των συμπληρωμάτων

διατροφής, ζωικής ή φυτικής προέλευσης, τα οποία κατέχουν σημαντικό ρόλο στην υγεία, πέρα της βασικής θρεπτικής αξίας. Η ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών στα τρόφιμα αποτελεί έναν δύσκολο στόχο για τους επιστήμονες των τροφίμων, καθώς μερικά από τα εμπόδια που καλούνται να ξεπεράσουν αφορούν την ευαισθησία των συστατικών αυτών σε διάφορες συνθήκες υποβάθμισης (π.χ. οξείδωση) και τη διατήρηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Η προσθήκη των βιοδραστικών μορίων σε τρόφιμα και κυρίως σε τρόφιμα που καταναλώνονται ως βασικό κομμάτι της διατροφής στοχευμένων πληθυσμιακών ομάδων, προσφέρει την ευκαιρία για βελτίωση της υγείας των καταναλωτών. Το ενδιαφέρον της βιομηχανίας τροφίμων για την ανάπτυξη τέτοιων λειτουργικών τροφίμων έχει οδηγήσει στην παραγωγή μιας νέας γενιάς προϊόντων διατροφής με βελτιωμένο επίπεδο συστατικών με πιθανά οφέλη για την υγεία (Augustin and Sanguansri, 2008).

Η παραγωγή αυτών των νέων προϊόντων διατροφής συχνά αποτελεί μία πρόκληση για τη βιομηχανία. Τα ήδη υπάρχοντα και τα νέα συστατικά πρέπει να συνυπάρξουν στα τρόφιμα, μέσα στα οποία σιγά σιγά υποβαθμίζονται και χάνουν τη δραστηριότητά τους, ή γίνονται πιο επικίνδυνα λόγω της οξείδωσης που υφίστανται. Τα προστιθέμενα συστατικά μπορούν, επίσης, να αλληλεπιδράσουν με τα συστατικά του συστήματος του τροφίμου, χάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους, ή αλλάζοντας το χρώμα και τη γεύση του τελικού προϊόντος. Σε αρκετές περιπτώσεις, η εφαρμογή της μικροενθυλάκωσης μπορεί να βοηθήσει ώστε να ξεπεραστούν αυτές οι δυσκολίες (Schrooyen et al., 2001). Η μικροενθυλάκωση στοχεύει στη διατήρηση της σταθερότητας των βιοδραστικών μορίων κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσης και στη πρόληψη ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων με τα υπόλοιπα συστατικά του τροφίμου. Τα βιοδραστικά συστατικά θα ωφεληθούν από τη μικροενθυλάκωσή τους, καθώς επιβραδύνονται οι διαδικασίες υποβάθμισης, όπως η οξείδωση και η υδρόλυση, και αναχαιτίζεται η υποβάθμισή τους έως ότου φτάσουν τον τελικό προορισμό τους. Με αυτό τον τρόπο, τα βιοδραστικά μόρια παραμένουν εντελώς λειτουργικά. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή παρέχει φραγμό ανάμεσα στα ευαίσθητα βιοδραστικά στοιχεία και το εξωτερικό περιβάλλον, επιτρέποντας τη διάκριση αρωμάτων και γεύσεων, την κάλυψη άλλων δυσάρεστων οσμών και γεύσεων, τη σταθεροποίηση των συστατικών του τροφίμου και την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους (Nedovic et al., 2011).

Επιπρόσθετα, η μικροενθυλάκωση προσφέρει προστασία στο πυρηνικό υλικό από τις χημικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στον γαστρεντερικό αυλό κατά τη

διάρκεια της πέψης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μικροενθυλάκωση των προβιοτικών, η οποία θεωρείται ιδιαίτερα χρήσιμη για τη διατήρηση των ευεργετικών ιδιοτήτων των προβιοτικών. Η μικροενθυλάκωση φαίνεται όχι μόνο να σταθεροποιεί τα κύτταρα, αλλά βελτιώνει τη ζωτικότητα των μικροοργανισμών και παράλληλα οδηγεί σε πιο εύκολη διαχείριση των προβιοτικών σε βιομηχανική κλίμακα. Επίσης, κάποιοι μικροοργανισμοί, όπως οι λακτοβάκιλλοι και το μπιφιδοβακτήρια φαίνεται να έχουν «κέρδος» από τη μικροενθυλάκωση κατά τη διάρκεια της αφυδάτωσης και της λυοφιλίωσης. Αξίζει να αναφέρουμε ότι τα βακτήρια από μόνα τους έχουν αναπτύξει ένα είδος ενθυλάκωσης με τους πολυσακχαρίτες που εναποθέτουν στις εξωτερικές μεμβράνες τους, με σκοπό την προστασία τους από εξωτερικούς παράγοντες. Τέλος, η στοχευμένη απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού στα διάφορα μέρη του γαστρεντερικού σωλήνα επιτυγχάνεται με σχεδιασμό της μηχανικής αντοχής της μικροκάψουλας στις περισταλτικές κινήσεις του στομάχου και του εντέρου, με χρήση ευαίσθητων στο pH πολυμερή στο εξωτερικό κάλυμμα, ώστε να αντέχουν στο pH του στομάχου, αλλά να διαλύονται στο pH του εντέρου και με εκμετάλλευση της τοπικής δράσης των ενζύμων της εντερικής μικροχλωρίδας (de Vos et al., 2010).



Σχήμα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της απελευθέρωσης της ενθυλακωμένης ουσίας από μία μικροκάψουλα (Martins et al., 2013).

Η επιλογή του εξωτερικού καλύμματος είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης και τη σταθερότητα του συμπλόκου εγκλεισμού. Τα κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου υλικού αφορούν την ασφάλειά του, τις φυσικοχημικές ιδιότητες του πυρηνικού υλικού (π.χ. διαλυτότητα, πορώδες) και του εξωτερικού καλύμματος (π.χ. ιξώδες, μηχανικές ιδιότητες), καθώς και τη συμβατότητα ανάμεσα στα δύο υλικά (π.χ. να μην πραγματοποιείται χημική αντίδραση). Επιπρόσθετα, το τελικό μέγεθος του προϊόντος της μικροενθυλάκωσης,

αλλά και βιομηχανικοί - οικονομικοί παράγοντες αποτελούν σημαντικές παραμέτρους της επιλογής του εξωτερικού καλύμματος (Estevinho et al., 2013).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων, ο αριθμός των συστατικών των τροφίμων που μικροενθυλακώνονται ή/και υπόκεινται σε ελεγχόμενη απελευθέρωση αυξάνεται. Μερικά συστατικά που φαίνεται να κυριαρχούν στη βιομηχανία τροφίμων και υποβάλλονται συχνά σε μικροενθυλάκωση είναι οι αρωματικές ύλες, οι χρωστικές ουσίες, οι σταθεροποιητές, τα αντιοξειδωτικά, τα ένζυμα, τα προβιοτικά, τα λιποειδή, τα μέταλλα και οι βιταμίνες (Estevinho et al., 2013).

Η μικροενθυλάκωση κερδίζει όλο και μεγαλύτερο έδαφος στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ παράλληλα πληθώρα ερευνών έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητά της. Ενδεικτικά, η μελέτη των Barrow et al., (2009) έδειξε ότι η βιοδιαθεσιμότητα των ω-3 λιπαρών οξέων που μικροενθυλακώθηκαν ήταν ίδια με τη βιοδιαθεσιμότητα των ω-3 λιπαρών οξέων που χορηγήθηκαν ως διατροφικό συμπλήρωμα, ενώ τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων μειώθηκαν ομοίως. Επιπλέον, η μικροενθυλάκωση καθιστά εφικτό τον εμπλουτισμό τροφίμων με βιταμίνες και μέταλλα, καθώς αποτρέπει την αντίδραση των συστατικών αυτών με τα συστατικά του τροφίμου. Για παράδειγμα, η βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου επηρεάζεται σημαντικά από συστατικά του συστήματος του τροφίμου όπως οι πολυφαινόλες και οι τανίνες (Champagne and Fustier, 2007). Με τη μικροενθυλάκωση είναι, επίσης, εφικτή η ενίσχυση του γάλακτος από σόγια με ασβέστιο, ώστε να προσομοιάζει τα επίπεδα ασβεστίου του αγελαδινού γάλακτος (Hirotaka et al., 1984). Επιπρόσθετα, η μικροενθυλάκωση αντιμικροβιακών παραγόντων μπορεί να αυξήσει τη συγκέντρωσή τους, στα συστήματα των τροφίμων, όπου παρατηρείται αυξημένη παρουσία ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Donsi et al., 2011). Τέλος, οι Hermenean et al. (2012) έδειξαν ότι το ενθυλακωμένο εκχύλισμα *Berberis vulgaris* L. σε β-κυκλοδεξτρίνη παρουσίασε καλύτερη ηπατοπροστατευτική δράση εν συγκρίσει με το σκέτο εκχύλισμα έπειτα από του στόματος χορήγηση σε ενήλικους μύες, λόγω της καλύτερης βιοδιαθεσιμότητάς του.

Πρόσφατα, η έρευνα και η αναζήτηση τρόπων αξιοποίησης των πολυφαινολών αποτελεί ένα πεδίο με έντονη δραστηριότητα στη βιομηχανία τροφίμων. Μελέτες in vitro και in vivo έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να ελαττώσουν τη φλεγμονή, να σταματήσουν την ανάπτυξη όγκων, να ρυθμίσουν το ανοσοποιητικό σύστημα, να προστατέψουν το καρδιαγγειακό σύστημα και να συνδράμουν στην απώλεια βάρους. Επιπλέον, η σημαντική αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών

αποδίδεται: 1) στην ικανότητά τους να δεσμεύουν απευθείας τις ελεύθερες ρίζες, 2) στην υψηλή τάση τους να σχηματίζουν χηλικούς δεσμούς με μεταλλικά ιόντα, τα οποία καταλύουν αντιδράσεις παραγωγής ελεύθερων ριζών και 3) στη δράση τους ως αναστολείς ενζύμων που παράγουν ελεύθερες ρίζες όπως η λιποοξυγονάση (Munin et al., 2011). Δυστυχώς, η ποσότητα των πολυφαινολών που φαίνεται αποτελεσματική σε μελέτες *in vitro* είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την πραγματική αποτελεσματικότητα *in vivo*. Η δραστηριότητα των διατροφοδραστικών προϊόντων έγκειται στη διατήρηση της βιοδιαθεσιμότητας των βιοδραστικών μορίων. Η επίτευξη της βέλτιστης διατηρησιμότητας αποτελεί μεγάλη πρόκληση και αναγκαιότητα, καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό των μορίων παραμένει δραστικό μετά τη χορήγηση από το στόμα, λόγω της επίδρασης των γαστρικών υγρών, της χαμηλής διαπερατότητας ή/και διαλυτότητας στον εντερικό αυλό, της αστάθειάς τους στις συνθήκες που απαντώνται κατά την επεξεργασία και αποθήκευση των τροφίμων (φως, οξυγόνο, υγρασία, θερμοκρασία) αλλά και στον γαστρεντερικό σωλήνα (ένζυμα, pH, άλλα συστατικά της διατροφής), περιορίζοντας τη ευεργετική δράση των πολυφαινολικών συστατικών. Επίσης, είναι γνωστό ότι οι πολυφαινόλες έχουν πικρή γεύση και χαρακτηρίζονται για τη στυφότητά τους. Η εφαρμογή λοιπόν της μικροενθυλάκωσης μπορεί να ξεπεράσει τα μειονεκτήματα της αστάθειας, να καλύψει δυσάρεστες οσμές και γεύσεις και να βελτιώσει τη βιοδιαθεσιμότητα και το χρόνο ζωής των πολυφαινολών *in vitro* και *in vivo* (Fang and Bhandari, 2010).

Η βιομηχανία τροφίμων είναι ένα καλό παράδειγμα σε ότι αφορά την εφαρμογή των τεχνικών μικροενθυλάκωσης και των θεωρήσεων περί κόστους και οικονομικής αποδοτικότητας. Σε αντίθεση με τη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών, η εφαρμογή της μικροενθυλάκωσης είναι περισσότερο δύσκολη, και το ισοζύγιο κόστους παραγωγής - τιμής τελικού προϊόντος και αποδοτικότητας πρέπει να λαμβάνεται υπόψη αυστηρώς. Σε οικονομικό επίπεδο, το προϊόν με το ενθυλακωμένο συστατικό μπορεί να είναι ελαφρώς πιο ακριβό, σε σχέση με το ίδιο προϊόν χωρίς το ενθυλακωμένο συστατικό, με την προϋπόθεση το ενθυλακωμένο συστατικό να προσφέρει επιπρόσθετες σημαντικές ιδιότητες στο τρόφιμο. Λαμβάνοντας υπόψη τα χαρακτηριστικά ενός προϊόντος με μικροενθυλακωμένα συστατικά, τα οποία αποτελούν το 1 - 5% του τελικού προϊόντος, εκτιμήθηκε το 2004, ότι το μέγιστο κόστος για την εφαρμογή της μικροενθυλάκωσης στη βιομηχανία τροφίμων δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 0,1 ευρώ ανά κιλό προϊόντος (Gouin, 2004).

1.2 Τεχνικές ενθυλάκωσης

Ποικίλες τεχνικές μικροενθυλάκωσης έχουν αναφερθεί, ωστόσο η κατάλληλη επιλογή τεχνικής εξαρτάται από το μέγεθος, τη βιοσυμβατότητα, την επιθυμητή ικανότητα βιοαποικοδόμησης του τελικού προϊόντος, τις φυσικοχημικές ιδιότητες του πυρηνικού υλικού και του εξωτερικού καλύμματος, τον τρόπο εφαρμογής των μικροκάψουλων, τον τρόπο απελευθέρωσης του πυρηνικού υλικού και το κόστος της παραγωγής (Nesterenko et al., 2013).

Οι συνήθεις τεχνικές που περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία και βρίσκουν εφαρμογή είναι (Gouin, 2004, Fang and Bhandari, 2010):

- ◆ ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)
- ◆ λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη (lyophilisation)
- ◆ ψύξη με ψεκασμό (spray cooling/chilling)
- ◆ εξώθηση ή εκβολή (extrusion)
- ◆ επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη (fluidized bed coating)
- ◆ συγκρυστάλλωση (cocrystallization)
- ◆ εγκλεισμός σε λιποσώματα (liposome entrapment)
- ◆ ενθυλάκωση σε ζύμες (yeast encapsulation)
- ◆ σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού (inclusion complexation)
- ◆ γαλακτωματοποίηση (emulsion)
- ◆ περιστρεφόμενος δίσκος (spinning disk)
- ◆ διαχωρισμός φάσεων (coacervation)

1.2.1 Ξήρανση με ψεκασμό

Η μικροενθυλάκωση με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων, από τα τέλη της δεκαετίας του 1950, για την ενθυλάκωση αρωματικών ελαίων παρέχοντας προστασία έναντι της οξείδωσης/υποβάθμισης, καθώς και για τη μετατροπή υγρών ουσιών σε στερεή μορφή (Gouin, 2004). Η ξήρανση με ψεκασμό είναι οικονομική, ευέλικτη, συνεχούς λειτουργίας τεχνική που παράγει σωματίδια καλής ποιότητας. Επίσης, είναι εύκολα αναπαραγωγίμη και μπορεί να εφαρμοστεί σε πιο ευρεία κλίμακα στις συνθήκες της βιομηχανίας

τροφίμων. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τη μέθοδο αυτή, την πιο πλέον διαδεδομένη τεχνική μικροενθυλάκωσης στο χώρο της βιομηχανίας τροφίμων (Fang and Bhandari, 2010, Estevinho et al., 2013).

Η ξήρανση με ψεκασμό είναι μία διαδικασία κατά την οποία ένα υγρό προϊόν ψεκάζεται σε ένα ρεύμα ζεστού αέρα, ώστε να προκύψει, στιγμιαίως, μία σκόνη (Gharsallaoui et al., 2007). Η βασική αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει τη διάλυση του πυρηνικού υλικού και του επιλεγμένου εξωτερικού καλύμματος προς τη δημιουργία ενός εναιωρήματος, γαλακτώματος ή διαλύματος. Το παρασκεύασμα αυτό, ακολούθως, ψεκάζεται υπό συνθήκες θερμού αέρα, επιτείνοντας την ταχεία απομάκρυνση του διαλύτη. Οι θερμοκρασίες που συνήθως χρησιμοποιούνται στην τεχνική αυτή κυμαίνονται από 150 έως 220°C, ενώ στη συνέχεια η θερμοκρασία πέφτει στους 50 – 80°C. Τα σωματίδια που προκύπτουν είναι σε μορφή σκόνης (Schrooyen et al., 2001, de Vos et al., 2010). Πιο αναλυτικά, για τους σκοπούς της μικροενθυλάκωσης, τροποποιημένο άμυλο, μαλτοδεξτρίνες, κόμμεα ή άλλες ουσίες διαλύονται, σε πρώτο βήμα, σε νερό, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως υλικά του εξωτερικού καλύμματος. Στη συνέχεια, το πυρηνικό υλικό ομογενοποιείται με το υλικό του εξωτερικού καλύμματος. Το μίγμα παροχετεύεται στη συσκευή της ξήρανσης με ψεκασμό και ψεκάζεται από τον εκνεφωτή ή τον περιστρεφόμενο δίσκο της συσκευής. Οι υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούν επισπεύδουν την εξάτμιση του νερού, και οι μικροκάψουλες εναποτίθενται στον πυθμένα του ξηραντήρα, από όπου και παραλαμβάνονται στο τέλος της διαδικασίας. Το τυπικό σχήμα των παραγόμενων σωματιδίων είναι σφαιρικό, και το μέσο μέγεθος κυμαίνεται από 10 nm έως 100 nm (Fang and Bhandari, 2010). Σημειώνεται ότι η το πυρηνικό υλικό και το υλικό του εξωτερικού καλύμματος θα πρέπει να βρίσκονται σε αναλογία 1:4 (Gibbs et al., 1999). Επιπλέον, η ταχεία εξάτμιση του νερού από το υλικό του καλύμματος διατηρεί τη θερμοκρασία του πυρήνα χαμηλότερη από τους 100°C, παρά τις υψηλές θερμοκρασίες (150 - 220°C) που επικρατούν στη μέθοδο αυτή, ενώ η έκθεση του μορίου στις θερμοκρασίες αυτές διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα. Έτσι, η ξήρανση με ψεκασμό θεωρείται ιδανική για τη διαχείριση μορίων, ασταθή σε υψηλές θερμοκρασίες (Shahidi and Han, 1993).

Η αφαίρεση του νερού με τη μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό είναι συνήθους βιομηχανική πρακτική. Μειώνοντας το περιεχόμενο νερό και την ενεργότητα νερού, η ξήρανση με ψεκασμό χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων για να διασφαλίσει τη μικροβιολογική σταθερότητα των προϊόντων, να ελαττώσει τον κίνδυνο για χημική

και βιολογική υποβάθμιση, να μειώσει το κόστος αποθήκευσης και μεταφοράς και να αποκτήσει το τελικό προϊόν κάποιες επιθυμητές ιδιότητες, όπως η αυξημένη διαλυτότητα (Estevinho et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, ένας περιορισμός της μεθόδου είναι η αναγκαία προϋπόθεση το υλικό του εξωτερικού καλύμματος να είναι υδατοδιαλυτό σε αποδεκτά όρια. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει ένας περιορισμός στα υλικά καλύμματος που μπορούν να χρησιμοποιηθούν (Gouin, 2004, Estevinho et al., 2013). Άλλος ένας περιορισμός, κυρίως στην ενθυλάκωση προβιοτικών, είναι πως οι υψηλές θερμοκρασίες ($>60^{\circ}\text{C}$) μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την επιβίωση των μικροοργανισμών (de Vos et al., 2010).

Το εξωτερικό κάλυμμα είναι σχεδιασμένο για να προστατεύει το πυρηνικό υλικό από ποικίλους παράγοντες που μπορούν να το υποβαθμίσουν, να εμποδίζει την αλληλεπίδραση του πυρηνικού υλικού με άλλα συστατικά του τροφίμου, να περιορίζει την απώλεια λόγω πτητικότητας και να επιτρέπει την ελεγχόμενη απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού υπό καθορισμένες συνθήκες. Βάσει των ιδιοτήτων του πυρηνικού υλικού, αλλά και των επιδιωκόμενων χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος, το εξωτερικό κάλυμμα θα πρέπει να πληροί κάποια κριτήρια. Αναφορικά οι φυσικοχημικές ιδιότητες που λαμβάνονται υπόψη είναι η διαλυτότητα σε νερό σε αποδεκτά όρια, το μοριακό βάρος, η υαλώδης μετάπτωση, η κρυσταλλικότητα, η ικανότητα διάχυσης, η ικανότητα γαλακτωματοποίησης, η μηχανική αντοχή, η συμβατότητα με το τρόφιμο και το κατάλληλο μέγεθος των παραγόμενων μικροκάψουλων. Τέλος, το κόστος παίζει πάντοτε σημαντικό ρόλο στην επιλογή του κατάλληλου υλικού. Η μικροενθυλάκωση με την τεχνική ξήρανση με ψεκασμό πραγματοποιείται με τη χρήση βιοπολυμερών όπως οι πρωτεΐνες, οι κηροί, τα κόμμεα και μαλτοδεξτρίνες, ως εξωτερικά καλύμματα (Gharsallaoui et al., 2007).

1.2.2 Λυοφιλίωση

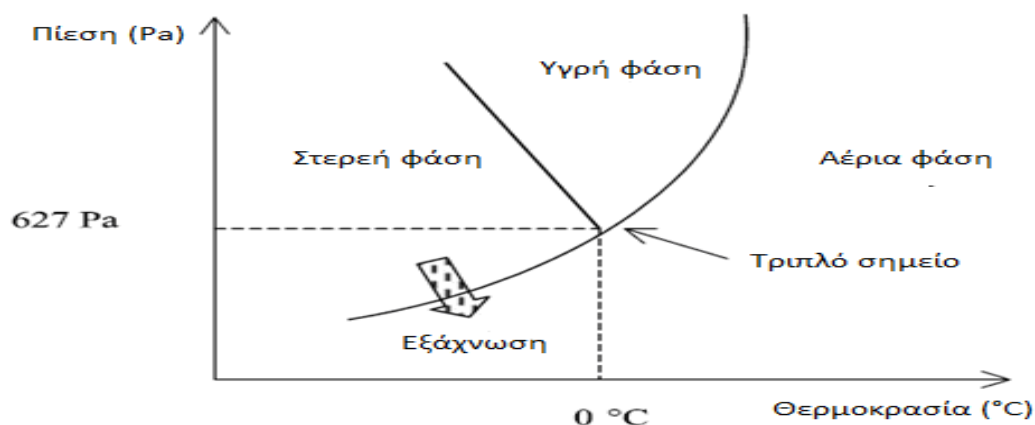
Η λυοφιλίωση, ή αλλιώς ξήρανση με κατάψυξη, είναι μια διαδικασία ξήρανσης που χρησιμοποιείται συχνά, κυρίως για θερμο-ευαίσθητα συστατικά. Η ξήρανση με κατάψυξη είναι μια πολύ-επίπεδη διαδικασία για τη σταθεροποίηση των συστατικών. Η διαδικασία αυτή έχει τέσσερα στάδια: την ψύξη, την εξάχνωση (πρώτο στάδιο ξήρανσης), το στάδιο της εκρόφησης (δεύτερο στάδιο ξήρανσης) και την

αποθήκευση. Τα προϊόντα της λυοφιλίωσης είναι υψηλής ποιότητας, ανασυντίθενται εύκολα και έχουν μεγάλο χρόνο ζωής (Ezhilarasik et al., 2013).

Η λυοφιλίωση περιλαμβάνει αρχικά την ψύξη των υλικών, έπειτα τη μείωση της πίεσης και τέλος την παροχή θερμότητας από το εξωτερικό περιβάλλον. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη διαφυγή του νερού από τη στερεή φάση κατευθείαν στην αέρια (Fang and Bhandari, 2010). Για τη μείωση της πίεσης, αλλά και την απομάκρυνση των ήδη υπαρχόντων αερίων στο θάλαμο της λυοφιλίωσης, τίθεται σε λειτουργία μία αντλία κενού. Επίσης, όταν ο πάγος αρχίζει να εξαχνώνεται, οι υδρατμοί διοχετεύονται σε ένα ψυγείο-συμπυκνωτή, εμποδίζοντας έτσι, την επιστροφή των υδρατμών στο θάλαμο της λυοφιλίωσης. Επιπλέον, μειώνεται ο τελικός όγκος των αερίων όπου η αντλία κενού πρέπει να απομακρύνει.

Το υγρό στοιχείο που συνήθως εξαχνώνεται είναι το νερό. Μιας και η πίεση ατμών του πάγου είναι πολύ χαμηλή, η ύπαρξη πολύ χαμηλής πίεσης ή υψηλού κενού είναι απαραίτητη για την επίτευξη της ξήρανσης με κατάψυξη. Το παρακάτω σχήμα απεικονίζει διαγραμματικά τις φάσεις του νερού σε διάφορες θερμοκρασίες και πιέσεις. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, όταν το νερό είναι στην καθαρή του μορφή, η πίεση στο θάλαμο ξήρανσης πρέπει να είναι μικρότερη από 627 kPa και η θερμοκρασία ίση ή χαμηλότερη από τους 0°C ώστε να πραγματοποιηθεί η εξάχνωση του πάγου επιτυχώς. Στην περίπτωση των τροφίμων, αναμεμιγμένα στο νερό βρίσκονται και άλλα συστατικά. Ως αποτέλεσμα, μειώνεται η θερμοκρασία πήξης και χαμηλότερες θερμοκρασίες απαιτούνται ώστε να ψυχθεί το τρόφιμο. Στις περισσότερες περιπτώσεις λυοφιλίωσης, οι θερμοκρασίες που επικρατούν είναι χαμηλότερες από τους -10°C και η πίεση χαμηλότερη από τα 2 mmHg (Barbosa-Cánovas et al., 2005).

Τα προϊόντα της λυοφιλίωσης είναι ξηρά, ελαφρά, πορώδη και διατηρούν σχεδόν εξ ολοκλήρου το αρχικό τους σχήμα και δομή. Τα κατάλληλα συσκευασμένα αποξηραμένα προϊόντα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάσουν τις φυσικοχημικές, βιολογικές και οργανοληπτικές ιδιότητες που είχαν πριν την ξήρανση. Επίσης, οι χαμηλές θερμοκρασίες που επικρατούν στη μέθοδο αυτή, ελαχιστοποιούν τις αντιδράσεις υποβάθμισης που παρατηρούνται συχνά στις υπόλοιπες τεχνικές ξήρανσης. Το προφανές πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πως η



Σχήμα 1.3: Διάγραμμα φάσεων του καθαρού νερού (Barbosa-Cánovas et al., 2005).

δομή κρυστάλλου κατά την κατάψυξη ελαχιστοποιεί τη συρρίκνωση του προϊόντος και έτσι, καθιστά εφικτή τη γρήγορη και ολοκληρωμένη επανενυδάτωση του προϊόντος. Οι καλές ανοικοδομητικές ιδιότητές του παραγόμενου αποξηραμένου προϊόντος επιτρέπουν την επανάκτηση της αρχικής μορφής και δομής, παρουσιάζοντας χαρακτηριστικά παρόμοια με το αρχικό νωπό προϊόν (Barbosa-Cánovas et al., 2005). Επιπλέον, η λυοφιλίωση οδηγεί στο σχηματισμό προϊόντων πάρα πολύ καλής ποιότητας, τα οποία μάλιστα αποκτούν μεγαλύτερο χρόνο ζωής κατά την αποθήκευσή τους. Από την άλλη πλευρά, μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο μεγάλος χρόνος αναμονής και το υψηλό ενεργειακό - οικονομικό κόστος μέχρι την ολοκλήρωσή της, μιας και η βαθιά κατάψυξη των προϊόντων και η δημιουργία κενού απαιτούν υψηλή παροχή ενέργειας (Ezhilarasi et al., 2013).

Η μικροενθυλάκωση πραγματοποιείται έπειτα από την ομογενοποίηση του πυρηνικού υλικού σε διάλυμα που περιέχει το εξωτερικό κάλυμμα, και τη συν-λυοφιλίωσή τους (Desai and Jin Park, 2005).

1.2.3 Ψύξη με ψεκασμό

Η ψύξη με ψεκασμό είναι μία μέθοδος ενθυλάκωσης η οποία προσομοιάζει την ξήρανση με ψεκασμό, όσον αφορά το γεγονός ότι περιλαμβάνει τη διάλυση του πυρηνικού υλικού σε ένα διάλυμα που ήδη έχει διαλυθεί το υλικό του εξωτερικού καλύμματος με στόχο την παραγωγή ενός εναιωρήματος, γαλακτώματος ή διαλύματος. Είναι εύλογο ότι και ο ψεκασμός από θερμασμένο εκνεφωτή σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον είναι ένα άλλο κοινό χαρακτηριστικό τους. Οι βασικές

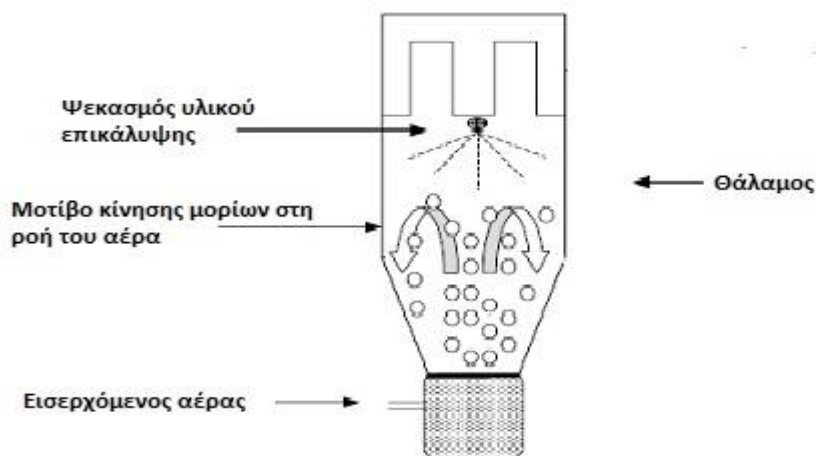
διαφορές τους, όμως, έγκεινται στη θερμοκρασία του αέρα που χρησιμοποιείται στον θάλαμο ξήρανσης και στο υλικό εξωτερικού καλύμματος που χρησιμοποιείται. Ενώ η ξήρανση με ψεκασμό χρησιμοποιεί θερμό αέρα για την εξάτμιση του διαλύτη, στη μέθοδο της ψύξης με ψεκασμό χρησιμοποιείται κρύος αέρας χαμηλότερης θερμοκρασίας από τη θερμοκρασία πήξης των τετηγμένων λιποειδών ή κηρών που χρησιμοποιούνται ως εξωτερικά καλύμματα. Πιο συγκεκριμένα, συνήθως χρησιμοποιούνται φυτικά λιπαρά ή παράγωγά τους ως εξωτερικά καλύμματα. Επιπλέον, οι μικροσωματίδια που δημιουργούνται είναι λιπόφιλα, λόγω του λιποειδικού εξωτερικού καλύμματος. Συνεπώς, η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για την ενθυλάκωση υδατοδιαλυτών συστατικών όπως υδατοδιαλυτές βιταμίνες, μέταλλα, ένζυμα ή μερικά αρώματα (Shahidi and Han, 1993). Τέλος, αξίζει να αναφέρουμε ότι η μέθοδος αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ενθυλάκωση «μήτρας», καθώς τα μόρια του πυρηνικού υλικού χαρακτηρίζονται ως ένα σύνολο συστατικών μορίων «βυθισμένων» σε μία λιπαρή «μήτρα», ενώ δεν σχηματίζεται η γνωστή μορφή της μικροκάψουλας (Gouin, 2004).

1.2.4 Εξώθηση

Η διαδικασία της εξώθησης περιλαμβάνει την εφαρμογή πίεσης σε μία άμορφη μάζα, ώστε να ρεύσει διαμέσου ενός στομίου ή καλουπιού υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η συσκευή της εξώθησης για την ενθυλάκωση αποτελείται από μια συσκευή παραγωγής και σκλήρυνσης σταγονιδίων. Η μικροενθυλάκωση με εξώθηση λαμβάνει χώρα σε υψηλές θερμοκρασίες, και περιλαμβάνει εκβολή ενός γαλακτώματος του πυρηνικού υλικού και του εξωτερικού καλύμματος μέσω ενός στομίου υπό υψηλή πίεση (Augustin and Sanguansri, 2008). Επίσης, χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για την ενθυλάκωση πτητικών και ασταθών αρωματικών συστατικών σε υδατάνθρακες που βρίσκονται στην υαλώδη κατάσταση. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλη διάρκεια ζωής των παραγόμενων προϊόντων σε μόρια που είναι επιρρεπή στην οξείδωση. Από την άλλη πλευρά, ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι ο σχηματισμός αρκετά μεγάλων σωματιδίων μεγέθους 500 - 1000 μm, ο οποίος περιορίζει τη χρήση των εξωθημένων αρωματικών συστατικών σε εφαρμογές όπου το mouthfulling είναι σημαντικό χαρακτηριστικό του τροφίμου. Επιπλέον, υπάρχει περιορισμένος αριθμός υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξωτερικά καλύμματα για μικροενθυλάκωση με εξώθηση (Gouin, 2004).

1.2.5 Επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη

Η μέθοδος της επικάλυψης σε ρευστοποιημένη κλίνη αποτελεί έναν τρόπο δημιουργίας μιας ομοιόμορφης στοιβάδας γύρω από στερεά σωματίδια. Τα στερεά σωματίδια προς ενθυλάκωση, παρασύρονται από ένα σταθερό ρεύμα θερμού ή κρύου αέρα από τον πυθμένα του θαλάμου επικάλυψης προς το ανώτερο τμήμα του θαλάμου. Στο ανώτερο τμήμα του θαλάμου υπάρχει ένας εκνεφωτής, ο οποίος ψεκάζει το υλικό του εξωτερικού καλύμματος. Το εξωτερικό κάλυμμα είτε είναι διαλυμένο σε κάποιον διαλύτη ή βρίσκεται σε «τετηγμένη» μορφή. Το εξωτερικό κάλυμμα επικαλύπτει το πυρηνικό υλικό καθώς το πλησιάζει, και δημιουργείται μια εξωτερική στοιβάδα. Στη συνέχεια, το πυρηνικό υλικό επικαλυμμένο με το εξωτερικό κάλυμμα, λόγω της βαρύτητας και του εξασθενημένου ρεύματος αέρα που επικρατεί στο ανώτερο τμήμα του θαλάμου, πέφτει προς τα κάτω. Η διαδικασία αυτή γίνεται αρκετές φορές μέχρι να σχηματιστεί πλήρως η επιθυμητή εξωτερική στοιβάδα. Στο τέλος, μετά την παύση του ρεύματος αέρα, τα σχηματισμένα σωματίδια συλλέγονται από τον πυθμένα του θαλάμου. Η μέθοδος αυτή είναι η δεύτερη πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την παραγωγή ενθυλακωμένων προϊόντων στη βιομηχανία τροφίμων, μιας και καθιστά δυνατή τη χρήση μεγάλης ποικιλίας υλικών εξωτερικού καλύμματος (Barbosa-Cánovas et al., 2005).



Σχήμα 1.4: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής μικροενθυλάκωσης: επικάλυψη με ρευστοποιημένη κλίνη (Barbosa-Cánovas et al., 2005)

1.2.6 Συγκρυστάλλωση

Η συγκρυστάλλωση είναι μια διαδικασία ενθυλάκωσης κατά την οποία η κρυσταλλική μορφή της σουκρόζης τροποποιείται από ένα τέλειο σε ένα ακανόνιστο

συσσωματωμένο κρύσταλλο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πορώδους μήτρας όπου καθιστά δυνατή την ενσωμάτωση ενός δεύτερου συστατικού. Η αυθόρμητη κρυστάλλωση του υπέρκορου διαλύματος σουκρόζης πραγματοποιείται σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (άνω των 120°C) και χαμηλής υγρασίας. Εάν ένα δεύτερο συστατικό προστεθεί τη στιγμή της κρυστάλλωσης, η αυθόρμητη κρυστάλλωση έχει ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του δεύτερου συστατικού στον κενό χώρο ανάμεσα στα συσσωματώματα των μικροκρυστάλλων. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η βελτιωμένη διαλυτότητα, ομοιογένεια, ικανότητα διασποράς, ενυδάτωση, αντισυσσωμάτωση, σταθερότητα και ρευστότητα των ενθυλακωμένων συστατικών (Fang and Bhandari, 2010).

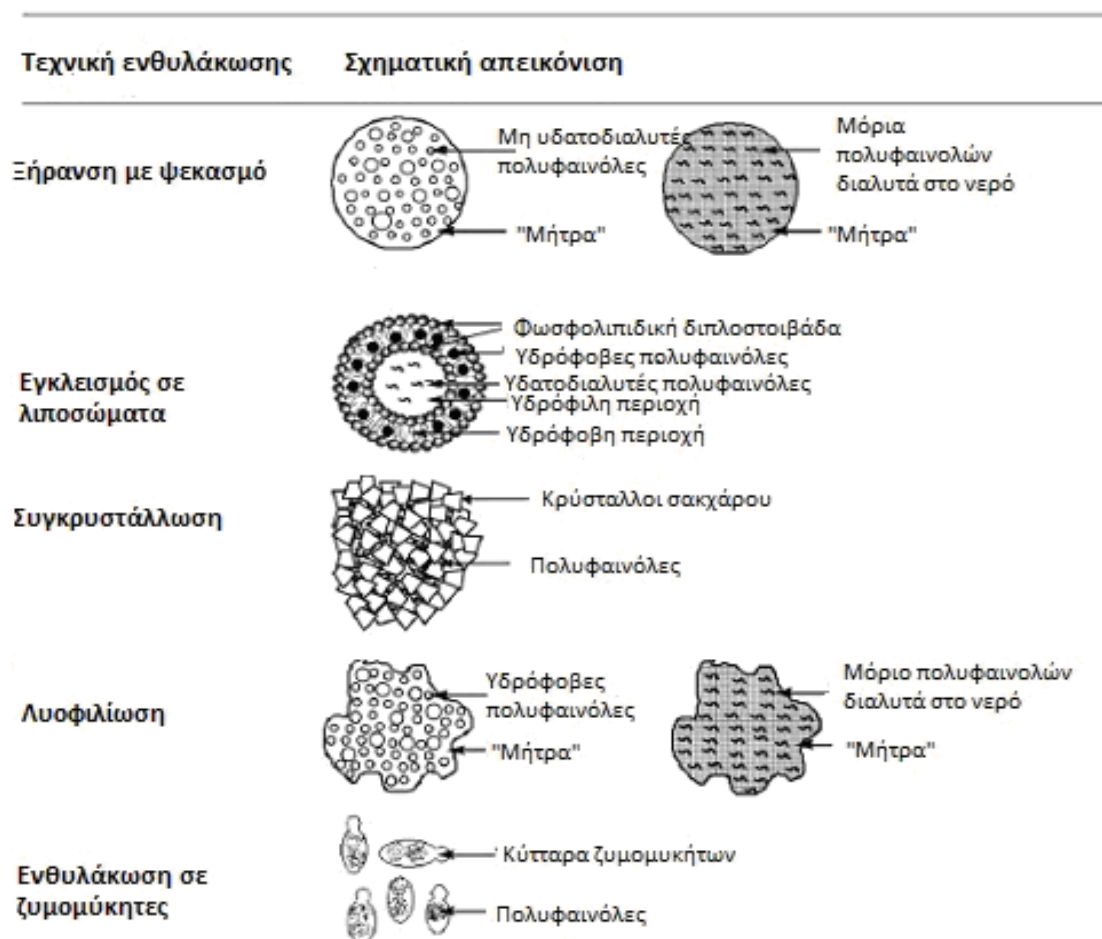
1.2.7 Εγκλεισμός σε λιποσώματα

Τα λιποσώματα αποτελούνται από τουλάχιστον ένα κυστίδιο και συντίθενται από λιπιδικές μεμβράνες, μίας ή δύο στοιβάδων. Οι στοιβάδες απαρτίζονται από λιπίδια όπως τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη. Τα λιποσώματα σχηματίζονται αφότου τα λιπίδια διασπαρθούν σε ένα υδατικό μέσο. Ο υποκείμενος μηχανισμός της δημιουργίας των λιποσωμάτων απαιτεί την παροχή ενέργειας και έγκειται στις υδροφιλικές - υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα λιπίδια και τα μόρια του νερού. Το πυρηνικό υλικό μπορεί είτε να εγκλειστεί στην κοιλότητα του λιποσώματος τη στιγμή του σχηματισμού του είτε να προσκολληθεί στην επιφάνειά του ή ενδομεμβρανικά. Η χρήση της τεχνικής αυτής στη βιομηχανία τροφίμων είναι ιδιαίτερα περιορισμένη εξαιτίας της χαμηλής απόδοσης της ενθυλάκωσης, το υψηλό κόστος και της αυξημένης πιθανότητας «διαφυγής» υδατοδιαλυτών εγκλεισμένων μορίων κατά την αποθήκευση του προϊόντος (Zuidam , 2010).

1.2.8 Ενθυλάκωση σε ζύμες

Από την πρώτη παρατήρηση, πριν 40 χρόνια, ότι τα κύτταρα των ζυμομυκήτων ήταν ικανές προστατευτικές δομές που μπορούσαν να έχουν διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές, πολλές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί, ώστε οι τεχνολόγοι να είναι σε θέση να ενσωματώνουν διάφορα συστατικά στα κύτταρα. Ο κυτταρικός φάκελος των ζυμομυκήτων μπορεί να λειτουργήσει ως εξωτερικό κάλυμμα και δρα ως μία προστατευτική κάψουλα, ελέγχοντας την οσμωτική πίεση και την ανταλλαγή

συστατικών με το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου. Μελέτες έχουν δείξει ότι είναι εφικτός ο μικροεγκλεισμός τόσο υδρόφοβων όσο και υδρόφιλων συστατικών στα κύτταρα των ζυμομυκήτων. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το ομοιόμορφο μέγεθος όλων των μικροκάψουλων, η υψηλή απόδοση της ενθυλάκωσης, ενώ το κόστος της δεν διαφέρει εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες τεχνικές μικροενθυλάκωσης. (Pham-Hoang et al., 2013). Για παράδειγμα, οι Paramera et al. (2011) πέτυχαν την ενθυλάκωση μορίων κουρκουμίνης σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* και έδειξαν ότι η ενθυλάκωση στα κύτταρα του ζυμομύκητα παρείχε προστασία από τις αρνητικές επιπτώσεις της έκθεσης της πολυφαινόλης στο φως, προστασία έναντι της οξείδωσης σε συνθήκες αυξημένης σχετικής υγρασίας, καθώς και αυξημένη θερμική σταθερότητα σε αναγωγικές και οξειδωτικές συνθήκες σε σταθερή θερμοκρασία 200°C. Η βιοενθυλάκωση στα κύτταρα παρείχε μεγαλύτερη προστασία σε σύγκριση με την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένο άμυλο.



Σχήμα 1.5: Συγκεντρωτική σχηματική απεικόνιση ενθυλακωμένων πολυφαινολών με διαφορετικές τεχνικές μικροενθυλάκωσης (Fang et al., 2010)

1.2.9 Μοριακός εγκλεισμός

1.2.9.1 Εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι έχουν ως δομική μονάδα την α-D-γλυκοκυρανόζη σε διαμόρφωση ανάκλιντρου, ενώ οι α-(1-4) γλυκοζιτικοί δεσμοί συνδέουν τα μονομερή. Οι κυκλοδεξτρίνες ανάλογα με τον αριθμό των μορίων γλυκοκυρανόζης διακρίνονται σε α-κυκλοδεξτρίνη (α-CD) με 6 δομικές μονάδες γλυκοκυρανόζης, σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) με 7 δομικές μονάδες γλυκοκυρανόζης και σε γ-κυκλοδεξτρίνη (γ-CD) με 8 δομικές μονάδες γλυκοκυρανόζης. Οι κυκλοδεξτρίνες αναφέρονται επίσης ως κυκλοαμυλόζες, κυκλομαλτόζες και δεξτρίνες Schardinger (Del Valle, 2004).

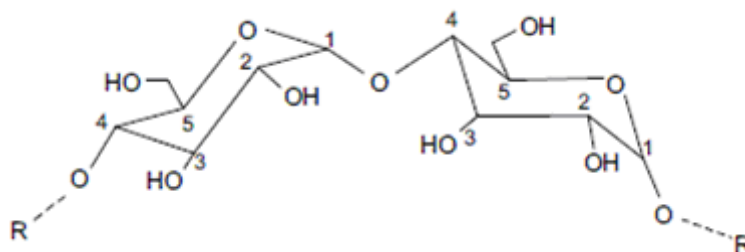
Πίνακας 1.1: Χαρακτηριστικά των κυκλοδεξτρινών α-CD, β-CD και γ-CD (Del Valle et al., 2004, Dodziuk, 2006)

Ιδιότητες	α-κυκλοδεξτρίνη	β-κυκλοδεξτρίνη	γ-κυκλοδεξτρίνη
Αριθμός μονάδων γλυκοκυρανόζης	6	7	8
Μοριακό βάρος (g/mol)	972	1135	1297
Διαλυτότητα στο νερό στους 25°C (% w/v)	14,5	1,85	23,2
Όγκος κοιλότητας (Å ³)	174	262	427
Εύρος θερμοκρασίας τήξεως (°C)	255-260	255-265	240-245
Περιεχόμενο κρυσταλλικό νερό (%)	10,2	13-15	8-18
Μόρια νερού στην κοιλότητα	6	11	17

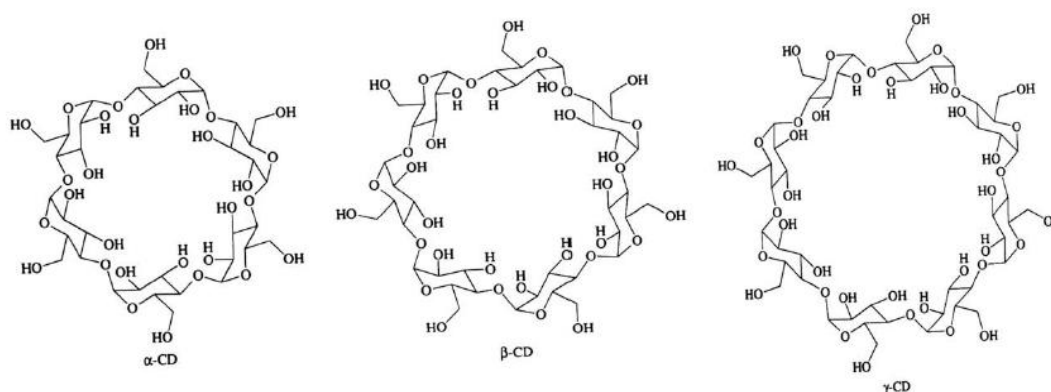
Οι κυκλοδεξτρίνες αρχικά θεωρήθηκαν τοξικές για τον άνθρωπο. Ωστόσο, η ικανότητά τους να δημιουργούν σύμπλοκα εγκλεισμού διέγειραν την περιέργεια των επιστημόνων. Μελέτες των μεταγενέστερων χρόνων έδειξαν ότι οι κυκλοδεξτρίνες όχι μόνο δεν είναι τοξικές αλλά μπορούν να είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την προστασία βιταμινών, αρωματικών ουσιών και φυσικών χρωστικών (Astray et al., 2009).

Στις μέρες μας, οι κυκλοδεξτρίνες παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα, με πρώτη ύλη το άμυλο, το οποίο μεταβολίζεται από ένζυμα μικροοργανισμών, όπως ο *Bacillus macerans* (Cevallos et al., 2010). Η πορεία παραγωγής των κυκλοδεξτρινών συνοψίζεται σε 4 στάδια: 1) καλλιέργεια του μικροοργανισμού το οποίο παράγει το ένζυμο γλυκοζυλο-τρανσφεράση της κυκλοδεξτρίνης (CGT-ase), 2) απομόνωση, συγκέντρωση και καθαρισμός του ενζύμου από το υλικό της καλλιέργειας, 3) ενζυμική μετατροπή του αμύλου σε μίγμα κυκλικών και μη κυκλικών δεξτρινών και 4) απομόνωση, καθαρισμός και κρυστάλλωση των κυκλοδεξτρινών (Moriwaki et al., 2014). Κατά την ενζυμική επεξεργασία, η CGT-ase αποικοδομεί το άμυλο και παράγει ενδομοριακές αντιδράσεις χωρίς τη συμμετοχή μορίων νερού. Με αυτή τη διαδικασία, παράγονται κυκλικές και μη κυκλικές δεξτρίνες μεσαίου μεγέθους. Οι κυκλοδεξτρίνες προκύπτουν από τη σύνδεση των μονάδων γλυκοπυρανόζης, οι οποίες απαρτίζουν τις δεξτρίνες. Οι συνδέσεις των μονομερών γίνονται με α-(1-4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ο δακτύλιος που σχηματίζεται στις κυκλοδεξτρίνες, στην πραγματικότητα μοιάζει με έναν κώνο, και πιο συγκεκριμένα με έναν κόλουρο κύλινδρο, με μια ευρύτερη βάση σχηματισμένη από τα υδροξύλια των C2 και C3, και μία στενότερη σχηματισμένη από τα υδροξύλια των C6. Το υδροξύλιο του C2 της μίας μονάδας γλυκοπυρανόζης μπορεί να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο του ανωμερούς άνθρακα του γλυκοζιτικού δεσμού και το υδροξύλιο του C3 της παρακείμενης μονάδας γλυκοπυρανόζης. Η «ζώνη» που σχηματίζεται από τους δεσμούς υδρογόνου, καθιστούν τα μόρια των κυκλοδεξτρινών, και κυρίως τα μόρια της β-κυκλοδεξτρίνης αρκετά άκαμπτα. Ο ενδομοριακός σχηματισμός των δεσμών υδρογόνου ίσως είναι η εξήγηση της παρατήρησης ότι η β-κυκλοδεξτρίνη είναι λιγότερο διαλυτή στο νερό σε σχέση με τις δύο άλλες κυκλοδεξτρίνες. Η «ζώνη» των δεσμών υδρογόνου είναι ημισχηματισμένη στην α-κυκλοδεξτρίνη, διότι μία μονάδα γλυκοπυρανόζης βρίσκεται σε διαστρεβλωμένη θέση. Συνεπώς, σχηματίζονται μόνο τέσσερις δεσμοί υδρογόνου, και όχι έξι όπως θα ήταν αναμενόμενο. Όσον αφορά τη γ-κυκλοδεξτρίνη, έχει μία πιο ευλύγιστη, μη ομοεπίπεδη δομή, καθιστώντας την, την

πιο ευδιάλυτη στο νερό κυκλοδεξτρίνη. Από την πλευρά όπου βρίσκονται τα δευτεροταγή υδροξύλια των C2 και C3, η διάμετρος της κοιλότητας είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τη διάμετρο της κοιλότητας από την πλευρά των πρωτοταγών υδροξυλίων του C6 (Astray et al., 2009).



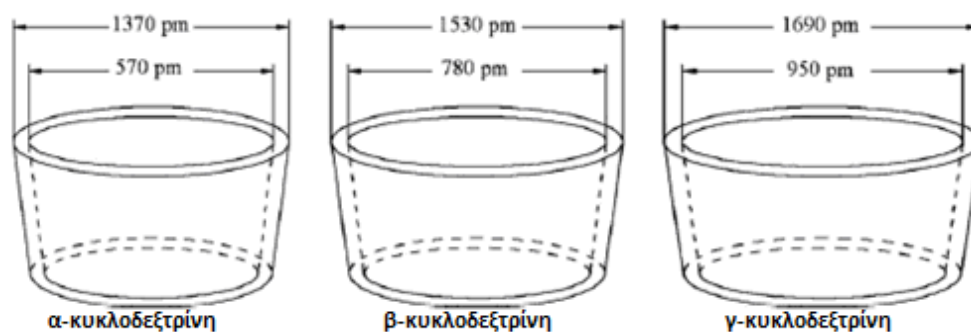
Σχήμα 1.6: Σχηματική απεικόνιση του α -(1-4) γλυκοζιτικού δεσμού (Astray et al., 2009)



Σχήμα 1.7: Σχηματική απεικόνιση των κυκλοδεξτρινών (Astray et al., 2009)

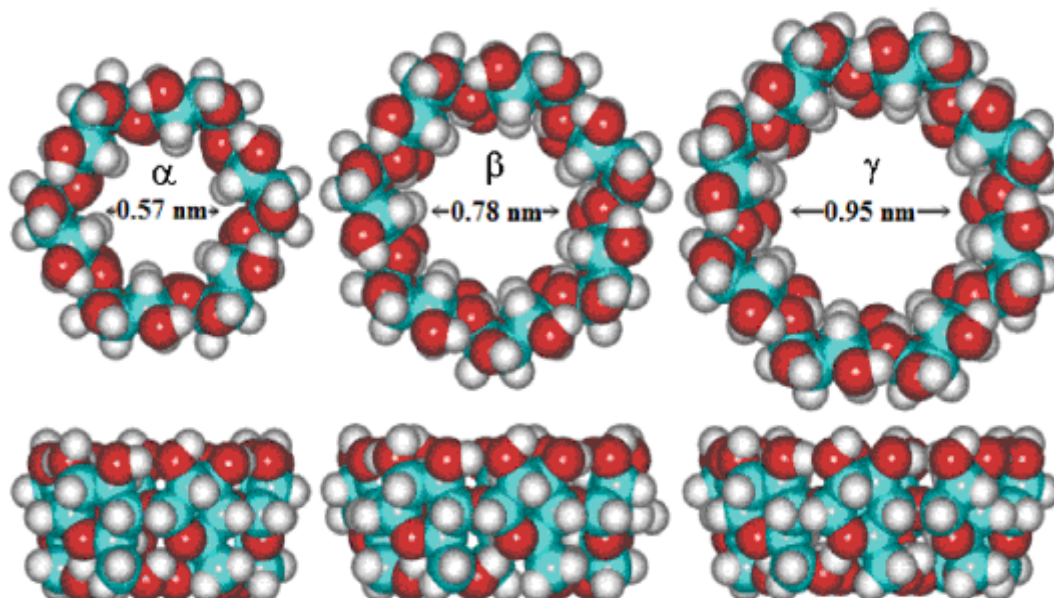
Κάθε κυκλοδεξτρίνη έχει μία υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και μία υδρόφοβη κεντρική κοιλότητα (Hsu et al. 2013). Η κοιλότητα που σχηματίζεται παίζει τον καθοριστικό ρόλο στον εγκλεισμό των πυρηνικών υλικών. Η εσωτερική κοιλότητα είναι υδρόφοβη διότι τα άτομα H3, H5 και H6 έχουν κατεύθυνση προς το εσωτερικό της κοιλότητας (Seridi and Boufelfel, 2013). Εξαιτίας, λοιπόν, της χωροταξικής διεύθετης των μορίων των κυκλοδεξτρινών, η κοιλότητα είναι σχετικά υδρόφοβη, ενώ η εξωτερική επιφάνειά τους είναι σχετικά υδρόφιλη. Η διάμετρος της κοιλότητας της α -κυκλοδεξτρίνης είναι 570 pm, της β -κυκλοδεξτρίνης είναι 780 pm και της γ -κυκλοδεξτρίνης είναι 950 pm, ενώ η συνολική διάμετρος είναι 1370 pm, 1530 pm και 1690 pm αντιστοίχως. Το ύψος των κυκλοδεξτρινών έχει υπολογιστεί στα 790 nm (Valente et al., 2005). Ως εκ τούτου, είναι δυνατό να σχηματιστούν σύμπλοκα εγκλεισμού με ουσίες με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (π.χ. πολυφαινολικά

συστατικά), βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο τη διαλυτότητά τους (Buschmann et al., 2002).



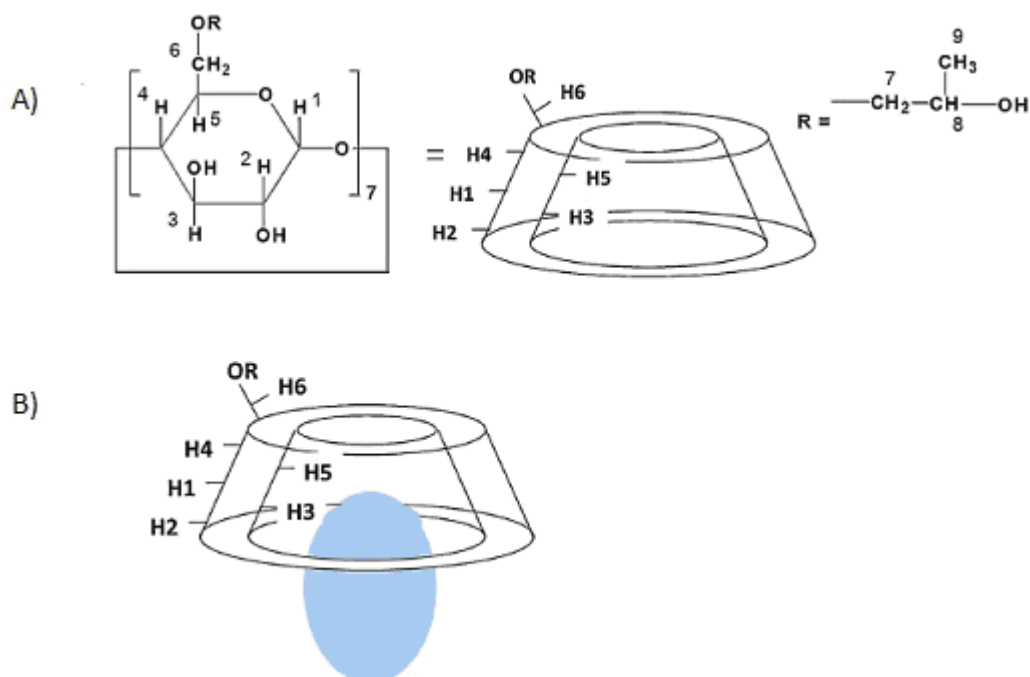
Σχήμα 1.8: Σχηματική απεικόνιση των διαστάσεων των κυκλοδεξτρινών (Astray et al., 2009)

Μία συγκριτική ανάλυση ανάμεσα στις 30 πιο γνωστές και συχνά χρησιμοποιούμενες κυκλοδεξτρίνες, έδειξε ότι η β-κυκλοδεξτρίνη είναι αυτή που χρησιμοποιείται πιο συχνά, κυρίως στη βιομηχανία φαρμάκων. Η αιτία της συχνής χρήσης της β-κυκλοδεξτρίνης έγκειται στο γεγονός ότι παρασκευάζεται εύκολα και, συνεπώς, έχει χαμηλότερη τιμή (5 USD/Kg) (Kurkov and Loftsson, 2013). Πέραν του χαμηλότερου κόστους, το μέγεθος της κοιλότητας της β-κυκλοδεξτρίνης επιτρέπει τον εγκλεισμό συνηθισμένων μορίων με μοριακό βάρος που κυμαίνεται ανάμεσα στα 200 και 800 g/mol (Haiyee et al., 2009). Ωστόσο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η χαμηλή διαλυτότητά της στο νερό αποτελεί ένα βασικό μειονέκτημα της χρήσης της.



Σχήμα 1.9: Τρισδιάστατη απεικόνιση των κυκλοδεξτρινών (Stalin et al., 2014)

Τα τελευταία χρόνια οι φυσικοχημικές ιδιότητες, άρα και η ικανότητα εγκλεισμού μορίων των κυκλοδεξτρινών, έχει βελτιωθεί με χημική τροποποίηση των ομάδων υδροξυλίων. Κάθε ομάδα γλυκοπυρανόζης έχει τρία ελεύθερα υδροξύλια, τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλα μόρια. Στην περίπτωση της β-κυκλοδεξτρίνης υπάρχουν συνολικά 21 ελεύθερα υδροξύλια, τα οποία μπορούν να αντικατασταθούν χημικώς ή ενζυμικώς. Τα παράγωγα της β-κυκλοδεξτρίνης κατηγοριοποιούνται βάσει της αλληλεπίδρασης τους με τα μόρια του νερού, σε υδρόφοβα, υδρόφιλα και ιονιζόμενα. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα παράγωγα τα οποία έχουν καλύτερη διαλυτότητα στο νερό και είναι κατάλληλα για εγκλεισμό μορίων με χαμηλή διαλυτότητα (Pinho et al., 2014). Χαρακτηριστικό παράδειγμα της κατηγορίας αυτής είναι η 2-υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD), η οποία προκύπτει έπειτα από προσθήκη υδροξυ-προπυλομάδας στη β-κυκλοδεξτρίνη. Η 2-υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη χρησιμοποιείται ευρέως με σκοπό να αυξήσει τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των εγκλεισμένων μορίων, με παράλληλη αυξημένη διαλυτότητα στο νερό και χαμηλότερη τοξικότητα εν συγκρίσει με τη β-κυκλοδεξτρίνη (Hsu et al., 2013). Είναι αξιοσημείωτο ότι η αρχικά χαμηλή διαλυτότητα της β-κυκλοδεξτρίνης (18,5 mg/mL στους 25°C) υπερπολλαπλασιάζεται στην περίπτωση της χημικώς τροποποιημένης HP-β-CD (>600 mg/mL στους 25°C) (Berbicz et al., 2011).



Σχήμα 1.10: A) Δομή 2-υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης, B) Σύμπλοκο εγκλεισμού με 2-υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Hsu et al., 2013)

Η πέψη των γραμμικών δεξτρινών μετά από λήψη από του στόματος πραγματοποιείται μέσω της ενζυμικής υδρόλυσής τους προς γλυκόζη. Αν και η αμυλάση της σιέλου διασπά γρήγορα τις γραμμικές δεξτρίνες, η γρήγορη διέλευσής της προς τον στομάχο, απενεργοποιεί τη δράση της λόγω της παρουσίας των γαστρικών οξέων. Στον στομάχο πραγματοποιείται μερική μη-ενζυμική υδρόλυση από τα γαστρικά οξέα, η οποία ωστόσο διασπά μόνο ένα μικρό ποσοστό των δεξτρινών. Στη συνέχεια, μεταφέρεται στο λεπτό έντερο, όπου υφίσταται υδρόλυση από την παγκρεατική α-αμυλάση. Τέλος, τα υπολείμματα των δεξτρινών τα οποία δεν υδρολύθηκαν πλήρως, μεταβολίζονται από τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας του κατώτερου πεπτικού συστήματος (Kurkov and Loftsson, 2013).

	αCD	βCD	γCD	
Στόμα	↓	↓	↓	α-αμυλάση
Οισοφάγος, Στόμαχος	↓	↓	↓	
Λεπτό έντερο	↓	↓	↓	Γραμμικά ολιγομερή Γλυκόζη Μαλτόζη α-αμυλάση και βακτηριακή αποικοδόμηση
Τυφλό έντερο	↓	↓	↓	βακτηριακή αποικοδόμηση
Παχύ έντερο	↓	↓	↓	βακτηριακή αποικοδόμηση
	CO ₂ H ₂ CH ₄	CO ₂ H ₂ CH ₄	CO ₂ H ₂ CH ₄	παραγόμενα άερια
Μη μεταβολισμένη κυκλοδεξτρίνη στα κόπρανα	0.3%	> 4%	0% (ακόμη και σε υψηλές δόσεις)	
Βιοδιαθεσιμότητα	2 με 3%	περίπου 0.3%	< 0.1%	

Σχήμα 1.11: Σχηματική παρουσίαση της πέψης της α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνης μετά από λήψη από του στόματος (Kurkov and Loftsson, 2013)

Οι κυκλικές, όμως, δεξτρίνες παρουσιάζουν διαφορές στην πέψη τους, κυρίως εξαιτίας της κυκλικής δομής τους, η οποία τις καθιστά πιο ανθεκτικές στην ενζυμική και μη-ενζυμική υδρόλυση. Οι κυκλοδεξτρίνες μεταβολίζονται πιο αργά από την α-αμυλάση, ενώ ο ρυθμός υδρόλυσης εξαρτάται από το μέγεθος του δακτυλίου και το

ποσοστό των ελεύθερων μορίων κυκλοδεξτρίνης. Ο μηχανισμός ο οποίος καθιστά τις συμπλοκοποιημένες κυκλοδεξτρίνες πιο ανθεκτικές περιλαμβάνει τον «εγκλωβισμό» των γλυκοζιτικών δεσμών στην κοιλότητά τους, παρέχοντάς τους με αυτόν τον τρόπο προστασία από τα ένζυμα. Ως αποτέλεσμα, οι ελεύθερες κυκλοδεξτρίνες μεταβολίζονται πιο εύκολα, σε σχέση με τη συμπλοκοποιημένη κυκλοδεξτρίνη. Επιπλέον, ο ρυθμός υδρόλυσης αυξάνει με αύξηση του μεγέθους της κοιλότητας των κυκλοδεξτρινών. Τέλος, όπως έχει ήδη αναφερθεί οι κυκλοδεξτρίνες αποτελούν υπόστρωμα για την εντερική μικροχλωρίδα. Ενώ η γ-κυκλοδεξτρίνη μεταβολίζεται εξ ολοκλήρου στο λεπτό έντερο, η α-κυκλοδεξτρίνη και η β-κυκλοδεξτρίνη πέπτονται κυρίως από τα βακτήρια του παχέος εντέρου (Kurkov and Loftsson, 2013).

Κατά τη χορήγηση κυκλοδεξτρινών από το στόματος, μόνο ένα μικρό ποσοστό απορροφάται ακέραιο από τον γαστρεντερικό αυλό, λόγω του μεγάλου μεγέθους τους και του υδρόφιλου χαρακτήρα τους. Οι απορροφώμενες κυκλοδεξτρίνες απεκκρίνονται στα ούρα χωρίς να έχουν υποστεί σημαντικό μεταβολισμό (Stella and He, 2008).

Πίνακας 1.2: Απορρόφηση κυκλοδεξτρινών και παραγώγων τους έπειτα από χορήγηση από το στόμα σε μύες (Stella and He, 2008)

Κυκλοδεξτρίνες	Δόση (mg/Kg)	Απορρόφηση (% της δόσης)
α-κυκλοδεξτρίνη	200	1
β-κυκλοδεξτρίνη	500	0,6
γ-κυκλοδεξτρίνη	1000	0,02
HP-β-CD	40	3

Σε ανθρώπους, έχει βρεθεί πως η βιοδιαθεσιμότητα της 2-υδρόξυ-πρόπυλο β-κυκλοδεξτρίνης κυμαίνεται στο 1%, μετά από λήψη από το στόμα. Γενικά, οι κυκλοδεξτρίνες παρουσιάζουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και περιορισμένη διασπορά στα όργανα του σώματος, ενώ παράλληλα απεκκρίνονται στα ούρα σχετικά γρήγορα και μη μεταβολισμένες. Οι κύριες επιδράσεις στον γαστρεντερικό σύστημα μετά από στοματική χορήγηση κυκλοδεξτρινών σε ζώα είναι η μαλακότερη υφή κοπράνων ή η διάρροια και ο μετεωρισμός, κυρίως λόγω της συμπεριφοράς των κυκλοδεξτρινών ως άπεπτοι υδατάνθρακες. Είναι αποδεκτό ότι η διάρροια και ο μετεωρισμός που

παρατηρούνται σε ζωικά μοντέλα μετά από χορήγηση κυκλοδεξτρινών, αντιπροσωπεύουν φυσιολογικές αποκρίσεις σε μεγάλο φορτίο άπεπτων υδατανθράκων και υψηλής οσμωτικότητας συστατικών της διατροφής. Ωστόσο, η ομοιότητα με τους ανθρώπους είναι περιορισμένη (Stella and He, 2008).

Έρευνες σε ζώα δεν έδειξαν εμβρυοτοξική επίδραση της α-κυκλοδεξτρίνης και της γ-κυκλοδεξτρίνης, ενώ ποσότητες διπλάσιες από τις επιτρεπόμενες για β-κυκλοδεξτρίνη προκάλεσαν καθυστέρηση της ανάπτυξης σε νεογνά. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στις επιτρεπόμενες δόσεις. Επιπλέον, μελέτες της α-, β-, γ- και υδρόξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης δεν έδειξαν καμία νεοπλασματική αλλοίωση σε ζωικά μοντέλα, έπειτα από χορήγηση από του στόματος. Τέλος, μια διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη, κλινική μελέτη με 24 συμμετέχοντες έδειξε ότι η λήψη 8 g γ-κυκλοδεξτρίνης είναι ανεκτή από τους συμμετέχοντες (Stella and He, 2008).

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται τόσο στη φαρμακοβιομηχανία όσο και στη βιομηχανία τροφίμων με στόχο τη βελτίωση της διαλυτότητας δυσδιάλυτων ουσιών, της σταθερότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των βιοδραστικών μορίων. Επιπλέον, οι κυκλοδεξτρίνες προστατεύουν τα βιοδραστικά μόρια από τις αρνητικές επιπτώσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως η θερμοκρασία, το φως και το pH, επιμηκύνοντας το χρόνο ζωής του προϊόντος (Nguyen et al., 2013). Τέλος, ο εγκλεισμός των μορίων στην κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών έχει ως αποτέλεσμα τον έλεγχο της πτητικότητας των εγκλειόμενων μορίων, την κάλυψη δυσάρεστων γεύσεων και οσμών και την ελεγχόμενη απελευθέρωση των βιοδραστικών μορίων (Nieddu et al., 2014).

Η χρήση των κυκλοδεξτρινών στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων αυξάνεται συνεχώς, ενώ υπάρχουν καθορισμένοι κανονισμοί για τη χρήση τους στις διάφορες χώρες. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, η α-κυκλοδεξτρίνη, β-κυκλοδεξτρίνη και η γ-κυκλοδεξτρίνη ανήκουν στην εγκεκριμένη λίστα με τα «γενικά αποδεκτά ως ασφαλή» (GRAS, Generally Recognized As Safe) πρόσθετα τροφίμων. Στην Ιαπωνία, οι παραπάνω κυκλοδεξτρίνες θεωρούνται φυσικά προϊόντα και ο μόνος περιορισμός κατά το εμπόριό τους στον τομέα των τροφίμων είναι η καθαρότητά τους (Astray, et al., 2009).

Πίνακας 1.3: Μέγιστη επιτρεπόμενη ποσότητα α-CD ανά κατηγορία τροφίμων (GRAS Notice No. GRN 000155, 2004)

Κατηγορία τροφίμων	Μέγιστη επιτρεπτή ποσότητα α-CD
Ψωμί, κέικ, μίγματα ψησίματος, dressings, μαγιονέζα	5%
Brownies	7%
Κράκερς (γλυκά ή αλμυρά), τσίχλες	10%
Σνακς, ξηρά μίγματα για πουτίγκα, αναψυκτικά, μίγματα ροφημάτων, χυμοί φρούτων, στιγμιαίος καφές και τσάι, υποκατάστατα κρέατος, διατροφικά συμπληρώματα,	1%
Ζωμοί λαχανικών, γάλα σόγιας, στιγμιαίο ρύζι, ζυμαρικά , κονσερβοποιημένες και ξηρές σούπες	2%
Δημητριακά πρωινού	2-9%*
Καρυκεύματα	3%
Γιαούρτι, μίγματα ροφημάτων γάλακτος, επιδόρπια παγωμένου γιαουρτιού	2,5%
Αλείμματα με χαμηλά λιπαρά	20%
Καραμέλες	15%

*Η επιτρεπόμενη ποσότητα διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος της μερίδας (<20 g/φλιτζάνι, 2% `20-43 g/φλιτζάνι 9%- >43 g/φλιτζάνι, 5%)

Πίνακας 1.4: Μέγιστη επιτρεπόμενη ποσότητα β-CD ανά κατηγορία τροφίμων (GRAS Notice No. GRN 000074, 2001)

Κατηγορίες τροφίμων	Μέγιστη επιτρεπτή ποσότητα β-CD
Ψημένα προϊόντα παρασκευασμένα με ξηρά μίγματα	2%
Δημητριακά πρωινού	2%
Τσίχλες	2%
Ξηρά μίγματα για σούπες	0,2%
Αρωματισμένος καφές και τσάι	1%

Καραμέλες	2%
Επεξεργασμένα προϊόντα τυριού	1%
Αρωματισμένα σνακς και κράκερς	0,5%
Ξηρά μίγματα για ροφήματα	1%

Πίνακας 1.5: Μέγιστη επιτρεπόμενη ποσότητα γ-CD ανά κατηγορία τροφίμων (GRAS Notice No. GRN 000046, 2000)

Κατηγορία τροφίμων	Μέγιστη επιτρεπτή ποσότητα γ-CD
Ξηρά μίγματα για ροφήματα	1%
Ξηρά μίγματα για σούπες	1%
Ξηρά μίγματα για dressings και σως	1%
Ξηρά μίγματα για πουτίγκες και γεμίσεις	1%
Στιγμιαίος καφές και τσάι	1%
Καραμέλες, τσίχλες, δημητριακά πρωινού	1%
Σνακς και κράκερς	1%
Μπαχαρικά	1%
Για μεταφορά βιταμινών σε μίγματα ξηρών τροφίμων και διατροφικών συμπληρωμάτων	90%
Για μεταφορά PUFAs σε μίγματα ξηρών τροφίμων και διατροφικών συμπληρωμάτων	80%
Για τροποποίηση γεύσης σε γάλα σόγιας	2%
Αλείμματα ψωμιού (με λίπος)	20%
Επιδόρπια παγωμένου γιαουρτιού	3%
Αρτοσκευάσματα	2%
Ψωμί	1%
Γέμιση με φρούτα	3%
Τυρί, Επιδόρπια γιαουρτιού	3%

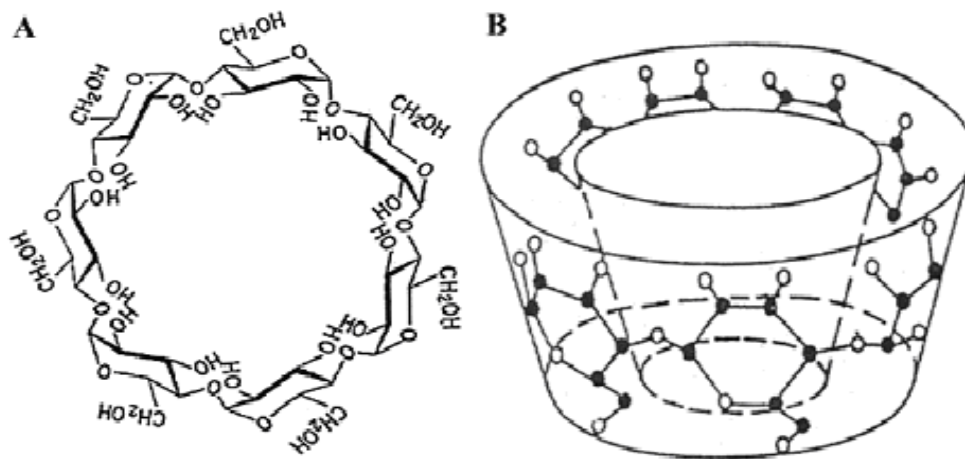
Η σύσταση της επιτροπής του Οργανισμού τροφίμων και Γεωργίας και του Παγκόσμιου οργανισμού Υγείας, στον Codex Alimentarius, για τη μέγιστη επιτρεπτή

πρόσληψη (ADI, acceptable dietary intake) β-κυκλοδεξτρίνης έχει καθοριστεί στα 5 mg/Kg σωματικού βάρους. Επιπλέον, η μέγιστη ποσότητα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κατηγορία τροφίμων των σνακς είναι 500 mg/Kg προϊόντος. Δεν έχουν καθοριστεί αντίστοιχα επίπεδα για την α- και γ-κυκλοδεξτρίνη (Marques, 2010). Επιπλέον, η υδροξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη χαρακτηρίζεται ως ανενεργό φαρμακευτικό συστατικό από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Kurkov and Loftsson, 2013).

1.2.9.1.1 Σύμπλοκα εγκλεισμού με β-κυκλοδεξτρίνη

Η δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού, γενικώς, αναφέρεται στην ενθυλάκωση ενός υποστρώματος (πυρηνικό υλικό) σε έναν υποκαταστάτη (εξωτερικό κάλυμμα) που φέρει κοιλότητα, μέσω μιας υπερμοριακής σύνδεσης εξαιτίας ποικίλων αλληλεπιδράσεων (Ezhilarasi et al., 2013).

Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χαρακτηριστούν ως «άδειες κάψουλες» δεδομένου μοριακού μεγέθους που μπορούν να εγκλείσουν στην κοιλότητά τους συγκεκριμένου μεγέθους και γεωμετρίας μόρια. Σε αυτήν την περίπτωση, οι κυκλοδεξτρίνες καλούνται «ξενιστές» (host) ενώ τα εγκλεισμένα μόρια, ξενιζόμενα μόρια (guests) (Astray et al., 2009).

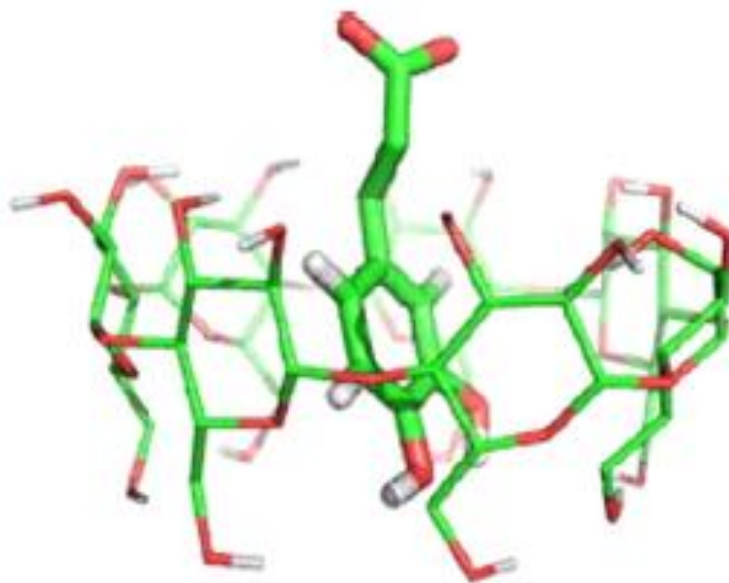


Σχήμα 1.13: Σχηματική απεικόνιση: A) χημική δομή της β-κυκλοδεξτρίνης B) τρισδιάστατη δομή της β-κυκλοδεξτρίνης (Mura, 2014)

Όσον αφορά τη β-κυκλοδεξτρίνη, η κοιλότητα της είναι κατειλημμένη από μόρια νερού, είτε βρίσκεται στην κρυσταλλική της μορφή είτε βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα. Είναι εύλογο ότι η παρατηρούμενη μη πολική-πολική αλληλεπίδραση

ανάμεσα στα πολικά μόρια του νερού και την άπολη εσωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης οδηγεί σε μία ανεπιθύμητη ενεργειακά κατάσταση. Για αυτόν τον λόγο, λοιπόν, τα μόρια του νερού εντός της κοιλότητας μπορούν εύκολα να αντικατασταθούν από λιγότερο πολικά ξενιζόμενα μόρια, τα οποία ταιριάζουν γεωμετρικώς εντός της κοιλότητας. Η β-κυκλοδεξτρίνη είναι το μόριο ξενιστής και μία σημαντική συνιστώσα της κινητήριου δύναμης του σχηματισμού του συμπλόκου εγκλεισμού είναι η αντικατάσταση των μορίων νερού με υψηλή ενθαλπία, με τα ξενιζόμενα μόρια. Ένα μόριο β-κυκλοδεξτρίνης δύναται να συμπεριλάβει στην κοιλότητά του παραπάνω από ένα ξενιζόμενα μόρια, ενώ ένα ξενιζόμενο μόριο μπορεί να εγκλειστεί σε μία, δύο ή τρεις β-κυκλοδεξτρίνες. Η πιο συχνά αναφερόμενη αναλογία ξενιστή:ξενιζόμενου μορίου είναι η αναλογία 1:1, η οποία αποτυπώνει καλύτερα την έννοια του μοριακού εγκλεισμού (Szejtli and Szente, 2005).

Ο σχηματισμός του συμπλόκου εγκλεισμού ανάμεσα στη β-κυκλοδεξτρίνη και το υδρόφοβο μόριο πραγματοποιείται λόγω δεσμών Υδρογόνου, στερεοχημικής εμπόδισης, μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, όπως οι δυνάμεις van der Waals, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις μεταφοράς φορτίου. Ο σχηματισμός των συμπλόκων αυτών καθιστά εφικτό τον έλεγχο της «συναρμολόγησης» και «αποσυναρμολόγησης» της υπερμοριακής δομής, ρυθμίζοντας την αμφιφιλικότητα των ξενιζόμενων μορίων. Ένας άλλος παράγοντας, ο οποίος πιθανόν να επηρεάζει τον σχηματισμό των συμπλόκων εγκλεισμού είναι ο βαθμός αυτό-συσσωμάτωσης των μορίων β-κυκλοδεξτρίνης στα υδατικά διαλύματα. Ωστόσο, είναι ασαφές το τμήμα του μορίου των β-κυκλοδεξτρινών που λαμβάνουν μέρος στη συσσωμάτωση (Valente and Söderman, 2014). Οι δεσμοί που σχηματίζονται ανάμεσα στα ξενιζόμενα μόρια και στη β-κυκλοδεξτρίνη δεν είναι σταθεροί και μόνιμοι, αλλά είναι μία δυναμική ισορροπία. Η ισχύς των σχηματιζόμενων συνδετικών δυνάμεων εξαρτάται από το πόσο καλά η β-κυκλοδεξτρίνη και το ξενιζόμενο μόριο ταιριάζουν μεταξύ τους και από τις τοπικές αλληλεπιδράσεις του σχηματιζόμενου συμπλόκου (Del Valle , 2004). Τέλος, θερμοδυναμικοί παράμετροι, όπως η ενθαλπία, η εντροπία και η ελεύθερη ενέργεια (κατά Gibbs), πρέπει να θεωρούνται εξίσου σημαντικοί στη διαδικασία της συμπλοκοποίησης, καθώς η θερμοκρασία επηρεάζει την ευαισθησία της δεσμευτικότητας ανάμεσα στη β-κυκλοδεξτρίνη και στο προς ενθυλάκωση μόριο (Pinho et al., 2014) .

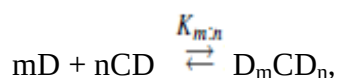


Σχήμα 1.14: Τριδιάστατη απεικόνιση συμπλόκου εγκλεισμού β-CD και καφεϊκού οξέος (Pinho et al., 2014)

Γενικώς, υπάρχουν τέσσερις ενεργειακά επιθυμητές αλληλεπιδράσεις οι οποίες μετακινούν την ισορροπία προς τον σχηματισμό του συμπλόκου εγκλεισμού:

- η εκτόπιση των πολικών μορίων νερού από την μη πολική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης
- ο αυξημένος αριθμός των δεσμών Υδρογόνου που δημιουργούνται, όταν τα εκτοπισμένα μόρια νερού επιστρέψουν στο νερό
- η μείωση των απωθητικών δυνάμεων ανάμεσα στα υδρόφοβα ξενιζόμενα μόρια και το υδατικό περιβάλλον
- η αύξηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, αφότου το υδρόφοβο ξενιζόμενο μόριο εισέλθει στην άπολη κοιλότητα (Del Valle, 2004).

Ο σχηματισμός του συμπλόκου εγκλεισμού (D_mCD_n) είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία, η ισορροπία της οποίας περιγράφεται με την ακόλουθη αντίδραση:



όπου m μόρια του ξενιζόμενου μορίου συνδέονται με n μόρια κυκλοδεξτρινών ώστε να σχηματίσουν σύμπλοκο εγκλεισμού (D_mCD_n) στοιχειομετρίας $m:n$. $K_{m:n}$ είναι η σταθερά της αντίδρασης, η οποία καλείται και ως σταθερά σύνδεσης ή σταθερά σχηματισμού.

Η σταθερά της αντίδρασης μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση (Kurkov and Loftsson, 2013):

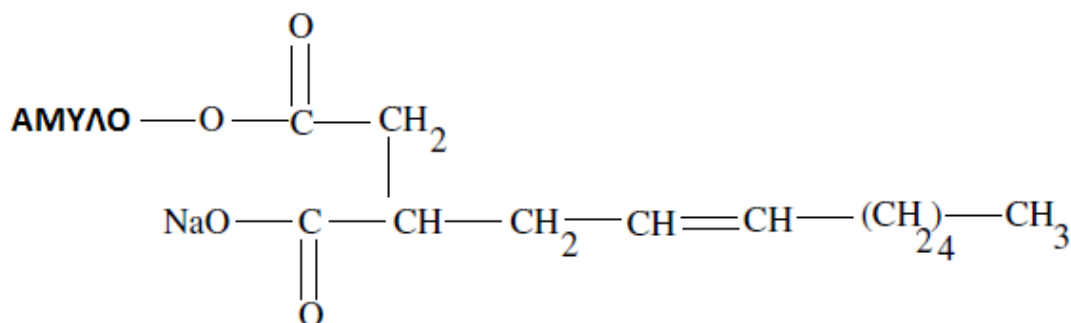
$$K_{m:n} = [D_m CD_n] / [D]^m [CD]^n$$

Ο υπολογισμός της σταθεράς της αντίδρασης είναι πολύ σημαντικός, καθώς αποτελεί δείκτη των αλλαγών των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, όπου υφίσταται το υπό εγκλεισμό μόριο. Οι περισσότερες μέθοδοι της εκτίμησης της σταθεράς K βασίζονται σε τιτλοδοτούμενες αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες του ξενιζόμενου μορίου, όπως η διαλυτότητα, η χημική αντιδραστικότητα και η μοριακή απορροφητικότητα (Del Valle, 2004).

Αφού έχει σχηματιστεί το σύμπλοκο εγκλεισμού και βρίσκεται στη στερεή κατάσταση, είναι ιδιαίτερα σταθερό, με επιμηκυμένη διάρκεια ζωής. Η αποσυμπλοκοποίηση απαιτεί είτε την παροχή θερμότητας, είτε την περίσσεια νερού, ώστε να αντιστραφεί η θερμοδυναμική ισορροπία (Del Valle, 2009).

1.2.9.2 Εγκλεισμός σε τροποποιημένο άμυλο

Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο μέσο εγκλεισμού στη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί το οκτενυλο-ηλεκτρικό τροποποιημένο άμυλο. Η τροποποίηση του αμύλου έγκειται στην προσθήκη μιας λιπόφιλης ομάδας στην αλυσίδα του αμύλου. Η προσθήκη, λοιπόν, της οκτενυλο-ηλεκτρικής ομάδας τροποποιεί τον υδρόφιλο χαρακτήρα του αμύλου και αυξάνει τη γαλακτωματοποιητική ικανότητά του. Η αύξηση του υδρόφοβου χαρακτήρα του αμύλου καθιστά το τροποποιημένο άμυλο ιδανικό για τη συγκράτηση των πτητικών συστατικών κατά την ξήρανση με ψεκασμό (Fernandes et al., 2014).



Σχήμα 1.15: Σχηματική απεικόνιση του οκτενυλο-ηλεκτρικού τροποποιημένου αμύλου (Bhosale et al., 2006)

Η χρήση του οκτενυλο-ηλεκτρικού τροποποιημένου άμυλου στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο τροφίμων είναι εγκεκριμένη από τον Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA), με την προϋπόθεση η συγκέντρωσή του να μην ξεπερνά το 3% (Borrmann et al., 2013). Επίσης, η χρήση του οκτενυλο-ηλεκτρικού τροποποιημένου άμυλου εγκρίθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση προς χρήση σε παιδικές φόρμουλες και παιδικές τροφές μετά του απογαλακτισμού (Barroso et al., 2013).

Το τροποποιημένο άμυλο ανήκει στην κατηγορία του ανθεκτικού αμύλου, δηλαδή είναι ανθεκτικό στην ενζυμική υδρόλυση του πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο κατά την πέψη του, και μεταβολίζεται από την εντερική μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Ai et al., 2013). Επιπλέον, οι He et al. (2008) έδειξαν ότι η κατανάλωση του τροποποιημένου αμύλου από υγιείς εθελοντές οδήγησε σε καθυστερημένη μεταγευματική γλυκαιμική απόκριση και σε σημαντική μείωση (32,2%) της μέγιστης τιμής γλυκόζης αίματος μεταγευματικά, εν συγκρίσει με το μη-τροποποιημένο άμυλο. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη της βραδείας απορρόφησής του από τον ανθρώπινο οργανισμό.

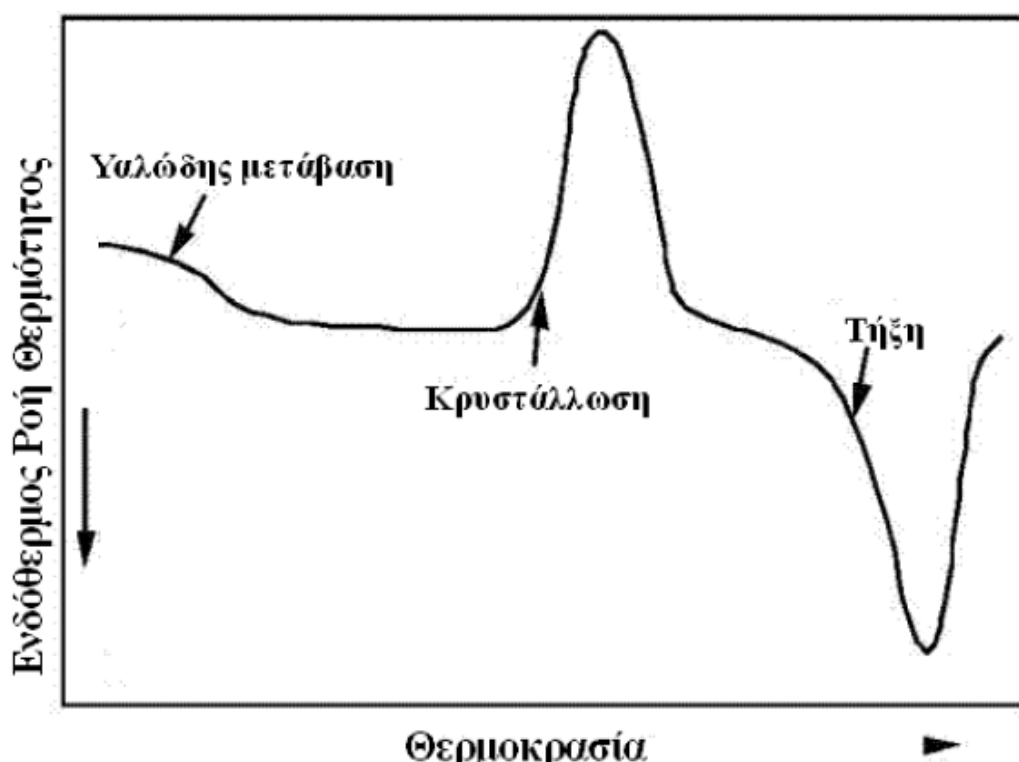
1.3 Μέθοδοι μελέτης ενθυλάκωσης

Η αξιολόγηση του σχηματισμού των συμπλόκων εγκλεισμού και ο πλήρης χαρακτηρισμός τους είναι ιδιαίτερα δύσκολο εγχείρημα. Διάφορες μέθοδοι και τεχνικές έχουν αναπτυχθεί προς αυτή την κατεύθυνση, με σημαντικότερες τις φασματοσκοπικές τεχνικές (π.χ. φασματομετρία UV-VIS, φασματομετρία φθορισμού, φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού), τις ηλεκτροανλυτικές τεχνικές (π.χ. πολαρογραφία, βολταμετρικές τεχνικές, ποτενσιομετρία, αγωγιμετρία) και τις αναλυτικές τεχνικές (π.χ. HPLC, ηλεκτροφόρηση υγρής φάσης) (Mura, 2014).

Μια ιδιαίτερα δημοφιλής και ευρέως διαδεδομένη μέθοδος μελέτης των συμπλόκων εγκλεισμού είναι η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Calorimetry Scanning, DSC). Η μέθοδος DSC είναι εργαλείο πρώτης επιλογής για τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των συμπλόκων εγκλεισμού, όταν αυτά βρίσκονται στη στερεή τους κατάσταση και χρησιμοποιείται ως μέθοδος ρουτίνας για τη γρήγορη πρωταρχική ποιοτική διερεύνησή τους (Giordano et al., 2001).

Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος DSC έχει τη δυνατότητα να μελετά τις μεταβολές της ενθαλπίας που πραγματοποιούνται στο υπό εξέταση δείγμα, όταν αυτό θερμαίνεται ή ψύχεται με προκαθορισμένο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Επιπλέον, δίνει τη δυνατότητα μελέτης εξώθερμων ή ενδόθερμων φαινομένων, όπως η τήξη, η κρυστάλλωση, η εξάχνωση, η υαλώδης μετάπτωση κ.ά. (Roos, 1995).

Μια τυπική καμπύλη της DSC απεικονίζει τη διαφορική ροή της θερμότητας στο υπό εξέταση δείγμα (dH/dt ή mJ/s ή $mcal/s$) ως προς τη θερμοκρασία (T) ή τον χρόνο (t). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι κύριες μεταβολές που μπορούν να μελετηθούν με τη μέθοδο DSC.



Σχήμα 1.16: Κύριες παρατηρηθείσες μεταβολές με τη χρήση της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Clas et al., 1999)

Μία τυπική διάταξη DSC αποτελείται από τα παρακάτω:

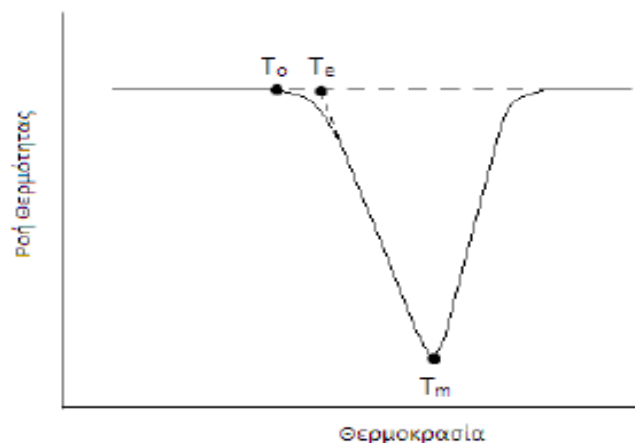
- Δύο υποδοχείς. Σε αυτούς τους υποδοχείς τοποθετούνται το υπό εξέταση δείγμα και το δείγμα αναφοράς. Μικρή ποσότητα (3 - 10 mg) από κάθε δείγμα τοποθετείται σε ειδικό καψίδιο αλουμινίου, το οποίο ανάλογα με το σκοπό της μελέτης είτε παραμένει ανοιχτό, είτε κλείνεται ερμητικά, είτε έχει μια μικρή οπή στο άνω μέρος. Τα μεταλλικά καψίδια έχουν καλή θερμική αγωγιμότητα και εξυπηρετούν στην ομοιόμορφη κατανομή της θερμότητας σε όλο το δείγμα. Η

θερμότητα από τον κλίβανο παρέχεται εξίσου και με τον ίδιο ρυθμό και στους δύο υποδοχείς.

- Κλίβανος. Ο κλίβανος είναι μικρός σε μάζα και όγκο και πρέπει να παρέχει ομοιόμορφη θέρμανση με γραμμικό ρυθμό. Επιπλέον, ο σχεδιασμός του δεν επιτρέπει αλληλεπιδράσεις με το υπό εξέταση δείγμα.
- Σύστημα ψύξης. Το σύστημα καθιστά δυνατή την επίτευξη θερμοκρασιών, χαμηλότερων από τη θερμοκρασία δωματίου.
- Φιάλες παροχής αερίων. Τα αέρια (άζωτο ή οξυγόνο) παρέχονται με ρυθμιζόμενη ροή.
- Λογισμικό. Μέσω του ειδικού λογισμικού καθορίζονται εκ των προτέρων οι επιθυμητές συνθήκες θέρμανσης/ψύξης που θα επικρατούν στον κλίβανο.
- Καταγραφικό σύστημα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καταγράφεται το θερμογράφημα DSC, από το οποίο προκύπτουν τα συμπεράσματα της μελέτης των δειγμάτων (Μουρτζίνος, 2007).

Δύο πολύ βασικές εφαρμογές της DSC είναι ο προσδιορισμός του σημείου τήξεως μίας ουσίας και η μελέτη της σταθερότητάς της στη θέρμανση και υπό οξειδωτικές συνθήκες.

Μέσω του διαγράμματος DSC είναι εφικτός ο προσδιορισμός του σημείου τήξεως μίας ουσίας. Εάν η ουσία που εξετάζεται είναι 100% κρυσταλλική, τότε θα εμφανιστεί στο θερμογράφημα μία οξεία κορυφή. Σε αντίθετη περίπτωση, όπου το δείγμα δεν είναι απόλυτα καθαρό, μπορεί να παρατηρηθεί διεύρυνση της κορυφής καθώς και ελάττωση του σημείου τήξεως. Έτσι, όπως παρατηρείται στο παρακάτω σχήμα, υπάρχουν τρεις αξιοσημείωτες θερμοκρασίες. Η T_0 είναι η θερμοκρασία στην οποία η καμπύλη αρχίζει να αποκλίνει από την αρχική της πορεία. Η T_e είναι το σημείο τομής της προέκτασης της αρχικής πορείας της καμπύλης και της προέκτασης της γραμμής από το σημείο που η καμπύλη φτάνει στο ελάχιστο σημείο, όπως φαίνεται στο σχήμα. Τέλος, η T_m είναι η θερμοκρασία της κορυφής της καμπύλης. Το σημείο τήξεως σύμφωνα με μερίδα των ερευνητών είναι η θερμοκρασία T_e . Ωστόσο, υπάρχουν πολλοί ερευνητές που θεωρούν ότι το σημείο τήξεως είναι η T_m (Μουρτζίνος, 2007).



Σχήμα 1.17: Θερμογράφημα μια ουσίας στο οποίο παρουσιάζονται οι T_o , T_e και T_m (Clas et al., 1999)

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης, σε μη-ισόθερμες συνθήκες ταυτόχρονης παρουσίας οξυγόνου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της πορείας της οξείδωσης διαφόρων ουσιών.

Ως χρόνος επαγωγής ορίζεται το χρονικό διάστημα κατά το οποίο δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στο θερμογράφημα, ή με άλλα λόγια, το χρονικό διάστημα μέχρι να παρουσιαστεί αλλαγή της κλίσης της καμπύλης λόγω εμφάνισης κάποιου εξώθερμου φαινομένου οξείδωσης. Ο χρόνος επαγωγής χρησιμοποιείται αρκετές φορές ως παράμετρος της οξειδωτικής σταθερότητας ελαίων. Άλλη μία σημαντική παράμετρος της μελέτης της οξειδωτικής σταθερότητας αποτελεί η θερμοκρασία έναρξης της οξείδωσης, η οποία αντιστοιχεί στη θερμοκρασία της απότομης αύξησης της κλίσης της εξώθερμης καμπύλης του θερμογραφήματος (Saldaña and Martínez-Monteaudo, 2013).

Η μέθοδος DSC χρησιμοποιείται συχνά για τη μελέτη των συμπλόκων εγκλεισμού. Σε αδρανείς συνθήκες Αζώτου, η επιβεβαίωση του εγκλεισμού των μορίων στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης βασίζεται στην εξαφάνιση της ενδόθερμης καμπύλης του εγκλεισμένου μορίου ή στην αλλαγή της εμφάνισης της τιμής της θερμοκρασίας τήξεως σε υψηλότερες ή χαμηλότερες θερμοκρασίες (Marques et al., 1990). Επιπλέον, η μέθοδος DSC μπορεί να εφαρμοστεί για τη μελέτη της σταθερότητας των σχηματιζόμενων συμπλόκων εγκλεισμού σε συνθήκες οξείδωσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία έναρξης της οξείδωσης, τόσο μεγαλύτερη είναι η οξειδωτική σταθερότητα της ενθυλακωμένης ουσίας, εξαιτίας της προστασίας

έναντι της οξειδωσης που προσφέρει η ενθυλάκωσή της στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης (Clas, 1999).

1.4 «Πράσινη» εκχύλιση

Μελέτες των τελευταίων χρόνων από ερευνητές και ειδικούς επαγγελματίες έδειξαν πως η εκχύλιση των φυσικών προϊόντων έχει μεγαλύτερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο από ότι αρχικώς είχε θεωρηθεί. Υπολογίζεται πως ο βιομηχανικός κύκλος εκχύλισης απαιτεί τουλάχιστον το 50% της δαπανώμενης ενέργειας ολόκληρης της βιομηχανικής διαδικασίας. Στη βιομηχανία τροφίμων, εκτός της πολύ καλά μελετημένης εκχύλισης των ζαχαρότευτλων για την παραγωγή της ζάχαρης ή την παραγωγή ντεκαφεϊνέ καφέ, πληθώρα άλλων μεθόδων έχουν ανακαλυφθεί για την εκχύλιση αρωματικών φυτών και βοτάνων με βιοδραστικά συστατικά. Η σύγχρονη τάση στην έρευνα των τεχνικών εκχύλισης εστιάζει στην εύρεση διαλυμάτων όπου να ελαχιστοποιούν την χρήση ανεπιθύμητων διαλυτών.

Ένας γενικότερος ορισμός της «πράσινης χημείας» περιλαμβάνει την εφεύρεση, το σχεδιασμό και την εφαρμογή χημικών προϊόντων και διεργασιών ώστε να μειωθεί η χρήση επικίνδυνων χημικών ουσιών. Επιπρόσθετα, η «πράσινη εκχύλιση» βασίζεται στην ανακάλυψη και τον σχεδιασμό διεργασιών εκχύλισης, οι οποίες θα μειώσουν την κατανάλωση ενέργειας, θα επιτρέψουν τη χρήση εναλλακτικών διαλυτών και ανανεώσιμων φυσικών προϊόντων και θα αποδώσουν ένα ασφαλές και υψηλής ποιότητας εκχύλισμα.

Μία σημαντική παράμετρος της «πράσινης εκχύλισης» αποτελεί η χρήση εναλλακτικών διαλυτών και κατά κύριο λόγο «πράσινων διαλυτών», οι οποίοι κατά κύριο λόγο βασίζονται στο νερό. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διαλύτες, οι οποίοι προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές όπως το άμυλο, έχουν υψηλή ικανότητα εκχύλισης, είναι βιο-διασπώμενοι, μη τοξικοί και μη εύφλεκτοι. Μία πρόσφατη «πράσινη» ανακάλυψη εκχύλισης με νερό, εμπεριέχει τη χρήση κυκλοδεξτρινών εξαιτίας της ιδιαίτερης ικανότητάς τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού ανάμεσα στην υδρόφοβη κοιλότητά τους και τα βιοδραστικά ξενιζόμενα μόρια. (Chemat et al., 2012)

2.ΣΙΑΕΡΙΤΗΣ

2.1 Βότανα στο πέρασμα του χρόνου

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ως παραδοσιακή ιατρική ορίζεται « η γνώση, οι δεξιότητες και οι πρακτικές που βασίζονται σε θεωρίες, πεποιθήσεις και εμπειρίες γηγενών ανθρώπων από διαφορετικούς πολιτισμούς και χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση της υγείας και την πρόληψη, διάγνωση, βελτίωση και θεραπεία των σωματικών και ψυχικών ασθενειών» (WHO, 2008). Η παραδοσιακή ιατρική, λοιπόν, είναι συνυφασμένη με τον πολιτισμό του κάθε λαού και έχει τις ρίζες της αρκετές χιλιετίες πριν. Ένα πολύ σημαντικό και αναπόσπαστο κομμάτι της παραδοσιακής ιατρικής του κάθε πολιτισμού είναι η χρήση των βοτάνων για την πρόληψη και θεραπεία ασθενειών, γεγονός που αποδεικνύεται από πληθώρα αρχαιολογικών ευρημάτων και ανθρωπολογικές και λαογραφικές παρατηρήσεις. Ενδεικτικά, το 1960 σε μία σπηλιά ενταφιασμού της μέσης Παλαιολιθικής εποχής στο σημερινό βόρειο Ιράκ, κατά τη χημική ανάλυση του χώματος δίπλα στα απολιθωμένα οστά, βρέθηκαν ασυνήθιστα υψηλές ποσότητες γύρης 8 διαφορετικών ειδών φυτών, τα οποία ακόμη και σήμερα χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς. Αυτό υποδηλώνει εμμέσως, ότι 60000 χρόνια πριν, οι άνθρωποι είχαν κατανοήσει και θέσει σε εφαρμογή τη χρήση των βοτάνων για διάφορους σκοπούς στην παραδοσιακή τους ιατρική (Solecki and Shanidar, 1975).

Αν και η παραδοσιακή ιατρική και η χρήση των βοτάνων έχουν κάνει ταξίδι χιλιετιών στο πέρασμα του χρόνου, εξακολουθούν να είναι δυναμικά παρούσες τόσο σε αναπτυσσόμενες χώρες, εξαιτίας του χαμηλού κόστους και της εύκολης διαθεσιμότητας, αλλά και στις αναπτυγμένες χώρες, ως εναλλακτική πρόταση στην κλασσική ιατρική, αλλά και ως πηγή έμπνευσης και καινοτομίας (WHO, 2008). Συγκεκριμένα, η χρήση των βοτάνων και άλλων διατροφικών συμπληρωμάτων κερδίζει συνεχώς όλο και μεγαλύτερο έδαφος στην παγκόσμια αγορά στις χώρες του δυτικού πολιτισμού. Βότανα ορίζονται από το Εθνικό Κέντρο Συμπληρωματικής και Εναλλακτικής Ιατρικής των ΗΠΑ (National Center for Complementary and Alternative Medicine, NCCAM), τα φυτά ή τμήματα των φυτών τα οποία χρησιμοποιούνται για το άρωμά τους, τη γεύση τους ή/και τις θεραπευτικές τους ιδιότητες, και χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά της διατροφής. Σε πολλές χώρες,

το 70-80% του πληθυσμού έχει χρησιμοποιήσει τουλάχιστον μία φορά κάποια μορφή συμπληρωματικής ή εναλλακτικής ιατρικής, με τα βότανα να είναι ιδιαίτερα δημοφιλή (Gardiner et al., 2013). Για παράδειγμα, μόνο το 2001 οι κάτοικοι των ΗΠΑ ξόδεψαν το ποσό των 4,1 δισεκατομμυρίων δολαρίων σε βότανα και άλλες βοτανικές θεραπείες (Kelly et al., 2005), ενώ το 2002 από τα αποτελέσματα της μελέτης NHIS εκτιμήθηκε ότι 1 στους 5 αμερικανούς νέους είχε λάβει κάποιο βότανο ή διατροφικό συμπλήρωμα κατά τη διάρκεια του τελευταίου χρόνου. Τα 10 πιο δημοφιλή βότανα που συμπεριλήφθηκαν στην παραπάνω επιδημιολογική μελέτη ήταν η εχινάκεια, το Ginkgo, η πιπερόριζα (Ginger), το Ginseng, το σκόρδο, το Kava-kava, η σόγια, το βότανο του Αγίου Ιωάννη, το αγριόχορτο (ragweed) και η μέντα (Gardiner et al., 2007).

Στη λεκάνη της Μεσογείου, η παραγωγή, η συγκομιδή, η χρήση και το εμπόριο των βοτάνων και των αρωματικών φυτών είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με τους πολιτισμούς που κυριάρχησαν στη γεωγραφική αυτή περιοχή στο πέρασμα του χρόνου. Πιο συγκεκριμένα, η συμβολή των αρχαίων Ελλήνων και Αιγυπτίων στο πεδίο της βοτανοθεραπείας ήταν τόσο σημαντική και ουσιώδης, που έθεσε τα θεμέλια τόσο για τη σημερινή ευρεία χρήση των βοτάνων και των χαρακτηριστικών ουσιών τους για θεραπευτικούς σκοπούς, όσο για τη σύγχρονη ιατρική και φαρμακευτική επιστήμη γενικότερα (Saad et al., 2005).

2.2 Σιδερίτης

2.2.1 Γενικές πληροφορίες

Ένα από τα βότανα που έχει έντονη και διαρκή παρουσία στην παραδοσιακή ιατρική των μεσογειακών λαών είναι ο σιδερίτης (*Sideritis, ironwort*). Η ονομασία του φυτού, σιδερίτης, προέρχεται από την ελληνική λέξη «σίδηρος», καθώς χρησιμοποιούταν για την επούλωση τραυμάτων που προκαλούνταν από σιδερένια όπλα, όπως βέλη ή ξίφη, κατά τη διάρκεια των μαχών. Στον ελλαδικό χώρο, ο σιδερίτης είναι γνωστός, επίσης, και με την ονομασία τσάι του βουνού (Mountain tea) (Koutsaviti et al., 2013). Στις υπόλοιπες βαλκανικές χώρες, στην Ισπανία, στην Ιταλία και στην Τουρκία, όμως, ο σιδερίτης συναντάται με πολλές άλλες διαφορετικές ονομασίες που ποικίλλουν στις τοπικές κοινωνίες. Για παράδειγμα, στην Πρώην

Γιουγκοσλαβική Δημοκρατία της Μακεδονίας (ΠΓΔΜ) το αφέψημα το οποίο προέρχεται από την εκχύλιση του σιδερίτη είναι ευρέως γνωστό στην τοπική παράδοση ως «Sharplaninsi chaj» ή «Planinski chaj» (Petreska et al., 2011), στη Βουλγαρία αναφέρεται ως «Mursalski tea» ή «Pirin Mountain tea» (Tylkowski et al., 2011), στην Ισπανία ως «rabo de gato» ή «zaharena» (de Castro, 1994) ενώ στην Τουρκία ονομάζεται «adacayi» ή «dagcayi» (Kirimer et al., 2004). Τέλος, στην Ιταλία το τσάι του βουνού είναι γνωστό ως «τσάι του βοσκού» (Shepherd's Tea), καθώς οι λαϊκές ιταλικές παραδόσεις αναφέρουν ότι οι βοσκοί στο όρος Madonie είχαν πάντοτε στην τσέπη τους, φυλαγμένα, μερικά φύλλα από σιδερίτη σε περίπτωση που τους χρειαστεί κατά την παραμονή τους στο βουνό (Lentini, 2000).

Ο σιδερίτης κατείχε σημαντική θέση στην παραδοσιακή ιατρική διαφόρων λαών, και η χρήση του ήταν ευρεία. Οι πρώτες αναφορές για τις θεραπευτικές ιδιότητες του σιδερίτη, καταγράφονται ήδη από τον 1^ο αιώνα π.Χ., στο έργο ενός από τους μεγαλύτερους φαρμακολόγους - βοτανολόγους της αρχαιότητας, Διοσκουρίδη, «Περί ύλης ιατρική». Το αφέψημα, παρασκευαζόμενο από τα υπέργεια τμήματα του βοτάνου, χορηγείται από του στόματος ή εφαρμόζεται τοπικά στο δέρμα και οι ιδιότητες που του αποδίδονται βάσει των παραδόσεων είναι: αντιφλεγμονώδες, αντιελκωτικό, αντιμικροβιακό, καταπραϋντικό, αντιβηχικό, αντισπασμωδικό, επουλωτικό πληγών και εγκαυμάτων, αντιεπιληπτικό και αναλγητικό (Ayar-Kayali H., et al. 2009, Nakiboglu et al., 2007). Στο τσάι που προέρχεται από το βρασμό του σιδερίτη σε νερό, συχνά προστίθεται μέλι και λεμόνι και ξεχωρίζει για το ευχάριστο άρωμα, την ωραία γεύση και το κιτρινωπό χρώμα. Οι πιο συχνές χρήσεις του τσαγιού του βουνού είναι έναντι γαστρεντερικών διαταραχών όπως στομαχόπονος, δυσπεψία, μετεωρισμός, συμπτωμάτων του κοινού κρυολογήματος όπως πυρετός, πονόλαιμος, βρογχίτιδα και ως τονωτική και διουρητική θεραπεία. Επιπλέον, τα υδατικά εκχυλίσματα των μίσχων του σιδερίτη εφαρμόζονταν εξωτερικά για την αποστείρωση και epούλωση των πληγών και των τραυμάτων. Τέλος, άλλες ενδιαφέρουσες χρήσεις του σιδερίτη στην παραδοσιακή ιατρική διαφόρων λαών περιλαμβάνουν τη χρήση των φύλλων του *Sideritis syriaca* στη βόρεια Ιταλία για το σταμάτημα της αιμορραγίας έπειτα από ένα κόψιμο, τη χρήση του σιδερίτη για μολύνσεις στα μάτια και ως διεγερτικό της όρεξης στην Ισπανία και τη παρασκευή ενός καταπλάσματος, στην Τουρκία, με βρασμένα φύλλα του σιδερίτη, αλεύρι κριθαριού, τριμμένο κρεμμύδι και πίσσα πεύκου, το οποίο εφαρμοζόταν στην κοιλιακή χώρα έναντι του κοιλιακού άλγους (Gonzalez-Burgos et al., 2011).

2.2.2 Βοτανολογική Κατάταξη

Η κατηγοριοποίηση του σιδερίτη σε κάποια ευρύτερη οικογένεια και γένος, ήταν πεδίο αμφιβολίας για τους βοτανολόγους, εξαιτίας των πολλών υβριδισμών που παρατηρούνται. Ωστόσο, έχουν γίνει σημαντικά βήματα προς την κατεύθυνση της βοτανολογικής κατάταξης, κυρίως με τη βοήθεια καρυοτυπικών, μορφολογικών, παλυνολογικών και γενετικών μελετών (Gonzalez-Burgos et al., 2011). Τελικά, οι βοτανολόγοι κατέληξαν στο ότι ο σιδερίτης (*Sideritis* spp.) ανήκει στη φυλή Lamieae, της υποοικογένειας Lamioideae, της οικογένειας των Χειλανθών (Lamiaceae) (Fraga et al., 2009), η οποία αποτελείται από πολλά είδη θάμνων και ετήσια ή πολυετή βότανα. Η οικογένεια Lamiaceae διαιρείται περίπου σε 230 γένη, ένα εκ των οποίων και το γένος *Sideritis* L., το οποίο αποτελείται από συνολικά 150 είδη, που ευδοκούν κυρίως στις μεσογειακές περιοχές, όπως η Βαλκανική χερσόνησος, η Ιβηρική χερσόνησος, η Τουρκία και η Ιταλία (Fraga et al., 2009, Fraga, 2012). Επίσης, το γένος *Sideritis* L. διαιρείται σε δύο υπογένη: *Sideritis* και *Marrubastrum*, με το *Sideritis* να απαριθμεί 125 είδη. Τέλος, το υπογένος *Sideritis* διαιρείται στους τέσσερις εξής τομείς: *Sideritis* και *Empedoclea* (πολυετή είδη που ευδοκούν στην Ιβηρική χερσόνησο και στην ανατολική Μεσόγειο), *Hesiodia* και *Burgsdorfia* (ετήσια είδη που ευδοκούν στη Μεσόγειο και στην κεντρική Ασία) (Gonzalez-Burgos et al., 2011).

Στην Ελλάδα ευδοκούν περίπου 10 είδη του σιδερίτη. Είναι αυτοφυές βότανο που αναπτύσσεται σε βραχώδη ελληνικά βουνά και είναι εξαιρετικά ανθεκτικό στην ξηρασία (Tsaknis and Lalas, 2005). Ενδεικτικά, μερικά από τα είδη που κυριαρχούν στον ελλαδικό χώρο είναι: *Sideritis raeseri* (στην κεντρική Ελλάδα), *Sideritis silypea* (στα νησιά του ανατολικού Αιγαίου), *Sideritis clandestina* (στη νότια Ελλάδα), *Sideritis syriaca* (γνωστό και ως μαλωτήρας στα βουνά της Κρήτης) (Aligiannis et al., 2001), *Sideritis euboea* (στο νησί της Εύβοιας) (Tsaknis and Lalas, 2005) και *Sideritis scardica* (τσάι του Ολύμπου) (Petreska et al., 2011).

2.2.3 Χημική σύσταση

Πληθώρα χημικών συστατικών έχουν ταυτοποιηθεί στο γένος του σιδερίτη, με σημαντικότερα τα τερπένια, τα φλαβονοειδή, το αιθέριο έλαιο, τα ιριδοειδή, τις κουμαρίνες, τις λιγνάνες και τις στερόλες. Επιπλέον, τα διτερπένια, τα φλαβονοειδή

και το αιθέριο έλαιο είναι παρόντα σε σχεδόν κάθε είδος του σιδερίτη, και αποτελούν τα κύρια υπεύθυνα συστατικά για τις θεραπευτικές ιδιότητές του. (Gonzalez-Burgos et al., 2011, Koleva et al., 2003).

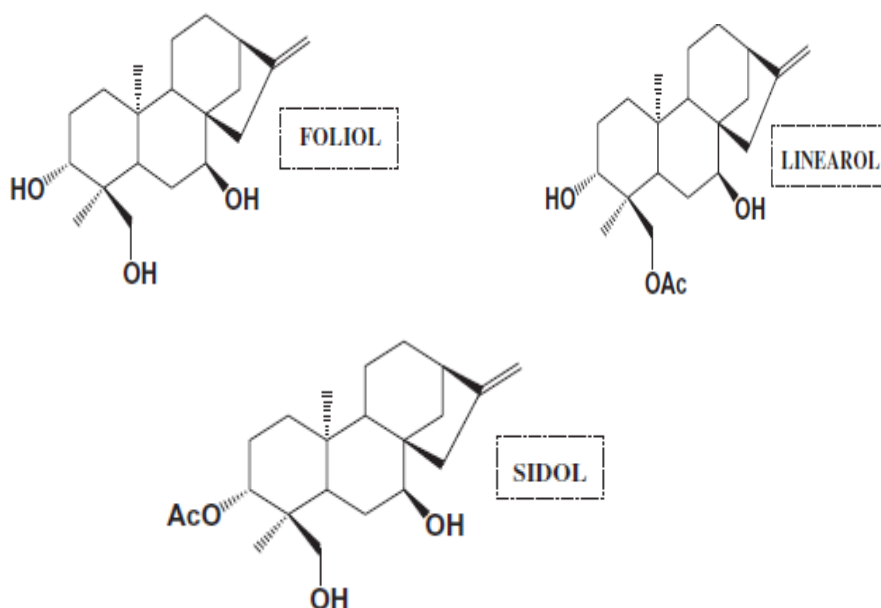
Αιθέριο έλαιο: Τα φυτά, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae είναι γνωστό ότι είναι ιδιαίτερα πλούσια σε αιθέριο έλαιο. Έτσι, και ο σιδερίτης είναι πλούσιος σε αιθέριο έλαιο, το οποίο αποτελείται από πάρα πολλές διαφορετικές ενώσεις, ανάλογα με το είδος, τους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, αλλά και τις αγροτικές πρακτικές της καλλιέργειάς του. Συνήθως, το αιθέριο έλαιο περιέχει κυρίως τερπένια, όπως μονοτερπένια, διτερπένια, σισκετερπένια, και φλαβονοειδή (Gonzalez-Burgos et al., 2011). Ενδεικτικά, μερικές από τους ουσίες που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του φυτού είναι: α-πινένιο, β-πινένιο, λιμονένιο, α-κοπαένιο, β-καρυοφυλλίνη, γ-μυρολένιο, δ-καδινένιο, αβιενόλη, θυμόλη, γερμακρένιο, σπαθουλενόνη, α-βισαβολένιο, β-μυρκένιο, β-βισαβολένιο, λιναλοόλη, γ-τιρπινένιο και α-τιρπινένιο (Aligiannis et al., 2001).

Τερπένια: Τα διάφορα είδη του σιδερίτη περιέχουν και διαφορετική αναλογία μονοτερπενίων, διτερπενίων και άλλων τερπενίων (Fraga et al., 2009, Fraga, 2012). Τα τερπένια είναι οργανικές ενώσεις με κύρια δομική μονάδα το ισοπρένιο και διαχωρίζονται ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα του ανθρακικού του σκελετού. Έτσι, μονοτερπένια ονομάζονται αυτά με 10 άτομα άνθρακα και 2 μονομερή ισοπρενίου, σεσκιτερπένια αυτά με 15 άτομα άνθρακα και 3 μονομερή ισοπρενίου, διτερπένια αυτά με 20 άτομα άνθρακα και 4 μονομερή ισοπρενίου και τριτερπένια αυτά με 30 άτομα άνθρακα και 6 μονομερή ισοπρενίου (Graßmann, 2005).

Μονοτερπένια: Μερικά μονοτερπένια τα οποία απαντώνται συχνά στο αιθέριο έλαιο του σιδερίτη είναι: α-πινένιο, α-φελλανδρένιο, β-φελλανδρένιο, λιμονένιο, 1,8-κινεόλη, σαβινένιο, φενχόνη και φενχόλη. Ωστόσο, η μεγάλη ποικιλία των ειδών και ο υβριδισμός τους, καθιστά εξαιρετικά δύσκολη την εξαγωγή ενός συνολικού συμπεράσματος σχετικά με την περιεκτικότητα του σιδερίτη σε μονοτερπένια, μιας και κάθε είδος έχει διαφορετική σύσταση. Επίσης, διαφορές στην περιεκτικότητα μονοτερπενίων παρατηρούνται ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή που αναπτύσσεται, αλλά και τις εποχές του χρόνου (Fraga, 2012). Τέλος, σε μερικά είδη

όπως τα *Sideritis montana*, *Sideritis syriaca* και *Sideritis scardica* έχουν εντοπιστεί μικρές ποσότητες ιριδοειδών (Charami et al., 2008).

Διτερπένια: Το *Sideritis spp.* θεωρείται ιδιαίτερα πλούσιο σε διτερπένια, και πληθώρα ερευνητών έχουν εντοπίσει, αναγνωρίσει και απομονώσει πάνω από 160 διαφορετικά διτερπένια, με μεγάλη δομική ποικιλία (Piozzi et al., 2006). Τα διτερπένια με γενικό δομικού τύπου καουρενίου είναι τα πιο συχνά στο σιδερίτη, και μερικά από τα πιο διαδεδομένα είναι: η επικαντιντιόλη, η σιδεριδιόλη, η σιδερόλη, η σιδεροδοξόλη, η φολιόλη, η ισολινεαρόλη, η λινεαρόλη και η σιδόλη (Topcu et al., 2011).



Σχήμα 2.1: Χημικές δομές της φολιόλης, της λινεαρόλης και της σιδόλης

Η φολιόλη, η λινεαρόλη και η σιδόλη είναι τα τρία κύρια διτερπένια του γένους *Sideritis* στα οποία αποδίδεται μεγάλο μέρος των ευεργετικών ιδιοτήτων των διτερπενίων του σιδερίτη (Gonzalez-Burgos et al., 2013). Επιπλέον, υπάρχουν και διτερπένια με διαφορετικό ανθρακικό σκελετό όπως τα διτερπένια με δομικό τύπο λαβδανίου, ατισανίου, και μπεϋερενίου (Gonzalez-Burgos et al., 2011).

Άλλα τερπένια: Το σκουαλένιο, το πρόδρομο μόριο για το σχηματισμό των στερολικών δακτυλίων, έχει εντοπιστεί στα *Sideritis argosphacelus*, *Sideritis discolor* και *Sideritis lhotsyi*. Επίσης, έχουν εντοπισθεί και διάφορα τριτερπένια σε διάφορα είδη του σιδερίτη, όπως η ερυθροδιόλη, η λουπεόλη, η α-αμυρίνη και η β-αμυρίνη.

Όσον αφορά τις στερόλες, σε μερικά είδη έχουν εντοπισθεί β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη και σιγμαστερόλη (Fraga, 2012).

Φλαβονοειδή: Τα φλαβονοειδή είναι παράγωγα του βενζο-γ-πυρανίου, τα οποία αποτελούνται από φαινολικούς και πυρανικούς δακτυλίους και κατηγοριοποιούνται βάσει των υποκαταστάσεων που πραγματοποιούνται. Τα φλαβονοειδή της διατροφής είναι κυρίως υποκατεστημένα με υδροξύλιο, μεθύλιο και υδατανθρακικές αλυσίδες (γλυκοσίδια), διαχωρίζονται σε φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες και ανθοκυανίνες και μαζί με τα φαινολικά οξέα, τα στυλβένια και τις λιγνάνες αποτελούν τη μεγάλη κατηγορία των πολυφαινολών (Heimet al., 2002).

Η λέξη φλαβονοειδές προέρχεται από τη λατινική λέξη «flavus» που σημαίνει κίτρινος, χαρακτηριστικό χρώμα μερικών φλαβονοειδών. Μερικά, βέβαια, είναι λευκά και οι ανθοκυανίνες είναι κυανές ή πορφυρές. Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν σημαντικές ιδιότητες σε σχέση με τις πτυχές της ζωής του φυτού και την αλληλεπίδρασή του με το περιβάλλον. Για παράδειγμα, προστατεύουν το φυτό από την υπεριώδη ακτινοβολία, έχουν αντιμικροβιακή δράση και δρουν ως ανασταλτικοί παράγοντες βρώσης για τα φυτοφάγα ζώα περιορίζοντας την απορρόφηση των πρωτεϊνών και περιορίζοντας τη δράση των πεπτικών ενζύμων (Pourcel et al., 2007).

Το γένος του σιδερίτη είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε φλαβονοειδή, όπως έχει παρατηρηθεί από πλήθος ερευνών στα διάφορα είδη του σιδερίτη της Μεσογείου και της Μακαρονησιακής βιογραφικής περιοχής (Κανάρια νησιά, νησιά Αζόρες και νησιά Μαδέιρα). Επίσης, έχει παρατηρηθεί και συσχέτιση της περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή στις ποικιλίες που ευδοκιμούν στις δύο αυτές περιοχές. Συγκεκριμένα, στον σιδερίτη της Μεσογείου έχουν εντοπιστεί άγλυκα φλαβονοειδή, και κυρίως φλαβόνες όπως 5,6,7,8-τετρα-οξυγονωμένες φλαβόνες (π.χ. ξανθομικρόλη ή γαρδενίνη), ενώ στη Μακαρονησιακή περιοχή 5,6,7-τρι-οξυγονωμένες φλαβόνες (π.χ. κισιμαριτίνη, σαλβιγενίνη ή νεπετίνη) (Gil et al., 1993). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση πως τα άγλυκα φλαβονοειδή είναι συγκεντρωμένα κυρίως στην επιφάνεια των φύλλων και του μίσχου. Οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι πιθανόν τα φλαβονοειδή αυτά να παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή του φυτού στο ημιάνυδρο περιβάλλον που ευδοκιμεί ο σιδερίτης. Αντίθετα, στα χυμοτόπια εντοπίστηκαν γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως παράγωγων απιγενίνης, λουτεολίνης και χρυσεριόλης (Gonzalez-Burgos et al., 2011). Επιπρόσθετα, άλλα φλαβονοειδή που έχουν ταυτοποιηθεί στα διάφορα είδη του σιδερίτη είναι ενδεικτικά η κισυλινεόνη, η σαλβιγενίνη, η ευπατορίνη και η διοσμετίνη (Fraga, 2012).

Άλλα συστατικά: Η εκτεταμένη μελέτη του σιδερίτη έδειξε την παρουσία και άλλων ουσιών σε μερικά είδη του σιδερίτη, όπως η κουμαρίνη σιδερίνη, η λιγνάνη σεμαμίνη, τα φαινυλο-προπανοϊκά παράγωγα βερμπασκοσίδη, λευκοσεπτοσίδη Α, μαρτυνοσίδη, εστέρες καφεϊκού οξέος και χλωρογενικό οξύ (Gonzalez-Burgos et al., 2011, Petreska et al., 2011, Tsibranska et al., 2011, Fraga, 2012). Επιπλέον, και στο φυτό αλλά και στο παρασκευαζόμενο αφέψημα υπάρχουν μέταλλα όπως Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, P, Zn, Co, Cr, Cu, Mn, ενώ τα βαρέα μέταλλα βρίσκονται σε απειροελάχιστες ποσότητες, καθιστώντας το τσάι του βουνού ένας ασφαλές ρόφημα (Özcan et al., 2008).

2.2.4 Φαρμακολογικές Ιδιότητες

Οι φαρμακολογικές ιδιότητες του σιδερίτη που τον κατέστησαν δυναμικά παρόν στην παραδοσιακή ιατρική πολλών λαών οφείλονται στα πολύ σημαντικά συστατικά του, όπως τα τερπένια και τα φλαβονοειδή. Πλήθος ερευνών, τόσο in vitro όσο και in vivo, έχουν δείξει πως ο σιδερίτης παρουσιάζει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικές, αντιμικροβιακές, αναλγητικές, ανιελκωτικές, αντι-HIV και άλλες δράσεις (Gonzalez-Burgos et al., 2011).

2.2.4.1 Αντιοξειδωτική δράση

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να χαρακτηριστούν ως ανεξάρτητα μόρια με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Η παρουσία του ασύζευκτου ηλεκτρονίου προσδίδει όλες τις ιδιότητες στις ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθή μόρια που αντιδρούν πάρα πολύ εύκολα και μπορούν να πάρουν ένα ηλεκτρόνιο, δρώντας ως οξειδωτικά μόρια (Andreoli, 2000). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς από τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού είτε μέσω του κυτταρικού μεταβολισμού είτε εξωτερικών παραγόντων. Είναι απαραίτητες για τη ζωή, καθώς λαμβάνουν μέρος στην κυτταρική σηματοδότηση και χρησιμοποιούνται από τα μακροφάγα για τη βακτηριοκτόνο δράση τους (Stagos et al., 2012). Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες στον ανθρώπινο οργανισμό είναι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν στις κυτταρικές μεμβράνες και στον πυρήνα του κυττάρου με πρωτεΐνες, λιποειδή, DNA και υδατάνθρακες, καταστρέφοντάς τα. Η επίθεση αυτή στα μακρομόρια του κυττάρου οδηγεί σε βλάβες στη λειτουργία και ακεραιότητά του (Lobo et al., 2010).

Σε πρακτικούς όρους, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου θεωρούνται οι O_2^- και $OH^\cdot$, με το χαρακτηριστικό ότι έχουν και οι δύο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Επίσης, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) αν και δεν θεωρείται ελεύθερη ρίζα, μπορεί να οδηγήσει ενδοκυτταρικά στο σχηματισμό $OH^\cdot$, εάν δεν επαρκεί η καταλάση για στη διάσπασή του σε νερό και οξυγόνο (Andreoli, 2000). Τέλος, το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες στους ιστούς (Betteridge, 2000) και σχετίζεται άμεσα με παθολογικές καταστάσεις όπως η καρδιαγγειακή νόσος (υπέρταση, αθηροσκλήρυνση, καρδιακή ανεπάρκεια), ο καρκίνος (Ceconi et al., 2003), νόσος Alzheimer (Christen, 2000) και ο σακχαρώδης διαβήτης (Niedowicz and Daleke, 2005).

Πολλές από τις θεραπευτικές ιδιότητες που αποδίδονται στον σιδερίτη, όπως η αντιφλεγμονώδης και αντιελκωτική δράση, οφείλονται κατά κύριο λόγο στην πολύ σημαντική αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του σιδερίτη. Η αντιοξειδωτική δράση πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της παρουσίας τερπενίων και φλαβονοειδών. Μία έρευνα in vivo των Celic and Kaya (2011) έδειξε ότι το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis caesarea* παρουσίασε αντιοξειδωτική δράση σε χημικά επαγόμενο οξειδωτικό στρες σε ζωικά μοντέλα επίμυων. Πιο αναλυτικά, οι ερευνητές μελέτησαν τη συγκέντρωση βιοδεικτών που δίνουν σαφή εικόνα για την απόκριση του οργανισμού έναντι της οξείδωσης όπως η υπεροξειδάση της δεσμουτάσης (SOD), η μηλονική διαλδεϋδη (MDA), η γλουταθειόνη (GSH) και η καταλάση, μετά τη χορήγηση τριχλωροακετικού οξέος (TCA) και TCA μαζί με το αφέψημα του σιδερίτη. Η ερευνητική ομάδα βρήκε ότι τα επίπεδα της MDA (δείκτης οξειδωτικής βλάβης) μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά στην ομάδα με το αφέψημα ενώ τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και καταλάση μειώθηκαν ελαφρώς στην ομάδα παρέμβασης με αφέψημα σιδερίτη ως προσαρμογή του οργανισμού στην εισαγωγή αντιοξειδωτικών ουσιών στο αίμα. Με αυτόν τον τρόπο, ανέδειξαν σε μελέτη in vivo την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος του σιδερίτη. Άλλη μία ενδιαφέρουσα μελέτη in vivo σε ενήλικες μύες, έδειξε ότι τα εκχυλίσματα του *Sideritis clandestina* έχουν αντιοξειδωτική δράση στον εγκέφαλο των ζώων (μείωση συγκέντρωσης MDA) και μπορούν να εμποδίσουν συμπεριφορές που σχετίζονται άμεσα με το άγχος, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Οι ερευνητές πρότειναν ότι τα συστατικά του σιδερίτη (φλαβονοειδή κυρίως) προσδίδουν βελτιωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα, νευροπροστατευτική δράση και νοητο-βελτιωτική δράση

(Vasilopoulou et al., 2013). Επίσης, οι González-Burgos et al. (2013) θέλοντας να μελετήσουν τη νευροπροστατευτική δράση συγκεκριμένων, μεμονομένων διτερπενίων του σιδερίτη, αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα in vitro, σε κυτταρικές σειρές. Το οξειδωτικό στρες προκλήθηκε χημικά με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα διτερπένια 1) αύξησαν τη μιτοχονδριακή ακεραιότητα και δραστηριότητα, καθώς και τη μεμβρανική ακεραιότητα των κυττάρων μέσω της επιδιόρθωσης μορφολογικών αλλαγών, 2) μείωσαν την οξειδωτική καταστροφή, περιορίζοντας την ενδοκυτταρική παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και τη λιπιδική υπεροξειδωση και 3) αύξησαν την έκφραση και τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Οι ερευνητές πρότειναν ότι τα διτερπένια αυτά, και κατ' επέκταση το αφέψημα του σιδερίτη, θα μπορούσε να έχει κάποιο προστατευτικό ρόλο στην εξέλιξη της άνοιας που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες (González-Burgos et al., 2013). Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζει και πληθώρα άλλων ερευνών που μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων σιδερίτη. Ενδεικτικά, ερευνητές μελέτησαν την αντιοξειδωτική και κυτταροτοξική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος *Sideritis perezlarae*, υπολογίζοντας το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική ικανότητα και την κυτταροτοξική επίδραση σε κυτταρική σειρά HT29 ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου και έδειξαν ότι το είδος αυτό κατέχει αξιολογες αντιοξειδωτικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες. Μάλιστα, το εκχύλισμα του σιδερίτη παρουσίασε μεγαλύτερη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, εν συγκρίσει με το φάρμακο 5-Fluorouracil (ανταγωνιστής της πυριμιδίνης) (Charami et al., 2008, de la Puerta et al., 2012). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα του *Sideritis perfoliata* έχουν αποτελεσματική αντιοξειδωτική δράση σε διαφορετικές in vitro δοκιμασίες όπως η δέσμευση ελεύθερων ριζών DPPH[•] και η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδάσης, όταν συγκρίθηκαν με τις πρότυπες ουσίες Trolox και κερκετίνης. Η δράση αυτή αποδόθηκε στα φλαβονοειδή και στους φαινυλο-προπανοϊκούς γλυκοζίτες, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα θεωρείται ευρέως ως παράμετρος φαρμακευτικής δράσης των βιοδραστικών μορίων (Charami et al., 2008). Άλλη μια μελέτη του ενδημικού είδους της Τουρκίας, *Sideritis leptoclada* έδειξε ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία αποδόθηκε στα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή είναι σημαντικά συστατικά του αντιοξειδωτικού συστήματος του φυτού, τα οποία απορροφούν και εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και αποσυνθέτουν υπεροξείδια. Οι ερευνητές πρότειναν πως τα εκχυλίσματα του

Siderits leptoclada θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φυσική πηγή αντιοξειδωτικών σε διατροφικά συμπληρώματα και φαρμακευτικά σκευάσματα (Ayar-Kayali et al., 2009). Τέλος, οι Karavoltsos et al. (2014) έδειξαν πως τα οργανικά συστατικά του εκχυλίσματος του *Sideriti syriaca* δημιουργεί χηλικούς δεσμούς με τον Χαλκό. Η δυνατότητα σύμπλεξης των ιόντων Cu^{2+} σχετίζεται εν μέρει με υδατάνθρακες, καταλυτικά ενεργούς πολυσακχαρίτες, φλαβόνες, τερπενικά οξέα και τερπενοειδείς φαινόλες.

2.2.4.2 Αντιφλεγμονώδης δράση

Μία από τις σημαντικότερες και πιο καλά μελετημένες ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στο τσάι του βουνού είναι η αντιφλεγμονώδης δράση των συστατικών του. Το είδος *Sideritis lotsyi* μελετήθηκε από τους Hernandez Perez and Rabanal Gallego (2002), όπου σε ζωικά μοντέλα προκάλεσαν, τεχνητά, οιδήματα στα πόδια των μυών με τη χρήση καραγενάνης. Ύστερα, τους χορηγήθηκαν per os εκχυλίσματα σιδεριτίτη σε διάφορους διαλύτες. Το εκχύλισμα φάνηκε να είχε αντιφλεγμονώδη δράση στην πρώτη φάση της εκδήλωσης του οιδήματος, που αφορά την απελευθέρωση μεσαλαβητών όπως η ισταμίνη και η σεροτονίνη. Επίσης, προκλήθηκαν και οιδήματα στα αυτιά των ζώων με τη χρήση TPA (12-o-tetradecanoyl-phorbol-acetate), όπου η τοπική εφαρμογή των εκχυλισμάτων φάνηκε να έχει κάποια δράση, και όχι η λήψη από το στόματος, και μάλιστα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Οι ιδιότητες αυτές αποδόθηκαν στα τερπένια του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύθηκαν από παρόμοιου μεθοδολογικού σχεδιασμού μελέτη σχετικά με την αντιφλεγμονώδη δράση του *Sideritis candicans*. Οι ερευνητές απέδωσαν τις δράσεις αυτές στα διτερπένια δομικού τύπου καουρενίου, στα τριτερπένια και στις φυτοστερόλες που περιέχει το είδος αυτό. Όσον αφορά, την αυξημένη αντιφλεγμονώδη δράση όταν το εκχύλισμα εφαρμόζεται τοπικά, οι ερευνητές ανέφεραν ότι η τοπική εφαρμογή ενός φαρμάκου οδηγεί στη μέγιστη δυνατή συγκέντρωση των συστατικών με αντιφλεγμονώδη δράση (Hernandez-Perez et al., 2004). Τα ίδια αποτελέσματα αναφέρθηκαν για το *Sideritis canariensis* και *Sideritis brevibracteata* (Hernandez-Perez and Rabanal, 2002, Güvenç et al., 2010). Άλλη μία έρευνα, έδειξε πως υδατικά εκχυλίσματα του *Sideritis javalambrensis* τα οποία εφαρμόστηκαν τοπικά, παρουσίασαν αντιφλεγμονώδη δράση σε κουνέλια με κερατοειδικό οίδημα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως ζωικά μοντέλα φλεγμονής. Επίσης, εκχυλίσματα του ίδιου

είδους με διαλύτη το εξάνιο παρουσίασαν 4 φορές μεγαλύτερη αντιφλεγμονώδη δράση στο διάστημα 6 - 24 ωρών, όπου το οίδημα εμφανίζεται πιο έντονα, εν συγκρίσει με το κορτικοστεροειδές φάρμακο αναφοράς, δεξαμεθαζόνη (Villena et al., 2000). Τέλος, τα καουρενικά τερπένια που περιέχουν σχεδόν όλα τα είδη του σιδερίτη και ιδιαίτερα η φολιόλη και η λινεαρόλη, από έρευνες in vivo και in vitro φάνηκε ότι διαθέτουν κάποιες σημαντικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, οι de las Heras et al. (2007) έδειξαν ότι παρουσία των παραπάνω τερπενίων, η τεχνητά επαγόμενη φλεγμονή σε σειρές μακροφάγων, υποχωρούσε, σε σύγκριση με τα μακροφάγα χωρίς την παρουσία των τερπενίων. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα τερπένια ανέστειλαν την κυτταρική απόπτωση, «διόρθωσαν» κάποιες λειτουργίες των μακροφάγων και επιμήκυναν τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

2.2.4.3 Αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση

Όσον αφορά την αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση, έχουν γίνει πολλές μελέτες που εξετάζουν την επίδραση διαφόρων εκχυλισμάτων ποικίλων ειδών του σιδερίτη, σε καλλιέργειες διαφορετικών μικροοργανισμών. Οι Aligiannis et al. (2001) εξέτασαν τόσο την αντιμικροβιακή δράση διαφορετικών αιθέριων ελαίων από 5 διαφορετικά είδη σιδερίτη σε καλλιέργειες *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* όσο και την επίδραση μεμονομένων συστατικών του αιθέριου ελαίου. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα έλαια από το *Sideritis clandestine* και *Sideritis raeseri* είχαν μέτρια βακτηριοστατική δράση, ενώ το πλούσιο στο διτερπένιο α-πινένιο *Sideritis siphylea* παρουσίασε ισχυρότερη δράση. Επίσης, είναι αξιοσημείωτο ότι το *Sideritis syriaca*, με υψηλή περιεκτικότητα σε καρβακρόλη (33,8%) είχε την υψηλότερη αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση. Η υψηλή αντιμικροβιακή δράση του μονοτερπενίου α-πινένιο και της καρβακρόλης επαληθεύθηκε και από τη μεμονωμένη μελέτη των συστατικών αυτών. Άλλη έρευνα από τους Koutsaviti et al. (2013), σε καλλιέργειες κατά Gram θετικών βακτηρίων (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*), κατά Gram αρνητικών βακτηρίων (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) και μυκήτων (*Candida albicans*), έδειξε ότι κατά Gram θετικά βακτήρια ήταν πιο ευαίσθητα στην παρουσία του ελαίου, σε σχέση με το κατά Gram αρνητικά

βακτήρια. Επιπλέον, η αντιμικροβιακή δράση του *Sideritis lutana* εναντίον των *Staphylococcus aureus* και *Micrococcus luteus* μπορεί να συγκριθεί με τα αντιβιοτικά αναφοράς για τους μικροοργανισμούς αυτούς. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με την επίδραση του εκχυλίσματος *Sideritis Euboea* στους *Micrococcus luteus* και *Enterococcus faecalis*, που είναι συγκρίσιμη με τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και αμικασίνη. Τα ευρήματα της παραπάνω έρευνας, έρχονται να επιβεβαιώσουν μία παλιότερη μελέτη του που είχε δείξει την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων σιδερίτη στα κατά Gram θετικά βακτήρια (Gergis et al., 1991). Τέλος, η έρευνα που διεξήχθη από τους Iscan et al. (2005) έδειξε αντιμυκητιακή και αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων των *Sideritis bilgerana* και *Sideritis cilicica* έναντι κατά Gram θετικών και κατά Gram αρνητικών βακτηρίων και μυκήτων, που αποδόθηκε στην υψηλή περιεκτικότητα σε α-πινένιο (32% και 28% αντίστοιχα) και σε β-πινένιο (48% και 39%), ως κύρια συστατικά των εκχυλισμάτων.

2.2.4.4 Αναλγητική δράση

Η χρήση του σιδερίτη στην παραδοσιακή ιατρική ως αναλγητικό έρχεται να επιβεβαιωθεί σε μελέτες που έγιναν in vivo. Οι Hernandez-Perez and Rabanal Gallego (2002) αξιολόγησαν την αναλγητική επίδραση του *Sideritis lhotskyi* σε ζωικά πειραματικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, μετά από τεχνητή πρόκληση πόνου και συσπάσεων σε μύες με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση οξικού οξέος, μελέτησαν την από του στόματος χορήγηση των εκχυλισμάτων του σιδερίτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ρόφημα οδήγησε σε σημαντική μείωση των συσπάσεων των μυών, αναδεικνύοντας έτσι την αναλγητική δράση των εκχυλισμάτων του σιδερίτη. Παρόμοια αποτελέσματα δημοσίευσε πάλι η ίδια ερευνητική ομάδα, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά εκχυλίσματα *Sideritis canariensis* και *Sideritis candicans* και απέδωσαν την αναλγητική δράση των εκχυλισμάτων κυρίως στην παρουσία των διτερπενίων δομικού τύπου καουρενίου (Hernandez-Perez et al., 2004). Τέλος, οι Guvenc et al. (2010) μελέτησαν και αυτοί τον σιδερίτη, και συγκεκριμένα το *Sideritis brevibracteata* και τα βιοδραστικά του μόρια, με παρόμοια μεθοδολογία και τα τελικά αποτελέσματα έδειξαν και πάλι αναλγητική δράση που πιθανόν να οφειλόταν στα φλαβονοειδή.

2.2.4.5 Αντι-ελκογόνος δράση

Οι [Gurbuz et al. \(2005\)](#) μελέτησαν την αντι-ελκογόνο δράση του αφεψήματος του *Sideritis caesarea*, αφού χορηγήθηκε από του στόματος σε μύες όπου είχε προηγηθεί χορήγηση αιθανόλης για τη χημική επαγωγή γαστρικού έλκους. Οι ιστοπαθολογικές αναλύσεις έδειξαν ότι πράγματι το αφέψημα προστάτευσε τους μύες από την ανάπτυξη του έλκους, και απέδωσαν την ιδιότητα αυτή σε αντιοξειδωτικές ουσίες όπως τα φλαβονοειδή και στα τερπένια. Επιπλέον, μία μελέτη που αφορούσε το *Sideritis italica* έδειξε ότι το αφέψημα κατέχει σημαντική ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του *Helicobacter pylori* ([Basile et al., 2005](#)).

2.2.4.6 Αντι-HIV δράση

Έρευνα in vitro που διεξάχθηκε από τους [Bruno et al. \(2002\)](#) έδειξε ότι μερικά παράγωγα του διτερπενίου δομικού τύπου καουρενίου, λινεαρόλη, είχαν ανασταλτική δράση όσον αφορά τον διπλασιασμό του ιού, σε κυτταρική σειρά H9 λεμφοκυττάρων.

2.2.4.7 Άλλες δράσεις

Αντινεοπλασματική δράση: Οι [Dimertas et al. \(2009\)](#) σε έρευνά τους in vitro έδειξαν πως τα μεθανολικά εκχυλίσματα από το *Sideritis libanotica* είχαν αντινεοπλασματικές ιδιότητες σε τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποίησαν (Vero, HeLa, C6). Η δράση αυτή, μάλιστα, ήταν δοσο-εξαρτώμενη και πιθανόν να οφείλεται στα τερπένια και τα φλαβονοειδή του περιέχει ο σιδερίτης. Επιπλέον, η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος του *Sideritis syriaca* με καρκινικές σειρές HT29 (καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου) και PC3 (καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα προστάτη) οδήγησε σε σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, και μάλιστα με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη σχέση ([Kogiannou et al., 2013](#)).

Οστεοπροστατευτική δράση: Μελέτη που διεξήχθη σε ζωικά μοντέλα που είχαν υποβληθεί σε ωοθηκεκτομή, έδειξε πιθανή οστεοπροστατευτική δράση του σιδερίτη. Πιο συγκεκριμένα, χορηγήθηκε από του στόματος αφέψημα σιδερίτη για 6 μήνες και

παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση στη μείωση της οστικής πυκνότητας και αύξηση της οστικής δύναμης, χωρίς ταυτόχρονα να διεγείρεται η μήτρα. Αυτό σημαίνει ότι το αφέψημα έχει εκλεκτική οιστρογονική δράση και δεν οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων της μήτρας (Dontas et al., 2011).

2.2.5 *Sideritis scardica*

Βοτανολογική κατάταξη του *Sideritis scardica*

Φυλή: Lamieae

Υποοικογένεια: Lamioideae

Οικογένεια: Lamiaceae

Γένος: *Sideritis*

Τομέας: Empedoclea

Είδος: *Sideritis Scardica*



Το *Sideritis scardica* είναι ένα ενδημικό φυτό που αυτοφύεται στη Βαλκανική χερσόνησο και κυρίως στη Βουλγαρία, την Ελλάδα, την Αλβανία και την Πρώην Γιουγκοσλαβική Δημοκρατία της Μακεδονίας (ΠΓΔΜ). Το είδος αυτό ευδοκimeί στα βουνά της Νοτίου Βουλγαρίας και της Βόρειας Ελλάδος, σε υψόμετρο 1000 - 2000 μέτρα πάνω από το επίπεδο της θάλασσας (Trendafilova et al., 2013). Πρόκειται για ένα πολυετές ποώδες φυτό με ένα καλά ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα. Τα στελέχη του φυτού έχουν μήκος 15 - 40 cm, διακλαδισμένα ή / και μη διακλαδισμένα, και είναι ξυλώδη στη βάση. Τα φύλλα του είναι γκρι, χνουδωτά και τοποθετημένα αντίθετα. Τα άνθη τακτοποιούνται σε σπειροειδή διάταξη, πυκνά συγκεντρωμένα στο άνω μέρος του μίσχου. Επίσης, το φυτό έχει μεσαίου μήκους βράκτια, μήκους 12 - 20 mm, τα οποία όμως είναι μακρύτερα από τα άνθη. Τα άνθη είναι κίτρινου χρώματος και σωληνοειδούς μορφής. Το φυτό αναπαράγεται κυρίως με σπόρους, αλλά υπό συνθήκες καλλιέργειας, η αναπαραγωγή είναι εφικτή με διαίρεση των ριζωμάτων (Todorova and Trendafilova, 2014).

Παραδοσιακά, το είδος *Sideritis scardica* είχε ευρεία χρήση στους λαούς των προαναφερθέντων χωρών ως χαλαρωτικό για τη βρογχίτιδα και το βρογχικό άσθμα, έναντι του κοινού κρυολογήματος, του πνευμονικού εμφυσήματος, των αλλεργιών και της δυσπεψίας. Επίσης, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της φλεγμονής, των γαστρεντερικών διαταραχών και του βήχα, καθώς και ως συστατικό διατροφικών

συμπληρωμάτων για την πρόληψη της αναιμίας (Tadic et al., 2012, Konic-Ristic et al., 2013).

Μία σύντομη βιβλιογραφική ανασκόπηση από τους Trendafilova and Trendafilova (2014) έδειξε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη χημική σύσταση του *Sideritis scardica*, ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή όπου αναπτύχθηκαν. Ενδεικτικά, το αιθέριο έλαιο από ελληνικής προέλευσης φυτά αποτελείται κυρίως από μονοτερπένια (>80%), με βασικό εκπρόσωπο το α-πινένιο (52%), ενώ το αιθέριο έλαιο τούρκικης προέλευσης αποτελείται κυρίως από β-πινένιο (17,9%), καρβακρόλη (14,8%) και α-πινένιο (7,3%). Από την άλλη πλευρά, τα φυτά από την ΠΓΔΜ είναι φτωχά σε μονοτερπένια, αλλά πλούσια σε σισκετερπένια, με κύριο εκπρόσωπο το α-καδινόλη (20%) ενώ το αιθέριο έλαιο βουλγαρικής προέλευσης αποτελείται από διτερπένια (>21%), οκταδεκενόλη (>20%) ή σύμφωνα με άλλες μελέτες β-καρνοφυλλένιο (18,8%) και νερολιδόλη (12,2%). Επίσης, μερικά από τα φλαβονοειδή που περιέχει είναι η απιγενίνη και χρυσεριόλη, με την 5,7-OH φλαβόνη, χρυσεριόλη να αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό γνώρισμα του είδους και διαχωριστικού στοιχείου από άλλα είδη, όπως το *Sideritis raeseri* (Janeska et al., 2007). Τέλος, πολυφαινολικά συστατικά που έχουν ταχτοποιηθεί με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) είναι το φερουλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το βανιλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το συριγγικό οξύ και το πρωτοκατεχικό οξύ (Tadic et al., 2012a).

Επιπροσθέτως, μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με το περιεχόμενό του *Sideritis scardica* σε μέταλλα. Έχει βρεθεί ότι το K, το Mg, ο Fe και το Ca είναι τα μέταλλα που βρίσκονται σε αφθονία, ενώ οι συγκεντρώσεις των τοξικών συστατικών As (0,0 - 0,6 mg/Kg) και Pb (0,3 - 2,8 mg/Kg) δεν υπερέβαιναν τα όρια των 1 mg/Kg και 5 mg/Kg, αντιστοίχως, που θεωρούνται ασφαλή. Στο αφέψημα, ωστόσο, μόνο ο Μόλυβδος ήταν παρόν, σε συγκέντρωση (5,5 µg/200 mL). Σημειώνεται, ότι η υψηλότερη ανεκτή εβδομαδιαία ποσότητα κατανάλωσης Pb ανέρχεται στα 25 µg/Kg σωματικού βάρους, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Todorova et al., 2014).

Το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica* έχει προταθεί ως εναλλακτική αντικατάσταση του δημοφιλούς πράσινου τσαγιού (*Camellia sinensis*), καθώς και τα δύο εκχυλίσματα παρουσίασαν παρόμοια βιολογική δράση. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα του *Sideritis scardica* παρουσίασε συνολική αντιοξειδωτική δράση σε κυτταρικές σειρές (επαγωγή κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών και πρόληψη

του οξειδωτικού στρες), η οποία ήταν συγκρίσιμη με το πλούσιο σε κατεχίνες πράσινο τσάι. Το εύρημα αυτό ήταν ιδιαίτερα εντυπωσιακό μιας και το εκχύλισμα του σιδερίτη περιέχει το 18% του φαινολικού περιεχομένου του πράσινου τσαγιού και 10 φορές χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα *in vitro*. Συμπερασματικά, λοιπόν, το τσάι του βουνού μπορεί να παρουσιάσει παρόμοια οφέλη στην υγεία, παρά το πολύ διαφορετικό φαινολικό προφίλ και την έλλειψη κατεχινών, με το διάσημο πράσινο τσάι (Danesi et al., 2013).

Τα εκχυλίσματα του *Sideritis scardica* έχουν μελετηθεί ως προς την αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή τους ικανότητα. Η μελέτη των Tadic et al. (2012b) έδειξε ικανοποιητική αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων του βοτάνου, ενώ παρατηρήθηκε ότι τα κατά Gram θετικά βακτήρια είναι πιο επιρρεπή σε σχέση με τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια.

Επιπρόσθετα, το είδος *Sideritis scardica* έχει εξεταστεί και μεμονωμένα για κάποιες θεραπευτικές ιδιότητες. Πιο αναλυτικά, μελετήθηκε *in vitro* η επίδραση του εκχυλίσματος *Sideritis scardica* σε δείγματα αίματος από εθελοντές με μεταβολικό σύνδρομο, εξετάζοντας βιοδείκτες ενεργοποίησης και συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων. Παράλληλα, υπήρξε και ομάδα έλεγχου με υγιείς εθελοντές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα εμπόδισε και την ενεργοποίηση και τη συσσωμάτωση

Πίνακας 2.1: Ταυτοποιημένα συστατικά του εκχυλίσματος του *Sideritis scardica* (Tadic et al., 2012a)

N°	Trivial name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1.	Protocatechuic acid	na [*]	na	H	OH
2.	Chlorogenic acid (3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid)	OH	quinic acid 	na	na
3.	Vanillic acid	na	na	H	OCH ₃
4.	Caffeic acid	OH	H	na	na
5.	Syringic acid	na	na	OCH ₃	OCH ₃
6.	<i>p</i> -Coumaric acid	H	H	na	na
7.	Ferulic acid	OCH ₃	H	na	na

N°	Trivial name	R _{3'}	R _{4'}	R
8	Luteolin-7- <i>O</i> -β-glucoside	OH	OH	β-glucosyl 
9	Apigenin-7- <i>O</i> -β-glucoside	H	OH	β-glucosyl 
10	Luteolin	OH	OH	H
11	Chrysoeriol	OCH ₃	OH	H
12	Apigenin	H	OH	H

των αιμοπεταλίων στις δύο ομάδες, χωρίς όμως να παρατηρείται στατιστική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες. Ωστόσο, παραμένει μία χρήσιμη κλινική πληροφορία (Konic-Ristic et al., 2013). Επίσης, το *Sideritis scardica* χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων σιδηρίτη στους μονοαμινικούς μεταφορείς και την προσπάθεια να εξηγήσουν πιθανή ιατρική εφαρμογή του φαρμακευτικού προφίλ των εκχυλισμάτων. Μελέτησαν ex vivo την επίδραση του εκχυλίσματος στην επαναπρόσληψη της σεροτονίνης, νορεπινεφρίνης και ντοπαμίνης στις συνάψεις εγκεφάλων μυών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα του *Sideritis scardica* εμπόδιζαν την επαναπρόσληψη και των τριών νευροδιαβιβαστών με συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο και πρότειναν ότι θα μπορούσε επικουρικά να συνδράμει στην αντιμετώπιση ψυχικών διαταραχών που σχετίζονται με τη δυσλειτουργία των μονοαμίνων νευροδιαβιβαστών, όπως οι διαταραχές άγχους, η κατάθλιψη, το σύνδρομο ελλειμματικής διαταραχής και υπερκινητικότητας ή άλλων νευροεκφυλιστικών διαταραχών (Knorle, 2012). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την in vivo μελέτη του εκχυλίσματος *Sideritis scardica*, η οποία προτείνει πως το εκχύλισμα του βοτάνου μπορεί να λειτουργήσει ως ψυχοδιεγερτικό και αντικαταθλιπτικό (Dimpfel, 2013). Τέλος, η μελέτη των Tadic et al. (2012a) ερευνήσε τις αντιφλεγμονώδεις, γαστροπροστατευικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες του εκχυλίσματος του *Sideritis scardica*. Αρχικά, προκάλεσαν, χημικώς, οίδημα στα πόδια επίμυων με τη χρήση καραγενάνης και έπειτα χορήγησαν το εκχύλισμα του σιδηρίτη. Η τελική ιστολογική ανάλυση έδειξε ότι τα εκχυλίσματα είχαν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, που εκδηλωνόταν δοσο-εξαρτώμενα. Επιπλέον, για να ερευνήσουν τη γαστροπροστατευική δράση, προκάλεσαν έλκος σε επίμυες, με τη χρήση αιθανόλης. Και σε αυτή την περίπτωση, τα εκχυλίσματα υπέδειξαν ισχυρή γαστροπροστατευική δράση, η οποία ήταν δοσο-εξαρτώμενη και μερικές δόσεις ήταν σημαντικά πιο αποτελεσματικές από το φάρμακο αναφοράς, ρανιτιδίνη. Στη συνέχεια, μελέτησαν και ανέδειξαν την αντιφλεγμονώδη δράση των εκχυλισμάτων in vivo, η οποία ήταν ίδιου επιπέδου με τα φάρμακα αναφοράς δομεθακίνη. Τελικά, μελέτησαν την κυτταροτοξική δράση σε καρκινικές σειρές κυττάρων, και παρατήρησαν ότι τα συστατικά του *Sideritis scardica*, απιγενίνη και λουτεολίνη, μεμονωμένα, είχαν αξιόλογη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα και επήγαγαν την απόπτωση σε ανθρώπινα κύτταρα λευχαιμίας. Οι ιδιότητες αυτές αποδόθηκαν στο υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων και στην ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες.

Πρόσφατα, μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος του *Sideritis scardica* στις ικανότητες μνήμης μυών. Οι ερευνητές βρήκαν πως τα αποτελέσματα των τεστ συμπεριφοράς μυών με νόσο Alzheimer, τα οποία λάμβαναν το εκχύλισμα, εν συγκρίσει με αυτά που δεν λάμβαναν, συσχετίστηκαν με τα ιστολογικά ευρήματα (μείωση του αμυλοειδούς κατά 55%) (Bjoern et al., 2013) .

Πίνακας 2.2: Φλαβονοειδή και φαινολικά συστατικά που έχουν ανιχνευθεί στο *Sideritis scardica* (Todorova et al., 2014)

Compound
Phenylethanoid glycosides
Echinacoside (8)
Lavandulifolioside (9)
Verbascoside (10)
Forsythoside A (11)
Isoverbascoside (12)
Samioside (13)
Allysonoside (14)
Leucoseptoside A (15)
Flavonoids
Hypolaetin 7-O-allosyl(1→2)glucoside (16)
Isoscutellarein 7-O-allosyl(1→2)glucoside (17)
4'-O-Methylisoscutellarein 7-O-allosyl(1→2)glucoside (18)
Apigenin 7-O-allosyl(1→2)glucoside (19)
Isoscutellarein 7-O-allosyl-(1→2)-[6''-O-acetyl]-glucoside (20)
Hypolaetin 7-O-allosyl-(1→2)-[6''-O-acetyl]-glucoside (21)
Hypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl(1→2) glucoside (22)
Luteolin 7-O-allosyl-(1→2)-[6''-O-acetyl]-glucoside (23)
Apigenin 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl(1→2)glucoside (24)
Luteolin 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl(1→2)glucoside (25)
Chryseriol 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl(1→2)glucoside (26)
Isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl (1→2)glucoside (27)
3'-O-Methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl (1→2)glucoside (28)
Luteolin 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl-(1→2)-[6''-O-acetyl]-glucoside (29)
4'-O-Methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl (1→2)glucoside (30)
Hypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl-(1→2)-[6''-O-acetyl]-glucoside (31)
4'-O-Methylisoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl (1→2)glucoside (32)
Isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl-(1→2)-[6''-O-acetyl]-glucoside (33)
3'-O-Methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl-(1→2)-[6''-O-acetyl]-glucoside (34)
4'-O-Methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl-(1→2)-[6''-O-acetyl]-glucoside (35)
4'-O-Methylisoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl-(1→2)-[6''-O-acetyl]-glucoside (36)
Luteolin 7-O-allosyl(1→2)glucoside (37)
3'-O-Methylhypolaetin 7-O-allosyl(1→2)glucoside(38)
Isoscutellarein 7-O-[2'''',6'''-di-O-acetyl]-allosyl(1→2)glucoside (39)
3'-O-Methylhypolaetin 7-O-[2'''',6'''-di-O-acetyl]-allosyl(1→2)glucoside (40)
Hypolaetin 7-O-[2'''',6'''-di-O-acetyl]-allosyl(1→2)glucoside (41)
Apigenin
Luteolin
Chrysoeriol
Apigenin 7-O-β-glucoside
Apigenin 7-O-(6"-p-coumaroyl)glucoside)
Apigenin 7-O-(4"-p-coumaroyl)glucoside)
Luteolin-7-O-β-glucoside
Phenolic acids
Protocatechuic acid
Chlorogenic acid
Vanillic acid
Caffeic acid
Syringic acid
p-Coumaric acid
Ferulic acid
3-Caffeoylquinic acid
5-Caffeoylquinic acid
Feruloylquinic acid
p-Coumaric acid 4-O-glucoside

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ

Η χρήση των κυκλοδεξτρινών στη βιομηχανία τροφίμων κερδίζει συνεχώς έδαφος λόγω της εξαιρετικής ικανότητας που έχουν να εγκλείουν βιοδραστικά συστατικά στην κοιλότητά τους, παρέχοντάς τους με αυτό τον τρόπο προστασία και ελεγχόμενη απελευθέρωση. Η χρήση των κυκλοδεξτρινών έχει προταθεί για τη μεταφορά διατροφολογικών συστατικών σε λειτουργικά τρόφιμα, με οφέλη για την υγεία του γενικού πληθυσμού. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το φυσικό εκχύλισμα του σιδερίτη, το οποίο κατέχει σημαντική θέση στην παραδοσιακή ιατρική πολλών λαών και αναμφισβήτητα διαθέτει πολλές ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας και της απόδοσης της «πράσινης εκχύλισης» του *Sideritis scardica* με χρήση κυκλοδεξτρινών και της παράλληλης μικροενθυλάκωσης των συστατικών του. Επιπλέον, να εξετασθεί η ενθυλάκωση του εκχυλίσματος *Sideritis scardica* σε τροποποιημένο άμυλο, καθώς και η διπλή ενθυλάκωσή του σε HP-β-CD και τροποποιημένο άμυλο.

Για τον σκοπό αυτό, θα πραγματοποιηθεί εκχύλιση του *Sideritis scardica* με μέσα εκχύλισης το νερό και υδατικά διαλύματα β-CD και HP-β-CD διαφόρων συγκεντρώσεων. Το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica* θα εξετασθεί ως προς τα φαινολικά του συστατικά με Αέρια Χρωματογραφία (GC-MS). Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί φωτομετρικός προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των διαφόρων εκχυλισμάτων και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Επιπλέον, για τη μελέτη της επιβεβαίωσης της μικροενθυλάκωσης στις υδρόφοβες κοιλότητες των β-CD και HP-β-CD θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης σε αναγωγικές και οξειδωτικές συνθήκες.

Όσον αφορά τη μελέτη της ενθυλάκωσης του εκχυλίσματος σιδερίτη σε τροποποιημένο άμυλο και τη διπλή ενθυλάκωσή του σε HP-β-CD και τροποποιημένο άμυλο, θα μελετηθεί η σταθερότητα σε οξειδωτικές συνθήκες με τη μέθοδο της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Παραλαβή εκχυλισμάτων σιδερίτη (*Sideritis scardica*)

Σκοπός

Η εκχύλιση των συστατικών του *Sideritis scardica* και παραλαβή του εκχυλίσματος. Τα μέσα εκχύλισης που χρησιμοποιούνται είναι το απιονισμένο νερό, υδατικά διαλύματα β-κυκλοδεξτρίνης (β-CD) συγκέντρωσης 8 mM και 16 mM και υδατικό διάλυμα υδροξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (HP-β-CD) συγκέντρωσης 27 mM. Η αναλογία σιδερίτη/μέσου εκχύλισης κατά την εκχύλιση είναι 1/10 (g/mL).

Υλικά - Αντιδραστήρια

- Υπέργεια τμήματα *Sideritis scardica*
- Απιονισμένο νερό
- β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Υδροξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD) (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)

Όργανα

- Ογκομετρικός κύλινδρος του 1L
- Κατσαρόλα
- Ζυγός ακριβείας, τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (OHAUS)
- Ηλεκτρική κουζίνα (PITSOS, Uniflam POP, 7680 PK)
- Φίλτρα- ηθμοί διήθησης
- Ποτήρι ζέσεως των 400 mL
- Ουροσυλλέκτες
- Parafilm

Αναλυτική διαδικασία

Ογκομετρείται 1 L απιονισμένου νερού και προστίθεται στην κατσαρόλα. Στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων β -CD και HP- β -CD γίνεται πρώτα η διάλυσή τους στο απιονισμένο νερό. Συγκεκριμένα, για την επίτευξη παρασκευής υδατικών διαλυμάτων β -CD συγκέντρωσης 8 mM και 16 mM προστίθενται 9,25 g και 18,5 g β -CD σε 1 L απιονισμένο νερό αντίστοιχα, ενώ για το υδατικό διάλυμα HP- β -CD συγκέντρωσης 27 mM προστίθενται 37 g HP- β -CD σε 1 L απιονισμένο νερό. Η πλήρης διάλυσή τους πραγματοποιείται με τη βοήθεια θέρμανσης. Στη συνέχεια, στην κατσαρόλα προστίθενται τα 100 g των υπέργειων τμημάτων του σιδερίτη και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού του νερού. Το μίγμα βράζει για 3 min και έπειτα η κατσαρόλα αποσύρεται από την εστία θέρμανσης. Ακολουθεί διήθηση του εκχυλίσματος μέσω ηθμού διήθησης και το εκχύλισμα συγκεντρώνεται προσωρινά σε ένα ποτήρι ζέσεως. Τέλος, τα εκχυλίσματα ογκομετρούνται στον ογκομετρικό κύλινδρο, φυλάσσονται σε ουροσυλλέκτες, αεροστεγώς κλεισμένους με parafilm και αποθηκεύονται σε θάλαμο κατάψυξης (-40°C) σε συνθήκες σκότους. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές.

3.2 Εκχύλιση πολυφαινολών από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica* σε διφασικό υγρό σύστημα

Σκοπός

Η διαδοχική εκχύλιση και παραλαβή των απλών φαινολικών ενώσεων του υδατικού εκχυλίσματος του σιδερίτη. Ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται ως διαλύτης, λόγω της διττής ικανότητάς του να παρασύρει τις φαινολικές ενώσεις και να σχηματίζει διφασικό υγρό σύστημα με το νερό.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- Οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate) εργαστηρίου αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Υδατικό εκχύλισμα *Sideritis scardica*

- ο Μεθανόλη εργαστηρίου αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)

Όργανα

- ο Γυάλινες διαχωριστικές χοάνες με στρόφιγγα
- ο Πώμα
- ο Ογκομετρικός κύλινδρος 100 mL
- ο Γυάλινο χωνί
- ο Σφαιρικές φιάλες 250 mL
- ο Ποτήρια ζέσεως των 200 mL
- ο Πιπέτα 100-1000 μ L (Eppendorf Reference)
- ο Tips πιπέτας
- ο Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotary evaporator)
- ο Σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό (Speed vac, CentriVac Concentrator LABCONCO)
- ο Δοκιμαστικοί σωλήνες

Αναλυτική πορεία

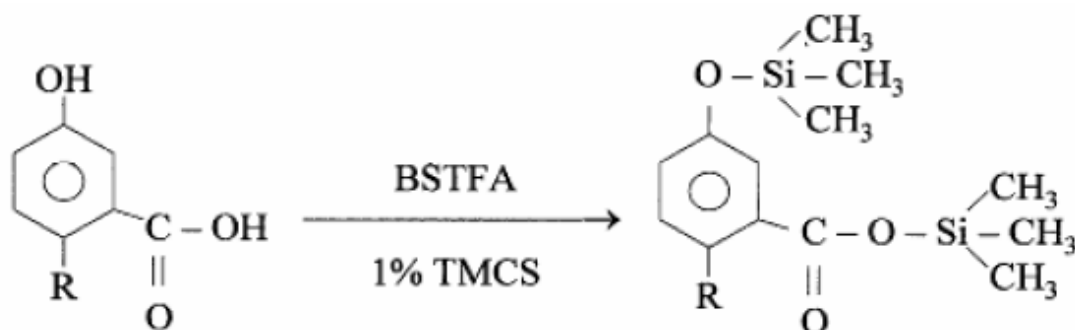
Στις δύο διαχωριστικές χοάνες τοποθετούνται 50 mL του υδατικού εκχυλίσματος του *Sideritis scardica*. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται τέσσερις διαδοχικές εκχυλίσεις με διαλύτη τον οξικό αιθυλεστέρα. Συγκεκριμένα, στα 50 mL του υδατικού εκχυλίσματος της κάθε διαχωριστικής χοάνης, προστίθενται 50 mL οξικού αιθυλεστέρα και ανακινούνται. Έπειτα, ανοίγεται τη στρόφιγγα ώστε να απαλλαχθεί το σύστημα από την υπερπίεση που δημιουργήθηκε, εξαιτίας των ατμών του διαλύτη. Η στρόφιγγα κλείνει και ανακινείται εκ νέου, έως ότου δεν δημιουργείται υπερπίεση. Εν συνεχεία, εφόσον δημιουργηθεί το διαφανικό υγρό σύστημα, συλλέγεται προσωρινώς το υποκείμενο υδατικό εκχύλισμα σε ένα ποτήρι ζέσεως, ενώ η υπερκείμενη φάση με τον οξικό αιθυλεστέρα και τα φαινολικά συστατικά συλλέγεται στη σφαιρική φιάλη. Το υδατικό διάλυμα επανατοποθετείται στη διαχωριστική χοάνη και ακολουθείται η ίδια διαδικασία άλλες τρεις φορές (συνολικά τέσσερις φορές). Κάθε φορά η υπερκείμενη φάση συλλέγεται στην ίδια γυάλινη φιάλη.

Εφόσον, συλλεχθεί η υπερκείμενη φάση στις δύο σφαιρικές φιάλες, οι φιάλες τοποθετούνται στον περιστροφικό εξατμιστήρα, έως ότου παραμείνουν λίγα mL. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα με οξικού αιθυλεστέρα τοποθετείται στους δοκιμαστικούς σωλήνες με την πιπέτα και εξατμίζεται έως ξηρού στο σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό. Τέλος, στο ξηρό εκχύλισμα τοποθετείται 1 mL μεθανόλης και επαναδιαλύεται.

3.3 Αντίδραση σιλυλίωσης

Σκοπός

Η αντίδραση της σιλυλίωσης καθιστά δυνατή τη μετατροπή ουσιών, όπως οι πολυφαινόλες, στα πτητικά τους παράγωγα. Οι πολυφαινόλες είναι μη πτητικές ουσίες, οι οποίες σε αντίθετη περίπτωση, θα κατακρατούνταν από τη στήλη της Αέριας Χρωματογραφίας. Η αντίδραση σιλυλίωσης περιλαμβάνει τη μετατροπή των $-OH$ σε αιθερομάδες και τη μετατροπή των $-COOH$ σε εστερομάδες, σύμφωνα με την αντίδραση:



Σχήμα 3.1: Απεικόνιση αντίδραση σιλυλίωσης

Υλικά – Αντιδραστήρια

- Εσωτερικό πρότυπο πολυφαινολών (3-(4-δρόξυ-φαίνυλο)-1-προπανόλη)
- Δι (τριμεθυλοσιλυλο)- τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA)
- Μεθανολικό διάλυμα πολυφαινολών του σιδερίτη

Όργανα

- ο Πιπέτα 100-100 0μL (Eppendorf Reference)
- ο Tips πιπέτας
- ο Φιαλίδια (Vials)- πώματα των vials
- ο Σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό (Speed vac, CentriVac Concentrator LABCONCO)
- ο Δοκιμαστικοί σωλήνες
- ο Συσκευή Vortex (VELD Scientifica)
- ο Υδατόλουτρο (Mettmert)

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, τοποθετείται στο vial εσωτερικό πρότυπο πολυφαινολών όγκου 50 μL και μεθανολικό διάλυμα των πολυφαινολών του σιδερίτη όγκου 50 μL. Το vial τοποθετείται στη συσκευή Speedvac, ώστε να εξατμιστεί η μεθανόλη. Μετά την ξήρανση, το vial τοποθετείται στον απαγωγό, προστίθενται 250 μL BSTFA και πωματίζεται. Ακολουθεί ανάδευση στη συσκευή vortex. Στη συνέχεια, τα vials τοποθετούνται στους δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς καπάκι και επωάζονται σε υδατόλουτρο για 20 min στους 75°C, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση της σιλυλίωσης.

3.4 Προσδιορισμός των επιμέρους πολυφαινολών

Σκοπός

Ο προσδιορισμός των επιμέρους πολυφαινολικών συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος του *Sideritis scardica*.

Υλικά – Αντιδραστήρια

- ο Σιλυλιωμένα δείγματα εκχυλίσματος σιδερίτη

Όργανα

- ο Συσκευή Αέριας Χρωματογραφίας- Φασματοσκοπίας Μάζας (GC-MS)

Αναλυτική πορεία

Η Αέρια Χρωματογραφία χρησιμοποιείται για τον επιμέρους διαχωρισμό των πολυφαινολικών συστατικών, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με φασματογράφο μάζας με την τεχνική της εκλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM, Selective Ion Monitoring) (Kalogeropoulos et al., 2009). Οι συνθήκες αέριας χρωματογραφίας ήταν:

- Θερμοκρασία: 250°C
- Θερμοκρασία γραμμής μεταφοράς του δείγματος από την αεριοχρωματογραφική στήλη στον ανιχνευτή MSD (MSD transfer line): 300°C
- Όγκος δείγματος: 1 μ L
- Φέρον αέριο: υψηλής καθαρότητας He με ροή 6mL/min
- Αναλογία αραίωσης δείγματος με φέρον αέριο (split ratio): 20:1
- Στήλη: τριχοειδής στήλη HS-5 MS με επικάλυψη 5% phenyl-95%methyl siloxane, μήκους 30 m, με εσωτερική διάμετρο 0,25mm και πάχος εσωτερικής επίστρωσης 0,25 μ m
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου του αεριοχρωματογράφου: (α) 70°C για 5min, (β) 70-130°C με ρυθμό ανόδου 15°C/min, (γ) 130-160°C με ρυθμό ανόδου 4°C/min, (δ) άνοδος από 160-300°C με ρυθμό 10°C/min και (ε) παραμονή στην τελική θερμοκρασία για 15 min.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο εσωτερικού προτύπου (3-(4-υδροξυφαίνυλο) -1- προπανόλη. Η ανίχνευση των πολυφαινολών βασίζεται στην παρουσία των επιλεγμένων προς σάρωση ιόντων, με ανοχή $\pm 0,05$ RT, όπου RT ο χρόνος κατακράτησης. Οι ποσοτικοί υπολογισμοί γίνονται βάσει των ιόντων στόχων (target ions), ενώ χρησιμοποιούνται και 1-2 ιόντα επιβεβαίωσης (qualifier ions), των οποίων η αναλογία σημάτων επιβεβαιώνει ή απορρίπτει την

υπόθεση ταυτοποίησης του κάθε πολυφαινολικού συστατικού. Επίσης, ως τελική τιμή των πολυφαινολών χρησιμοποιείται ο μέσος όρος των δύο επιμέρους αποτελεσμάτων.

3.5 Ξήρανση των εκχυλισμάτων σιδερίτη

Σκοπός

Τα υδατικά διαλύματα υποβάλλονται σε λυοφιλίωση με στόχο την απομάκρυνση της υγρασίας. Η λυοφιλίωση είναι η πιο αποτελεσματική τεχνική για την προστασία ευπαθών μορίων από τη χημική αποικοδόμηση διότι η χαμηλή θερμοκρασία που επικρατεί και η μειωμένη υγρασία, ελαττώνει την απώλεια βιοδραστικότητας. Η μικροενθυλάκωση με λυοφιλίωση προστατεύει την εγκλεισμένη ουσία εντός του εξωτερικού καλύμματος διατηρώντας τη βιοδραστικότητα και ελέγχοντας την απελευθέρωσή του (de Rosa et al., 2013).

Η παραλαβή των συστατικών του σιδερίτη σε μορφή σκόνης, διευκολύνει τη συντήρησή τους, καθώς και τη χρήση τους σε επόμενες φυσικοχημικές αναλύσεις.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- Εκχυλίσματα *Sideritis scardica* με διαλύτες το απιονισμένο νερό, υδατικά διαλύματα β-CD συγκέντρωσης 8 mM και 16 mM και υδατικό διάλυμα HP-β-CD συγκέντρωσης 27 mM.

Όργανα

- Συσκευή λυοφιλίωσης
- Γουδί από πορσελάνη
- Γουδοχέρι από πορσελάνη
- Ουροσυλλέκτες
- Parafilm

Αναλυτική διαδικασία

Τα διάφορα εκχυλίσματα τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -40°C για μία ημέρα. Στη συνέχεια, οδηγούνται στη διάταξη της λυοφιλίωσης, και με την πάροδο 4 ημερών, παραλαμβάνονται τα εκχυλίσματα του σιδερίτη σε μορφή σκόνης. Τα λυοφιλωμένα προϊόντα κονιορτοποιούνται στο γουδί και επανατοποθετούνται στους ουροσυλλέκτες, όπου σφραγίζονται αεροσταγώς με parafilm.

3.6 Φωτομετρικός προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Σκοπός

Ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με διαλύτες το απιονισμένο νερό, τα υδατικά διαλύματα β -CD συγκέντρωσης 8 mM και 16 mM και το υδατικό διάλυμα HP- β -CD συγκέντρωσης 27 mM.

Αρχή μεθόδου

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ολικού φαινολικού φορτίου των εκχυλισμάτων χρησιμοποιείται η φωτομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu, η οποία βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Πιο συγκεκριμένα, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων, πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων του αντιδραστήριου. Κατά την οξείδωση των φαινολικών συστατικών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το προϊόν της αντίδρασης είναι ένα σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραιμίου χαρακτηριστικού μπλε χρώματος που απορροφά στην περιοχή του ορατού (750 nm) και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Το αλκαλικό περιβάλλον που είναι απαραίτητο για τη βέλτιστη πραγματοποίηση της αντίδρασης ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού

νατρίου (Na_2CO_3). Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, έπειτα από την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς, και συγκεκριμένα σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος / mL εκχυλίσματος σιδερίτη.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany)
- Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού οξέος (Na_2CO_3 , 20%w/v)
- Μεθανόλη εργαστηρίου αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Απιονισμένο νερό
- Πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος (Gallic acid, GA) (Sigma Aldrich)
- Εκχυλίσματα *Sideritis scardica*

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (OHAU)
- Φυγόκεντρος
- Συσκευή Vortex (VELD scientifica)
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (Analytic Jena - Specord 200)
- Πιπέτα 100-1000 μL (Eppendorf Reference)
- Πιπέτα 10-100 μL (Hirschmann Laborgerate)
- Tips πιπετών
- Eppendorfs των 1,5 mL
- Ογκομετρική φιάλη των 100 mL
- Κυψελίδες

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, σε ένα Eppendorf τοποθετούνται 790 μL απιονισμένου νερού, 10 μL αραιωμένου εκχυλίσματος και 50 μL του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Στη συνέχεια, ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex και προστίθενται επιπλέον 150 μL κορεσμένου ανθρακικού διαλύματος (Na_2CO_3 , 20% w/v). Ακολουθεί και δεύτερη

ανάδευση στη συσκευή vortex. Για τον τυφλό προσδιορισμό, τηρείται ακριβώς η ίδια διαδικασία, με την ειδοποιό διαφορά πως στη θέση του αραιωμένου εκχυλίσματος, προστίθεται ίση ποσότητα του διαλύτη του εκχυλίσματος, δηλαδή 10 μL απιονισμένου νερού. Η παρασκευή των δειγμάτων γίνεται εις τριπλούν, με στόχο την αύξηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Τα δείγματα φυλάσσονται σε σκιερό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου για 120 min. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης των φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu φωτομετρείται στα 750 nm ως προς το τυφλό δείγμα. Τέλος, για την εύρεση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος και τα τελικά αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg GAE/mL εκχυλίσματος σιδερίτη).

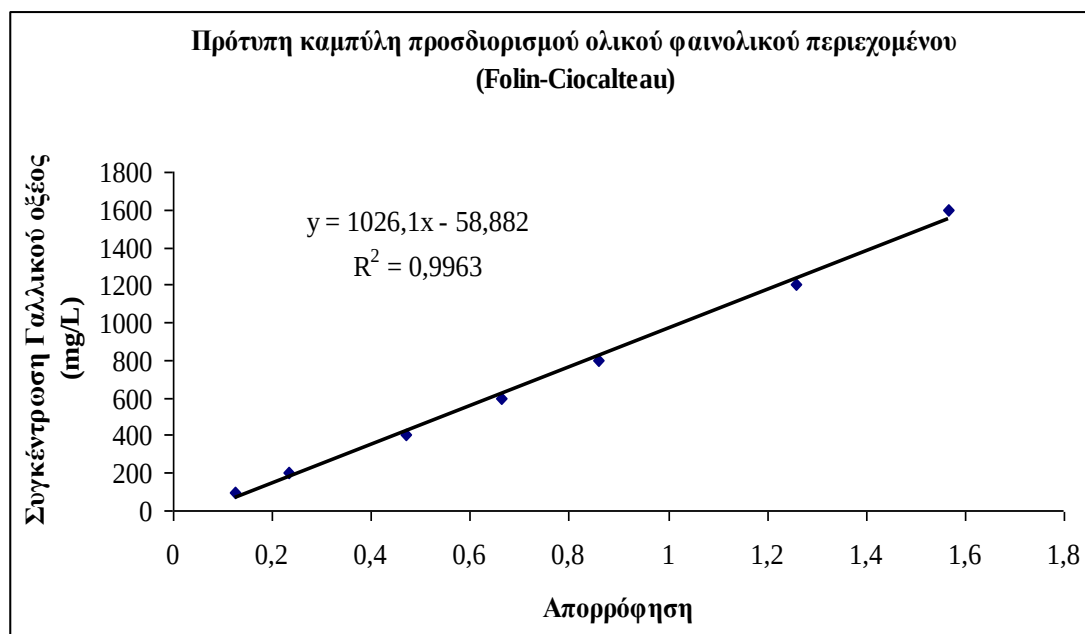
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος:

Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 1600 mg/L. Πιο αναλυτικά, σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 0,16 g γαλλικού οξέος και διαλύονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με 100 mL αιθανόλη. Στη συνέχεια, ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις ώστε να προκύψουν διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος, όπως φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 3.1 : Διαδοχικές αραιώσεις γαλλικού οξέος και τελικές συγκεντρώσεις του κάθε διαλύματος

Αραιώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
0,16 g + 100 mL αιθανόλη	1600 mg/L
750 μL (1600 mg/L) + 250 μL αιθανόλη	1200 mg/L
500 μL (1600 mg/L) + 500 μL αιθανόλη	800 mg/L
500 μL (1200 mg/L) + 500 μL αιθανόλη	600 mg/L
500 μL (800 mg/L) + 500 μL αιθανόλη	400 mg/L
500 μL (400 mg/L) + 500 μL αιθανόλη	200 mg/L
500 μL (200 mg/L) + 500 μL αιθανόλη	100 mg/L

Τα δείγματα αυτά φωτομετρούνται στα 750 nm. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η απορρόφηση στα 750 nm και ψ η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος σε mg/L.



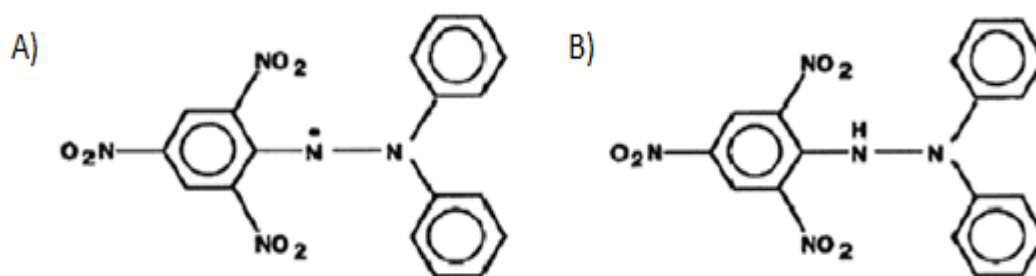
Σχήμα 3.2: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση γαλλικού οξέος (mg/L)

3.7 Μελέτη ικανότητας δέσμευσης της 2,2-διφαινυλο-1-πικρυδραζύλιο ελεύθερης ρίζας DPPH[•]

Αρχή μεθόδου

Για τον υπολογισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DPPH[•]. Η μέθοδος DPPH βασίζεται στην δέσμευση ελεύθερων ριζών DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-διφαινυλο-1-πικρυδραζύλιο). Πιο συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες DPPH[•] χαρακτηρίζονται ως σταθερές ελεύθερες ρίζες με την ιδιότητα του απεντοπισμού του ελεύθερου ηλεκτρονίου σε ολόκληρο το μόριο, με αποτέλεσμα το μόριο να μη διασπάται. Επιπρόσθετα, ο απεντοπισμός του ελεύθερου ηλεκτρονίου δημιουργεί το σκούρο μωβ χρώμα, με απορρόφηση σε μεθανολικό διάλυμα στα 515 nm. Η αντίδραση των ελευθέρων ριζών με ουσία που μπορεί να δωρίσει ένα άτομο H προκαλεί μείωση του σκούρου μωβ χρώματος. Με

άλλα λόγια, η αντίδραση του αντιδραστηρίου με ουσίες που διαθέτουν με αντιοξειδωτική ικανότητα οδηγεί στον αποχρωματισμό του αρχικού σκούρου μωβ χρώματος. Το DPPH[•] μπορεί να δεσμεύσει εύκολα το ελεύθερο ηλεκτρόνιο ή ιόν υδρογόνου για να γίνει ένα σταθερό μόριο. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το DPPH[•] εμφανίζει την υψηλότερη απορρόφηση στα 515 nm, ενώ το σκούρο μωβ χρώμα αποχρωματίζεται παράλληλα με την αναγωγή του από τις αντιοξειδωτικές ουσίες. Ο αποχρωματισμός του αντιδραστηρίου είναι στοιχειομετρικός, δηλαδή όσες περισσότερες ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα συστατικά του εκχυλίσματος και δεσμεύονται, τόσο μεγαλύτερος θα είναι και ο αποχρωματισμός (Kedare et al., 2011). Τέλος, ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλίσμάτων βασίζεται σε πρότυπη καμπύλη αναφοράς, όπου χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα Trolox (ανάλογο βιταμίνης E), και τα τελικά αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox (mg TE/mL εκχυλίσματος σιδερίτη)



Σχήμα 3.3: A) Ελεύθερη ρίζα DPPH, B) Δεσμευμένη ρίζα DPPH

Υλικά - Αντιδραστήρια

- DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Trolox (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Μεθανόλη εργαστηρίου αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany)
- Απιονισμένο νερό
- Εκχυλίσματα *Sideritis scardica*

Όργανα

- Ζυγός ακριβείας, τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (OHAUS)
- Φυγόκεντρος
- Συσκευή Vortex (VELD Scientifica)
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (Analyticjena Specord 200)
- Πιπέτα 100-1000 μL (Eppendorf Reference)
- Πιπέτα 10-100 μL (Hirschmann Laborgerate)
- Tips πιπετών
- Eppendorfs των 1,5 mL
- Ογκομετρική φιάλη των 250 mL
- Κυψελίδες

Αναλυτική πορεία

Πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η παρασκευή διαλύματος DPPH[•] συγκέντρωσης 100 μM . Αρχικά, ζυγίζονται στο ζυγό ακριβείας 0,0099 g DPPH[•] και διαλύονται σε 250 mL μεθανόλης. Το διάλυμα φυλάσσεται στην κατάψυξη. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται τα δείγματα των πρότυπων διαλυμάτων Trolox, καθώς και των εκχυλισμάτων. Σε ένα Eppendorf τοποθετούνται 25 μL αραιωμένου εκχυλίσματος και 975 μL διαλύματος DPPH[•]. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex. Κάθε δείγμα παρασκευάζεται τρεις φορές με στόχο της αύξησης της αξιοπιστίας των τιμών των απορροφήσεων. Τα Eppendorfs με τα δείγματα παραμένουν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 min.

Επόμενο βήμα είναι η φωτομέτρηση των δειγμάτων. Τα δείγματα τοποθετούνται σε κυψελίδες και η φωτομέτρηση πραγματοποιείται στα 515 nm. Για το σταντάρισμα του φωτομέτρου χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης μεθανόλη, ενώ έγινε και μέτρηση απορρόφησης δείγματος που περιείχε μόνο DPPH[•]. Η μέτρηση αυτή χρησιμεύει ως τυφλό δείγμα στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια, γίνεται η φωτομέτρηση των υπόλοιπων δειγμάτων.

Οι τιμές της απορρόφησης για κάθε δείγμα προσαρμόζονται στον μαθηματικό τύπο που αναφέρεται παρακάτω, ώστε να υπολογιστεί η επί τοις εκατό μείωση των ελεύθερων ριζών DPPH[•], δηλαδή το ποσοστό των ριζών που δεσμεύθηκε:

$$\%DPPH\cdot_{\text{μείωση}} = \% \Delta A_{515} = ((A_{DPPH\cdot} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{DPPH\cdot}) * 100$$

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων της απορρόφησης, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με Trolox (ισοδύναμο βιταμίνης E) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox, και συγκεκριμένα σε mg TE/mL εκχυλίσματος σιδερίτη.

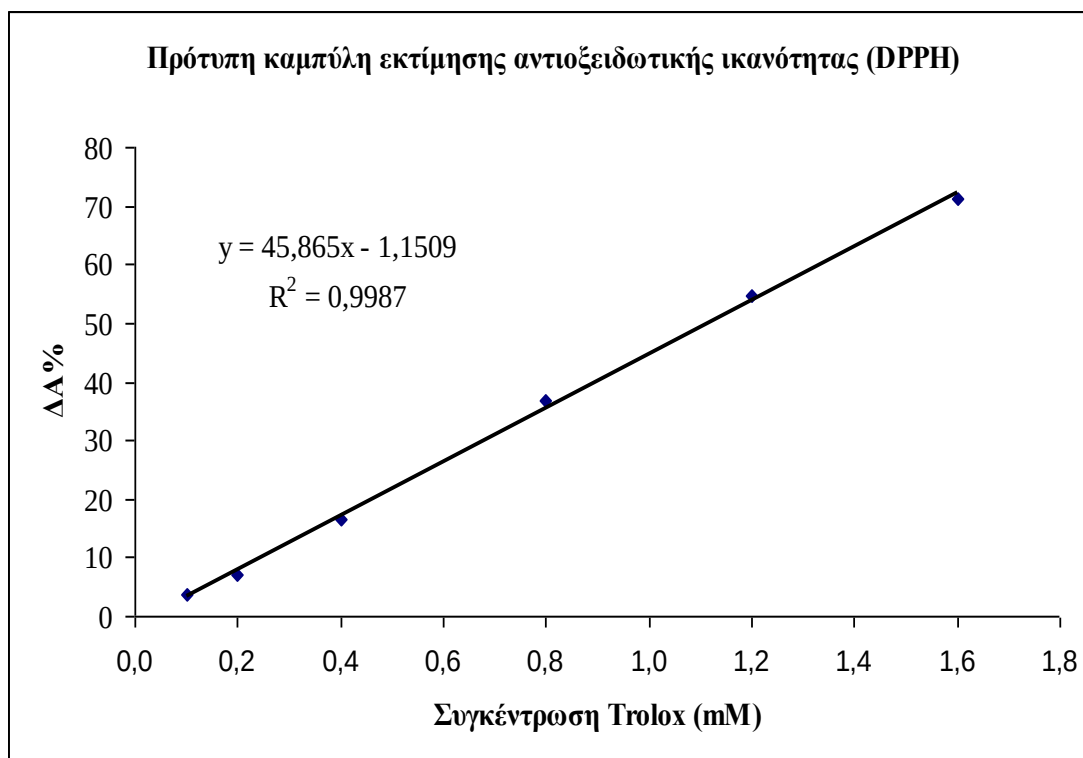
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα Trolox, ποικίλων συγκεντρώσεων. Αναλυτικά, ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας 0,04 g Trolox και διαλύονται σε 100mL μεθανόλης (MeOH). Η συγκέντρωση του διαλύματος που προκύπτει είναι 1,6 mM. Στη συνέχεια, ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.2: Διαδοχικές αραιώσεις Trolox και τελικές συγκεντρώσεις του κάθε διαλύματος

Αραίωση	Τελική συγκέντρωση
750 μL 1,6 mM+ 250 μL MeOH	1,2 mM
500 μL 1,6 mM+ 500 μL MeOH	0,8 mM
500 μL 0,8 mM+ 500 μL MeOH	0,4 mM
500 μL 0,4 mM+ 500 μL MeOH	0,2 mM
500μL 0,2 mM+ 500 μL MeOH	0,1 mM

Στη συνέχεια, γίνεται η παρασκευή των δειγμάτων Trolox με προσθήκη μεθανολικού διαλύματος DPPH $\cdot$, με τον τρόπο που έχει αναφερθεί παραπάνω, φωτομετρώνται στα 515 nm και υπολογίζεται η %ΔΑ. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η συγκέντρωση των ισοδυνάμων Trolox (mM) και ψ η ΔΑ%. Στο τέλος, κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη.



Σχήμα 3.4: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της $\Delta A\%$ σε συνάρτηση με την συγκέντρωση Trolox (mM)

3.8 Ενθυλάκωση εκχυλίσματος σιδερίτη σε τροποποιημένο άμυλο με τεχνική ξήρανσης με ψεκασμό

Σκοπός

Ο εγκλεισμός συστατικών σιδερίτη σε οκτενυλο-ηλεκτρικό τροποποιημένο άμυλο (Modified Starch, MS).

Υλικά - Αντιδραστήρια

- Απιονισμένο νερό
- Τροποποιημένο άμυλο με ομάδες οκτενυλο-ηλεκτρικού ανυδρίτη (Cargill, Inc., Cedar Rapids, IA, USA)
- Λυοφιλωμένα εκχυλίσματα *Sideritis scardica* με διαλύτη το απιονισμένο νερό και το υδατικό διάλυμα HP-β-CD συγκέντρωσης 27 mM

- ο Γαλακτωματοποιητής Tween 80 (Merck, Steinheim, Germany)

Όργανα

- ο Ζυγός ακριβείας, τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (OHAUS)
- ο Ομογενοποιητής (IKA ULTRA-TURRAX T25)
- ο Συσκευή Spray drying (BUCHI Mini Spray Dryer B-191)
- ο Ποτήρι ζέσεως 200 ml
- ο Κωνική φιάλη 500 ml

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, σε ποτήρι ζέσεως, ζυγίζονται 20 g τροποποιημένου αμύλου και προστίθενται 50 ml απιονισμένο νερό. Η πλήρης διάλυση του αμύλου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος γίνεται έπειτα από 2 ημέρες. Στη συνέχεια προστίθεται στο διάλυμα ποσότητα 1 g εκχυλίσματος *Sideritis scardica* σε μορφή σκόνης και μερικές σταγόνες γαλακτωματοποιητή Tween 80. Γίνεται ομογενοποίηση του διαλύματος για 1 min στις 9500 rpm με τον ομογενοποιητή Ultra-Turrax. Το νερό απομακρύνεται από το γαλάκτωμα με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό. Οι συνθήκες λειτουργίας της συσκευής ορίζονται ως εξής:

- μέγιστη ροή ατμοσφαιρικού αέρα: 35 m³/h
- θερμοκρασία εισερχόμενου αέρα: 135°C
- πίεση αέρα: 5-8 bar
- ρυθμός παροχής αέρα στο θερμαινόμενο θάλαμο: 500 L/h
- θερμοκρασία εξερχόμενου αέρα: ~ 85°C

3.9 Έλεγχος ενθυλάκωσης των συστατικών σιδερίτη σε β-CD και HP-β-CD με τη μέθοδο της Διαφορικής Θερμοδομετρίας Σάρωσης (DSC)

Σκοπός

Η μέθοδος της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση του εγκλεισμού των συστατικών του σιδερίτη στη β-CD και στην HP-β-CD.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- ο Λυοφιλιωμένα εκχυλίσματα σιδερίτη με διαλύτες το απιονισμένο νερό, τα υδατικά διαλύματα β-CD συγκέντρωσης 8 mM και 16 mM και το υδατικό διάλυμα HP-β-CD συγκέντρωσης 27 mM
- ο β-κυκλοδεξτρίνη (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- ο Υδροξύ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)

Όργανα

- ο Ζυγός ακριβείας (Chyo JL-180)
- ο Καψίδια αλουμινίου 30 μ L με καπάκια (Perkin Elmer DSC)
- ο Συσκευή σφραγίσματος καψιδίων (Perkin Elmer)
- ο Διάταξη διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Perkin Elmer Pyris 6 DSC)

Αναλυτική πορεία

Ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας, 10 mg με ακρίβεια $\pm 0,1$ mg από τα υπό εξέταση δείγματα: σκόνη λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος σιδερίτη με διαλύτες το απιονισμένο νερό, τα υδατικά διαλύματα β-CD συγκέντρωσης 8 mM και 16 mM και το υδατικό διάλυμα HP-β-CD συγκέντρωσης 27 mM. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε καψίδιο αλουμινίου και σφραγίζεται ερμητικά με τη βοήθεια ειδικού οργάνου. Διασφαλίζεται πως το περιεχόμενο καλύπτει πλήρως την επιφάνεια του καψιδίου, επιτυγχάνοντας τη

μέγιστη δυνατή και ομοιόμορφη μεταφορά θερμότητας. Το κάθε καψίδιο, στη συνέχεια, τοποθετείται στο όργανο DSC μαζί με ένα άδειο καψίδιο που λειτουργεί ως τυφλό. Ο φούρνος του οργάνου κλείνει και διαβιβάζεται αέριο άζωτο με ροή 20 mL/min στο εσωτερικό του. Η αρχική θερμοκρασία ορίζεται στους 70°C, όπου παραμένει για 1 min, και η τελική στους 230°C, όπου και πάλι παραμένει για 1 min. Χρησιμοποιούνται δύο θερμοκρασιακά προγράμματα με παροχή θερμότητας με ρυθμό 10°C/min και 5°C/min αντίστοιχα. Λαμβάνονται τα θερμογραφήματα και συγκρίνονται μεταξύ τους. Για κάθε είδος δείγματος γίνονται τουλάχιστον 3 επαναλήψεις του πειράματος για καλύτερη επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Πριν από την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών, πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση (καλιμπράρισμα) με πρότυπα δείγματα Ίνδιου (Indium) και Ψευδάργυρου (Zn) από την κατασκευάστρια εταιρεία. Ως σημείο τήξης θεωρείται η κορυφή της καμπύλης της ενδόθερμης απορρόφησης.

3.10 Μελέτη οξειδωτικής σταθερότητας των συμπλόκων εγκλεισμού με χρήση DSC

Σκοπός

Η μελέτη της οξείδωσης του συμπλόκου αποτελεί έναν έμμεσο τρόπο επιβεβαίωσης του εγκλεισμού. Όταν ο εγκλεισμός είναι επιτυχής η ενθυλακωμένη ουσία προστατεύεται από την οξείδωση, η οποία τελικά συμβαίνει σε υψηλότερες θερμοκρασίες από ότι θα συνέβαινε στη καθαρή ουσία.

Υλικά - Αντιδραστήρια

- Λυοφιλωμένα εκχυλίσματα σιδερίτη με διαλύτες το απιονισμένο νερό, τα υδατικά διαλύματα β-CD συγκέντρωσης 8 mM και 16 mM και το υδατικό διάλυμα HP-β-CD συγκέντρωσης 27 mM
- Σύμπλοκο εγκλεισμού τροποποιημένου αμύλου/ λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σιδερίτη
- Σύμπλοκο εγκλεισμού τροποποιημένου αμύλου/ λυοφιλωμένου εκχυλίσματος σιδερίτη με διαλύτη το υδατικό διάλυμα HP-β-CD

Όργανα

- ο Ζυγός ακριβείας (Chyo JL-180)
- ο Καψίδια αλουμινίου 30 μL με καπάκια (Perkin Elmer DSC)
- ο Συσκευή σφραγίσματος καψιδίων (Perkin Elmer)
- ο Διάταξη διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Perkin Elmer Pyris 6 DSC)

Αναλυτική πορεία

Ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας 10 mg από κάθε ουσία που αναφέρεται παραπάνω με ακρίβεια $\pm 0,1$ mg. Η ποσότητα τοποθετείται ομοιόμορφα σε καψίδιο αλουμινίου αλλά δε σκεπάζεται με σκοπό την επαφή της ουσίας με το αέριο οξυγόνο που διοχετεύεται στα δείγματα με ροή 20 ml/min. Μαζί με το καψίδιο της ουσίας τοποθετείται και ένα άδειο ανοιχτό καψίδιο που λειτουργεί ως τυφλό. Το πρόγραμμα ρυθμίζεται ως εξής: η θερμοκρασία του φούρνου αρχικά αυξάνεται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι τους 120°C με ρυθμό 90 °C/min και παραμένει για 1 min σε αυτή την τιμή. Στη συνέχεια αυξάνεται μέχρι τους 380°C με ρυθμό 5 °C/min. Λαμβάνονται τα θερμογραφήματα και συγκρίνονται μεταξύ τους. Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, για κάθε είδος δείγματος γίνονται 3 επαναλήψεις.

3.11 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των παρατηρήσεων ($n=3$) του συνολικού φαινολικού φορτίου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τους διαφορετικούς διαλύτες πραγματοποιείται με το στατιστικό πακέτο SPSS 21.0. Οι μεταβλητές εκφράστηκαν σαν Μέση Τιμή $\pm$ Τυπική Απόκλιση (Μέσος $\pm$ Τ.Α.).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αποτελέσματα επιμέρους προσδιορισμού των πολυφαινολικών συστατικών του *Sideritis scardica* με GC-MS

Ο συγκεντρωτικός πίνακας που ακολουθεί περιέχει τις επιμέρους πολυφαινόλες, όπως προσδιορίστηκαν από τη μέθοδο της Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματοσκοπίας Μάζας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/mL υδατικού εκχυλίσματος σιδερίτη.

Πίνακας 4.1: Προσδιορισμός επιμέρους πολυφαινολών

Πολυφαινολικά συστατικά	ng/mL εκχυλίσματος
π-Κουμαρικό οξύ	303,3
Συριγγικό οξύ	244,9
π-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	190,9
Βανιλλικό οξύ	122,2
Καφεϊκό οξύ	112,9
Πρωτοκατεχικό οξύ	111,6
Κινναμωμικό οξύ	90,1
Φερουλικό οξύ	75,9
Βανιλίνη	75,3
Τυροσόλη	72,3
π-Υδροξυφαινυλοξικό οξύ	25,8
Ομοβανιλλική αλκοόλη	25,4

Η παρουσία των συγκεκριμένων πολυφαινολικών συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος *Sideritis scardica*, επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες του είδους αυτού. Ενδεικτικά, το πρωτοκατεχικό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ εντοπίστηκαν και από τους [Tadic et al. \(2012a\)](#). Ωστόσο, δεν μπορεί να γίνει περεταίρω σύγκριση για την παρουσία ή μη άλλων πολυφαινολικών ενώσεων ή την περιεκτικότητα του σιδερίτη σε συγκεκριμένες πολυφαινόλες, διότι χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός τρόπος εκχύλισης.

4.2 Αξιολόγηση του φωτομετρικού προσδιορισμού των ολικών πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

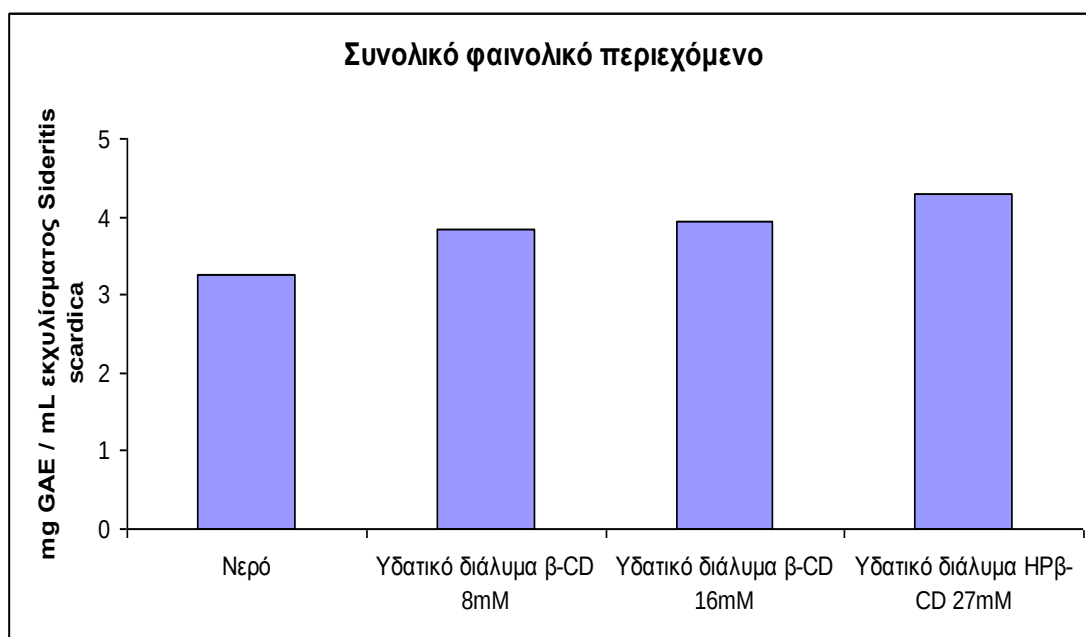
Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Σκοπός της σύγκρισης των τεσσάρων διαφορετικών εκχυλισμάτων που προκύπτουν είναι να διαπιστωθεί εάν η προσθήκη β-CD και HP-β-CD κατά την εκχύλιση των βοτάνων αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης και τελικά το συνολικό φαινολικό φορτίο. Το αφέψημα με μέσο εκχύλισης το νερό λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του φωτομετρικού προσδιορισμού:

Πίνακας 4.1: Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των αφεψημάτων εκφρασμένο σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (GAE) /mL εκχυλίσματος

Μέσο εκχύλισης	mg GAE/mL εκχυλίσματος
Νερό	3,2617 ± 0,884
Υδατικό διάλυμα β-CD (8 mM)	3,8426 ± 0,139
Υδατικό διάλυμα β-CD (16 mM)	3,9505 ± 0,075
Υδατικό διάλυμα HP-β-CD (27 mM)	4,2818 ± 0,318

Τα αποτελέσματα του φωτομετρικού προσδιορισμού του συνολικού φαινολικού φορτίου (Πίνακας 4.1) έδειξαν πως η προσθήκη β-CD και HP-β-CD κατά την εκχύλιση του σιδερίτη αύξησε το συνολικό φαινολικό φορτίο. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα με διαλύτη το υδατικό διάλυμα HP-β-CD (27 mM) παρουσίασε το μεγαλύτερο συνολικό φαινολικό φορτίο, το οποίο ήταν κατά 37,27% μεγαλύτερο από το δείγμα ελέγχου. Σημαντική αύξηση κατά 21,12 % παρουσιάστηκε και με τη χρήση υδατικού διαλύματος β-CD συγκέντρωσης 16 mM, ενώ η αύξηση με διαλύτη το διάλυμα β-CD (8 mM) ήταν 17,81%. Επιπλέον, εξετάστηκε το ενδεχόμενο τα διαλύματα β-CD και HP-β-CD να επηρεάζουν τη μέθοδο δίνοντας ψευδώς αυξημένες τιμές συνολικού φαινολικού περιεχομένου. Εξετάστηκαν, λοιπόν, τα διαλύματα β-CD

και HP- β -CD συγκεντρώσεων όπως και αυτές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκχύλιση. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός έδειξε απορρόφηση στα 750 nm, η οποία ήταν εξαιρετικά χαμηλή και εκτός των ορίων γραμμικότητας της πρότυπης καμπύλης. Για αυτό το λόγο, αποκλείστηκε η πιθανότητα τα διαλύματα β -CD και HP- β -CD να επηρέασαν τα αποτελέσματα της μεθόδου και να απέδωσαν ψευδώς αυξημένες τιμές απορρόφησης.



Σχήμα 4.1: Συγκριτική απεικόνιση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με μέσο εκχύλισης: νερό, υδατικό διάλυμα β -CD (8 mM), υδατικό διάλυμα β -CD (16 mM) και υδατικό διάλυμα HP- β -CD (27 mM)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, οι επιμέρους παράμετροι της τεχνικής μπορεί να αλλάζουν από εργαστήριο σε εργαστήριο, καθιστώντας τη σύγκριση αποτελεσμάτων αρκετά δύσκολη (Cicco et al., 2009). Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται στη διεθνή βιβλιογραφία κατά την ανάλυση ίδιων εκχυλισμάτων βοτάνων οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το κλίμα, ο τόπος και η εποχή συγκομιδής των βοτάνων (Shan et al., 2005). Τέλος, άλλες παράμετροι που δυσχαιρένουν τη σύγκριση είναι ο τρόπος παρασκευής των αφεψημάτων, η χρησιμοποιούμενη ποσότητα του βοτάνου και ο χρόνος βρασμού (Kratchanova et al., 2010).

Η αύξηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου μπορεί, αρχικά, να αποδοθεί εν μέρει στην αύξηση της διαλυτότητας των πολυφαινολικών συστατικών του σιδερίτη. Πράγματι, η μικροενθυλάκωση πολυφαινολικών συστατικών μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητά τους. Για παράδειγμα, οι [Kalogeropoulos et al. \(2009\)](#) κατά τη μελέτη της διαλυτότητας των συστατικών της πρόπολης έδειξαν, πως η αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος β-CD επιφέρει ανάλογη αύξηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου. Μάλιστα, η επιμέρους μελέτη διαλυτότητας των συστατικών του εκχυλισμάτων της πρόπολης έδειξε αυξημένη διαλυτότητα του π-κουμαρικού οξέος, του φερουλικού οξέος και του καφεϊκού οξέος, όταν αυτά ενθυλακώθηκαν στη β-CD. Τα συστατικά αυτά είναι παρόντα και στο υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica*.

Επιπρόσθετα, άλλη μία πιθανή εξήγηση του αυξημένου φαινολικού περιεχομένου είναι η αυξημένη απόδοση της εκχύλισης στην περίπτωση της προσθήκης β-CD και HP-β-CD κατά την εκχύλιση του σιδερίτη. Στη διεθνή βιβλιογραφία, δεν έχει αναφερθεί παρόμοια προσπάθεια σύγκρισης της εκχυλιστικής ικανότητας των υδατικών διαλυμάτων β-CD και HP-β-CD και του νερού ως μέσα εκχύλισης σιδερίτη. Ωστόσο, οι [Ratnasooriya et al. \(2012\)](#) αξιολόγησαν την ανάκτηση πολυφαινολικών συστατικών από πολύ στέμφυλων με διαλύτη το νερό και υδατικά διαλύματα β-CD διαφορετικών συγκεντρώσεων. Οι ερευνητές παρατήρησαν πως η εκχύλιση με υδατικό διάλυμα β-CD οδήγησε σε κατά πολύ υψηλότερο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο στο εκχύλισμα, εν συγκρίσει με το νερό ως μέσο εκχύλισης. Ο προσδιορισμός των συνολικών φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Μάλιστα, η αύξηση της συγκέντρωσης της β-CD στο υδατικό διάλυμα από 1% σε 2,5% οδήγησε σε σημαντικά μεγαλύτερο πολυφαινολικό φορτίο. Τα ταυτοποιημένα πολυφαινολικά συστατικά των στέμφυλων φάνηκε να έχουν το ιδανικό μέγεθος, ώστε να εισχωρήσουν στην υδρόφοβη κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης, καθιστώντας δυνατή την αυξημένη ανάκτηση των πολυφαινολικών συστατικών με υδατικό διάλυμα β-CD. Οι ερευνητές, επίσης, διετύπωσαν την υπόθεση πως για τον σχηματισμό των συμπλόκων εγκλεισμού, η β-CD θα πρέπει να αλληλεπιδράσει με φαινολικά συστατικά, τα οποία βρίσκονται κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα, στο κυτόπλασμα και στα χυμοτόπια. Η β-CD θα πρέπει να διεισδύσει το κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη για να φθάσει σε αυτά τα οργανίδια. Με μοριακό βάρος 1135 g/mol, φαίνεται πως δεν μπορεί να διεισδύσει στις βιολογικές μεμβράνες των κυττάρων και των οργανιδίων με

απλή διάχυση. Επομένως, περεταίρω μελέτες θα πρέπει να διεξαχθούν, ώστε να εξακριβωθεί ο μηχανισμός της δράσης της β -CD κατά την εκχύλιση των φυτικών προϊόντων.

4.3 Αξιολόγηση της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH[·]

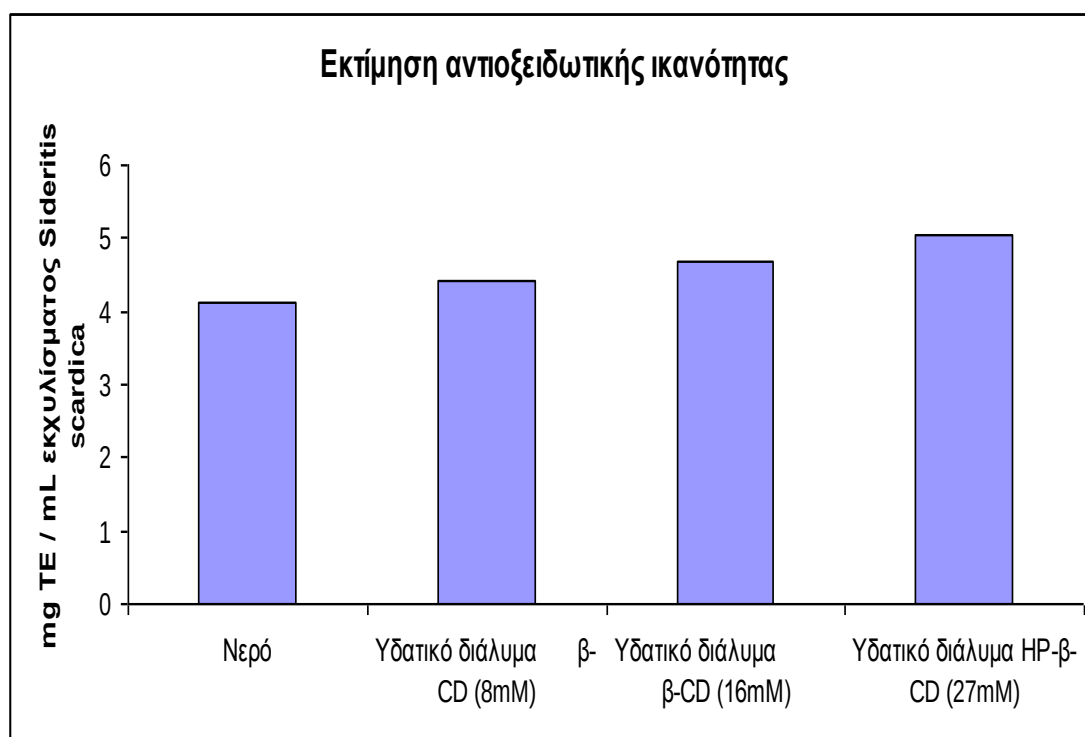
Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων *Sideritis scardica* έχει αναδειχθεί σε ποικίλες μελέτες. Στην παρούσα εργασία, η αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων προσδιορίστηκε με την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH[·]. Σκοπός της εκτίμησης αυτής είναι να εξακριβωθεί εάν αυξάνεται η αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων έπειτα από προσθήκη β -CD και HP- β -CD κατά την εκχύλιση του σιδερίτη. Το αφέψημα με μέσο εκχύλισης το νερό λειτούργησε ως δείγμα ελέγχου. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας:

Πίνακας 4.2: Εκτιμώμενη αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων εκφρασμένη σε mg ισοδυνάμων Trolox (TE) /mL εκχυλίσματος

Μέσο εκχύλισης	mg TE/mL εκχυλίσματος
Νερό	4,1149 $\pm$ 0,4487
Υδατικό διάλυμα β -CD (8mM)	4,4182 $\pm$ 0,1000
Υδατικό διάλυμα β -CD (16mM)	4,6815 $\pm$ 0,1891
Υδατικό διάλυμα HP- β -CD (27mM)	5,0520 $\pm$ 0,4494

Όλα τα αφεψήματα με τα διαφορετικά μέσα εκχύλισης παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση (Πίνακας 4.2). Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η παρατήρηση πως η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος β -CD ως μέσο εκχύλισης εν συγκρίσει με το δείγμα ελέγχου. Επιπλέον, το διάλυμα HP- β -CD (27 mM) ως μέσο εκχύλισης φάνηκε να επιφέρει τη μεγαλύτερη αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του αφεψήματος. Πιο αναλυτικά, η εκχύλιση με υδατικό διάλυμα β -CD συγκέντρωσης 8 mM επέφερε αύξηση της αντιοξειδωτικής

ικανότητας κατά 7,37%, ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης της β -CD επέφερε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά 13,77% . Τέλος, το υδατικό διάλυμα HP- β -CD επέφερε τη μεγαλύτερη αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά 22,8%. Επιπλέον, εξετάστηκε το ενδεχόμενο το διαλύματα β -CD και HP- β -CD να επηρεάζουν τη μέθοδο δίνοντας ψευδώς αυξημένες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας. Εξετάστηκαν, λοιπόν, τα υδατικά διαλύματα β -CD και HP- β -CD συγκεντρώσεων όπως και αυτές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκχύλιση. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός έδειξε πάρα πολύ χαμηλή απορρόφηση, η οποία βρισκόταν εκτός των ορίων γραμμικότητας της πρότυπης καμπύλης. Για αυτό το λόγο, αποκλείστηκε η πιθανότητα τα διαλύματα β -CD και HP- β -CD να επηρέασαν τα αποτελέσματα της μεθόδου.



Σχήμα 4.2: Συγκριτική απεικόνιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με μέσο εκχύλισης: νερό, υδατικό διάλυμα β -CD (8 mM), υδατικό διάλυμα β -CD (16 mM) και υδατικό διάλυμα HP- β -CD (27 mM)

Η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με την προσθήκη β -CD και HP- β -CD κατά την εκχύλιση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2, μπορεί να αποδοθεί σε πολλές αιτίες. Αρχικά, όπως ήδη έχει γίνει λόγος, κατά την εκχύλιση με τα διάφορα μέσα εκχύλισης, παρατηρήθηκε αύξηση του πολυφαινολικού περιεχομένου, η οποία ακολουθείται από το ίδιο μοτίβο αύξησης της αντιοξειδωτικής

ικανότητας. Η παράλληλη αυτή αύξηση των δύο παραμέτρων είναι αρκετά εύλογη καθώς έρευνες έχουν αποδείξει πως η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του σιδερίτη μπορεί να αποδοθεί σε μεγάλο βαθμό στο φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων. Οι φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και λειτουργούν ως δότες ατόμων H. Η απιγενίνη και οι γλυκοζίτες απιγενίνης - συστατικά του *Sideritis scardica* - είναι αντιοξειδωτικοί παράγοντες λόγω των ομάδων υδροξυλίου που διαθέτουν. Επιπρόσθετα, η παρουσία των υδροξυκιναμωμικών οξέων (p-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ) εμπλουτίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Η ομάδα $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-$ εξασφαλίζει μεγαλύτερη ικανότητα προσφοράς ατόμων H και με αυτό τον τρόπο ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Έχει δειχθεί πως τα εκχυλίσματα του *Sideritis scardica* είναι πλούσια σε υδρόξυ-κιναμωμικά παράγωγα (Tadic et al., 2012a). Η παρουσία του π-κουμαρικού οξέος, του φερουλικού οξέος και του καφεϊκού οξέος στο υδατικό εκχύλισμα επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη.

Επιπρόσθετα, στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται πως οι πολυφαινόλες είναι αρκετά δυσδιάλυτες σε υδατικά διαλύματα. Η δημιουργία, όμως, συμπλόκων εγκλεισμού μεταξύ των πολυφαινολών και της β-CD αυξάνει τη διαλυτότητά τους στο νερό, και μάλιστα με τρόπο ανάλογο με τη συγκέντρωση της β-CD και της θερμοκρασίας (Kalogeropoulos et al., 2009). Οπότε, είναι πολύ πιθανό η προσθήκη β-CD και HP-β-CD κατά την εκχύλιση του σιδερίτη να αύξησε τη διαλυτότητα των πολυφαινολικών συστατικών του βοτάνου. Η πιθανή, λοιπόν, αύξηση της διαλυτότητας επιτρέπει την αυξημένη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH $\cdot$, και κατά συνέπεια την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Επιπρόσθετα, σε μία άλλη μελέτη, η εκχύλιση της ρεσβερατρόλης από το *Polygonum cuspidatum* με υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών (β-CD και HP-β-CD) ήταν εξίσου αποτελεσματική με το μεθανολικό εκχύλισμα, όταν συγκρίθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα (μέθοδος DPPH, μέθοδος ORAC). Συμπερασματικά, λοιπόν, η χρήση των κυκλοδεξτρινών κατά την εκχύλιση μπορεί να αυξήσει ικανοποιητικά την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (Mantegna et al., 2012). Μάλιστα, η διαφορά στη διαλυτότητα του ξενιζόμενου μόριο με μόριο εγκλεισμού τη β-CD και την HP-β-CD έχει δειχθεί από τους Nguyen et al (2013). Συγκεκριμένα, η μελέτη τους έδειξε πως ο εγκλεισμός της ρουτίνης σε HP-β-CD επέφερε μεγαλύτερη αύξηση της διαλυτότητάς της εν συγκρίσει με τον εγκλεισμό της σε β-CD. Η μελέτη της

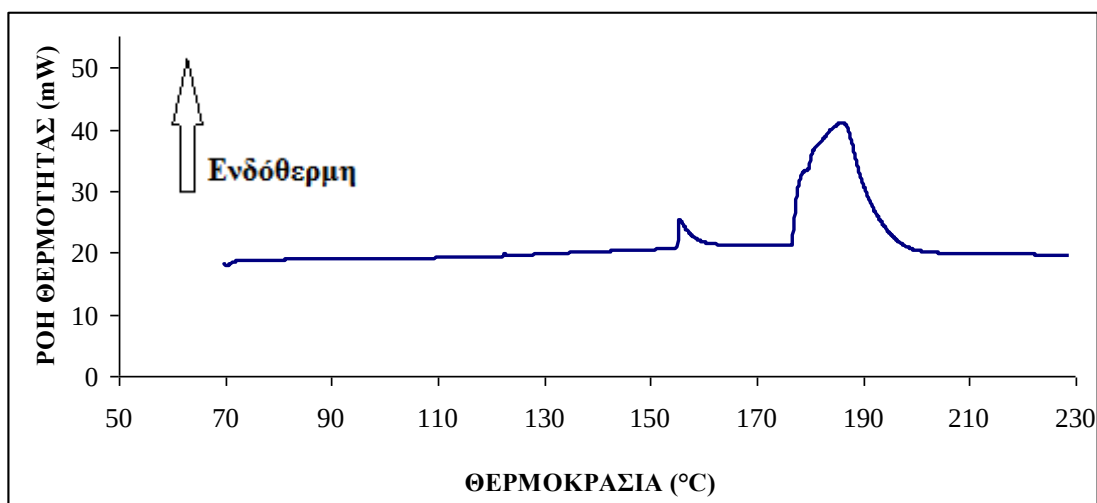
διαλυτότητας και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε στην ίδια θερμοκρασία. Ευρήματα άλλων ερευνών δείχνουν πως είναι δυνατή η μεμονωμένη μικροενθυλάκωση συστατικών του σιδερίτη σε β -CD και HP- β -CD, όπως η ενθυλάκωση του καφεϊκού οξέος σε HP- β -CD (Zhang et al., 2009), του π-κουμαρικού οξέος σε β -CD (Kralj et al., 2009), του χλωρογενικού οξέος σε β -CD (Zhao et al., 2010), του φερουλικού οξέος σε HP- β -CD (Wang et al., 2011a), της λουτεΐνης σε β -CD και HP- β -CD (Liu et al., 2013) και της απιγενίνης σε β -CD και HP- β -CD (Kim et al., 2008).

Τέλος, ο εγκλεισμός του ξενιζόμενων μορίων του εκχυλίσματος σιδερίτη, αυτός κάθε αυτός, μπορεί να αποτελεί έναν επιπρόσθετο λόγο της αύξησης της αντιοξειδωτικής του ικανότητας των εκχυλισμάτων. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της μικροενθυλάκωσης της ρουτίνης σε HP- β -CD, η αύξηση της αντιοξειδωτικής της ικανότητας κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου εγκλεισμού μπορεί να αποδοθεί σε αλλαγές στην ικανότητα προσφοράς ατόμων H λόγω του ίδιου του εγκλεισμού. Όταν η ρουτίνη διεισδύει στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, ένας ή περισσότεροι δεσμοί H μπορεί να σχηματιστούν ανάμεσα στα άτομα H των υδροξυλομάδων της ρουτίνης με τα ηλεκτραρνητικά άτομα της κυκλοδεξτρίνης. Αυτοί οι δεσμοί H αποδυναμώνουν τους ομοιοπολικούς δεσμούς ανάμεσα στο Υδρογόνο και το Οξυγόνο των υδροξυλομάδων. Για αυτό το λόγο, λοιπόν, η προσφορά ατόμων H από της υδροξυλομάδες μπορεί να γίνει ευκολότερη (Nguyen et al., 2013).

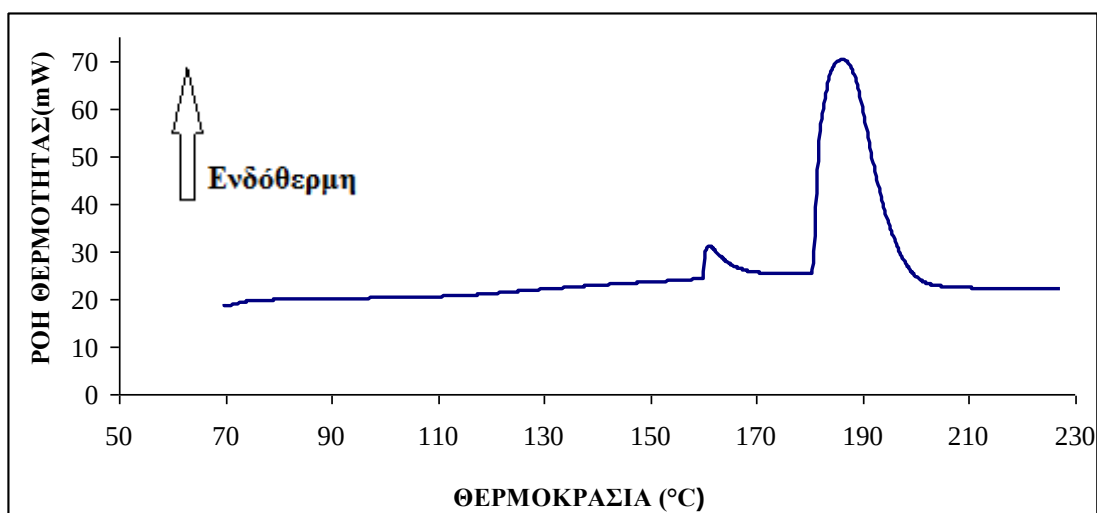
4.4 Επιβεβαίωση εγκλεισμού των συστατικών του εκχυλίσματος *Sideritis scardica* σε β -CD και HP- β -CD με χρήση οργάνου DSC σε αδρανείς συνθήκες

Η μέθοδος της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης χρησιμοποιείται ευρέως για την επιβεβαίωση του σχηματισμού των συμπλόκων εγκλεισμού. Η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση πως καθώς το ξενιζόμενο μόριο εγκλείεται στην κοιλότητα της β -CD και της HP- β -CD, το σημείο τήξεώς του εμφανίζεται σε διαφορετική θερμοκρασία σε σχέση με την καθαρή ουσία ή δεν εμφανίζεται απολύτως κανένα φαινόμενο τήξης (Wang et al., 2011a).

Στην παρούσα μελέτη η μέθοδος DSC εφαρμόστηκε στις καθαρές ουσίες των β -CD, HP- β -CD καθώς και σε όλα τα εκχυλίσματα.



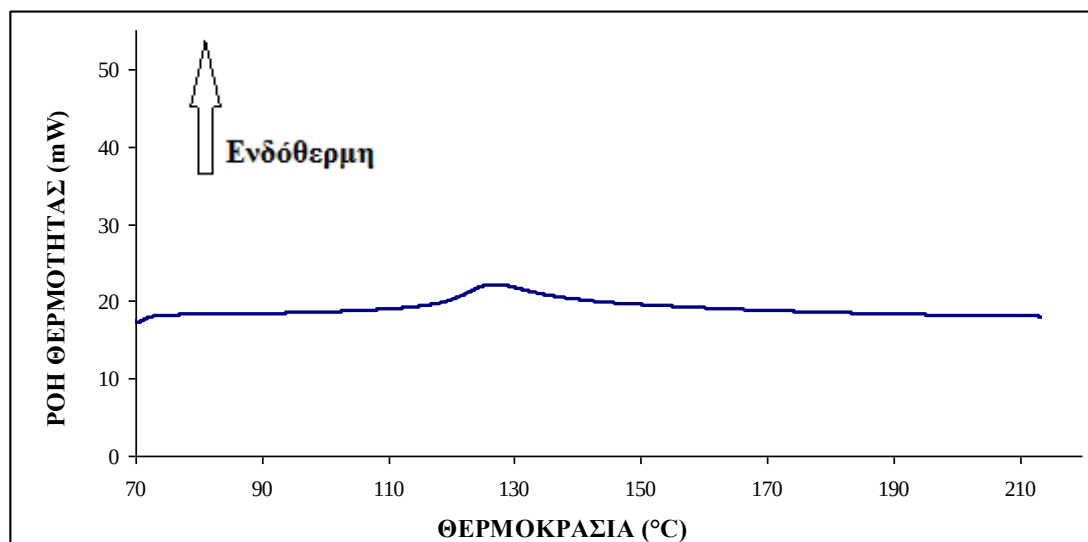
Σχήμα 4.3: Θερμογράφημα β-CD με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 5°C/min



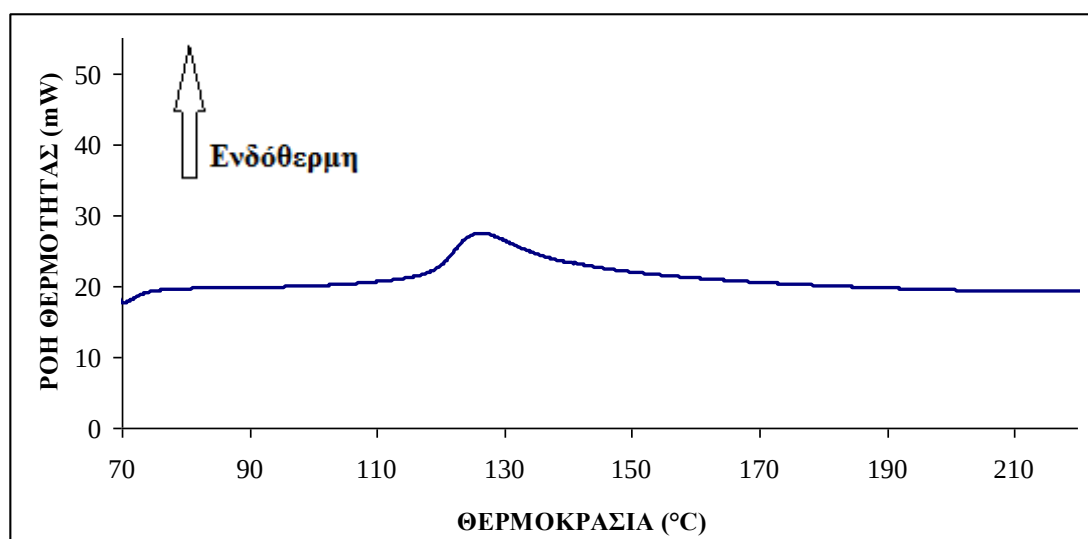
Σχήμα 4.4: Θερμογράφημα β-CD με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 10°C/min

Τα θερμογραφήματα τα οποία προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου στην καθαρή ουσία της β-CD με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 5°C/min (Σχήμα 4.3) και 10°C/min (Σχήμα 4.4) έδειξαν μία ενδόθερμη απορρόφηση στους 186,07°C ($\Delta H=286,99$ J/g) και 187,05°C ($\Delta H=300,08$ J/g) αντίστοιχα. Οι [da Rosa et al. \(2013\)](#) ανίχνευσαν την κορυφή της ενδόθερμης κορυφής της β-CD στους 189°C. Η εμφάνιση της ενδόθερμης απορρόφησης, πιθανόν, οφείλεται στην απομάκρυνση των μορίων νερού από την κοιλότητα και την επιφάνεια της β-CD ([Mourtzinou et al., 2007](#)). Πράγματι, βάσει πινάκων ενθαλπίας εξάτμισης νερού προκύπτει πως η ενθαλπία εξάτμισης του νερού στους 185°C είναι 1996 J/g. Οπότε, αν θεωρήσουμε ότι η διαφορά ενθαλπίας που παρουσιάζεται οφείλεται εξ ολοκλήρου στην εξάτμιση του

νερού, τότε προκύπτει πως η απορρόφηση 300 J/g οφείλεται σε εξάτμιση 0,15 g νερού. Το εύρημα αυτό υποστηρίζει πως η περιεκτικότητα της β -CD σε νερό κυμαίνεται περίπου στο 15%, εύρημα που επιβεβαιώνεται από την ήδη γνωστή περιεκτικότητα της β -CD σε κρυσταλλικό νερό (13-15%) (Dodziuk, 2006).



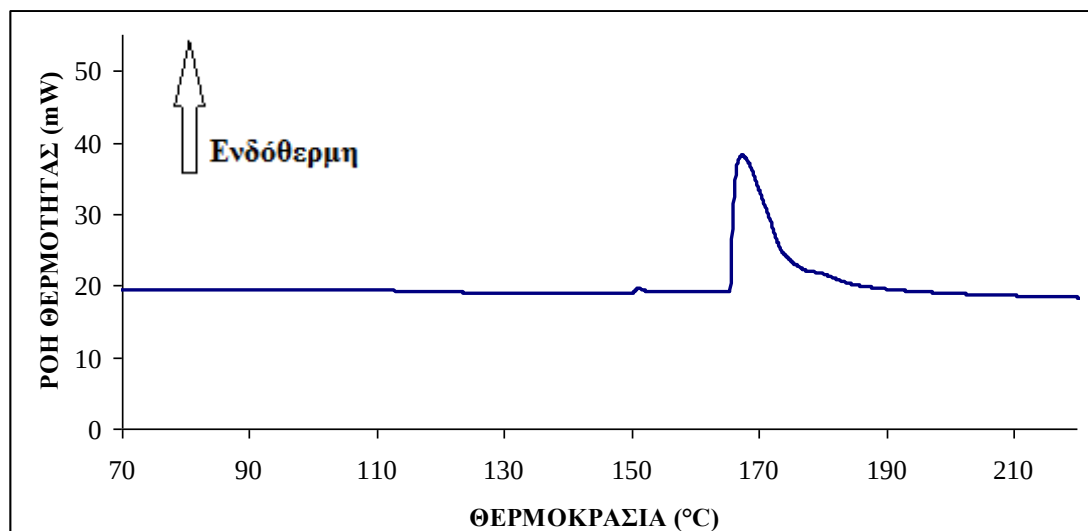
Σχήμα 4.5: Θερμογράφημα HP-β-CD με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 5°C/min



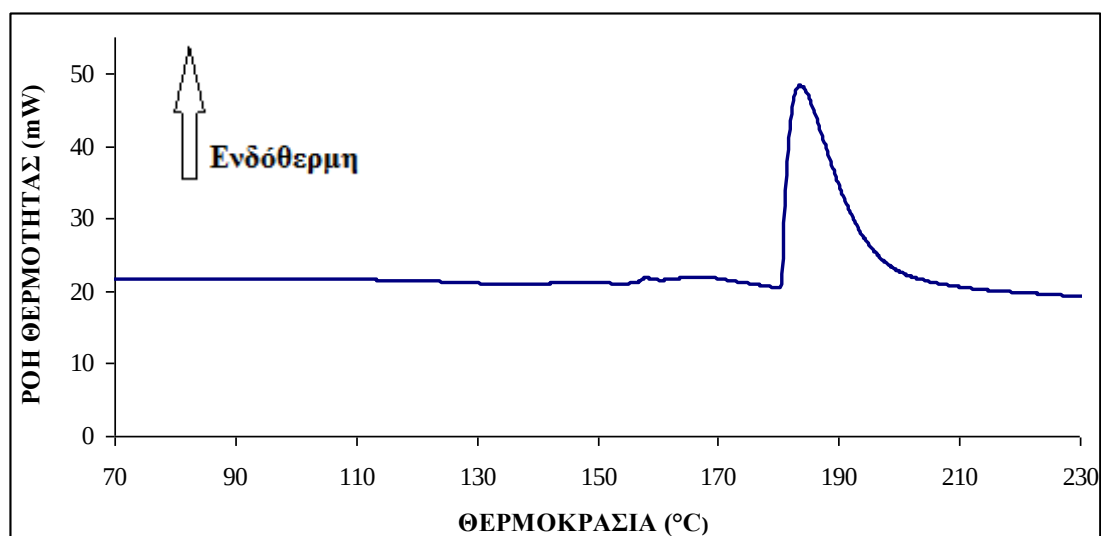
Σχήμα 4.6: Θερμογράφημα HP-β-CD με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 10°C/min

Στα θερμογραφήματα της HP-β-CD στα δύο θερμοκρασιακά προγράμματα των 5°C/min (Σχήμα 4.5) και 10°C/min (Σχήμα 4.6) εμφανίζεται μία διευρυμένη κορυφή στους 126,74°C ($\Delta H=62,38$ J/g) και 126,35°C ($\Delta H=95,48$ J/g), αντίστοιχα. Είναι εμφανές πως δεν παρατηρείται κάποια ουσιαστική διαφορά στη θερμοκρασία

εμφάνισης της κορυφής. Η εμφάνιση της κορυφής μπορεί να αποδοθεί στην απομάκρυνση των μορίων του νερού από το μόριο της HP-β-CD.



Σχήμα 4.7: Θερμογράφημα *Sideritis scardica* με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 5°C/min

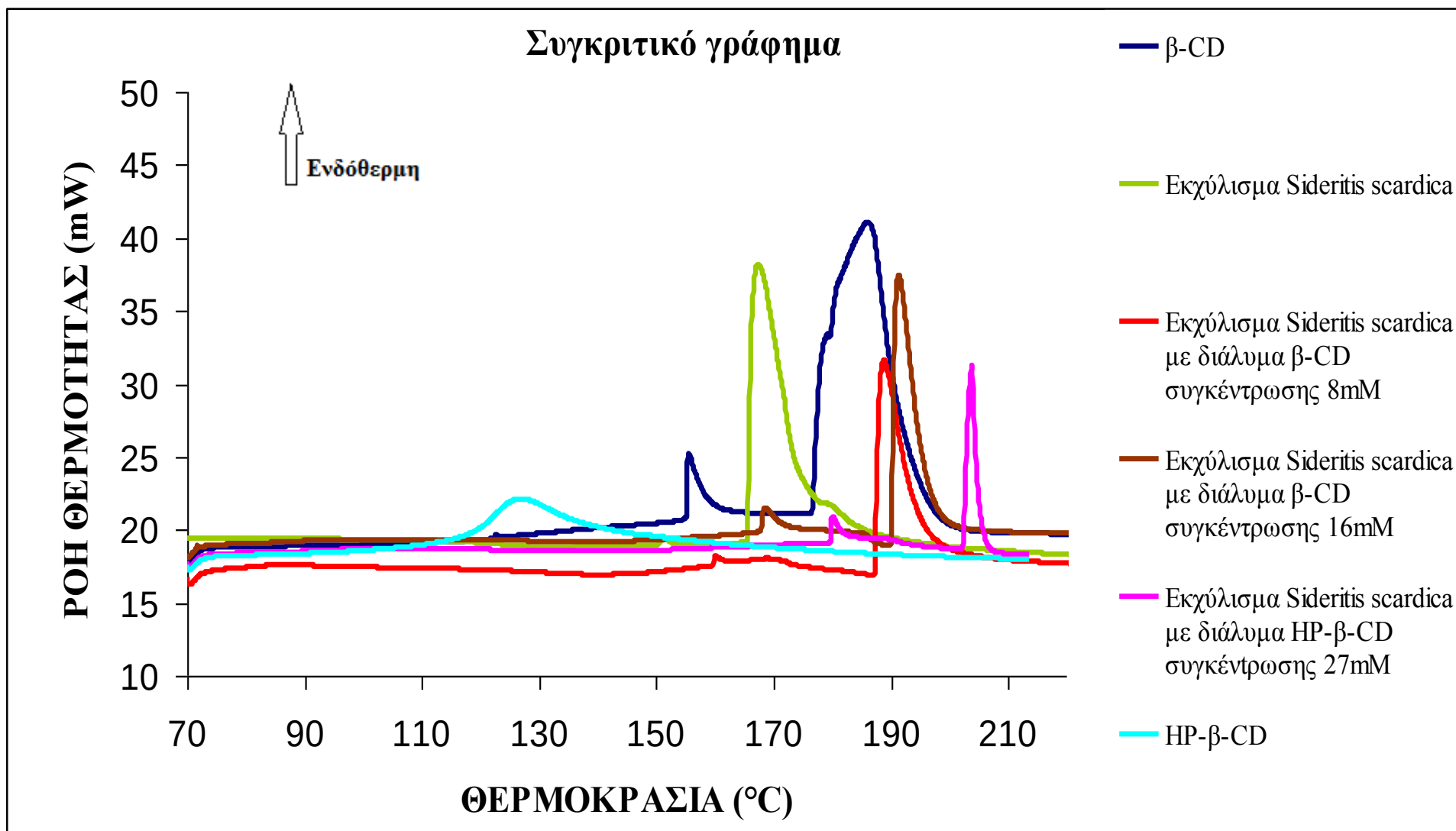


Σχήμα 4.8: Θερμογράφημα *Sideritis scardica* με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 10°C/min

Στο θερμογράφημα του υδατικού εκχυλίσματος σιδερίτη με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 5°C/min (Σχήμα 4.7) παρατηρείται μία ενδόθερμη απορρόφηση στους 167,39°C ($\Delta H=167,26$ J/g), ενώ στο θερμογράφημα με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 10°C/min (Σχήμα 4.8) η ενδόθερμη απορρόφηση εμφανίζεται στους 183,67°C ($\Delta H=184,08$ J/g). Οι τιμές των θερμοκρασιών αυτών, είναι πιθανόν να σχετίζονται με

το σημείο τήξης των κυρίαρχων συστατικών του εκχυλίσματος σιδερίτη. Εάν και δεν παρατηρείται ουσιαστική διαφορά στις τιμές της διαφοράς ενθαλπίας κατά την τήξη των συστατικών του βοτάνου, παρατηρείται μία σημαντική διαφορά στην ανίχνευση της θερμοκρασίας τήξης στα δύο θερμοκρασιακά προγράμματα. Το γεγονός αυτό μπορεί ενδεχομένως να ερμηνευθεί από τα ευρήματα των **Saldapa and Monteagudo (2013)**, οι οποίοι αναφέρουν πως κατά την οξείδωση των λιποειδών, ο αργός ρυθμός παροχής θερμότητας επιτρέπει τον σχηματισμό κάποιος πρωταρχικών και ενδιάμεσων προϊόντων οξείδωσης, τα οποία επιταχύνουν τη διαδικασία της υποβάθμισης. Αντίθετα, τα συστατικά αυτά δεν παράγονται όταν ο ρυθμός παροχής θερμότητας είναι ταχύτερος, με αποτέλεσμα την εμφάνιση της ενδόθερμης κορυφής σε υψηλότερη θερμοκρασία. Ωστόσο τονίζουν πως ο ρυθμός θέρμανσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 25°C/min, καθώς το υπό εξέταση δείγμα δεν καταφέρνει να αποκτήσει τη θερμοκρασία του φούρνου, δημιουργώντας ένα χάσμα του επηρεάζει την κινητική της οξείδωσης. Χωρίς να έχει αναφερθεί κάτι παρόμοιο στη διεθνή βιβλιογραφία, η ίδια υπόθεση θα μπορούσε να ισχύει και για το εκχύλισμα του *Sideritis scardica*.

Στη συνέχεια, η μέθοδος της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης εφαρμόστηκε για τα εκχυλίσματα του σιδερίτη με μέσο εκχύλισης τα υδατικά διαλύματα β-CD συγκέντρωσης 8 mM και 16 mM και το υδατικό διάλυμα HP-β-CD συγκέντρωσης 27 mM. Στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα παροχής θερμότητας με ρυθμό 5°C/min (Σχήμα 4.9), η ενδόθερμη κορυφή εμφανίστηκε στους 189,25°C ($\Delta H=115,16$ J/g) και στους 196,35°C ($\Delta H=94,44$ J/g), αντιστοίχως για τα διαλύματα β-CD συγκέντρωσης 8mM και 16mM. Είναι εμφανές πως στην περίπτωση της χαμηλότερης συγκέντρωσης β-CD παρατηρείται εξαφάνιση της ενδόθερμης κορυφής της τήξης των συστατικών του σιδερίτη, ενώ η ενδόθερμη κορυφή εμφανίζεται σε θερμοκρασία υψηλότερη κατά 3,18 °C εν συγκρίσει με την καθαρή β-CD. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της εκχύλισης με υδατικό διάλυμα β-CD συγκέντρωσης 16 mM, όπου η ενδόθερμη κορυφή των συστατικών του σιδερίτη εξαφανίστηκε πλήρως, ενώ παράλληλα η κορυφή εμφανίζεται μετακινημένη κατά 5,25°C, σε σχέση με τη β-CD. Τέλος, το εκχύλισμα του σιδερίτη με διάλυμα HP-β-CD συγκέντρωσης 27 mM εμφάνισε μία ενδόθερμη κορυφή 203,76°C ($\Delta H=27,10$ J/g), η οποία εντοπίστηκε σε θερμοκρασία υψηλότερη κατά 17,69 °C, συγκρινόμενη με την καθαρή β-CD.

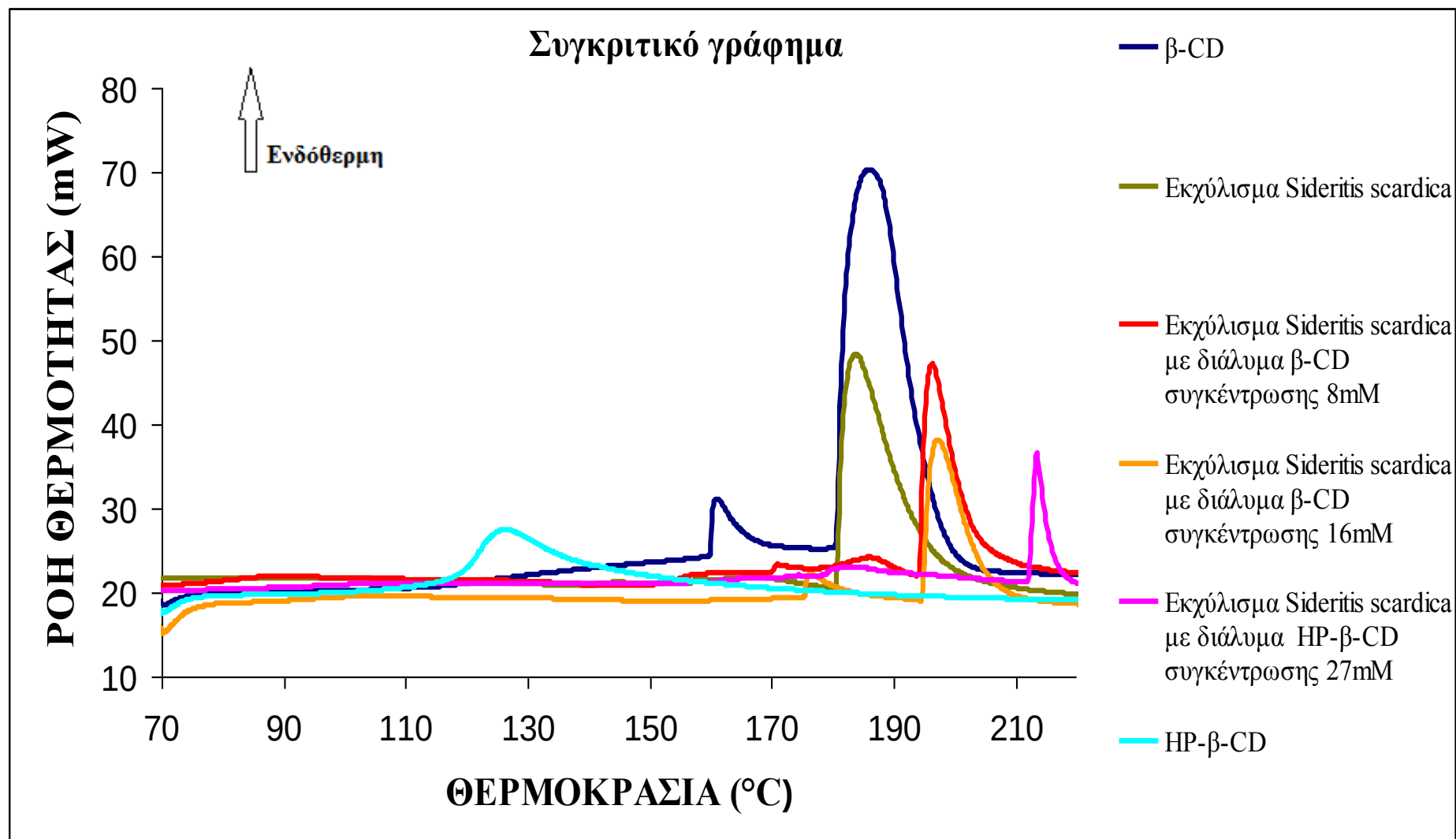


Σχήμα 4.9: Συγκριτικό διάγραμμα θερμογραφημάτων: β-CD, υδατικό εκχύλισμα *Sideritis scardica*, εκχύλισμα *Sideritis scardica* με διάλυμα β-CD (8 mM), εκχύλισμα *Sideritis scardica* με διάλυμα β-CD (16 mM) και εκχύλισμα *Sideritis scardica* με διάλυμα HP-β-CD (27 mM), με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 5°C/min

Στο συγκριτικό διάγραμμα (Σχήμα 4.9) που συνοψίζει τα τέσσερα διαφορετικά θερμογραφήματα φαίνεται ευδιάκριτα πως η ενδόθερμη καμπύλη που αντιστοιχούσε στη τήξη των συστατικών του σιδερίτη απουσιάζει από τα θερμογραφήματα των εκχυλισμάτων με προσθήκη β -CD και HP- β -CD. Η μετακίνηση, λοιπόν, της εμφάνισης της ενδόθερμης απορρόφησης σε υψηλότερη θερμοκρασία και η σημαντική μείωση της διαφοράς της ενθαλπίας εν συγκρίσει με την καθαρή β -CD και HP- β -CD αποτελούν σημαντική, έμμεση ένδειξη συμπλοκοποίησης των συστατικών του σιδερίτη με τη β -CD και την HP- β -CD. Επίσης, φαίνεται πως το υδατικό διάλυμα β -CD συγκέντρωσης 16 mM υπερέχει ελαφρώς του άλλου διαλύματος εκχύλισης (συγκέντρωση 8 mM), καθώς η θερμοκρασία εμφάνισης της ενδόθερμης απορρόφησης είναι κατά 2,07°C υψηλότερη και η ΔH είναι κατά 18,72 J/g χαμηλότερη. Τέλος, η περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος σιδερίτη παρουσία HP- β -CD εμφανίζει τη μεγαλύτερη μετακίνηση της ενδόθερμης κορυφής και παράλληλα τη χαμηλότερη ΔH . Επομένως, φαίνεται πως ο εγκλεισμός των συστατικών του σιδερίτη κατά την εκχύλισή του με υδατικό διάλυμα HP- β -CD συγκέντρωσης 27 mM είναι ο αποτελεσματικότερος.

Στο συγκεντρωτικό διάγραμμα (Σχήμα 4.10) των θερμογραφημάτων με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 10°C/min παρατηρείται το ίδιο μοτίβο μετακινήσεων των ενδόθερμων κορυφών. Συνοπτικά, η ενδόθερμη κορυφή απορρόφησης των συστατικών του σιδερίτη εξαφανίζεται, ενώ παράλληλα εμφανίζονται νέες κορυφές στους 196,35°C ($\Delta H = 97,36$ J/g) για το εκχύλισμα με διάλυμα β -CD συγκέντρωσης 8mM, στους 197,28°C ($\Delta H=79,81$ J/g) για το εκχύλισμα με διάλυμα β -CD συγκέντρωσης 16 mM και στους 213,51°C ($\Delta H=24,31$ J/g) για το εκχύλισμα με διάλυμα HP- β -CD συγκέντρωσης 27 mM. Ανάμεσα στα θερμογραφήματα των εκχυλισμάτων των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων β -CD δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές. Ωστόσο, στην περίπτωση της χρήσης HP- β -CD κατά την εκχύλιση του σιδερίτη παρατηρείται η μεγαλύτερη αύξηση της θερμοκρασίας εμφάνισης της ενδόθερμης κορυφής και η χαμηλότερη τιμή ΔH .

Η μετακίνηση της εμφάνισης των ενδόθερμων κορυφών σε υψηλότερες θερμοκρασίες και η παράλληλη ελαχιστοποίηση της απορρόφησης θερμότητας (ΔH) υποδεικνύουν πως πιθανότατα δεν πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός όλων των συστατικών του σιδερίτη στην υδρόφοβη κοιλότητα της β -CD και της HP- β -CD, αλλά σημαντικό μέρος αυτών.



Σχήμα 4.10: Συγκριτικό διάγραμμα θερμογραφημάτων: β-CD, υδατικό εκχύλισμα *Sideritis scardica*, εκχύλισμα *Sideritis scardica* με διάλυμα β-CD (8 mM), εκχύλισμα *Sideritis scardica* με διάλυμα β-CD (16 μmM) και εκχύλισμα *Sideritis scardica* με διάλυμα HP-β-CD (27 mM), με ρυθμό αύξησης θερμότητας 10°C/min

Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν από τα προηγούμενα θερμογραφήματα με ρυθμό $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ως προς τις θερμοκρασίες εμφάνισης των ενδόθερμων κορυφών των διαφόρων εκχυλίσμάτων. Έχει ήδη αναφερθεί πως οι διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν στο διαφορετικό ρυθμό παροχής θερμότητας.

Στο θερμογράφημα του εκχυλίσματος με μέσο διάλυσης το διάλυμα HP- β -CD (27 mM) παρατηρείται, και στα δύο θερμοκρασιακά προγράμματα, μία οξεία κορυφή, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Η εμφάνιση αυτής της οξείας κορυφής σε υψηλότερη θερμοκρασία εν συγκρίσει με το υδατικό εκχύλισμα του σιδερίτη, πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός πως ένα μέρος των συστατικών του σιδερίτη δεν έχουν ενθυλακωθεί πολύ σταθερά στην υδρόφοβη κοιλότητα. Έτσι, με την παροχή της θερμότητας αποσυνπλέκονται και απελευθερώνονται, ενώ εμφανίζουν σημείο τήξης σε πιο υψηλή θερμοκρασία, αποδίδοντας αυτή την οξεία κορυφή. Η μικρή τιμή της ΔH δείχνει πως αυτά τα συστατικά αποτελούν μικρό μέρος των συστατικών εκχυλίσματος του σιδερίτη.

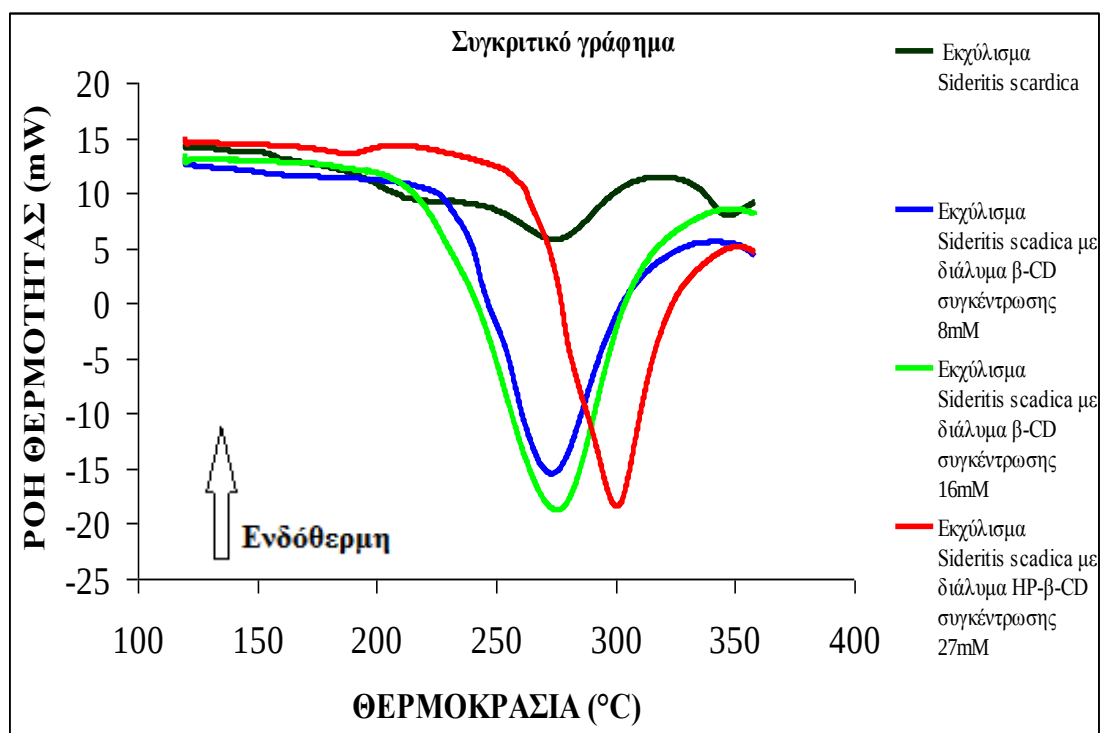
Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες, οι οποίες, ωστόσο, δεν μελετούσαν την ενθυλάκωση των συστατικών του σιδερίτη, αλλά άλλες ουσίες. Ενδεικτικά, κατά τον εγκλεισμό του ελαίου σκόρδου σε β -CD, τα θερμογραφήματα του συμπλόκου εγκλεισμού έδειξαν μία μετακίνηση της ενδόθερμης απορρόφησης σε υψηλότερη θερμοκρασία κατά 4°C εν συγκρίσει με την καθαρή β -CD, ενώ η κορυφή που αντιστοιχούσε στο έλαιο του σκόρδου είχε εξαφανιστεί πλήρως (Wang et al., 2011a). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη η ανίχνευση της ενδόθερμης κορυφής σε υψηλότερη θερμοκρασία συσχετίστηκε με την αλληλεπίδραση της κατεχίνης με την β -CD (Krishnaswamy et al., 2012). Και στις δύο περιπτώσεις, η αύξηση της θερμοκρασίας της εμφανιζόμενης ενδόθερμης αντίδρασης αποδόθηκε στον σχηματισμό μιας υπερ-μοριακής δομής ανάμεσα στο ξενιζόμενο μόριο και τη β -CD. Επιπρόσθετα, οι Gomes et al. (2014) χρησιμοποίησαν τη διαφορά στη ΔH για να δείξουν την υπεροχή κάποιας τεχνικής έναντι της άλλης για τον σχηματισμό συμπλόκου β -CD και εκχυλίσματος κόκκινης πιπεριάς. Με άλλα λόγια, διετύπωσαν την υπόθεση πως η τεχνική ενθυλάκωσης που παρουσιάζει τη χαμηλότερη ενθαλπία τήξης, υπερέχει της άλλης όπου παρουσιάζει μεγαλύτερη ενθαλπία, υποδηλώνοντας έτσι πως η χαμηλότερη ενθαλπία συνεπάγεται καλύτερη αλληλεπίδραση των μορίων του συμπλόκου. Συμπερασματικά, λοιπόν, η μείωση της ενθαλπίας, πιθανώς, επιβεβαιώνει τη μερική αλληλεπίδραση των ξενιζόμενων μορίων και το μόριο ξενιστή, υποδηλώνοντας ότι μέρος των συστατικών του σιδερίτη έχει εγκλειστεί στην

κοιλότητα της β -CD και της HP- β -CD. Σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξαν και οι [Filipovic-Grcic et al. \(2000\)](#), όταν παρατήρησαν μειωμένη ενθαλπία στο σύμπλοκο της β -CD με την υδροκορτιζόνη.

Επιπρόσθετα, η αποτελεσματικότερη ενθυλάκωση στην HP- β -CD μπορεί να αποδοθεί στη χημική τροποποίηση που έχει υποστεί η β -CD, δηλαδή στην προσθήκη των υδροξυ-προπυλομάδων. Η σημαντικώς υψηλότερη ικανότητα ενθυλάκωσης των συστατικών του σιδεριτίτη στην HP- β -CD, πέρα από την υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, υποδεικνύει πως η παρουσία των υδροξυ-προπυλομάδων παίζει σημαντικό ρόλο, πιθανώς υποβοηθώντας την καλύτερη συγκράτηση του ενθυλακωμένου μορίου στην υδρόφοβη κοιλότητα μέσω των δεσμών Υδρογόνου. Το εύρημα αυτό υποστηρίζεται από τη διατυπωθείσα υπόθεση πως η υποκατάσταση της β -CD από υδροξυ-προπυλομάδες αυξάνει την ικανότητα εγκλεισμού των φλαβονοειδών ([Liu et al., 2012](#)).

4.5 Επιβεβαίωση ενθυλάκωσης των συστατικών του εκχυλίσματος του *Sideritis scardica* σε β -CD, HP- β -CD και οκτενυλο-ηλεκτρικό τροποποιημένο άμυλο με χρήση οργάνου DSC σε οξειδωτικές συνθήκες

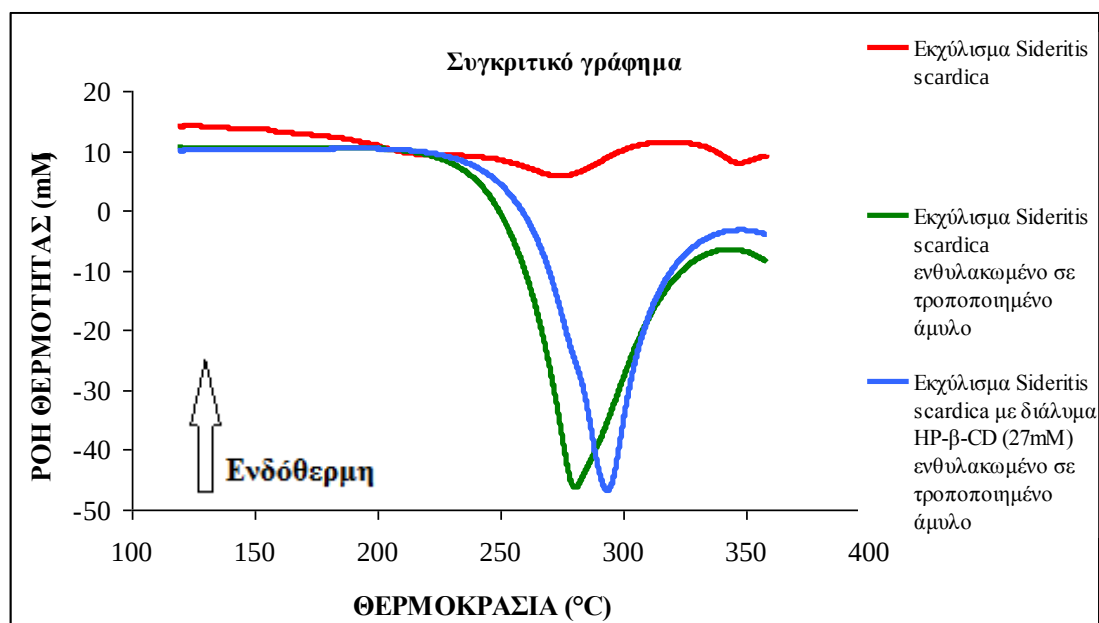
Η εφαρμογή της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης σε οξειδωτικές συνθήκες χρησιμοποιείται για την έμμεση επιβεβαίωση του εγκλεισμού σε β -CD, HP- β -CD και τροποποιημένο άμυλο. Ο εγκλεισμός στην κοιλότητα των β -CD και HP- β -CD, αλλά και στο τροποποιημένο άμυλο προσφέρει σταθερότητα στα μόρια του εκχυλίσματος του σιδεριτίτη έναντι της οξείδωσης. Η αυξημένη σταθερότητα των μορίων του εκχυλίσματος του σιδεριτίτη, εφόσον ενθυλακωθούν, είναι δυνατόν να πιστοποιηθεί με τη μέθοδο DSC σε οξειδωτικές συνθήκες, ενώ παράλληλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επιβεβαίωση της δημιουργίας συμπλόκων εγκλεισμού με τα μόρια ξενιστές. Ειδικότερα, έγινε σύγκριση της σταθερότητας, υπό οξειδωτικές συνθήκες του απλού εκχυλίσματος σιδεριτίτη, καθώς και των εκχυλισμάτων με μέσο εκχύλισης τα υδατικά διαλύματα β -CD (8 mM και 16 mM) και HP- β -CD (27 mM). Επιπλέον, εξετάστηκαν ως προς την οξειδωτική σταθερότητά τους τα δείγματα του λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος σιδεριτίτη και του λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος σιδεριτίτη με προσθήκη HP- β -CD κατά την εκχύλισή του, τα οποία είχαν ενθυλακωθεί σε τροποποιημένο άμυλο με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό.



Σχήμα 4.11: Συγκριτικό γράφημα θερμογραφημάτων: υδατικό εκχύλισμα *Sideritis scardica*, εκχύλισμα *Sideritis scardica* με διάλυμα β-CD (8 mM), εκχύλισμα *Sideritis scardica* με διάλυμα β-CD (16 mM) και εκχύλισμα *Sideritis scardica* με διάλυμα HP-β-CD (27 mM) υπό οξειδωτικές συνθήκες

Στο συγκριτικό διάγραμμα (Σχήμα 4.11) παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα του απλού εκχυλίσματος σιδερίτη και των εκχυλισμάτων με τα τρία διαφορετικά μέσα εκχύλισης: διάλυμα β-CD (8 mM), διάλυμα β-CD (16 mM) και διάλυμα HP-β-CD (27 mM). Στο θερμογράφημα του εκχυλίσματος σιδερίτη φαίνεται πως η έναρξη της οξείδωσής των μορίων του ξεκινά στους 189,58°C. Αντίθετα, στην περίπτωση του εκχυλίσματος με διάλυμα β-CD συγκέντρωσης 8 mM, η οξείδωση ξεκινά σημαντικώς καθυστερημένα στους 236,63°C, και στους 229,63°C στην περίπτωση της μεγαλύτερης συγκέντρωσης του διαλύματος β-CD. Φαίνεται, λοιπόν, πως η εκχύλιση του σιδερίτη με υδατικά διαλύματα β-CD ευνοεί την προστασία τους από την οξείδωση, εξαιτίας του εγκλεισμού τους στην κοιλότητα της β-CD. Ομοίως, το θερμογράφημα του εκχυλίσματος με διάλυμα HP-β-CD (27 mM) απεικονίζει την έναρξη της ενεργοποίησης της οξείδωσης στους 270,89°C. Είναι εμφανές πως η προσθήκη της HP-β-CD κατά την εκχύλιση του σιδερίτη οδηγεί στη μέγιστη προστασία από την οξείδωση, και κατά συνέπεια στον αποτελεσματικότερο εγκλεισμό. Τα αποτελέσματα της μελέτης της σταθερότητας σε συνθήκες

επιταχυνόμενης οξείδωσης συμφωνούν με τα αποτελέσματα της θερμικής σταθερότητας σε αδρανείς συνθήκες που προηγήθηκαν, όσον αφορά την αποτελεσματικότητα του σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού παράλληλα με την εκχύλιση του *Sideritis scardica*.



Σχήμα 4.12: Συγκριτικό γράφημα θερμογραφημάτων: Εκχύλισμα *Sideritis scardica*, εκχύλισμα *Sideritis scardica* ενθυλακωμένο σε MS, εκχύλισμα *Sideritis scardica* με διάλυμα HP-β-CD (27 mM) ενθυλακωμένο σε MS

Στο παραπάνω συγκριτικό διάγραμμα (Σχήμα 4.12) απεικονίζονται τα θερμογραφήματα δύο τύπων εκχυλισμάτων: υδατικό εκχύλισμα και εκχύλισμα με διάλυμα HP-β-CD (27 mM), τα οποία ενθυλακώθηκαν σε τροποποιημένο άμυλο με την τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η έναρξη της οξείδωσης του εκχυλίσματος του σιδερίτη τοποθετείται στους 189,58°C. Η ενθυλάκωσή του σε τροποποιημένο άμυλο οδηγεί σε καθυστερημένη έναρξη της οξείδωσης, και συγκεκριμένα στους 258,55°C. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί έμμεση απόδειξη της επιτυχίας του εγκλεισμού των συστατικών του σιδερίτη στο τροποποιημένο άμυλο. Το θερμογράφημα του ενθυλακωμένου σε τροποποιημένο άμυλο εκχυλίσματος σιδερίτη με διάλυμα HP-β-CD (27 mM) δείχνει πως η έναρξη της οξείδωσης πραγματοποιείται στους 270,9°C - θερμοκρασία σαφώς υψηλότερη από το σκέτο εκχύλισμα σιδερίτη. Όταν, όμως το εκχύλισμα του σιδερίτη ενθυλακώθηκε στην HP-β-CD και το τροποποιημένο άμυλο, δεν παρατηρείται καμία

διαφορά στη θερμοκρασία έναρξης της οξείδωσης εάν συγκριθεί με το μη ενθυλακωμένο εκχυλίσματος σιδερίτη με διάλυμα HP-β-CD (27 mM). Συμπερασματικά, δεν παρατηρείται καμία επιπρόσθετη προστασία στην περίπτωση της διπλής ενθυλάκωσης των συστατικών του σιδερίτη στις οξειδωτικές συνθήκες. Ωστόσο, άλλες τεχνικές επιβεβαίωσης του εγκλεισμού (π.χ. NMR) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, ώστε να εξακριβωθεί με βεβαιότητα η επιτυχία ή όχι της διπλής ενθυλάκωσης.

5. Συμπεράσματα

Μία νέα μέθοδος εκχύλισης εφαρμόστηκε με επιτυχία στην παρούσα εργασία για την εκχύλιση του *Sideritis scardica*. Η επιμέρους μελέτη διαφόρων παραμέτρων οδήγησε στα εξής συμπεράσματα:

- Αποδείχθηκε επιτυχής ο μικροεγκλεισμός των συστατικών του *Sideritis scardica* σε β -CD, HP- β -CD και σε τροποποιημένο άμυλο.
- Η εκχύλιση με διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης β -CD και HP- β -CD οδήγησε σε σημαντική αύξηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, με συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η χρήση, λοιπόν, της β -CD και της HP- β -CD κατά την εκχύλιση του σιδερίτη καθιστά δυνατή την καλύτερη απόδοση της εκχύλισης. Επίσης, η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του ολικού φαινολικού περιεχομένου μπορούν να ενισχύσουν τις ήδη μελετημένες ευεργετικές ιδιότητες του *Sideritis scardica*.
- Ο προσδιορισμός των πολυφαινολικών συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος του *Sideritis scardica* με Αέρια Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας υποδεικνύει την παρουσία βανιλίνης, κινναμωμικού οξέος, τυροσόλης, π-υδροξυβενζοϊκού οξέος, π-υδροξυφαινυλοξικού οξέος, ομοβανιλλικής αλκοόλης, βανιλλικού οξέος, πρωτοκατεχικού οξέος, συριγγικού οξέος, π-κουμαρικού οξέος, φερουλικού οξέος και καφεϊκού οξέος.
- Η αποτελεσματικότερη μικροενθυλάκωση επετεύχθη όταν χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα HP- β -CD συγκέντρωσης 27 mM κατά την εκχύλιση του σιδερίτη, όπως εξακριβώθηκε με τη μέθοδο της Διαφορικής Θερμιδομετρία Σάρωσης.
- Σε οξειδωτικές συνθήκες, ο εγκλεισμός σε β -CD και HP- β -CD, σε μεγαλύτερο βαθμό, οδήγησε σε μεγαλύτερη σταθερότητα των συστατικών του σιδερίτη, εν συγκρίσει με τις ελεύθερες μορφές του υδατικού εκχυλίσματος

- Η ενθυλάκωση του εκχυλίσματος σιδερίτη σε τροποποιημένο άμυλο, αλλά και η διπλή ενθυλάκωσή του σε HP-β-CD και τροποποιημένο άμυλο επιβεβαιώθηκε από την εφαρμογή της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης σε οξειδωτικές συνθήκες. Ωστόσο, η διπλή ενθυλάκωση δεν φάνηκε να προσδίδει περαιτέρω προστασία έναντι της οξείδωσης.

Εν κατακλείδι, η προσθήκη β-CD και HP-β-CD κατά την «πράσινη» εκχύλιση του *Sideritis scardica* οδηγεί σε παραγωγή τελικού προϊόντος, το οποίο είναι ιδιαίτερα σταθερό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή καινοτόμων τροφίμων με λειτουργικές ιδιότητες και διατροφικών συμπληρωμάτων, διατηρώντας και ενισχύοντας τις φαρμακολογικές ιδιότητες του σιδερίτη. Η διαδικασία εκχύλισης που προτείνεται στην παρούσα εργασία είναι πιο αποτελεσματική και φιλική προς το περιβάλλον.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ai, Y., Nelson, B., Birt, D.F., & Jane, G. (2013). In vitro and in vivo digestion of octenyl succinic starch. *Carbohydrate Polymers*, 98(2): 1266-1271.

Aliagiannis, N., Kalpoutzakis, E., Chinou I.B., Mitakou, S., Gikas, E., & Tsaibopoulos, A. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9): 4168-4170.

Andreoli, T.E. (2000). Free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 108(8): 650-651.

Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., & Simal-Gandara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23(7): 1631-1640.

Augustin, M.A. & Sanguansri, L. (2008). Encapsulation of Bioactives. *Food Materials Science.*, J. Aguilera and P. Lillford, Springer New York: 577-601.

Ayar-kayali. H., Urek, R.O., Kaniboglu. M., & Tarhan, L. (2009). Antioxidant activities of endemic *Sideritis leptoclada* and *Mentha dumetorum* aqueous extracts used in Turkey folk medicine. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33: 285–295.

Barroso, A.M.K., Pierucci, A.P.T.R., Freitas, S.P., Torres,A.G., & da Rocha-Leao, M.H.M. (2013). Oxidative stability and sensory evaluation of microencapsulated flaxseed oil. *Journal of Microencapsulation*, 31(2): 193-201.

Barrow, C.J., Nolan, C., & Holub., B. (2009). Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. *Journal of Functional Foods*, 1(1): 38-43.

Basile, A., Ferrara, L., Pezzo, M.D., Mele, G., Sorbo, S., Bassi, P., & Montesano, D. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(1): 32-36.

Berbicz, F., Nogueira, A.C., Medina-Neto, A., Natali, M.R., Baesso, M.L., & Matioli, G. (2011). Use of photoacoustic spectroscopy in the characterization of inclusion complexes of benzophenone-3-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and ex vivo evaluation of the percutaneous penetration of sunscreen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(2): 449-457.

Bertolini, A.C., Siani, A.C., & Grosso, C.R. (2001). Stability of monoterpenes encapsulated in gum Arabic by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2): 780-785.

Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2 Suppl 1): 3-8.

Bhosale, R., Singhal, R. (2006). Process optimization for the synthesis of octenyl succinyl derivative of waxy corn and amaranth starches. *Carbohydrate polymers*, 66(4): 521-527.

Bjoern, F., Bernd, W., & Jens, P. (2013). Extract preparation from *Sideritis scardica* enhances memorizing skills of mice in Morris water maze. *Planta Medica*, 79: 1142 (79-PB9).

Borrmann, D., Pierucci, A.P.T.R., Leite, S., & Leaa, M.H. (2013). Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*) juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray-drying. *Food and Bioproducts Processing*, 91(1): 23-27.

Bruno, M., Rosselli, S., Pibiri, I., Kilgore, N., Lee, K.-H. (2002). Anti-VIH agents derived from the ent-kaurene diterpenoid linearol. *Journal of Natural Products*, 65: 1594–1597.

Buschmann, H.J., & Schollmeyer, E. (2002). Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *Journal of Cosmetic Science*, 53(3): 185–191.

Ceconi, C., Boraso, A., Cargoni, A., & Ferrari, R. (2003). Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 420(2): 217-221.

Celik, I. & Kaya M.S. (2011). The antioxidant role of *Sideritis caesarea* infusion against TCA toxicity in rats. *British Journal of Nutrition*, 105(5): 663-668.

Cevallos, P.A., Buera, M.P., Buera, M.P., & Elizalde, B.E. (2010). Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*, 99(1): 70-75.

Chalchat J.C., Ozcan M., Figueredo G. (2011). The composition of essential oils of different parts of laurel, mountain tea, sage and ajowan, *Journal of Food Biochemistry*, 35: 484–499.

Champagne, C.P. & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2): 184-190.

Charami, M.T., Lazari, D., Karioti, A., Skaltsa, H., Hadjipavlou-Litina, D., & Souleles, C. (2008). Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (*Lamiaceae*). *Phytotherapy Research*, 22(4): 450-454.

Chemat F, Vian M.A., & Cravotto, G. (2012) Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7): 8615-8627.

Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2): 621-629.

Cicco, N. Lanorte, M.T. Paraggio, M. Viggiano, M. Lattanzio, V. (2009) A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91: 107–110.

Clas, S.D., Dlaton, C.R., Hancock, B.C. (1999). Differential scanning calorimetry: Applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2: 311-320.

da Rosa, C.G., Borges, C.D., Zambiasi, R.C., Nunes, M.R., Benvenuti, E.V., Luz, S.R.d., D'Avila, R.F., & Rutz, J.K. (2013). Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, 46: 138-146

Danesi, F., Saha, S., Kroon, P. A., Glibetić, M., Konić-Ristić, A., D'Antuono, L. F. and Bordoni, A. (2013), Bioactive-rich *Sideritis scardica* tea (mountain tea) is as potent as *Camellia sinensis* tea at inducing cellular antioxidant defences and preventing oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 3558–3564

de Castro O. & Rivera-Nunez, D. (1994). A Taxonomic Revision of the Section *Sideritis* (Genus *Sideritis*) (Labiatae). In: Cramer, J. (Ed.), *Phanerogamarum Monographiae Tomus XXI*, Berlin.

de la Puerta, R., Fernández-Arche, M.A., Lopez-Lozaro, M., & Garcia, M.D. (2012). Antioxidant and cytotoxic activities of *Sideritis perezlarae* (Borja) Roselló, Stübing and Peris. *Natural Product Research*, 27(17): 1602-1606.

de las Heras, Hortelano, B., Giron, N., Rodriquez, B., & Bosca, L. (2007). Kaurane diterpenes protect against apoptosis and inhibition of phagocytosis in activated macrophages. *British Journal of Pharmacology*, 152(2): 249-255.

de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4): 292-302.

Del Valle, E.M.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9): 1033-1046.

Demirtas I., Sahin, A., Ayhan, B., Tekin, S., & Telci, I., (2009) Antiproliferative Effects of the Methanolic Extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. linearis, *Records of Natural Products*, 3:2 104-109.

Desai, K.G.H. & Jin Park H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7): 1361-1394.

Dimpfel, W. (2013). Pharmacological classification of herbal extracts by means of comparison to spectral EEG signatures induced by synthetic drugs in the freely moving rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(2): 583-589.

Dodziuk, H. (2006). Molecules with Holes – Cyclodextrins, in Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications (ed H. Dodziuk), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG.

Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M., and Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity. *LWT- Food science and Technology*, 44(9): 1908-1914.

Dontas, I.A., Lelovas, P.P., Kourkoulis, S.K., Aligiannis, N., Mitakou, S., Galanos, A., Kassi, E., Mitousoudis, A., Xanthos, A., Papaioannou, N., Lyritis, G.P. (2011). Protective effect of *Sideritis euboea* extract on bone mineral density and strength of ovariectomized rats. *Menopause*, 18(8): 915-922.

Estevinho, B.N., Rocha, F., Santos, L., & Alves., A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2): 138-155.

Ezhilarasi, P. N., Karthik, P. ,& Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3): 628-647.

Fang, Z. & Bhandari B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10): 510-523.

Fernandes, R.V., Borges, S.V., & Botrel, D.A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrates Polymers*, 101: 524-532.

Filipovic-Grcic, J., Voinovich, D., Moneghini, M., Becirevic-Lacan, M. Magarotto L., & Jalsenjak, I. (2000). Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone–hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *European Journal of Pharmaceutical Science*, (9): 373-379.

Fraga, B.M. (2012). Phytochemistry and chemotaxonomy of *Sideritis* species from the Mediterranean region. *Phytochemistry*, 76: 7-24.

Fraga, B.M., Hernandez, M.G., Fernandez, C., & Santana, J. (2009). A chemotaxonomic study of nine Canarian *Sideritis* species. *Phytochemistry*, 70(8): 1038-1048.

Gardiner, P., Kemper, K.J., Legedza, A., & Phillips, R. (2007). Factors associated with herb and dietary supplement use by young adults in the United States. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 7: 39.

Gardiner, P., Whelan, J., White, L.F., Fillipelli, A.C., Bharmal, N., & Kaptcuk T.J. (2013). A Systematic Review of the Prevalence of Herb Usage Among Racial/Ethnic Minorities in the United States. *Journal of Immigrant and Minority Health*, 15(4): 817-828.

Gergis, V., Spiliotis, V., Argyriadou, N., & Poulos, C. (1991), Relation between the antimicrobial activity and the chemical composition of the essential oil of *Sideritis sipylea* boiss. (labiateae). *Flavour and Fragrance Journal*, 6: 93–95.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9): 1107-1121.

Ghosh, S.K. (2006). Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective. *Functional Coatings*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 1-28.

Gibbs, B.F., Kermasha, S., & Mulligan, C.N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3): 213-224.

Gil, M.I., Ferreres, F., Marrero, A., Tomas-Lorente, F., & Tomas-Barberan, F. (1993). Distribution of flavonoid aglycones and glycosides in *Sideritis* species from the Canary islands and Madeira. *Phytochemistry*, 34(1): 227-232.

Giordano, F., Novak, C., & Moyano, J.R. (2001). Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 380(2): 123-151.

Gomes, L.M.M., Petito, N., Costa, V.G., Falcao, D.Q., & de Lima Araujo, K.G. Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β -cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. *Food Chemistry* 2014, 148- 428.

Gonzalez-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gomez-Serranillos, M.P. (2011). *Sideritis* spp.: uses, chemical composition and pharmacological activities-a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2): 209-225.

Gonzalez-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gomez-Serranillos, M.P. (2013). Kaurane diterpenes from *Sideritis* spp. exert a cytoprotective effect against oxidative injury that is associated with modulation of the Nrf2 system. *Phytochemistry*, 93: 116-123.

González-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gomez-Serranillos, M.P. (2013). Nrf2-dependent neuroprotective activity of diterpenoids isolated from *Sideritis* spp. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(3): 645-652.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7–8): 330-347.

Graßmann, J. (2005). Terpenoids as Plant Antioxidants. *Vitamins & Hormones*. L. Gerald, Academic Press. Volume 72: 505-535.

Gurbuz, I., Ozkan, A.M., Yesilada, E., & Kutsal, O. (2005). Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3): 313-318.

Güvenç, A., Okada, Y., Akkol, E., Duman, H., Okuyama, H., & Calis, I. (2010). Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic compounds from *Sideritis brevibracteata*. *Food Chemistry*, 118(3): 686-692.

Haiyee, Z.A., Saim, N., Said, M., Illias, R., Mustapha, W., & Hassan, O. (2009). Characterization of cyclodextrin complexes with turmeric oleoresin. *Food Chemistry*, 114(2): 459-465.

He, J., Liu, J., & Zhang, G. (2008) Slowly Digestible Waxy Maize Starch Prepared by Octenyl Succinic Anhydride Esterification and Heat–Moisture Treatment: Glycemic Response and Mechanism. *Biomacromolecules*, 9(1): 175-184.

Heim, K.E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional and Biochemistry*, 13(10): 572-584.

Hernandez-Perez, M. & Rabanal, R. M. (2002). Analgesic and antiinflammatory properties of *Sideritis lotsyi* var. Mascaensis. *Phytotherapy Research*, 16(3): 264-266.

Hernandez-Perez, M. & Rabanal, R. M. (2002). Evaluation of the antinflammatory and analgesic activity of *Sideritis canariensis* var. pannosa in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1): 43-47.

Hernandez-Perez, M., Sanchez-Mateo, C.C., Montalbetti-Moreno Y, & Rabanal R.M. (2004). Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans*

Ait. var. eriocephala Webb aerial part. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3): 279-284.

Hermenean, A., Popescu, C., Ardelean, A., Stan, M., Hadaruga, N., Mihali, C.V., Costache, M., & Dinischiotu, A. (2012) Hepatoprotective Effects of *Berberis vulgaris* L. Extract/ β Cyclodextrin on Carbon Tetrachloride–Induced Acute Toxicity in Mice. *International Journal of Molecular Science*, 13: 9014-9034.

Hsu, C.M., Yu, S.C., Tsai, F.C., & Tsai, Y. (2013). Enhancement of rhubarb extract solubility and bioactivity by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 98(2): 1422-1429.

Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuoglu, M., & Baser, K.H. (2005). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Endemic Species from Turkey: *Sideritis cilicica* and *Sideritis bilgerana*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(6): 679-682.

Janeska, B., Stefova, M., & Alipieva, K. (2007). Assay of flavonoid aglycones from the species of genus *Sideritis* (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 57(3): 371-377.

Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Mourtzinou, I., Troullidou, E., Chiou, A., & Karathanos, V.T. (2009). Encapsulation of complex extracts in β -cyclodextrin: An application to propolis ethanolic extract. *Journal of Microencapsulation*, 26(7): 603–613.

Karavoltzos, S., Plavšić M., Kalogeropoulos, N., Kogiannou, D., Strmecki, S., Sakellari, A., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2014) Copper complexing properties and physico-chemical characterisation of the organic matter in Greek herbal infusions. *Food Chemistry*, 160: 53-60

Kelly, J.P., Kaufman, D.W., Kelley, K., Rosenberg, L., Anderson, T.E., & Mitchell, A.A. (2005). Recent trends in use of herbal and other natural products. *Archives of International Medicine*, 165(3): 281-286.

Kim, H., Kim, H., & Jung, S. (2008). Aqueous solubility enhancement of some flavones by complexation with cyclodextrins. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29(3): 590–594.

Kirimer, N., Baser, H. C., Demirci, B., & Duman, H. (2004). Essential Oils of *Sideritis* Species of Turkey Belonging to the Section *Empedoclia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(1): 19-23.

Knorle, R. (2012). Extracts of *Sideritis scardica* as triple monoamine reuptake inhibitors. *Journal of Neural Transmission*, 119(12): 1477-1482.

Kogiannou, D.A., Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M.G., & Kaliora A.C. (2013). Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 61: 152-159.

Koleva, I.I., Linssen, J.P., van Beek, T.A., Evstatieva, L.N., Kortenska, V., & Handjieva, N. (2003), Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 809–819.

Konic-Ristic, A., Srdic-Rajic, T., Kardum, N., Aleksic-VeliCkovic, V., Kroon, P.A., Hollands, W.J., Needs, P.W., Boyko, N., Hayran, O., Jorjande, M., & Glibetic, M. (2013). Effects of bioactive-rich extracts of pomegranate, persimmon, nettle, dill, kale and *Sideritis* and isolated bioactives on arachidonic acid induced markers of platelet activation and aggregation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(14): 3581-3587.

Koutsaviti A., Bazos I., Milenkovic M., Pavlovic-Drobac M., & Tzakou O. (2013). Antimicrobial Activity and Essential Oil Composition of Five *Sideritis* taxa of *Empedoclia* and *Hesiodia* Sect. from Greece, *Records of Natural Products*, 7:1 6-14.

Kralj, B., Šmidovnik, A., & Kobe, J. (2009). Mass spectrometric investigations of α - and β -cyclodextrin complexes with ortho-, meta- and para-coumaric acids by negative

mode electrospray ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23: 171–180.

Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A., & Mihailov A. (2010) Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta biochimica Polonica*, 57(2): 229-34.

Krishnaswamy K., Valurie Orsat, V., & Thangavel, K. (2012). Synthesis and characterization of nano-encapsulated catechin by molecular inclusion with beta-cyclodextrin. *Journal of Food engineering*, 111: 255-264.

Kuang, S.S., Oliveira, J.C., & Crean, A.M. (2010). Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(10): 951-968.

Kurkov, S. V. & Loftsson T. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1): 167-180.

Lentini, F., (2000). The role of ethnobotics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. *Fitoterapia*, 71: S83–S88.

Liu, B., Li, W., Nguyen, T. A., & Zhao, J. (2012). Empirical, thermodynamic and quantum-chemical investigations of inclusion complexation between flavanones and (2-hydroxypropyl)-cyclodextrins. *Food Chemistry*, 134: 926–932.

Liu, B., Liu, Y., Zhu, X., Li, W., Zhao, J., & Liang, G. (2013) Physicochemical characterisation of the supramolecular structure of luteolin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry*, 141: 900 – 906.

Lobo, V., Patil A., Phatak A., & Chandra N. (2010), Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8): 118–126

Mantegna, S., Binello, A., Boffa, L., Giorgis, M., Cena, C., Cravotto G. (2012), A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chemistry*, 130: 746–750.

Martins I.M., Barreiro, M.F., Coelho, M., & Rodrigues,, A.E. (2013). Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245(0): 191-200.

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

Marques, H.C., Hadgraft, J., & Kellaway, I. (1990). Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. *International Journal of Pharmaceutics*, 63: 259–266.

Moriwaki, C., Mangolim, C.S., Ruiz, G.B., de Moraes, G.R., Baesso, M.L., & Matioli, G. (2014). Biosynthesis of CGTase by immobilized alkalophilic bacilli and crystallization of beta-cyclodextrin: Effective techniques to investigate cell immobilization and the production of cyclodextrins. *Biochemical Engineering Journal*, 83(0): 22-32.

Mourtzinou, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A., & Karathanos, V. (2007). Encapsulation of olive leaf extract in β -cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8088–8094.

Munin, A. & Edward-Levy (2011) Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 3: 793-829

Mura, P. (2014). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (14): 113-117

Musa Özcan, M., Ünver, A., Ucar, T., & Arslan, D. (2008). Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. *Food Chemistry*, 106(3): 1120-1127.

Nakiboglu, M., Urek, R. O., Ayar-Kayali, H., & Tarhan, L. (2007). Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey. *Food Chemistry*, 104(2): 630-635.

Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2): 182-186.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1(0): 1806-1815.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42(0): 469-479.

Nguyen, T.A., Liu, B., Zhao, J., Thomas, D., & Hook, J. (2013). An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry*, 136(1): 186-192.

Nieddu, M., Rassu, G., Boattu, G., Bosi, G., Trevisi, P., Giunchedi, P., Carta, A., & Gavini, E. (2014). Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: in vitro and in vivo studies. *Carbohydrate Polymers*, 102: 393-399.

Niedowicz, D.M. & Daleke, D.L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 43(2): 289-330.

Paramera, E.I., Konteles, S.J., & Karathanos, V.T. (2011). Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. *Food Chemistry*, 125(3): 913-922.

Petreska, J., Stefova, M., Moreno D.A., Tomas-Barberan F.A, Stefkov G., Kulevanova S., & Gil-Izquierdo A. (2011). Potential bioactive phenolics of

Macedonian *Sideritis* species used for medicinal “Mountain Tea”. *Food Chemistry*, 125(1): 13-20.

Pham-Hoang, B.N., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., & Wavhe, Y. (2013). Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(15): 6635-6645.

Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., & Henriques, M. (2014). Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrates Polymers*, 101(0): 121-135.

Piozzi, F., Bruno, M., Rosselli, S., & Maggio, A. (2006). The diterpenoids from the genus *Sideritis*. *Studies in Natural Products Chemistry*, 33: 493–540

Pourcel, L., Routaboul, J.M., Cheynier, V., Lepinieec, L., & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12(1): 29-36.

Ratnasooriya, C.C. and Rupasinghe, H.P.V. (2012). Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 134: 625–631.

Roos, Y.H. Phase Transitions in Foods, Academic Press, 1995

Saad, B., Azaizeh, H., & Omar, S. (2005). Tradition and perspectives of arab herbal medicine: a review. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(4): 475-479.

Sagar Kedare. B., & Singh, R.P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* 48(4): 412–422.

Saldaña, M.D.A. & Martínez-Monteagudo, S. I. (2013). Oxidative Stability of Fats and Oils Measured by Differential Scanning Calorimetry for Food and Industrial Applications. ISBN 978-953-51-0947-1

Sansone, F., Picerno, P., Mencherini, T., Villesco, F., D'Ursi, A.M., Aquino, R.P., & Lauro, M.R. (2011). Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability. *Journal of Food Engineering*, 103(2): 188-196.

Schroyen, P. M., van der Meer, R., & de Kruif, C.G. (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *The Proceedings of Nutrition Society*, 60(4): 475-479.

Seridi, L. & Boufelfel A. (2013). Wogonin hosted @ β -cyclodextrin: Structural, electronic and nuclear studies. *Journal of Molecular Liquids*, 188(0): 13-21.

Shan, B., Yiszong, Y.Z., Sun, M., & Corke, H. (2005) Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7749-7759.

Shahidi, F. & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 33(6): 501-547.

Stalin, T., Srinivasan, K., Sivakumar, K., & Radhakrishnan, S. (2014). Preparation and characterizations of solid/aqueous phases inclusion complex of 2,4-dinitroaniline with β -cyclodextrin. *Carbohydrate polymers*. 107: 72-84

Stella, V. J. & He, Q. (2008). Cyclodextrins. *Toxicology Pathology*, 36(1): 30-42.

Solecki R., & Shanidar I.V. (1975). A Neanderthal flower burial in Northern Iraq. *Science*, 190: 880-1

Stagos D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A.M., & Kouretas, D. (2012) Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*. 50(11): 4115-4124.

Szejtli, J. & Szente, L. (2005). Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 61(3): 115-125.

Tadic, V.M., Jeremic, I., Dobric S, Isakovic A, Markovic I, Trajkovic V, Bojovic D, Arsic I. (2012a). Anti-inflammatory, gastroprotective, and cytotoxic effects of *Sideritis scardica* extracts. *Planta Medica*, 78(5): 415-427.

Tadić V., Bojović, D., Arsić, I., Dordević, S., Aksentijevic, K., Stamenić, K., & Janković, S. (2012b). Chemical and Antimicrobial Evaluation of Supercritical and Conventional *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae Extracts. *Molecules*, 17: 2683-2703

Todorova, M. & Trendafilova, A. (2014). *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(2): 256-265

Topçu, G., Ertaş, A., Ozturk, M., Dincel, D., Kilic, T., & Halfon, B. (2011). Ent-kaurane diterpenoids isolated from *Sideritis congesta*. *Phytochemistry Letters*, 4(4): 436-439.

Trendafilova, A.B., Todorova, M.N., Evstatieva, L.N., & Antonova, D.V. (2013). Variability in the essential-oil composition of *Sideritis scardica* GRISEB from native Bulgarian populations. *Chemistry and Biodiversity*, 10(3): 484-492.

Tsaknis, J. & Lalas, S. (2005). Extraction and identification of natural antioxidant from *Sideritis euboea* (mountain tea). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16): 6375-6381.

Tsibranska, I., Tylkowski, B., Kochanov, R., & Alipieva, K. (2011). Extraction of biologically active compounds from *Sideritis* ssp. *L. Food and Bioproducts Processing*, 89(4): 273-280.

Tylkowski, B., Tsibranska, I., Kochanov, R., Peev, G., & Giamberini, M. (2011). Concentration of biologically active compounds extracted from *Sideritis ssp. L.* by nanofiltration. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4): 307-314.

Valente, A.J.M., Nilsson, M., & Soderman, O. (2005). Interactions between n-octyl and n-nonyl β -d-glucosides and α - and β -cyclodextrins as seen by self-diffusion NMR. *Journal of Colloid and Interface Science*, 281(1): 218-224.

Valente, A.J.M. & Söderman, O. (2014). The formation of host–guest complexes between surfactants and cyclodextrins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 205(0): 156-176.

Vasilopoulou, C.G., Kontogianni, V.G., Linardaki, Z.I., Iatrou, G., Lamari, F, Neratzaki, A.A., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A.G., & Margarity, M. (2013). Phytochemical composition of "mountain tea" from *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* and evaluation of its behavioral and oxidant/antioxidant effects on adult mice. *European Journal of Nutrition*, 52(1): 107-116.

Villena, C., Vivas, J.M., & Villar, A.M. (2000). Suppression of croton oil-induced rabbit corneal edema by *Sideritis javalambrensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1-2): 301-305.

Wang, J., Cao, .Y, Sun, B., & Wang, C. (2011a) Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β - cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chemistry* 127: 1680-1685.

Wang, J., Cao, Y., Sun, B., & Wang, C. (2011b) Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl-b-cyclodextrin. *Food Chemistry*, 124: 1069-1075

World Health Organization: Traditional Medicine. 2008; 2011.

Zhang, M., Li, J., Zhang, L., & Chao, J.(2009). Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1891-1895.

Zhao, M., Wanga, H., Yang, B., & Tao, H. (2010) Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food Chemistry*. (4): 1138-1142.

Zuidam N. & Shimon, E. (2010). Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food processings, ISBN 978-1-4419-1008-0

Ελληνική Βιβλιογραφία

Μουρτζίνος, Ι. (2007). Προστασία και ελεγχόμενη απελευθέρωση διατροφολογικών ουσιών μικροενθλακωμένων σε δομές βιοπολυμερών. Διδακτορική Διατριβή, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ηλεκτρονικές πηγές

http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=cyclodextrin