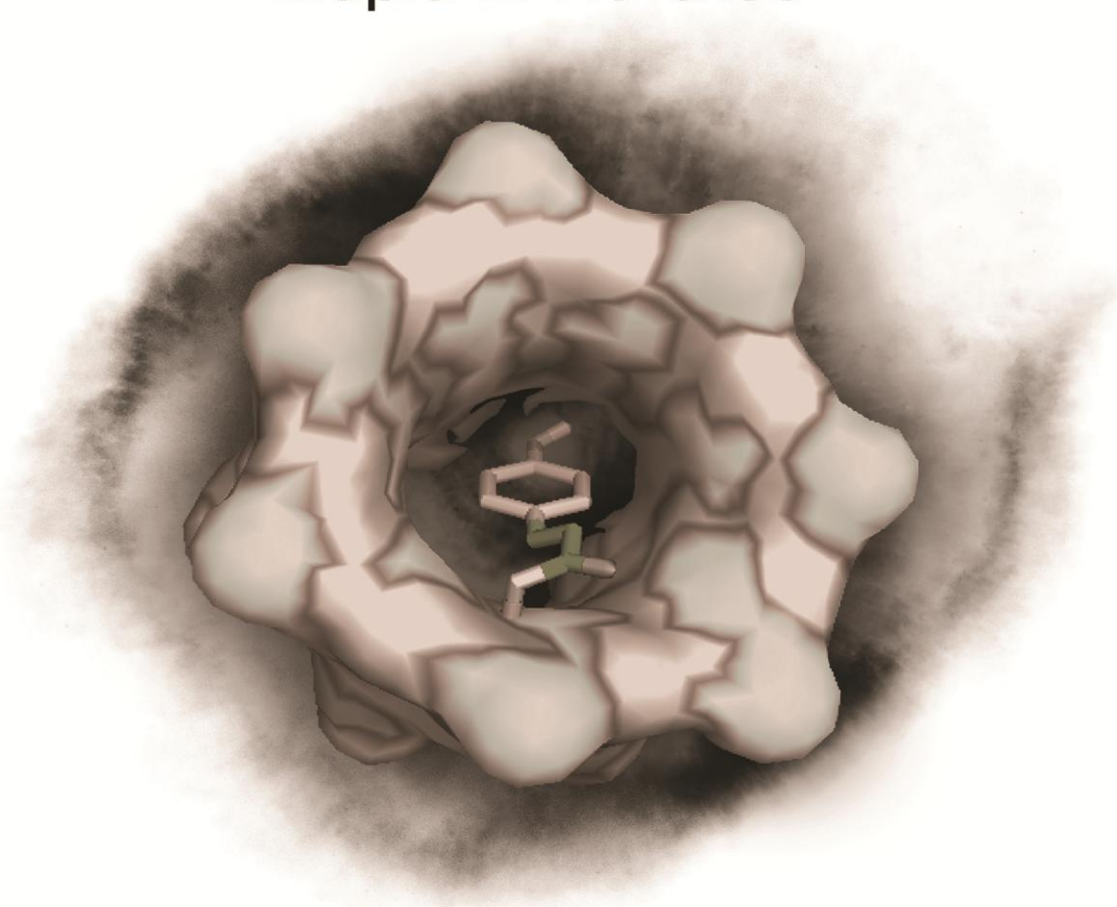


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ  
«Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων»

Μεταπτυχιακή Διατριβή  
Μαρία Σ. Πατέλου



*Μελέτη εγκλεισμού p-κουμαρικού οξέος  
σε επτάκις (2,6-δι-Ο-μεθυλο)-β-κυκλοδεξτρίνη*



Επιβλέπων Καθηγητής : Μπεθάνης Κωνσταντίνος  
Αθήνα, 2012

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ**  
**«Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων»**

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

**Μαρία Σ. Πατέλου**

*Μελέτη εγκλεισμού p-κουμαρικού οξέος σε  
επτάκιν (2,6-δι-Ο-μεθυλο)-β-κυκλοδεξτρίνη*

**Επιβλέπων Καθηγητής: Μπεθάνης Κωνσταντίνος**  
**Αθήνα, 2012**

# Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μαρία Σ. Πατέλου

*Μελέτη εγκλεισμού p-κουμαρικού οξέος σε  
επτάκιν (2,6-δι-Ο-μεθυλο)-β-κυκλοδεξτρίνη*

Επιβλέπων Καθηγητής: Μπεθάνης Κωνσταντίνος

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μπεθάνης Κωνσταντίνος

Επίκουρος Καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Φυσικής Γ.Π.Α.  
(Επιβλέπων)

Παππάς Χρήστος

Επίκουρος Καθηγητής, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Γενικής Χημείας Γ.Π.Α.  
(Μέλος)

Φλεμετάκης Εμμανουήλ

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο  
Μοριακής Βιολογίας Γ.Π.Α. (Μέλος)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαριτες που παράγονται από το άμυλο με ενζυματική δράση. Αποτελούνται από γλυκοζιτικές μονάδες συνδεδεμένες μεταξύ τους με  $\alpha$ -(1,4) δεσμούς. Βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς όπως στα τρόφιμα, στη φαρμακευτική, στη κοσμητική, στη γεωπονία και στη χημεία γενικότερα. Η κυριότερη ιδιότητα τους είναι η δημιουργία προϊόντων εγκλεισμού. Η υδρόφοβη κοιλότητά τους και το υδρόφιλο εξωτερικό τους τις καθιστά κατάλληλα μόρια ξενιστές για τον εγκλεισμό διαφόρων ενώσεων. Ο εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνες οδηγεί πολλές φορές σε ευνοϊκά αποτελέσματα όπως είναι η αύξηση της διαλυτότητας της ξενιζόμενης ένωσης, η αργή απελευθέρωσή της καθώς και η προστασία της από παράγοντες όπως το φως και η οξείδωση. Πέραν των φυσικών κυκλοδεξτρινών, έχουν δημιουργηθεί και χημικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες με βελτιωμένες ιδιότητες, κυρίως με την υποκατάσταση των υδροξύλομάδων τους. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις είναι τα παράγωγα της  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης που προκύπτουν από τη μεθυλίωση των 2,6 [επτάκις-(2,6-δι-*O*-μεθυλο)- $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη ή DIMEB] και 2,3,6 [επτάκις-(2,3,6-τρι-*O*-μεθυλο)- $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη ή TRIMEB] υδροξύλομάδων τους. Οι μεθυλιωμένες αυτές  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνες έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη υδατοδιαλυτότητα και εύκαμπτη υδροφοβική κοιλότητα.

Το *p*-κουμαρικό οξύ είναι ένα υδροξυκιναμικό οξύ, δηλαδή μία οργανική ένωση που είναι υδρόξυ παράγωγο του κινναμικού οξέος. Το *p*-κουμαρικό οξύ αποτελεί ένα πολύ σημαντικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων και ιδιαίτερα των μονοκοτυλήδων. Βρίσκεται σε πολλά λαχανικά και φρούτα καθώς επίσης και στη λιγνίνη. Συχνά απαντάται στο κρασί σε εστεροποιημένη μορφή. Το *p*-κουμαρικό οξύ έχει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες για τις ιδιότητές του αυτές.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε παρασκευή και χαρακτηρισμός του προϊόντος εγκλεισμού του *p*-κουμαρικού οξέος (*trans*) σε διμεθυλιωμένη  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη (DIMEB) με σκοπό την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας και επομένως της βιοδιαθεσιμότητας του. Το προϊόν εγκλεισμού *p*-κουμαρικό/DIMEB μελετήθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου και φασματοσκοπία υπεριώδους.

Με τη φασματοσκοπία υπεριώδους παρατηρήθηκε ότι η διαλυτότητα του *p*-κουμαρικού οξέος αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης της DIMEB. Η γραμμικότητα του διαγράμματος διαλυτότητας δείχνει τη δημιουργία στο διάλυμα προϊόντος εγκλεισμού στοιχειομετρίας ξενιστή:ξενιζομένου 1:1 του οποίου η σταθερά σύνδεσης  $K_S$  υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο *Higuchi-Connors* και βρέθηκε ίση με  $192 \text{ M}^{-1}$ .

Από τη σύγκριση των 4 φασμάτων υπέρυθρης ακτινοβολίας (1. *p*-κουμαρικό, 2. DIMEB, 3. μείγμα *p*-κουμαρικού-DIMEB 4. Προϊόν εγκλεισμού *p*-κουμαρικό/DIMEB) παρατηρούνται περιοχές απορρόφησης ενδεικτικές της αλληλεπίδρασης ξενιζομένου/ξενιστή που αποδεικνύουν το σχηματισμό προϊόντος εγκλεισμού στη στερεά κατάσταση.

---

Επίσης, το *p*-κουμαρικό/DIMEB κρυσταλλώθηκε και ακολούθησε συλλογή πειραματικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ από τον μονοκρύσταλλο. Προκαταρκτικά αποτελέσματα αυτής της κρυσταλλογραφικής μελέτης παρουσιάζονται σε αυτήν την εργασία.

Η δομή του προϊόντος εγκλεισμού *p*-κουμαρικό/DIMEB προσδιορίστηκε με υπολογιστικές μεθόδους προσομοίωσης σύνδεσης μοριακών μοντέλων (docking). Η πρόβλεψη της βέλτιστης διαμόρφωσης προκύπτει από υπολογισμούς της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ( $\Delta G$ ), οι οποίοι οδηγούν σε εκτίμηση της σταθερά σύνδεσης  $K_S$ . Η τιμή της  $K_S$  που προσδιορίστηκε υπολογιστικά ( $K_S = 188 \text{ M}^{-1}$ ) βρίσκεται σε πολύ καλή συμφωνία με την τιμή που προέκυψε από το διάγραμμα διαλυτότητας των φασματοσκοπικών μελετών υπεριώδους.

Τέλος, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του *p*-κουμαρικού οξέος σε ελεύθερη μορφή συγκριτικά με το προϊόν εγκλεισμού του σε DIMEB με τη δοκιμή FRAP. Τα πειράματα έδειξαν πως η αντιοξειδωτική δράση του *p*-κουμαρικού οξέος ελαττώνεται παρουσία περίσσειας DIMEB σε σχέση με το *p*-κουμαρικό οξύ σε ελεύθερη μορφή.

---

## ABSTRACT

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides composed of  $\alpha$ -(1,4) linked glucopyranoside units and produced from starch by means of enzymatic conversion. Their most interesting property is the formation of inclusion complexes as their hydrophobic cavity and their hydrophilic exterior make them suitable host molecules for a variety of compounds. The complexation with cyclodextrins leads to beneficial modification of the physicochemical properties of the guest molecule like increase of its solubility, slow release and protection from factors like light or oxidation. Therefore, CDs are widely used in food industry, pharmaceuticals, cosmetics, agriculture and chemical engineering. Apart from the natural CDs, numerous modified CDs made by substituting their hydroxyl groups, have been reported. The modified CDs are designed in order to have enhanced and/or selective inclusion properties. Among them, the derivatives of  $\beta$ -cyclodextrin which are formed by the methylation of their 2,6 [Heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin or DIMEB] and 2,3,6 [Heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)  $\beta$ -cyclodextrin or TRIMEB] hydroxyl groups are noteworthy. These methylated  $\beta$ -cyclodextrins are commercially available and they have particular interest due to their increased water solubility and their flexible hydrophobic cavity.

*p*-Coumaric acid is a hydroxycinnamic acid, an organic compound that is a hydroxy derivative of cinnamic acid. It is an important cell wall constituent of plants and especially of monocotyledons. It exists in many fruits and vegetables and at lignin as well. Frequently it exists in wine in an esterified form. *p*-Coumaric acid has been extensively studied for its antioxidant and anti-inflammatory properties.

In the present work, the inclusion compound of *p*-coumaric acid (*trans*) in DIMEB was formed and characterized. The aim was to increase the water solubility and thus the bio-availability of *p*-coumaric acid.

Using UV-Vis spectroscopy we observed that the solubility of *p*-coumaric acid increases with the increment of the DIMEB concentration in the solution. The linearity of the phase solubility diagram indicates a complex formation with guest:host stoichiometry of 1:1. The value of the stability constant  $K_S$  was calculated equal to  $192 \text{ M}^{-1}$  according to the *Higuchi-Connors* method.

FT-IR spectra were obtained for the lyophilized samples of: 1. *p*-coumaric, 2. DIMEB, 3. Mixture of *p*-coumaric and DIMEB and 4. complex of *p*-coumaric/DIMEB. By comparing these spectra, characteristic absorbance regions indicating the inclusion of *p*-coumaric and the interaction between the host and the guest molecule were observed verifying the formation of the inclusion compound in the solid state.

Additionally, the *p*-coumaric/DIMEB was crystallized and X-ray diffraction data were collected by exposing the single crystal to synchrotron radiation. Preliminary results of this crystallographic study are presented in this work.

A computational estimation of the most probable 3D structure of *p*-coumaric/DIMEB complex is given by using the molecular modeling method of docking. The prediction of the optimal conformation results from the Gibbs free energy ( $\Delta G$ ) calculations, which also lead to the evaluation of the stability constant  $K_S$ . The value of  $K_S$ , which was calculated by computational means ( $K_S = 188M^{-1}$ ), is in a very good agreement with the value estimated by the experimental phase solubility study.

Finally, the effect of the complexation with DIMEB on the antioxidant activity of the *p*-coumaric acid was studied by using the FRAP assay. The experiments showed a clear decrease of the antioxidant activity of the *p*-coumaric acid with the presence of an excess of DIMEB. This result indicates a possible H-bond formation (also indicated by molecular modeling calculations) between the proton donor of the *p*-coumaric acid and one of the DIMEB hydroxyl groups that inhibits the antioxidant activity of the *p*-coumaric acid.

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Ελληνικός όρος	Αγγλικός όρος	Σύντμηση
Κυκλοδεξτρίνες	Cyclodextrins	CDs
2,6-δι- <i>O</i> -μεθυλ-κυκλοδεξτρίνη	2,6-di- <i>O</i> -methyl-cyclodextrin	DIMEB
Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier	Fourier transform infrared spectroscopy	FTIR
Φασματοσκοπία FTIR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης	Diffuse Reflection Infrared Spectroscopy	DRIFTS
Φασματοσκοπία υπεριώδους	Ultraviolet spectroscopy	UV
Σταθερά σύνδεσης	Stability constant	Ks
Οξειδωτική ικανότητα σιδήρου του πλάσματος	Ferric Reducing Ability of Plasma	FRAP
2,4,6-Τρις(2-πυριδυλ)-s-τριαζίνη	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine	TPTZ

## ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ

Ελληνικός όρος	Αγγλικός όρος
Υπερμοριακή Χημεία	Supramolecular Chemistry
Φαινόμενα Εγκλεισμού και Μακροκυκλική Χημεία	Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry
Κρυσταλλογραφία Ακτίνων X	X-ray Crystallography

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΙΑ ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Ελληνικός όρος	Αγγλικός όρος
<i>p</i> -κουμαρικό οξύ	<i>p</i> -coumaric acid
2,6-δι- <i>O</i> -μεθυλ-κυκλοδεξτρίνη	2,6-di- <i>O</i> -methyl-cyclodextrin
Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier	Fourier transform infrared spectroscopy
Φασματοσκοπία υπεριώδους	Ultraviolet spectroscopy
Μελέτη εγκλεισμού με υπολογιστικές μεθόδους	Molecular docking
Προϊόντα εγκλεισμού	Inclusion Complexes
Κρυστάλλωση	Crystallization
---	AutoDock Vina
Οξειδωτική ικανότητα σιδήρου του πλάσματος	Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)



# Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT .....	5
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ .....	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	11
ΣΚΟΠΟΣ.....	12
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	13
Κεφάλαιο 1 .....	14
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ (CDs) .....	14
1.1 Γενικά .....	14
1.2 Ιδιότητες .....	15
1.3 Σχηματισμός προϊόντος εγκλεισμού και διαλυτότητα.....	17
1.4 Μεθυλιωμένα παράγωγα της β-κυκλοδεξτρίνης .....	20
1.5 Εφαρμογές.....	23
1.5.1 Κοσμετική .....	24
1.5.2 Τρόφιμα .....	24
1.5.3 Φαρμακευτική .....	24
1.5.4 Γεωπονικές και χημικές εφαρμογές.....	25
Κεφάλαιο 2 .....	27
p-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ (p-COUMARIC ACID) .....	27
2.1 Γενικά.....	27
2.2 Φυσικές πηγές εύρεσης .....	27
2.3 Βιοσύνθεση.....	28
2.4 Βιοχημεία .....	28
2.5 Εφαρμογές.....	29
Κεφάλαιο 3 .....	30
ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ.....	30
3.1 Γενικά.....	30
3.2 Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και κυκλοδεξτρίνες.....	32
3.3 Κρυστάλλωση.....	32
3.3.1 Γενικά .....	32
3.3.2 Κρυστάλλωση των μεθυλιωμένων κυκλοδεξτρινών.....	33
Κεφάλαιο 4.....	34
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ .....	34

4.1	Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR).....	34
4.1.1	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier.....	34
4.1.2	Οργανολογία .....	35
4.1.3	Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS).....	35
4.1.4	Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR.....	37
4.2	Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού (UV-Vis).....	37
4.2.1	Γενικά .....	37
4.2.2	Οργανολογία .....	38
4.2.3	Εφαρμογές.....	38
<b>Κεφάλαιο 5 .....</b>		<b>39</b>
ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ .....		39
5.1	Γενικά.....	39
5.2	Οξειδωτική ικανότητα σιδήρου του πλάσματος (Ferric Reducing Ability of Plasma - FRAP) .....	40
<b>Π. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>		<b>41</b>
<b>Κεφάλαιο 5 .....</b>		<b>42</b>
5.1	Φασματοσκοπία υπεριώδους (UV spectroscopy).....	42
5.1.1	Παρασκευή διαλυμάτων .....	42
5.1.2	Οργανολογία .....	42
5.2	Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR spectroscopy).....	43
5.2.1	Παρασκευή διαλυμάτων .....	43
5.2.2	Οργανολογία .....	43
5.2.3	Επεξεργασία Φασμάτων.....	43
5.3	Κρυσταλλογραφία .....	43
5.3.1	Μέθοδος της αργής ψύξης για σύμπλοκα της β-κυκλοδεξτρίνης.....	43
5.3.2	Μέθοδος της αργής ψύξης για σύμπλοκα της DIMEB .....	44
5.4	Οξειδωτική ικανότητα σιδήρου του πλάσματος (Ferric Reducing Ability of Plasma - FRAP) .....	45
5.4.1	Παρασκευή αντιδραστηρίων.....	45
5.4.2	Παρασκευή διαλυμάτων.....	45
5.4.3	Σχεδιασμός πρότυπης καμπύλης.....	45
5.4.4	Πειραματική διαδικασία.....	46
5.5	Ανάλυση δομών με το το Vina μέσω των AutoDock Tools.....	46
5.6	Αντιδραστήρια και Διαλύτες .....	47
<b>ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>		<b>48</b>
<b>Κεφάλαιο 6 .....</b>		<b>49</b>
6.1	Φασματοσκοπία υπεριώδους (UV spectroscopy).....	49
6.1.1	Φάσματα απορρόφησης.....	49
6.1.2	Διαγράμματα διαλυτότητας (Phase-solubility diagrams).....	50
6.2	Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR spectroscopy).....	52

---

6.3	Οξειδωτική ικανότητα σιδήρου του πλάσματος (Ferric Reducing Ability of Plasma - FRAP) .....	54
6.4	Κρυσταλλογραφία του προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/p-κουμαρικού οξέος.....	55
6.4.1	<i>Κρυστάλλωση προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/p-κουμαρικού οξέος.....</i>	55
6.4.2	<i>Συλλογή δεδομένων περίθλασης – προκαταρκτικά αποτελέσματα .....</i>	55
6.5	In silico μελέτη της δομής του προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/p-κουμαρικού οξέος... 57	
<b>IV.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>62</b>
<b>V.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>65</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1</b>	<b>.....</b>	<b>71</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2</b>	<b>.....</b>	<b>72</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο Εργαστήριο Φυσικής υπό την άμεση επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή Μπεθάνη Κωνσταντίνου στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων». Τμήματα της πειραματικής διαδικασίας διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας του ίδιου πανεπιστημίου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή Μπεθάνη Κωνσταντίνο για την επιλογή του θέματος, το συνεχές ενδιαφέρον του για την πορεία του πειραματικού μέρους της εργασίας αλλά και για την κατανόηση του θεωρητικού πλαισίου μέσα στο οποίο εντάσσεται η συγκεκριμένη μελέτη.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη των εργαστηρίων φυσικής και χημείας για την πολύτιμη καθοδήγησή τους όσον αφορά την εξοικείωση μου με τον εργαστηριακό χώρο αλλά και με το αντικείμενο της παρούσας εργασίας καθώς επίσης και την εξεταστική επιτροπή.

Τέλος ευχαριστώ τον Κωστούδη Δημήτριο από το site <http://e-tutorials.gr/> για την επιμέλεια του εξωφύλλου της μελέτης.

## ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζεται ο σχηματισμός και ο χαρακτηρισμός του προϊόντος εγκλεισμού του *p*-κουμαρικού οξέος σε διμεθυλωμένη κυκλοδεξτρίνη (DIMEB).

Το *p*-κουμαρικό οξύ βρίσκεται σε πολλά λαχανικά και φρούτα καθώς επίσης στη λιγνίνη και στο κρασί σε εστεροποιημένη μορφή. Έχει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες για τις ιδιότητές του αυτές. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαριτες των οποίων η υδρόφοβη κοιλότητα και το υδρόφιλο εξωτερικό τις καθιστά κατάλληλα μόρια ξενιστές για τον εγκλεισμό διαφόρων ενώσεων. Η  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη αλλά έχει σχετικά χαμηλή υδατοδιαλυτότητα. Οι μεθυλωμένες κυκλοδεξτρίνες, που προκύπτουν από την υποκατάσταση των υδροξυλομάδων με μεθύλιομαδες, έχουν πιο ευέλικτη υδρόφοβη κοιλότητα και σημαντικά μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα.

Ο σχηματισμός και η μελέτη του προϊόντος εγκλεισμού του *p*-κουμαρικού οξέος (*trans*) σε κυκλοδεξτρίνη γίνεται στην εργασία αυτή με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας και την αργή απελευθέρωση του *p*-κουμαρικού οξέος ώστε να βελτιωθεί η βιοδιαθεσιμότητά του.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε ο εγκλεισμός του *p*-κουμαρικού οξέος σε DIMEB. Για το χαρακτηρισμό του προϊόντος εγκλεισμού στο διάλυμα έγινε μελέτη της μεταβολής της διαλυτότητας του *p*-κουμαρικού παρουσία DIMEB με φασματοσκοπία UV από την οποία προκύπτει και εκτίμηση της σταθεράς σύνδεσης  $K_S$  του προϊόντος εγκλεισμού. Χαρακτηρισμός του προϊόντος εγκλεισμού στη στερεά κατάσταση έγινε με φασματοσκοπία FT-IR. Το *p*-κουμαρικό /DIMEB σχηματίστηκε επίσης, στην κρυσταλλική κατάσταση για τη δομική του ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Για την πρόβλεψη της βέλτιστης διαμόρφωσης του προϊόντος εγκλεισμού *p*-κουμαρικό/DIMEB χρησιμοποιήθηκαν υπολογιστικές μέθοδοι προσομοίωσης σύνδεσης μοριακών μοντέλων (docking). Σύμφωνα με τις μεθόδους αυτές υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια Gibbs ( $\Delta G$ ) και επομένως μια τιμή της σταθεράς σύνδεσης  $K_S$  η σύγκριση της οποίας με την πειραματικά προσδιορισμένη τιμή είναι ενδεικτική της ευστοχίας της εφαρμογής αυτών των υπολογιστικών μεθόδων. Τέλος πραγματοποιήθηκε μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας του προϊόντος εγκλεισμού του *p*-κουμαρικού οξέος σε DIMEB.

# **I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

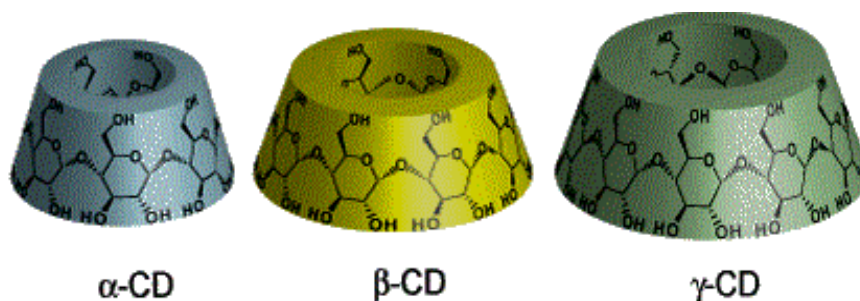
## Κεφάλαιο 1

### ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ (CDs)

#### 1.1 Γενικά

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι από έξι, επτά ή οκτώ μονάδες γλυκοπυρανόζης στην  $\alpha$ -κυκλοδεξτρίνη, στη  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη και στη  $\gamma$ -κυκλοδεξτρίνη αντίστοιχα, οι οποίες συνδέονται με  $\alpha$ -(1,4) δεσμούς (βλ. εικόνα 1,2). Είναι επίσης γνωστές με τις ονομασίες κυκλοαμυλόζης, κυκλομαλτόζης και δεξτρίνες Schardinger<sup>1</sup>. Παράγονται ως αποτέλεσμα μιας αντίδρασης τρανσγλυκοσυλίωσης από το άμυλο μέσω του ενζύμου γλυκοτρανσφεράση (CGTase)<sup>2</sup>.

Ανακαλύφθηκαν το 1891, όταν επιπροσθέτως των αναγωγικών δεξτρινών λήφθηκε μια μικρή ποσότητα ενός κρυσταλλικού υλικού από την πέψη του αμύλου του *Bacillus amylobacter*, όπου σχηματίστηκε σε πολύ μικρές ποσότητες (περίπου 3g/kg αμύλου) ένας υδρογονάνθρακας που σχημάτιζε όμορφους ακτινοβόλους κρυστάλλους έπειτα από παραμονή στην αλκοόλη από την οποία οι δεξτρίνες καθίζαναν. Η σύνθεσή του αντιπροσωπεύτηκε από μια πολλαπλότητα του τύπου  $(C_6H_{10}O_5) \cdot 3H_2O$ . Σύμφωνα με άλλους συγγραφείς, ο Villiers πιθανότατα να χρησιμοποίησε μη καθαρές καλλιέργειες και οι κυκλοδεξτρίνες παρήχθησαν από μια μόλυνση με *Bacillus macerans*. Το 1903, ο Schardinger κατόρθωσε να απομονώσει δύο κρυσταλλικά προϊόντα, τις δεξτρίνες Α και Β, οι οποίες περιγράφηκαν σύμφωνα με την αδυναμία τους να ανάγουν. Δυστυχώς το βακτηριακό στέλεχος που έχει την ικανότητα να παράγει αυτά τα προϊόντα δε διατηρήθηκε.

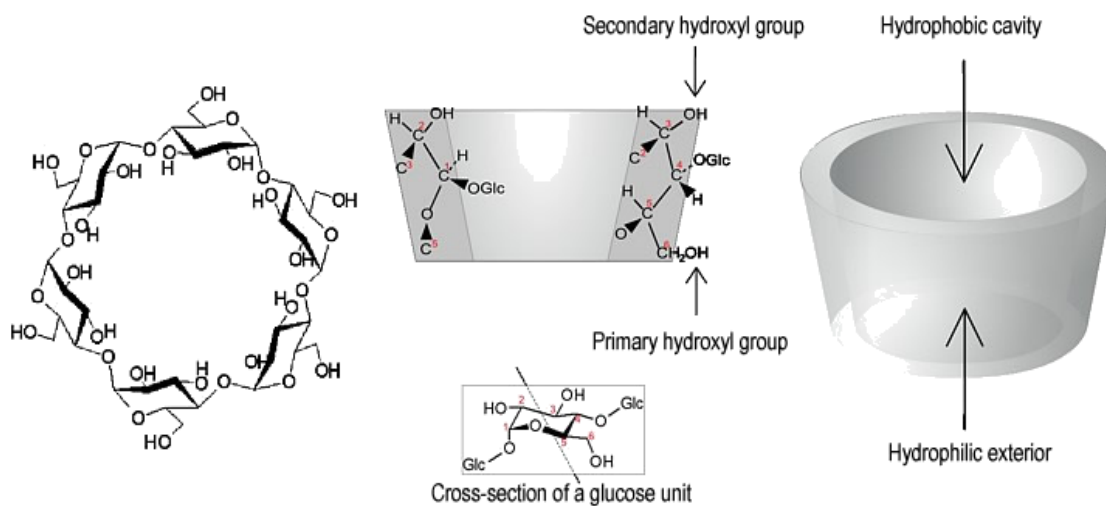


**Εικόνα 1:** Δομή της  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ -κυκλοδεξτρίνης.

Το 1904, ο Schardiger<sup>1</sup> απομόνωσε ένα νέο οργανισμό ικανό να παράγει ακετόνη και αιθυλική αλκοόλη από φυτικό υλικό που περιέχει ζάχαρη και άμυλο. Το 1911 περιέγραψε ότι αυτό το στέλεχος, που καλείται *Bacillus macerans*, παράγει επίσης μεγάλη ποσότητα κρυσταλλικών δεξτρινών (25-30%) από άμυλο. Ο Schardiger ονόμασε τα κρυσταλλικά του προϊόντα "κρυσταλλοποιημένη δεξτρίνη  $\alpha$ " και "κρυσταλλοποιημένη δεξτρίνη  $\beta$ ". Η  $\gamma$ -κυκλοδεξτρίνη δεν απομονώθηκε πριν το 1935. Το 1942 οι δομές της  $\alpha$ - και  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης καθορίστηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X<sup>3</sup>. Το 1948, ακολούθησε η δομή ακτίνων X της  $\gamma$ -κυκλοδεξτρίνης

και αναγνωρίστηκε ότι οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να σχηματίσουν προϊόντα εγκλεισμού. Το 1961, παρεσχέθη ένδειξη για τη φυσική ύπαρξη δ-, ζ-, ξ- και ακόμη και η-κυκλοδεξτρίνης (9-12 υπολειμματικά μόρια γλυκόζης). Οι κυκλοδεξτρίνες με λιγότερες από έξι γλυκοζιτικές μονάδες είναι πολύ τεταμένες για να υπάρχουν ως φυσικά απαντώμενα μόρια, ενώ εκείνες που έχουν περισσότερες από οκτώ γλυκοζιτικές μονάδες είναι πολύ διαλυτές με αποτέλεσμα να είναι δυσκολότερο να απομονωθούν και να μελετηθούν<sup>4</sup>. Το κυρίως ενδιαφέρον στις κυκλοδεξτρίνες έγκειται στην ικανότητά τους να σχηματίζουν προϊόντα εγκλεισμού με διάφορες ενώσεις<sup>5</sup>. Ο περιορισμός της ελεύθερης περιστροφής των δεσμών που συνδέουν της μονάδες γλυκοκυρανόζης είναι η αιτία που οι κυκλοδεξτρίνες δε είναι απόλυτα κυλινδρικά μόρια αλλά κωνικά<sup>6</sup>. Από τις δομές των ακτίνων X φαίνεται ότι στις κυκλοδεξτρίνες οι ομάδες δευτεροταγών ομάδων υδροξυλίων (C2 και C3) είναι τοποθετημένες στην ευρύτερη άκρη του δακτυλίου και οι ομάδες πρωτοταγών υδροξυλίων (C6) στην άλλη άκρη. Τα μη πολικά υδρογόνα C3 και C5 και τα αιθερικά οξυγόνα είναι στο εσωτερικό των μορίων. Τα παραπάνω οδηγούν σε ένα μόριο με υδρόφιλο εξωτερικό, που μπορεί να διαλυθεί σε νερό, και μια μη πολική κοιλότητα, που παρέχει ένα υδρόφοβο εσωτερικό και περιγράφεται ως ένα μικρό ετερογενές περιβάλλον<sup>7</sup>.

Ως αποτέλεσμα αυτής της κοιλότητας, οι κυκλοδεξτρίνες είναι ικανές να σχηματίσουν προϊόντα εγκλεισμού με μια ευρεία ποικιλία υδρόφοβων μορίων ξενιστών. Ένα ή δύο μόρια ξενιστές μπορούν να εγκλεισθούν από ένα, δύο ή τρία μόρια κυκλοδεξτρίνης.



**Εικόνα 2:** Μοριακή δομή της  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης, το cross-section ενός μορίου κυκλοδεξτρίνης δείχνει την οργάνωση μιας γλυκοζιτικής μονάδας και η κωνική αναπαράσταση δείχνει το υδρόφιλο εξωτερικό και το υδρόφοβο εσωτερικό της.

## 1.2 Ιδιότητες

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι τριών τύπων,  $\alpha$ -κυκλοδεξτρίνη,  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη και  $\gamma$ -κυκλοδεξτρίνη και αναφέρονται ως κυκλοδεξτρίνες πρώτης γενιάς ή γονικές κυκλοδεξτρίνες. Η  $\alpha$ -κυκλοδεξτρίνη αποτελείται από έξι υπολειμματικά μόρια γλυκόζης ενώ η  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη από



επτά και η  $\gamma$ -κυκλοδεξτρίνη από οκτώ. Η πιο ευρέως διαδεδομένη, χαμηλού κόστους και γενικά πιο χρήσιμη κυκλοδεξτρίνη είναι η  $\beta^8$ . Επιπλέον η  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη είναι και μη τοξική για δια στόματος λήψη<sup>9</sup>. Οι μελέτες κυκλοδεξτρινών σε διάλυμα υποστηρίζονται από ένα μεγάλο αριθμό μελετών κρυσταλλικών δομών. Οι κυκλοδεξτρίνες κρυσταλλώνουν με δύο τρόπους μοριακής συσκευασίας, τις δομές καναλιού και τις δομές κελιού, ανάλογα με τον τύπο της κυκλοδεξτρίνης και του ξενιζόμενου μορίου. Αυτές οι κρυσταλλικές δομές δείχνουν ότι οι κυκλοδεξτρίνες σε προϊόντα εγκλεισμού υιοθετούν την αναμενόμενη κυκλική δομή με όλες τις μονάδες γλυκοπυρανόζης σε μορφή ανακλίντρου  ${}^4C_1$ . Επιπλέον, μελέτες με γραμμικές μαλτοεξόζες, που σχηματίζουν μια αντιπαράλληλη διπλή έλικα, δείχνουν ότι η  $\alpha$ -κυκλοδεξτρίνη είναι η μορφή στην οποία η στερική τάση εξαιτίας της κυκλοποίησης είναι ελάχιστη ενώ στη  $\gamma$ -κυκλοδεξτρίνη η τάση είναι μέγιστη<sup>2</sup>.

**Πίνακας 1:** Μερικές από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των κυκλοδεξτρινών<sup>4</sup>

property	cyclodextrin		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
no. glucose units	6	7	8
empirical formula (anhydrous)	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
mol wt (anhydrous)	972.85	1134.99	1297.14
cavity length, Å	8	8	8
cavity diameter, Å (approx)	~5.2	~6.6	~8.4
$\alpha_D$ , deg	+150.5	+162.0	+177.4
heat capacity (anhyd solid), J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	1153	1342	1568
heat capacity (infinite diln), J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	1431	1783	2070
pK <sub>a</sub> (25°)	12.33	12.20	12.08
$\Delta H^\circ$ (ionization), kcal mol <sup>-1</sup>	8.36	9.98	11.22
$\Delta S^\circ$ (ionization), cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	-28.3	-22.4	-17.6
solubility (water, 25°), mol L <sup>-1</sup>	0.1211	0.0163	0.168
$\Delta H^\circ$ (solution), kcal mol <sup>-1</sup>	7.67	8.31	7.73
$\Delta S^\circ$ (solution), cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	13.8 <sup>a</sup>	11.7 <sup>a</sup>	14.7 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Mole fraction standard state.

Πολλές από τις τιμές στον πίνακα 1 δείχνουν μία φανερή ομαλή τάση στην  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ -κυκλοδεξτρίνη. Οι pK<sub>a</sub>, οι τιμές ενθαλπίας και εντροπίας του ιονισμού και η ικανότητα θέρμανσης συμπεριφέρονται με αυτόν τον τρόπο. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι διαλυτές στο νερό και έχουν περιβαλλοντικά συμβατές χημικές ιδιότητες<sup>10</sup>. Η συμπεριφορά στη διαλυτότητα είναι πολύ διαφορετική, με όλες τις κυκλοδεξτρίνες να είναι λιγότερο διαλυτές από τα άκυκλα σάκχαρα και η  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη να είναι φανερά μία "ανωμαλία" ανάμεσα στις κυκλοδεξτρίνες. Η θερμοδυναμική του διαλύματος δείχνει πως η σχετικά χαμηλή διαλυτότητα της  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης σχετίζεται με τη λιγότερο ευνοϊκή  $\Delta H$  και  $\Delta S$ . Αυτά τα αποτελέσματα της διαλυτότητας είναι ένα μέρος της πληροφορίας που προτείνει ότι οι κυκλοδεξτρίνες μπορεί να μη συμπεριφέρονται καθολικά ως μονότονες σειρές<sup>4</sup>. Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας, συμπεριλαμβανομένων την προσθήκη ουρίας<sup>11</sup>, μεταλλικών αλάτων<sup>12</sup>, αιθανόλης και 2-προπανόλης και επίσης έχουν μελετηθεί και οι επιδράσεις διαφόρων άλλων διαλυτών<sup>13</sup>.

Πέραν των φυσικά απαντώμενων κυκλοδεξτρινών έχουν συντεθεί πολλά παράγωγα κυκλοδεξτρινών. Αυτά τα παράγωγα συνήθως παράγονται με αμινώσεις, εστεροποιήσεις ή αιθεροποιήσεις των πρωτοταγών και δευτεροταγών υδροξυλικών ομάδων των κυκλοδεξτρινών.

Ανάλογα με τον υποκαταστάτη, η διαλυτότητα των παραγώγων κυκλοδεξτρινών είναι διαφορετική από εκείνη των αρχικών κυκλοδεξτρινών. Εικονικά όλα τα παράγωγα έχουν έναν αλλαγμένο όγκο της υδρόφοβης κοιλότητας και επίσης αυτές οι αλλαγές μπορούν να βελτιώσουν την διαλυτότητα, τη σταθερότητα κατά την έκθεση σε φως ή οξυγόνο και μπορούν να βοηθήσουν στον έλεγχο της χημικής δραστηριότητας των μορίων ξενιστών<sup>8</sup>.

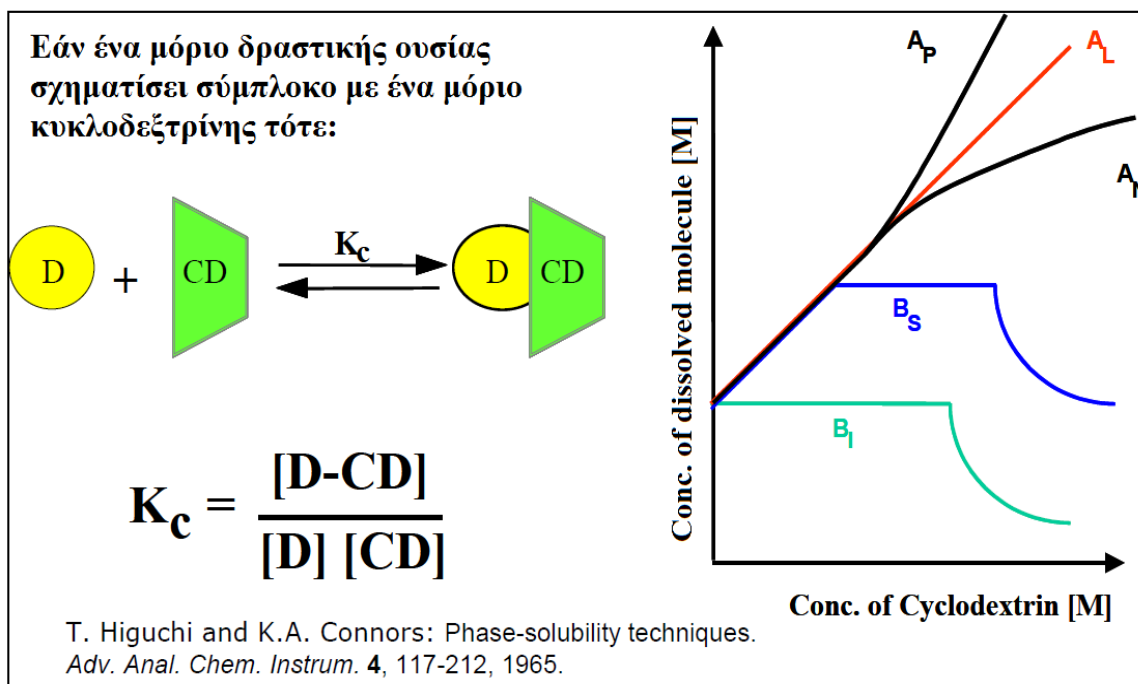
Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται συχνά ως οικοδομικοί λίθοι. Πάνω από είκοσι συστατικά έχουν συνδεθεί με τη β-κυκλοδεξτρίνη με έναν τοποεπιλεκτικό τρόπο. Η σύνθεση ομοιόμορφων παραγώγων κυκλοδεξτρίνης απαιτεί τοποειδικά αντιδραστήρια, βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης και καλό διαχωρισμό των προϊόντων. Η πιο συχνά μελετώμενη αντίδραση είναι η ηλεκτρονιόφιλη προσβολή στις υδροξυλομάδες, ο σχηματισμός αιθέρων και εστέρων με αλκυλαλογονίδια, εποξειδία, ακυλ- παράγωγα, ισοκτανίδια και με παράγωγα ανόργανων οξέων καθώς το σπάσιμο των δεσμών C-OH με χλωρίδιο σουλφονικού οξέος έχει μελετηθεί αρκετά, συμπεριλαμβάνοντας μια νουκλεόφιλη προσβολή από ενώσεις όπως ιόντα αζιδίου, ιόντα αλογονιδίων, θειόλες, θειουρία και αμίνες<sup>2</sup>.

Εξαιτίας της ικανότητας τους να συνδέονται ομοιοπολικά και μη ομοιοπολικά με άλλες κυκλοδεξτρίνες, οι CDs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή υπερμοριακών συμπλόκων. Η ικανότητά τους να δημιουργούν προϊόντα εγκλεισμού με το ξενιζόμενο μόριο της δραστικής ουσίας προσφέρει πιθανότητες να δημιουργηθούν υπερμοριακά νήματα<sup>2</sup>.

### 1.3 Σχηματισμός προϊόντος εγκλεισμού και διαλυτότητα

Σε υδατικά διαλύματα οι κυκλοδεξτρίνες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με πολλά φάρμακα και γενικά διάφορους ξενιστές, λαμβάνοντας ένα μόριο φαρμάκου ή πιο συχνά μια λιπόφιλη μειοψηφία του μορίου, στο εσωτερικό της κεντρικής κοιλότητας. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του προϊόντος εγκλεισμού ούτε σχηματίζονται ούτε σπάνε ομοιοπολικοί δεσμοί και τα μόρια του ξενιζόμενου μορίου της δραστικής ουσίας στο προϊόν εγκλεισμού είναι σε ταχεία ισορροπία με τα ελεύθερα μόρια στο διάλυμα. Οι δυνάμεις που οδηγούν στο σχηματισμό του προϊόντος εγκλεισμού περιλαμβάνουν απελευθέρωση μορίων νερού από τη κοιλότητα, τα οποία είναι πλούσια σε ενθαλπία, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, αλληλεπιδράσεις van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου, απελευθέρωση του στελέχους διαμόρφωσης και αλληλεπιδράσεις μεταφοράς φορτίου. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ελεύθερων ξενιζόμενων μορίων της δραστικής ουσίας είναι διαφορετικές από εκείνων που είναι δεμένα στα μόρια της κυκλοδεξτρίνης. Ομοίως, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ελεύθερων μορίων κυκλοδεξτρινών είναι διαφορετικές από εκείνων στο προϊόν εγκλεισμού. Σε θεωρητικό επίπεδο, οποιαδήποτε μεθοδολογία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρατήρηση αυτών των αλλαγών στις πρόσθετες φυσικοχημικές ιδιότητες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίσει τη στοιχειομετρία των σχηματιζόμενων προϊόντων εγκλεισμού και τις αριθμητικές τιμές των σταθερών ισορροπίας. Τα παραπάνω περιλαμβάνουν αλλαγές στη διαλυτότητα, αλλαγές στη χημική αντιδραστικότητα, αλλαγές στην απορρόφηση UV/Vis, αλλαγές στο φθορισμό, χημικές μετατοπίσεις NMR, αλλαγές στην κατακράτηση ξενιζόμενο μόριο της δραστικής ουσίας, αλλαγές στις τιμές pK<sub>a</sub>, ποτενσιομετρικές μετρήσεις, αλλαγές στη χημική διαλυτότητα και επιδράσεις στην διαπερατότητα των φαρμάκων

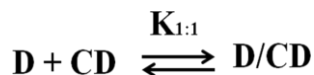
διαμέσου τεχνητών μεμβρανών. Επιπλέον, εξαιτίας του ότι ο εγκλεισμός θα επηρεάσει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του υδατικού μέσου εγκλεισμού, μπορούν να εφαρμοστούν μέθοδοι που παρακολουθούν αυτές τις αλλαγές του μέσου με σκοπό τη μελέτη του προϊόντος εγκλεισμού. Παρόλαυτά, μόνο μερικές από αυτές τις μεθόδους μπορούν να εφαρμοστούν για την απόκτηση δομικών πληροφοριών όσον αφορά τα προϊόντα εγκλεισμού ξενιζόμενο μόριο της δραστικής ουσίας/κυκλοδεξτρίνης.



**Εικόνα 3:** Σχέσεις διαλυτότητας φάσεων (Phase solubility)

Οι *Higuchi* και *Connors* κατηγοριοποίησαν τα σύμπλοκα βασιζόμενοι στην επίδρασή τους στην διαλυτότητα του υποστρώματος. Τα προφίλ της διαλυτότητας τύπου A, σύμφωνα με την *εικόνα 3*, λαμβάνονται όταν η διαλυτότητα του υποστρώματος (δηλαδή του ξενιζόμενου μορίου της δραστικής ουσίας) αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του προσδέτη (δηλαδή της κυκλοδεξτρίνης). Όταν το προϊόν εγκλεισμού είναι πρώτης τάξης σύμφωνα με τον προσδέτη και πρώτης ή υψηλότερης τάξης σύμφωνα με το υπόστρωμα τότε λαμβάνεται ένα προφίλ της διαλυτότητας τύπου  $A_L$ . Εάν το προϊόν εγκλεισμού είναι πρώτης τάξης σύμφωνα με το υπόστρωμα αλλά δεύτερης ή υψηλότερης τάξης σύμφωνα με τον προσδέτη τότε λαμβάνεται ένα προφίλ της διαλυτότητας τύπου  $A_P$ . Τα προφίλ του τύπου  $A_N$  μπορεί να παρουσιάσουν δυσκολία στην ερμηνεία τους. Τα προφίλ B της διαλυτότητας δείχνουν σχηματισμό προϊόντων εγκλεισμού με περιορισμένη διαλυτότητα στο υδατικό διάλυμα εγκλεισμού. Γενικά, τα υδατοδιαλυτά παράγωγα της κυκλοδεξτρίνης είναι από τα προφίλ τύπου A, ενώ οι λιγότερο διαλυτές φυσικές κυκλοδεξτρίνες είναι από τα προφίλ τύπου B. Η πλειοψηφία των προϊόντων εγκλεισμού ξενιζόμενο μόριο της δραστικής ουσίας/κυκλοδεξτρίνης θεωρούνται σύμπλοκα εγκλεισμού αλλά είναι επίσης γνωστό ότι οι κυκλοδεξτρίνες σχηματίζουν σύμπλοκα χωρίς εγκλεισμό και πολύπλοκα συσσωματώματα ικανά να διαλυτοποιήσουν μόρια μέσω δομών τύπου μυκηλίου. Τα προφίλ της διαλυτότητας δεν επιβεβαιώνουν το σχηματισμό των προϊόντων εγκλεισμού. Η

χρησιμότητα των παραπάνω είναι το ότι περιγράφουν πως η αυξανόμενη συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης επηρεάζει τη διαλυτότητα των ξενιστών μορίων. Το πιο σύνηθες προϊόν εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης είναι 1:1 ξενιζόμενο μόριο της δραστικής ουσίας/κυκλοδεξτρίνη (D/CD) όπου ένα ξενιζόμενο μόριο της δραστικής ουσίας (D) σχηματίζει ένα προϊόν εγκλεισμού με ένα μόριο κυκλοδεξτρίνης (CD):



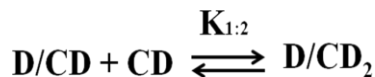
Υπό τέτοιες συνθήκες θα παρατηρούνταν ένα διάγραμμα διαλυτότητας τύπου  $A_L$ , με κλίση λιγότερη από τη μονάδα και η σταθερά σύνδεσης ( $K_{1:1}$ ) του προϊόντος εγκλεισμού μπορεί να υπολογιστεί από τη κλίση και την εγγενή διαλυτότητα ( $S_0$ ) του μορίου της δραστικής ουσίας εγκλεισμού (δηλαδή τη διαλυτότητα του μορίου της δραστικής ουσίας όταν δεν είναι παρούσα η κυκλοδεξτρίνη):

$$K_{1:1} \xrightleftharpoons{\text{Slope}} \frac{\text{Slope}}{S_0(1-\text{Slope})}$$

Η τιμή της  $K_{1:1}$  είναι συνήθως ανάμεσα στα 50 και 2000  $M^{-1}$  με μία μέση τιμή 129, 490 και 355  $M^{-1}$  για την  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ -κυκλοδεξτρίνη αντίστοιχα<sup>4</sup>. Από τα προϊόντα εγκλεισμού ξενιζόμενο μόριο/κυκλοδεξτρίνη η αποδοτικότητα του εγκλεισμού (CE) μπορεί να υπολογιστεί από τη κλίση του διαγράμματος διαλυτότητας:

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

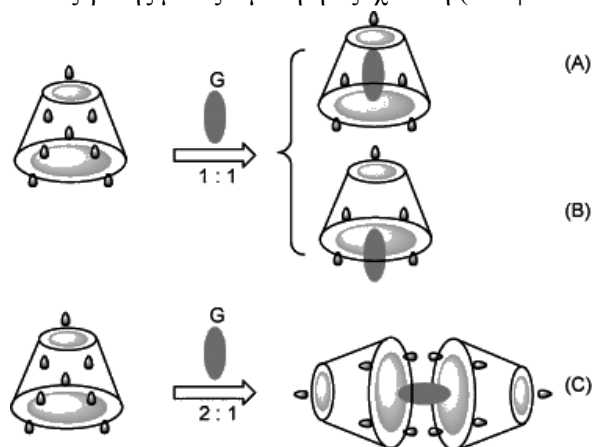
Η επιλογή κυκλοδεξτρίνης ή συνθηκών εγκλεισμού κατά τη διάρκεια της εργασίας της διατύπωσης συχνά μπορεί να είναι ευκολότερο να συγκριθεί οι τιμές CE από τις  $K_{1:1}$ . Η πιο κοινή στοιχειομετρία υψηλότερης τάξης προϊόντος εγκλεισμού ξενιζόμενου/κυκλοδεξτρίνης είναι η 1:2 ξενιζόμενο/κυκλοδεξτρίνη καταλήγοντας σε καμπύλη τύπου  $A_p$  στο διάγραμμα διαλυτότητας φάσης. Όπου υπάρχει σχηματισμός προϊόντος εγκλεισμού 1:2 θεωρείται συνεχής εγκλεισμός όταν ένα επιπλέον μόριο κυκλοδεξτρίνης σχηματίζει προϊόν εγκλεισμού με ένα υπάρχον προϊόν εγκλεισμού 1:1 :



Η τιμή της  $K_{1:2}$  είναι συχνά ανάμεσα σε 10 και 500  $M^{-1}$ , ή σημαντικά χαμηλότερη από την  $K_{1:1}$ .

Σε διάλυμα, τα σύμπλοκα κυκλοδεξτρίνης συνήθως προετοιμάζονται με προσθήκη περίσσειας ξενιζόμενου μορίου της δραστικής ένωσης σε ένα υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης. Το εναιώρημα που προκύπτει ισορροπείται στην επιθυμητή θερμοκρασία (το οποίο μπορεί να απαιτεί διάστημα έως και μία βδομάδα) και έπειτα φιλτράρεται ή φυγοκεντρείται για να

σχηματιστεί καθαρό ξενιζόμενο μόριο/κυκλοδεξτρίνη προϊόν εγκλεισμού στο διάλυμα. Για την προετοιμασία στερεών προϊόντων εγκλεισμού, το νερό αφαιρείται από το υδατικό διάλυμα ξενιζόμενου μορίου/κυκλοδεξτρίνης με εξάτμιση ή εξάχνωση (λυοφιλίωση)<sup>14,15</sup>.



**Εικόνα 4:** Σχηματική αναπαράσταση τριών ειδών από τις πιο συχνές περιπτώσεις εγκλεισμού ανάμεσα σε κυκλοδεξτρίνες και ξενιζόμενα μόρια<sup>16</sup>.

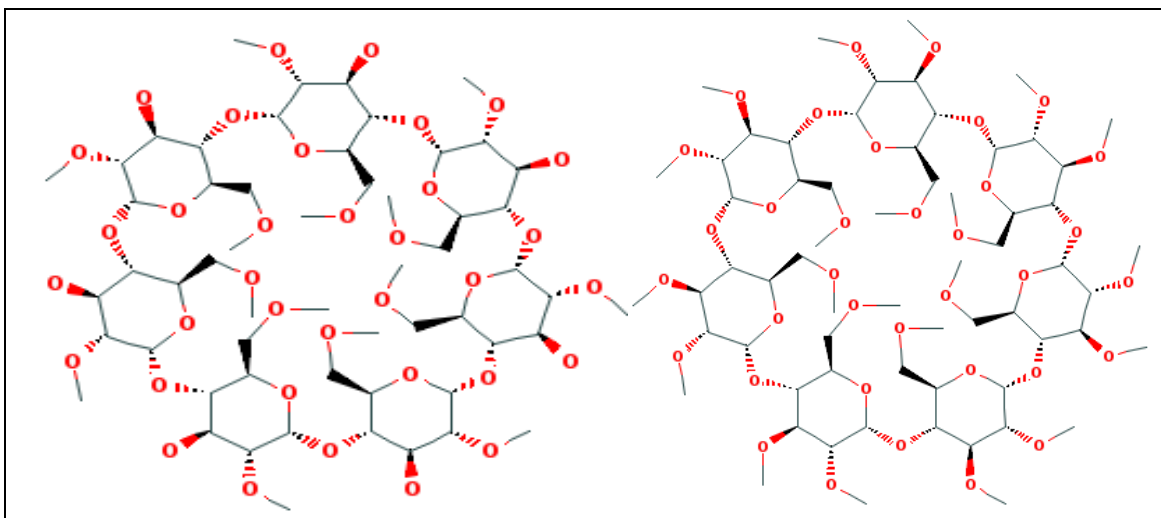
#### 1.4 Μεθυλωμένα παράγωγα της $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης

Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να τροποποιηθούν χημικά, κυρίως με υποκατάσταση των υδροξυλικών ομάδων τους. Τα υδροξύλια χαρακτηρίζονται από διαφορετικές δραστηριότητες και μπορούν να υποκατασταθούν επιλεκτικά. Με υποκαταστάτες που διαφέρουν, η διαλυτότητα και επιλεκτικότητα σχηματισμού προϊόντος εγκλεισμού των τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών μπορεί να ελεγχθεί. Η προετοιμασία και οι ιδιότητες χιλιάδων παραγώγων κυκλοδεξτρινών έχει ήδη δημοσιευτεί, δίνοντας ιδέες για το πως μπορούν να δημιουργηθούν παράγωγα που να επιλύουν διάφορα προβλήματα<sup>17</sup>.

Η  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη παρόλο που είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη, φαίνεται πως υστερεί σε διαλυτότητα σε σχέση με τις μεθυλωμένες κυκλοδεξτρίνες<sup>18</sup>. Οι προμεθυλωμένες κυκλοδεξτρίνες, που προκύπτουν από την υποκατάσταση των υδροξυλομάδων με μεθόξυ ομάδες, έχουν την ικανότητα να εγκλείουν διάφορα μόρια που δε μπορούν να εγκλειστούν στη κοιλότητα των φυσικά απαντώμενων κυκλοδεξτρινών διότι έχουν βαθύτερη και πιο ευέλικτη υδρόφοβη κοιλότητα<sup>19</sup>. Ο μέσος όρος των υποκατεστημένων υδροξυλίων ανά μονάδα γλυκοπυρανόζης του δακτυλίου της κυκλοδεξτρίνης λέγεται και βαθμός της υποκατάστασης (Degree of substitution, DS). Αφού ο αριθμός των αντιδρώντων υδροξυλίων ανά mole μονάδας γλυκοπυρανόζης είναι 3, ο μέγιστος βαθμός υποκατάστασης για τη  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη είναι 21<sup>20</sup>. Με την αύξηση του βαθμού της μεθυλίωσης η διαλυτότητα των  $\beta$ -κυκλοδεξτρινών (σε κρύο νερό) αυξάνεται μέχρι όταν περίπου τα 2/3 όλων των υδροξυλίων έχουν μεθυλωθεί και μετά μειώνεται ξανά. Επομένως η κυκλοδεξτρίνη που έχει τα 14 υδροξυλία της μεθυλωμένα παρουσιάζει την υψηλότερη διαλυτότητα, ενώ εκείνη με τα 21 έχει μειωμένη διαλυτότητα. Εντούτοις, ακόμη και η κυκλοδεξτρίνη που έχει 21 μεθυλωμένα υδροξύλια είναι πιο διαλυτή από εκείνη που δεν είναι καθόλου υποκατεστημένη. Η μακροκυκλική δομή της  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης δεν επηρεάζεται από τη

μεθυλίωση των O2H υδροξυλικών ομάδων, διότι οι ενδομοριακοί O3H-O2 υδρογονικοί δεσμοί διατηρούν το σχήμα του μορίου και οι μεθυλομάδες δείχνουν προς τα έξω από το δακτύλιο<sup>21</sup>. Η περαιτέρω εισαγωγή μεθυλομάδων στις O6H υδροξυλομάδες αυξάνει το βάθος της κοιλότητας περίπου 1Å σε σύγκριση με την κοιλότητα των φυσικών κυκλοδεξτρινών, παρόλο που η διάμετρος της κοιλότητας δεν αλλάζει. Λόγω του ότι η διαλυτότητα των μεθυλιωμένων κυκλοδεξτρινών συσχετίζεται αρνητικά με τη θερμοκρασία, οι κυκλοδεξτρίνες αυτές είναι λιγότερο διαλυτές σε υψηλότερη θερμοκρασία. Εξαιτίας των παραπάνω οι μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες και τα σύμπλοκά τους έχουν κρυσταλλοποιηθεί κυρίως σε θερμοκρασίες από 30°C έως 50°C<sup>22</sup>.

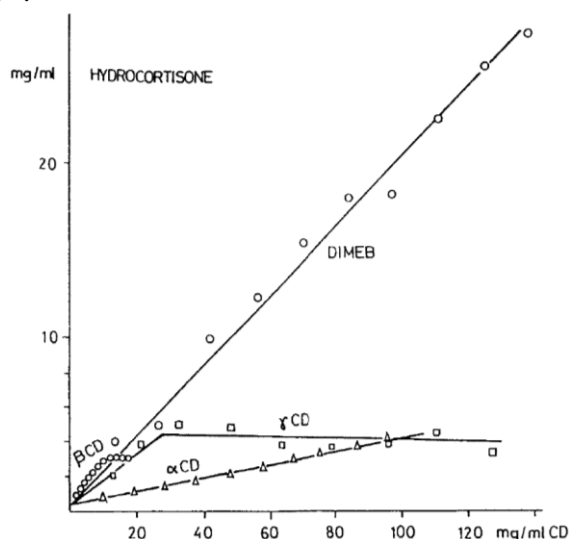
Η μεθυλίωση όλων των υδροξυλομάδων αυξάνει το βάθος της κοιλότητας περίπου 1.5 Å αλλά τέτοιες κυκλοδεξτρίνες δε διατηρούν το κυκλικό σχήμα λόγω στερικής αποτροπής και διατάραξης των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου των δευτεροταγών υδροξυλομάδων ανάμεσα στις παρακείμενες γλυκοζιτικές μονάδες<sup>22</sup>. Οι ετερογενείς, μερικώς μεθυλιωμένες β-κυκλοδεξτρίνες είναι εφαρμόσιμες για πολλούς πρακτικούς σκοπούς. Για συγκεκριμένους τομείς όπως είναι η φαρμακευτική, μπορούν να ληφθούν υπόψη μόνο δύο καλά προσδιορισμένες ενώσεις: οι διμεθυλ- και τριμεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνες. Η πλήρης ονομασία τους είναι επτάκις-(2,6-δι-Ο-μεθυλ-) και η επτάκις-(2,3,6-τρι-Ο-μεθυλ)-β-κυκλοδεξτρίνη, οι οποίες έχουν σα συντομογραφίες DIMEB και TRIMEB αντίστοιχα (βλ. εικόνα 5). Ένας αριθμός αδιάλυτων ή ανεπαρκώς διαλυόμενων ενώσεων και φαρμάκων μπορεί να διαλυτοποιηθεί σε υδατικό διάλυμα



**Εικόνα 5:** Χημική δομή της DIMEB (αριστερά) και της TRIMEB (δεξιά)

με DIMEB<sup>18</sup>, δηλαδή η διαλυτότητα των στεροειδών αυξάνεται σε ένα συντελεστή 40-1200. Είναι δυνατό να παραχθεί υδατικό διάλυμα DIMEB 10% που περιέχει 13 mg/mL προγεστερόνη ή 20 mg/mL υδροκορτιζόνη. Στην εικόνα 6 παρουσιάζονται οι ισόθερμες καμπύλες διαλυτότητας ενός στεροειδούς σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση διάφορων κυκλοδεξτρινών συμπεριλαμβανομένης και της DIMEB. Ο πίνακας 2 περιέχει τις ιδιότητες της DIMEB όσον αφορά την βελτίωση της διαλυτότητας. Είναι αξιοσημείωτο ότι μόνο οι μερικώς μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες δείχνουν να έχουν τόσο μεγάλη επίδραση στη διαλυτότητα ενώ τα α- ή γ-

παράγωγα είναι αξιoσημείωτα λιγότερο αποτελεσματικά<sup>17</sup>. Τα προϊόντα εγκλεισμού της DIMEB με τα παράγωγα των βιταμίνη D<sub>3</sub>, λιδοκαΐνη, υδροκορτιζόνη, πρεδνισολόνη και φαινανθρολίνη και τα προσταγλαδίνες, διαπεζαμ, συνένζυμο Q<sub>10</sub> κ.α. έχουν μελετηθεί και σε όλες τις περιπτώσεις η διαλυτότητα βελτιώθηκε ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρθηκε πως βελτιώθηκε και η βιοδιαθεσιμότητα. Ένα από τα ελαττώματα της DIMEB είναι τοξικότητα μεμβράνης της που προκαλεί ερεθισμό των ιστών και αιμόλυση, επιδράσεις που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της<sup>23</sup>. Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε φάρμακα και τη TRIMEB έχουν μελετηθεί πολύ λιγότερο<sup>17</sup>.



**Εικόνα 6:** Ισόθερμες καμπύλες διαλυτότητας της υδροκορτιζόνης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση διάφορων κυκλοδεξτρινών σε θερμοκρασία 25°C.

**Πίνακας 2:** Παραδείγματα βελτίωσης διαλυτότητας της DIMEB σε υδατικό διάλυμα 10g/100mL.

Substance	Solubility in water mg/ml (S <sub>1</sub> )	Solubility in DIMEB sol. mg/ml (S <sub>2</sub> )	S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub>
<i>p</i> -aminobenzoic acid	4.05	12	3
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	5.9	25	4
1-naphthol	0.11	1.0	8
2-naphthol	0.62	12.5	20
toluene	0.44	9.6	22
hydrocortisone	0.41	23	56
digoxine	0.27	22.2	81
methyltestosterone	0.071	13.7	193
progesterone	0.016	13.0	812
3β, 17α-triacetoxy-5-pregnen-20-one	0.01	10.2	1025
3β, 17α, 21-trihydroxy-5-pregnen-20-one-21-acetate	0.008	9.1	1137
16α-methyl-17,21-dihydroxy-4-pregnen-3,20-dione	0.011	13.70	1245

Εκτός των παραπάνω υπάρχουν ενώσεις που η υδρόλυσή τους σε υδατικό διάλυμα καθυστερεί αισθητά με την παρουσία κυκλοδεξτρινών. Ένα παράδειγμα είναι η προσταγλαδίνη E<sub>2</sub>, της οποίας οι σταθερές ρυθμού αποσύνθεσής της σε υδατικό διάλυμα είναι (pH 11.0, 60°C) 62h<sup>-1</sup> και παρουσία TRIMEB και DIMEB είναι 14.7 h<sup>-1</sup> και μόνο 6.9 h<sup>-1</sup> αντίστοιχα<sup>17</sup>.

**Πίνακας 3: Ιδιότητες των DIMEB και TRIMEB<sup>24</sup>**

	<b>DIMEB</b>	<b>TRIMEB</b>
<b>Μοριακό Βάρος</b>	1331	1429
<b>Όψη</b>	Λευκή, κρυσταλλική σκόνη	Λευκή, κρυσταλλική σκόνη
<b>Διάμετρος κοιλότητας</b>	6 Å	4-7 Å
<b>Σημείο τήξης</b>	295°C -300°C	157°C
<b>Ποσοστό υγρασίας</b>	≤1% w/w	≤1% w/w
<b>Διαλυτότητα</b>	Διαλυτή 1 στα 135 μέρη αιθανόλης και 1 στα 1.75 νερού στους 25°C. Μείωση με αύξηση θερμοκρασίας.	Διαλυτή 1 στα 3.2 μέρη νερού στους 25°C. Μείωση με αύξηση θερμοκρασίας.
<b>Μέθοδος παρασκευής</b>	Από τη β-CD με επιλεκτική μεθυλίωση όλων των C2 δευτεροταγών υδροξυλικών ομάδων και όλων των C6 πρωτοταγών υδροξυλικών ομάδων.	Από τη β-CD με ολοκληρωτική μεθυλίωση όλων των C2, C3 δευτεροταγών υδροξυλικών ομάδων και των C6 πρωτοταγών υδροξυλικών ομάδων.

## 1.5 Εφαρμογές

Κατά το σχηματισμό προϊόντων εγκλεισμού με κυκλοδεξτρίνη κάθε ξενιζόμενο μόριο περιβάλλεται ατομικά από ένα μόριο κυκλοδεξτρίνης. Επομένως, το μόριο αυτό μικρο-εγκλείεται από μία μικροσκοπική οπτική γωνία, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε επωφελείς αλλαγές των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων του ξενιζόμενου μορίου.

1. Σταθεροποίηση ουσιών ευαίσθητων στο φως και στο οξυγόνο.
2. Μεταβολή της χημικής δραστηριότητας του ξενιζόμενου μορίου.
3. Σταθεροποίηση των πολύ πτητικών ουσιών.
4. Βελτίωση της διαλυτότητας των ουσιών.
5. Μεταβολή των υγρών ουσιών σε σκόνη.
6. Προστασία ενάντια στην αποσύνθεση των ουσιών από τους μικροοργανισμούς.
7. Επικάλυψη της άσχημης οσμής και γεύσης.
8. Επικάλυψη χρωστικών ενώσεων ή χρωμάτων των ουσιών.



## 9. Καταλυτική δραστηριότητα των κυκλοδεξτρινών με τα ξενιζόμενα μόρια.

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των κυκλοδεξτρινών ή των παραγώγων τους τις κάνουν κατάλληλες για εφαρμογές στην αναλυτική χημεία, στη γεωπονία, στην φαρμακευτική, στα τρόφιμα και στα προϊόντα κοσμητικής<sup>25</sup>.

### 1.5.1 Κοσμητική

Η προετοιμασία των προϊόντων κοσμητικής είναι ένας τομέας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι κυκλοδεξτρίνες, κυρίως στην πτητική καταστολή των αρωμάτων, στα αρωματικά χώρων και στα απορρυπαντικά, επιτυγχάνοντας ελεγχόμενη απελευθέρωση των αρωμάτων από τα σύμπλοκα εγκλεισμού. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των κυκλοδεξτρινών σε αυτό τον κλάδο είναι η σταθεροποίηση, ο έλεγχος του αρώματος και η βελτίωση της διαδικασίας όσον αφορά τη μετατροπή ενός υγρού συστατικού σε στερεή μορφή. Οι εφαρμογές αφορούν οδοντόκρεμες, κρέμες δέρματος, στερεά και υγρά μαλακτικά υφασμάτων, χάρτινες πετσέτες και αποσμητικά. Η αλληλεπίδραση του ξενιζόμενου μορίου με τις κυκλοδεξτρίνες παράγει ένα υψηλότερο ενεργειακό φράγμα ώστε να καταβληθεί η εξάτμιση, με αποτέλεσμα να παράγονται μεγάλης διάρκειας αρώματα. Το άρωμα εγκλωβίζεται στη κυκλοδεξτρίνη και το προϊόν εγκλεισμού που προκύπτει εγκλείεται με φωσφορικό κάλιο έτσι ώστε να σταθεροποιηθεί το άρωμα. Προϊόντα που βασίζονται στον εγκλεισμό σε κυκλοδεξτρίνη χρησιμοποιούνται επίσης σε διάφορα προϊόντα κοσμητικής που περιορίζουν τις σωματικές οσμές. Επίσης, η ίδια χρήση των κυκλοδεξτρινών, δηλαδή για επικάλυψη οσμών, εφαρμόζεται και στα απορρυπαντικά<sup>8</sup>.

### 1.5.2 Τρόφιμα

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται σε σκευάσματα τροφίμων με σκοπό την προστασία ή την απόδοση της γεύσης. Σχηματίζουν προϊόντα εγκλεισμού με μια ποικίλα μόρια συμπεριλαμβανομένων των λιπαρών οξέων και των χρωστικών. Η πλειοψηφία των φυσικών και των τεχνητών γεύσεων είναι πτητικά έλαια ή υγρά και ο εγκλεισμός με κυκλοδεξτρίνες παρέχει μια υποσχόμενη εναλλακτική λύση στις συμβατικές τεχνολογίες εγκλεισμού που χρησιμοποιούνται για τη προστασία της γεύσης. Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται επίσης ως βοηθήματα σε διαδικασίες όπως είναι η αφαίρεση της χοληστερόλης από προϊόντα όπως το γάλα, το βούτυρο και τα αυγά. Οι κυκλοδεξτρίνες έχει αναφερθεί πως έχουν επίδραση στη βελτίωση της υφής σε γλυκά και σε προϊόντα κρέατος. Άλλες εφαρμογές προέρχονται από την ικανότητά τους να ελαττώνουν την πικρή γεύση, τη δυσάρεστη οσμή και γεύση και να σταθεροποιούν τις γεύσεις όταν υπόκεινται σε μακροχρόνια αποθήκευση<sup>2</sup>. Οι κυκλοδεξτρίνες δρουν ως μοριακοί εγκλειστές, προστατεύοντας τη γεύση από πολλές ενδελεχείς μεθόδους επεξεργασίας τροφίμων για ψύξη, απόψυξη και έκθεση σε μικροκύματα. Η β-κυκλοδεξτρίνη ως μοριακός εγκλειστής επιτρέπει τη διατήρηση της ποιότητας της γεύσης σε μεγαλύτερο βαθμό και για περισσότερο χρόνο σε σύγκριση με άλλα μόρια εγκλειστές και παρέχει μακροβιότητα στα τρόφιμα<sup>8</sup>.

### 1.5.3 Φαρμακευτική

Κάθε φαρμακευτικό σκεύασμα οφείλει να έχει ένα καθορισμένο επίπεδο διαλυτότητας στο νερό για να μπορεί να αποσταλεί στη κυτταρική μεμβράνη, αλλά πρέπει να είναι αρκετά υδρόφοβο για

να τη διαπεράσει. Μία από τις δυνατότητες που είναι μοναδικές για τις κυκλοδεξτρίνες, είναι η ικανότητά τους να βελτιώνουν τη μεταφορά φαρμάκων διαμέσου βιολογικών μεμβρανών. Τα μόρια των κυκλοδεξτρινών είναι μεγάλα, με υδρογονωμένη εξωτερική επιφάνεια και υπό κανονικές συνθήκες, τα μόρια των κυκλοδεξτρινών μπορούν να διαπεράσουν βιολογικές μεμβράνες με δυσκολία<sup>26</sup>. Είναι αποδεκτό ότι οι κυκλοδεξτρίνες δρουν ως μεταφορείς διατηρώντας τα υδρόφοβα μόρια του φαρμάκου διαλυτοποιημένα και μεταφέροντάς τα στην επιφάνεια των βιολογικών μεμβρανών. Η σχετικά λιπόφιλη μεμβράνη έχει χαμηλή συσχέτιση με τα υδρόφιλα μόρια της κυκλοδεξτρίνης με αποτέλεσμα να παραμένουν στο υδατικό εξωτερικό περιβάλλον της μεμβράνης. Οι κυκλοδεξτρίνες στο τομέα της φαρμακευτικής έχουν πολλές εφαρμογές. Ένα παράδειγμα είναι η προσθήκη  $\alpha$ - και  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας των φαρμάκων στο νερό<sup>27-29</sup>. Επιπροσθέτως, πολλά φαρμακευτικά μόρια είναι αρκετά ευαίσθητα στην οξείδωση, στη θερμοδιάσπαση, στο φως, στα ιόντα και σε άλλα συστατικά της φαρμακευτικής σύνθεσης. Τα μειονεκτήματα αυτά μπορούν να βελτιωθούν με τη χρήση κυκλοδεξτρινών<sup>30</sup>. Οι CDs χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία προϊόντων εγκλεισμού με φαρμακευτικά σκευάσματα (π.χ. τοπικά αναισθητικά) με σκοπό την αργή απελευθέρωση αυτών στον οργανισμό μετά τη κατανάλωση, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διάρκεια της ουσίας<sup>31</sup>. Σε ορισμένες περιπτώσεις η χρήση των κυκλοδεξτρινών επιφέρει αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων με αποτέλεσμα τη μείωση της χορηγούμενης δόσης στον ασθενή. Ακόμη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εγκλεισμό ενοχλητικών για τον άνθρωπο προϊόντων με στόχο την προστασία της γαστρικής βλεννογόνου της αναπνευστικής οδού καθώς και για την ελάττωση της φθοράς της επιδερμίδας στην επιδερμική οδό. Τέλος, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ελαττώσουν τη δυσάρεστη και πικρή οσμή και γεύση των φαρμακευτικών προϊόντων<sup>2</sup>.

#### 1.5.4 Γεωπονικές και χημικές εφαρμογές

Οι κυκλοδεξτρίνες σχηματίζουν σύμπλοκα με ποικίλα αγροχημικά συμπεριλαμβανομένων ζιζανιοκτόνων, εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων, απωθητικών, φερομονών και ρυθμιστών ανάπτυξης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθυστερήσουν τη βλάστηση των σπόρων. Οι κυκλοδεξτρίνες, στη χημική βιομηχανία, χρησιμοποιούνται ευρέως για να διαχωρίσουν ισομερή και εναντιομερή, για να καταλύουν αντιδράσεις, ως βοηθήματα σε διάφορες διαδικασίες και για την αποτοξίνωση υλικών αποβλήτων. Επιπλέον, μεγάλη χρήση έχουν στο διαχωρισμό εναντιομερών με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) και αέρια χρωματογραφία (GC). Κάποιες άλλες αναλυτικές εφαρμογές μπορούν να βρεθούν σε φασματοσκοπική ανάλυση. Σε μελέτες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) μπορούν να δράσουν ως παράγοντες χειρόμορφης μετατόπισης και στον κυκλικό διχρωισμό ως επιλεκτικοί (χειρόμορφοι) παράγοντες που αλλάζουν το φάσμα. Χρησιμοποιούνται επίσης για να καλύψουν ενώσεις που προκαλούν μόλυνση, επιτρέποντας πιο ακριβείς μετρήσεις<sup>2</sup>. Μια καινοτόμα χρήση των CDs στις καταλυτικές αντιδράσεις είναι η ικανότητά τους να δρουν ως ενζυμικοί μιμητές. Οι παραπάνω σχηματίζονται μετατρέποντας τις φυσικά απαντώμενες κυκλοδεξτρίνες με υποκατάσταση διάφορων λειτουργικών ενώσεων στη πρωτοταγή ή δευτεροταγή πλευρά του μορίου ή με πρόσδεση ενεργών ομάδων.

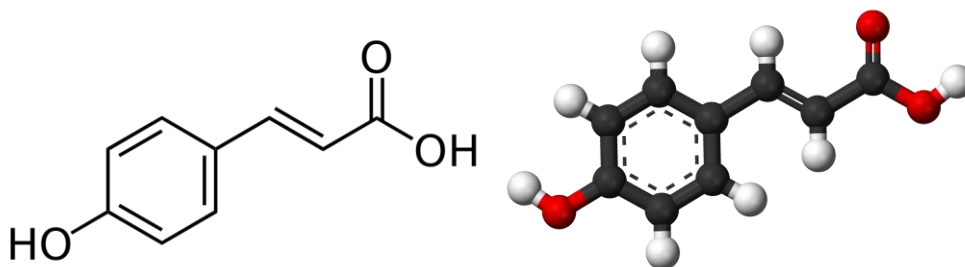
Οι CDs κατέχουν σημαντικό ρόλο στην περιβαλλοντική επιστήμη όσον αφορά τη διαλυτοποίηση των οργανικών μολυσματικών ενώσεων, τον εμπλουτισμό και την αφαίρεση των οργανικών ρύπων και των βαρέων μετάλλων από το έδαφος, το νερό και την ατμόσφαιρα. Μία εφαρμογή είναι στο χειρισμό του νερού με στόχο την αύξηση της δράσης της σταθεροποίησης, του εγκλεισμού και της απορρόφησης των μολυσμάτων. Η χρήση των CDs δίνει τη δυνατότητα της αφαίρεσης υψηλά τοξικών ενώσεων από τους βιομηχανικούς ρύπους με το σχηματισμό προϊόντων εγκλεισμού. Τα απόβλητα περιέχουν αρωματικές ενώσεις που είναι ακατάλληλες για το περιβάλλον όπως είναι η φαινόλη, η *p*-χλωροφαινόλη και το βενζόλιο, οι οποίες μετά από χειρισμό με  $\beta$ -CD έχουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα από αυτούς τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες σε σχέση με τα αρχικά τους επίπεδα. Επιπλέον, οι CDs χρησιμοποιούνται για την ακύρωση των αέριων αποβλήτων από τις βιομηχανίες οργανικής χημείας<sup>8</sup>.

## Κεφάλαιο 2

### *p*-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ (*p*-COUMARIC ACID)

#### 2.1 Γενικά

Το *p*-κουμαρικό οξύ [3-(4-υδροξυφαινυλ)-2-προπενοϊκό οξύ] είναι ένα φυσικό υδροξυκινναμικό φαινολικό οξύ, δηλαδή μία οργανική ένωση που είναι υδρόξυ παράγωγο του κινναμικού οξέος. Το μοριακό του βάρος είναι 164.1580. Είναι επίσης γνωστό και με τα ονόματα 2-Propenoic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)-Cinnamic acid, *p*-hydroxy- $\beta$ -(4-Hydroxyphenyl)-acrylic acid, *p*-Hydroxycinnamic acid, *p*-Hydroxyphenylacrylic acid, 4-Coumaric acid, 4-Hydroxycinnamic acid, para-Coumaric acid και 4'-Hydroxycinnamic acid. Υπάρχουν τρία ισομερή του κουμαρικού οξέος, το *o*-, το *m*- και το *p*-κουμαρικό οξύ, τα οποία διαφέρουν ως προς τη θέση της υδρόξυ υποκατάστασης του φαινυλίου. Το *p*-κουμαρικό οξύ είναι το πιο άφθονο ισομερές από τα τρία. Υπάρχουν δύο ισομερή του *p*-κουμαρικού οξέος το *cis* και το *trans*, αλλά το *trans* είναι το επικρατέστερο. Αποτελεί ένα κρυσταλλικό στερεό που είναι ελαφρώς διαλυτό σε υδατικό διαλύτη, αλλά επαρκώς διαλυτό σε αιθανόλη και διεθυλαιθέρα. Το *p*-κουμαρικό οξύ παρουσιάζει μέτρια διαλυτότητα στο ύδωρ (0.712 mg/mL).



Εικόνα 7: Δομή του *p*-κουμαρικού οξέος

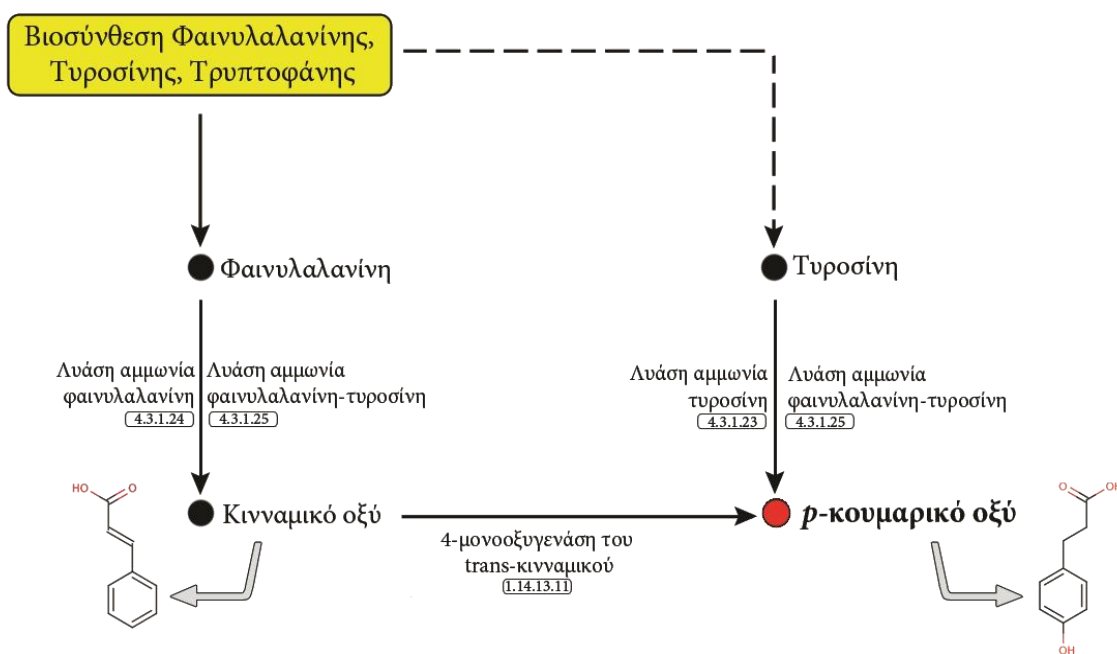
#### 2.2 Φυσικές πηγές εύρεσης

Το *p*-κουμαρικό οξύ αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα συστατικά της λιγνίνης<sup>32</sup> και ένα μεγάλο ποσοστό του είναι γνωστό πως εστεροποιείται με αυτήν<sup>33</sup>. Βρίσκεται στο κρασί σε εστεροποιημένη μορφή με ταρταρικό οξύ, τον ταρταρικό *p*-κουμαροϋλικό εστέρα. Επίσης, είναι πιθανό να βρίσκεται ως ετεροσίδης γλυκόζης. Στα σταφύλια, αποτελεί ένα πρόδρομο πολυφαινόλης, κυρίως για φλαβονοειδή, φλαβόνες και φλαβονόλες. Το οξύ αυτό είναι εξίσου σημαντικό υπόστρωμα για ένζυμα για τη δημιουργία ρεσβερατρόλης. Στο χυμό σταφυλιών το *p*-κουμαρικό οξύ μπορεί να φτάσει μία συγκέντρωση των 60 mg/L, αλλά στο κρασί δεν ανεβαίνει τα 8 mg/L<sup>34</sup>. Το *p*-κουμαρικό οξύ αποτελεί ένα πολύ σημαντικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων και ιδιαίτερα των μονοκοτυλήδων<sup>35</sup>. Υπάρχει ευρέως σε φρούτα, όπως μήλα και αχλάδια και σε φρούτα και φυτικά προϊόντα, όπως φασόλια, πατάτες, τομάτες και τσάι<sup>36</sup>. Έχει βρεθεί επίσης ότι το σπανάκι, οι ίνες του ζακχαροκάλαμου και τα πτίουρα δημητριακών είναι σημαντικές πηγές *p*-κουμαρικού οξέος<sup>37</sup>. Ο γλυκοσίδης του *p*-

κουμαρικού οξέος απαντάται επίσης σε κάποια εμπορικά είδη άρτου που περιέχουν λιναρόσπορο<sup>38</sup>.

## 2.3 Βιοσύνθεση

Η βιοσύνθεση του *p*-κουμαρικού οξέος αποτελεί τμήμα στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των φαινυλοπροπανοειδών. Αρχικά παραλαμβάνονται τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη που παράγονται στο αντίστοιχο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη. Έπειτα με τη βοήθεια διαφόρων ενζύμων, τελικά παράγεται το *p*-κουμαρικό οξύ. Η βιοσύνθεσή του μπορεί να γίνει είτε από τη φαινυλαλανίνη με ενδιάμεσο προϊόν το κινναμικό οξύ είτε απευθείας από τη τυροσίνη (βλ. εικόνα 8).

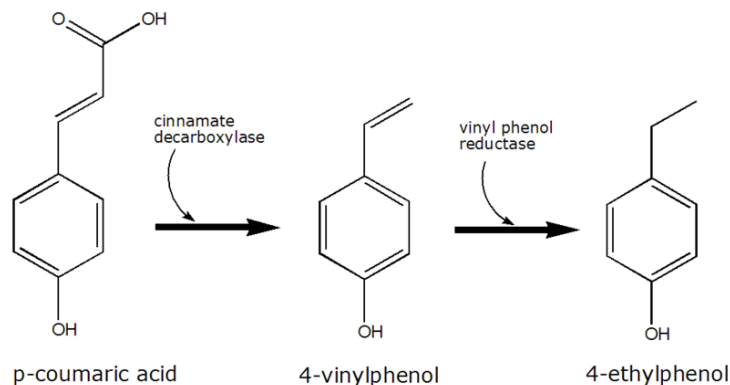


**Εικόνα 8:** Μονοπάτι βιοσύνθεσης του *p*-κουμαρικού οξέος (πηγή: **KEGG**: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Οι αριθμοί στα πλαίσια είναι τα EC των ενζύμων.

## 2.4 Βιοχημεία

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κρασιού, το *p*-κουμαρικό οξύ απελευθερώνεται εξαιτίας της δράσης της εστεράσης στη ζύμη και φαίνεται ότι η διαδοχική δράση δύο ενζύμων στο ελεύθερο *p*-κουμαρικό οξύ θα μπορούσε να είναι η βασική αιτία της παραγωγής της αιθυλφαινόλης στο κρασί<sup>39</sup>. Αρχικά η αποκαρβοξυλάση του υδροξυκινναμικού αλλάζει το υδροξυκινναμικό οξύ σε υδροξυτυρένιο (βινυλοφαινόλη), που έπειτα ανάγεται σε αιθυλο-παράγωγα από την αναγωγή της βινυλοφαινόλης<sup>40</sup>. Ακόμη, πολλοί συγγραφείς απέδειξαν ότι η ύπαρξη της αιθυλοφαινόλης οφείλεται στην παρουσία του ζυμομύκητα *Brettanomyces* sp. και στο σπόριό του *Dekkera*<sup>34,40</sup>. Ο

μύκητας αυτός θεωρείται ως μόλυνση στο κρασί γιατί είναι η αιτία της παραγωγής των αιθυλοφαινόλων, ουσιών που έχουν δυσάρεστη οσμή, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού και κατά συνέπεια η εμπορική του αξία<sup>34</sup>.



**Εικόνα 9:** Η μετατροπή του *p*-κουμαρικού οξέος σε αιθυλοφαινόλη από τον *Brettanomyces*.

## 2.5 Εφαρμογές

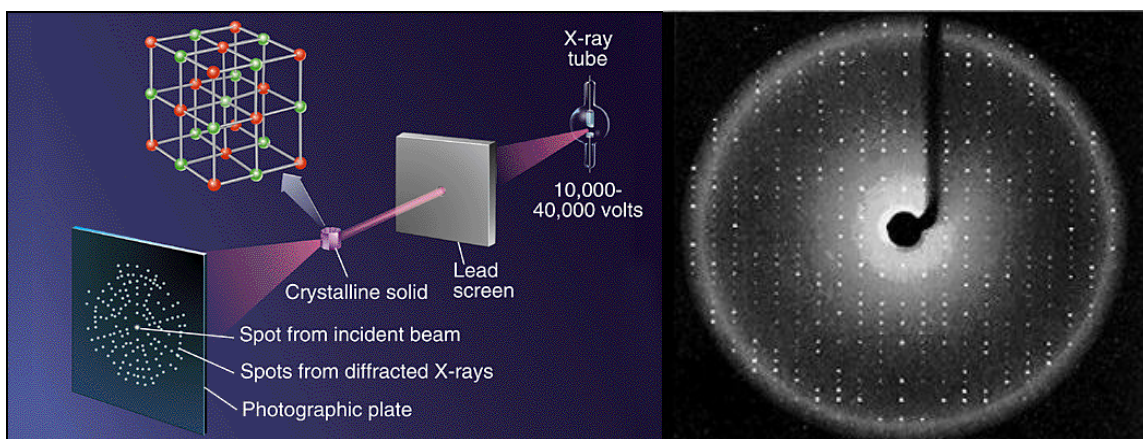
Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για το *p*-κουμαρικό οξύ έδειξαν πως έχει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες στη βλεννογόνο του παχέος εντέρου σε ποντίκια<sup>41</sup>. Σύμφωνα με κάποιες αναφορές, το *p*-κουμαρικό οξύ *in vitro* μπορεί να παρέχει αντιοξειδωτική προστασία στην LDL ως αποτέλεσμα της δράσης του 'σπασίματος' της αλυσίδας που προκαλεί. Η προσθήκη ακατέργαστου αποστάγματος του *p*-κουμαρικού οξέος σε συμπληρώματα διατροφής είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του εστέρα της χοληστερόλης, παρέχοντας ένα μηχανισμό προστασίας ενάντια στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Έχει επίσης αποδειχθεί η ικανότητα του *p*-κουμαρικού οξέος να αποτρέπει την εκτεταμένη περοξειδωση των λιπιδίων με βάση τη δράση του 'σπασίματος' της αλυσίδας της οξειδωσης της  $\alpha$ -τοκοφερόλης. Πιο πρόσφατα αναφέρθηκε πως το *p*-κουμαρικό οξύ ήταν αποτελεσματικό στη βελτίωση της ανθεκτικότητας της LDL στην οξείδωση<sup>36</sup>.

## Κεφάλαιο 3

### ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ

#### 3.1 Γενικά

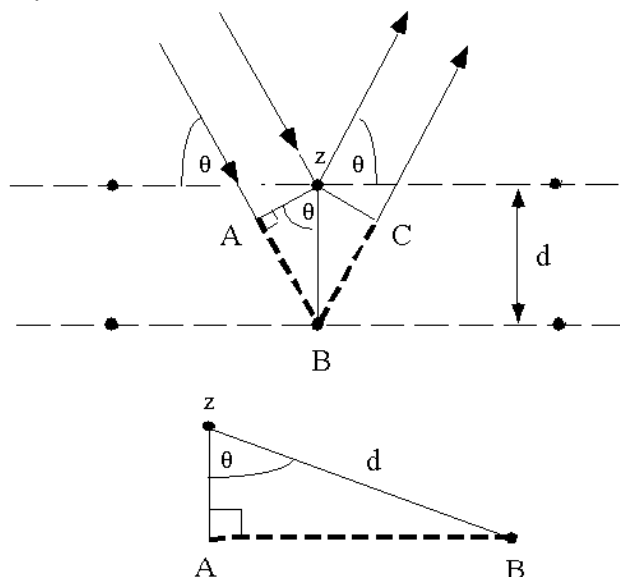
Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι πλέον η επικρατέστερη τεχνική για τον προσδιορισμό της δομής πρωτεϊνών και βιολογικών μακρομορίων. Οι ερευνητές που ενδιαφέρονται για οποιοδήποτε τομέα των βιολογικών επιστημών χρειάζονται δομικές πληροφορίες για να δώσουν λύση σε αναπάντητα ερωτήματα που αφορούν τη μελέτη τους, μία ανάγκη που αυξάνεται συνεχώς. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα της δομής μίας πρωτεΐνης προσφέρει μία πιο λεπτομερή προσέγγιση για μελλοντική έρευνα. Η προέκταση της τεχνικής σε συστήματα όπως ιοί, ανοσοποιητικά σύμπλοκα και σύμπλοκα νουκλεϊκού οξέος-πρωτεΐνης χρησιμεύουν μόνο στο να αυξήσουν τις εφαρμογές της κρυσταλλογραφίας. Ο σχεδιασμός φαρμάκου που στηρίζεται σε δομή, η διευκρίνιση των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-συνδέτη είναι μερικοί από τους τομείς που η κρυσταλλογραφία προσφέρει διασάφηση.



**Εικόνα 10:** Διαδικασία λήψης του χάρτη μίας δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (αριστερά) και ένας χάρτης (φωτογραφικό φιλμ) που προκύπτει από τη διαδικασία αυτή (δεξιά).

Ο στόχος της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ είναι η λήψη μιας τρισδιάστατης δομής του μορίου από ένα κρύσταλλο. Ένα καθαρισμένο δείγμα σε υψηλή συγκέντρωση κρυσταλλοποιείται και οι κρύσταλλοι εκτίθενται σε ακτινοβολία Χ. Τα σχήματα που προκύπτουν από τη περίθλαση μπορούν να επεξεργαστούν ώστε να αποδώσουν πληροφορίες όσον αφορά τη συμμετρία της κρυσταλλικής συσκευασίας και το μέγεθος της επαναλαμβανόμενης μονάδας που σχηματίζει το κρύσταλλο (βλ. *εικόνα 10*). Τα παραπάνω προκύπτουν από τους σχηματισμούς των σημείων της περίθλασης. Οι εντάσεις των σημείων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιορίσουν τους παράγοντες της δομής από τους οποίους μπορεί να υπολογιστεί ένας χάρτης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν αυτό το χάρτη έως ότου είναι ικανοποιητικά σαφής για να επιτρέψει το σχεδιασμό της μοριακής δομής χρησιμοποιώντας τη πρωτεϊνική αλληλουχία. Η καταληκτική δομή προσαρμόζεται ώστε

να ταιριάζει με μεγαλύτερη ακρίβεια στο χάρτη και για να αποκτήσει μία θερμοδυναμικά ευνοούμενη διαμόρφωση.



**Εικόνα 11:** Περίθλαση ακτίνων X - Νόμος του Bragg.

Οι ακτίνες X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκος κύματος της τάξης του  $10^{-10}\text{m}$ , γεγονός που καθιστά πρακτικά αδύνατη τη κατασκευή ενός φράγματος με τόσο μικρό εύρος σχισμών. Οι αποστάσεις ανάμεσα στα άτομα των στερεών είναι της τάξης του  $10^{-10}\text{m}$  και κατά συνέπεια μια σειρά ατόμων ενός κρυστάλλου θα μπορούσε να παίξει τον ρόλο φράγματος περιθλάσεως για ακτίνες X. Η μέθοδος αυτή αποδίδει εικόνες περιθλάσεως ιδιαίτερα σύνθετες εξαιτίας της τρισδιάστατης δομής του κρυστάλλου. Η πρόσπτωση μιας παράλληλης δέσμης ακτίνων X που περιέχει συνεχές φάσμα μηκών κύματος σε έναν κρύσταλλο οδηγεί είτε σε ενισχυτική είτε σε ακυρωτική συμβολή. Στις διευθύνσεις όπου η συμβολή είναι ενισχυτική, η περιθλώμενη ακτινοβολία είναι πολύ έντονη και τούτο συμβαίνει διότι συμβάλλουν ενισχυτικά οι ακτίνες X που ανακλάστηκαν από τα ατομικά επίπεδα του κρυστάλλου. Οι περιθλώμενες ακτίνες ανιχνεύονται με φωτογραφικό φιλμ (βλ. *εικόνα 10*) και με προσεκτική εξέταση και μελέτη της θέσης και της έντασης των κηλίδων στο φιλμ εξάγονται συμπεράσματα για την κρυσταλλική δομή. Με την υπόθεση ότι η προσπίπτουσα δέσμη ακτίνων X σχηματίζει γωνία  $\theta$  με ένα από τα επίπεδα των ατόμων του κρυστάλλου, μέρη της δέσμης ανακλώνται από το επάνω και το κάτω επίπεδο ατόμων. Το μέρος της δέσμης που ανακλάστηκε από το κάτω επίπεδο διανύει μεγαλύτερη διαδρομή από την δέσμη που ανακλάστηκε από το πάνω επίπεδο. Η διαφορά διαδρομής των δύο αυτών δεσμών είναι  $2d\eta\mu\theta$ . Όταν η διαφορά διαδρομής είναι ένα ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος  $\lambda$ , θα έχουμε ενισχυτική συμβολή. Το παραπάνω ισχύει και για ανακλάσεις από σειρά ολόκληρη παράλληλων επιπέδων. Συνεπώς η συνθήκη για ενισχυτική συμβολή είναι

$$2d\eta\mu\theta = n\lambda, \text{ με } n=1,2,3,\dots$$



όπου  $d$  είναι η απόσταση των ατόμων,  $n$  είναι ο ακέραιος αριθμός που προσδιορίζεται από τη δοσμένη σειρά,  $\theta$  είναι η γωνία που σχηματίζεται από τη προσπίπτουσα ακτίνα ή διαφορετικά η γωνία διασποράς (scattering angle) και  $\lambda$  το μήκος κύματος (βλ. *εικόνα 11*). Η συνθήκη αυτή ονομάζεται νόμος του Bragg. Εάν είναι γνωστό το μήκος κύματος των ακτίνων X, τότε ο νόμος του Bragg μας δίνει την απόσταση των ατομικών επιπέδων του κρυστάλλου. Επομένως, η περίθλαση Bragg πραγματοποιείται όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ή κύματα υποατομικών σωματιδίων με μήκος κύματος συγκρίσιμο με τις ατομικές αποστάσεις προσπίπτουν σε ένα κρυσταλλοποιημένο δείγμα και διασπείρονται από τα άτομα του συστήματος.

### 3.2 Κρυσταλλογραφία ακτίνων X και κυκλοδεξτρίνες

Από την ανακάλυψη των κυκλοδεξτρινών στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, πέρασαν περισσότερα από 70 έτη πριν να γίνει ανάλυση της τρισδιάστατης δομής αυτών με ακτίνες X. Στο αρχικό στάδιο της μελέτης των κυκλοδεξτρινών, η κυκλική δομή τους αναμενόταν από διάφορες χημικές μελέτες. Παρόλαυτά χωρίς τη γνώση της τρισδιάστατης δομής ήταν ακόμη δύσκολο να γίνουν πλήρως αντιληπτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά των κυκλοδεξτρινών που τις καθιστούν ικανές να σχηματίζουν προϊόντα εγκλεισμού με ένα μεγάλο αριθμό ξενιζόμενων μορίων. Οι δομές των ακτίνων X έδωσαν την άμεση απόδειξη του εγκλεισμού του ξενιζόμενου μορίου στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Το 1942, η κρυσταλλογραφική μέθοδος εφαρμόστηκε πρώτα σε κυκλοδεξτρίνες για τον προσδιορισμό του μοριακού τους βάρους. Το 1959 προτάθηκε μία δομή 'συσκευασίας' για διάφορα κρυσταλλικά σύμπλοκα της  $\alpha$ -κυκλοδεξτρίνης με μικρά ξενιζόμενα μόρια. Το 1968 αναφέρθηκαν προκαταρκτικά κρυσταλλογραφικά δεδομένα προϊόντων εγκλεισμού  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης με παράγωγα βενζολίου. Η πρώτη κρυσταλλική δομή που λύθηκε με ανάλυση ακτίνων X το 1965 ήταν το προϊόν εγκλεισμού  $\alpha$ -κυκλοδεξτρίνης και οξικού καλίου 11. Οι δομές δύο άλλων γνωστών κυκλοδεξτρινών της  $\beta$  και της  $\gamma$ , καθορίστηκαν το 1976 και το 1980 αντίστοιχα<sup>22</sup>.

### 3.3 Κρυστάλλωση

#### 3.3.1 Γενικά

Το πρώτο στάδιο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X είναι η διαδικασία της κρυστάλλωσης. Παρόλο που είναι το πρώτο στάδιο αποτελεί αρκετά συχνά και το δυσκολότερο. Αυτό οφείλεται στη δυσκολία απόκτησης του καταλληλότερου κρυστάλλου ανάλογα με τη περίπτωση. Η παρασκευή του κρυστάλλου πρέπει να πραγματοποιείται υπό ορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας, δονήσεων, διαλύτη καθώς και συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας. Ο κρυστάλλος πρέπει να είναι ικανοποιητικά μεγάλος, δηλαδή μεγαλύτερος από 0.1mm σε όλες του τις διαστάσεις, καθαρός στη σύστασή του, με μη σημαντικές εσωτερικές ατέλειες όπως είναι ρωγμές και η ύπαρξη κοινών επιφανειών του κρυστάλλου με γειτονικό κρυστάλλο. Η επιλογή του τελικού κρυστάλλου αποτελεί σημαντική διαδικασία αφού η σκεδαστική του ικανότητα είναι εκείνη που θα οδηγήσει σε ικανοποιητικό πρότυπο περίθλασης για την ανάλυση της δομής. Η κρυστάλλωση είναι μία χρονοβόρα διαδικασία, που στη πλειοψηφία των περιπτώσεων απαιτεί αρκετές μέρες για να ολοκληρωθεί. Βασίζεται στη βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης της

διαλυμένης ουσίας πέραν του ορίου της διαλυτότητάς της. Η έναρξη της κρυστάλλωσης γίνεται με τη διαλυτοποίηση της ουσίας του ενδιαφέροντος σε κατάλληλο διαλύτη και σε συγκέντρωση όπου στο διάλυμα να βρίσκεται σε κορεσμό. Καθώς οι κρύσταλλοι στο μητρικό υγρό αναπτύσσονται, μειώνεται η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στο περιβάλλον των πυρήνων κρυστάλλωσης και αυξάνεται η εναπόθεση υλικού περιμετρικά αυτών. Η κρυστάλλωση που προκύπτει από υγρή φάση είναι μια δυναμική ισορροπία μεταξύ υγρής και στερεάς φάσης και προάγεται εφόσον συμβαίνει μετατόπιση της ισορροπίας προς τα δεξιά. Η διαδικασία αυτή εξαρτάται άμεσα από τη φύση των δυνάμεων που ασκούνται μεταξύ των μορίων και όταν η υγρή φάση είναι διάλυμα προς κρυστάλλωση από τη φύση του διαλύτη και τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας.

### 3.3.2 Κρυστάλλωση των μεθυλιωμένων κυκλοδεξτρινών

Η δημιουργία κρυστάλλων από μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες διαφέρει σε κάποια σημεία από ότι οι υπόλοιπες κυκλοδεξτρίνες εξαιτίας της σχέσης μεθύλιωσης διαλυτότητας και της ανάστροφης διαλυτότητας με τη θερμοκρασία. Η ιδιότητα των DIMEB και TRIMEB που είναι ασυνήθιστη είναι ότι τα ομογενή διαλύματά τους κρυσταλλώνουν με θέρμανση<sup>42</sup>. Η θέρμανση της κρυστάλλωσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση αλλά για δεδομένες συνθήκες πραγματοποιείται μέσα σε εύρος 0.5°C. Αν αρχίσει η ψύξη, οι κρύσταλλοι θα ανατηχθούν μέσα στο διάλυμα τους και όλη η διαδικασία χαρακτηρίζεται από βρόγχο υστέρησης εύρους 7-12° C. Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν από μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες και σε κρύο νερό έχουν πολύ υψηλότερο ποσοστό νερού όταν συγκρίνονται με εκείνους που αναπτύχθηκαν σε ζεστό νερό, οι οποίοι έχουν ελάχιστα ή καθόλου νερό από τα μόρια ενυδάτωσης. Αυτό προτείνει πως οι μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες είναι εξαιρετικά διαλυτές στο νερό σε χαμηλή θερμοκρασία πιθανών επειδή είναι ισχυρά ενυδατωμένες. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, η ενυδάτωση διακόπτεται και οι υδρόφοβες μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες συναθροίζονται και κρυσταλλώνουν<sup>43</sup>.

**Πίνακας 4:** Αριθμός μορίων νερού στη β-CD και τη DIMEB βασισμένος σε MD (molecular dynamics) δεδομένα (αβεβαιότητα ±20 μόρια νερού)<sup>43</sup>.

Hydration shells/bulk water	β-CD		DIMEB	
	25°C	70°C	25°C	70°C
Hydrophilic (near -OH groups only)	442	535	46	31
Hydrophobic (near -CH <sub>3</sub> groups only)	-	-	147	18
Integral (both -OH and -CH <sub>3</sub> )	-	-	513	938
Bulk water	503	410	760	479
Number of water 'clusters'	10	7	12	8

## Κεφάλαιο 4

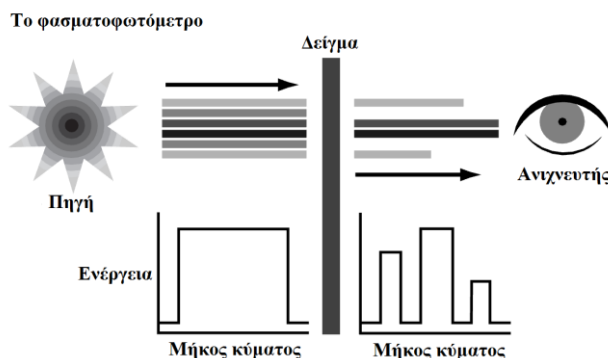
### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

#### 4.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR)

Η περιοχή του IR του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος καλύπτει την περιοχή αμέσως μετά το ορατό ( $7,8 \cdot 10^{-5}$  cm) μέχρι τα  $10^{-2}$  cm περίπου, αλλά μόνον η ενδιάμεση περιοχή, από τα  $2,4 \cdot 10^{-5}$  cm ως τα  $2,5 \cdot 10^{-3}$  cm, χρησιμοποιείται από τους οργανικούς χημικούς. Οι συχνότητες εντός της περιοχής IR εκφράζονται σε κυματαριθμούς  $\nu$  περισσότερο παρά σε *hertz*. Ο κυματαριθμός, που εκφράζεται σε μονάδες αντίστροφων εκατοστόμετρων, είναι απλώς το αντίστροφο του μήκους κύματος. Όλα τα μόρια διαθέτουν κάποια συγκεκριμένη ποσότητα ενέργειας κατανεμημένη σε όλη τη δομή τους, που προκαλεί στους δεσμούς δονήσεις (επιμηκύνσεις) και κάμψεις. Ταυτόχρονα, εξαιτίας της, τα άτομα πάλλονται και περιστρέφονται, ενώ παρατηρούνται και διάφορες μοριακές δονήσεις. Η ποσότητα ενέργειας που περιλαμβάνει ένα μόριο δεν μεταβάλλεται κατά συνεχή τρόπο, αλλά είναι κβαντισμένη. Όταν το μόριο δέχεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία απορροφάται ενέργεια όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίδια με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο δονητικών συχνοτήτων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίση με εκείνη της ακτινοβολίας αυξάνει το πλάτος της. Εφόσον κάθε συχνότητα που απορροφάται από ένα μόριο αντιστοιχεί σε μια προκαθορισμένη μοριακή κίνηση, μπορούμε να διαπιστώσουμε τις κινήσεις του μορίου, μελετώντας το φάσμα IR. Από την ερμηνεία αυτών των κινήσεων μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί (λειτουργικές ομάδες) υπάρχουν στο μόριο. Το προκύπτον φάσμα αντιπροσωπεύει τη μοριακή απορρόφηση και μετάδοση, δημιουργώντας ένα μοριακό 'δακτυλικό αποτύπωμα' του δείγματος. Όπως και το δακτυλικό αποτύπωμα, δύο ενώσεις δε μπορούν να έχουν το ίδιο IR φάσμα και έτσι η φασματοσκοπία IR χρησιμεύει σε διάφορους τύπους αναλύσεων<sup>44</sup>.

##### 4.1.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform InfraRed) είναι η προτιμώμενη μέθοδος όσον αφορά τη φασματοσκοπία υπερύθρου. Ο μετασχηματισμός Fourier χρησιμοποιήθηκε για να υπερνικήσει την αδυναμία που παρουσιάζει η IR φασματοσκοπία.

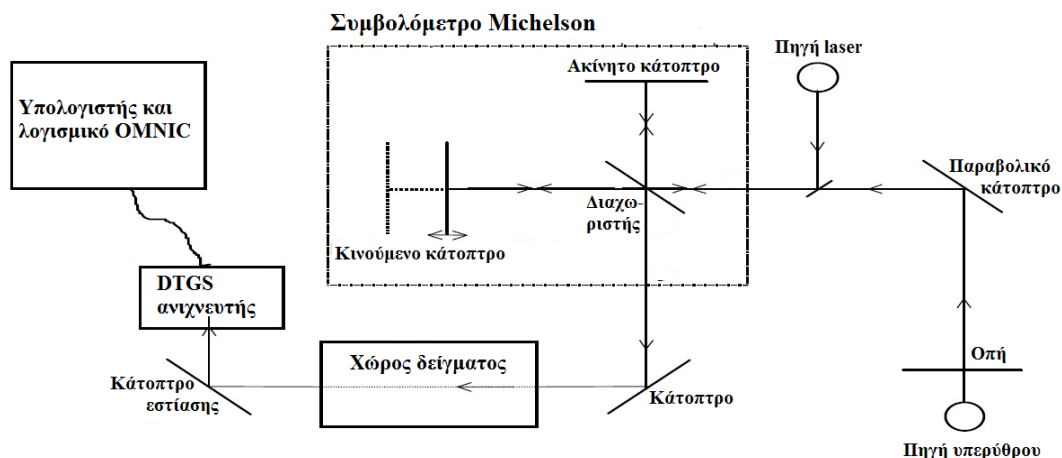


Εικόνα 12: Διάταξη φασματοφωτόμετρου IR

Η αδυναμία αυτή έγκειται στο γεγονός ότι οι μικρές εντάσεις των απορροφήσεων στην περιοχή  $4000-400\text{cm}^{-1}$  υπερκαλύπτονται από το 'θόρυβο'. Σε ένα φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας παρουσιάζονται δύο περιοχές. Η πρώτη είναι η περιοχή όπου εντοπίζονται κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων και εκτείνεται από τα  $4000$  έως τα  $1500\text{cm}^{-1}$ . Στη δεύτερη περιοχή εντοπίζονται κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις ολόκληρου του μορίου και ονομάζεται δακτυλικό αποτύπωμα (fingerprint), ενώ εκτείνεται από τα  $1500$  έως τα  $600\text{cm}^{-1}$ . Η μέθοδος FT-IR έχει πολλά πλεονεκτήματα. Μπορεί να παρέχει πληροφορίες που θα βοηθήσουν στην αναγνώριση άγνωστων υλικών, στον προσδιορισμό της ποιότητας και της συνοχής του δείγματος και στον προσδιορισμό του ποσότητας των συστατικών σε ένα μείγμα. Αποτελεί μία ταχύτατη τεχνική, μπορεί να εφαρμοστεί χωρίς προηγούμενη κατεργασία του δείγματος, δε καταστρέφει τα δείγματα και τέλος παρουσιάζει χαμηλό θόρυβο και υψηλή διαχωριστική ικανότητα.

#### 4.1.2 Οργανολογία

Ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR, αποτελείται από την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, δηλαδή μία λυχνία νικελίου – χρωμίου, την πηγή λέιζερ που λειτουργεί με διέγερση ατόμων ηλίου και νέου, το συμβολόμετρο Michelson, που είναι διαχωριστής δέσμης από KBr, περιλαμβάνει ένα κινητό και ένα ακίνητο κάτοπτρο και τέλος τον ανιχνευτή, ο οποίος είναι δευτεριωμένη θεϊκή γλυκίνη. Το σχηματικό διάγραμμα του συμβολομέτρου λαμβάνεται χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό και στη συνέχεια υφίσταται μετασχηματισμό κατά Fourier και εμφανίζεται σαν τυπικό φάσμα FT-IR. Στην παρούσα μελέτη το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το OMNIC 7.3 της εταιρίας Nicolet, 750 Magna series.



βλ. 13: Διάταξη οργανολογίας για FT-IR

#### 4.1.3 Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS)

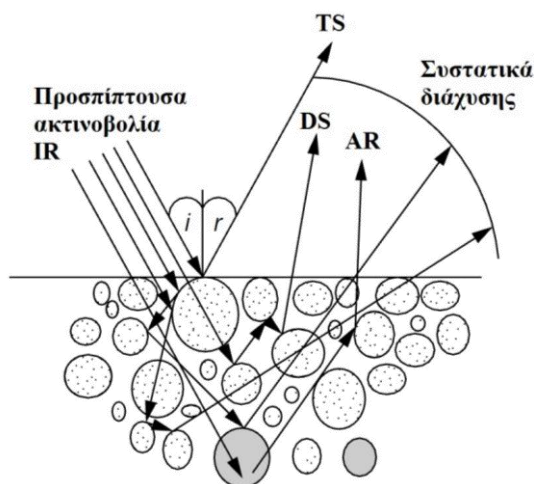
Η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης με μετασχηματισμό κατά Fourier (Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transform Spectroscopy, DRIFTS), μπορεί να θεωρηθεί ως μία πολύπλευρη σειρά αναλυτικών εργαλείων που είναι διαθέσιμα για τη μελέτη της απορρόφησης της υπέρυθρης

ακτινοβολίας σε στερεά υλικά<sup>45</sup>. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος (βλ. εικόνα 14).



**Εικόνα 14:** Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος και καψίδια για τη λήψη φασμάτων (DRIFTS)

Η IR ακτινοβολία μπορεί να ανακλάται άμεσα από την επιφάνεια του δείγματος, δημιουργώντας κατοπτρική διάθλαση, η οποία είναι μία συνάρτηση του δείκτη ανάκλασης και της απορροφητικότητας του δείγματος. Η ακτινοβολία μπορεί επίσης να υποβληθεί σε πολλαπλές ανακλάσεις που πραγματοποιούνται στην επιφάνεια των σωματιδίων και να μη διαπερνά το δείγμα<sup>46</sup>. Η ανάκλαση της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε στερεό δείγμα υπό μορφή σκόνης δίνει τριών ειδών ανακλάσεις, την απορροφητικά ανακλώμενη (AR), τη διαχυτικά ανακλώμενη (DS) και την αληθινά ανακλώμενη (TS). Η AR έχει περάσει από το εσωτερικό των σωματιδίων του δείγματος, επομένως περιέχει στοιχεία για τις ιδιότητες απορρόφησής τους και είναι η μόνη που είναι χρησιμοποιήσιμη<sup>46</sup>.



**Εικόνα 15:** Είδη ανάκλασης για DRIFTS

Οι ιδιότητες του υλικού που επηρεάζουν την ποιότητα του φάσματος DRIFTS είναι ο δείκτης διάθλασης του δείγματος, οι διαστάσεις των σωματιδίων, η ομοιογένεια, η συγκέντρωση και οι συντελεστές απορρόφησης. Επομένως η μελέτη δειγμάτων που αποτελούνται από μείγμα ενώσεων, απαιτούν επιμελή ομογενοποίηση πριν τη μέτρηση. Η τεχνική DRIFTS χρησιμοποιείται ευρέως εξαιτίας της ευκολίας και της ταχύτητάς της.

#### 4.1.4 Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR

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

##### Αυτόματη εξομάλυνση (Automatic Smooth)

Με την αυτόματη εξομάλυνση ο θόρυβος μειώνεται σε μεγάλο βαθμό, μέσω μιας μαθηματικής επεξεργασίας, χωρίς να αλλοιώνεται η εικόνα του φάσματος. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η βελτίωση του λόγου σήμα/θόρυβος (signal to noise ratio, SNR). Η καμπύλη του φάσματος προσαρμόζεται με έναν αλγόριθμο, ο οποίος χρησιμοποιεί ένα πολυωνυμικό μοντέλο, τις πληροφορίες για το RSN κάποιων επιλεγμένων σημείων και με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων. Η αυτόματη εξομάλυνση πραγματοποιείται αυτόματα από το λογισμικό OMNIC 7.3 της εταιρίας Nicolet.

##### Αυτόματη διόρθωση της βασικής γραμμής (Automatic baseline correct)

Η λειτουργία αυτή αποσκοπεί στη διόρθωση των σημείων της βασικής γραμμής του φάσματος που η έντασή τους δεν είναι μηδέν. Η διόρθωση της βασικής γραμμής γίνεται πρωτίστως για τις ποσοτικές αναλύσεις των φασμάτων, όπου απαιτείται τα φάσματα να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους και δευτερευόντως για τη βελτίωση της εικόνας του φάσματος. Η διόρθωση της βασικής γραμμής πραγματοποιείται αυτόματα από το λογισμικό OMNIC 7.3 της εταιρίας Nicolet.

## 4.2 Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού (UV-Vis)

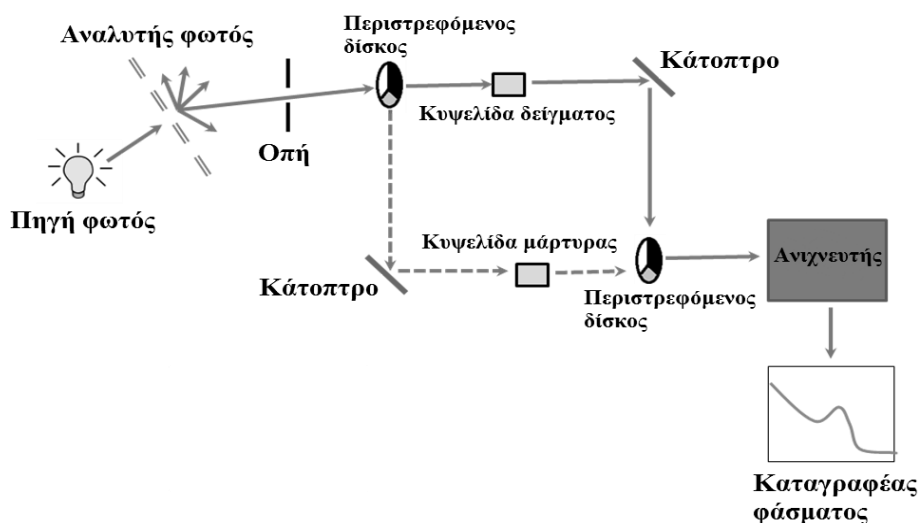
### 4.2.1 Γενικά

Στη φασματοσκοπία UV-Vis οι οργανικές ενώσεις απορροφούν κυρίως σε μήκη κύματος 200-800nm. Οι απορροφήσεις στην περιοχή αυτή οφείλονται σε διεγέρσεις ηλεκτρονίων σθένους και γι αυτό τα φάσματα αυτά ονομάζονται ηλεκτρονικά. Κατά την επίδραση σ'ένα μόριο υπεριώδους ακτινοβολίας (200-400nm) ή ορατού φωτός (400-800nm) συμβαίνει εκλεκτική απορρόφηση ενέργειας και διέγερση των ηλεκτρονίων σθένους από τη βασική τους στάθμη σε μια αντιδεσμική κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Με την καταγραφή της απορροφούμενης ενέργειας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος προκύπτουν τα ηλεκτρονικά φάσματα απορρόφησης, που χρησιμοποιούνται κυρίως στην οργανική χημεία. Με αντίθετη διεργασία, δηλαδή προσφορά ενέργειας, διέγερση και καταγραφή της ακτινοβολίας που εκπέμπουν τα ηλεκτρόνια όταν μεταπέσουν από τη διεγερμένη κατάσταση στη βασική, προκύπτουν τα ηλεκτρονικά φάσματα εκπομπής, που δε βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στα οργανικά μόρια, επειδή συνήθως καταστρέφονται με τις δραστικές συνθήκες διεγέρσεως που χρησιμοποιούνται. Η ενέργεια διεγέρσεως αυξάνει όσο μικρότερο είναι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και οι τιμές τις κυμαίνονται από 40-140 kcal/mol. Τα φάσματα UV-Vis παίρνονται κυρίως σε διαλύματα κι έχουν τη μορφή ταινιών ή καμπυλών απορρόφησης και όχι οξείων κορυφών, γιατί ταυτόχρονα συμβαίνουν διεγέρσεις δονήσεως και περιστροφής του μορίου που διευρύνουν την περιοχή

απορροφήσεως. Στη διεύρυνση των κορυφών συμβάλλει και ο διαλύτης. Το μήκος κύματος όπου παρατηρείται μέγιστο απορροφήσεως συμβολίζεται με  $\lambda_{\max}$ . Για τη λήψη ενός φάσματος χρησιμοποιούνται αραιά διαλύματα της ουσίας με κατάλληλους διαλύτες (ύδωρ, μεθανόλη, εξάνιο κ.λπ). Τα διαλύματα περιέχονται σε δοχεία χαλαζία (κυψελίδες) που είναι διαφανή στο υπεριώδες φως. Η απορρόφηση συνδέεται με τον μοριακό συντελεστή αποσβέσεως και σύμφωνα με το νόμο των Beer και Lambert ισχύει ότι  $\log_{10} (I_0/I) = A = \epsilon \cdot c \cdot d$ , όπου  $A$  είναι η απορρόφηση,  $d$  το μήκος της διαδρομής που διανύει η ακτίνα του φωτός (συνήθως είναι σταθερό και ίσο με ένα),  $c$  είναι η συγκέντρωση και  $\epsilon$  είναι ο μοριακός συντελεστής αποσβέσεως<sup>47</sup>.

#### 4.2.2 Οργανολογία

Τα όργανα που χρησιμοποιούνται ονομάζονται φασματοφωτόμετρα και αποτελούνται σε γενικές γραμμές από την πηγή ακτινοβολίας (λυχνία υδρογόνου ή υδραργύρου για το υπεριώδες και βολφραμίου για το ορατό), τον αναλυτή του φωτός (πρίσμα ή περιθλαστικό φράγμα από χαλαζία), που παρέχει μονοχρωματική δέσμη φωτός με συνεχώς μεταβαλλόμενο μήκος κύματος, τον ανιχνευτή της εντάσεως της ακτινοβολίας μετά τη δίοδο της από το διάλυμα (φωτοκύτταρο) και κατάλληλο καταγραφικό σύστημα.



**Εικόνα 16:** Οργανολογία φασματοσκοπίας UV-Vis

#### 4.2.3 Εφαρμογές

Τα ηλεκτρονικά φάσματα δίνουν γενικές πληροφορίες για τη δομή μιας ενώσεως και ορισμένες τιμές  $\lambda_{\max}$  είναι χαρακτηριστικές, σε συνδυασμό με τις τιμές  $\epsilon$ , για την παρουσία ορισμένων ομάδων. Μεγάλη εφαρμογή βρίσκουν τα φάσματα UV σε κινητικές μελέτες αντιδράσεων, όπου παρακολουθούνται με μεγάλη ακρίβεια μεταβολές συγκεντρώσεων αρχικών ουσιών και ενδιάμεσων ή τελικών προϊόντων από τη μεταβολή της οπτικής τους πυκνότητας. Επίσης χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό των σταθερών διαστάσεων οξέων και βάσεων, σε μελέτες σχηματισμού ασταθών ενδιάμεσων προϊόντων, όπως διάφορα σύμπλοκα και κυρίως σε αναλυτικούς προσδιορισμούς.

## Κεφάλαιο 5

### ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

#### 5.1 Γενικά

Ως συνέπεια του κανονικού αερόβιου μεταβολισμού υπάρχει πιθανότητα να παραχθούν επιβλαβή δραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS). Αυτές οι ελεύθερες ρίζες συνήθως αφαιρούνται ή απενεργοποιούνται *in vivo* από μια ομάδα αντιοξειδωτικών<sup>48</sup>. Συγκεκριμένα μέλη της ομάδας της αντιοξειδωτικής άμυνας αναπτύσσονται για να εμποδίσουν την παραγωγή των ROS, έτσι ώστε να καταστρέψουν πιθανά οξειδωτικά και να “καθαρίσουν” τα ROS. Επομένως, το στρες που δημιουργείται από την οξείδωση και προκαλεί καταστροφή των ιστών ελαχιστοποιείται. Παρόλαυτά, μια απόλυτη ή σχετική έλλειψη αντιοξειδωτικής άμυνας μπορεί να οδηγήσει σε κατάσταση αυξημένου οξειδωτικού στρες και αυτό μπορεί να σχετιστεί με αιτίες και συνέπειες ποικίλων ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένης της νόσου της στεφανιαίας αρτηρίας και του καρκίνου<sup>49</sup>.

Διάφορες δοκιμές που μετρούν τη συνδυαστική αντιοξειδωτική επίδραση των μονοενζυματικών αμυνών σε βιολογικά υγρά μπορούν να φανούν χρήσιμες στην παροχή ενός δείκτη της ικανότητας αντίστασης στην οξειδωτική καταστροφή. Η πλειοψηφία των δοκιμών της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας που έχουν χρησιμοποιηθεί έχουν μετρήσει την ικανότητα του πλάσματος στο να έχει ανθεκτικότητα στις οξειδωτικές επιδράσεις των ενεργών ειδών που παράγονται σκόπιμα στο μείγμα τις αντιδράσεις. Η μείωση των αντιοξειδωτικών γίνεται αντιληπτή με την αλλαγή του σήματος, όπως είναι το ποσοστό της χρήσης του οξυγόνου ή η χημειοφωταύγεια. Η μέτρηση αυτών των σημάτων απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και τέτοιου είδους δοκιμές μπορεί να είναι χρονοβόρες.

Ένα βιολογικό αντιοξειδωτικό έχει προσδιοριστεί ως “οποιαδήποτε ουσία, που όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με εκείνες ενός οξειδωσιμου υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος”. Αυτός ο προσδιορισμός είναι σαφής και καλύπτει κάθε μέλος της ομάδας άμυνας των αντιοξειδωτικών. Εντούτοις, εκτός εάν ένα αντιοξειδωτικό αποτρέπει την ανάπτυξη των ROS, μια οξειδοαναγωγική αντίδραση εξακολουθεί να συμβαίνει. Η διαφορά είναι ότι τα οξειδωτικά είδη αντιδρούν με το αντιοξειδωτικό αντί του υποστρώματος, δηλαδή το αντιοξειδωτικό μειώνει το οξειδωτικό. Με απλά λόγια μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ μπορούν να περιγραφούν ως αναγωγικά και η απενεργοποίηση των οξειδωτικών από τα αναγωγικά μπορεί να περιγραφεί με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες ένα αντιδρών είδος ανάγεται με κόστος την οξείδωση ενός άλλου<sup>50</sup>.



## 5.2 Οξειδωτική ικανότητα σιδήρου του πλάσματος (Ferric Reducing Ability of Plasma - FRAP)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η δοκιμή FRAP. Σε χαμηλό pH, όταν το προϊόν εγκλεισμού ferric-tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ) ανάγεται σε μορφή διασθενή σιδήρου ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ), αναπτύσσεται ένα έντονο μπλε χρώμα και συνοδεύεται από μέγιστη απορρόφηση στα  $593\text{nm}^{51}$ . Η αντίδραση είναι μη ειδική και κάθε ημιαντίδραση που έχει μια μικρότερη-θετική αναγωγική δυνατότητα, υπό τις συνθήκες της αντίδρασης, σε σχέση με την ημιαντίδραση  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ θα οδηγήσει στην αντίδραση αναγωγής  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ. Οι συνθήκες δοκιμής ευνοούν την αναγωγή του προϊόντος εγκλεισμού και κατά συνέπεια και την ανάπτυξη χρώματος, με την προϋπόθεση ότι ένα αναγωγικό (αντιοξειδωτικό) είναι παρόν. Η φεροζίνη (Ferrozine), μία ένωση που σχετίζεται με το TPTZ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, με περίσσεια ασκορβικού οξέος, ώστε να μετρηθεί ο σίδηρος. Στη δοκιμασία FRAP, χρησιμοποιείται περίσσεια  $\text{Fe}^{\text{III}}$  και ο περιοριστικός παράγοντας της τιμής του σχηματισμού του  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPTZ, και κατά συνέπεια του χρώματος, είναι η αναγωγική ικανότητα του δείγματος<sup>50</sup>.

# **II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Κεφάλαιο 5

### 5.1 Φασματοσκοπία υπεριώδους (UV spectroscopy)

#### 5.1.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Τα διαλύματα για τη καμπύλη αναφοράς παρασκευάστηκαν σε διαλύτη μεθανόλη όγκου 20mL και προστέθηκαν διάφορες γνωστές συγκεντρώσεις του *p*-κουμαρικού οξέος (βλ. πίνακας 5). Έπειτα ακολούθησε η λήψη των φασμάτων UV προκειμένου να βρεθεί η απορρόφηση ABS στο λmax του *p*-κουμαρικού οξέος. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας έγιναν διάφορες αραιώσεις των διαλυμάτων αυτών σε σταθερό όγκο, για την εύρεση της καταλληλότερης συγκέντρωσης για τη μέτρηση έτσι ώστε να είναι εντός του ορίου ανίχνευσης του οργάνου.

**Πίνακας 5:** Συγκέντρωση του *p*-κουμαρικού οξέος (mg) για την καμπύλη αναφοράς

$5 \cdot 10^{-6}$
$7 \cdot 10^{-6}$
$10^{-5}$
$1.5 \cdot 10^{-5}$

Το πείραμα διαλυτότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των *Higuchi* και *Connors*. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα όγκου 10mL στα οποία διαλυτοποιήθηκε DIMEB σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (βλ. πίνακας 6). Στη συνέχεια προστέθηκε περίσσεια *p*-κουμαρικού (30 mg) στο κάθε διάλυμα και τα μείγματα τοποθετήθηκαν σε shaker (200 rpm), σε θερμοκρασία δωματίου, για χρονικό διάστημα 48 ωρών, προκειμένου να αποκατασταθεί η ισορροπία της αντίδρασης. Τέλος, τα διαλύματα διηθήθηκαν υπό κενό, με ηθμό 0.45μm PTFE και στο διήθημα του καθενός λήφθηκε το φάσμα απορρόφησής τους, με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

**Πίνακας 6:** Συγκέντρωση της DIMEB (mg) για το πείραμα διαλυτότητας

0.01
0.03
0.05
0.07
0.09

#### 5.1.2 Οργανολογία

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

## 5.2 Φασματοσκοπία υπερόθρου (FT-IR spectroscopy)

### 5.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Για την φασματοσκοπία υπερόθρου παρασκευάστηκε (1) διάλυμα της DIMEB (30mg), η οποία διαλυτοποιήθηκε σε 5mL απιονισμένου H<sub>2</sub>O, (2) διάλυμα του *p*-κουμαρικού οξέος (30mg), που διαλυτοποιήθηκε σε 5mL απιονισμένου H<sub>2</sub>O και (3) διάλυμα *p*-κουμαρικού οξέος/DIMEB σε μοριακή συγκέντρωση 1:1 (1:1 molar ratio). Ακολούθησε παραμονή των παραπάνω διαλυμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες και ανάδευση στα 200 rpm. Έπειτα τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία -20°C για άλλες 24 ώρες και ακολούθως λυοφιλιώθηκαν. Τέλος, λήφθηκαν οι μετρήσεις FT-IR των δειγμάτων. Εκτός από τα παραπάνω τρία δείγματα έγινε και ανάμιξη των 1 και 2 με λειοτριβίση και το προκύπτον δείγμα μετρήθηκε επίσης με FT-IR. Κατά την διάρκεια των μετρήσεων προστέθηκε βρωμιούχο κάλιο (KBr) σε αναλογία 3:1 KBr:*p*-κουμαρικό οξύ για ελαχιστοποίηση της υγρασίας των δειγμάτων αλλά και ως background φάσμα.

### 5.2.2 Οργανολογία

Τα φάσματα FT-IR λήφθηκαν στην περιοχή 400-4000cm<sup>-1</sup> σε φασματόμετρο Nicolet FT-IR 6700 με τις εξής παραμέτρους:

Σαρώσεις (scans): 100

Διακριτική ικανότητα (resolution): 4cm<sup>-1</sup>

Ταχύτητα κινούμενου κατόπτρου (optical velocity): 0,6329mm s<sup>-1</sup>

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

### 5.2.3 Επεξεργασία Φασμάτων

Πραγματοποιήθηκε εξομάλυνση με χρήση της λειτουργίας «Automatic Smoothing» του λογισμικού OMNIC 7.3 της Nicolet 750 Magna series, που συνοδεύει το φασματοφωτόμετρο, καθώς και διόρθωση της βασικής γραμμής με χρήση της λειτουργίας «Automatic Baseline Correct».

## 5.3 Κρυσταλλογραφία

### 5.3.1 Μέθοδος της αργής ψύξης για σύμπλοκα της β-κυκλοδεξτρίνης

Η μέθοδος της αργής ψύξης είναι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία για το σχηματισμό μονοκρυστάλλων. Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα της β-κυκλοδεξτρίνης με συγκέντρωση διπλάσια εκείνης του κορεσμού και εμβαπτίζεται σε υδατόλουτρο 70°C ώστε να διαλυτοποιηθεί κατά το μέγιστο δυνατό. Το διάλυμα που προκύπτει εισάγεται σε δοχείο που περιέχει ισομοριακή ποσότητα της ουσίας προς εγκλεισμό. Ακολουθεί προσθήκη νερού σε όγκο για κεκορεσμένο διάλυμα όσον αφορά τη β-κυκλοδεξτρίνη και αναδεύεται σε επιλεγμένη θερμοκρασία (18°C-65°C) με παράλληλη προσθήκη νερού στη περίπτωση που εξατμιστεί. Η ανάδευση αποσκοπεί στη πλήρη διαλυτοποίηση της β-κυκλοδεξτρίνης. Στην περίπτωση που

υπάρχουν ορατά αιωρούμενα σωματίδια προστίθεται κάποιος οργανικό διαλύτης, συνηθέστερα αιθανόλη. Σε ένα διάλυμα 1-2mL, 0.5μL οργανικού είναι αρκετά, διότι μεγαλύτερη ποσότητα υπάρχει κίνδυνος να οδηγήσει σε ανταγωνισμό του διαλύτη στον εγκλεισμό ή και συμμετοχή του σε αυτή. Ο σχηματισμός προϊόντος εγκλεισμού είναι ορατός από τη μεταβολή της χροιάς του διαλύματος. Η αναλογία συγκέντρωσης της CD και της εγκλεισμένης ουσίας, η θερμοκρασία καθώς και ο χρόνος ανάδευσης προσαρμόζονται στο κάθε πείραμα. Επομένως, παρασκευάζονται αρκετοί κρύσταλλοι υπό διάφορες συνθήκες και συγκεντρώσεις έως ότου ληφθεί ο κρύσταλλος με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Το διάλυμα μετά την ανάδευση εισάγεται σε πυρίμαχους γυάλινους σωληνίσκους με βιδωτό πώμα. Οι σωληνίσκοι εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο 70°C μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Αν δε γίνει διαυγές τότε δεν αναμένεται ο σχηματισμός κρυστάλλου, ενώ εάν σχηματιστεί ίζημα απομακρύνεται. Τέλος οι σωληνίσκοι τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 70°C και αρχίζει η σταδιακή ψύξη τους μέχρι τη θερμοκρασία περιβάλλοντος με μέγιστη θερμοβαθμίδα 10°C/24 ώρες. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η θερμοβαθμίδα μειώνεται. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται όταν ως θερμοκρασία περιβάλλοντος ρυθμιστεί η 17°C-18°C. Η τοποθέτηση των διαλυμάτων στο ψυγείο θα μπορούσε να δράσει ευεργετικά.

### 5.3.2 Μέθοδος της αργής ψύξης για σύμπλοκα της DIMEB

Η μέθοδος προσαρμόστηκε στην ιδιαίτερη συμπεριφορά της DIMEB εξαιτίας της διαλυτότητάς της. Αρχικά ζυγίζονται ισομοριακές ποσότητες της DIMEB και της ξενιζόμενης ουσίας. Στην παρούσα μελέτη η αναλογία των moles (molar ratio) για το προϊόν εγκλεισμού ήταν 1:1 και χρησιμοποιήθηκαν 39.6mg DIMEB και 4.88mg *p*-κουμαρικού οξέος. Ακολουθεί ανάδευση του πυκνού διαλύματος της ουσίας υπό σταθερή θερμοκρασία 38°C-50°C μέχρι να διαλυθεί και έπειτα προστίθεται διάλυμα της DIMEB σε συγκέντρωση κοντά στο σημείο κορεσμού. Με τη προσθήκη μικρής ποσότητας κρύου νερού αποφεύγεται ο σχηματισμός ιζήματος και η θερμοκρασία κατά την ανάδευση δε πρέπει να υπερβαίνει τους 40°C. Η διάρκεια ανάδευσης κυμαίνεται από 15 λεπτά έως 3 ώρες. Η στιγμιαία γαλακτόχροη χροιά του διαλύματος πιστοποιεί το σχηματισμό κρυστάλλων. Ακολουθεί τοποθέτηση του διαλύματος σε δοχείο ζυγίσεως επικαλυπτόμενο με πλαστικό υμένα, ο οποίος είναι διάτρητος σε διάφορα σημεία και εισάγεται σε κλίβανο υπό σταθερή θερμοκρασία 45°C-52°C και σε ατμόσφαιρα κορεσμένη σε υγρασία. Οι κρύσταλλοι λαμβάνονται 1-7 ημέρες μετά. Απαραίτητο είναι να απομακρυνθεί το μητρικό διάλυμα στο οποίο βρίσκονται οι κρύσταλλοι από το δοχείο. Με την αναστροφή του δοχείου απομακρύνεται η μεγαλύτερη ποσότητα του μητρικού διαλύματος αλλά για την πλήρη απομάκρυνση οι κρύσταλλοι είτε επανατοποθετούνται στο κλίβανο είτε το διάλυμα απορροφάται με διηθητικό χαρτί. Λόγω της ευαισθησίας των συγκεκριμένων κρυστάλλων ρίπτεται μείγμα ελαίων έως ότου καλυφθούν πλήρως. Στη συγκεκριμένη περίπτωση της κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκε παραφινέλαιο. Η θερμοκρασία στο χώρο συντήρησης πρέπει να είναι 23°C-27°C αλλιώς οι κρύσταλλοι γίνονται εύθρυπτοι.

## 5.4 Οξειδωτική ικανότητα σιδήρου του πλάσματος (*Ferric Reducing Ability of Plasma - FRAP*)

Η πειραματική διαδικασία της δοκιμής FRAP πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που εφαρμόστηκε από τους Benzie *et al* (1996)<sup>50</sup>.

### 5.4.1 Παρασκευή αντιδραστηρίων

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή FRAP συντίθεται από την ένωση των τριών ακόλουθων χημικών αντιδραστηρίων σε αναλογία A:B:C→10:1:1 και διατηρείται σε θερμοκρασία 37°C για δύο ώρες.

- A. 300mM CH<sub>3</sub>COONa\*3H<sub>2</sub>O
- B. 10mM TPTZ [2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine]
- C. 20mM FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O

### 5.4.2 Παρασκευή διαλυμάτων

Για τη δοκιμή FRAP παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα *p*-κουμαρικού οξέος σε συγκέντρωση 1\*10<sup>-3</sup>, δηλαδή διαλυτοποιήθηκαν 0.00328g σε 20mL απιονισμένου νερού. Επίσης παρασκευάστηκε διάλυμα για την DIMEB 10<sup>-2</sup>, δηλαδή διαλυτοποιήθηκαν 0.2663g σε 20mL απιονισμένου νερού και τέλος για το προϊόν εγκλεισμού παρασκευάστηκε διάλυμα σε αναλογία *p*-κουμαρικού/κυκλοδεξτρίνης 1:10 (για να υπάρχει βεβαιότητα σχηματισμού του προϊόντος εγκλεισμού). Επίσης η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε για το προϊόν εγκλεισμού απορρέει και από την ήδη υπολογισμένη  $K_s$  για διάλυμα 1:1 αφού:

$$\begin{aligned}
 & \frac{K_s}{[p\text{-κουμαρικό}]+[DIMEB]} \leftrightarrow [p\text{-κουμαρικό}/DIMEB] \\
 \leftrightarrow K_s &= [p\text{-κουμαρικό}/DIMEB]/[p\text{-κουμαρικό}] + [DIMEB] \\
 \leftrightarrow K_s * [DIMEB] &= [p\text{-κουμαρικό}/DIMEB]/[p\text{-κουμαρικό}] \\
 \leftrightarrow [p\text{-κουμαρικό}/DIMEB] &= [p\text{-κουμαρικό}] = 192 * 10^{-2} \\
 \leftrightarrow [p\text{-κουμαρικό} / DIMEB] &= 1,92 * [p\text{-κουμαρικό}]
 \end{aligned}$$

Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω έχουμε περίπου 66,6% του προϊόντος εγκλεισμού στο διάλυμα και 33,3% ελεύθερου *p*-κουμαρικού οξέος. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε shaker (200 rpm), σε θερμοκρασία δωματίου, για χρονικό διάστημα 24 ωρών, προκειμένου να αποκατασταθεί η ισορροπία της αντίδρασης. Από κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα χρησιμοποιούνταν 50μL σε 1mL διαλύματος FRAP και πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις.

### 5.4.3 Σχεδιασμός πρότυπης καμπύλης

Για την πρότυπη καμπύλη λήφθηκαν τιμές απορρόφησης του πρότυπου διαλύματος ασκορβικού οξέος, συγκέντρωσης 1M στα 593nm σε φασματοφωτόμετρο. Οι όγκοι του πρότυπου διαλύματος εκφράζονται σε μικρόλιτρα (μL) και η απορρόφηση αυτών σχετίζεται με την απορρόφηση ισοδύναμων ποσοτήτων εκχυλίσματος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δοκιμή. Οι όγκοι ασκορβικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2μM, 4μM, 6μM, 8μM, 10μM, 15μM.

#### 5.4.4 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιείται καλή ανάδευση των δειγμάτων που τους προστέθηκε το διάλυμα FRAP και στη συνέχεια επωάζονται στους 37°C για 4 λεπτά. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 593 nm. Η τιμή της απορρόφησης (ABS) στα 593 nm μετατρέπεται στην τιμή FRAP του δείγματος ανάλογα με την απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος και με την απορρόφηση του προτύπου δείγματος F που θα επιλεγεί (η οποία πάντα πρέπει να είναι μικρότερη από την απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος). Αναλυτικότερα, οι τιμές FRAP του κάθε δείγματος υπολογίζονται σε  $\mu\text{M}$  σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Τιμή FRAP (}\mu\text{M)} = (\text{ABS δείγματος}/\text{ABS προτύπου}) \cdot \text{τιμή προτύπου (}\mu\text{M)}$$

### 5.5 Ανάλυση δομών με το το Vina μέσω των AutoDock Tools

Οι απεικονίσεις του προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/*p*-κουμαρικού οξέος υπολογίστηκαν με το AutoDock Vina<sup>52</sup>. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εύρεση της βέλτιστης διαμόρφωσης του προϊόντος εγκλεισμού περιλάμβανε τα ακόλουθα βήματα.

#### 1. Λήψη συντεταγμένων της δομής του *p*-κουμαρικού και της DIMEB

Για την απόκτηση των συντεταγμένων έγινε αναζήτηση στο διαδίκτυο. Η δομή του *p*-κουμαρικού λήφθηκε από το Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), αναζητώντας τη 3D δομή του σε αρχείο τύπου sdf. Η δομή της DIMEB λήφθηκε από υπάρχουσα βιβλιογραφία με τύπο αρχείου cif<sup>53</sup>. Το αρχείο αυτό είναι καταχωρημένο στη βάση δεδομένων CCDC (Cambridge Crystallographic Data Center, <http://beta-www.ccdc.cam.ac.uk/pages/Home.aspx#>).

#### 2. Επεξεργασία αρχείου cif

Το αρχείο τύπου cif της DIMEB λήφθηκε από υπάρχουσα βιβλιογραφία με αποτέλεσμα να μην περιέχει μόνο τη δομή της DIMEB αλλά και τη δομή άλλων μορίων που περιελάμβανε η εν λόγω δημοσίευση. Επομένως είναι απαραίτητη η αφαίρεση όλων των ατόμων που δεν ανήκουν στο μόριο της DIMEB, έτσι ώστε να μπορεί να ακολουθήσει επεξεργασία αυτής από το πρόγραμμα. Κάθε αρχείο cif μπορεί να διαβαστεί ως κείμενο σε οποιοδήποτε τύπο κειμενογράφου (Microsoft office word, Notepad) και να τροποποιηθεί.

#### 3. Μετατροπή τύπου αρχείων

Το AutoDock Vina δε μπορεί να επεξεργαστεί αρχεία τύπου cif και sdf. Επομένως, για να γίνουν επεξεργάσιμα πρέπει να μετατραπούν σε τύπο pdb. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με το πρόγραμμα Mercury<sup>54</sup>.

#### 4. Επεξεργασία των δομών με το AutoDock Vina

Το πρώτο στάδιο είναι το άνοιγμα και των δύο αρχείων pdb από τα AutoDock tools επιλέγοντας το read molecule. Έπειτα μπορεί να οριστεί από το χρήστη ένα πλέγμα (grid box) μέσα στο οποίο

υπάρχει η μεγαλύτερη πιθανότητα σχηματισμού του προϊόντος εγκλεισμού. Στη προκειμένη περίπτωση η περιοχή που περιλαμβάνει το πλέγμα είναι όλο το μόριο της DIMEB και κυρίως η υδρόφοβη κοιλότητά της. Μία επιπλέον επιλογή που διαθέτει το πρόγραμμα είναι η ικανότητα της προβολής των δεσμών που μπορούν να περιστραφούν. Στη παρούσα περίπτωση βρέθηκαν οι δεσμοί του ξενιζόμενου μορίου που μπορούν να περιστραφούν (rotatable bonds of ligand). Έπειτα το πρόγραμμα επεξεργάζεται τα δύο μόρια και σύμφωνα και δίνει τόσες απεικονίσεις του προϊόντος όσες έχουν οριστεί από το χρήστη (exhaustiveness). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε ενώ έχει οριστεί ότι τα δύο μόρια θα είναι άκαμπτα (rigid). Μπορεί όμως να γίνει ορίζοντας κάποια άτομα ευέλικτα (flexible). Στη παρούσα μελέτη ορίστηκαν ως flexible residues τρεις από τις επτά γλυκοζιτικές μονάδες της DIMEB (Flexible Residues). Το προϊόν που προκύπτει από τη flexible DIMEB είναι πιο αντιπροσωπευτικό σε σχέση με το πειραματικά σχηματιζόμενο προϊόν. Με τη λήξη του υπολογισμού του προϊόντος εγκλεισμού δίνεται ένα αρχείο txt που περιέχει τη  $\Delta G$  (ελεύθερη ενέργεια Gibbs) για όλες της πιθανές διαμορφώσεις που έδωσε το πρόγραμμα γι αυτό. Η διαμόρφωση με τη μικρότερη  $\Delta G$  είναι και πιο αντιπροσωπευτική για το προϊόν εγκλεισμού.

#### 5. Προβολή διαμορφώσεων προϊόντος εγκλεισμού με το PyMOL

Με το πρόγραμμα PyMOL μπορεί να ανοιχθεί το αρχείο που προήλθε από την επεξεργασία του προϊόντος εγκλεισμού στο Vina μέσω των AutoDock Tools.

### 5.6 Αντιδραστήρια και Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν λήφθηκαν από την εταιρία Applichem, σε βαθμό καθαρότητας 'χημικώς καθαρά'. Το ασκορβικό οξύ, η DIMEB και το *p*-κουμαρικό οξύ, λήφθηκαν από την εταιρεία Fluka. Τα  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  και TPTP λήφθηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich και το  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  από την εταιρεία Riedel-de Haën.

Όλα τα παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν χωρίς να υποστούν περαιτέρω επεξεργασία.



# **III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

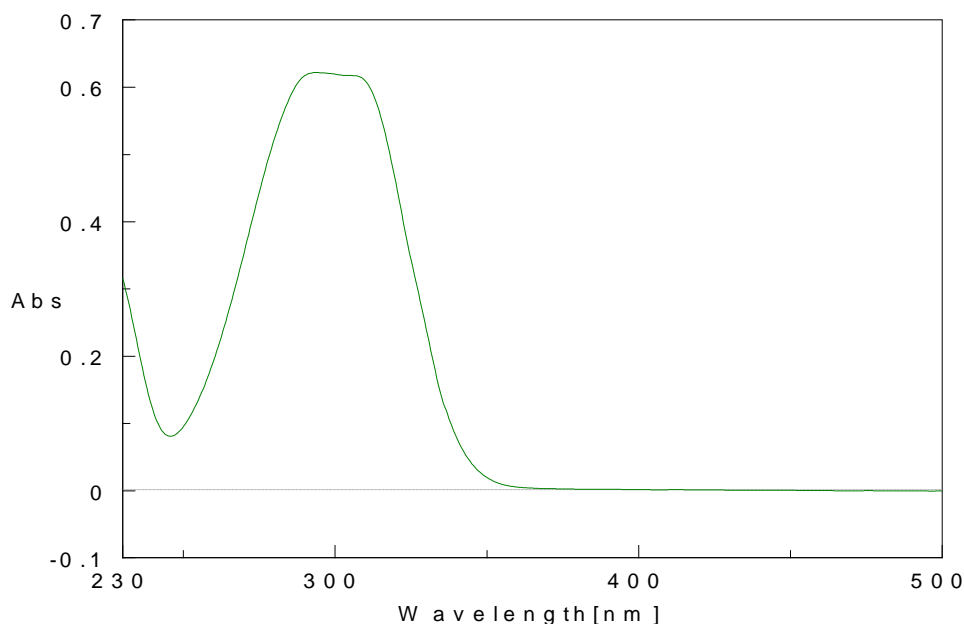
## Κεφάλαιο 6

### 6.1 Φασματοσκοπία υπεριώδους (UV spectroscopy)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη διάφορων φασμάτων από διαλύματα της DIMEB, του *p*-κουμαρικού οξέος καθώς και τον συνδυασμό αυτών. Τα φάσματα UV είναι μία ένδειξη όσον αφορά τον σχηματισμό του προϊόντος εγκλεισμού του ξενιζομένου μορίου στη DIMEB, αλλά όχι απόλυτη απόδειξη αυτού. Αρχικά λήφθηκαν τα φάσματα για τη καμπύλη αναφοράς του *p*-κουμαρικού οξέος και έπειτα τα φάσματα για τη καμπύλη της διαλυτότητας (Higuchi-Connors).

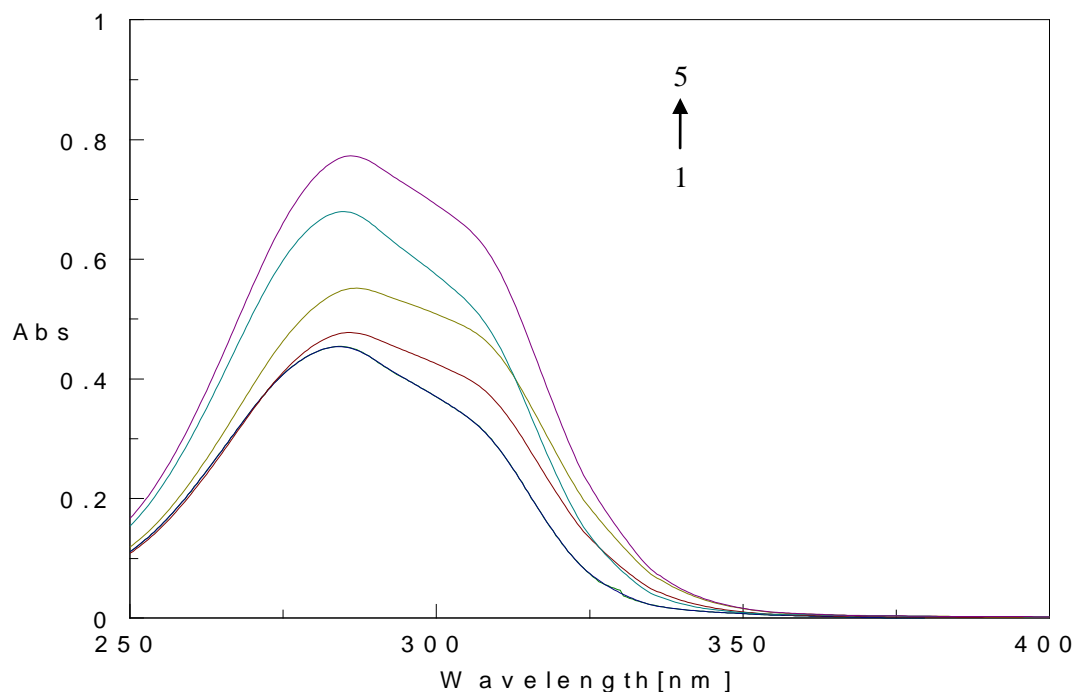
#### 6.1.1 Φάσματα απορρόφησης

Η λήψη φασμάτων για το σχεδιασμό καμπύλης αναφοράς αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της πειραματικής διαδικασίας διότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο σύγκρισης για τις περαιτέρω μετρήσεις. Το *p*-κουμαρικό οξύ παρουσίασε  $\lambda_{\max}$  στα 295nm (βλ. εικόνα 17).



**Εικόνα 17:** Φάσμα απορρόφησης UV σε μεθανολικό διάλυμα *p*-κουμαρικού οξέος

Οι UV απορροφήσεις του *p*-κουμαρικού οξέος σε υδατικά διαλύματα παρουσία της DIMEB σε διάφορες συγκεντρώσεις με σκοπό τον υπολογισμό της διαλυτότητας του οξέος παρουσίασαν  $\lambda_{\max}$  284-286nm (βλ. εικόνα 18). Παρατηρείται πως τα φάσματα αυτά παρουσιάζουν ελαφρά μετατόπιση του  $\lambda_{\max}$  προς τα αριστερά, γεγονός που πιθανότατα να οφείλεται στο σχηματισμό προϊόντος εγκλεισμού με τη DIMEB.



**Εικόνα 18:** Φάσμα απορρόφησης UV σε υδατικό διάλυμα *p*-κουμαρικού οξέος με παρουσία DIMEB.

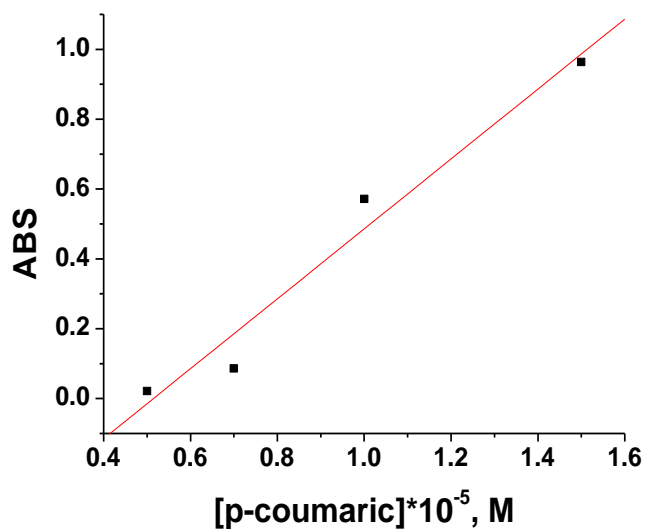
Οι καμπύλες στην *εικόνα 18* αντιστοιχούν σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις DIMEB (βλ. *πίνακας 7*), ενώ η συγκέντρωση του ξενιζομένου μορίου είναι σε σταθερή περίσσεια. Άμεση είναι η παρατήρηση ότι η απορρόφηση του *p*-κουμαρικού οξέος, άρα και η συγκέντρωσή του, συνδέεται ανάλογα με τη συγκέντρωση της DIMEB. Κατά συνέπεια, η παρατήρηση αυτή είναι η ένδειξη του ότι η διαλυτότητα του *p*-κουμαρικού οξέος αυξήθηκε με την παρουσία της κυκλοδεξτρίνης, γεγονός που δείχνει πιθανό σχηματισμό του προϊόντος εγκλεισμού.

**Πίνακας 7:** Διαφορετικές συγκεντρώσεις DIMEB στα υδατικά διαλύματα με *p*-κουμαρικό οξύ

	Συγκέντρωση της DIMEB (M)	Απορρόφηση (Abs)
<b>1</b>	0.0075	0.4541
<b>2</b>	0.0225	0.4776
<b>3</b>	0.0376	0.5518
<b>4</b>	0.0526	0.6798
<b>5</b>	0.0676	0.7728

### 6.1.2 Διαγράμματα διαλυτότητας (Phase-solubility diagrams)

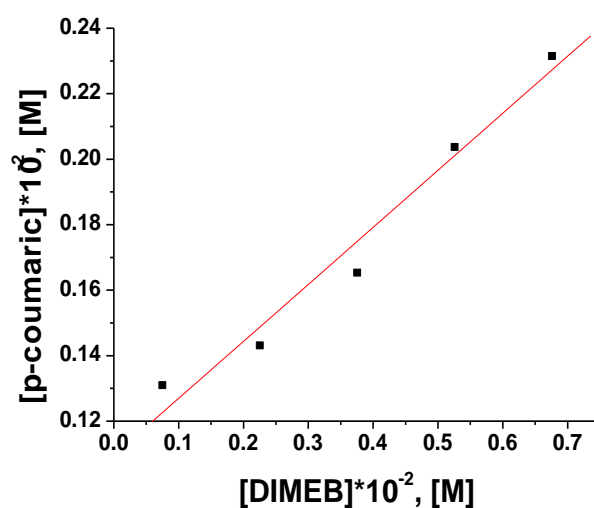
Σύμφωνα με τη κατηγοριοποίηση των *Higuchi* και *Connors* τα διαγράμματα της διαλυτότητας για τη DIMEB και το *p*-κουμαρικό οξύ είναι τύπου A διότι η διαλυτότητα του υποστρώματος (δηλαδή του *p*-κουμαρικού οξέος) αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του προσδέτη (δηλαδή της DIMEB). Το προϊόν εγκλεισμού είναι πρώτης τάξης διότι λαμβάνεται ένα προφίλ της διαλυτότητας τύπου A<sub>L</sub> (βλ. *εικόνα 20*).



**Εικόνα 19:** Διάγραμμα διαλυτότητας για τα διαλύματα αναφοράς του *p*-κουμαρικού οξέος

Συγκέντρωση του <i>p</i> -κουμαρικού οξέος (M)	Απορρόφηση (Abs)
$5 \cdot 10^{-6}$	0.0217
$7 \cdot 10^{-6}$	0.0334
$10^{-5}$	0.6219
$1.5 \cdot 10^{-5}$	0.9533

Ο τύπος της καμπύλης της εικόνας 19 είναι  $y = ax + \beta$ . Επομένως είναι ευθεία με  $R = 0.98$  και η εξίσωση της ευθείας διαμορφώνεται ως εξής:  $y = -0.515 + 1001x$ . Εξαιτίας της μεγάλης διαφοράς του  $\beta$  από το  $\alpha$ , το  $\beta$  θεωρείται αμελητέο, επομένως  $y = 1001x$ .



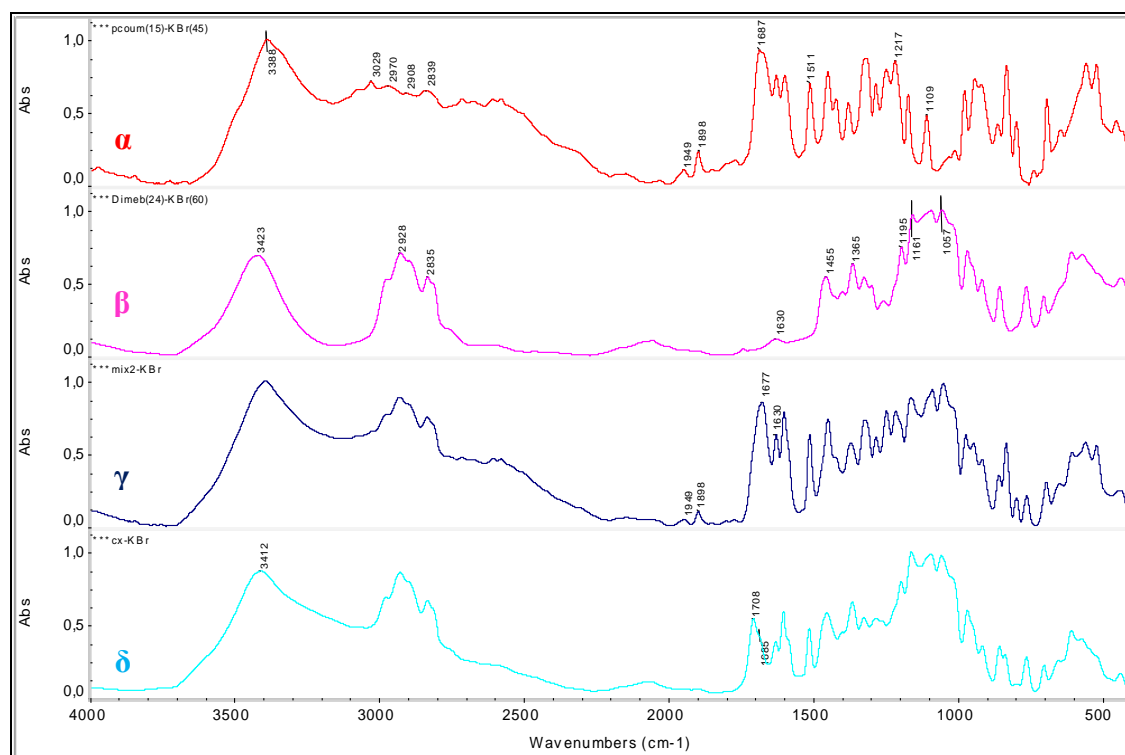
**Εικόνα 20:** Διάγραμμα διαλυτότητας του *p*-κουμαρικού οξέος και της DIMEB

Στην *εικόνα 20* παρουσιάζεται το διάγραμμα διαλυτότητας της συγκέντρωσης του *p*-κουμαρικού οξέος σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της DIMEB και από το σχήμα της καμπύλης διαλυτότητας υποδεικνύεται πως ένα μοριακό ποσοστό 1:1 είναι το πιο πιθανό για τα προϊόντα εγκλεισμού που έχουν σχηματιστεί. Οι συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον τύπο των Beer-Lambert. Η καμπύλη είναι τύπου  $y = ax + \beta$ . Επομένως είναι ευθεία με  $R = 0.984$  και η εξίσωση της ευθείας διαμορφώνεται ως εξής:  $y = -0.001 + 0.174x$ .

Για τον υπολογισμό της σταθεράς σύνδεσης  $K_s$ , χρησιμοποιήθηκαν οι παράμετροι της ευθείας του διαγράμματος (βλ. *εικόνα.20*), δηλαδή ως slope χρησιμοποιήθηκε το  $a$  της εξίσωσης της ευθείας και ως intercept ( $S_0$ ) το  $\beta$ . Σύμφωνα με την εξίσωση των *Higuchi* και *Connors*  $K_{1:1} = \text{Slope} / S_0(1-\text{Slope})$  η  $K_s$  του προϊόντος εγκλεισμού *p*-κουμαρικού οξέος/DIMEB υπολογίστηκε πως είναι  $192 \text{ M}^{-1}$ .

## 6.2 Φασματοσκοπία υπερόθρου (FT-IR spectroscopy)

Με τη χρήση της μεθόδου της φασματοσκοπίας υπερόθρου λήφθηκαν φάσματα από το λυοφιλωμένο *p*-κουμαρικό οξύ και τη λυοφιλωμένη DIMEB. Επιπλέον λήφθηκαν φάσματα για τη μίξη των δύο αυτών ενώσεων καθώς και το προϊόν εγκλεισμού αυτών (βλ. *εικόνα 21*).



**Εικόνα 21:** Φάσματα IR των: (α) *p*-κουμαρικό οξύ λυοφιλωμένο (β) DIMEB λυοφιλωμένη, (γ) μίξη των α, β με λειοτριβίση, (δ) προϊόν εγκλεισμού 1:1 των α, β.

Από τα φάσματα που λήφθηκαν αναγνωρίστηκαν ορισμένες κορυφές για τη DIMEB και το *p*-κουμαρικό οξύ, οι οποίες αναγράφονται αναλυτικά στους πίνακες 8 και 9.

**Πίνακας 8:** Κορυφές της DIMEB<sup>18,55</sup>*ν: δόνηση τάσης, δ: δόνηση κάμψης*

Κορυφή απορρόφησης (cm <sup>-1</sup> )	Απόδοση κορυφής
3500-3300	ν (-OH)
2977-2830	ν (αλειφατικών -CH <sub>2</sub> , -CH)
1630	Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των μορίων του H <sub>2</sub> O
1455	δ (O-C-H, H-C-H)
1365	δ (O-C-H, C-C-H)
1198-1030	ν (C-O-O)

Στους πίνακες 8 και 9 αναγράφονται οι απορροφήσεις των κορυφών και που αποδίδονται. Σύμφωνα με τις απορροφήσεις αυτές έγινε και η εκτίμηση των κορυφών στο φάσμα που λήφθηκε από τη μίξη των DIMEB και *p*-κουμαρικό όξυ, που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το προϊόν εγκλεισμού αυτών.

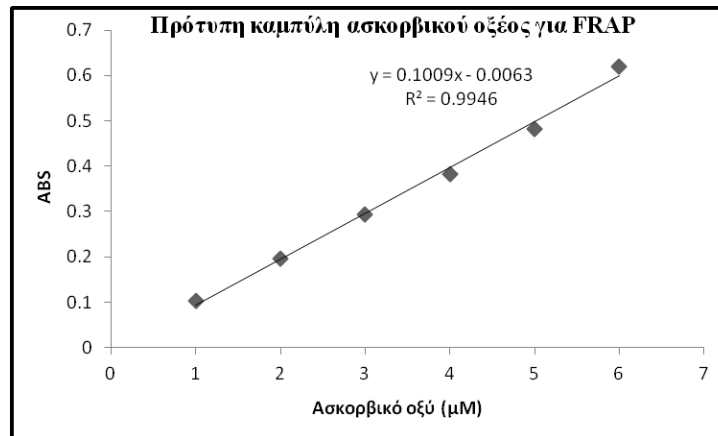
**Πίνακας 9:** Κορυφές του *p*-κουμαρικού<sup>44</sup>*ν: δόνηση τάσης, δ: δόνηση κάμψης*

Κορυφή απορρόφησης (cm <sup>-1</sup> )	Απόδοση κορυφής
3388	ν (-OH)
3029	ν C-H
2970	ν (αλειφατικών -CH)
1898	ν (C=C)
1687	ν (C=O)
1511	Συνολική κίνηση του φαινολικού δακτυλίου
1217	ν (C-O φαινόλης)
1109	ν (C-O αλκοόλης)

Από τη σύγκριση των φασμάτων α και β (βλ. εικόνα 21), προέκυψε μία παρατήρηση όσον αφορά το προϊόν εγκλεισμού. Η κορυφή του *p*-κουμαρικού στα 1898 cm<sup>-1</sup> εμφανίζεται στην περιοχή του καρβονυλίου και υπάρχει στο φάσμα της μίξης των α και β, αλλά όχι στο προϊόν εγκλεισμού (δ), γεγονός που υποδεικνύει πιθανό εγκλεισμό του αρωματικού δακτυλίου στην υδρόφοβη κοιλότητα της DIMEB και αλληλεπίδραση – διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ του *p*-κουμαρικού οξέος και της DIMEB.

### 6.3 Οξειδωτική ικανότητα σιδήρου του πλάσματος (*Ferric Reducing Ability of Plasma - FRAP*)

Οι μετρήσεις των απορροφήσεων που λήφθηκαν για γνωστές συγκεντρώσεις του ασκορβικού (βλ. πίνακας 10) οξέος οδήγησαν στη σχεδίαση της πρότυπης καμπύλης του (βλ. εικόνα 22).



Εικόνα 22: Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος για τη δοκιμή FRAP

Πίνακας 10: Απορροφήσεις ασκορβικού οξέος για την πρότυπη καμπύλη

Ασκορβικό Οξύ (μM)	Απορρόφηση (ABS)
2	0.104
4	0.196
6	0.294
8	0.383
10	0.483
15	0.62

Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη και την εξίσωση για την τιμή FRAP υπολογίστικαν οι τιμές FRAP. Ακολουθούν οι απορροφήσεις των διαλυμάτων σε φασματοφωτόμετρο με σκοπό των υπολογισμό της τιμής FRAP.

1. *p*-κουμαρικό οξύ

Επανάληψη	Απορρόφηση (593nm)
1 <sup>η</sup>	0.288
2 <sup>η</sup>	0.298
3 <sup>η</sup>	0.296
4 <sup>η</sup>	0.300
Μέσος όρος	0.2955

$$\text{Τιμή FRAP} = (0.2955/0.294) \cdot 6\mu\text{M} = 6.03\mu\text{M}$$

## 2. DIMEB

Επανάληψη	Απορρόφηση (593nm)
1 <sup>η</sup>	0
2 <sup>η</sup>	0
3 <sup>η</sup>	0
4 <sup>η</sup>	0
Μέσος όρος	0

Τιμή FRAP = 0

## 3. Προϊόν εγκλεισμού

Επανάληψη	Απορρόφηση (593nm)
1 <sup>η</sup>	0.211
2 <sup>η</sup>	0.216
3 <sup>η</sup>	0.223
4 <sup>η</sup>	0.236
Μέσος όρος	0.2215

Τιμή FRAP =  $(0.2215/0.196) \cdot 4\mu\text{M} = 4.52\mu\text{M}$

Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως δεν υπάρχει αλληλεπίδραση του διαλύματος FRAP με την DIMEB, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα του *p*-κουμαρικού οξέος παρουσιάζει ελάττωση παρουσία DIMEB. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου (εικόνα 28) των υδροξυλίων του *p*-κουμαρικού οξέος με τα υδροξύλια της DIMEB.

## 6.4 Κρυσταλλογραφία του προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/*p*-κουμαρικού οξέος

### 6.4.1 Κρυστάλλωση προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/*p*-κουμαρικού οξέος

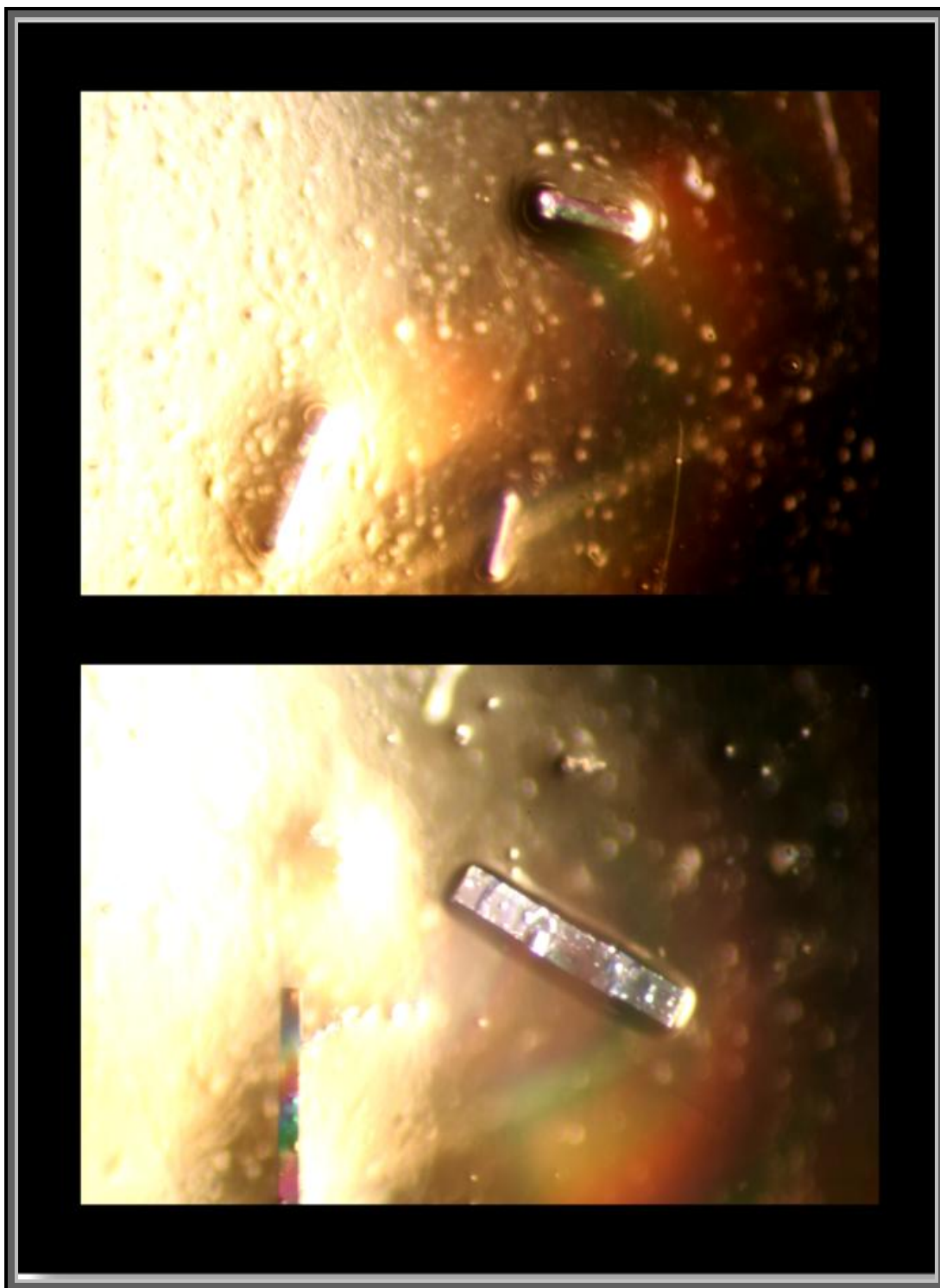
Με τη διαδικασία της κρυστάλλωσης παρασκευάστηκε μονοκρύσταλλος του προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/*p*-κουμαρικού οξέος και λήφθηκαν φωτογραφίες από στερεοσκόπιο του εργαστηρίου. Οι κρύσταλλοι προέκυψαν από στοιχειομετρία 1:1. Είναι ραβδόμορφοι και αξιοποιήσιμοι, αφού δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες ατέλειες όπως ρωγμές και επιπλέον δεν είναι προσκολλημένοι σε αυτούς μικρότεροι κρύσταλλοι που θα εμπόδιζαν την μελέτη τους (βλ. εικόνα 23).

### 6.4.2 Συλλογή δεδομένων περίθλασης – προκαταρκτικά αποτελέσματα

Η συλλογή δεδομένων έγινε από μέλη του εργαστηρίου Φυσικής του ΓΠΑ με έκθεση κατάλληλου μονοκρυστάλλου υπό συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου σε ακτινοβολία



σύγχροτρον από τη δέσμη X11 του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL) στις εγκαταστάσεις του DORIS storage ring, DESY, του Αμβούργου. Οι εικόνες περίθλασης αναλύθηκαν με το πρόγραμμα XDS<sup>56</sup>.



**Εικόνα 23:** Μονοκρύσταλλος προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/p-κουμαρικού οξέος

Ελήφθησαν δεδομένα που φθάνουν σε διακριτικότητα (resolution) 0,96 Å. Τελικά έγιναν αποδεκτές 10473 ανεξάρτητες ανακλάσεις που αντιστοιχούν σε πληρότητα 98,9% (βλ. πίνακα 11). Από την προκαταρκτική ανάλυση προκύπτει ότι το προϊόν εγκλεισμού *p*-κουμαρικό/DIMEB κρυσταλλώνει σε μονοκλινές κρυσταλλικό σύστημα και σε ομάδα χώρου P2<sub>1</sub>. Η μοναδιαία κυψελίδα έχει διαστάσεις  $a=15.000(18)\text{Å}$ ,  $b=10.500(13)\text{Å}$ ,  $c=54.10(2)\text{Å}$ ,  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=93.6(2)^\circ$  και  $\gamma=90^\circ$ .

Αρχικές προσπάθειες επίλυσης της κρυσταλλικής δομής, με άμεσες μεθόδους με το πρόγραμμα Shelx97<sup>57</sup> ή με τη μέθοδο μοριακής αντικατάστασης με το πρόγραμμα DIRDIF<sup>58</sup> μέσα από το πακέτο προγραμμάτων Wingx<sup>59</sup> έδειξαν ότι η ασύμμετρη μονάδα αποτελείται από 2 σύμπλοκα και επομένως, σύμφωνα με τις πράξεις συμμετρίας της ομάδας χώρου P2<sub>1</sub>, 4 σύμπλοκα διευθετούνται στη μοναδιαία κυψελίδα.

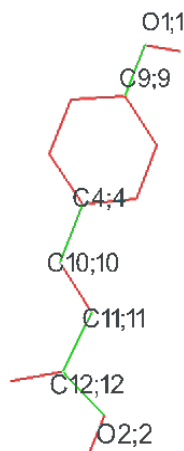
**Πίνακας 11:** Κρυσταλλογραφικά δεδομένα

<b>Πειραματικά δεδομένα</b>	
Θερμοκρασία συλλογής δεδομένων	293K
Μήκος κύματος Cu	0.8148 Å
Διαστάσεις κρυστάλλου	0.020x0.050x0.050 mm
Κρυσταλλικό Σύστημα, Ομάδα χώρου	Μονοκλινές, P2 <sub>1</sub>
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	$a=15.000(18)\text{Å}$ $\alpha=90^\circ$ $b=10.500(13)\text{Å}$ $\beta=93.6(2)^\circ$ $c=54.10(2)\text{Å}$ $\gamma=90^\circ$
Πλήθος συνολικών /ανεξαρτήτων ανακλάσεων	41791 / 10473 [R(merged) = 0.044]
Πληρότητα ως προς $\theta=66.59$	98.9%
Διακριτικότητα	0.96 Å
Z	4

### 6.5 *In silico* μελέτη της δομής του προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/*p*-κουμαρικού οξέος

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη πραγματοποίηση της *in silico* μελέτης του προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/*p*-κουμαρικού είναι η molecular docking. Πρόκειται για μία υπολογιστική διαδικασία που σκοπεύει στην αποτελεσματική πρόβλεψη της μη ομοιοπολικής σύνδεσης των μακρομορίων ή, πιο συχνά, ενός μακρομορίου (υποδοχέα) και ενός μικρού μορίου (συνδέτη), ξεκινώντας με τις μη δεσμευμένες δομές τους, οι οποίες λαμβάνονται από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (molecular dynamics), ή από μοντέλα ομολογίας κ.λπ. Ο στόχος είναι η

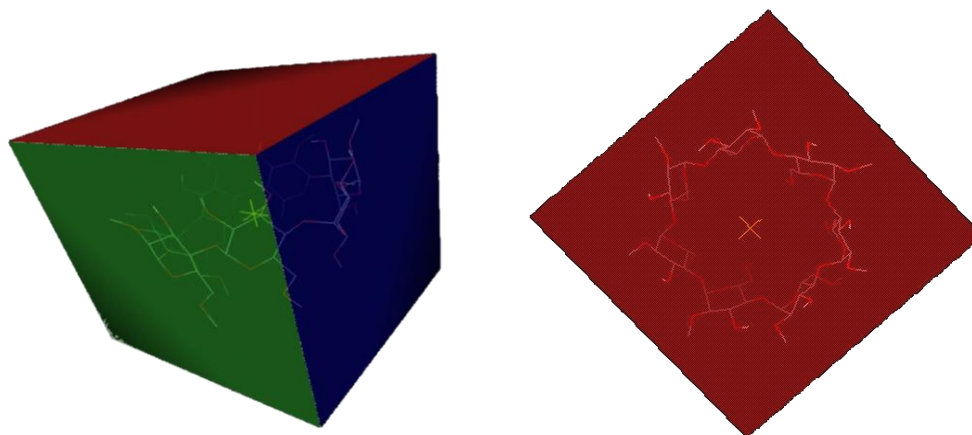
πρόβλεψη των διαμορφώσεων μετά τη σύνδεση καθώς και της συγγένειας της σύνδεσης. Η πρόβλεψη της σύνδεσης μικρών μορίων με πρωτεΐνες έχει συγκεκριμένη πρακτική σημασία διότι χρησιμοποιείται για διαλογή screening σε εικονικές βιβλιοθήκες μορίων που μοιάζουν με φάρμακα έτσι ώστε να αποκτηθούν οδηγοί για περαιτέρω ανάπτυξη των φαρμάκων. Η μέθοδος docking μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης για να γίνει προσπάθεια πρόβλεψης διαμορφώσεων γνωστών συνδετών, όταν οι πειραματικές δομές δεν είναι διαθέσιμες. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το Vina με το AutoDock.



**Εικόνα 24:** Δεσμοί του *p*-κουμαρικού που μπορούν να περιστραφούν.

Η επιλογή του Vina για την εύρεση των δεσμών του *p*-κουμαρικού που μπορούν να περιστραφούν έδειξε πως οι δεσμοί αυτοί είναι οι O9(9)...O1(1), C4(4)...C10(10), C11(11)...C12(12) και C12(12)...O2(2) (δεσμοί με πράσινο χρώμα, βλ. *εικόνα 24*). Ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να αλλάξει έναν ή περισσότερους δεσμούς σε περιστρέψιμους εάν το επιθυμεί. Στη παρούσα περίπτωση κάτι τέτοιο δε θεωρήθηκε σκόπιμο. Στην δομή του *p*-κουμαρικού της *εικόνας 24* έχουν αφαιρεθεί τα υδρογόνα.

Το grid box αποτελεί μία άλλη επιλογή του Vina είναι η περιοχή που ορίζεται από το χρήστη και δείχνει εντός ποιών ορίων θα γίνει αναζήτηση της καταλληλότερης θέσης του ξενιζόμενου μορίου έτσι ώστε να σχηματιστεί προϊόν εγκλεισμού.



**Εικόνα 25:** Περιοχή του ξενιστή που ορίστηκε από το χρήστη ως grid box.

Ο χειριστής επιλέγει πόσα σημεία σε κάθε μία από τις διαστάσεις (number of points in x-,y- and z- dimension) επιθυμεί να έχει. Στη παρούσα μελέτη και στις τρεις διαστάσεις ο αριθμός των σημείων ήταν 40 και το grid box περιλαμβάνει όλο το μόριο της κυκλοδεξτρίνης και ένα μικρό μέρος της περιοχής που τη περιβάλλει (βλ. εικόνα 25).

**Πίνακας 12:** Πίνακας δεδομένων που υπολογίζονται από το Vina για τη  $\Delta G$  όταν το μόριο έχει flexible residues (αριστερά) και όταν είναι rigid (δεξιά).

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode rmsd l.b.	rmsd u.b.	mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-3.1	0.000	0.000	1	-4.7	0.000	0.000
2	-3.0	2.439	5.729	2	-4.7	0.967	1.288
3	-3.0	2.978	3.664	3	-4.6	2.947	3.465
4	-2.9	2.100	2.366	4	-4.6	3.102	3.410
5	-2.9	3.266	4.029	5	-4.5	3.068	3.297
6	-2.8	3.123	3.931	6	-4.5	2.487	2.921
7	-2.8	3.510	4.473	7	-4.4	1.838	2.351
8	-2.8	2.912	3.780	8	-4.3	1.914	2.050
9	-2.7	3.783	4.515	9	-4.3	3.439	3.684

Για την εύρεση της καταλληλότερης διαμόρφωσης του προϊόντος εγκλεισμού υπολογίζεται η  $\Delta G$ . Σύμφωνα με τον αριθμό των δομών που ορίζει ο χρήστης, δίνονται από το πρόγραμμα οι αντίστοιχες  $\Delta G$ . Η  $\Delta G$  εξαρτάται άμεσα από το αν τα μόρια που συμμετέχουν στο προϊόν εγκλεισμού είναι εύκαμπτα. Με τη χρήση της επιλογής του Vina για flexible residues τα αποτελέσματα είναι εντελώς διαφορετικά (βλ. πίνακας 12). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά επιλέγεται η δομή με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και στη συνέχεια μπορεί να μελετηθεί η δομή του προϊόντος εγκλεισμού καθώς και οι υδρογονικοί που αναπτύσσονται κατά τον εγκλεισμό. Η ενέργεια που χρησιμοποιείται είναι η πρώτη, δηλαδή η -3.1. Χρησιμοποιώντας τον τύπο

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \beta$$

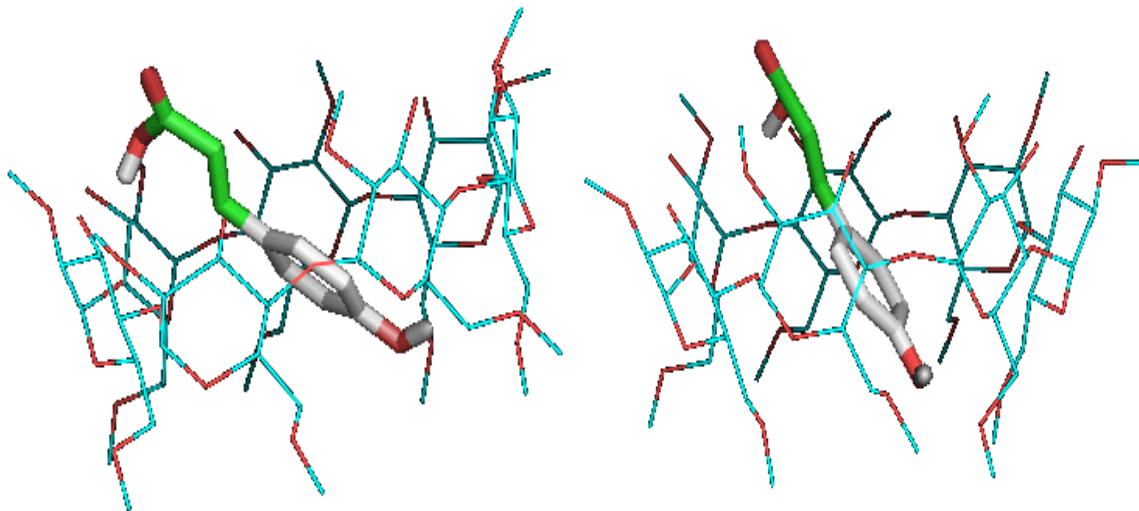
όπου που το  $\beta$  είναι

$$\beta_n = \prod_{i=1}^n K_i, (\beta = 1, 2, 3, \dots)$$

υπολογίστηκε η  $K_s$ . Στην παρούσα περίπτωση το  $\beta=1$ , επομένως  $\beta=K=188 \text{ M}^{-1}$ , τιμή που συμπίπτει σε μεγάλο βαθμό με την πειραματικά υπολογισμένη μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών τιμή ( $192 \text{ M}^{-1}$ ).

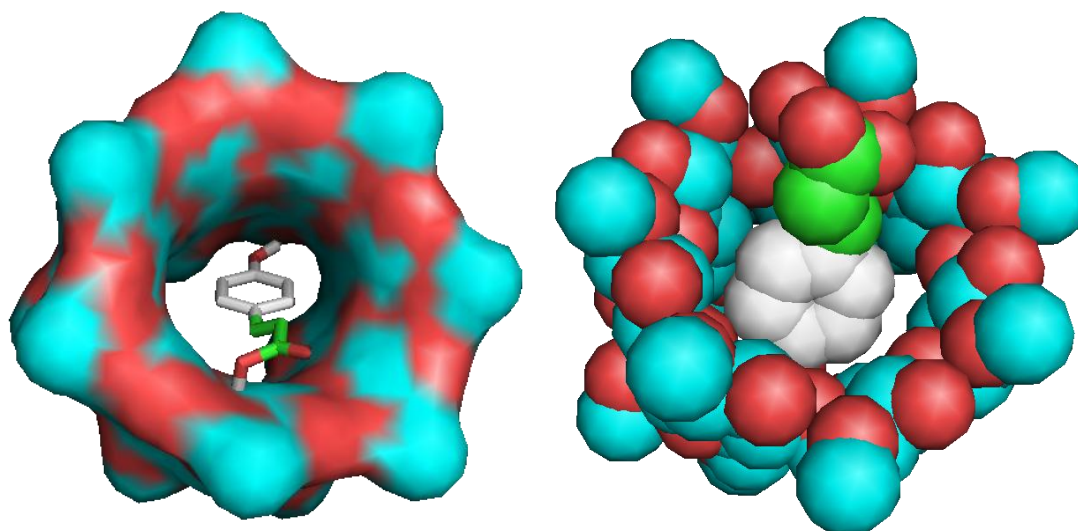
Στις εικόνες 26, 27 και 28 που ακολουθούν, τα μοντέλα της κυκλοδεξτρίνης φέρουν κόκκινο χρώμα για τα άτομα του οξυγόνου και μπλε για τον άνθρακα. Αντίστοιχα για το *p*-κουμαρικό, το

λευκό και το πράσινο είναι για τους άνθρακες του βενζολικού δακτυλίου και της ουράς του μορίου αντίστοιχα και το κόκκινο για το οξυγόνο. Στις εικόνες αυτές παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο υπολογίστηκε πως θα είναι η διαμόρφωση του προϊόντος εγκλεισμού, όπου ο δακτύλιος του *p*-κουμαρικού οξέος έχει εγκλεισθεί στην υδρόφοβη κοιλότητα της DIMEB.



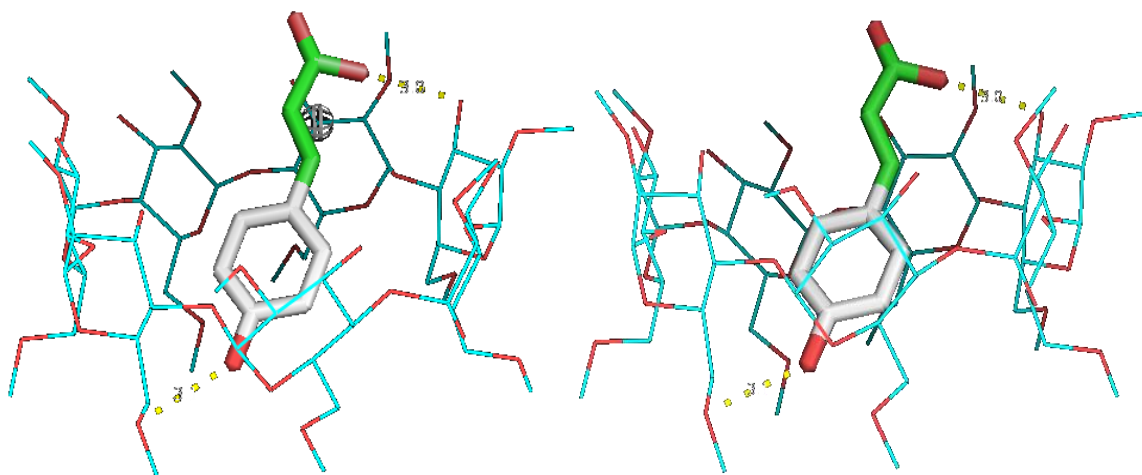
**Εικόνα 26:** Βέλτιστη διαμόρφωση του προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/*p*-κουμαρικού σύμφωνα με τη  $\Delta G$ .

Αλλάζοντας τον τύπο εμφάνισης των ατόμων λαμβάνονται διάφορες εμφανίσεις του προϊόντος εγκλεισμού που διευκολύνουν σε κάθε περίπτωση τη μελέτη των αποτελεσμάτων. Ένα παράδειγμα είναι τα χωροπληρωτικά μοντέλα (*space-filling models*), που δίνουν την καλύτερη οπτική εντύπωση του σχήματος του μορίου και επιτρέπουν άμεσο έλεγχο των επιφανειών επαφής διαφορετικών τμημάτων του (βλ. εικόνα 27).



**Εικόνα 27:** Χωροπληρωτικά μοντέλα του προϊόντος εγκλεισμού DIMEB/*p*-κουμαρικού

Οι υδρογονικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ της DIMEB και του *p*-κουμαρικού παρουσιάζονται με κίτρινη διάστικτη γραμμή. Όπως όλοι οι υδρογονικοί δεσμοί δεν υπερβαίνουν τα 3 Å (βλ. εικόνα 28).



**Εικόνα 28:** Οι υδρογονικοί δεσμοί που σχηματίζονται ανάμεσα στη DIMEB και το *p*-κουμαρικό κατά το σχηματισμό του προϊόντος εγκλεισμού.

## **IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η δημιουργία και η κρυστάλλωση του προϊόντος εγκλεισμού του *p*-κουμαρικού οξέος σε διμεθυλιωμένη κυκλοδεξτρίνη. Για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου ακολουθήθηκε μια συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία η οποία συνοδεύτηκε από μελέτη του σχηματιζόμενου προϊόντος εγκλεισμού με υπολογιστικές μεθόδους. Οι πειραματικές και υπολογιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν κάποια στοιχεία για το προϊόν εγκλεισμού αλλά, όλες οι μέθοδοι εκτός της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X είναι μόνο συμπληρωματικές και δε μπορούν να δώσουν την απόλυτη δομή του.

Το πρώτο βήμα ήταν η μελέτη της διαλυτότητας του *p*-κουμαρικού οξέος παρουσία της DIMEB. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των *Higuchi* και *Connors*. Τα φάσματα που λήφθηκαν με υπεριώδη ακτινοβολία έδειξαν πως καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της DIMEB στο διάλυμα, αυξάνεται και η ποσότητα του *p*-κουμαρικού οξέος που διαλυτοποιήθηκε στο νερό. Επιπλέον, υπολογίστηκε και η σταθερά σύνδεσης  $K_s$  και βρέθηκε  $192M^{-1}$ . Επομένως, το συμπέρασμα από την φασματοσκοπία UV είναι ότι η παρουσία της DIMEB σε υδατικό διάλυμα *p*-κουμαρικού οξέος αυξάνει τη διαλυτότητά του.

Το δεύτερο βήμα ήταν η μελέτη του προϊόντος εγκλεισμού σε μορφή στερεού υλικού με την τεχνική της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Η μελέτη των κορυφών της λυοφιλιωμένης κυκλοδεξτρίνης χωρίς παρουσία του ξενιστή καθώς και του *p*-κουμαρικού οξέος χωρίς την DIMEB έδωσαν τα φάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τη μελέτη του φάσματος του προϊόντος εγκλεισμού. Εκτός από τα παραπάνω τρία αυτά φάσματα λήφθηκε και ένα για τη μίξη *p*-κουμαρικού/DIMEB, που προέκυψε από λειοτρίβιση των δύο λυοφιλιωμένων δειγμάτων. Το μείγμα χρησίμευσε δείχνοντας πως δεν παρουσιάστηκαν ιδιαίτερες διαφορές στις κορυφές από τα φάσματα μάρτυρες. Σε αντίθεση με το μείγμα, το προϊόν εγκλεισμού παρουσίασε μία διαφορά, η οποία είναι η κορυφή του *p*-κουμαρικού στα  $1898\text{ cm}^{-1}$ , που εμφανίζεται στο φάσμα της μίξης των  $\alpha$  και  $\beta$ , αλλά όχι στο προϊόν εγκλεισμού. Οι διαφορές αυτές υποδεικνύουν πιθανό εγκλεισμό του αρωματικού δακτυλίου του *p*-κουμαρικού στην υδρόφοβη κοιλότητα της DIMEB.

Από την κρυστάλλωση του προϊόντος εγκλεισμού *p*-κουμαρικού οξέος/DIMEB λήφθηκαν κρύσταλλοι χρησιμοποιήσιμοι, χωρίς ιδιαίτερα ελαττώματα έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση της κρυσταλλογραφικής δομής με ακτίνες X. Ακολούθησε η συλλογή πειραματικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων X από τον μονοκρύσταλλο του προϊόντος εγκλεισμού, προκαταρκτικά αποτελέσματα της οποίας παρουσιάστηκαν στη μελέτη αυτή.

Τα παραπάνω συμπληρώθηκαν από την *in silico* μελέτη του προϊόντος εγκλεισμού με το πρόγραμμα Autodock Vina. Υπολογίστηκε η βέλτιστη διαμόρφωση του προϊόντος εγκλεισμού σύμφωνα με την ελεύθερη ενέργεια Gibbs και ήταν με τον αρωματικό δακτύλιο του *p*-κουμαρικού στο εσωτερικό της υδρόφοβης κοιλότητας της DIMEB. Μέσω των επιλογών του προγράμματος υπολογίστηκε η  $K_s$  που βρέθηκε  $188\text{ M}^{-1}$ , τιμή που παρουσιάζει πολύ καλή συμφωνία με την πειραματικά υπολογισμένη  $K_s$ .

Τέλος, η δοκιμή FRAP για το *p*-κουμαρικό οξύ παρουσία περίσσειας DIMEB έδειξε μείωση της αντιοξειδωτικής του δράσης. Κατά συνέπεια, όταν χρησιμοποιούνται αντιοξειδωτικές ενώσεις με



προσθήκη κυκλοδεξτρίνης πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν η πιθανή μείωση της δράσης τους λόγω σχηματισμού προϊόντος εγκλεισμού.

Η αλληλοσυμπλήρωση των αποτελεσμάτων των παραπάνω μεθόδων καθώς η απόρροια παρομοίων συμπερασμάτων για κάθε μία από αυτές δείχνει πως πιθανότατα ο εγκλεισμός ήταν επιτυχής. Οι μελλοντικοί στόχοι είναι η πραγματοποίηση περισσότερων φασματοσκοπικών τεχνικών και αντιοξειδωτικών δοκιμών με σκοπό την επαλήθευση και τον εμπλουτισμό των αποτελεσμάτων καθώς και η ολοκλήρωση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X με την ερμηνεία των κρυσταλλογραφικών αποτελεσμάτων έτσι ώστε να ληφθεί η τρισδιάστατη δομή του προϊόντος εγκλεισμού και να επιβεβαιωθούν όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω.

# **V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- 1 Eastburn, S. D. & Tao, B. Y. Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnology Advances* **12**, 325-339, doi:10.1016/0734-9750(94)90015-9 (1994).
- 2 Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews* **98**, 1743-1754, doi:10.1021/cr970022c (1998).
- 3 Buschmann, H. J. & Schollmeyer, E. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *J Cosmet Sci* **53**, 185-191 (2002).
- 4 Connors, K. A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical Reviews* **97**, 1325-1358, doi:10.1021/cr960371r (1997).
- 5 Baudin, C., Pean, C., Perly, B. & Gosselin, P. Inclusion of Organic Pollutants in Cyclodextrins and Derivatives. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **77**, 233-242, doi:10.1080/03067310008032685 (2000).
- 6 Chadha, R., Kashid, N. & Saini, A. (CSIR, 2004).
- 7 Szejtli, J. Downstream processing using cyclodextrins. *Trends in Biotechnology* **7**, 170-174, doi:10.1016/0167-7799(89)90094-2 (1989).
- 8 Del Valle, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* **39**, 1033-1046, doi:10.1016/s0032-9592(03)00258-9 (2004).
- 9 Redenti, E., Szente, L. & Szejtli, J. Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs. Thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **90**, 979-986, doi:10.1002/jps.1050 (2001).
- 10 Tsorteki, F., Bethanis, K., Pinotsis, N., Giastas, P. & Mentzafos, D. Inclusion compounds of plant growth regulators in cyclodextrins. V. 4-Chlorophenoxyacetic acid encapsulated in [beta]-cyclodextrin and heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)-[beta]-cyclodextrin. *Acta Crystallographica Section B* **61**, 207-217, doi:10.1107/S0108768105004106 (2005).
- 11 Pharr, D. Y., Fu, Z. S., Smith, T. K. & Hinze, W. L. Solubilization of cyclodextrins for analytical applications. *Analytical Chemistry* **61**, 275-279, doi:10.1021/ac00178a018 (1989).
- 12 Buvári, Á. & Barcza, L. *J. Inclusion Phenom.* **7**, 379 (1989).
- 13 Chatjigakis, A. K., Donze, C., Coleman, A. W. & Cardot, P. Solubility behavior of .beta.-cyclodextrin in water/cosolvent mixtures. *Analytical Chemistry* **64**, 1632-1634, doi:10.1021/ac00038a022 (1992).

- 
- 14 Loftsson, T., Magnusdottir, A., Masson, M. & Sigurjonsdottir, J. F. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. *J Pharm Sci* **91**, 2307-2316, doi:10.1002/jps.10226 (2002).
- 15 Loftsson, T., Masson, M. & Brewster, M. E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J Pharm Sci* **93**, 1091-1099, doi:10.1002/jps.20047 (2004).
- 16 Song, L. X., Bai, L., Xu, X. M., He, J. & Pan, S. Z. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry. *Coordination Chemistry Reviews* **253**, 1276-1284, doi:10.1016/j.ccr.2008.08.011 (2009).
- 17 Szejtli, J. The properties and potential uses of cyclodextrin derivatives. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* **14**, 25-36, doi:10.1007/bf01041363 (1992).
- 18 Badr-Eldin, S. M., Elkheshen, S. A. & Ghorab, M. M. Inclusion complexes of tadalafil with natural and chemically modified  $\beta$ -cyclodextrins. I: Preparation and in-vitro evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **70**, 819-827, doi:10.1016/j.ejpb.2008.06.024 (2008).
- 19 Caira, M. R., Griffith, V. J., Nassimbeni, L. R. & van Oudtshoorn, B. Unusual 1C4 conformation of a methylglucose residue in crystalline permethyl-[small beta]-cyclodextrin monohydrate. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 2071-2072 (1994).
- 20 Challa, R., Ahuja, A., Ali, J. & Khar, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech* **6**, E329-E357, doi:10.1208/pt060243 (2005).
- 21 Reibenspies, J. H., Maynard, D. K., Derecskei-Kovacs, A. & Vigh, G. Crystal structures of heptakis(2,6-di-O-tert-butylidimethylsilyl)cyclomaltoheptaose, heptakis(2-O-methyl-3,6-di-O-tert-butylidimethylsilyl)cyclomaltoheptaose and heptakis(2-O-methyl)cyclomaltoheptaose. *Carbohydrate Research* **328**, 217-227, doi:10.1016/s0008-6215(00)00083-5 (2000).
- 22 Dodziuk, H. (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006).
- 23 Irie, T. & Uekama, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **86**, 147-162, doi:10.1021/js960213f (1997).
- 24 Szente, L. & Szejtli, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Advanced Drug Delivery Reviews* **36**, 17-28, doi:10.1016/s0169-409x(98)00092-1 (1999).
- 25 Singh, M., Sharma, R. & Banerjee, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv* **20**, 341-359, doi:S0734975002000204 [pii] (2002).

- 26 Rajewski, R. A. & Stella, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. in vivo drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **85**, 1142-1169, doi:10.1021/js960075u (1996).
- 27 Chowdary, K. P. R. & Nalluri, B. N. Nimesulide and  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Physicochemical Characterization and Dissolution Rate Studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **26**, 1217-1220, doi:doi:10.1081/DDC-100100995 (2000).
- 28 Brewster, M. E. & Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 645-666, doi:10.1016/j.addr.2007.05.012 (2007).
- 29 Hassan, H., Kata, M., Erős, I. & Aigner, Z. Preparation and Investigation of Inclusion Complexes Containing Gemfibrozil and DIMEB. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* **50**, 219-225, doi:10.1007/s10847-004-3124-7 (2004).
- 30 SZEJTLI, #160 & Jozsef. *Past, present, and future of cyclodextrin research*. Vol. 76 (Pure and applied chemistry, 2004).
- 31 Dollo, G., Le Corre, P., Chevanne, F. & Le Verge, R. Inclusion complexation of amide-typed local anaesthetics with  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives. I. Physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics* **131**, 219-228, doi:10.1016/0378-5173(95)04334-9 (1996).
- 32 Sun, X.-F., Sun, Fowler, P. & Baird, M. S. Extraction and Characterization of Original Lignin and Hemicelluloses from Wheat Straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 860-870, doi:10.1021/jf040456q (2005).
- 33 MacAdam, J. & Grabber, J. Relationship of growth cessation with the formation of diferulate cross-links and p-coumaroylated lignins in tall fescue leaf blades. *Planta* **215**, 785-793, doi:10.1007/s00425-002-0812-7 (2002).
- 34 Salameh, D., Brandam, C., Medawar, W., Lteif, R. & Strehaiano, P. Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. *Food Chemistry* **107**, 1661-1667, doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.052 (2008).
- 35 Hartley, R. D. & Harris, P. J. Phenolic Constituents of the cell walls of dicotyledons. *Biochemical Systematics and Ecology* **9**, 189-203, doi:10.1016/0305-1978(81)90040-5 (1981).
- 36 Zang, L.-Y. *et al.* Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **279**, C954-C960 (2000).
- 37 Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**,

- 1033-1043, doi:10.1002/(sici)1097-0010(20000515)80:7<1033::aid-jsfa595>3.0.co;2-t (2000).
- 38 Strandås, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R. & Åman, P. Phenolic glucosides in bread containing flaxseed. *Food Chemistry* **110**, 997-999, doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.088 (2008).
- 39 Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S. & Drawert, F. Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **37**, 927-943, doi:10.1002/jsfa.2740370915 (1986).
- 40 Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology* **20**, 377-384, doi:10.1016/s0740-0020(03)00023-6 (2003).
- 41 Guglielmi, F., Luceri, C., Giovannelli, L., Dolara, P. & Lodovici, M. Effect of 4-coumaric and 3,4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa. *British Journal of Nutrition* **89**, 581-587, doi:doi:10.1079/BJN2003849 (2003).
- 42 Szejtli, J. (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht ; Boston, 1988).
- 43 Starikov, E. B., Bräsicke, K., Knapp, E. W. & Saenger, W. Negative solubility coefficient of methylated cyclodextrins in water: A theoretical study. *Chemical Physics Letters* **336**, 504-510, doi:10.1016/s0009-2614(01)00160-9 (2001).
- 44 McMurry, J. (Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2006).
- 45 Highfield, J. G. & Bowen, P. Diffuse-reflectance Fourier-transform infrared spectroscopic studies of the stability of aluminum nitride powder in an aqueous environment. *Analytical Chemistry* **61**, 2399-2402, doi:10.1021/ac00196a016 (1989).
- 46 Armaroli, T., Bécue, T. & Gautier, S. Spectroscopie infrarouge en réflexion diffuse (DRIFTS) : application à l'analyse in situ de catalyseurs. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP* **59**, 215-237 (2004).
- 47 Αλεξάνδρου Ε.Ν, Β. Γ. Α. (ΖΗΤΗ ΠΕΛΑΓΙΑ & ΣΙΑ Ο.Ε., 1986).
- 48 Gutteridge, J. M. C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions* **91**, 133-140, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0009-2797\(94\)90033-7](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2797(94)90033-7) (1994).
- 49 Aruoma, O. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Amer Oil Chem Soc* **75**, 199-212, doi:10.1007/s11746-998-0032-9 (1998).

- 
- 50 Benzie, I. F. & Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry* **239**, 70-76 (1996).
- 51 Benzie, I. F. F. An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clinical Biochemistry* **29**, 111-116, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](http://dx.doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6) (1996).
- 52 Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* **31**, 455-461, doi:10.1002/jcc.21334 (2010).
- 53 Tsorteki, F. & Mentzafos, D. Structure of the complex of heptakis(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin with (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid. *Carbohydrate Research* **337**, 1229-1233, doi:10.1016/s0008-6215(02)00114-3 (2002).
- 54 Macrae, C. F. *et al.* Mercury CSD 2.0 - new features for the visualization and investigation of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography* **41**, 466-470, doi:doi:10.1107/S0021889807067908 (2008).
- 55 Zhou, J. & Zeng, Z. Novel fiber coated with  $\beta$ -cyclodextrin derivatives used for headspace solid-phase microextraction of ephedrine and methamphetamine in human urine. *Analytica Chimica Acta* **556**, 400-406, doi:10.1016/j.aca.2005.09.063 (2006).
- 56 Kabsch, W. XDS. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 125-132 (2010).
- 57 Sheldrick, G. A short history of SHELX. *Acta Crystallographica Section A* **64**, 112-122, doi:doi:10.1107/S0108767307043930 (2008).
- 58 Beurskens, P. *et al.* The DIRDIF2008 program system. *Crystallography Laboratory, University of Nijmegen, The Netherlands* (2008).
- 59 Farrugia, L. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. *Journal of Applied Crystallography* **32**, 837-838, doi:doi:10.1107/S0021889899006020 (1999).

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

### **AutoDock Vina**

Το υπολογιστικό πρόγραμμα AutoDock Vina είναι ένα open source πρόγραμμα για μελέτη φαρμάκων, molecular docking και εικονικό screening και προσφέρει πολυπύρηνη διαθεσιμότητα υψηλή απόδοση και ενισχυμένη ακρίβεια και ευκολία χρήσης. Σχεδιάστηκε από τον Dr. Oleg Trott στο Molecular Graphics Lab του The Scripps Research Institute. Το AutoDock Vina βελτιώνει σημαντικά τη μέση ακρίβεια της πρόβλεψης του τρόπου σύνδεσης σε σύγκριση με το AutoDock 4, κρίνοντας από τα δοκιμαστικά που πραγματοποιήθηκαν κατά την ανάπτυξη του AutoDock 4.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

### ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΘΛΑΣΗΣ ΑΚΤΙΝΩΝ-X ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ XDS

\*\*\*\*\* CORRECT \*\*\*\*\* (VERSION June 12, 2007)

INPUT PARAMETER VALUES

-----  
SPACE\_GROUP\_NUMBER= 3  
UNIT\_CELL\_CONSTANTS= 15.00 10.50 54.10 90.000 93.600 90.000  
FRIEDEL'S\_LAW=TRUE  
PROFILE\_FITTING= TRUE  
OVERLOAD= 250000 MINPK= 75.0 WFAC1= 1.0  
INCLUDE\_RESOLUTION\_RANGE= 90.000 0.960  
NAME\_TEMPLATE\_OF\_DATA\_FRAMES=../pcoum\_???.mar2560 DIRECT MAR345  
DATA\_RANGE= 1 220  
ROTATION\_AXIS= 1.000000 0.000000 0.000000  
OSCILLATION\_RANGE= 1.000000  
STARTING\_ANGLE= 0.000 STARTING\_FRAME= 1  
X-RAY\_WAVELENGTH= 0.814800  
INCIDENT\_BEAM\_DIRECTION= 0.010045 0.004135 1.227247  
FRACTION\_OF\_POLARIZATION= 0.900  
POLARIZATION\_PLANE\_NORMAL= 0.000000 1.000000 0.000000  
AIR= 0.00017  
SILICON= 2.135183 SENSOR\_THICKNESS= 0.000000  
DETECTOR=MAR345  
DIRECTION\_OF\_DETECTOR\_X-AXIS= 1.00000 0.00000 0.00000  
DIRECTION\_OF\_DETECTOR\_Y-AXIS= 0.00000 1.00000 0.00000  
DETECTOR\_DISTANCE= 140.749  
ORGX= 1276.17 ORGY= 1861.46  
NX= 2560 NY= 3072 QX= 0.139000 QY= 0.139000  
BEAM\_DIVERGENCE\_E.S.D.= 0.163  
REFLECTING\_RANGE\_E.S.D.= 0.524  
MINIMUM\_ZETA= 0.150

MAXIMUM\_ERROR\_OF\_SPOT\_POSITION= 3.0  
 REFLECTIONS/CORRECTION\_FACTOR= 50  
 CORRECTIONS= DECAY MODULATION ABSORPTION  
 REFERENCE\_DATA\_SET=

REFLECTIONS FROM "INTEGRATE.HKL" WILL BE REINDEXED SUCH THAT

NEW-H = 0\*H + -1\*K + 0\*L + 0  
 NEW-K = -1\*H + 0\*K + 0\*L + 0  
 NEW-L = 0\*H + 0\*K + -1\*L + 0

\*\*\*\*\* 2 EQUIVALENT POSITIONS IN SPACE GROUP # 3 \*\*\*\*\*

If x',y',z' is an equivalent position to x,y,z, then

x'=x\*ML(1)+y\*ML( 2)+z\*ML( 3)+ML( 4)/12.0  
 y'=x\*ML(5)+y\*ML( 6)+z\*ML( 7)+ML( 8)/12.0  
 z'=x\*ML(9)+y\*ML(10)+z\*ML(11)+ML(12)/12.0

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
2	-1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-1	0

43411 REFLECTIONS ON FILE "INTEGRATE.HKL"  
 0 REFLECTIONS INCOMPLETE OR OUTSIDE IMAGE RANGE 1 ... 220  
 0 OVERLOADED REFLECTIONS (IGNORED)  
 7 REFLECTIONS OUTSIDE ACCEPTED RESOLUTION RANGES  
 OR TOO CLOSE TO ROTATION AXIS (IGNORED)  
 0 REFLECTIONS REJECTED AS REQUESTED FROM FILE "REMOVE.HKL"  
 43404 REFLECTIONS ACCEPTED  
 COMPLETENESS AND QUALITY OF DATA SET  
 -----

R-FACTOR  
 observed = (SUM(ABS(I(h,i)-I(h))))/(SUM(I(h,i)))  
 expected = expected R-FACTOR derived from Sigma(I)

COMPARED = number of reflections used for calculating R-FACTOR  
 I/SIGMA = mean of intensity/Sigma(I) of unique reflections

(after merging symmetry-related observations)  
 Sigma(I) = standard deviation of reflection intensity I  
 estimated from sample statistics

R-meas = redundancy independent R-factor (intensities)  
 Rmrgd-F = quality of amplitudes (F) of this data set  
 For definition of R-meas and Rmrgd-F see  
 Diederichs & Karplus (1997), Nature Struct. Biol. 4, 269-275.

Anomal = mean correlation factor between two random subsets  
 Corr of anomalous intensity differences  
 SigAno = mean anomalous difference in units of its estimated  
 standard deviation ( $|F(+)-F(-)|/\text{Sigma}$ ). F(+), F(-)  
 are structure factor estimates obtained from the  
 merged intensity observations in each parity class.  
 Nano = Number of unique reflections used to calculate  
 Anomal\_Corr & SigAno. At least two observations  
 for each (+ and -) parity are required.

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE $\geq -3.0$ AS FUNCTION OF RESOLUTION														
RESOLUTION	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS	R-FACTOR	R-FACTOR	COMPARED	I/SIGMA	R-meas	Rmrgd-F	Anomal	SigAno	Nano	
LIMIT	OBSERVED	UNIQUE	POSSIBLE	OF DATA	observed	expected					Corr			
2.87	1629	419	443	94.6%	5.4%	4.8%	1629	26.80	6.4%	3.3%	-25%	0.664	246	
2.03	3116	747	748	99.9%	3.6%	4.9%	3116	27.79	4.2%	2.2%	-19%	0.518	530	
1.66	3947	933	937	99.6%	4.0%	5.0%	3947	27.13	4.5%	2.3%	-17%	0.594	668	
1.44	4570	1112	1121	99.2%	4.3%	5.1%	4570	24.61	4.9%	2.9%	-17%	0.621	746	
1.28	5141	1239	1244	99.6%	5.3%	5.4%	5141	22.25	6.0%	3.7%	-20%	0.685	837	
1.17	5662	1362	1364	99.9%	5.8%	5.8%	5662	19.75	6.7%	4.3%	-11%	0.730	881	
1.09	6138	1488	1490	99.9%	7.2%	6.6%	6138	16.98	8.3%	5.7%	-10%	0.771	914	
1.02	6491	1586	1590	99.7%	9.3%	8.8%	6491	13.09	10.7%	8.8%	-8%	0.777	923	
0.96	5095	1586	1655	95.8%	13.4%	12.6%	4993	8.36	16.0%	14.4%	-5%	0.824	528	
total	41789	10472	10592	98.9%	4.8%	5.3%	41687	18.95	5.6%	4.4%	-12%	0.697	6273	

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE $\geq 0.0$ AS FUNCTION OF RESOLUTION														
RESOLUTION	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS	R-FACTOR	R-FACTOR	COMPARED	I/SIGMA	R-meas	Rmrgd-F	Anomal	SigAno	Nano	
LIMIT	OBSERVED	UNIQUE	POSSIBLE	OF DATA	observed	expected					Corr			
2.87	1629	419	443	94.6%	5.4%	4.8%	1629	26.80	6.4%	3.3%	-25%	0.664	246	
2.03	3116	747	748	99.9%	3.6%	4.9%	3116	27.79	4.2%	2.2%	-19%	0.518	530	
1.66	3947	933	937	99.6%	4.0%	5.0%	3947	27.13	4.5%	2.3%	-17%	0.594	668	

1.44	4562	1109	1121	98.9%	4.3%	5.1%	4562	24.67	4.9%	2.9%	-17%	0.621	745
1.28	5133	1237	1244	99.4%	5.2%	5.4%	5133	22.29	6.0%	3.6%	-20%	0.685	836
1.17	5654	1360	1364	99.7%	5.8%	5.8%	5654	19.77	6.7%	4.3%	-11%	0.731	880
1.09	6122	1483	1490	99.5%	7.2%	6.6%	6122	17.04	8.2%	5.6%	-10%	0.773	912
1.02	6453	1576	1590	99.1%	9.3%	8.8%	6453	13.17	10.7%	8.5%	-7%	0.779	918
0.96	5055	1573	1655	95.0%	13.2%	12.5%	4955	8.43	15.8%	13.9%	-4%	0.826	524
total	41671	10437	10592	98.5%	4.8%	5.3%	41571	19.01	5.6%	4.3%	-12%	0.698	6259

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE >= 3.0 AS FUNCTION OF RESOLUTION

RESOLUTION LIMIT	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS OF DATA	R-FACTOR observed	R-FACTOR COMPARED expected	I/SIGMA	R-meas	Rmrgd-F	Anomal Corr	SigAno	Nano	
2.87	1625	417	443	94.1%	5.4%	4.8%	1625	26.92	6.4%	3.3%	-25%	0.664	246
2.03	3109	745	748	99.6%	3.6%	4.9%	3109	27.86	4.2%	2.2%	-18%	0.517	529
1.66	3939	930	937	99.3%	4.0%	5.0%	3939	27.21	4.5%	2.3%	-17%	0.594	668
1.44	4521	1096	1121	97.8%	4.3%	5.1%	4521	24.95	4.9%	2.8%	-16%	0.622	741
1.28	5044	1207	1244	97.0%	5.2%	5.4%	5044	22.80	6.0%	3.4%	-20%	0.686	828
1.17	5452	1304	1364	95.6%	5.8%	5.7%	5452	20.56	6.6%	3.9%	-10%	0.739	854
1.09	5704	1373	1490	92.1%	7.0%	6.4%	5704	18.26	8.0%	4.8%	-9%	0.786	860
1.02	5663	1380	1590	86.8%	8.6%	8.1%	5663	14.78	9.9%	6.3%	-8%	0.793	799
0.96	4031	1201	1655	72.6%	11.5%	10.7%	3993	10.47	13.6%	9.4%	-5%	0.836	430
total	39088	9653	10592	91.1%	4.8%	5.2%	39050	20.41	5.5%	3.7%	-12%	0.699	5955

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE >= 6.0 AS FUNCTION OF RESOLUTION

RESOLUTION LIMIT	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS OF DATA	R-FACTOR observed	R-FACTOR COMPARED expected	I/SIGMA	R-meas	Rmrgd-F	Anomal Corr	SigAno	Nano	
2.87	1617	414	443	93.5%	5.4%	4.8%	1617	27.08	6.4%	3.3%	-25%	0.664	246
2.03	3096	739	748	98.8%	3.6%	4.9%	3096	28.05	4.1%	2.2%	-18%	0.517	529
1.66	3930	926	937	98.8%	4.0%	5.0%	3930	27.31	4.5%	2.3%	-17%	0.594	668
1.44	4472	1079	1121	96.3%	4.3%	5.1%	4472	25.27	4.9%	2.8%	-16%	0.621	736
1.28	4930	1174	1244	94.4%	5.2%	5.4%	4930	23.32	6.0%	3.3%	-20%	0.689	816
1.17	5216	1241	1364	91.0%	5.7%	5.7%	5216	21.38	6.5%	3.7%	-10%	0.742	823
1.09	5273	1262	1490	84.7%	6.9%	6.2%	5273	19.46	7.9%	4.5%	-9%	0.798	790
1.02	4798	1163	1590	73.1%	8.0%	7.4%	4798	16.71	9.2%	5.3%	-8%	0.796	681
0.96	2952	840	1655	50.8%	9.9%	9.0%	2941	13.10	11.6%	7.2%	-6%	0.831	323
total	36284	8838	10592	83.4%	4.7%	5.2%	36273	21.88	5.5%	3.4%	-13%	0.696	5612

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE >= 9.0 AS FUNCTION OF RESOLUTION

RESOLUTION LIMIT	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS OF DATA	R-FACTOR observed	R-FACTOR COMPARED expected	I/SIGMA	R-meas	Rmrgd-F	Anomal Corr	SigAno	Nano	
2.87	1614	413	443	93.2%	5.4%	4.8%	1614	27.13	6.4%	3.3%	-25%	0.664	246
2.03	3088	735	748	98.3%	3.6%	4.9%	3088	28.16	4.1%	2.2%	-18%	0.517	529
1.66	3903	916	937	97.8%	4.0%	5.0%	3903	27.53	4.5%	2.3%	-16%	0.596	665
1.44	4382	1052	1121	93.8%	4.3%	5.1%	4382	25.73	4.9%	2.7%	-16%	0.624	724
1.28	4767	1129	1244	90.8%	5.2%	5.3%	4767	23.95	5.9%	3.2%	-19%	0.696	793

1.17	4872	1149	1364	84.2%	5.7%	5.6%	4872	22.50	6.4%	3.5%	-9%	0.751	770
1.09	4758	1129	1490	75.8%	6.7%	6.0%	4758	20.87	7.7%	4.1%	-8%	0.806	711
1.02	4093	980	1590	61.6%	7.6%	6.9%	4093	18.45	8.7%	4.8%	-9%	0.800	584
0.96	2279	621	1655	37.5%	8.9%	8.2%	2275	15.13	10.5%	6.0%	-4%	0.845	261
total	33756	8124	10592	76.7%	4.7%	5.1%	33752	23.16	5.4%	3.2%	-12%	0.696	5283

NUMBER OF REFLECTIONS IN SELECTED SUBSET OF IMAGES 43404  
 NUMBER OF REJECTED MISFITS 1613  
 NUMBER OF SYSTEMATIC ABSENT REFLECTIONS 0  
 NUMBER OF ACCEPTED OBSERVATIONS 41791  
 NUMBER OF UNIQUE ACCEPTED REFLECTIONS 10473  
  
 NUMBER OF REFLECTIONS SAVED ON "XDS\_ASCII.HKL" 43404  
 (ACCEPTED OBSERVATIONS + REJECTED MISFITS + ABSENCES;  
 MISFITS are marked by -1\*SIGMA(IOBS) in "XDS\_ASCII.HKL")