

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Κωνσταντίνου Κρινούλα

***ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΣΕ ΔΟΜΕΣ
ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ***

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΠΟΥ ΕΚΠΟΝΗΘΗΚΕ ΣΤΟ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ ΒΑΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)
ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΜΠΟΣΚΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2006

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Κωνσταντίνου Κρινούλα

***ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΣΕ ΔΟΜΕΣ
ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ***

Διπλωματική εργασία ΜΔΕ

ΑΘΗΝΑ 2006

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται ο εγκλεισμός των μονοτερπενίων θυμόλης και γερανιόλης με μέσα εγκλεισμού την β-κυκλοδεξτρίνη και το τροποποιημένο άμυλο.

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Φυσικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Διαιτολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή κ. Β. Καραθάνου, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την αμέριστη επιστημονική και ηθική υποστήριξή του. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Γιάννη Μουρτζίνο, χημικό, για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του. Ευχαριστώ επίσης τους κ. Ν. Ανδρικόπουλο και κ. Γ. Μπόσκου, μέλη της τριμελούς μου επιτροπής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
A.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ
	5
B.	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
	7
B.1	Γενικά για τον εγκλεισμό
	7
B.1.1	Spray Draying (Ξήρανση με ψεκασμό)
	9
B.1.2	Λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη
	12
B.2	Μέσα ενθυλάκωσης
	13
B.2.1	Τροποποιημένο άμυλο
	13
B.2.2	Γενικά για τις κυκλοδεξτρίνες ως μέσα εγκλεισμού
	15
B.3	Μελέτη διαλυτότητας διατροφοδραστικών μορίων
	23
B.4	Μονοτερπένια
	26
B.4.1	Θυμόλη
	26
B.4.2	Γερανιόλη
	27
Γ.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
	33
Δ.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
	34
Δ.1	Υλικά – Αντιδραστήρια
	34
Δ.2	Συσκευές – όργανα
	34
Δ.3	Μέθοδοι παρασκευής συμπλόκων
	35
Δ.3.1	Παρασκευή του συμπλόκου με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης
	35
Δ.3.1.1	Παρασκευή συμπλόκου θυμόλης β-κυκλοδεξτρίνης
	35
Δ.3.1.2	Παρασκευή συμπλόκου θυμόλης β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση
	35
Δ.3.1.3	Παρασκευή συμπλόκου θυμόλης β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση με χρήση γαλακτωματοποιητή
	35
Δ.3.1.4	Παρασκευή συμπλόκου γερανιόλης β-κυκλοδεξτρίνης
	36
Δ.3.1.5	Παρασκευή συμπλόκου γερανιόλης β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση
	36
Δ.3.1.6	Παρασκευή συμπλόκου γερανιόλης β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση παρουσία γαλακτωματοποιητή
	36
Δ.3.1.7	Παρασκευή μίγματος θυμόλης β-κυκλοδεξτρίνης
	36
Δ.3.2	Παρασκευή συμπλόκων με τη μέθοδο ξηρού ψεκασμού
	36
Δ.3.2.1	Παρασκευή συμπλόκου θυμόλης /τροποποιημένου αμύλου
	36
Δ.3.2.2	Παρασκευή συμπλόκου γερανιόλης – τροποποιημένου αμύλου
	37
Δ.4	Μελέτη διαλυτότητας
	37
Δ.4.1	Μελέτη διαλυτότητας θυμόλης
	38
Δ.4.2	Μελέτη διαλυτότητας γερανιόλης
	39
Δ.5	Μελέτη σχηματισμού και σταθερότητας συμπλόκων με τη μέθοδο Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)
	41
Δ.5.1	Μελέτη οξείδωσης θυμόλης , γερανιόλης με τη με τη μέθοδο DSC
	41
Δ.5.2.1	Μελέτη οξείδωσης θυμόλης και των συμπλόκων της
	41
Δ.5.2.2	Μελέτη οξείδωσης γερανιόλης και των συμπλόκων της
	42
Ε.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ
	43
ΣΤ.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ
	57
Ζ.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
	59

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος μιας ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας που έχει ως στόχο την μελέτη της συμπεριφοράς διατροφοδοραστικών συστατικών (nutraceuticals), εγκλεισμένων (ενθυλακωμένων, encapsulated) σε δομές υδατανθράκων ή άλλων μακροσυστατικών.

Στην παρούσα μελέτη παρασκευάστηκαν σύμπλοκα θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης και γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, με ξήρανση του διαλύματος του συμπλόκου με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης καθώς και σύμπλοκα θυμόλης/τροποποιημένου αμύλου και γερανιόλης/τροποποιημένου αμύλου με ξήρανση του αιωρήματος του συμπλόκου με τη μέθοδο ξήρανσης με ψεκασμό (spray drying). Ο σχηματισμός των συμπλόκων της θυμόλης επιβεβαιώθηκε με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) καθώς η θυμόλη βρίσκεται σε στερεή μορφή, κάτι που δεν κατέστη δυνατό να πραγματοποιηθεί για το μόριο της γερανιόλης καθώς αυτή είναι σε υγρή μορφή. Τα θερμογραφήματα έδειξαν ότι η ενδόθερμη απορρόφηση που εμφανίζεται στην περίπτωση της θυμόλης και του φυσικού μίγματος της θυμόλης με β-κυκλοδεξτρίνη, εξαιτίας της τήξης των κρυστάλλων, δεν εμφανίζεται στο θερμογράφημα των συμπλόκων που προκύπτουν με τις μεθόδους λυοφιλίωσης και ξηρού ψεκασμού, κάτι που αποδίδεται καταρχήν στη δημιουργία συμπλόκων ενθυλάκωσης. Η χρήση της τεχνικής DSC σε οξειδωτικές συνθήκες έδειξε ότι η ενθυλακωμένη γερανιόλη (τόσο με τη μορφή συμπλόκου γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης όσο και με τη μορφή συμπλόκου γερανιόλης/τροποποιημένου αμύλου) προστατεύεται από την οξείδωση, εφόσον παραμένει σταθερή σε θερμοκρασίες στις οποίες η ελεύθερη γερανιόλη οξειδώνεται. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η β-κυκλοδεξτρίνη αποτελεί καλύτερο μέσο εγκλεισμού για το μόριο της γερανιόλης καθώς αυξάνει την προστασία/σταθερότητα του εν λόγω μορίου στην οξείδωση. Ακόμη φαίνεται ότι η ομογενοποίηση και η δημιουργία γαλακτώματος δεν συμβάλει στη δημιουργία σταθερότερου μορίου κατά τη συμπλοκοποίηση. Αντίθετα η ενθυλακωμένη θυμόλη δεν φαίνεται να προστατεύεται περισσότερο από τη οξείδωση, καθώς είναι ένα μόριο σταθερό στην οξείδωση από μόνο του.

Όσον αφορά την διαλυτότητα των μορίων θυμόλης και γερανιόλης στο νερό αυτή αυξάνεται σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν αυξανόμενες ποσότητες β-κυκλοδεξτρίνης λόγω της εισαγωγής τους στο εσωτερικό της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενθυλακωμένες μορφές τόσο της θυμόλης όσο και της γερανιόλης είναι περισσότερο διαλυτές στο νερό από ότι η ελεύθερη θυμόλη και γερανιόλη.

Η αύξηση της προστασίας των δύο μορίων και η αύξηση της διαλυτότητας είναι σημαντική για την χρήση των εγκλεισμένων μορφών των δύο μορίων σε υδατικά διαλύματα.

B. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 Γενικά για τον εγκλεισμό

Ο εγκλεισμός (ενθυλάκωση, encapsulation) είναι μία μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία για την μεταφορά φαρμάκων, ενώ στη τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιείται κυρίως για τη μεταφορά αρωματικών ενώσεων. Μπορεί επίσης να εφαρμοσθεί για τον εγκλεισμό λειτουργικών συστατικών, δηλαδή συστατικών που έχουν θετικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Η παροχή προστασίας από ασθένειες διαμέσου της δίαιτας αποτελεί μια μοναδική ευκαιρία για τα λειτουργικά τρόφιμα. Συχνά τα προϊόντα αυτά αποτελούν νέα πρόκληση για την τεχνολογία τροφίμων. Σε πολλές περιπτώσεις η εφαρμογή του μικροεγκλεισμού μπορεί να ξεπεράσει τα προβλήματα που προκύπτουν από την ενσωμάτωση των συστατικών αυτών μέσα σε διατροφικά συστήματα, όπως πχ. τη σταδιακή υποβάθμισή τους, χάνοντας έτσι τις ιδιότητές τους ή ακόμη την πιθανότητα να καταστούν επικίνδυνα λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων. Ακόμη τα συστατικά αυτά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα συστατικά που βρίσκονται στο τρόφιμο μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους ή αλλάζοντας το χρώμα ή τη γεύση του προϊόντος (Schooyen, 2001).

Με το μικροεγκλεισμό περιβάλλονται μικρά στερεά σωματίδια, υγρά σταγονίδια ή αέρια με μια μορφή καλύμματος (Betrolini et.al.,2001, Schrooyen, et.al, 2001) και ένα υγρό συστατικό μπορεί να μετατραπεί σε στερεή σκόνη. Οι βασικοί στόχοι του εγκλεισμού στη χημεία των τροφίμων είναι:

1. Ο διαχωρισμός συστατικών
2. Η μείωση την τοξικότητας ενός υλικού
3. Η αλλαγή των επιφανειακών ιδιοτήτων ενός υλικού
4. Η μείωση της ευφλεκτότητας των υγρών
5. Η αύξηση στην διάρκεια αποθήκευσης
6. Η επικάλυψη της δυσάρεστης γεύσης συγκεκριμένων συστατικών
7. Η μείωση της υποβάθμισης και παραγωγή τοξικών προϊόντων λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων
8. Η αύξηση της διαλυτότητας συστατικών σε συγκεκριμένο μέσο

Στην τεχνολογία του εγκλεισμού το συστατικό που εγκλείεται αναφέρεται ως πυρηνικό υλικό, ενεργή φάση, ή εσωτερική φάση. Το υλικό που περιβάλλει το εγκλεισμένο συστατικό αναφέρεται ως βάση εγκλεισμού, μεταφορέας, κάλυμμα (Gibbs, et.al, 1999)

Γενικά οι τεχνικές που οδηγούν στο σχηματισμό τοιχώματος γύρω από το εγκλεισμένο συστατικό, εγγυώνται ότι δεν παρατηρούνται διαρροές και διαβεβαιώνουν ότι οι ανεπιθύμητες ουσίες παραμένουν εκτός. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο εγκλεισμός οδηγεί σε τελικό προϊόν με τη μορφή στερεής σκόνης, συνήθως η μέθοδος περιλαμβάνει σύστημα απομάκρυνσης του νερού από το διάλυμα ή το αιώρημα του συμπλόκου (Beristain et.al, 1996).

Οι πιο γνωστές τεχνικές εγκλεισμού, που περιγράφονται στην βιβλιογραφία είναι:

- spray drying (ξήρανση με ψεκασμό)
 - Lyophilization or freeze-drying (λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη)
 - spray cooling ή spray chilling (ψύξη με ψεκασμό)
 - co-crystallization (συγκρυστάλλωση)
 - absorption (απορρόφηση)
 - spinning disk (περιστρεφόμενος δίσκος)
 - rapid expansion of supercritical solution (ταχεία εκτόνωση υπερκρίσιμου διαλύματος)
 - liposome entrapment (εγκλεισμός με λιποσώματα)
 - fluidized bed (ρευστοποιημένη κλίνη)
 - extrusion (εξώθηση ή εκβολή),
 - formation of inclusion complex (σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού)
- (Szente & Szejtli, 2004).

Παρακάτω περιγράφονται οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρύτατα και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την ξήρανση του διαλύματος και του γαλακτώματος του εγκλεισμένου συστατικού: η μέθοδος ξήρανσης με ψεκασμό και η λυοφιλίωση.

B.1.1 Spray Draying (ξήρανση με ψεκασμό)

Ο όρος ξήρανση (drying) αναφέρεται κυρίως στην αφαίρεση μικρών σχετικά ποσοτήτων νερού από στερεά ή ημιστερεά υλικά. Η αφαίρεση υγρασίας από αέρια αποδίδεται κυρίως με τους όρους αφύγρανση (dehumidification) και προσρόφηση (absorption), ενώ ο όρος εξάτμιση (evaporation) αναφέρεται συνήθως στην αφαίρεση μεγάλων ποσοτήτων νερού από διαλύματα .

Στις διεργασίες ξήρανσης είθισται να δίνεται έμφαση στο αποξηραμένο τελικό προϊόν και, στις περισσότερες περιπτώσεις, η ξήρανση επιτυγχάνεται με αφαίρεση υγρασίας σε θερμοκρασίες κατώτερες του σημείου βρασμού, ενώ στην εξάτμιση η αφαίρεση υγρασίας γίνεται στο σημείο βρασμού του διαλύματος. Η μελέτη της ξήρανσης και οι υπολογισμοί για το απαιτούμενο μέγεθος του ξηραντήρα περιλαμβάνουν πολλών ειδών επιμέρους προβλήματα από τα πεδία της ρευστό μηχανικής, της φυσικοχημείας επιφανειών και της δομής στερεών, καθώς και προβλήματα μεταφοράς θερμότητας και μάζας. Σε πολλές περιπτώσεις τα εκτυλισσόμενα φαινόμενα είναι αρκετά πολύπλοκα και η γνώση που υπάρχει γύρω από αυτά είναι περιορισμένη, με αποτέλεσμα οι ποσοτικές εκτιμήσεις στον σχεδιασμό του ξηραντήρα να καθίστανται πρακτικά αδύνατες.

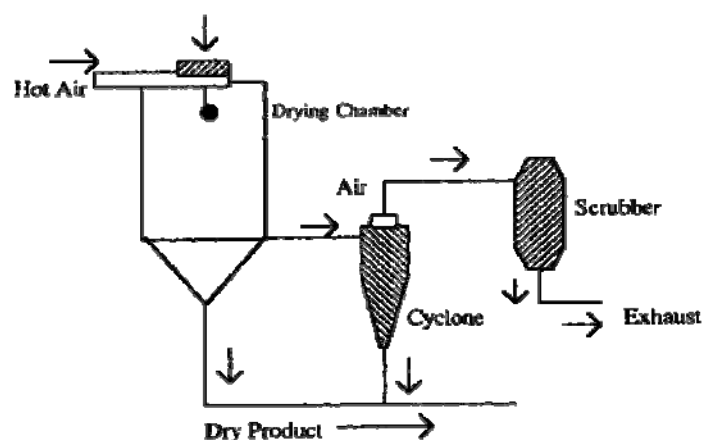
Η μέθοδος Spray drying (ξήρανση με ψεκασμό) είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται για τη ξήρανση υδατικών ή οργανικών διαλυμάτων της βιομηχανίας τροφίμων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη συντήρηση τροφίμων ή ως απλή μέθοδος ταχείας ξήρανσης (Bertolini et al., 2001).

Εφαρμόζεται εκτεταμένα για την παρασκευή σκόνης γάλακτος, ορού γάλακτος, παγωτού, βουτύρου, τυριού, παιδικών τροφών με πρώτη ύλη το γάλα, καφέ, χυμών φρούτων, το αλεύρι, και τον αραβόσιτο. Επίσης εξασφαλίζει την μείωση του βάρους και όγκου. Ο αριθμός των προϊόντων στα οποία εφαρμόζεται αυτή η μέθοδος συνεχίζει να επεκτείνεται, έτσι ώστε σήμερα η ξήρανση με την τεχνική αυτή συνδέεται με πολλά προϊόντα που χρησιμοποιούμε καθημερινά. Αποτελεί και την κυρίαρχη τεχνολογική μέθοδο στον τομέα του μικροεγκλεισμού (Heinzelmann and Franke, 1999). Η μέθοδος περιλαμβάνει εξάτμιση του νερού από μια τροφή μέσω ανάμειξης του μέσου ψεκασμού και ξήρανσης. Το μέσο ξήρανσης είναι ο αέρας. Η

ξήρανση συνεχίζει μέχρι να επιτευχθεί το επιθυμητό ποσοστό υγρασίας στα σωματίδια ψεκασμού και το προϊόν ακολούθως διαχωρίζεται από τον αέρα. Το μείγμα που υπόκειται ξήρανση μπορεί να είναι διάλυμα, γαλάκτωμα, μέσο διασποράς ή αιώρημα.

Η ξήρανση με εκνέφωση πραγματοποιείται με τη χρήση των ξηραντήρων εκνέφωσης. Η πρώτη ύλη (διάλυμα, γαλάκτωμα, μέσο διασποράς ή αιώρημα) εισάγεται εντός του θαλάμου ξήρανσης υπό την μορφή λεπτών σταγονιδίων που έρχονται σε άμεση επαφή με ρεύμα θερμού αέρα για σύντομο χρονικό διάστημα. Τα σταγονίδια παράγονται με τη βοήθεια εκνεφωτή που περιστρέφεται με μεγάλη ταχύτητα. Ο χρόνος παραμονής στο θάλαμο ξήρανσης είναι 1-20 δευτερόλεπτα. Ο ξηραντήρας αποτελείται από: σύστημα θέρμανσης και κυκλοφορίας αέρα για την επίτευξη την απαιτούμενης θερμοκρασίας και ταχύτητας του εκνεφωτή για την παραγωγή υγρών σφαιριδίων του απαιτούμενου μεγέθους, θάλαμο στον οποίο έρχονται σε στιγμιαία επαφή τα σταγονίδια με το θερμό αέρα, σύστημα συλλογής, διαχωρισμού και μετακίνησης του προϊόντος ξήρανσης. Τα κυριότερα στάδια της ξήρανσης με εκνέφωση είναι: η είσοδος του προϊόντος, το φιλτράρισμα, η ψύξη, η αποθήκευση, προθέρμανσης στους 71-88°C, η προσυμπύκνωση περίπου στους 43°C έως 42%, η είσοδος θερμού αέρα, ο διαχωρισμός της σκόνης από τον αέρα και η συσκευασία της σκόνης (Αρβανιτογιάννης, 2004) .

Ο πιο κοινός τύπος συσκευής spray dryer (ξηραντήρας ψεκασμού) είναι η open-cycle, co-current φαίνεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Open cycle, co-current spray drying layout. (Barbosa-Canovas and Vega-Mercado, 1996).

Η διαδικασία ξεκινά με το σχηματισμό ενός υδατικού φορέα. Η ουσία ή το μίγμα ουσιών που θα υποστεί ξήρανση γαλακτωματοποιείται σε έναν φορέα και εισέρχεται στο θάλαμο της συσκευής, με μεγάλη πίεση θερμού αέρα, μέσω ενός ατμοποιητή και τα σωματίδια θερμαίνονται άμεσα. Ακολούθως σχηματίζεται ένα φιλμ στην επιφάνεια του σταγονιδίου επιβραδύνοντας τη διάχυση της ύλης ενώ επιτρέπει στα μόρια ύδατος να μεταναστεύσουν γρήγορα στην επιφάνεια και να εξατμιστούν. Ελέγχοντας τη θερμοκρασία εισαγωγής, το ρυθμό εισαγωγής του γαλακτώματος και την ψύξη του εξατμιστή, η θερμοκρασία του σταγονιδίου δεν πρέπει να ξεπερνά τους 100°C. Τα σωματίδια που έχουν υποστεί ξήρανση αφαιρούνται με τρόπο που εμποδίζει την υπερθέρμανσή και την καύση τους.

Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται για ένα ιδανικό φορέα εγκλεισμού στη διαδικασία spray drying περιλαμβάνουν, υψηλό βαθμό διαλυτότητας, μειωμένο ιξώδες, ιδιότητες γαλακτωματοποίησης, ιδιότητες ξήρανσης, μη υγροσκοπικό χαρακτήρα, ήπια γεύση, να μην είναι δραστικός, και να έχει χαμηλό κόστος. Φορείς που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι:

- Τροποποιημένο άμυλο
- Αραβικό κόμμι
- Μαλτοδεξτρίνες
- Πρωτεΐνες γάλακτος
- Ζελατίνη που έχει υποστεί υδρόλυση
- Τροποποιημένες κυτταρίνες

Η συσκευή ξήρανσης με ψεκασμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μικρή ή μεγάλη παραγωγή προϊόντων ξήρανσης ανάλογα με το σχεδιασμό της. Μπορούν να επιτύχουν χωρητικότητα εξάτμισης μέχρι 7000 kg/ώρα. Έστω και αν το κόστος του εξοπλισμού είναι αρκετά υψηλό, το κόστος συντήρησης είναι χαμηλό εξαιτίας των λιγοστών τμημάτων που αφαιρούνται και της χρησιμοποίησης ανθεκτικών υλικών. Η καθαρότητα των προϊόντων διατηρείται αφού τα τρόφιμα δεν έρχονται σε άμεση

επαφή με την επιφάνεια του εξοπλισμού μέχρι να ξηραθούν, ελαχιστοποιώντας έτσι προβλήματα προσκόλλησης και διάβρωσης. Το σύστημα λειτουργίας είναι απλό και επίσης εξασφαλίζεται χαμηλή πυκνότητα προϊόντος (Nonhebel and Moss, 1971).

B.1.2 Λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη

Η διεργασία της ξήρανσης με κατάψυξη (λυοφιλίωση, freeze drying/lyophilisation) είναι μια ιδιαίτερα εξελιγμένη μέθοδος αφυδάτωσης τροφίμων. Χρησιμοποιείται με επιτυχία για την αφυδάτωση ευαίσθητων, υψηλής αξίας τροφίμων όπως καφές, φράουλας, γαρίδων μανιταριών και ορισμένες φορές τεμαχισμένων τροφίμων όπως το κρέας. Τα προϊόντα μετά την αφυδάτωσή τους διατηρούν κατά μεγάλο ποσοστό την αρχική γεύση και άρωμα, γεγονός που ήταν αδύνατο με τις κλασικές μεθόδους αφυδάτωσης. Η αρχή στην οποία βασίζεται η λυοφιλίωση είναι ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες χαμηλής τάσης ατμών, ο πάγος μπορεί να εξαχνωθεί χωρίς απαραίτητα να προηγηθεί τήξη. Η λέξη λυόφιλο αφορά στο γεγονός της ταχύτατης ενυδάτωσης αυτών των προϊόντων.

Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στην εξάχνωση του πάγου των προϊόντων. Το νερό μεταβαίνει από την στερεά του κατάσταση (πάγος) στην αέρια (υδρατμός) χωρίς να περάσει από την υγρή. Αυτό γίνεται κατανοητό αν θεωρήσουμε το διάγραμμα φάσεων του καθαρού νερού. Η καμπύλη εξάχνωσης/συμπύκνωσης βρίσκεται μεταξύ της στερεάς και της αέριας φάσης του νερού σε πολύ χαμηλές πιέσεις και θερμοκρασίες, κάτω από το τριπλό σημείο του νερού, όπου συνυπάρχουν οι τρεις φάσεις του νερού (θερμοκρασία 0,01°C και πίεση 6,104 mbar ή 4,58 mm Hg). Για τη φυσική αυτή μεταβολή στερεό σε αέριο απαιτείται σημαντική προσφορά ενέργειας, λόγω θερμοδυναμικής απαίτησης για την αλλαγή της φάσης, έστω και αν η διαδικασία γίνεται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Η λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης του πάγου είναι πολύ υψηλή, μεγαλύτερη (ανά μονάδα μάζας) από τις θερμότητες τήξης και εξάτμισης (τήξη πάγου 80 cal/g (0°C), εξάτμιση νερού 540 cal/g (100°C) εξάχνωση πάγου 678,5 cal/g (-20°C). Επομένως για την πραγματοποίηση της ξήρανσης με κατάψυξη απαιτούνται τα ακόλουθα:

1. Τα προϊόντα να είναι αρχικά κατεψυγμένα κατά προτίμηση σε θερμοκρασία μικρότερη των -40°C για επίτευξη καλής ποιότητας αποξηραμένων προϊόντων.
2. Να υπάρχει υψηλό κενό, δηλαδή πίεση χαμηλότερη τουλάχιστον από την πίεση του τριπλού σημείου (4,58 mm Hg) και συνήθως $< 0,2 - 0,5$ mm Hg. Το κενό δημιουργείται καταρχήν με αντλία κενού.
3. Να παρέχεται μεγάλο ποσό ενέργειας για την πραγματοποίηση της εξάχνωσης. Η ενέργεια αυτή είναι εύκολο να παρασχεθεί ακόμη και από το περιβάλλον γιατί υπάρχει μεγάλη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ περιβάλλοντος (πχ 20°C) και προϊόντος στον ξηραντήρα (-40°C). Η θέρμανση γίνεται με αγωγή μέσω θερμαινόμενων πλακών.
4. Λόγω της εξάχνωσης του πάγου δημιουργούνται πολύ μεγάλες ποσότητες υδρατμών που πρέπει να αφαιρεθούν πριν εισέλθουν στην αντλία κενού.
5. Για την καλύτερη μεταφορά της θερμότητας στο παγωμένο προς ξήρανση προϊόν θα πρέπει το προϊόν να είναι αρκετά λεπτό ή σε μεγάλη διασπορά ή να έχει μικρό πάχος, γεγονός που κάνει τη μέθοδο αυτή αρκετά αναποτελεσματική για ξήρανση μεγάλων ποσοτήτων (Καραθάνος, 2006).

B.2 Μέσα ενθυλάκωσης

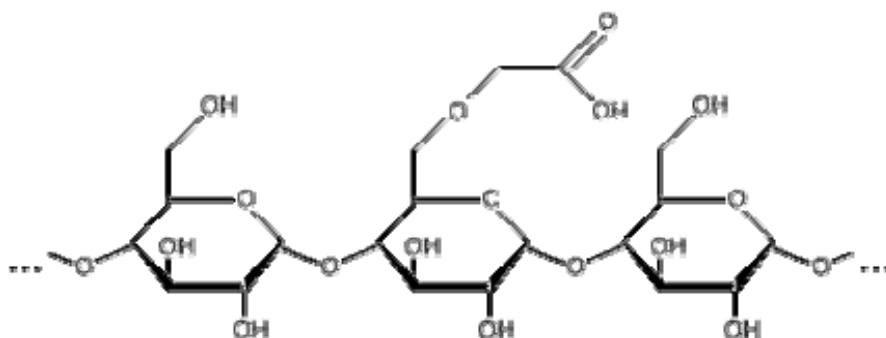
B.2.1 Τροποποιημένο άμυλο

Το άμυλο είναι γραμμικός διακλαδισμένος πολυσακχαρίτης και συνίσταται από αλυσίδες πολλών μορίων γλυκόζης. Αποτελεί την κύρια αποθηκευτική μορφή υδατάνθρακα σε ρίζες και σε σπόρους. Στο άμυλο η μία αλυσίδα (η απλή γραμμική) καλείται αμυλόζη και η άλλη, η σύνθετη διακλαδισμένη αλυσίδα, καλείται αμυλοπηκίνη.

Οι διάφορες μορφές αμύλου μπορεί να τροποποιηθούν με ποικίλους τρόπους, κυρίως χημικούς ή ενζυμικούς με σκοπό την αλλαγή των λειτουργικών τους ιδιοτήτων και την αύξηση του αριθμού των εφαρμογών τους στη τεχνολογία τροφίμων.

Τρόποι τροποποίησης του αμύλου:

- ♦ Μια μορφή τροποποιημένου αμύλου προκύπτει με ένωση των διαφορετικών αλυσίδων του και σχηματισμό μιας μορφής δικτύου. Ο σχηματισμός δεσμών μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων πραγματοποιείται όταν η υδροξυλική ομάδα της μίας αλυσίδας ενώνεται με την υδροξυλική ομάδα της γειτονικής αλυσίδας. Η διαδικασία αυτή καθιστά το άμυλο πιο ανθεκτικό στη θέρμανση και στα οξέα. Ο σχηματισμός δεσμών μεταξύ των αλυσίδων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω θέρμανσης ή με τη χρήση αντιδραστηρίων, όπως ο φώσφορος ή η γλυκερόλη.
- ♦ Μια συνήθης μορφή τροποποιημένου αμύλου μπορεί να προκύψει με θέρμανση του αμύλου, οπότε σπάνε οι αλυσίδες του σε μόρια μικρότερου μοριακού βάρους όπως δεξτρίνες, και μαλτοδεξτρίνη.
- ♦ Τροποποιημένο άμυλο μπορεί να προκύψει με αντικατάσταση των υδρογόνων του από άλλο μόριο. Ως παράδειγμα αναφέρεται το καρβοξυμεθυλικό άμυλο που προκύπτει από την αντικατάσταση του υδρογόνου του υδροξυλίου του C6 από μια καρβοξυμεθυλική ομάδα σχηματίζοντας το καρβοξυμεθυλικό άμυλο.



Σχήμα 2 Καρβοξυμεθυλικό άμυλο

Προσθέτοντας την καρβοξυμεθυλική ομάδα το άμυλο καθίσταται λιγότερο επιρρεπές σε βλάβες οι οποίες μπορούν να προκληθούν από την θερμότητα και τα βακτήρια. Οι καρβοξυμεθυλικές ομάδες καθιστούν το άμυλο περισσότερο υδρόφιλο, και συνεισφέρουν στη ένωση των αλυσίδων. Αυτό καθιστά το καρβοξυμεθυλικό άμυλο χρήσιμο για την παρασκευή της ασπιρίνης καθώς και άλλων δισκίων, κάνοντας τα να διασπώνται πιο γρήγορα.

♦ Ακόμη μπορούν να προστεθούν μεγαλύτερες αλυσίδες άνθρακα, όπως καρβοξυαιθυλικές ομάδες ή καρβοξυπροπυλικές ομάδες. Προσθέτοντας ογκώδεις λειτουργικές ομάδες όπως καρβοξυμεθυλικές και καρβοξυαιθυλικές ομάδες μειώνεται η τάση του αμύλου να επανακρυσταλλώνεται.

♦ Επίσης μπορεί να γίνει εστεροποίηση του αμύλου με τροποποίησή του χρησιμοποιώντας κάποιο οξύ. Ο εστέρας είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης μιας αλκοόλης και ενός οξέος. Το άμυλο χάνει τη υδροξυλική ομάδα του ομάδα και το οξύ χάνει το υδρογόνο του. Ως αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι ο σχηματισμός νερού.

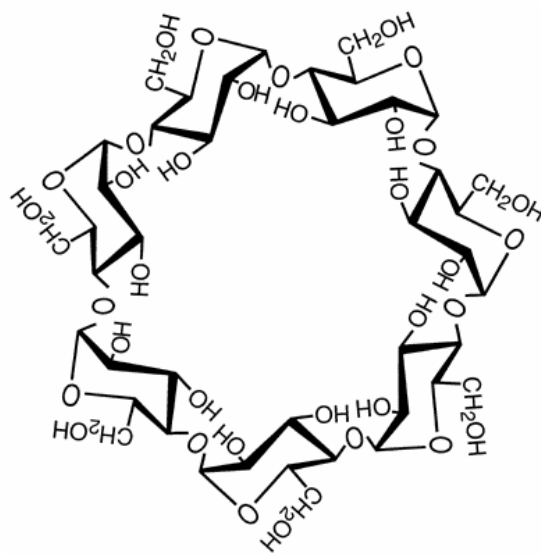
Χρησιμοποιώντας το οξικό οξύ, σχηματίζεται το οξικό άμυλο το οποίο χρησιμοποιείται για το σχηματισμό πολυμέρων που σχηματίζουν κάλυμμα/ μεμβράνη για τα φαρμακευτικά προϊόντα. Τα οξέα μπορούν επίσης να διασπών τις μακριές αλυσίδες σε μικρότερα μόρια πολύ περισσότερο από ότι η θέρμανση για το σχηματισμό πολυδεξτρίνων, μαλτοδεξτρίνων ή δεξτρινών. Για το σκοπό αυτό μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ένζυμα.

♦ Μερικές φορές το άμυλο προζελατινοποιείται προκειμένου να διαλύεται ευκολότερα κατά την παρασκευή προϊόντων.

♦ Οξειδώνεται με υδροχλωρικό νάτριο. Το οξειδωμένο άμυλο είναι λευκότερο από το μη τροποποιημένο άμυλο, έχει αυξημένη καθαρότητα και χαμηλότερο ιξώδες (Field Q.S).

B.2.2 Γενικά για τις κυκλοδεξτρίνες ως μέσα εγκλεισμού

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικά μόρια που σχηματίζονται από ενζυματική κατεργασία του αμύλου. Το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση της κυκλοδεξτρίνης προέρχεται από μικροοργανισμούς ή φυτά και αποικοδομεί το άμυλο με ενδομοριακό

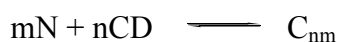


Σχήμα Δομή β-κυκλοδεξτρίνης

σπάσιμο της αλυσίδας. Από χημικής άποψης οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικά oligομερή της γλυκόζης με 6, 7 ή 8 μονάδες γλυκόζης και ονομάζονται α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνες αντίστοιχα, συνδεόμενα με 1,4-α-γλυκοζιτικούς δεσμούς (Szente and Szejtli 2004; Clarot et al, 2000)

Η εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρίνων είναι υδρόφοβη (Yuliani et al, 2005) ενώ εξωτερικά το μόριο είναι υδρόφιλο. Έτσι οι κυκλοδεξτρίνες εύκολα σχηματίζουν σύμπλοκα με μία μεγάλη ποικιλία μορίων καθώς και ιόντα μορίων. Διατροφο-δραστικά συστατικά, τα οποία συνήθως είναι λιπόφιλα, μπορούν εύκολα να εγκλεισθούν στις κυκλοδεξτρίνες (Bibby et al, 2000; Clarot et al., 2000). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την αντικατάσταση μορίων νερού που συγκρατούνται στο κέντρο της κυκλοδεξτρίνης, από μόρια του εγκλειόμενου συστατικού. Το εγκλειόμενο συστατικό αλληλεπιδρά με την κυκλοδεξτρίνη με δεσμούς υδρογόνου ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Η ισορροπία σχηματισμού του συμπλόκου μεταξύ κυκλοδεξτρίνης και διατροφο-δραστικού συστατικού περιγράφεται από την αντίδραση:



Η σταθερά σχηματισμού συμπλόκου περιγράφεται από την εξίσωση 1

$$K_{nm} = [C_{nm}] / [N]^m [CD]^n \quad (1)$$

Η απελευθέρωση του εγκλεισμένου μορίου πραγματοποιείται όταν το σύμπλοκο τοποθετείται σε περίσσεια νερού, με αντιστροφή της θερμοδυναμικής ισορροπίας (Kant et al., 2004). Η απελευθέρωση του μορίου επηρεάζεται από άλλα μόρια τα οποία ενδέχεται να υπάρχουν. Το εγκλεισμένο μόριο μπορεί να δεσμευθεί σε άλλες ουσίες ως αποτέλεσμα του αυξανόμενου ρυθμού απελευθέρωσης.

Διάφορες μέθοδοι μπορούν να εφαρμοσθούν για το σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ διατροφο-δραστικού συστατικού και κυκλοδεξτρίνης, μεταξύ των οποίων ο σχηματισμός συμπλόκου σε υδατικό διάλυμα με ή χωρίς ρύθμιση του pH, η μέθοδος της συγκαταβύθισης, η απευθείας ανάμιξη στερεής σκόνης με την παρουσία μικρής ποσότητας νερού (Kneading) (Hedges, 1998).

Ο σχηματισμός ενός συμπλόκου σε υδατικό διάλυμα μπορεί να είναι μια απλή διαδικασία. Ο απαραίτητος εξοπλισμός περιορίζεται σε ένα ποτήρι ζέσεως και μία θερμή πλάκα με αναδευτήρα (Szente, 2004). Το διατροφο-δραστικό συστατικό μπορεί να προστεθεί σε απιονισμένο και απεσταγμένο νερό που περιέχει τη κυκλοδεξτρίνη, σε μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης-διατροφοδραστικού συστατικού 1:1, 2:1, 1:2 ανάλογα με την αναλογία των δύο συστατικών που προβλέπεται να περιέχονται στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Το υδατοδιαλυτό σύμπλοκο που προκύπτει σχηματίζεται μετά από ανάμιξη των συστατικών για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία που περιγράφεται παραπάνω. Ο καθαρισμός του σχηματιζόμενου συμπλόκου περιλαμβάνει διήθηση με φίλτρο συγκεκριμένης διαμέτρου. Εναλλακτικά ο σχηματισμός μπορεί να γίνει όταν το διατροφο-δραστικό συστατικό διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται σε πολικό διαλύτη, και ακολουθεί ανάμιξη των δύο διαλυμάτων. Η τρίτη διαδικασία περιλαμβάνει ανάμιξη του διατροφο-δραστικού συστατικού και της κυκλοδεξτρίνης σε μικρή ποσότητα νερού. Αυτή η μέθοδος μπορεί εύκολα εφαρμοστεί για εμπορική παραγωγή. Για την απομάκρυνση του νερού από το διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί διήθηση,

φυγοκέντριση, λυοφιλίωση ή ξηρός ψεκασμός, όπως αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω.

Οι παραπάνω διαδικασίες δεν περιλαμβάνουν ρύθμιση του pH. Εναλλακτικά μπορεί να γίνει σχηματισμός του συμπλόκου σε συγκεκριμένη τιμή pH με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η κατάσταση ιονισμού ορισμένων μορίων (Zornoza, 1998) παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του συμπλόκου, πιθανό λόγω του ότι η ιονισμένη μορφή του διατρο-φοδραστικού συστατικού είναι λιγότερο ικανή να αντικαταστήσει τα υδατοδιαλυτά μόρια που βρίσκονται στη κοιλότητα και να σχηματίσουν πιο σταθερά μόρια. Αυτός είναι και ο λόγος που σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα, με στόχο την μετατροπή των μορίων στη μη ιονισμένη κατάσταση. Σαν παράδειγμα αναφέρεται ότι ο εγκλεισμός του κινναμικού οξέος σε κυκλοδεξτρίνες επιτυγχάνεται καλύτερα σε pH 4.(Rodis et al., 2004).

Πολλά βιο-δραστικά μόρια είναι αδιάλυτα στο νερό εφόσον είναι μη πολικά. Πολλές υδρόφοβες ομάδες, όπως οι ομάδες βενζολίου των βιολογικών μορίων μπορούν εύκολα να ενσωματωθούν στη κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών. Ο εγκλεισμός σχετικά λιπόφιλων ουσιών σε κυκλοδεξτρίνες μεταβάλλει τη διαλυτότητά τους στο νερό, και με τον τρόπο αυτό μετατρέπονται σε μία μορφή με την οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εμπλουτισμό τροφίμων που το κύριο συστατικό είναι το νερό. Ακόμη ο εγκλεισμός μορίων μέσα στη κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών μπορεί να αλλάξει της φυσικοχημικές ιδιότητες του εγκλεισμένου μορίου σε πολύ μεγάλο βαθμό (Clarot et al., 2000).

Οι κυκλοδεξτρίνες εκτός από μεταφορείς διατροφο-δραστικών μορίων, μπορούν επίσης να προστατεύσουν τα ευπαθή μόρια από την οξείδωση, όπως παρουσιάζεται στο παράδειγμα της βανιλίνης (Karathanos et al., 2006). Επιπλέον οι κυκλοδεξτρίνες προστατεύουν τα μόρια έναντι της αποικοδόμησης που προωθείται από το φως. Για παράδειγμα η α -τοκοφερόλη, ένα φωτοευαίσθητο μόριο, μπορεί να προστατευθεί, με το σχηματισμό συμπλόκου με β -κυκλοδεξτρίνες. Επίσης τα εγκλεισμένα μόρια προστατεύονται από αποικοδόμηση λόγω θέρμανσης και αυτός

είναι ένας ακόμη λόγος που επιβάλλει τη χρησιμοποίηση των κυκλοδεξτρινών για την προστασία των δραστικών μορίων.

Ο εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνες έχει εφαρμοσθεί σε φαρμακευτικά μόρια προκειμένου να αλλάξει τη διαλυτότητα διάφορων συστατικών, με μικρή διαλυτότητα στο νερό. Επιπλέον, ο εγκλεισμός βελτιώνει την σταθερότητα των φαρμάκων και τη βιοδιαθεσιμότητα τους, επιπλέον μπορεί να μετατρέψει τα μόρια σε λιγότερο τοξικά. Πολλές μέθοδοι που εφαρμόζονται στον εγκλεισμό των φαρμακευτικών ουσιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εγκλεισμό διατροφολογικών δραστικών μορίων. Για παράδειγμα είναι πολύ γνωστό από μελέτες εγκλεισμού φαρμακευτικών μορίων ότι η β-κυκλοδεξτρίνη προσφέρει ένα ιδανικό περιβάλλον για να τη δέσμευση φαινολικών δακτυλίων.

Στο εμπόριο κυκλοφορούν διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες ως προς το μέγεθος του δακτυλίου και το βαθμό υποκατάστασης. Η επιλογή της πιο κατάλληλης κυκλοδεξτρίνης που θα χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό συγκεκριμένων διατροφολογικών μορίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως:

- Το μέγεθος του μορίου
- Η διαλυτότητα του μορίου στο νερό
- Το κόστος της κάθε κυκλοδεξτρίνης, σε σχέση με το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα
- Το τρόφιμο όπου το εγκλεισμένο μόριο πρόκειται να ενσωματωθεί
- Από την διαδικασία που θα χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό του συμπλόκου
- Τη διαθέσιμη βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο ή συγγενή μόριο
- Αν επιτρέπεται η χρήση τους σε συστήματα τροφίμων
- Τη μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση σχηματισμού του συμπλόκου. Σαν παράδειγμα αναφέρεται ότι η υδρόξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη σχηματίζει σύμπλοκο που είναι δύσκολο να μελετηθεί ως προς τη δομή του με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού που χρησιμοποιείται ευρέως για την επιβεβαίωση του εγκλεισμού.

Οι διαστάσεις των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων κυκλοδεξτρινών εμφανίζονται στο πιο κάτω Πίνακα 1. Οι συγκεκριμένες κυκλοδεξτρίνες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με μια ευρεία ποικιλία οργανικών συστατικών. Το μέγεθος της κοιλότητας των κυκλοδεξτρινών επιτρέπει την εκλεκτική δέσμευση ορισμένων μορίων. Η β-κυκλοδεξτρίνη αποτελεί το πιο συνηθισμένο μέσω εγκλεισμού εξαιτίας της υψηλής ικανότητας που έχει να σχηματίζει σύμπλοκα και λόγω χαμηλού κόστους. Η δομή της είναι κυκλική και έχει σχήμα κώνου (Yuliani et al., 2005). Η β-κυκλοδεξτρίνη βρίσκεται στη λίστα GRAS από το 1998, ως μεταφορέας γεύσης σε επίπεδα 2% σε πολυάριθμα τρόφιμα. Μεταξύ των κυκλοδεξτρινών που χρησιμοποιούνται συχνά, η β-κυκλοδεξτρίνη προσφέρει άριστο περιβάλλον δέσμευσης των φαινολικών δακτυλίων, ο φαινολικός δακτύλιος απαντάται συχνά στις δομές διατροφο-δραστικών συστατικών όπως είναι οι δομές των αντιοξειδωτικών.

Πίνακας 1: Διαστάσεις α-, β-, γ-κυκλοδεξτρίνης.

Τύπος κυκλοδεξτρίνης	Εσωτ.διάμετρος Å	Εξωτ. Διάμετρος Å	Μήκος Å
α-κυκλοδεξτρίνη	5.7	13.7	7.8
β-κυκλοδεξτρίνη	7.8	15.3	7.8
γ-κυκλοδεξτρίνη	9.5	16.9	7.8

Κατά τον εγκλεισμό των μορίων, οι φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητές τους τροποποιούνται (Szente, 2004). Όπως αναφέρθηκε, οι κυκλοδεξτρίνες αυξάνουν τη διαλυτότητα των μορίων στο νερό. Επιπλέον με τον εγκλεισμό αυξάνεται η διαπερατότητα σε μεμβράνες και η βιοδιαθεσιμότητα των μερικών διαλυτών διατροφο-δραστικών μορίων.

Έχουν απομονωθεί και μελετηθεί μεγαλύτερου μεγέθους κυκλοδεξτρίνες (Szejtli J., 1998), όπως η δ-κυκλοδεξτρίνη, η-κυκλοδεξτρίνη και θ-κυκλοδεξτρίνη, οι οποίες έχουν μεγαλύτερο μέγεθος εσωτερικής κοιλότητας. Η δ-κυκλοδεξτρίνη περιλαμβάνει εννιά μόρια γλυκόζης και έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό από την β-κυκλοδεξτρίνη, αλλά μικρότερη διαλυτότητα από την α- και γ-κυκλοδεξτρίνη. Οι μεγαλύτερου μεγέθους κυκλοδεξτρίνες δεν έχουν φυσιολογική κυλινδρική δομή

και η κοιλότητα τους είναι ακόμη μικρότερη από αυτή των γ-κυκλοδεξτρινών. Από το 1997 έχει αναφερθεί η σύνθεση περισσότερων από 1500 παραγώγων κυκλοδεξτρινών. Μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το μέγεθος και το είδος της ομάδας που εισάγεται ως υποκατάστατης. Τα διάφορα παράγωγα των κυκλοδεξτρινών παρουσιάζονται στο Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Παράγωγα κυκλοδεξτρινών

Παράγωγα κυκλοδεξτρινών		
α-	B-	γ-
Μεθυλ-	Μεθυλ-	Μεθυλ-
	Αιθυλ-	
Βουτυλ-	Βουτυλ-	Βουτυλ-
	Υδροξυαιθυλ-	Υδροξυαιθυλ-
2-Υδροξυπροπυλ-Ι	2-υδροξυπροπυλ-	2-υδροξυπροπυλ-
	2-υδροξυβουτυλ-	
Ακετυλ-	Ακετυλ-	Ακετυλ-
	Προπιονυλ-	
	Βουτυρυλ-	
Σουκινυλ-	Σουκινυλ-	Σουκινυλ-
	Βενζοϋλ-	
	Παλμιτυλ-Ι	
	Τολουενεσουλφονυλ-	

Τα πιο γνωστά υποκατεστημένα παράγωγα κυκλοδεξτρινών είναι η υδρόξυπροπυλο-β-κυκλοδετρίνη (HP-β-CD), τυχαίας μεθυλίωσης α- και β-κυκλοδετρίνη, μαλτοζυλ-β-κυκλοδετρίνη, ακετυλιωμένη κυκλοδετρίνη, σουλφοβουτυλαιθερ-β-κυκλοδετρίνη (SE-b-CD). Με τη χρήση αυτών των παραγώγων κυκλοδεξτρινών επιτυγχάνεται συνήθως μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα και μικρότερη τοξικότητα (Connors, 1997). Η τυχαία υποκατάσταση κρυσταλλικών μορίων κυκλοδετρίνης, έχει ως αποτέλεσμα το μετασχηματισμό τους σε άμορφο μίγμα ισομερών παραγώγων, τα οποία έχουν επιπλέον διαλυτότητα στο νερό (Lofsson T, & Masson M., 2001)

Στο Πίνακα 3 παρουσιάζεται η διαλυτότητα στο νερό και το κόστος των συχνά χρησιμοποιούμενων κυκλοδεξτρινών. Από τον πίνακα αυτό φαίνεται ότι οι υποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες παρουσιάζουν σημαντικά αυξανόμενη διαλυτότητα.

Πίνακας 3: Κόστος διαφόρων τύπων κυκλοδεξτρινών

Κυκλοδεξτρίνες	Υποκατάσταση	MW	Υδατοδιαλυτότητα (mg/ml)	Κόστος (USD/Kg)
α-κυκλοδεξτρίνη		972	145	45
β-κυκλοδεξτρίνη		1135	18.5	5
υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη	0.65	1400	>600	300
Τυχαία μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη	1.8	1312	>500	350
γ-κυκλοδεξτρίνη		1297	232	80

(Πηγή: Magnusdottir et al., 2002)

Οι κυκλοδεξτρίνες κρυσταλλώνονται με την συμμετοχή μορίων νερού. Η ενυδατωμένη α-κυκλοδεξτρίνη, απαντά με την μορφή α-CD·6H₂O και σε δύο κρυσταλλικές μορφές I και II, αλλά μία τρίτη μορφή α-CD7.57 H₂O, έχει κρυσταλλοποιηθεί από διάλυμα BaCl₂. Η β-κυκλοδεξτρίνη κρυσταλλώνεται με έντεκα ή δώδεκα μόρια νερού β-CD·11 H₂O, και ως, β-CD·12 H₂O, η ακριβής σύσταση των οποίων εξαρτάται από τη σχετική υγρασία. Η γ-CD κρυσταλλώνεται συνήθως με οκτώ μόρια νερού αλλά μπορεί να κρυσταλλωθεί από 7-28 μόρια νερού. Η δ-CD μπορεί να κρυσταλλοποιηθεί ως δ-CD13.75 H₂O (Connors KA., 1997).

Η διαλυτότητα των α, β και γ κυκλοδεξτρινών στους 25°C, είναι 14.5, 1.85 και 8.19 αντίστοιχα ανά 100ml νερού. Η διαλυτότητα αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας. Επίσης η διαλυτότητα αυξάνει καθώς αυξάνει ο βαθμός μεθυλίωσης. Η μέγιστη διαλυτότητα επιτυγχάνεται με τη μεθυλοποίηση των 2/3 των υδροξυλικών ομάδων. Ωστόσο, η διαλυτότητα μειώνεται όταν η μεθυλίωση ξεπερνά τον βέλτιστο βαθμό (Lofsson & Brewste, 1996). Ο σχηματισμός συμπλόκου γενικά μεταβάλλει

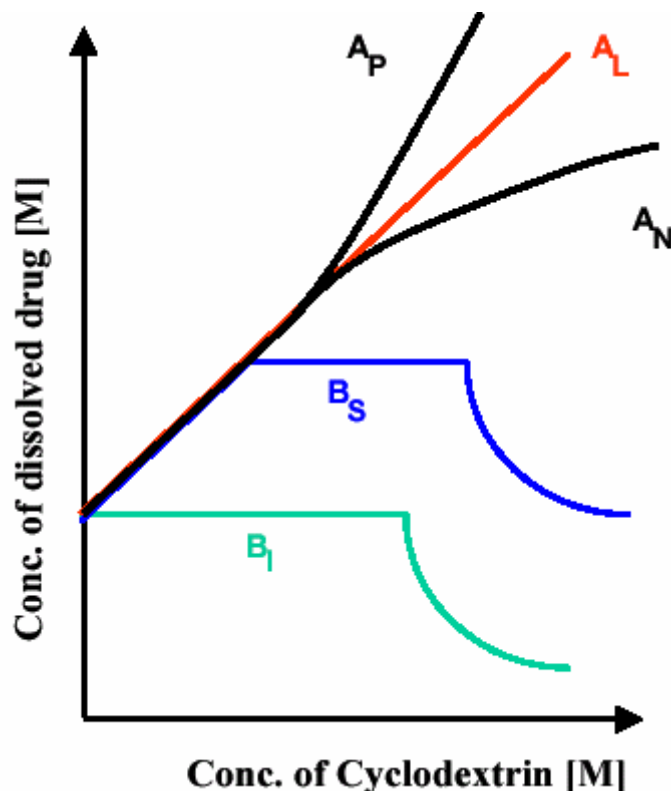
τη διαλυτότητα της κυκλοδεξτρίνης. Εάν το εγκλεισμένο μόριο είναι μη διαλυτό στο νερό, συχνά το σχηματισθέν σύμπλοκο έχει μικρότερη διαλυτότητα από το μόριο της κυκλοδεξτρίνης, αλλά μεγαλύτερη από το μη εγκλεισμένο διατροφο-δραστικό συστατικό.

Ο εγκλεισμός μορίων σε κυκλοδεξτρίνες μπορεί να μελετηθεί με την μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC). Οι κυκλοδεξτρίνες εμφανίζουν δυο κορυφές κατά τη σάρωση με την μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας. Η πρώτη είναι στους 100°C λόγω απομάκρυνσης του κρυσταλλικού νερού. Η δεύτερη παρατηρείται στους 300°C, λόγω τήξης των κρυστάλλων και της θερμική διάσπασης τους.

Η ενυδάτωση των κυκλοδεξτρινών αποτελεί σημαντικό παράγοντα όσον αφορά στο σχηματισμό του εγκλεισμού. Ο μηχανισμός του εγκλεισμού λαμβάνει χώρα μόνο όταν η κυκλοδεξτρίνη έχει συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε νερό. Το νερό της εσωτερικής κοιλότητας είναι σημαντικό στην αλληλεπίδραση μεταξύ του εγκλεισμένου μορίου και της κυκλοδεξτρίνης.

B.3 Μελέτη διαλυτότητας διατροφοδραστικών μορίων

Μετά την επιλογή της κατάλληλης κυκλοδεξτρίνης στην οποία πρόκειται να εγκλεισθεί το διατροφο-δραστικό συστατικό, το επόμενο βήμα είναι να βρούμε τις βέλτιστες συνθήκες, όπως η ιδανική συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης που χρειάζεται για την παρασκευή του εγκλεισμένου συμπλόκου (Magnusdottir A. et al., 2002). Τις πληροφορίες αυτές μπορεί να αντλήσουμε διαμέσου του διαγράμματος μελέτης διαλυτότητας. Η μελέτη διαλυτότητας είναι πολύ συνηθισμένη σε εργασίες στις οποίες οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται για να τροποποιήσουν τη διαλυτότητα ενός μη διαλυτού ή λίγο διαλυτού βιολογικού μορίου στο νερό. Οι Higuchi & Connors, 1997 ταξινόμησαν τα σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών με βάση το προφίλ διαλυτότητας του εγκλειόμενου συστατικού σε συνάρτηση με την συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης.



Σχήμα 3 Διαγράμματα μελέτης διαλυτότας

Ο τύπος Α όσον αφορά στο προφίλ της διαλυόμενης φάσης, παρατηρείται όταν η διαλυτότητα του διατροφο-δραστικού συστατικού αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της κυκλοδεξτρίνης και είναι η πιο συνήθης. Όταν το σύμπλοκο είναι πρώτης τάξης σε σχέση με την κυκλοδεξτρίνη και πρώτης ή μεγαλύτερης τάξης σε σχέση με το υπόστρωμα τότε το προφίλ διαλυτότητας χαρακτηρίζεται A_L . Αν το σύμπλοκο είναι πρώτης τάξης σε σχέση με το υπόστρωμα αλλά δεύτερης ή τρίτης τάξης σε σχέση με τη κυκλοδεξτρίνη τότε το προφίλ διαλυτότητας χαρακτηρίζεται A_P . A_N προφίλ μπορεί δύσκολα να ερμηνευθεί. Το προφίλ διαλυτότητας τύπου Β υποδηλώνει σχηματισμό συμπλόκου με περιορισμένη διαλυτότητα. Τα περισσότερα σύμπλοκα κυκλοδεξτρίνης φαίνεται να είναι σύμπλοκα που περιλαμβάνουν το εγκλεισμένο συστατικό στην εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, είναι δυνατό οι κυκλοδεξτρίνες να διαλυτοποιήσουν συστατικά μέσω δομών που μοιάζουν με μικκύλια. Οι μελέτες διαλυτότητας δεν επαληθεύουν το σχηματισμό συμπλόκου. Μπορούν μόνο να περιγράψουν ότι η αύξηση στη συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης επηρεάζει τη διαλυτότητα των μορίων. Ο πιο συνήθης τύπος συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης είναι με αναλογία διατροφο-δραστικού συστατικού-κυκλοδεξτρίνης

1:1, όπου ένα μόριο διατροφο-δραστικού συστατικού σχηματίζει σύμπλοκο με ένα μόριο κυκλοδεξτρίνης

Κάτω από τέτοιες συνθήκες η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση 2:

$$K_{1:1} = \frac{Slope}{S_0(1 - Slope)} \quad (2)$$

Όπου (S_0) είναι η κλίση και η διαλυτότητα του διατροφο-δραστικού συστατικού σε υδατικό μέσο απουσία κυκλοδεξτρίνης.

Η αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού μπορεί να υπολογισθεί από τη κλίση του διαγράμματος με βάση την εξίσωση 3:

$$CE = S_0 K_{1:1} = \frac{Slope}{(1 - Slope)} \quad (3)$$

Μελέτες διαλυτότητας σε διαφορετικές θερμοκρασίες επιτρέπουν τον υπολογισμό θερμοδυναμικών παραμέτρων του σχηματισμού του συμπλόκου. Από την εξίσωση του van't Hoff (Εξίσωση 4) μπορεί να υπολογιστεί η μεταβολή της ενθαλπίας και η μεταβολή της εντροπίας (Tommasini et al., 2004):

$$\ln K_C = -\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (4)$$

Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs λόγω των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά το σχηματισμό του συμπλόκου μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση (5):

$$\Delta G_{25} = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (5)$$

B.4 Μονοτερπένια

Τα μονοτερπένια είναι μη θρεπτικά διαιτητικά συστατικά τα οποία βρίσκονται στα αιθέρια έλαια των καρπών (Crowell, 1999; P.Ji, 2002, Zunino and Zygadlo, 2004) των εσπεριδοειδών (Crowell, 1999; P.Ji, 2002), και σε άλλα φρούτα όπως τα κεράσια. Επίσης βρίσκονται στο διόσμο (Crowell, 1999), στα δημητριακά προερχόμενα από το σιτάρι (He, 1997), στα βότανα (Crowell, 1999; P.Ji, 2002). Όσον αφορά στη βιολογική τους δράση τα μονοτερπένια, όπως και τα αιθέρια έλαια, παρεμποδίζουν την βλάστηση των σπόρων και την ανάπτυξη των φυτών (He, 1997). Λειτουργούν φυσιολογικά ως χημειο-έλκυστικές και χημειο-απωθητικές ουσίες και σε αυτές οφείλεται σε μεγάλο βαθμό η χαρακτηριστική μυρωδιά πολλών φυτών (Crowell, 1999; Fang Luan, 2005). Τα μονοτερπένια αντιπροσωπεύουν μια νέα τάξη χημειοπροληπτικών παραγόντων έναντι του καρκίνου, και από την άποψη αυτή μπορούν να θεωρηθούν διατροφο-δραστικά συστατικά (P. Ji, 2002). Φαίνεται να καταστέλλουν την έναρξη της καρκινογένεσης που οφείλεται σε χημικούς παράγοντες. Η δράση τους αυτή έχει αποδοθεί τόσο στις αποτοξινωτικές όσο και στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Τα ισοπρενοειδή διαφέρουν όσον αφορά στην επίδραση τους στην ανάπτυξη του όγκου. Συγκεκριμένα καταστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου HMG-CoA ρεδουκτάση διαμέσου των μετα-μεταγραφικών τους δραστηριοτήτων. Η δράση τους αυτή είναι επίσης απαραίτητη για την μείωση του ρυθμού σύνθεσης της χοληστερόλης. Υπάρχει ομοφωνία όσον αφορά στην ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της κατασταλτικής δράσης διαφόρων ισοπρενοειδών στο τελευταίο στάδιο του όγκου και της επίδρασής τους στο ένζυμο HMG-CoA ρεδουκτάση. Ως συνέπεια της κατασταλτικής δράσης των ισοπρενοειδών στη δραστηριότητα του ενζύμου HMG-CoA ρεδουκτάση, οι δεξαμενές της ενδιάμεσης πορείας του μεβαλονικού περιορίζονται κατά την μετα-μεταφραστική διαδικασία των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον όγκο (He, 1997).

B.4.1 Θυμόλη

Το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυσικές ουσίες, σε σχέση με τους συνθετικούς παράγοντες έχει επικεντρώσει την προσοχή πολλών ερευνητών στα φυτά

που χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα ή συστατικά τροφίμων όπως τα μπαχαρικά, τα οποία είναι πλούσια σε βιο-δραστικά συστατικά. Το θυμάρι και η ρίγανη συχνά χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα κυρίως για τη γεύση τους, το άρωμα τους, την ιδιότητά τους να συντηρούν τα τρόφιμα, ενώ από την αρχαιότητα είναι γνωστή η θεραπευτική τους δράση και η χρήση τους στην ιατρική. Τα κύρια συστατικά των ελαίων του θυμαριού και της ρίγανης είναι η θυμόλη, η καρβακρόλη, και το γ-τερπινένιο. Τα αιθέρια έλαια του θυμαριού και τα συστατικά τους έχουν δείξει ότι έχουν μια σειρά από βιολογικές δράσεις. Από τη στιγμή που τα αιθέρια έλαια του θυμαριού και της ρίγανης έχουν μεγάλη αντιβακτηριακή και αντιμικροβιακή δράση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι δράσεις αυτές αποδίδονται περισσότερο στην παρουσία φαινολικών συστατικών όπως η θυμόλη και καρβακρόλη και των υδρογονανθράκων όπως το γ-τερπινένιο και το π-κουμένιο. Η θυμόλη και η καρβακρόλη μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνα τους ή σε συνδυασμό κατά τη διάρκεια θεραπείας στοματικής μόλυνσης εξαιτίας της ανασταλτικής τους δράσης στα βακτήρια του στόματος. Τα συστατικά του θυμαριού κυρίως η θυμόλη και η καρβακρόλη έχει θεωρηθεί ότι έχουν αντιοξειδωτικές δράσεις για το λόγο αυτό το θυμάρι και η ρίγανη έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την παραγωγή αφλατοξίνης. Επίσης για τα συστατικά του θυμαριού έχουν αναφερθεί ότι έχουν αντισπασμωδικές ιδιότητες και παρεμποδίζουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επίσης έχει εκτιμηθεί η δράση των συστατικών αυτών στην έναρξη της καταστροφής του DNA από την 2-άμινιο-3μεθυλιμιδαζο[4,5-f]-κινολίνη (IQ) και την μιτομυκίνη C (MMC). Δεν παρατηρήθηκε καμία θραύση στο DNA σε συγκεντρώσεις θυμόλης και γ-τερπινένιου χαμηλότερες από 0.1mM αλλά σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0.2mM παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της καταστροφής του DNA. Η καρβακρόλη ένα ισομερές της θυμόλης φαίνεται να προστατεύει τα λεμφοκύτταρα από τις γενοτοξικές επιδράσεις της IQ και MMC σε μη τοξικές συγκεντρώσεις κάτω από 0.5mM, αλλά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από 0.1mM η καρβακρόλη φαίνεται να προκαλεί ζημία στο DNA.

Σε *in vitro* μελέτες έχει αποδειχθεί η αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων εναντίον των *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Sigella dysenteria*, *Bacillus cereus*, και *Staphylococcus aureus*, (σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0.2-10μl ml⁻¹). Οι Gram αρνητικοί οργανισμοί είναι

ελαφρώς λιγότερο ευαίσθητοι από τα Gram θετικά βακτήρια. Ένας αριθμός συστατικών των αιθέριων ελαίων έχουν ταυτοποιηθεί ως αποτελεσματικά αντιβακτηριακά πχ. καρβακρόλη, θυμόλη, ευγενόλη, κινναμαλδεΐδη, και κινναμικό οξύ, έχοντας *in vitro* ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MICs) $0.05-5 \mu\text{l ml}^{-1}$. Στα τρόφιμα απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση προκειμένου να επιτευχθούν τα ίδια αποτελέσματα. Μελέτες με φρέσκο κρέας, προϊόντα κρέατος, ψάρι, γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα, λαχανικά, φρούτα, και ψημένο ρύζι, έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση που απαιτείται για να επιτευχθεί σημαντικά αντιβακτηριακά αποτελέσματα είναι γύρω στα $0.5-20 \text{ ml g}^{-1}$ στα φαγητά και γύρω στα $0.1-10 \mu\text{l ml}^{-1}$ σε διαλύματα που προορίζονται για πλύσιμο των των φρούτων και των λαχανικών. Η υδροφοβικότητα των αιθέριων ελαίων τους επιτρέπει να διαχωρίζουν τα λιπίδια που υπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων και των μιτοχονδρίων, αποδίδοντας τους διαβατότητα και οδηγώντας σε διαρροή των συστατικών του κυττάρων (Burt S., 2004).

Μελέτη των Ettayebi et al έχει δείξει ότι υπάρχει συνεργασία του bacteriocin nisin που παράγεται από πολλούς *Lactococcus lactis*, και ευθύνεται για την ανταγωνιστική δράση βακτηρίων του γαλακτικού οξέος έναντι άλλων οργανισμών και της θυμόλης. Το bacteriocin Nisin είναι μια ακριβή ουσία και επομένως, το εμπορικό κόστος μπορεί να είναι απαγορευτικό για πολλές βιομηχανίες, ιδιαίτερα όταν απαιτούνται μεγάλες συγκεντρώσεις. Επίσης η χρησιμοποίηση υψηλών συγκεντρώσεων της ουσίας αυτής μπορεί να προκαλέσει επιλεκτική αύξηση των βακτηριακών υποπληθυσμών που είναι ανθεκτικοί στην νισίνη. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση άλλων παραγόντων σε συνδυασμό με την νισίνη, λόγω συνεργιστικής επίδρασης, όπου απαιτείται χαμηλή συγκέντρωση της νισίνης για αποτελεσματικό έλεγχο των σχετικών μικροοργανισμών (Ettayebi et al, 2000)

Είναι γνωστό ότι η ρευστότητα που παρουσιάζουν οι βιολογικές μεμβράνες είναι απαραίτητη για την φυσιολογική λειτουργία τους. Το μέγεθος αυτών των ρευστών περιοχών εξαρτάται κυρίως από το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά ένζυμα που βρίσκονται συνδεδεμένα στις μεμβράνες των κυττάρων εξαρτώνται από την ρευστότητα της μεμβράνης. Επιπρόσθετα τα Ω-6 λιπαρά οξέα παίζουν σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές δραστηριότητες ενός αριθμού εικοσανοειδών. Αν και φωσφολιποειδή

που βρίσκονται στις μεμβράνες μπορούν να συνεισφέρουν στην διατήρησή της ρευστής κατάστασης της μεμβράνης, εντούτοις είναι πολύ ευάλωτοι στόχοι στις επιθέσεις των ελευθέρων ριζών λόγω της τάσης των πλευρικών αλυσίδων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων να χάνουν το υδρογόνο τους. Έχειδειχθεί ότι η πρόσληψη φυτικών αιθέρων ελαίων δια μέσου της διατροφής προστατεύει και διατηρεί τα επίπεδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στις κυτταρικές μεμβράνες. Συγκεκριμένα, εργαστηριακές έρευνες των Barat et al. έχουν αποδείξει ότι η λήψη θυμαρίσιου ελαίου σε ηλικιωμένα ποντίκια ανέτρεψαν την σχετιζόμενη με την ηλικία μείωση της συγκέντρωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Οι ίδιοι ερευνητές σε μεταγενέστερη έρευνα τους μελέτησαν την επίδραση της θυμαρίσιου λαδιού και του κύριου συστατικού του, της θυμόλης στις σχετιζόμενες με την ηλικία αλλαγές στη σύσταση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε διάφορους ιστούς σε ποντίκια. Τα αποτελέσματα της έρευνα τους έδειξαν ότι η λήψη διαμέσου της διατροφής θυμαρίσιου ελαίου τείνουν να διατηρήσουν υψηλότερα τα επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν. Το μεγαλύτερο μέρος της δράσης αυτής οφείλεται στη θυμόλη που αποτελεί το κύριο συστατικό του ελαίου αυτού (49%) (Youdim A. Kouresh, 1999)

Επιπλέον σύμφωνα με την μελέτη των Robledo et al., τόσο η θυμόλη όσο και τα ημισυνθετικά παράγωγα της φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενα κατά της λεϊσμανίασης και θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως νέες δομές στην έρευνα που αφορά στα νέα φάρμακα κατά της ασθένειας αυτής. Η θυμόλη συστατικό που προέρχεται από το p-cymene, χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική για τις αντιμικροβιακές, αντισηπτικές, απολυμαντικές και τις θεραπευτικές της ιδιότητες στην επούλωση των πληγών (Robledo et al, 2005).

B.4.2 Γερανιόλη

Η γερανιόλη, ένα άκυκλο μονοτερπένιο (Carnesecchi et al, 2002; Ligima et al, 2004), το οποίο περιέχει δύο λειτουργικές ομάδες (Burgener ., 2006). Λαμβάνεται από διάφορα είδη λουλουδιών, κυρίως τα τριαντάφυλλα. Επίσης βρίσκεται σε διάφορους φυτικούς ιστούς διαφόρων φυτών. Συχνά βρίσκεται μαζί με την γερανιάλη και τη νεράλη, που αποτελούν τα προϊόντα οξείδωσης της γερανιόλης

(Ligima Yoko, 2004). Τα προϊόντα οξείδωσης της γερανιόλης είναι πολύ σημαντικά ενδιάμεσα για την παραγωγή αρωμάτων, μυρωδικών και φαρμακευτικών ουσιών (Burgener et al, 2006). Το μίγμα αυτό της γερανιάλης και νεράλης καλείται κιτράλη. Η γερανιόλη φαίνεται να βιοσυντίθεται από την διφωσφορική γερανιόλη, που αποτελεί το πρόδρομο μόριο όλων των μονοτερπενίων. Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να ταυτοποιούν την ακριβή σύνθεση της γερανιόλης (Ligima et al, 2004).

Όσον αφορά την βιολογική της δράση η γερανιόλη παρουσιάζει τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, αντικαρκινικές ιδιότητες, έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων (Carnesecchi et al, 2002; Nazer et al, 2005). Η γερανιόλη είναι γνωστός αναστολέας του μεταβολισμού των εστέρων ή των αλάτων του μεβαλονικού οξέος (MVA). Αναστέλλει την δράση της 3 υδρόξυ- 3 μεθυλογλουτάρυλο CoA ρεδουκτάσης (HMG-CoA) στο ανθρώπινο ήπαρ. Σε αυτή της τη δράση οφείλεται και η αντικαρκινική της ιδιότητα. Η αναστολή της HMG-CoA ρεδουκτάσης οδηγεί σε περιορισμό των ενδιάμεσων MVA, τα οποία είναι απαραίτητα στις μετα-μεταφραστικές διεργασίες των αυξανο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών (Carnesecchi S, 2002)

Η γερανιόλη αυξάνει την ευαισθησία των Caco-2 κυττάρων σε αντικαρκινικό φάρμακο. Συγκεκριμένα στη μελέτη των S. Carnesechi & al, 2002 βρέθηκε ότι η γερανιόλη αυξάνει την ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων, που προκαλούν τον καρκίνο του εντέρου στην 5-Fluorouracil θεραπεία (αντικαρκινικό φάρμακο) . Η επίδραση της γερανιόλης ήταν μεγαλύτερη στα κύτταρα εκείνα που παρουσίαζαν μεγαλύτερη αντίσταση στο 5-FU. Αποδείχθηκε ότι η γερανιόλη δρα σε δύο κύριους παράγοντες που επιδρούν στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται στο κόλο στη χημειοθεραπεία: Στην διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων και στην διαπερατότητα της μεμβράνης στο φάρμακο. Η γερανιόλη, προάγει την διαφοροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται στο κόλο και αυξάνει την πρόσληψη τους σε 5-FU. Η έρευνα έχει δείξει ότι η αλληλεπίδραση της γερανιόλης με τις μεμβράνες των κυττάρων αποτρέπει την διαδικασία διαφοροποίησης και διευκολύνει την πρόσληψη των χημικοθεραπευτικών παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα. Η αλληλεπίδραση της γερανιόλης με τη μεμβράνη μπορεί να αλλάζει το μεταγωγικό σήμα διαμέσου της μιτωτικά

δραστήριας πρωτεϊνικής κινάσης και αποτρέποντας την διαφοροποίηση των κυττάρων. (Carnesecchi , 2002)

Επιπλέον η γερανιόλη αλληλεπιδρά με την μεμβρανικές λειτουργίες των *Candida albican* και *Saccharomyces cervisiae* και αυξάνει την ρευστότητα των λιποσωμικών μεμβρανών. Κατ' αυτό τον τρόπο οι μεταβολές που προκαλεί η γερανιόλη στις μεμβράνες των κυττάρων μπορεί να επιφέρουν αλλαγές στη διαμόρφωση των ιοντικών καναλιών οδηγώντας σε αύξηση ή μείωση της ροής των ιόντων των trans-μεμβρανών. Επιπρόσθετα οι αλλαγές στη ρευστότητα των λιπιδίων της μεμβράνης μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στη διαμόρφωση των ενσωματωμένων πρωτεϊνών της μεμβράνης και να διαταράξει την ενδοκυττάρια οδό σήμανσης οδηγώντας σε γενετικές αλλαγές. Σε μελέτη των Carnesecchi et al , 2002 βρέθηκε ότι 400μM γερανιόλης προκάλεσαν εκπόλωση της μεμβράνης με μείωση της αντίστασης της μεμβράνης εξαιτίας της τοπικής διάτρησης της κυτταρικής μεμβράνης. Επώαση των Caco-2 κυττάρων με γερανιόλη για 6 ώρες προκάλεσε 60% μείωση της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Μετά από 16 ώρες επώασης, η γερανιόλη μείωσε κατά 50% το ποσό των δραστικών μορφών των p44/p42 εξωκυττάρια ρυθμιστικά σήματα της πρωτεϊνικής κινάσης (EPK). Στις πιο πάνω δράσεις της γερανιόλης οφείλεται η αντιπολλαπλασιαστική επίδραση που έχει στα Caco-2 κύτταρα. (Carnesecchi et al, 2002).

Οι Burke et al, μελέτησαν in vivo τις συγγενείς αντικαρκινικές ιδιότητες της διαιτητικής φαρνεσόλης, γερανιόλης, έναντι του καρκίνου του παγκρέατος και βρήκαν ότι μαζί γερανιόλη και φαρνεσόλη, μειώνουν την ανάπτυξη του όγκου κατά 50% όταν προσλαμβάνονται μέσω δίαιτας 40γρ/kg. Οι ίδιοι επιστήμονες παρατήρησαν ότι τόσο το σωματικό βάρος όσο και τα επίπεδα χοληστερόλης πλάσματος των ζώων που λάμβαναν δίαιτα πλούσια σε ισοπρενοειδή, είχαν σημαντικές διαφορές από αυτές των ζώων της ομάδα ελέγχου (Nazer et al,2005)

Οι Ji et al (2002), μελέτησαν την υπόθεση η γερανιόλη να προστατεύει από την οξεία απόρριψη μοσχεύματος. Προκειμένου να αποδειχθούν οι ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες γερανιόλης οι ερευνητές μελέτησαν τα αποτελέσματα της in vitro με δοκιμασία αναπαραγωγής των λεμφοκυττάρων και in vivo σε μόσχευμα μεταμοσχευμένης καρδιάς αρουραίου. Στην δοκιμασία αναπαραγωγής των

λεμφοκυττάρων παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη αναστολή της αναπαραγωγής των λεμφοκυττάρων σε συγκέντρωση μεταξύ 1 μ mol/L και 50 μ mol/L. Επιπλέον η γερανιόλη σε μεγαλύτερες δόσεις μπορούσε να προκαλέσει απόπτωση ιδιαίτερα στα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα. Όσον αφορά στη *in vivo* μελέτη όλες οι θεραπείες που χρησιμοποιούσαν γερανιόλη παράτειναν σημαντικά τον χρόνο ζωής του μοσχεύματος, ενώ ο συνδυασμός γερανιόλης, κυκλοσπορίνης, είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Συμπερασματικά η γερανιόλη έχει *in vitro* και *in vivo* ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Ο συνδυασμός γερανιόλη–κυκλοσπορίνης οδηγεί σε επιπρόσθετες ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και μπορεί να επιτρέψει μικρότερες δόσεις κυκλοσπορίνης (Ji et al 2002).

Η γερανιόλη έχει επίσης και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Έχει μελετηθεί και αποδειχθεί η δράση της εναντίον της *Salmonella* sv Typhimurium, σε συνεργασία με άλλα συστατικά όπως θυμόλη, καρβακρόλη, ευγενόλη, οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ. Η χρήση των πιο πάνω ουσιών ως αντιμικροβιακών παραγόντων αποτελεί ένα διαφορετικό τρόπο προστασίας των τροφίμων έναντι της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών ενώ παράλληλα διατηρείται υψηλή αρωματική ποιότητα (Ligima et al, 2004).

Ακόμη το αιθέριο έλαιο που προέρχεται από την palmarosa, το οποίο συνίσταται κατά 65% από γερανιόλη και 20% οξική γερανιόλη έχει αποδεδειγμένα αντιμικροβιακές ιδιότητες κατά των κυττάρων του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*. Αιθέριο έλαιο palmarosa σε συγκέντρωση 0.1% αναστέλλει ολοκληρωτικά την ανάπτυξη των κυττάρων του *S. cerevisiae*. Η εφαρμογή του palmarosa oil προκαλεί την έξοδο ιόντων καλίου και ενδεχομένως και μαγνησίου από τα ζυμοκύτταρα, δράση που οφείλεται κυρίως στη γερανιόλη. Το έλαιο αυτό έχει αντιμυκητιακή δράση εναντίον των νηματοειδών μυκήτων *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum* και *Penicillium funiculosum* και θεωρείται ότι παρέχει προστασία έναντι των κουνουπιών. Ο μύκητας, *Cryptococcus neoformans*, ένα μύκητας που προκαλεί φλεγμονή κατά την διάρκεια των τελευταίων σταδίων του AIDS αναστέλλεται από τον palmarosa oil και την γερανιόλη (Carnesecchi., 2002)

Γ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι να διαπιστωθεί εάν τα μονοτερπένια θυμόλη και γερανιόλη, τα οποία είναι υδρόφοβα, μπορούν να ενθυλακωθούν σε μόρια – φορείς όπως η κυκλοδεξτρίνη και το τροποποιημένο άμυλο, κάτι που θα είχε ως αποτέλεσμα την δυνατότητα ενσωμάτωσής τους σε υδατικό περιβάλλον και τρόφιμα όπως χυμοί κλπ. Όπως αναφέρεται πιο πάνω, τόσο η θυμόλη όσο και η γερανιόλη έχουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές ιδιότητες, επίσης φαίνεται να επιδρούν ευεργετικά στο λιπιδαιμικό προφίλ. Η προσθήκη τους στα τρόφιμα έχει ως αποτέλεσμα την εκμετάλλευση των λειτουργικών ιδιοτήτων τους και την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων. Επομένως η ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα θα μπορούσε να αντικαταστήσει αντιοξειδωτικά και συντηρητικά έτσι ώστε με τον τρόπο αυτό να αποφεύγεται η χρήση συνθετικών συστατικών για την αύξηση της διατηρησιμότητας του τροφίμου. Επιπλέον σκοπός αυτής της εργασίας είναι να μελετηθεί η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζουν τα παραπάνω μόρια όταν αυτά ενσωματωθούν στις δομές της κυκλοδεξτρίνης και του τροποποιημένου αμύλου.

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Δ.1 Υλικά - Αντιδραστήρια

Για τον σχηματισμό των συμπλόκων

- β-κυκλοδεξτρίνη , ALDRICH, M.B. 1135, Cat: 85.608-, Lot:S20642-054, Steinheim, Germany
- Θυμόλη, RIEDEL-DE HAEN, M:150.22g/Mol, Germany
- Γερανιόλη, MP Biomedicals Inc., Combustible, Cat. No. 157184, Lot. 5232C, MB=154.3, France
- Tween 80, Merck, Germany
- Τροποποιημένο άμυλο, Cargill, Food & Pharma Specialties, USA.
- Απιονισμένο νερό

Δ.2 Συσκευές – όργανα

- Φασματοφωτόμετρο KONTRON INSTRUMENTS, Type: UVIKON SPECTROPHOTOMETER 931, Serial No. 04941035, 100/240V, 50/60Hz, Main Fuses: 100/120V 4A, 220/240V 2A.
- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης. HEIDOLPH INKUBATORHAUBE, No.549-90030-00-0, groß, 09/99, HEIDOLPH UNIMAX 1010, INKUBATOR 1000
- Συσκευή spray drying. LAB-PLANT, Spray Drier- SD-04, England
- Διάταξη λυοφιλίωσης, TELSTAR, Model Cryodos-45, Spain, 2001, Nr 397, 220V, 50Hz, 0.525 KW
- Ομογενοποιητής Junke & Kunkel, IKA – Labortechnik, ULTRA – TURRAX .
- Διάταξη Διαφορική Θερμιδομετρίας Σάρωσης, Perkin Elmer, DSC-6, Boston, MA, USA)

Δ.3 Μέθοδοι παρασκευής συμπλόκων

Δ.3.1 Παρασκευή των συμπλόκων με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης

↓

Δ.3.1.1 Παρασκευή συμπλόκου θυμόλης β-κυκλοδεξτρίνης

Το σύμπλοκο της θυμόλης με την β-CD παρασκευάστηκε με ανάμιξή τους σε υδατικό διάλυμα και απομάκρυνση του νερού, με την μέθοδο της λυοφιλίωσης. Ποσότητα θυμόλης (0.049gr) προστίθεται σε υδατικό διάλυμα β- CD (0.37gr β-Cycl + 20ml νερού) σε μοριακή αναλογία 1:1 και αναμιγνύονται με τη βοήθεια αναδευτήρα για 3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που προκύπτει διηθείται με τη βοήθεια φίλτρου με διάμετρο πόρων 0.45 μm (PVDF, Chromafil P-45/25, Macherey-Nagel, Duren, Germany). Το διήθημα ψύχεται στους -40°C για 24 h και το νερό απομακρύνεται στην διάταξη της λυοφιλίωσης.

Δ.3.1.2 Παρασκευή συμπλόκου θυμόλης β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε ακριβώς όπως το πιο πάνω σύμπλοκο, με τη διαφορά ότι το διάλυμα β-κυκλοδεξτρίνης/θυμόλης υπέστη ομογενοποίηση πριν την διαδικασία της ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η πιο πάνω διαδικασία.

Δ.3.1.3 Παρασκευή συμπλόκου θυμόλης/ β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση με χρήση γαλακτοματοποιητή

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε ακριβώς όπως τα πιο πάνω σύμπλοκα, με τη διαφορά ότι στο διάλυμα β-κυκλοδεξτρίνης/θυμόλης προστέθηκαν 2 σταγόνες γαλακτοματοποιητή tween 80, ακολούθησε ομογενοποίηση του μίγματος και κατόπιν όλη η πιο πάνω διαδικασία.

Δ.3.1.4 Παρασκευή συμπλόκου γερανιόλης/ β-κυκλοδεξτρίνης

Το σύμπλοκο της γερανιόλης με την β-CD παρασκευάστηκε με την ίδια μέθοδο που εφαρμόστηκε για την παρασκευή του συμπλόκου θυμόλης/β-CD, με 0.05gr γερανιόλης.

Δ.3.1.5 Παρασκευή συμπλόκου γερανιόλης/ β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε ακριβώς το σύμπλοκο θυμόλης/β-CD με ομογενοποίηση, με 0.05gr γερανιόλης.

Δ.3.1.6 Παρασκευή συμπλόκου γερανιόλης/ β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση παρουσία γαλακτοματοποιητή

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε ακριβώς το σύμπλοκο θυμόλης/β-CD με ομογενοποίηση και γαλακτοματοποιητή με 0.05gr γερανιόλης

Δ.3.1.7 Παρασκευή μίγματος θυμόλης β-κυκλοδεξτρίνης

Παρασκευάστηκε μίγμα, το οποίο αποτελείται από θυμόλη και β-CD στις ίδιες αναλογίες με τις οποίες παρασκευάστηκαν τα πιο πάνω σύμπλοκα εγκλεισμού. Η θυμόλη και η β-CD αναμιγνύονται σε κάψα πορσελάνης για 5 λεπτά για το σχηματισμό ομογενούς μίγματος των δύο στερεών.

Δ.3.2 Παρασκευή συμπλόκων με τη μέθοδο ξήρανσης με ψεκασμό

Δ.3.2.1 Παρασκευή συμπλόκου θυμόλης /τροποποιημένου αμύλου

Παρασκευή γαλακτώματος με την προσθήκη 20g τροποποιημένου αμύλου σε 50ml νερό, το οποίο αφήνουμε για 24 ώρες προκειμένου να διαλυθεί. Μετά το πέρας των 24 ωρών προσθέτουμε 1g θυμόλης και 2 σταγόνες γαλακτοματοποιητή (tween 80). Το γαλάκτωμα αυτό υπέστη ξήρανση με τη μέθοδο Spray-Drying. Συνθήκες συσκευής: Θερμοκρασία εισόδου 130°C, θερμοκρασία εξόδου 85°C.

Δ.3.2.2 Παρασκευή συμπλόκου γερανιόλης /τροποποιημένου αμύλου

Ακολουθήθηκε η πιο πάνω διαδικασία.

Δ. 4 Μελέτη διαλυτότητας

Η αυξανόμενη διαλυτότητα τόσο της θυμόλης όσο και της γερανιόλης, παρουσία του μέσου εγκλεισμού μελετήθηκε με βάση τη μέθοδο των Higuchi και Connors (1965). Ποσότητες θυμόλης και γερανιόλης προστίθεται σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις της β-CD (0.000, 0.003, 0.006, 0.009, 0.012, 0.015 M), με τη βοήθεια εργαστηριακού αναδευτήρα σε θερμοκρασίες 25°, 35°, 45°C. Οι ποσότητες παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες. Οι ποσότητες τόσο της διαλυτής θυμόλης όσο και της διαλυτής γερανιόλης σε όλα τα διαλύματα προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά μετά από την αποκατάσταση ισορροπίας (3 ημέρες), με μέτρηση της απορρόφησης στο $\lambda_{\max}$ της θυμόλης 280.2 nm και στο $\lambda_{\max}$ της γερανιόλης 221.8 nm. Για την απομάκρυνση της αδιάλυτης θυμόλης και γερανιόλης αντίστοιχα, τα διαλύματα διηθούνται με φίλτρα διαμέτρου 0.46 μm. Οι πιο πάνω πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν σε κάθε θερμοκρασία.

Η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου K_c , υπολογίζεται από την ευθεία τους διαγράμματος που προκύπτει με βάση την πιο κάτω εξίσωση (εξίσωση 1).

$$K_c = \frac{slope}{intercept \cdot (1 - slope)}$$

Δ.4.1. Μελέτη διαλυτότητας της Θυμόλης

Μελέτη διαλυτότητας θυμόλης στους 25 °C

H ₂ O (ml)	β- κυκλοδεξτρίνη (M)	β- κυκλοδεξτρίνη (g)	Θυμόλη (g)
10	0.003	0,0346	0.1090
10	0.006	0,0679	0.1008
10	0.009	0,1296	0.1018
10	0.012	0,1362	0.1000
10	0.015	0,1702	0.1000

Μελέτη διαλυτότητας θυμόλης στους 35 °C

H ₂ O (ml)	β- κυκλοδεξτρίνη (M)	Β- κυκλοδεξτρίνη (g)	Θυμόλη (g)
10	0.000	0.0000	0.1011
10	0.003	0,0346	0.1003
10	0.006	0,0679	0.1005
10	0.009	0,1296	0.1000
10	0.012	0,1362	0.0997
10	0.015	0,1702	0.1032

Μελέτη διαλυτότητας θυμόλης στους 45 °C

H₂O (ml)	β- κυκλοδεξτρίνη (M)	B- κυκλοδεξτρίνη (g)	Θυμόλη (g)
10	0.000	0.0000	0.1028
10	0.003	0,0346	0.1030
10	0.006	0,0679	0.1018
10	0.009	0,1296	0.1026
10	0.012	0,1362	0.1026
10	0.015	0,1702	0.1015

Δ.4.2 Μελέτη διαλυτότητας γερανιόλης

Μελέτη διαλυτότητας γερανιόλης στους 25 °C

H₂O (ml)	β- κυκλοδεξτρίνη (M)	B- κυκλοδεξτρίνη (g)	Γερανιόλη (g)
10	0.003	0,03405	0.1097
10	0.006	0,0681	0.1132
10	0.009	0,1295	0.1086
10	0.012	0,1362	0.1085
10	0.015	0,1702	0.0998

Μελέτη διαλυτότητας γερανιόλης στους 35 °C

H₂O (ml)	β- κυκλοδεξτρίνη (M)	B- κυκλοδεξτρίνη (g)	Γερανιόλη (mg/m)
10	0.000	0.0000	0.1015
10	0.003	0,0346	0.1096
10	0.006	0,0679	0.1022
10	0.009	0,1296	0.1027
10	0.012	0,1362	0.1080
10	0.015	0,1702	0.1008

Μελέτη διαλυτότητας γερανιόλης στους 45 °C

H₂O (ml)	β- κυκλοδεξτρίνη (M)	B- κυκλοδεξτρίνη (g)	Γερανιόλη (mg/m)
10	0.000	0.0000	0.1027
10	0.003	0,0346	0.0995
10	0.006	0,0679	0.1035
10	0.009	0,1296	0.1112
10	0.012	0,1362	0.1017
10	0.015	0,1702	0.1138

Δ.5 Μελέτη σχηματισμού και σταθερότητας των συμπλόκων με τη μέθοδο Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)

Δ.5.1 Μελέτη σχηματισμού συμπλόκων με τη μέθοδο (DSC)

Χρησιμοποιήθηκε διάταξη διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Perkin Elmer, DSC-6, Boston, MA, USA). Για την επιβεβαίωση σχηματισμού του συμπλόκου μελετήθηκαν πέντε δείγματα: β-κυκλοδεξτρίνη, θυμόλη, φυσικό μίγμα θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, σύμπλοκο εγκλεισμού θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, σύμπλοκο εγκλεισμού θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης που παρασκευάστηκε με ομογενοποίηση και παρατηρήθηκαν οι διαφορές που παρουσιάζουν τα θερμογραφήματά τους. Η ταχύτητα σάρωσης ήταν 10 C°/min μεταξύ 40°C και 210°C με την ταυτόχρονη διαβίβαση αερίου αζώτου. Η μάζα του δείγματος ελήφθη 5 mg και ζυγίστηκαν με ακρίβεια ± 0.01 mg και τοποθετήθηκαν σε κλειστά καψίδια αλουμινίου μεγέθους 40 μ L. Το κάθε δείγμα σαρώθηκε στην παραπάνω περιοχή θερμοκρασιών τρεις φορές.

Δ.5.2 Μελέτη οξείδωσης θυμόλης, γερανιόλης και των συμπλόκων τους με τη μέθοδο (DSC)

Δ.5.2.1 Μελέτη οξείδωσης θυμόλης και των συμπλόκων της

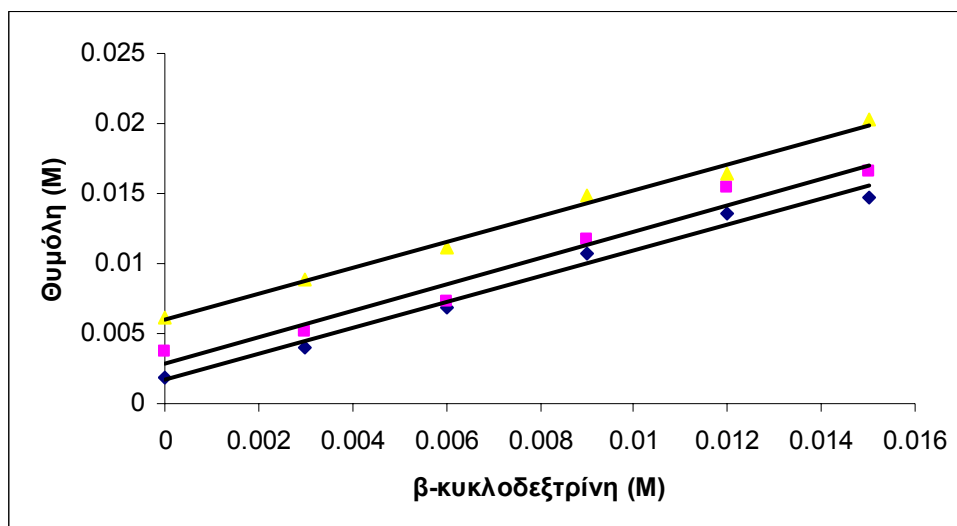
Για την μελέτη της οξείδωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DSC υπό οξειδωτικές συνθήκες με τη διαβίβαση αερίου οξυγόνου. Μικρή ποσότητα δείγματος ~4mg θυμόλης, συμπλόκου θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, συμπλόκου θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης που έχει παρασκευαστεί με ομογενοποίηση, θυμόλης ενθυλακωμένης σε τροποποιημένο άμυλο, τοποθετούνται σε καψίδια από αλουμίνιο με ανοιχτή οπή στο πάνω μέρος για την διαβίβαση οξυγόνου στο δείγμα. Τα δείγματα θερμαίνονται από θερμοκρασία περιβάλλοντος έως τους 120°C με ρυθμό σάρωσης 90 C°/min. Τα δείγματα παραμένουν στους 120°C για ένα λεπτό, για την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας στο δείγμα και μετά θερμαίνονται έως τους 350°C με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 10 C°/min.

Δ.5.2.2 Μελέτη οξείδωσης γερανιόλης και των συμπλόκου της

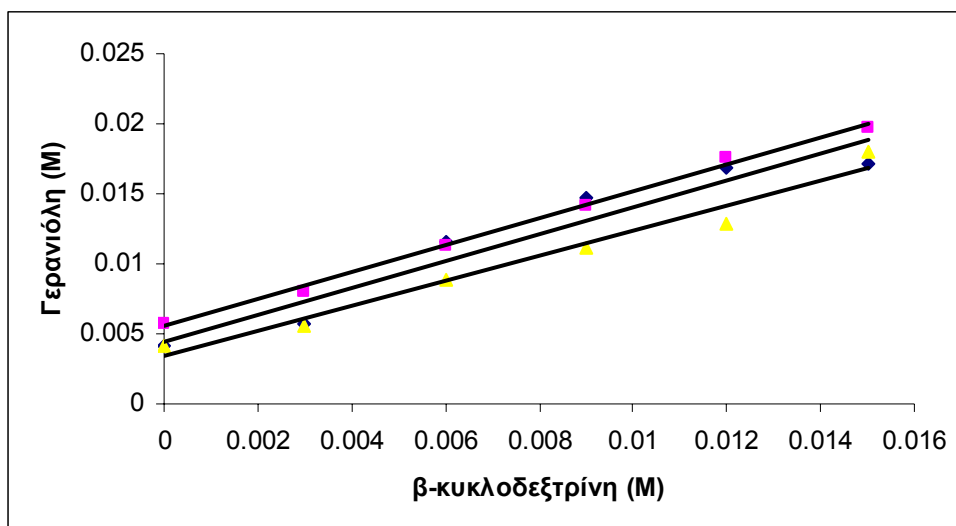
Για την μελέτη της οξείδωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DSC υπό οξειδωτικές συνθήκες με τη διαβίβαση αερίου οξυγόνου, τοποθετούνται σε καψίδια από αλουμίνιο με ανοιχτή οπή στο πάνω μέρος για την διαβίβαση οξυγόνου. Μικρή ποσότητα δείγματος ~4mg γερανιόλης, συμπλόκου γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, συμπλόκου γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης που έχει παρασκευαστεί με ομογενοποίηση, γερανιόλης ενθυλακωμένης σε τροποποιημένο άμυλο στο δείγμα. Τα δείγματα θερμαίνονται από θερμοκρασία περιβάλλοντος έως τους 120°C με ρυθμό σάρωσης 90 C°/min. Τα δείγματα παραμένουν στους 120°C για 1 min, για την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας στο δείγμα και μετά θερμαίνονται έως τους 400°C με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 10 C°/min.

Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για τη μελέτη της αυξανόμενης διαλυτότητας τόσο της θυμόλης όσο και της γερανιόλης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές διαλυτότητας σε τρεις θερμοκρασίες, κατασκευάστηκαν καμπύλες διαλυτότητας και υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες σταθερές σχηματισμού συμπλόκου, K_c , καθώς και οι τιμές θερμοδυναμικών παραμέτρων σχηματισμού του συμπλόκου. Τα διαγράμματα μεταβολής της διαλυτότητας τόσο της θυμόλης όσο και της γερανιόλης παρουσία της β-κυκλοδεξτρίνης σε διαφορετικές θερμοκρασίες παρουσιάζονται στα Σχήματα 4 και 5 αντίστοιχα. Η μεταβολή της συγκέντρωσης σε κάθε θερμοκρασία είναι γραμμική και τα διαγράμματα αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως διαγράμματα μορφής A_L (Higuchi & Connors, 1965).



Σχήμα 4 Μελέτη διαλυτότητας θυμόλης παρουσία β-CD στους 25 °, 35 °, 45 °C



Σχήμα 5 Μελέτη διαλυτότητας γερανιόλης παρουσία β-CD στους 25°, 35°, 45°C

Από τα διαγράμματα φαίνεται ότι η διαλυτότητα των δύο μονοτερπενίων στο νερό αυξάνει λόγω συμπλοκοποίησης με τη β-κυκλοδεξτρίνη, έτσι η ενθυλακωμένη μορφή των μορίων που βρίσκεται σε μορφή σκόνης μπορεί να προστεθεί σε τρόφιμα που έχουν ως βάση το νερό εξασφαλίζοντας μεγαλύτερες ποσότητες θυμόλης και γερανιόλης σε διαλυτή μορφή.

Οι σταθερές σχηματισμού του συμπλόκου (K_c) τόσο της θυμόλης όσο της γερανιόλης με τη β-κυκλοδεξτρίνη στις τρεις θερμοκρασίες 25°, 35°, 45°C όπως υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση 1 δίνονται στους Πίνακες 4 και 5. Οι τιμές της αποτέμνουσας (intercept) των διαγραμμάτων δείχνουν ότι η διαλυτότητα τόσο της θυμόλης όσο και της γερανιόλης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Οι τιμές των σταθερών σχηματισμού του συμπλόκου (K_c) μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας, όπως αναμένεται για εξώθερμες διαδικασίες.

Πίνακας 4 Σταθερές σχηματισμού του συμπλόκου (Kc) θυμόλης /β-CD σε διαφορετικές θερμοκρασίες (25 °, 35 °, 45 °C)

Θερμοκρασία (°C)	Intercept	Slope	Kc (M ⁻¹)
25	0.0017	0.9265	7415
35	0.0028	0.9449	5913.4
45	0.0059	0.9296	2238.1

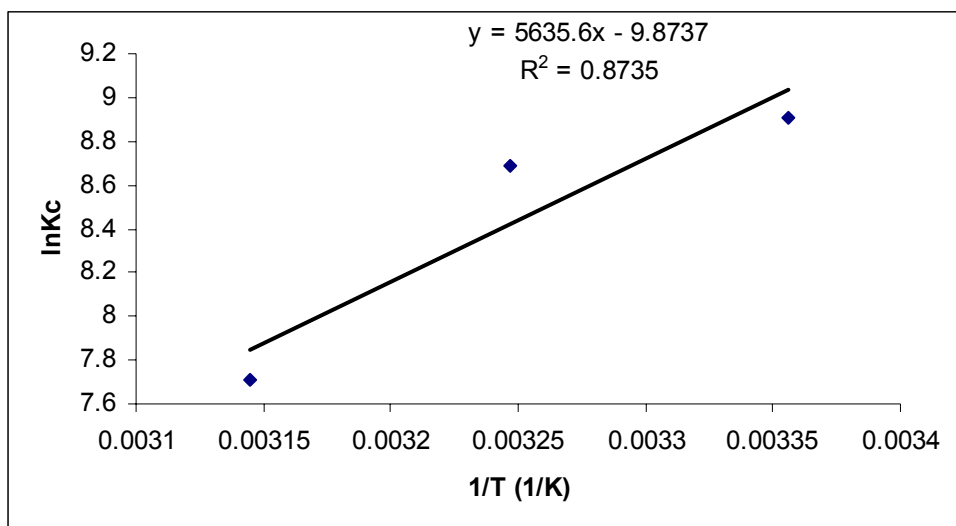
Πίνακας 5 Σταθερές σχηματισμού του συμπλόκου (Kc) γερανιόλης /β-CD σε διαφορετικές θερμοκρασίες (25 °, 35 °, 45 °C)

Θερμοκρασία (°C)	Intercept	Slope	Kc (M ⁻¹)
25	0.0044	0.9657	6398.8
35	0.0055	0.9668	5294.6
45	0.0034	0.8943	2788.4

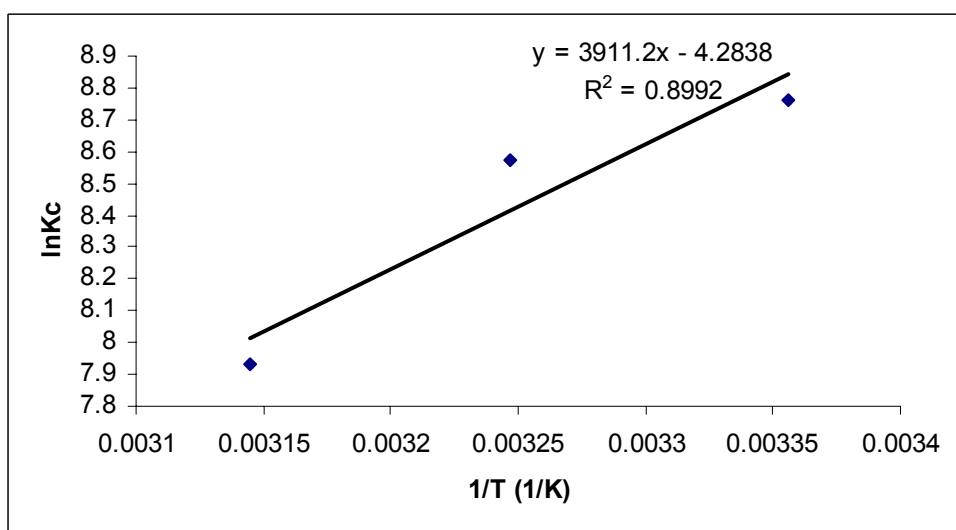
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να υπολογιστούν τιμές θερμοδυναμικών παραμέτρων. Από την εξίσωση του van't Hoff (εξίσωση 6), μπορούν να υπολογιστούν οι μεταβολές της ενθαλπίας και οι μεταβολές της εντροπίας (Tommasini et al., 2004)

$$\ln K_c = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (6)$$

Στα Σχήματα 6 και 7 παρουσιάζεται το διάγραμμα van't Hoff όπου οι τιμές της Kc είναι γραμμική συνάρτηση του αντίστροφου της απόλυτης θερμοκρασίας. Οι υπολογιζόμενες τιμές των θερμοδυναμικών παραμέτρων παρουσιάζονται στους Πίνακες 6, 7.



Σχήμα 6. Διάγραμμα Van't Hoff σχηματισμού του συμπλόκου μεταξύ θυμόλης και β-CD.



Σχήμα 7. Διάγραμμα Van't Hoff σχηματισμού του συμπλόκου μεταξύ γερανιόλης και β-CD.

Οι αρνητικές τιμές μεταβολής της ενθαλπίας δείχνουν ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου είναι εξώθερμο φαινόμενο. Η τιμές (ΔH) για τη θυμόλη είναι $-46854.3 \text{ kJ mole}^{-1}$, και για τη γερανιόλη είναι $-32517.7 \text{ kJ mole}^{-1}$ είναι σχετικά μικρές και τυπικές υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, απομάκρυνσης μορίων νερού από το εσωτερικό της κοιλότητας της β-CD και δημιουργίας δεσμών υδρογόνου. Η μεταβολή της εντροπίας είναι επίσης αρνητική και οφείλεται στο γεγονός ότι η

συμπλοκοποίηση οδηγεί σε ένα πιο οργανωμένο δομικά σύστημα με μειωμένη ικανότητα περιστροφής του συμπλοκοποιημένου μορίου σε σχέση με το ελεύθερο μόριο.

Πίνακας 6. Θερμοδυναμικές παράμετροι σχηματισμού του συμπλόκου θυμόλης /β-κυκλοδεξτρίνης

Θερμοδυναμική παράμετρος	Τιμή
ΔH (kJ mol ⁻¹)	-46854.3
ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-82.0
ΔG (kJ mol ⁻¹)	- 22391.5

Πίνακας 7. Θερμοδυναμικές παράμετροι σχηματισμού του συμπλόκου γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης

Θερμοδυναμική παράμετρος	τιμή
ΔH (kJ mol ⁻¹)	-32517.7
ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-35.6
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-21904.2

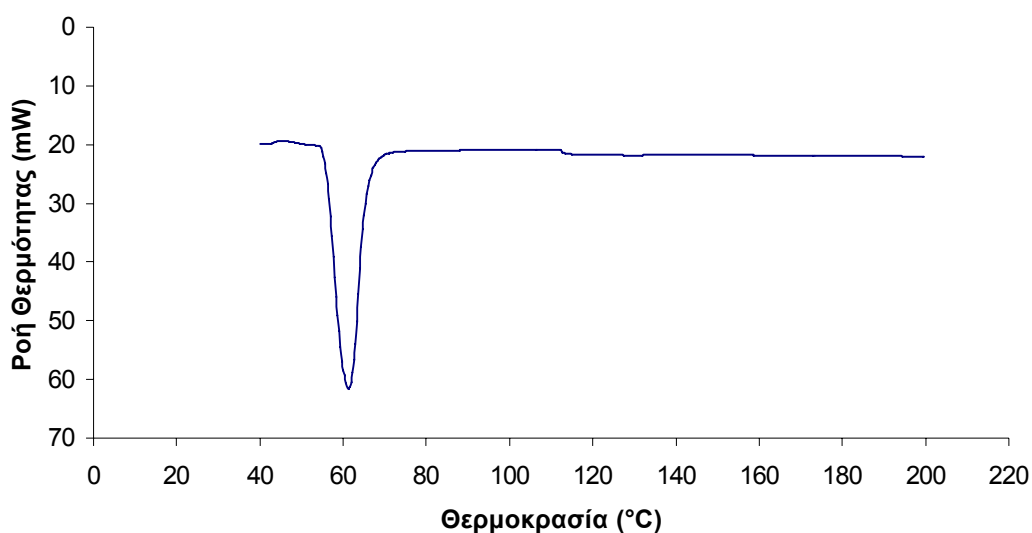
Οι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs για της αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν κατά το εγκλεισμό της θυμόλης και της γερανιόλης μπορούν να υπολογιστούν με τη βοήθεια της εξίσωσης (8):

$$\Delta G_{25} = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (8)$$

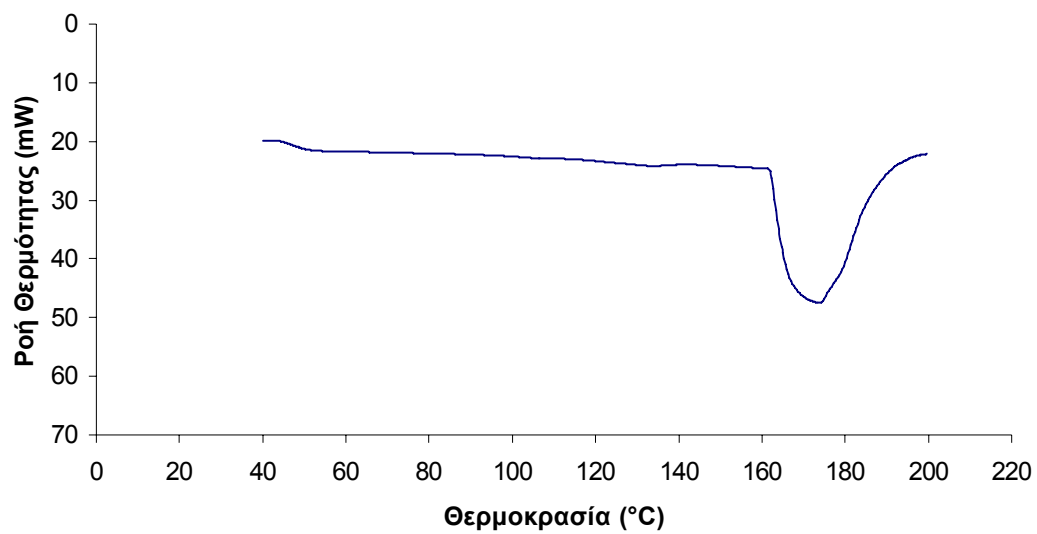
Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs στους 298 K ΔG_{25} υπολογίστηκε από την εξίσωση 8 και οι τιμές παρουσιάζονται στους Πίνακες 6 και 7. Οι αρνητικές τιμές φανερώνουν ότι η διαδικασία του εγκλεισμού είναι αυθόρμητο φαινόμενο.

Στα Σχήματα 8-12 παρουσιάζονται τα θερμογράφημα πέντε διαφορετικών δειγμάτων: της θυμόλης, της β-κυκλοδεξτρίνης, του φυσικού μίγματος της θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, του συμπλόκου θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, και του

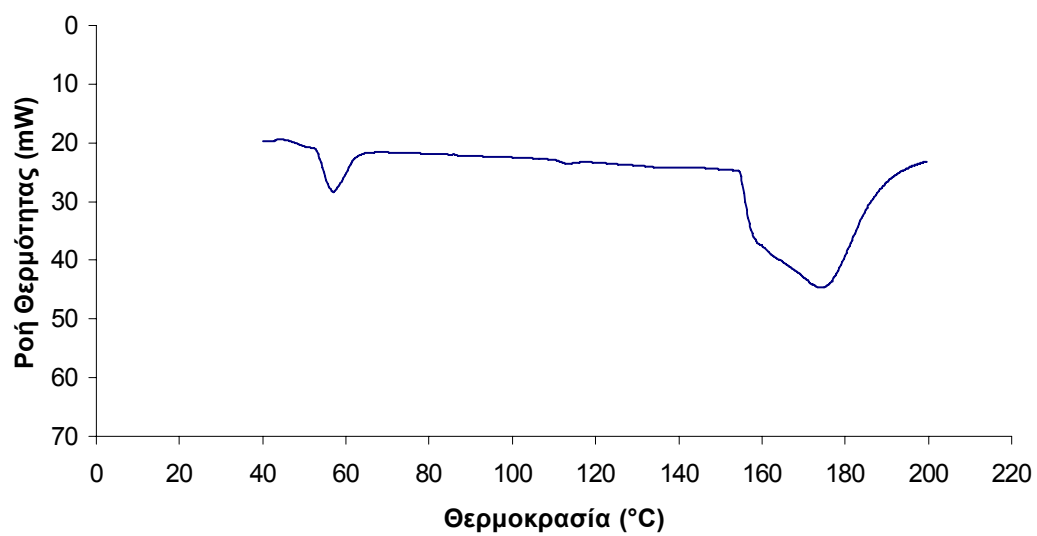
συμπλόκου θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης που προκύπτει μετά την ομογενοποίηση. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της σάρωσης με DSC, στο Σχήμα 8, το μόριο της θυμόλης παρουσιάζει μια ενδόθερμη κορυφή στη θερμοκρασία 61.6°C, το οποίο αντιπροσωπεύει το σημείο τήξης των κρυστάλλων του μορίου. Στο θερμογράφημα της β-κυκλοδεξτρίνης (Σχήμα 9), παρουσιάζει μια ενδόθερμη κορυφή στους 174°C που οφείλεται στην απομάκρυνση μορίων νερού. Στο Σχήμα 10, το οποίο αντιπροσωπεύει το φυσικό μίγμα θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, παρουσιάζονται δύο ενδόθερμες κορυφές μία στους 58.27°C και μία στους 176,44°C. Τα εν λόγω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι με απλή ανάμιξη δεν μπορεί να επιτευχθεί εγκλεισμός της θυμόλης μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Στο Σχήμα 11, το οποίο αντιπροσωπεύει τη συμπλοκοποιημένη μορφή του μορίου της θυμόλης, δεν εμφανίζεται απορρόφηση στη θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο σημείο τήξεως της θυμόλης (61.6°C), το αποτέλεσμα αποτελεί απόδειξη εγκλεισμού του μορίου της θυμόλης μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Στο Σχήμα 12, το οποίο αντιπροσωπεύει την ομογενοποιημένη μορφή του συμπλόκου θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, παρουσιάζεται μια ενδόθερμη κορυφή στους 170.23°C, που οφείλεται στην απομάκρυνση μορίων νερού ενώ και το θερμογράφημα αυτό δεν εμφανίζει απορρόφηση που οφείλεται στο σ.τ της θυμόλης κάτι που αποδεικνύει ότι η παρασκευή συμπλόκου με τη μέθοδο της ομογενοποίησης οδηγεί σε αποτελεσματικό εγκλεισμό.



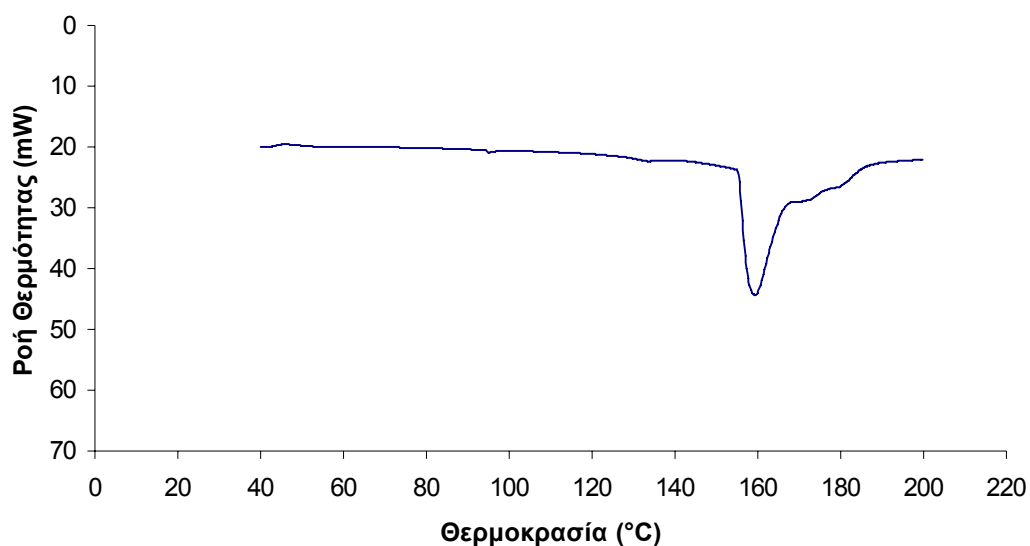
Σχήμα 8 Θερμογράφημα θυμόλης



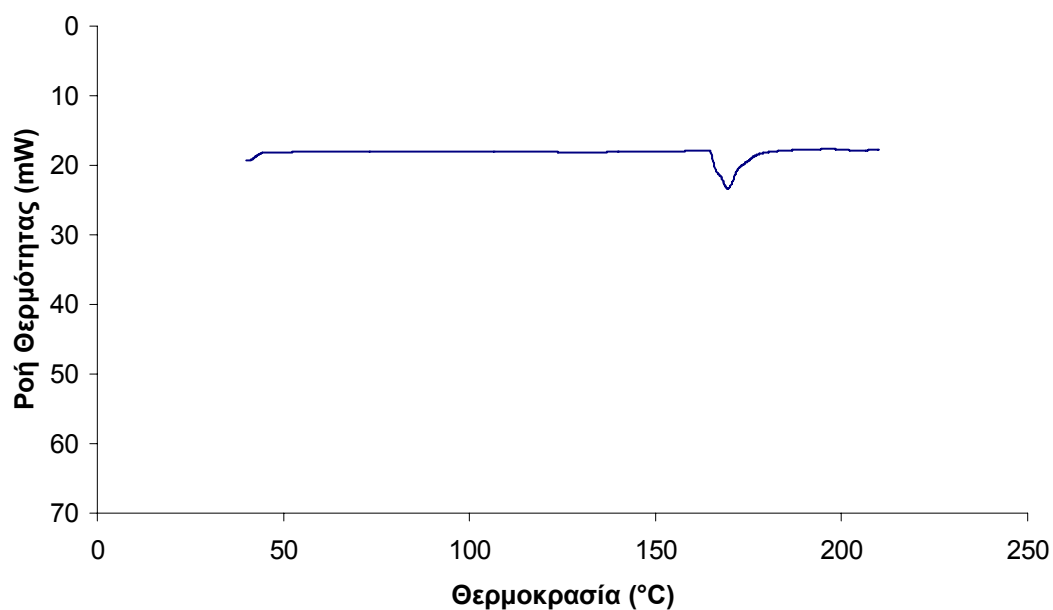
Σχήμα 9 Θερμογράφημα β-κυκλοδεξτρίνης



Σχήμα 10 Θερμογράφημα φυσικού μίγματος θυμόλης β-κυκλοδεξτρίνης



Σχήμα 11 Θερμογράφημα συμπλόκου θυμόλης β-κυκλοδεξτρίνης

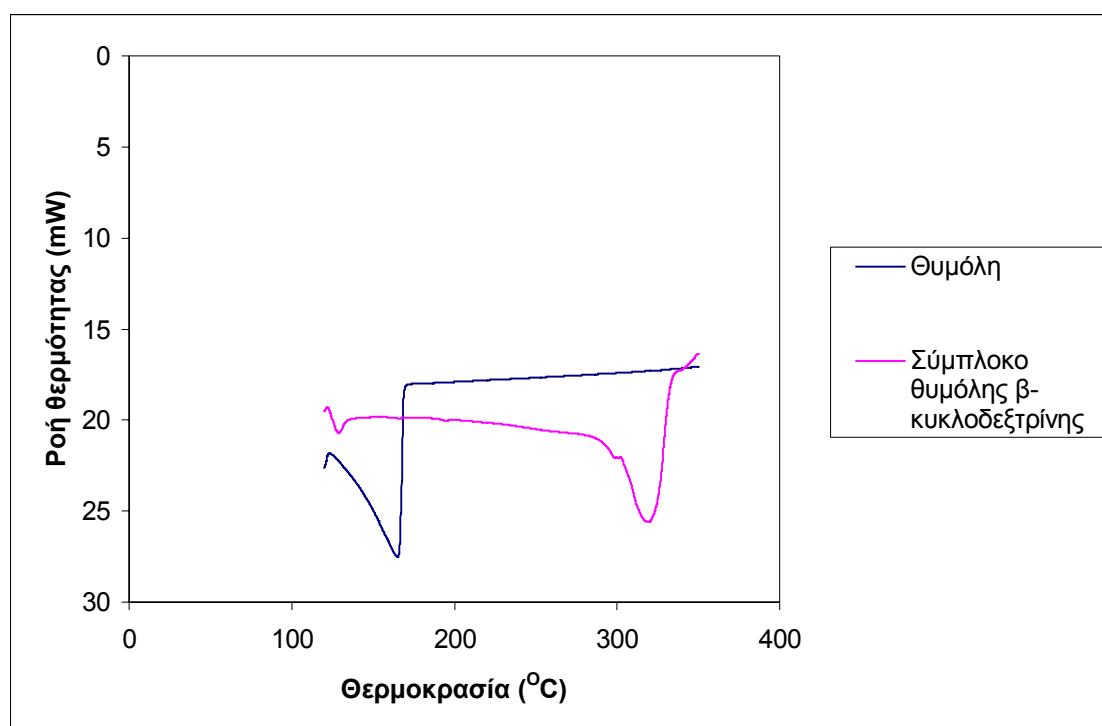


Σχήμα 12 Θερμογράφημα συμπλόκου θυμόλης β-κυκλοδεξτρίνης μετά την ομογενοποίηση

Η πιστοποίηση του ποιοτικού εγκλεισμού της γερανιόλης μέσα στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με DSC καθώς το αντιδραστήριο της γερανιόλης ήταν σε υγρή μορφή και το ελεύθερο μόριο δεν εμφανίζει καμία απορρόφηση. Ο σχηματισμός του συμπλόκου μπορεί να

επιβεβαιωθεί έμμεσα με τη χρήση της DSC σε συνθήκες οξείδωσης. Η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα του μορίου της γερανιόλης όταν αυτή σχηματίζει σύμπλοκο οφείλεται στο γεγονός ότι βρίσκεται στο εσωτερικό της κοιλότητας της. Η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρουσιάζεται παρακάτω.

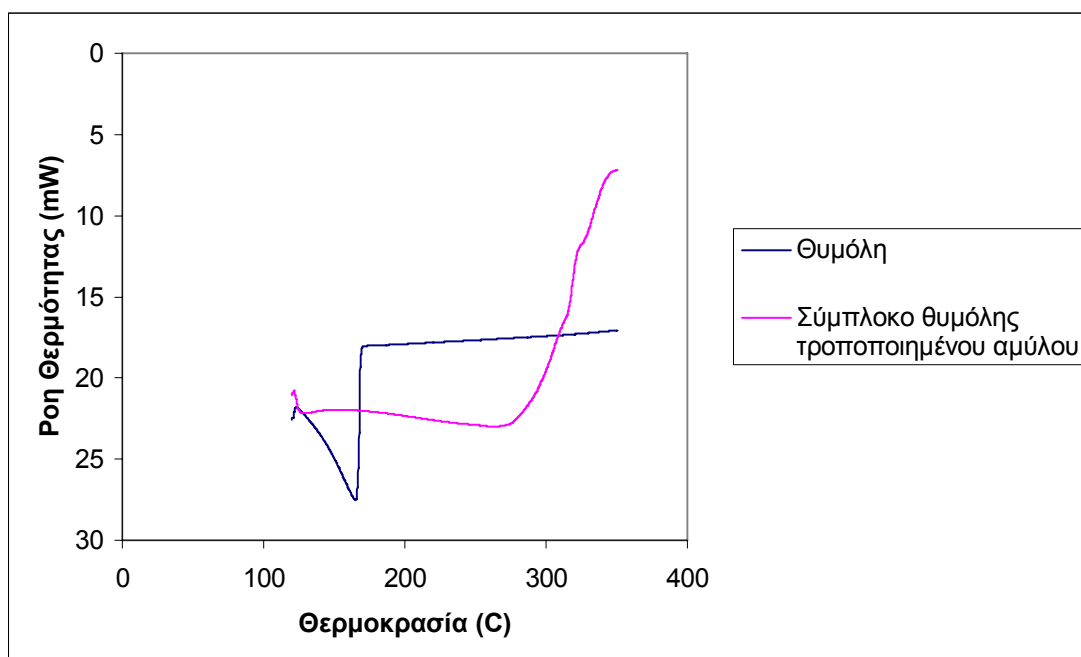
Στο Σχήμα 13 παρατίθενται συγκριτικά τα διαγράμματα οξείδωσης της θυμόλης καθώς και του συμπλόκου θυμόλης /β-κυκλοδεξτρίνης (θέρμανση από 120°C – 350 °C με ρυθμό 10 °C /min). Όπως φαίνεται από τις καμπύλες του σχήματος 13 το μόριο της θυμόλης είναι σταθερό στην οξείδωσης είτε αυτό είναι ελεύθερο είτε βρίσκεται με τη μορφή συμπλόκου με τη β-κυκλοδεξτρίνη. Επομένως η συμπλοκοποίηση δεν προσφέρει πρόσθετη προστασία στο μόριο της θυμόλης κάτι που είναι αναμενόμενο εφόσον η θυμόλη αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως σταθερό μόριο.



Σχήμα 13 Καμπύλες οξείδωσης θυμόλης και συμπλόκου θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης

Στο Σχήμα 14 παρατίθενται τα συγκριτικά διαγράμματα οξείδωσης της θυμόλης καθώς και του συμπλόκου θυμόλης/τροποποιημένο άμυλο (θέρμανση από 120 °C – 350 °C με ρυθμό 10 °C /min). Όπως φαίνεται από τις καμπύλες του

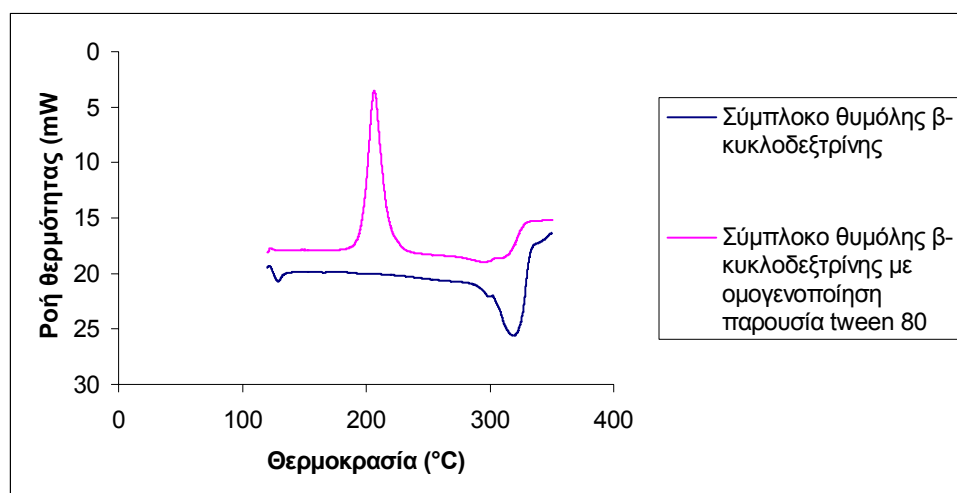
Σχήματος 14 το ελεύθερο μόριο της θυμόλης είναι σταθερό μέχρι την θερμοκρασία που γίνεται η σάρωση, ενώ όταν αυτό είναι εγκλεισμένο σε τροποποιημένο άμυλο εμφανίζεται εξώθερμη απορρόφηση στους 292°C λόγω οξείδωσης και αποικοδόμησης των μορίων. Επομένως και η ενθυλάκωση με τροποποιημένο άμυλο δεν προσφέρει προστασία στην οξείδωση της θυμόλης.



Σχήμα 14 Καμπύλες οξείδωσης θυμόλης και συμπλόκου θυμόλης/τροποποιημένο άμυλο.

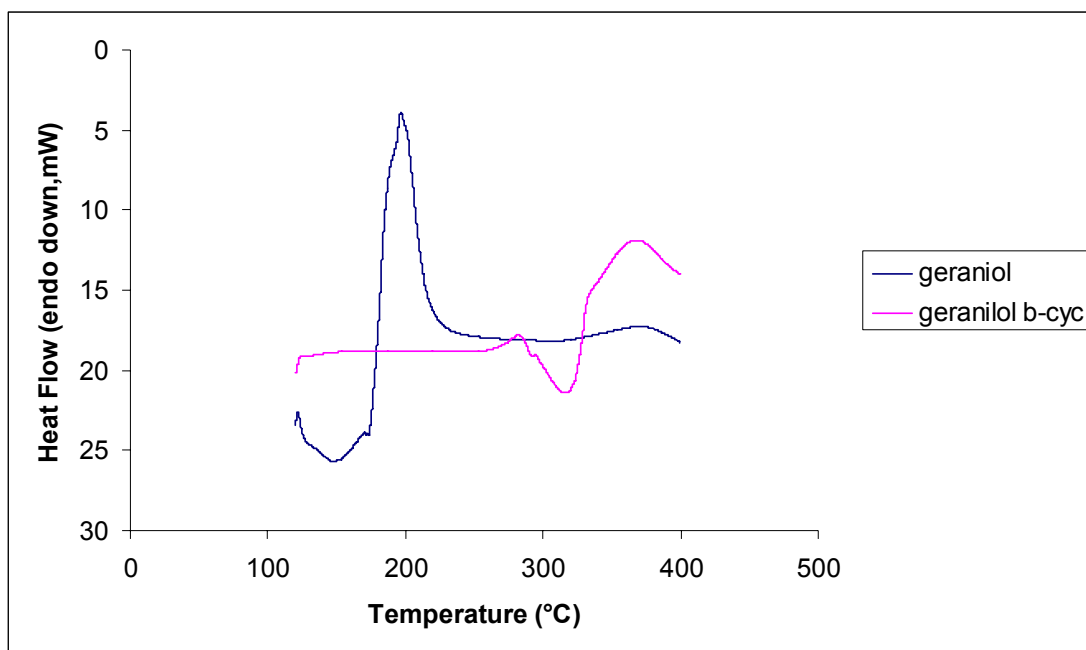
Στο Σχήμα 15 παρουσιάζονται συγκριτικά διαγράμματα οξείδωσης των συμπλόκων θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης, θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης όταν η συμπλοκοποίηση έγινε με ομογενοποίηση για σχηματισμό γαλακτώματος παρουσία γαλακτοματοποιητή tween 80, (θέρμανση από 120°C – 350°C με ρυθμό 10°C/min). Όπως φαίνεται από τις καμπύλες του Σχήματος 15, η οξείδωση του συμπλόκου θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης αρχίζει στους 318.8°C, και του συμπλόκου θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση και γαλακτοματοποιητή tween 80 στους 303°C. Η εξώθερμη κορύφη που παρουσιάζεται στο σύμπλοκο θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης με γαλακτοματοποιητή Tween 80 στους 207.8°C, ενδεχομένως να οφείλεται στο γαλακτοματοποιητή. Επομένως η ομογενοποίηση και η δημιουργία γαλακτώματος

δεν φαίνεται να συμβάλλει στη δημιουργία σταθερότερου συμπλόκου και επομένως μεγαλύτερη προστασία στο μόριο της θυμόλης.



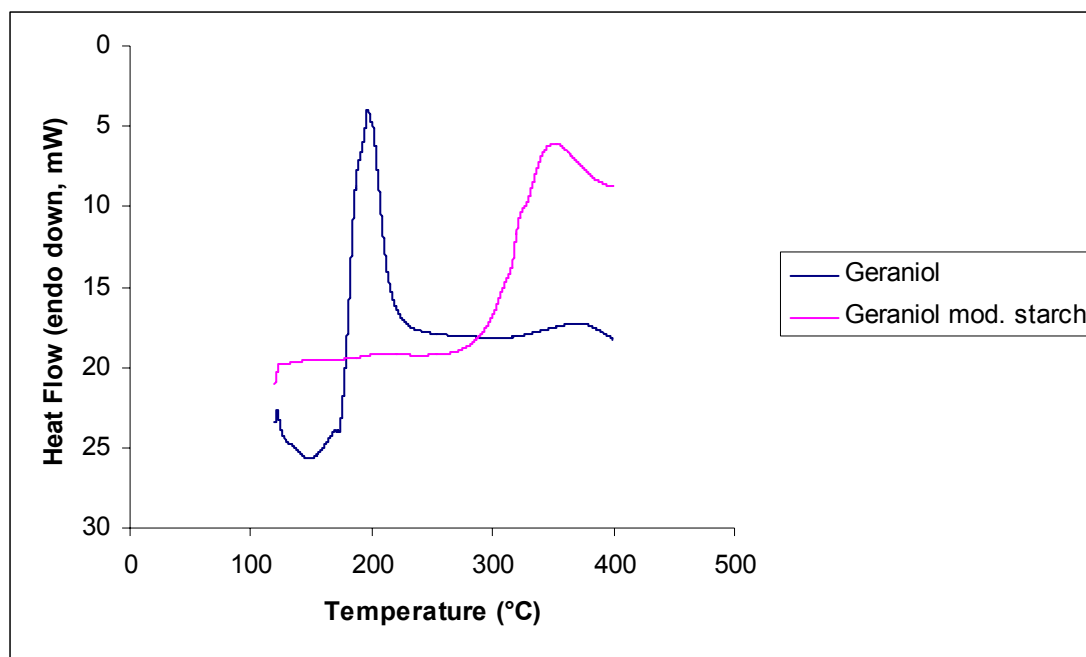
Σχήμα 15 Καμπύλες οξείδωσης συμπλόκου θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνη και συμπλόκου θυμόλης/β-κυκλοδεξτρίνης που παρασκευάστηκε με συμπλοκοποίηση παρουσία tween 80.

Στο Σχήμα 16 παρουσιάζονται συγκριτικά διαγράμματα οξείδωσης της γερανιόλης καθώς και του συμπλόκου γερανιόλης /β-κυκλοδεξτρίνης (θέρμανση από 120°C – 400°C με ρυθμό 10°C /min). Όπως φαίνεται από τις καμπύλες τους Σχήματος 16 το μόριο της γερανιόλης είναι πιο επιρρεπές στην οξείδωση όταν βρίσκεται ελεύθερο, ενώ αντίθετα όταν βρίσκεται με την μορφή συμπλόκου με β-κυκλοδεξτρίνη είναι πιο σημαντικά πιο σταθερό. Όπως φαίνεται από τις καμπύλες τους Σχήματος 16 η οξείδωση-αποικοδόμηση του ελεύθερου μορίου γερανιόλης αρχίζει στους 174°C, ενώ η εξώθερμη του συμπλόκου εμφανίζεται στους 321°C. Επομένως ο εγκλεισμός της γερανιόλης στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης κάνει το μόριο πιο σταθερό.



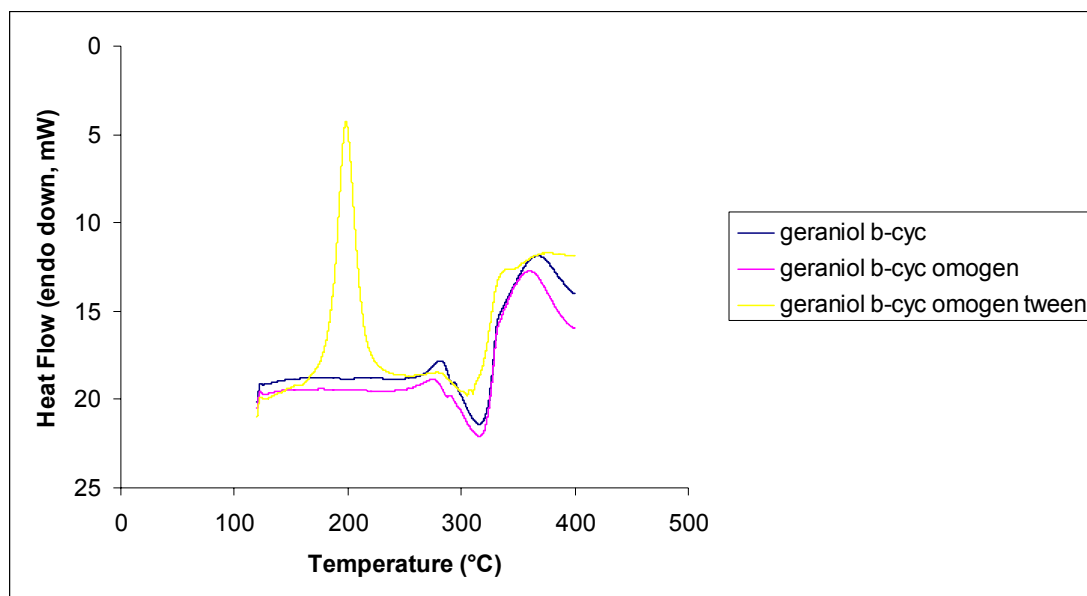
Σχήμα 16 Καμπύλες οξείδωσης γερανιόλης και συμπλόκου γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης.

Στο Σχήμα 17 παρουσιάζονται συγκριτικά διαγράμματα οξείδωσης της γερανιόλης καθώς και του συμπλόκου γερανιόλης/ τροποποιημένο άμυλο (θερμοκρασία σάρωσης από 120°C – 400°C με ρυθμό 10°C /min). Όπως φαίνεται από τις καμπύλες του Σχήματος 17 το μόριο της είναι πιο επιρρεπές στην οξείδωση όταν βρίσκεται ελεύθερο, ενώ αντίθετα όταν βρίσκεται με την μορφή συμπλόκου με τροποποιημένο άμυλο είναι πιο σταθερό. Όπως φαίνεται από τις καμπύλες τους Σχήματος 17 η οξείδωση-αποικοδόμηση του ελεύθερου μορίου γερανιόλης αρχίζει στους 174°C, ενώ η εξώθερμη του συμπλόκου εμφανίζεται στους 277°C. Επομένως το τροποποιημένο άμυλο αποτελεί αποτελεσματικό μέσω εγκλεισμού για τη γερανιόλη. Συγκρίνοντας τη καμπύλη του συμπλόκου γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης του Σχήματος 16 με τη καμπύλη του συμπλόκου γερανιόλης /τροποποιημένο άμυλο του Σχήματος 17 φαίνεται ότι το μόριο της β-κυκλοδεξτρίνης αποτελεί καλύτερο μέσω εγκλεισμού για το μόριο της γερανιόλης καθώς αυξάνει την προστασία/σταθερότητα του εν λόγω μορίου.



Σχήμα 17 Καμπύλες οξείδωσης γερανιόλης και συμπλόκου γερανιόλης – τροποποιημένου αμύλου.

Στο Σχήμα 18 παρουσιάζονται συγκριτικά διαγράμματα οξείδωσης των συμπλόκων γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης με παρασκευή συμπλόκου σε υδατικό διάλυμα, γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης με παρασκευή συμπλόκου με ομογενοποίηση, γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης με παρασκευή συμπλόκου με ομογενοποίηση παρουσία γαλακτωματοποιητή Tween 80, (θερμοκρασίας σάρωσης από 120°C – 400°C με ρυθμό 10°C/min). Όπως φαίνεται από τις καμπύλες του Σχήματος 18, η οξείδωση του συμπλόκου γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης αρχίζει στους 321°C, του συμπλόκου γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση στους 319.8°C, του συμπλόκου γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση παρουσία γαλακτωματοποιητή Tween 80 στους 311°C. Η εξώθερμη κορύφη που παρουσιάζεται στο σύμπλοκο γερανιόλης/β-κυκλοδεξτρίνης με ομογενοποίηση παρουσία γαλακτωματοποιητή Tween 80 στους 199.8°C, ενδεχομένως να οφείλεται στο γαλακτωματοποιητή Tween 80. Επομένως η ομογενοποίηση και η δημιουργία μιας μορφής γαλακτώματος δεν φαίνεται να συμβάλλει στη δημιουργία σταθερότερου μορίου κατά τη συμπλοκοποίηση.



Σχήμα 18 Καμπύλες οξείδωσης γερανιόλης και συμπλόκων γερανιόλης (θέρμανση από 120°C – 400°C στους 10°C /min).

ΣΤ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Σύμφωνα με αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας μελέτης η διαλυτότητα των δύο μονοτερπενίων στο νερό αυξάνει λόγω συμπλοκοποίησης με τη β-κυκλοδεξτρίνη, έτσι η ενθυλακωμένη μορφή των μορίων που βρίσκεται σε μορφή σκόνης μπορεί να προστεθεί σε τρόφιμα που έχουν ως βάση το νερό εξασφαλίζοντας μεγαλύτερες ποσότητες θυμόλης και γερανιόλης σε διαλυτή μορφή.

Τα αποτελέσματα της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) έδειξαν ότι το μόριο της θυμόλης ενθυλακώνεται επιτυχώς στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης.

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης σε συνθήκες οξείδωσης έδειξε ότι μόριο της θυμόλης είναι σταθερό στην οξείδωση είτε αυτό είναι ελεύθερο είτε βρίσκεται με τη μορφή συμπλόκου με τη β-κυκλοδεξτρίνη ή ενθυλακωμένο σε τροποποιημένο άμυλο. Ανάλογα αποτελέσματα προκύπτουν όταν η συμπλοκοποίηση γίνεται με σχηματισμό γαλακτώματος με ομογενοποίηση παρουσία γαλακτωματοποιητή Tween 80. Ανάλογα πειράματα για η γερανιόλη έδειξαν ότι το μόριο της γερανιόλης είναι πιο επιρρεπές στην οξείδωση όταν βρίσκεται ελεύθερο, ενώ αντίθετα όταν βρίσκεται με την μορφή συμπλόκου με β-κυκλοδεξτρίνη είναι σημαντικά πιο σταθερό. Η οξείδωση-αποικοδόμηση του ελεύθερου μορίου γερανιόλης αρχίζει στους 174°C, ενώ η εξώθερμη του συμπλόκου εμφανίζεται στους 321°C. Επομένως ο εγκλεισμός της γερανιόλης στην κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης κάνει το μόριο πιο σταθερό. Η αυξανόμενη σταθερότητα στην οξείδωση της ενθυλακωμένης γερανιόλης αποτελεί έμμεση απόδειξη ενθυλάκωσης της.

Στο μέλλον η επιβεβαίωση του εγκλεισμού μπορεί να γίνει και με άλλες μεθόδους όπως η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού που παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για την ακριβή δομή και στοιχειομετρία του συμπλόκου. Επιπλέον τα σύμπλοκα θυμόλης και γερανιόλης τόσο με κυκλοδεξτρίνη όσο και με τροποποιημένο άμυλο πρέπει να μελετηθούν ως προς την απελευθέρωση των εγκλεισμένων μορίων σε διάφορους διαλύτες και συστήματα τροφίμων.

Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aydin S., Basaran A.A., Basaran N., 2005. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation Res.* 581, 43-53.
2. Beristain C, Vazquez A, Garcia H, Vernon-Carter E., 1996. Encapsulation of Orange Peel Oil by Co-crystallization. *Lebensm. -Wissu.-Technol.* 29, 645-647.
3. Betrolini A.C, Siani A.C and Grosso R.F., 2001. Stability of monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying. *J. Agric Food Chem.* 69, 780-785.
4. Bibby DC, Davies NM, Tucker IG., 2000. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 197, 1-11.
5. Burgener M., Tyszewski T., Ferri D., Mallat T., Baiker Al., 2005. Palladium-catalyzed oxidation of geraniol in dense carbon dioxide. *Appl. Catal. A: General* 299, 66-72.
6. Burke Y.D., Stark M.J., Roach S.L., Sen S.E., Crowell P.L., 1997 Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids* 32, 151-6.
7. Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microb.* 94, 223-253
8. Carnesecchi S., Bradaia A., Fischer B., Coelho D., Scholler-Guinnard M., Gosse F., and Raul F., 2002. Perturbation by Geraniol of Cell Permeability and Signal Transduction Pathways in Human Colon Cancer Cells. *J. Pharm. Exp. Therapeutics, JPET* 303, 711-715.
9. Carnesecchi S., Bras-Goncalves R., Amyaouch B., Mirjam Z., Gosse F., Poupon M. and Raul F., 2004. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates, DNA syntesis and potentiates 5 fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Canc.Letters* 215, 53-59.
10. Carnesecchi S., Langeley K., Exinger F., Gosse F., Raul F., 2002. Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *J. Pharm. Exp. Therapeutics, JPET* 301, 625-630.
11. Clarot D.C., Battu S., Cardot P.J.P., 2000. Chromatographic of study of terpene derivatives on porous graphitic carbon stationary phase with β -cyclodextrin as mobile phas modifier. *J. Chrom. A.* 903, 67-76
12. Connors KA. 1997.The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.* 97, 1325-1357
13. Crowell P.L., 1999 Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes, *Amer. Soc. Nutr. Sci.* 129, 775S-778S, 1999.
14. Ettayebi K.l , Yamani J.E., Hassani B.R., 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus Subtilis*, *FEMS Micr.Letters* 183, 191-195
15. Field Quellen Simon, 2006, *Ingretients*
16. Gibbs B.F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C.N., 1999. Encapsulation in the food industry. *Int. J. F. Sci. and Nutr.* 50, 213-224.
17. Hedges A.R., 1998. Industrial applications of cyclodextrines. *Chem Rev.* 98, 2035-2044.

18. Heinzelmann K., Franke K., 1999. Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. *Col. and Surf. B:Bioint.*12, 223-229.
19. Ji P., Si M.S., Pondos Y., and Imagawa D.K., 2002. Monoterpene Geraniol Prevents Acute Allograft Rejection. *Transpl. Proc.* 34, 1418-1419
20. Karathanos V., Mourtzinou I., Yannakopoulou K., and Andrikopoulos N., 2007. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *F. Chem.*, 101, 652-658
21. Kant A., Linforth R.S.T., Hort J., Taylor A.J., 2004. Effect of β -cyclodextrin on Aroma Release and Flavor Perception. *J. Agr. Food and Chem.* 52, 2028-2035
22. He L., Huanbiao M., Susilowati H., Asaf A. Q. and Elson C.E., 1997, Isoprenoids Suppress the Growth of Murine V16 Melanomas in vitro and in vivo. *J.Nutr.* 127, 668-674
23. Ligima Y., Gand D.R., Fridman E., Lewinsohn E. and Pichersky E., 2004 Characterization of Geraniol Synthase from the Peltate Glands of Sweet Basil. *Plant Phys.*134, 370-379.
24. Loftsson T., Brewster M.E., 1996. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins Drug Solubilization and Stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85, 1017-1025
25. Loftsson T., Masson M., 2001. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.* 225, 15-30.
26. Luan F., Mosandl A., Munch A., Wust M., 2005. Metabolism of geraniol in grape berry mesocarp of *Vitis Vinifera* L. Cv Sheurebe: demonstration of stereoselective reduction, E/Z-isomerization, oxidation and glycosylation. *Phytochem.* 66, 295-303
27. Magnusdottir A., Masson M., and Loftsson T., 2002. Cyclodextrines. *Incl. Phenom. Macroc. Chem.* 44., 213-218.
28. Nazer A.I., Kobilinsky A., Tholozan J.L. and Dubois-Brissonnet F., 2005, Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microb.* 22, 391-398.
29. Prashar A., Hili P., Veness G.R., Evans S.C., 2003. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon Martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochem.* 63, 569-575.
30. Robledo S., Osorio E., Muñoz D., Jaramillo L.M., Restrepo A,¹ Arango G., and Vélez, 2005, In Vitro and In Vivo Cytotoxicities and Antileishmanial Activities of Thymol and Hemisynthetic Derivatives. *Am. Soc. Microb.* 49, 1652-1655.
31. Schrooyen P.M, Van der Meer R, De Kruif C.G., 2001. Microencapsulation: its application in nutrition, *Food Res.*60, 475-479.
32. Szejtli J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.*98: 1743-1753.
33. Szente L.L., Szejtli J., 2004. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food. Sci. & Techn* 15, 137-142.
34. Tommasini S., Raneri D., Ficarra R., Calabro M.L., 2004. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with β -cyclodextrin. *J. Pharm. Biom. Anal.* 35, 379-387

35. Youdim A.K., Deans G.S., 1999. Beneficial effects of thyme oil on age-related changes in the phospholipids C20 and C22 polyunsaturated fatty acid composition of various rat tissues. *Bioch. et Bioph. Acta* 1438, 140-146
36. Yuliani S., Torley J.P., D'Arcy B., Nicholson T., Bhandari B., 2005, Extrusion of mixtures of starch and D.Limonene encapsulated with β -cyclodextrin: Flavour retention and physical properties. *Food. Res. Int.*
37. Zornoza A., Martin C., Sanchez M., Velaz I., Piquer A., 1998. Inclusion complexation of glisentide with α -, β - and γ -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 169, 239–244.
38. Zunino P.M., Zygadlo A.J., 2004, Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. *Planta* 219, 303-309

Ελληνική βιβλιογραφία

1. Αρβανιτογιάννης Σ.Ι., Στοιχεία Τεχνολογίας, Μεταποίησης & Συσκευασίας Τροφίμων.
2. Καραθάνος Θ.Β, (2005-2006). Σημειώσεις Φυτικοχημείας Τροφίμων, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διατροφής και Διαιτολογίας, Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας και Φυτικοχημείας Τροφίμων.