



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

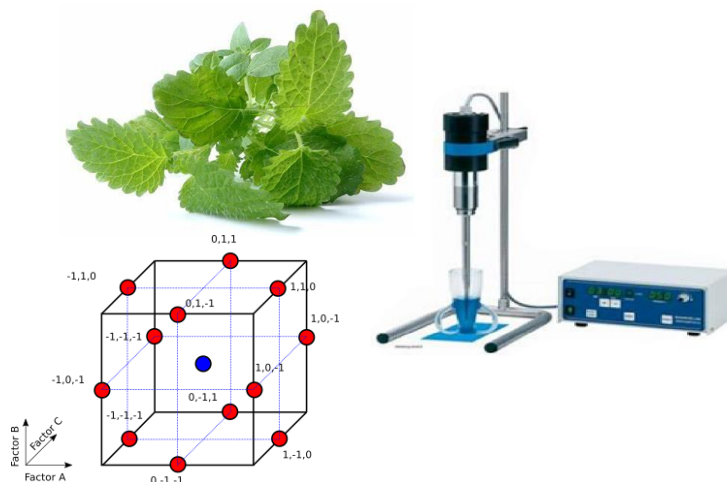
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

«Εκχύλιση Φαινολικών Ενώσεων από Παραπροϊόντα Μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*) με Χρήση Μοντέλων Πειραματικού Σχεδιασμού και Υγρής Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (LC-MS/MS)»

Diploma Thesis

“Extraction of Phenolic Compounds from Lemon Balm (*Melissa officinalis*) By-Products Using Experimental Design and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS)”



ΓΙΑΝΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ
ΑΜ: 19684016

ΖΩΤΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΑΜ: 18684030

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:
ΤΣΙΑΚΑ ΘΑΛΕΙΑ

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Πτυχιακή Εργασία

«Εκχύλιση Φαινολικών Ενώσεων από Παραπροϊόντα Μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*) με Χρήση Μοντέλων Πειραματικού Σχεδιασμού και Υγρής Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (LC-MS/MS)»

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η πτυχιακή/διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι

Εξεταστική Επιτροπή:

A/a	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΑΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1.	Τσιάκα Θάλεια	Διδακτικό Προσωπικό ΕΣΠΑ/Επιβλέπουσα	
2.	Σινάνογλου Βασιλεία	Καθηγήτρια – Κοσμήτορας της Σχολής Επιστημών Τροφίμων/Μέλος	
3.	Κρίτση Ευτυχία	Επίκουρη Καθηγήτρια/Μέλος	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Γιάννης Δημήτρης του Θεοφάνη και Ζώτος Δημήτριος του Σπύρου με αριθμό μητρώου 19684016 και 18684030 αντίστοιχα, φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουν υπεύθυνα ότι:

«Είναι συγγραφείς αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαν για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκαναν χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουν ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από αυτούς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικό τους, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση των πτυχίων μας».

Ο ΔΗΛΩΝ
ΓΙΑΝΝΗΣ
ΔΗΜΗΤΡΗΣ

Ο ΔΗΛΩΝ
ΖΩΤΟΣ
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μας Δρ. Τσιάκα Θάλεια για την υποστήριξη, την υπομονή, την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον της καθ' όλη την εκπόνηση της πτυχιακής μας εργασίας. Ευχαριστούμε επιπλέον τον κ. Γιώργο Σωτηρούδη, μέλος του Ειδικού Επιστημονικού & Τεχνικού Προσωπικού του Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης στις οικογένειές μας για την στήριξη και την αγάπη τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μας στο τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.

Δημήτρης & Δημήτρης,
Σεπτέμβριος 2023

Περίληψη

Η σύγχρονη τάση για οικολογική διαχείριση των αποβλήτων/παραπροϊόντων και η ανάγκη για την εφαρμογή “πράσινων” μεθόδων, φιλικών προς το περιβάλλον, κατά την παραγωγή βιομηχανικών προϊόντων τροφίμων έχει οδηγήσει στην διεξαγωγή μεγάλου πλήθους μελετών, οι οποίες αφορούν την αξιοποίηση των παραπροϊόντων από τις βιομηχανίες τροφίμων και αρωματικών φυτών. Τα παραπροϊόντα επεξεργασίας αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών κατά την παραγωγή αιθέριων ελαίων αποτελούν υπόστρωμα πλούσιο σε βιοδραστικές ενώσεις, το οποίο συχνά μένει ανεκμετάλλευτο και απορρίπτεται ως απόβλητο. Στην εν λόγω πτυχιακή εργασία, μελετάται το φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων από παραπροϊόντα επεξεργασίας μελισσόχορτου (Lemon Balm, *Melissa officinalis*), με σκοπό την αξιοποίησή τους στη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικά πρόσθετα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκχύλιση των επιθυμητών ενώσεων πραγματοποιείται με χρήση υπερήχων (Ultrasound Assisted Extraction), ενώ για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης γίνεται χρήση του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken. Οι προς βελτιστοποίηση παράμετροι είναι η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (% v/v), ο χρόνος εκχύλισης (min), η % ένταση του μηχανήματος υπερήχων και η αναλογία διαλύτη/υποστρώματος (mL/g), με 3 επίπεδα τιμών η κάθε μία. Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε μέσω της φασματοφωτομετρικής μεθόδου Folin-Ciocalteu, αρχικά σε ξηρό προϊόν μελισσόχορτου με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης βάσει πειραματικού σχεδιασμού. Οι προτεινόμενες συνθήκες εκχύλισης εφαρμόστηκαν στο ξηρό προϊόν και σε παραπροϊόντα μελισσόχορτου και έγινε σύγκριση μεταξύ των προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών, με σκοπό την αξιολόγηση του παραγόμενου μοντέλου. Η εκτίμηση της σημαντικότητας των παραμέτρων, έγινε με χρήση του στατιστικού εργαλείου ANOVA. Αξιολογούνται επιπλέον η αντιοξειδωτική ικανότητα, με τη μέθοδο FRAP καθώς και η ικανότητα ανάσχεσης της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+} τόσο στο ξηρό προϊόν όσο και σε επιλεγμένα παραπροϊόντα επεξεργασίας μελισσόχορτου. Βάσει αποτελεσμάτων, στα παραπροϊόντα μελισσόχορτου βέλτιστη απόδοση σε συνολικό φαινολικό περιεχόμενο ($13,6 \pm 1,8$ mg GAE/g φυτού) δίνει η εκχύλιση υπό τις εξής συνθήκες: 60% v/v αιθανόλη, 25 λεπτά χρόνος εκχύλισης, 80% ένταση υπερήχων και 60 mL διαλύτη/g υποστρώματος. Οι ίδιες συνθήκες δίνουν την μέγιστη τιμή (με στατιστικά σημαντική διαφορά) ιόντων Fe(II) κατά την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα παραπροϊόντα μελισσόχορτου, ίση με $43,7 \pm 1,3$ mg Fe/g φυτού, καθώς και κατά την εκτίμηση της ικανότητας ανάσχεσης της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+}, ίση με $37,2 \pm 4,4$ mg TE/g φυτού. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του φυτοχημικού προφίλ ορισμένων δειγμάτων εκχύλισης των παραπροϊόντων επεξεργασίας μελισσόχορτου με τη μέθοδο LC-MS/MS. Ταυτοποιήθηκαν συνολικά 20 φαινολικές ενώσεις σε 3 δείγματα παραπροϊόντων υπό διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης, μεταξύ των οποίων φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή.

Λέξεις-Κλειδιά: Μελισσόχορτο, Παραπροϊόντα Αρωματικών Φυτών, Εκχύλιση με Υπερήχους, Φαινολικές Ενώσεις, Πειραματικός Σχεδιασμός, Box-Behnken, Υγρή χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Abstract

The modern trend for the ecological waste/by-product management and the need for the application of "green", environmentally friendly methods during the manufacturing of food industrial products has led to an outburst of research, which are related to the utilization of by-products of food and aromatic plants industry. The by-products of aromatic and medicinal plants that have undergone processing during the production of essential oils constitute a rich substrate of bioactive compounds, which often remains untapped and is rejected as waste. In this thesis, the phenolic content of extracts from by-products of lemon balm processing (Lemon Balm, *Melissa officinalis*) is studied, with the aim of using them in the food industry as natural additives with antioxidant properties. The extraction of the desired compounds is carried out using ultrasound (Ultrasound Assisted Extraction), while the Box-Behnken experimental design model is used to optimize the extraction conditions. The parameters to be optimized are the ethanol content in the solvent (% v/v), the extraction time (min), the % intensity-power of the ultrasound machine and the solvent/substrate ratio (mL/g), with 3 levels of values each. The total phenolic content is measured by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, initially with the dry Lemon Balm product, in order to build a model for predicting the optimal extraction conditions based on experimental designing. The proposed extraction conditions are applied to the dry product and by-products of Lemon Balm and a comparison is made between the predicted and experimental values, to evaluate the produced prediction model. The importance of the parameters was evaluated with the help of ANOVA statistical tool. In addition, an evaluation of the antioxidant capacity, using the FRAP method, as well as the ability to inhibit the free radical ABTS^{•+} was studied in both the dry product and selected by-products of Lemon Balm. Based on the results, in Lemon Balm by-products the best performance in terms of total phenolic content (13.6 ± 1.8 mg GAE/g plant) is given by extracting under the following conditions: 60% v/v ethanol, 25 min extraction time, 80% ultrasound intensity-power and 60 mL solvent/g substrate. The same conditions give the maximum value (with a statistically significant difference) of Fe(II) ions when measuring the antioxidant capacity in Lemon Balm by-products, equal to 43.7 ± 1.3 mg Fe/g plant, as well as when estimating the ability to inhibit ABTS^{•+} radical, which is equal to 37.2 ± 4.4 mg TE/g plant. Finally, an evaluation of the phytochemical profile of the extraction samples of specific Lemon Balm processing by-products was carried out using the LC-MS/MS method. A total of 20 phenolic compounds were identified in 3 samples from different extraction conditions, including phenolic acids and flavonoids.

Keywords: Lemon Balm, Aromatic Plants By-Products, Ultrasound Assisted Extraction, Phenolic Compounds, Design of Experiment, Box-Behnken, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	11
1.1 Αρωματικά Φυτά	11
1.2 Παραπροϊόντα Αρωματικών Φυτών.....	15
1.3 Φαινολικές Ενώσεις.....	19
1.4 Μελισσόχορτο	22
1.5 Εκχύλιση Βιοδραστικών Συστατικών	26
1.5.1 Εκχύλιση Φαινολικών Ενώσεων από Φυτικά Παραπροϊόντα: Γενικές αρχές.....	26
1.5.2 Εκχύλιση με Υπερήχους	28
1.5.3 Πειραματικός Σχεδιασμός	31
2. Σκοπός Εργασίας.....	33
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	35
3.1 Πειραματική Πορεία.....	35
3.2 Αναλώσιμα και Οργανολογία	36
3.2.1 Αντιδραστήρια, Διαλύτες και Πρότυπες Ουσίες.....	36
3.2.2 Συσκευές και Επιστημονικά όργανα.....	36
3.3 Δείγμα Παραπροϊόντος Επεξεργασίας Μελισσόχορτου (<i>Melissa officinalis</i>)	37
3.4 Προκατεργασία Δείγματος	37
3.5 Εκχύλιση Φαινολικών Ενώσεων από τα Δείγματα Μελισσόχορτου.....	37
3.6 Πειραματικός Σχεδιασμός Εκχυλίσεων.....	39
3.7 Φασματοφωτομετρικές Αναλύσεις Εκχυλισμάτων Ξηρής Δρόγης και Παραπροϊόντος Επεξεργασίας Μελισσόχορτου (<i>Melissa officinalis</i>)	40
3.7.1 Μέτρηση Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου με τη Μέθοδο Folin-Ciocalteu (F-C)	40
3.7.2 Προσδιορισμός Αναγωγικής Ισχύος/Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με τη Μέθοδο FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	43
3.7.3 Εκτίμηση της Ικανότητας Δέσμευσης/Ανάσχεσης της Σταθερής Ελεύθερης Ρίζας ABTS ^{•+}	45
3.8 Μέθοδος LC-MS/MS για την Ταυτοποίηση Φαινολικών Ενώσεων των Εκχυλισμάτων Ξηρής Δρόγης και Παραπροϊόντων Επεξεργασίας Μελισσόχορτου (<i>Melissa officinalis</i>).....	46
3.9 Στατιστική Ανάλυση	48
4. Αποτελέσματα και Συζήτηση	49
4.1 Βελτιστοποίηση Εκχύλισης Φαινολικών Ενώσεων από Δείγμα Μελισσόχορτου με Πειραματικό Σχεδιασμό	49

4.1.1 Χρήση Μοντέλου Box-Behnken για Βελτιστοποίηση Εκχύλισης	49
4.1.2 Προσδιορισμός Φαινολικού Περιεχομένου στο Ξηρό Προϊόν Μελισσόχορτου με την Μέθοδο F-C.....	49
4.1.3 Στατιστικά Σημαντικοί Παράγοντες	51
4.1.4 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης.....	62
4.2 Προσδιορισμός Φαινολικού Περιεχομένου, Αντιοξειδωτικής και Αντιριζικής Δράσης σε Δείγματα Ξηρού Προϊόντος και Παραπροϊόντος Μελισσόχορτου	64
4.2.1 Προσδιορισμός Φαινολικού Περιεχομένου στο Παραπροϊόν Μελισσόχορτου με την Μέθοδο F-C.....	64
4.2.2 Σύγκριση Απόδοσης σε TPC Μεταξύ Ξηρού Προϊόντος και Παραπροϊόντος Μελισσόχορτου	66
4.2.3 Υπολογισμός Αναγωγικής Ισχύος/Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με τη Δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	67
4.2.4 Εκτίμηση της Ικανότητας Δέσμευσης/Ανάσχεσης της Ελεύθερης Ρίζας ABTS ^{•+}	68
4.2.5 Συσχέτιση Φασματοφωτομετρικών Μεθόδων με τον Στατιστικό Δείκτη Pearson's Correlation	68
4.3 Ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) Συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) για την Αξιολόγηση του Φυτοχημικού Προφίλ Φαινολικών Ενώσεων των Εκχυλισμάτων Παραπροϊόντων Επεξεργασίας Μελισσόχορτου (<i>Melissa officinalis</i>)	70
5. Συμπεράσματα	75
6. Μελλοντικοί Στόχοι	78
7. Βιβλιογραφία.....	79

1. Εισαγωγή

1.1 Αρωματικά Φυτά

Καθ' όλη την ιστορία του ανθρώπινου είδους, τα φυτά χρησιμοποιούνται τόσο σαν τροφή όσο και ως θεραπευτικοί παράγοντες, χάρις στις ευεργετικές τους λειτουργίες και στην διατροφική τους αξία (Mascoloti Spréa *et al.*, 2022). Η χρήση των αρωματικών φυτών για ιατρικούς και διατροφικούς σκοπούς χρονολογείται πριν από περισσότερο από δύο χιλιετίες στην μέση Ανατολή, με τις γευστικές, συντηρητικές και θεραπευτικές τους ιδιότητες να είναι ήδη από τότε γνωστές (Costa *et al.*, 2015). Οι ευεργετικές ιδιότητες των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών έχουν τονισθεί από τον πατέρα της ιατρικής, Ιπποκράτη (460-370 π.Χ.), ο οποίος πίστευε ότι οι ανθρώπινες ασθένειες προέρχονταν από φυσικά αίτια και ως εκ τούτου χρησιμοποιούσε βοτανικές θεραπείες για την αγωγή τους (Ziagova *et al.*, 2022). Έχει επίσης ανακαλυφθεί ότι φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά αξιοποιούνται προ χιλιετιών στην παραδοσιακή φαρμακευτική, στη συντήρηση των τροφίμων, σε ιερές τελετές καθώς και για σκοπούς περιποίησης (καλλυντικά). Μπορούν είτε να συγκομίζονται ως "άγρια" είτε να καλλιεργούνται. Οι τοποθεσίες από τις οποίες μπορούν να συλλεχθούν ποικίλουν, ενώ μερικές από αυτές μπορεί να είναι δασικές εκτάσεις, βουνά, αγροτικές εκτάσεις, κήποι ή ακόμα και στην άκρη του δρόμου (Wildmapsfit.eu, 2020).

Τα αρωματικά φυτά πωλούνται νωπά, αποξηραμένα ή σε μορφή τσαγιού, ενώ αξιοποιούνται επίσης για την εκχύλιση ενώσεων με υψηλή αξία, όπως αιθέρια έλαια. Όταν είναι φρέσκα, λόγω του υψηλού περιεχομένου τους σε υγρασία, το οποίο επηρεάζει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και την διατροφική τους ποιότητα, καθίστανται συντηρήσιμα για πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Επομένως, σε αυτή τους τη μορφή μπορούν να πωληθούν σε μικρούς εμπόρους λιανικής ή σε σουπερμάρκετ αλλά η δυνατότητα εξαγωγής μεγάλων ποσοτήτων τους περιορίζεται σημαντικά λόγω της χαμηλής συντηρησιμότητάς τους. Η ξήρανση αποτελεί μία σημαντική διαδικασία η οποία συχνά εφαρμόζεται ως τελικό στάδιο επεξεργασίας πριν την συσκευασία και διάθεση για πώληση τους. Τα αποξηραμένα αρωματικά φυτά, χάρις στην χαμηλή τους περιεκτικότητα σε υγρασία καθιστούν δυνατή την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα καθώς και την εξαγωγή σε άλλες χώρες (Wildmapsfit.eu, 2020).

Τα τελευταία έτη, αναπτύσσεται ραγδαία μία παγκόσμια τάση η οποία αφορά την χρήση φυσικών ουσιών ως πηγή αντιοξειδωτικών και λειτουργικών συστατικών στη διατροφή. Την τάση αυτή εκμεταλλεύονται οι βιομηχανίες τροφίμων με σκοπό να εξυπηρετήσουν τις απαιτήσεις της καταναλωτικής αγοράς. Τόσο οι βιομηχανοποιημένες όσο και η μη βιομηχανοποιημένες χώρες, αυξάνουν με σταθερό ρυθμό τις απαιτήσεις τους σε αρωματικά φυτά ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών (Costa *et al.*, 2015). Επιπλέον, οι βιολογικές δράσεις των φυτών έχουν μελετηθεί και αξιοποιηθεί από τις βιομηχανίες καλλυντικών, συσκευασίας αλλά και υφασμάτων. Ως συνέπεια αυτών, τα αρωματικά φυτά έχουν κεντρίσει τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον, μιας και θεωρούνται μία ανεξερεύνητη, σε μεγάλο βαθμό, δεξαμενή πολύτιμων συστατικών τα οποία σχετίζονται με τις προαναφερθείσες λειτουργίες και απαιτήσεις των σύγχρονων καταναλωτών (Mascoloti Spréa *et al.*, 2022).

Τα αρωματικά φυτά αποτελούν μία ειδική κατηγορία φυτών τα οποία περιέχουν αρωματικές ενώσεις (αιθέρια έλαια), πτητικές σε θερμοκρασία δωματίου, στα οποία οφείλεται και το χαρακτηριστικό άρωμα του κάθε είδους. Παίζουν ρόλο ζωτικής σημασίας στην υγεία και την ευημερία των ανθρώπων καθώς αποτελούν πηγή για την παρασκευή και σύνθεση νέων ενώσεων με φαρμακευτική δράση και νέων προϊόντων που βασίζονται σε φυσικά εκχυλίσματα (λειτουργικά τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής, διατροφο-δραστικά προϊόντα (nutraceuticals)). Πολλά είδη πλέον χρησιμοποιούνται αποκλειστικά ως φυσικά φάρμακα λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους (Samarth, Samarth and Matsumoto, 2017) και σε άλλες θεραπευτικές μεθόδους, όπως αρωματοθεραπεία (Saha and Basak, 2020). Στην Κίνα αξιοποιούνται σχεδόν 5000 είδη, ενώ η Ινδία χρησιμοποιεί περίπου 7000 είδη αρωματικών φυτών στο παραδοσιακό τους φαρμακευτικό σύστημα (εθνοφαρμακολογία). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organisation, WHO), από ένα σύνολο 252 βασικών και απαραίτητων αναγνωρισμένων φαρμάκων, το 11% έχουν αποκλειστικά φυτική προέλευση (Saha and Basak, 2020). Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (Food and Drug Administration, FDA) έχει αναγνωρίσει ως ασφαλή για ανθρώπινη κατανάλωση και χωρίς περιορισμό στην πρόσληψη, περισσότερα από 150 είδη φυτών τα οποία περιέχουν ως κύρια βιολειτουργικά συστατικά ορισμένα αιθέρια έλαια και ελαιορητίνες. Επιπλέον, οι επαγγελματίες στο χώρο της υγείας συνιστούν την ένταξή τους στο διατροφικό πλαίσιο λόγω των οφελών στον ανθρώπινο οργανισμό, τα οποία αποδίδονται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στη μείωση της χρήσης αλατιού στη σύγχρονη διαίτα καθώς και στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Πράγματι το 2014, η Πορτογαλική Κυβέρνηση στο πλαίσιο του Διεθνούς προγράμματος για την ‘‘Προαγωγή Υγιεινής Διατροφής’’ δημοσίευσε άρθρο στο οποίο συνίσταται η χρήση των αρωματικών φυτών η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της ποσότητας αλατιού και συνεπώς της υπέρτασης. Τα αρωματικά φυτά παρέχουν στον ανθρώπινο οργανισμό πολύτιμα βιολειτουργικά συστατικά όπως διαιτητικές ίνες, πτητικές ενώσεις (αιθέρια έλαια), βιταμίνες (Α, C και σύμπλεγμα βιταμινών Β), μεταλλικά ιχνοστοιχεία (Ασβέστιο, Φώσφορο, Νάτριο, Κάλιο και Σίδηρο), πρωτεΐνες και φυτοχημικά (βιοδραστικές ενώσεις οι οποίες απαντώνται σε μικρές περιεκτικότητες και δρουν ως αντιοξειδωτικά, βακτηριοκτόνα ή αντιαρκά), όπως πολυφαινόλες, αλκαλοειδή, καρποτενοειδή, κ.ά. (Costa *et al.*, 2015).

Οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δραστηριότητες των αρωματικών φυτών έχουν μελετηθεί σε βάθος τα τελευταία έτη. Μεταξύ των ευεργετικών για τον ανθρώπινο οργανισμό ιδιοτήτων τους, συγκαταλέγονται η πρόληψη και μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών, όπως φλεγμονών, αθηροσκλήρωσης, καρκίνου (Samarth, Samarth and Matsumoto, 2017), η μείωση του οξειδωτικού στρες και η αποτροπή καρδιαγγειακών και νευροεγκεφαλικών νόσων (Costa *et al.*, 2015). Παρακάτω (Πίνακας 1.1) παρουσιάζονται ορισμένα είδη αρωματικών φυτών και οι πιθανές φαρμακευτικές τους δράσεις καθώς και εφαρμογές τους στην γαστρονομία.

Πίνακας 1.1: Γαστρονομικές εφαρμογές και Φαρμακευτικές ιδιότητες ορισμένων αρωματικών φυτών με την ένδειξη “GRAS”, Costa et al., 2015

Κοινή Ονομασία	Βοτανική Ονομασία	Οικογένεια	Γαστρονομικές Εφαρμογές	Φαρμακευτικές ιδιότητες
Βασιλικός	<i>Ocimum basilicum L.</i>	<i>Lamiaceae</i>	Στην Μεσογειακή κουζίνα, φρέσκος ή αποξηραμένος σε προϊόντα ντομάτας, λαχανικά, σαλάτες, πίτσες, θαλασσινά κ.ά.	Αγωγή για πονοκεφάλους, βήχα, κονδυλώματα, δυσκοιλιότητα, βρογχίτιδα, λαρυγγίτιδα, αμυγδαλίτιδα γαστρεντερικές και νεφρικές διαταραχές.
Κόλιανδρος	<i>Coriandrum sativum L.</i>	<i>Umbelliferae (Apiaceae)</i>	Μαζί με σκόνη κάρυ σε κιμάδες και στιφάδο, σε σάλτσες, σαλάτες, γαρνιτούρες και ως γευστικός παράγοντας σε σούπες, σοκολάτες και λικέρ.	Θεραπεία της ανορεξίας, του εμέτου, της δυσπεψίας, του μετεωρισμού και της διάρροιας.
Λεβάντα	<i>Lavandula officinalis Chaix.</i>	<i>Lamiaceae</i>	Καρύκευμα σε μη αλκοολούχα ποτά, παγωτά, τσίχλες και ζαχαρωτά, πηγή αιθέριων ελαίων.	Θεραπεία της μετεωρικής δυσπεψίας ή ως ελαφρύ ηρεμιστικό. Χρησιμοποιείται επίσης ως διουρητικό και σπασμολυτικό.
Μαντζουράν αγκυκιά	<i>Origanum majorana L. (syn. Majorana hortensis Moench)</i>	<i>Lamiaceae</i>	Ως μπαχαρικό σε λουκάνικα, σε αρτοσκευάσματα, λαχανικά, αυγά, μαγειρευτά, καρυκείματα, σούπες, σνακ και σάλτσες.	Θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών, κράμπες, κατάθλιψης, ζαλάδας, νευρικών πονοκεφάλων, ημικρανίας, παροξυσμικό βήχα και ως διουρητικό.
Ρίγανη	<i>Origanum vulgare L.</i>	<i>Lamiaceae</i>	Ως καρύκευμα σε πίτσα, άλλα τρόφιμα με ντομάτα, τυριά.	Χρησιμοποιείται ως εφιδρωτικό, ανθρακούχο, αντισπασμωδικό, αντισηπτικό και τονωτικό.
Μαϊντανός	<i>Petroselinum crispum (Mill.) Mansf.</i>	<i>Apiaceae</i>	Τα φρέσκα, αποξηραμένα και αφυδατωμένα φύλλα χρησιμοποιούνται ως καρύκευμα, γαρνιτούρα και αρωματικό συστατικό.	Ως αντιανααιμικό και υπογλυκαιμικό σε μορφή εγχύματος.

Μία ποικιλία οικογενειών φυτών, με ιδιαίτερη βαρύτητα να αποδίδεται στις *Lamiaceae*, *Ariaceae* και *Zinziberaceae*, έχουν μελετηθεί εκτενώς για την θεραπευτική τους αξία. Οι τελευταίες επηρεάζονται στα αρωματικά φυτά από παράγοντες όπως οι συνθήκες ανάπτυξης, οι μέθοδοι επεξεργασίας και εκχύλισης των συστατικών τους καθώς και από τη σύστασή τους (Samarth, Samarth and Matsumoto, 2017). Μεταξύ αυτών, η *Lamiaceae* ξεχωρίζει έναντι των υπολοίπων καθώς συμπεριλαμβάνει γένη φυτών παγκοσμίως διαδεδομένα ως προς τη χρήση τους κυρίως στην γαστρονομία ως ενισχυτικά γεύσης και αρωματικές ύλες. Εκτός από την χρήση τους σε τρόφιμα ως πρόσθετα, τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* αποτελούν πηγή φυτοχημικών ενώσεων με σημαντικά οφέλη στην υγεία των καταναλωτών συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών, αντιβακτηριακών και κυτταροτοξικών ιδιοτήτων στενά συσχετισμένων με την ποιότητα και την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που εμπεριέχονται στα φυτά (Mascoloti Spréa *et al.*, 2022).

Εκτιμάται ότι ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 75% του πληθυσμού της γης πλέον χρησιμοποιεί για οποιονδήποτε σκοπό φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά. Κατά προσέγγιση, το 60% των εκσυγχρονισμένων φαρμακευτικών προϊόντων και των εμπορικών φαρμάκων εμπεριέχουν ενεργά συστατικά προερχόμενα από φυτά. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων & Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO), η παγκόσμια παραγωγή αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών το 2020 εκτιμάται στους 330 εκατομμύρια τόνους από μία συνολική έκταση 77 εκατομμυρίων εκταρίων (1 ha=10.000 m²) (Wildmapsfit.eu, 2020) ενώ η αξία της παγκόσμιας αγοράς το 2019 έφτασε τα 66 δισεκατομμύρια € (de Elguea-Culebras, Bravo and Sánchez-Vioque, 2022).

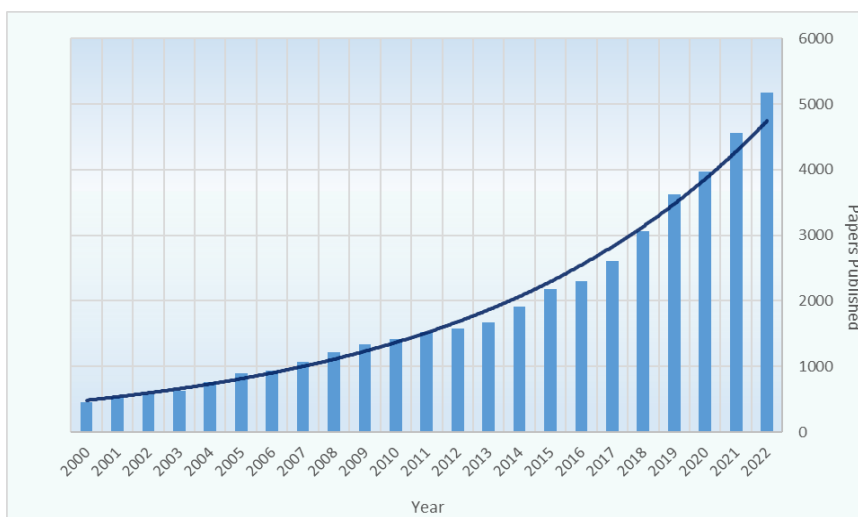
Η βιοποικιλότητα των φυτών στην Ελλάδα θεωρείται ως μία από τις πιο πλούσιες στην Ευρώπη και αποτελεί παγκοσμίως «Hot Spot» για την καλλιέργεια και παραγωγή μεσογειακών αρωματικών φυτών. Οι γηγενείς φυτικοί πόροι της Ελλάδας συμπεριλαμβάνουν πάνω από 7.000 αυτοκαλλιεργούμενα είδη και υποείδη φυτών, τα οποία συντελούν σχεδόν το 50% των φυτικών ειδών σε ολόκληρη την Ευρώπη και το 22% εξ' αυτών είναι ενδημικά (Taghouti *et al.*, 2022). Πολλά από αυτά αποτελούν σπάνια είδη ή είδη υπό εξαφάνιση. Τα κύρια είδη που αναπτύσσονται στην Ελλάδα και αξιοποιούνται εμπορικά είναι η ρίγανη, το θυμάρι, το θρούμπι, το φασκόμηλο, ο γλυκάνισος, ο μάραθος, το χαμομήλι, η δάφνη, ο δυόσμος, η μέντα, το φλισκούνι, η λεβάντα, το μελισσόχορτο και ορισμένα μοναδικά τοπικά προϊόντα συγκεκριμένων περιοχών της Ελλάδας, όπως η μαστίχα Χίου, ο κρόκος Κοζάνης, το δίκταμο Κρήτης και το τσάι του Βουνού. Λόγω της τεράστιας ζήτησης από τις κύριες χώρες εισαγωγής φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών, όπως η Γερμανία, η Γαλλία, η Αγγλία, η Ελβετία και η Ιταλία, η τιμή της χονδρικής πώλησης της ξηρής δρόγης στην Ελλάδα κυμαίνεται μεταξύ 5-10€/kg. Με αποδόσεις από 100 έως 400 kg δρόγης ανά στρέμμα-τιμή εξαρτώμενη από το είδος και το μέρος του φυτού που συγκομίζεται-υπολογίζεται ότι το ακαθάριστο κέρδος ανέρχεται στα 960 (ρίγανη, τσάι του βουνού) έως και 4000€ (μελισσόχορτο) (Wildmapsfit.eu, 2020). Στη συνέχεια (Πίνακας 1.2) παρουσιάζονται ενδεικτικά οι τιμές και αποδόσεις των ξηρών προϊόντων προερχόμενα από τα κυριότερα αρωματικά φυτά στην Ελλάδα.

Πίνακας 1.2: Ενδεικτικές τιμές ξηρών προϊόντων & αποδόσεις καλλιέργειας αρωματικών φυτών στην Ελλάδα, D2-Market-Analysis-of-Wild-MAP.pdf (wildmapsfit.eu)

Φυτό	€/kg	Μέρος Φυτού	Απόδοση (kg/στρέμμα)	Ακαθάριστο κέρδος (€/στρέμμα)
Μελισσόχορτο	10	Φύλλο	400	4000
Δενδρολίβανο	5	Φύλλο	300	1500
Ρίγανη	8	Φύλλο	120	960
Βασιλικός	7,5	Φύλλο	400	3000
Χαμομήλι	10	Άνθος	100	1000
Φασκόμηλο	7,5	Φύλλο	400	3000
Μέντα	10	Φύλλο	300	3000
Τσάι του Βουνού	8	Φύλλο	120	960
Λεβάντα	10	Άνθος	200	2000
Δίκταμο Κρήτης	8	Φύλλο	200	1600
Θυμάρι	7,5	Φύλλο	400	3000
Θρούμπι	6,5	Φύλλο	400	2800
Μαντζουράνα	7	Φύλλο	200	1400

1.2 Παραπροϊόντα Αρωματικών Φυτών

Τα τελευταία χρόνια σημειώνεται σταθερή αύξηση στον αριθμό των ερευνών και μελετών που αφορούν την αξιοποίηση των παραπροϊόντων και αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων και αρωματικών φυτών (Εικόνα 1.1). Τόσο τα παραπροϊόντα των αρωματικών φυτών όσο και τον τροφίμων, τα οποία προκύπτουν κατά την βιομηχανική επεξεργασία αυτών, εκπροσωπούν μία φθηνή και πλούσια πηγή πολύτιμων ενδοκυτταρικών ενώσεων οι οποίες δύναται να ανακτηθούν και να συναντήσουν δυναμικά μεγάλη εφαρμογή στην βιομηχανία ως συμπληρώματα τροφίμων ή θρεπτικά συστατικά (Carpentieri *et al.*, 2022). Η εκχύλιση των φυτοχημικών ενώσεων και παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας αποτελεί πλέον τάση στις σύγχρονες βιομηχανίες (Andrés *et al.*, 2018). Συγκεκριμένα, οι βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών βρίσκονται σε μία συνεχή προσπάθεια να συμβαδίσουν με τις ολοένα αυξανόμενες καταναλωτικές απαιτήσεις για “καθαρές ετικέτες” και φυσικά συστατικά με ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες (ενισχυτικά γεύσης, χρωστικές, αντιοξειδωτικά).



Εικόνα 1.1: Ερευνητικές δημοσιεύσεις στο “Scopus” με τις λέξεις “Παραπροϊόντα” και “Προστιθέμενη Αξία” από το 2000 έως το 2022.

Η αγορά φυτικών εκχυλισμάτων συμβαδίζει με τις νέες αυτές τάσεις και η στροφή προς τα φυτικά προϊόντα οδηγούν στην ανάπτυξη της τα τελευταία χρόνια (Carpentieri *et al.*, 2022). Να σημειωθεί ότι η αξία της παγκόσμιας αγοράς φυτικών εκχυλισμάτων (αφορά ελαιορητίνες, αιθέρια έλαια, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή και καροτενοειδή) με εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων & ποτών, καλλυντικών, φαρμάκων και συμπληρωμάτων διατροφής εκτιμάται ότι το 2022 έφτασε τα 34,4 δις. \$ (Plant Extracts Market Industry Analysis | Types, Advantages, and Forecast, 2022).

Η αγορά των τροφίμων και υγείας, η οποία πραγματεύεται την εύρεση και χρήση νέων βιοδραστικών συστατικών τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία τροφίμων με σκοπό την ανάπτυξη καινοτόμων λειτουργικών προϊόντων με επιστημονικά τεκμηριωμένους ισχυρισμούς, αποτελεί ένα συνεχώς αναπτυσσόμενο πεδίο τόσο σε οικονομικό όσο και σε ερευνητικό επίπεδο. Βάσει αυτού, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις φυσικές ενώσεις και τις σχετικές βιοενεργές τους ιδιότητες. Ωστόσο, οι φυσικές πηγές είναι περιορισμένες και πρέπει να βρεθούν νέες, εναλλακτικές λύσεις ώστε να υποστηριχθούν συστηματικά οι συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες της βιομηχανίας τροφίμων σε συστατικά και πρόσθετα. Το σχέδιο δράσης της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) για την κυκλική οικονομία με στόχο τη μείωση των οργανικών αποβλήτων προερχόμενων από τρόφιμα περιλαμβάνει μια στρατηγική προσέγγιση που στηρίζεται στη μείωση, την επαναχρησιμοποίηση, την ανάκτηση και την ανακύκλωση υλικών και ενέργειας, ενισχύοντας την αξία και, κατά συνέπεια, τη διάρκεια ζωής των προϊόντων, των υλικών αλλά και των πόρων στην οικονομία. Η επαναχρησιμοποίηση αγροβιομηχανικών παραπροϊόντων μπορεί να αποτελέσει ανανεώσιμη πηγή για ορισμένα ήδη χρησιμοποιούμενα πρόσθετα τροφίμων ή ακόμη και για την παραγωγή νέων συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας με λειτουργικές ενώσεις και ιδιότητες με οφέλη τόσο για τους αγρότες και τους παραγωγούς όσο και για τους τελικούς καταναλωτές. Παραδείγματος χάριν, τα παραπροϊόντα περιέχουν πολυσακχαρίτες, οργανικά οξέα, πρωτεΐνες και άλλες ενώσεις (φαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή, τερπένια, κ.ά), οι οποίες, δίχως πρόσθετο κόστος παραγωγής και με μειωμένο βιομηχανικό κόστος, τα καθιστούν πλούσια πηγή φυσικών ενώσεων που μπορούν δυνητικά να εφαρμοστούν στη βιομηχανία τροφίμων ως πηγές πρόσθετων

τροφίμων (Faustino *et al.*, 2019). Παρακάτω (Πίνακας 1.3) παρουσιάζεται μία τυπική χημική σύσταση παραπροϊόντων του *M. Officinalis*, κοινώς γνωστό ως μελισσόχορτο.

Πίνακας 1.3: Χημική Σύσταση χρησιμοποιημένων αγρο-υπολειμμάτων Μελισσόχορτου, Ashori, Hamzeh and Amani, 2011

Συστατικό	% περιεκτικότητα	Συστατικό	% περιεκτικότητα
Ολοκυτταίνη	57,0 ± 1,4	Πεντοζάνες	9,8 ± 0,8
α-Κυτταρίνη	42,7 ± 1,8	Αραβινόζη	1,8 ± 0,2
Ημικυτταρίνη	14,3 ± 1,3	Μαννόζη	3,2 ± 0,5
Λιγνίνη (αδιάλυτη σε οξέα)	26,5 ± 4,3	Γλυκόζη	68,6 ± 4,7
Λιγνίνη (διαλυτή σε οξέα)	1,30 ± 0,12	Ξυλόζη	18,4 ± 1,4
Λιγνίνη (διαλυτή σε ζεστό νερό)	20,0 ± 1,4	Ραμνόζη	1,4 ± 0,4
Λιγνίνη (διαλυτή σε 1% NaOH)	68,9 ± 7,5	Τέφρα	9,5 ± 2,6

Η αποδοτική αξιοποίηση και ανακύκλωση της υπολειμματικής βιομάζας-παραπροϊόντος που παράγεται από τα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά χρίζει καίριας σημασίας όσον αφορά το οικονομικό κέρδος των βιομηχανιών, την περιβαλλοντική βιωσιμότητα και τα κοινωνικά οφέλη. Η επεξεργασία των αρωματικών φυτών σε βιομηχανική κλίμακα συνεπάγεται την δημιουργία στερεής, υγρής ή και αέριας υπολειμματικής βιομάζας. Παρόλο που η βιομάζα αυτή δεν θεωρείται απόβλητο και δεν συνεισφέρει στην αύξηση του αποτυπώματος CO₂ στην ατμόσφαιρα, η απόρριψη της δημιουργεί περιβαλλοντικά προβλήματα. Μπορεί να χαρακτηριστεί ως παραπροϊόν και συχνά εμπεριέχει φυτοχημικά και δραστικές ουσίες οι οποίες ορισμένες φορές ξεπερνούν σε αξία το ίδιο το προϊόν (Saha and Basak, 2020).

Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή αρωματικών υδάτων (υδροσόλη) ως παραπροϊόντα προερχόμενα από την απόσταξη με ατμό των αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών. Τα ύδατα αυτά περιέχουν ίχνη των αιθέριων ελαίων και άλλων υδατοδιαλυτών ενώσεων και γενικά η απόρριψή τους επιφέρει αξιοσημείωτες οικονομικές σπατάλες μιας και αναγνωρίζονται ως μία εύκολη και φθηνή πηγή παραγωγής προϊόντων καθώς εμφανίζουν αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (Andrés *et al.*, 2018).

Η παραγωγή αιθέριων ελαίων αποτελεί μία από τις κυριότερες χρήσεις των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών· ένας κλάδος μεγάλης σημασίας στον χώρο της αγροτικής και αγροδιατροφικής βιομηχανίας. Στην παγκόσμια αγορά, σχεδόν 300 είδη φυτών εμπορεύονται για τα αιθέρια έλαια τους, ενώ περισσότερα από 3000 είδη είναι γνωστό ότι αποτελούν πηγή αιθέριων ελαίων (Skendi *et al.*, 2022).

Ωστόσο, ο λόγος παραγωγής αιθέριων ελαίων προς την φυτική βιομάζα που υπόκειται σε επεξεργασία είναι μικρός, το οποίο συνεπάγεται την μεγάλη σε ποσότητα παραγωγή στερεών παραπροϊόντων, κάτι το οποίο είναι απαραίτητο να λαμβάνεται υπόψιν από τις

βιομηχανίες με σκοπό την κατάλληλη διαχείρισή τους. Υπολογίζεται ότι 100 kg στερεών αποβλήτων παράγονται για την παραλαβή, στην καλύτερη περίπτωση, 1 kg αιθέριων ελαίων (Πίνακας 1.4). Εάν στη Γαλλία μόνο το 2016 παρήχθησαν 1.439 τόνοι αιθέριου ελαίου από λεβάντα, από αυτά προέκυψαν περίπου 140.000 τόνοι στερεών αποβλήτων σε ένα μόνο έτος (de Elguea-Culebras, Bravo and Sánchez-Vioque, 2022). Η Ευρωπαϊκή στρατηγική για βιώσιμη ανάπτυξη (Σχέδιο Δράσης Κυκλικής Οικονομίας) επικεντρώνεται στην προώθηση των υπολειμμάτων επεξεργασίας των αρωματικών φυτών για την αξιοποίησή τους ως πηγές βιοδραστικών ενώσεων (Skendi et al., 2022).

Δεδομένου ότι τα παραπροϊόντα προερχόμενα από επεξεργασίες απόσταξης των αρωματικών φυτών δεν συνεισφέρουν στην αύξηση των επιπέδων CO₂ στην ατμόσφαιρα (ανθρακικά ουδέτερα) και σε συμφωνία με τις αρχές της κυκλικής, βιώσιμης και οικολογικής οικονομίας, μπορούν να θεωρηθούν ως πολύτιμη ύλη με ένα πλήθος διαφορετικών πιθανών εφαρμογών (Εικόνα 1.2) (de Elguea-Culebras, Bravo and Sánchez-Vioque, 2022).



Εικόνα 1.2: Πιθανές χρήσεις Παραπροϊόντων Αρωματικών Φυτών σε Βιομηχανικό Επίπεδο, de Elguea-Culebras, Bravo and Sánchez-Vioque, 2022

Παρόλο που το στερεό παραπροϊόν των αρωματικών φυτών θεωρείται δυνητικά μία ικανή πηγή βιοδραστικών ενώσεων, η αξία του ως πολύτιμη βιομάζα ακόμα υποτιμάται από την βιομηχανία αιθέριων ελαίων. Φαινομενικά, όταν αυτή η βιομάζα απορρίπτεται σαν απόβλητο στο περιβάλλον, ασκεί ένα ισχυρό ρυπαντικό αντίκτυπο καθώς και οικονομική επιβάρυνση. Υπό αυτή την έννοια, η επαναχρησιμοποίηση των φυτικών υπολειμμάτων αποτελεί κινητήρια δύναμη πίσω από την ανάπτυξη διαφορετικών

στρατηγικών για την αξιοποίηση των γεωργικών και βιομηχανικών αποβλήτων ως πηγή προϊόντων-συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας (Skendi *et al.*, 2022).

Πίνακας 1.4: Εκτιμώμενη παραγωγή πρωτογενών και δευτερογενών στερεών υπολειμμάτων στην βιομηχανία αιθέριων ελαίων, Saha and Basak, 2020

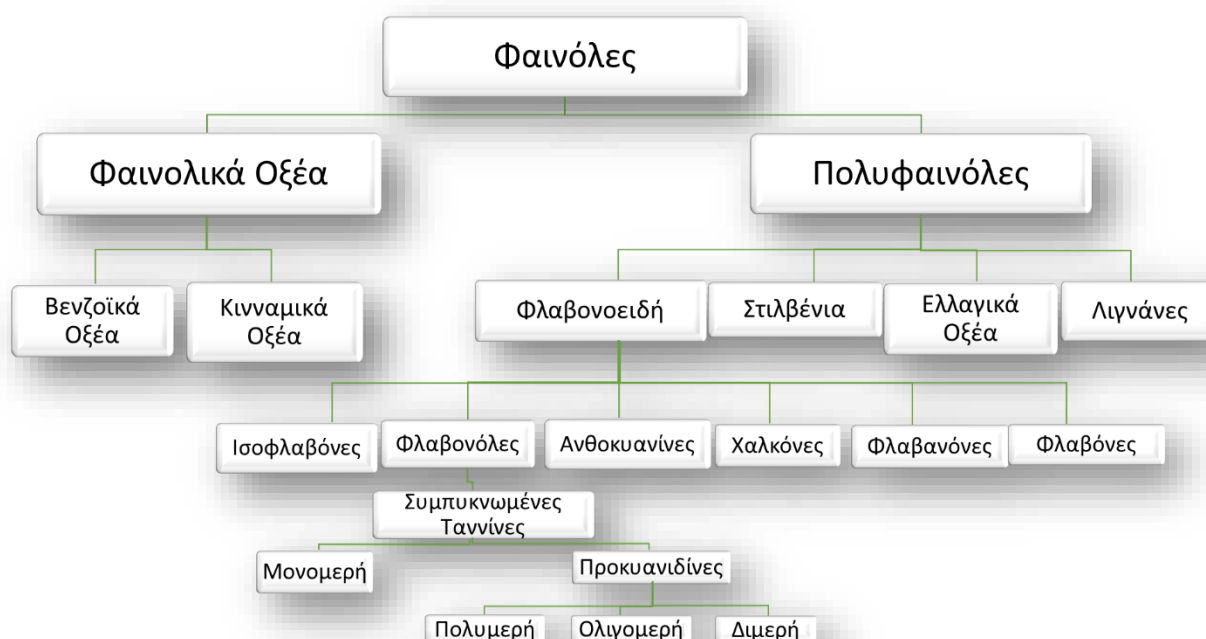
Καλλιέργεια	Όγκος Παραγωγής Υπολειμμάτων
Χαμομήλι	100 kg στερεού υπολείμματος/0,3-0,45 kg Αιθέριου Ελαίου
Μαντζουράνα	100 kg στερεού υπολείμματος/0,5 kg Αιθέριου Ελαίου
Μελισσόχορτο	100 kg στερεού υπολείμματος/0,014 kg Αιθέριου Ελαίου
Λάβδανο	100 kg στερεού υπολείμματος/0,5 kg Αιθέριου Ελαίου
Λαβαντίνη	100 kg στερεού υπολείμματος/1 kg Αιθέριου Ελαίου
Τριαντάφυλλο	100 kg στερεού υπολείμματος/0,033 kg Αιθέριου Ελαίου
Σαντολίνα	100 kg στερεού υπολείμματος/0,25 kg Αιθέριου Ελαίου

1.3 Φαινολικές Ενώσεις

Τα αρωματικά φυτά εμπεριέχουν μία ποικιλία λειτουργικών συστατικών όπως πρωτεΐνες, φυτικές ίνες, πτητικά συστατικά (αιθέρια έλαια), Βιταμίνες (Α, C και σύμπλεγμα βιταμινών Β), ιχνοστοιχεία (Ασβέστιο, Φωσφόρο, Νάτριο, Κάλιο και Σίδηρο) και φυτοχημικές ενώσεις (βιοενεργές ουσίες παρούσες σε μικρές συγκεντρώσεις με βιολειτουργικές δράσεις). Στις τελευταίες, εντάσσεται μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες ενώσεων, οι φαινολικές ενώσεις, στις οποίες οφείλονται σε μεγάλο βαθμό οι ευεργετικές ιδιότητες των αρωματικών φυτών. Παρόλο που τα αρωματικά φυτά καταναλώνονται σε μικρές ποσότητες, η βιολογική τους δράση κατά την πρόσληψη δεν θεωρείται αμελητέα. Είναι γνωστό ότι αποτρέπουν την εμφάνιση νόσων που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες, όπως καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές παθήσεις καθώς και καρκίνο. Παρουσιάζουν επίσης αντιοξειδωτικές, αντικές, αντιμεταλλαξιόγόνες, αντικαρκινικές, αντιαλλεργικές, κατά

του έλκους, αντιδιαρροϊκές, αντιηπατοξικές, αντιπολλαπλασιαστικές (Costa *et al.*, 2015), αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριδιακές και κυτταροτοξικές δράσεις (Mascoloti Spréa *et al.*, 2022). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη φυτικών φαινολικών αντιοξειδωτικών συσχετίζεται με μειωμένη εμφάνιση παθήσεων όπως στεφανιαία νόσο και εκφύλιση των ματιών λόγω γήρατος. Βρέθηκε επίσης ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), τον ιό του έρπητα (HSV) και τις γλυκοζυλοτρανσφεράσες του *Streptococcus mutans* (οι οποίες σχετίζονται με την τερηδόνα) (Costa *et al.*, 2015).

Οι φαινολικές ενώσεις είναι πανταχού παρούσες στο βασίλειο των φυτών· ωστόσο η κατανομή τους εξαρτάται από το μέρος του φυτού ή ιστού στο οποίο βρίσκονται. Παράγονται μέσω του μεταβολικού μονοπατιού του σικιμικού οξέος ως δευτερογενείς μεταβολίτες και χαρακτηριστικό της μοριακής τους δομής αποτελεί το ότι έχουν στο μόριό τους έναν αρωματικό δακτύλιο ο οποίος φέρει έναν ή περισσότερους υδροξυ-υποκαταστάτες. Είναι υδατοδιαλυτές και δύναται να δημιουργηθούν ως γλυκοζίτες, όταν συνδυάζονται με μόριο σακχάρου, όπως η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ραμνόζη, η αραβινόζη, η ξυλόζη και η ρουτινόζη. Γύρω στις 8000 πολυφαινόλες έχουν χαρακτηριστεί και μπορούν να διαιρεθούν σε ορισμένες υπο-ομάδες οι οποίες ποικίλουν από απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα, μέχρι πολυμερή όπως οι ταννίνες (Costa *et al.*, 2015). Στην **Εικόνα 1.3** φαίνεται μία σχηματική κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων.



Εικόνα 1.3: Σχηματική Κατηγοριοποίηση Φαινολικών Ενώσεων (Figure 2.1: Schematic Classification of Phenolic Compounds)

Οι φαινολικές ενώσεις θεωρούνται ως μία από τις κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά. Το βιοδραστικό τους δυναμικό αποδίδεται κυρίως στη δράση τους έναντι των ελευθέρων ριζών οφειλόμενο στις αντιοξειδωτικές, οξειδοαναγωγικές

και χηλικές τους ικανότητες, δρώντας ως αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνου και δεσμευτές οξυγόνου (Mascoloti Spréa *et al.*, 2022). Καθίστανται απαραίτητες για τις ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες των φυτών, όπως στη διασπορά και επικονίαση των σπόρων από τα έντομα λόγω των ελκυστικών χρωμάτων τους, η συμμετοχή σε σηματοδοτικούς και δομικούς ρόλους και σε αμυντικές στρατηγικές υπό συνθήκες έντονου στρες όπως τραυματισμός, μόλυνση, υπεριώδη ακτινοβολία ή υπερβολικά έντονο φως. Στα τρόφιμα, οι φαινολικές ενώσεις συνεισφέρουν σε ιδιότητες όπως την οξειδωτική σταθερότητα, το χρώμα, την οσμή, την απόδοση πικρής γεύσης ή και την στυπτικότητα. Οι βιολογικές τους δράσεις έχουν επίσης αξιοποιηθεί σε βιομηχανικούς τομείς όπως των καλλυντικών, της συσκευασίας, της κλωστοϋφαντουργίας (Costa *et al.*, 2015), των φαρμάκων, της γεωργίας αλλά και της αγροβιομηχανίας (de Elguea-Culebras, Bravo and Sánchez-Vioque, 2022).

Παρόλο που τα αιθέρια έλαια αποτελούν το κύριο και υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόν της βιομηχανίας αιθέριων ελαίων, αντιπροσωπεύουν μόλις ένα πολύ μικρό μερίδιο (μικρότερο του 5% w/w) της φυτικής πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται, με αποτέλεσμα να παράγονται τεράστιοι όγκοι βιομάζας χωρίς καμία εμφανή εμπορική χρήση (Skendi *et al.*, 2022). Η ανακύκλωση και επαναχρησιμοποίηση των υπολειμμάτων προερχόμενα από μεσογειακά αρωματικά φυτά ως πηγές φαινολικών ενώσεων έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον μεταξύ των ερευνητών και των βιομηχανιών αιθέριων ελαίων τα τελευταία είκοσι χρόνια. Η σύσταση της υπολειμματικής βιομάζας και συνεπώς η απόδοση σε φαινολικά συστατικά καθώς και η ποιότητα αυτών εξαρτάται από τη βιοχημική σύσταση του ίδιου του αρωματικού φυτού, τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την καλλιέργειά του (κλίμα, ποιότητα χώματος, παροχή νερού, εμφάνιση βιοτικού ή αβιοτικού στρες) ή την περίοδο συγκομιδής μεταξύ άλλων. Η ανάκτηση μπορεί να επιτευχθεί με ένα πλήθος διαφορετικών μεθόδων, όπως εξάτμιση, εκχύλιση υγρού-υγρού με διαλύτες, εκχύλιση στερεού-στερεού, εκχύλιση υγρού υπό πίεση, με μικροκύματα, υπερήχους, υπερκρίσιμα ρευστά κ.ά. (de Elguea-Culebras, Bravo and Sánchez-Vioque, 2022).

Ένα σε μεγάλη έκταση μελετημένο πεδίο, αφορά τη χρήση των φαινολικών συστατικών που ανακτώνται από τα υπολείμματα της βιομηχανίας αιθέριων ελαίων, στη βιομηχανία των τροφίμων. Ο Πίνακας 1.5 αφορά ορισμένα παραδείγματα εφαρμογών.

Πίνακας 1.5: Παραδείγματα εφαρμογών αξιοποίησης της δράσης των φαινολικών ενώσεων από εκχυλίσματα/παραπροϊόντα αρωματικών φυτών στη βιομηχανία τροφίμων

Αρωματικό Φυτό	Εφαρμογή	Βιβλιογραφία
Ξηρά και αλεσμένα υπολείμματα λεβάντας & μελισσόχορτου (μετά την απόσταξη των αιθέριων ελαίων)	Ενίσχυση αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ψωμί	Skendi <i>et al.</i> , 2022
Ξηρά φύλλα ρίγανης	Εμπλουτισμός παρθένου ελαιόλαδου για ενίσχυση αντιοξειδωτικής ικανότητας	Peñalvo <i>et al.</i> , 2016

Λιποδιαλυτό μίγμα δενδρολίβανου	Σε λουκάνικα για μείωση των δραστικών ενώσεων θειοβαρβιτουρικού οξέος και ελάττωση απώλειας κόκκινου χρώματος	Sebranek <i>et al.</i> , 2005
Υδατοδιαλυτό μίγμα δενδρολίβανου	Προστασία από οξείδωση των λιπιδίων μαγειρεμένης γαλοπούλας κατά την συντήρηση υπό ψύξη	Yu <i>et al.</i> , 2002
Εμπορικά εκχυλίσματα δενδρολίβανου και ρίγανης	Αναστολή λιπιδικής οξείδωσης σε patties μοσχαριού συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα για συντήρηση 16 ημερών	Sánchez-Escalante <i>et al.</i> , 2003
Εκχύλισμα ρίγανης	Αναστολή λιπιδικής οξείδωσης σε burgers αρνιού συσκευασμένα υπό κενό και για μηχανικά διαχωρισμένο κρέας κοτόπουλου συσκευασμένο υπό κενό	Vergara, Cózar and Rubio, 2020, Hać-Szymańczuk <i>et al.</i> , 2019
Εκχυλίσματα υσσώπου, λεβάντας, Ισπανικής μαντζουράνας και Ισπανικού φασκόμηλου	Αντιμυκητιακές ιδιότητες κατά του <i>Penicillium verrucosum</i>	de Elguea-Culebras, Bravo and Sánchez-Vioque, 2022
Εμπορικό εκχύλισμα δενδρολίβανου	Προσθήκη σε συσκευασία LDPE, ελάττωση λιπιδικής οξείδωσης κρέατος	Barbosa-Pereira <i>et al.</i> , 2014
Εμπορικό εκχύλισμα ρίγανης	Προσθήκη σε πολυστρωματικό φιλμ πολυαιθυλενίου και πολυαμιδίου, ελάττωση λιπιδικής οξείδωσης κρέατος, προστασία χρώματος	Camo <i>et al.</i> , 2011
Εργαστηριακά προετοιμασμένο αιθανολικό εκχύλισμα δενδρολίβανου	Προσθήκη σε ζελατίνη χοίρου, χιτοζάνη και μείγματα αυτών, αντιβακτηριακή δράση κατά των <i>S. aureus</i> & <i>E. coli</i>	Bonilla and Sobral, 2016

1.4 Μελισσόχορτο

Το *Melissa officinalis* είναι ένα καλλιεργούμενο πολυετές αρωματικό φυτό (βότανο) με άρωμα λεμονιού, γνωστό και ως “βάλσαμο λεμονιού”, “γλυκό βάλσαμο” ή “κοινό βάλσαμο” (Scholey *et al.*, 2014; Shakeri, Sahebkar and Javadi, 2016). Ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* και αναπτύσσεται ευρέως στην κεντρική και νότια Ευρώπη και στη Μικρά Ασία. Ωστόσο, καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο λόγω των γαστρονομικών ιδιοτήτων του. Στο Ιράν, είναι γνωστό τοπικά με τα ονόματα “Barenboim”, “Varangboo” και “Faranjmoshk” και απαντάται στα βόρεια, βορειοδυτικά και δυτικά τμήματα της χώρας (Dastmalchi *et al.*, 2008). Μεγαλώνει σε ύψος 30-125 εκ. και τα φύλλα του είναι μίσχοι, ωοειδούς σχήματος με μήκος έως 6 εκ. και πλάτος έως 3 εκ.. Το μελισσόχορτο μπορεί να αναπτύσσεται γρήγορα σε θερμοκρασίες 15-35°C και απαιτεί καθ’ όλη τη διάρκεια του χρόνου κατακρήμνιση 500-600 χιλ., ειδάλως πρέπει να ποτίζεται (Shakeri, Sahebkar and Javadi, 2016).

Τα αρχεία σχετικά με τη φαρμακευτική του χρήση χρονολογούνται έως και 2000 χρόνια πριν, συμπεριλαμβανομένης της σύστασης του Παράκελσου (γνωστός και ως «πατέρας» της τοξικολογίας) ο οποίος ισχυριζόταν ότι «Το φυτό θα αναζωογονούσε πλήρως έναν άνθρωπο και θα έπρεπε να χρησιμοποιείται για όλες τις ασθένειες που θεωρείται ότι προέρχονται από διαταραχή του νευρικού συστήματος». Αρκετοί φαρμακοποιοί έχουν αποδώσει στο φυτό γενικές ευεργετικές επιδράσεις στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων ειδικών βελτιώσεων της μνήμης (Scholey *et al.*, 2014). Χρησιμοποιείται στο σύστημα παραδοσιακής ιατρικής του Ιράν για τη θεραπεία πονοκεφάλων, μετεωρισμού, δυσπεψίας, κολικών, ναυτίας, νευρικότητας, αναιμίας, ιλίγγου, συγκοπής, δυσφορίας, άσθματος, βρογχίτιδας, αμηνόρροιας, καρδιακής ανεπάρκειας, αρρυθμιών, αιπνίας, επιληψίας, κατάθλιψης, ψύχωσης, υστερίας, έλκους και πληγών (Dastmalchi *et al.*, 2008).

Πιο πρόσφατα, η έρευνα έχει στραφεί στις βιοδραστικές ιδιότητες του *M. officinalis*, συμπεριλαμβανομένων των επιδράσεων του στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Όσον αφορά τις νευρογνωστικές επιδράσεις του, η δέσμευση με χολινεργικούς, νικοτινικούς και μουσκαρινικούς υποδοχείς σε ομογενοποιημένα του ανθρώπινου εγκεφάλου διέφερε σημαντικά μεταξύ των στελεχών του *M. officinalis*. Ένα εκχύλισμα με αμελητέα δέσμευση με χολινεργικούς υποδοχείς επέδειξε δράση ως ήπιο ηρεμιστικό/αγχολυτικό αλλά δεν ενίσχυε την μνήμη. Αντιθέτως, εκχύλισμα που εξετάστηκε για υψηλή μουσκαρινική και νικοτινική δέσμευση στον ανθρώπινο εγκεφαλικό ιστό είχε τα ίδια ηρεμιστικά αποτελέσματα αλλά και βελτιωμένη απόδοση της μνήμης. Αυτό υποδηλώνει ότι, στην περίπτωση του *M. officinalis*, οι ισχυρές ηρεμιστικές/αγχολυτικές επιδράσεις του μπορεί να εξαρτώνται από έναν, ακόμη άγνωστο, μη χολινεργικό μηχανισμό (Scholey *et al.*, 2014). Έρευνες επίσης, έχουν αποδείξει ότι το μελισσόχορτο εκδηλώνει βιολογικές δράσεις στις οποίες συμπεριλαμβάνονται αντιοξειδωτικές, υπογλυκαιμικές, υπολιπιδαιμικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντικαταθληπτικές, αγχολυτικές, αντιερεθιστικές, αντιφλεγμονώδης και σπασμολυτικές ιδιότητες (Shakeri, Sahebkar and Javadi, 2016). Παρακάτω (Πίνακας 1.6) παρουσιάζονται ορισμένες μελέτες που αφορούν παραδείγματα βιολειτουργικών δράσεων του μελισσόχορτου.

Πίνακας 1.6: Παραδείγματα κλινικών μελετών κατά τη χρήση μελισσόχορτου

Ιδιότητες που ελέγχθηκαν	Εφαρμοσμένη δόση	Χρόνος χρήσης	Παρατηρούμενη Επίδραση	Γκρουπ Δοκιμής	Μελέτη
Αντιοξειδωτικές ιδιότητες	2 x 1,5 g αφεψήματος φύλλων	30 ημέρες	Αύξηση της δραστηριότητας των: καταλάση, υπεροξειδίου δισμουτάσης, υπεροξειδάση γλουταθειόνης Μείωση της βλάβης του DNA,	n=55	Zeraatpis he <i>et al.</i> , 2011

			υπεροξειδωσης των λιπιδίων και δραστηριότητας της μυελοϋπεροξειδάση		
Αγχολυτικές και αντικαταθλητικές ιδιότητες	2 x 500 mg εκχυλίσματος φύλλων την ημέρα	14 ημέρες	Μείωση συμπτωμάτων άγχους	n=28	Alijaniha <i>et al.</i> , 2015
Αντιμετώπιση διαταραχής ύπνου	2 x 300 mg εκχυλίσματος φύλλων	15 ημέρες	Ελάττωση συχνότητας απνίας	n=20	Cases <i>et al.</i> , 2011
Υποστήριξη λειτουργίας των γνωστικών λειτουργιών	0,6 g εκχυλίσματος φύλλων	1 ημέρα	Βελτίωση μαθηματικών και ψυχοκινητικών δεξιοτήτων	n=5	Scholey <i>et al.</i> , 2014
Εφαρμογές στην καρδιολογία	2 x 500 mg εκχυλίσματος φύλλων	14 ημέρες	Μείωση ρυθμού καρδιακών παλμών κατά 36,8%	n=28	Alijaniha <i>et al.</i> , 2015
Εφαρμογές στην καταπολέμηση της παχυσαρκίας	Αφένημα από 2 g Μελισσόχορτου	1 μήνας	Ελάττωση σωματικού βάρους, δείκτη μάζας και αρτηριακής πίεσης	n=18	Jafari <i>et al.</i> , 2018

Το μελισσόχορτο αποτελεί πηγή μίας μεγάλης ποικιλίας φυτοχημικών ενώσεων. Σε αυτά περιλαμβάνονται αιθέρια έλαια κυρίως σε μορφή οξυγονωμένων μονοτερπενίων, σε μικρές περιεκτικότητες συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη της οικογένειας *Lamiaceae* (0,02-0,3%), τριτερπένια (κυρίως ουρσολικό και ελανολικό οξύ), φαινολικά οξέα (κυρίως παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμικού οξέος), φλαβονοειδή, χολοκυτταρίνη, λιγνίνη (25%), άλφα-κυτταρίνη (32,7%), γλυκόζη και ξυλόζη (Shakeri, Sahebkar and Javadi, 2016). Παρακάτω (Πίνακας 1.7) παρουσιάζονται αναλυτικά οι κυριότερες φυτοχημικές ουσίες που έχουν απομονωθεί από το *M. officinalis*.

Πίνακας 1.7: Κύριες φυτοχημικές ενώσεις απομονωθείσες και χαρακτηρισμένες από στελέχη του *M. officinalis*, Shakeri, Sahebkar and Javadi, 2016

No.	Κατηγοριοποίηση	Χημική Ένωση	Μέρος Φυτού
1	Οξυγονωμένα Μονοτερπένιο	(2E)-3,7-διμεθυλοκτα-2,6-διενάλη (Geranial)	Εναέρια Μέρη
2	Οξυγονωμένα Μονοτερπένιο	(2Z) 3,7-διμεθυλοκτα-2,6-διενάλη (Neral)	Εναέρια Μέρη
3	Οξυγονωμένα Μονοτερπένιο	3,7-διμεθυλοκτα-6-ενάλη (Citronellal)	Εναέρια Μέρη
4	Οξυγονωμένα Μονοτερπένιο	(2E)-3,7-διμεθυλοκτα-2,6-διεν-1-όλη (Geraniol)	Εναέρια Μέρη
5	Οξυγονωμένα Μονοτερπένιο	Δεκα-2,4-διενάλη (Decadienal)	Φύλλα

6	Οξυγονωμένα Μονοτερπένιο	2-μεθυλο-5-προπαν-2-υλφαινόλη (Carvacrol)	Φύλλα
7	Οξυγονωμένα Μονοτερπένιο	Μεθυλ-3,7-διμεθυλοκτ-6-ενοϊκό (Methyl citronellate)	Φύλλα
8	Υδρογονάνθρακας Σεσκιτερπενίου	β-Cubebene	Εναέρια Μέρη
9	Υδρογονάνθρακας Σεσκιτερπενίου	β-Caryophyllene	Εναέρια Μέρη
10	Τριτερπένιο	Ουρσολικό οξύ	Εναέρια Μέρη
11	Τριτερπένιο	Ολενολικό οξύ	Εναέρια Μέρη
12	Τριτερπένιο	3β,16β,23-τριυδροξυ-13,28-εποξυ- 11-εν-3-O-β-D-γλυκοπιρανοσίδη	Κοτσάνι & Φύλλα
13	Τριτερπένιο	3,23-δισουλφιδικός εστέρας του 3β,19α,23-τριυδροξουρσ-12-εν-28- οϊκού οξέος	Κοτσάνι & Φύλλα
14	Τριτερπένιο	3,23-δισουλφιδικός εστέρας του 2α,3β,19α,23-τετραυδροξουρσ-12- εν-28-οϊκού οξέος	Κοτσάνι & Φύλλα
15	Τριτερπένιο	3,23-δισουλφιδικός εστέρας του 2α,3β,19α,23-τετραυδροξουρσ-12- εν-28-οϊκού οξέος, 28-O-β-D- γλυκοπιρανοσίδη	Κοτσάνι & Φύλλα
16	Τριτερπένιο	3,23-δισουλφιδικός εστέρας του 2α,3β,23,29-τριυδροξουλεν-12-εν- 28-οϊκού οξέος	Κοτσάνι & Φύλλα
17	Τριτερπένιο	3,23-δισουλφιδικός εστέρας του 2α,3β,23,29-τετραυδροξουλεν-12- εν-28-οϊκού οξέος	Κοτσάνι & Φύλλα
18	Τριτερπένιο	3,23-δισουλφιδικός εστέρας του 2α,3β,23,29-τετραυδροξουλεν-12- εν-28-οϊκού οξέος, 28-O-β-D- γλυκοπιρανοσίδη	Φύλλα
19	Τριτερπένιο	23-μονοσουλφιδικός εστέρας του 2 ^α ,23-διυδροξουρσ-12-εν-28-οϊκού οξέος, 28-O-β-D-γλυκοπιρανοσίδη	Φύλλα
20	Φαινολικό Οξύ	Ροσμαρινικό οξύ	Εναέρια Μέρη
21	Φαινολικό Οξύ	2-(3,4-διυδροξυφαινυλ)-Γαλακτικό οξύ	Εναέρια Μέρη
22	Φαινολικό Οξύ	Καφεϊκό οξύ	Εναέρια Μέρη
23	Φαινολικό Οξύ	Λιθοσπερμικό οξύ Α	Εναέρια Μέρη
24	Φαινολικό Οξύ	Σαλβιανολικό οξύ F	Εναέρια Μέρη
25	Φαινολικό Οξύ	Σαλβιανολικό οξύ Α	Εναέρια Μέρη
26	Φαινολικό Οξύ	Σαλβιανολικό οξύ C	Εναέρια Μέρη
27	Φαινολικό Οξύ	Σαλβιανολικό οξύ Β	Εναέρια Μέρη
28	Φαινολικό Οξύ	Σαγερινικό οξύ	Εναέρια Μέρη
29	Φαινολικό Οξύ	Γιουννανεϊκό οξύ	Εναέρια Μέρη
30	Φαινολικό Οξύ	Χλωρογενικό οξύ	Φύλλα
31	Φαινολικό Οξύ	Γαλλικό οξύ	Φύλλα

32	Φαινολικό Οξύ	m-Κουμαρικό οξύ	Φύλλα
33	Φαινολικό Οξύ	Μελιτρικό οξύ Α	Εναέρια Μέρη
34	Φαινολικό Οξύ	Μελιτρικό οξύ Β	Εναέρια Μέρη
35	Φαινολικό Οξύ	Ελλαγικό οξύ	Εναέρια Μέρη
36	Γλυκοζίτης Φλαβόνης	Λουτεολιν-3'-Ο-β-D-γλυκουρονίδιο	Φύλλα
37	Γλυκοζίτης Φλαβόνης	Λουτεολιν-7-Ο-γλυκοζίτης	Φύλλα
38	Γλυκοζίτης Φλαβόνης	Απιγενιν-7-Ο-γλυκοζίτης	Φύλλα
39	Γλυκοζίτης Φλαβονόλης	Ισοκερκιτρίνη	Φύλλα
40	Φλαβονόλη	Ραμνοκιτρίνη	Φύλλα
41	Γλυκοζίτης Φλαβόνης	Λουτεολιν-7-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσίδη-3'-Ο-β-D-γλυκουρονοκυρανοσίδη	Φύλλα
42	Φλαβόνη	Απιγενίνη	Φύλλα
43	Γλυκοζίτης Φλαβόνης	Λουτεολιν-7-Ο-β-D-γλυκουροκυρανοσίδη	Φύλλα
44	Φλαβόνη	Λουτεολίνη	Φύλλα
45	Γλυκοζίτης Φλαβόνης	Απιγενιν-7-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσίδη	Φύλλα
46	Γλυκοζίτης Φλαβόνης	Λουτεολιν-3'-Ο-β-D-γλυκουροκυρανοσίδη	Φύλλα
47	Γλυκοζίτης Φλαβονόνης	Εσπεριδίνη	Φύλλα
48	Φλαβονόνη	Εσπερετίνη	Φύλλα
49	Γλυκοζίτης Φλαβονόνης	Εριοδικτυολ-7-Ο-γλυκοσίδη	Φύλλα
50	Γλυκοζίτης Φλαβονόνης	Ναργινίνη	Φύλλα
51	Φλαβονόνη	Ναρινγενίνη	Φύλλα
52	Φλαβονόλη	Κατεχίνη	Εναέρια Μέρη
53	Φλαβονόλη	Επι-Κατεχίνη	Εναέρια Μέρη
54	Γλυκοζίτης Φλαβονόλης	Ρουτίνη	Εναέρια Μέρη

1.5 Εκχύλιση Βιοδραστικών Συστατικών

1.5.1 Εκχύλιση Φαινολικών Ενώσεων από Φυτικά Παραπροϊόντα: Γενικές αρχές

Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης φαινολικών συστατικών προέρχεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της ικανότητας διαλυτοποίησης του διαλύτη και της σχετικής διαλυτότητας του δείγματος, η οποία καθορίζει τον συντελεστή κατανομής και την ικανότητα εκχύλισής τους. Με δεδομένο αυτό, η ικανότητα των διαλυτών να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου είναι καθοριστική, ειδικά για την επίτευξη της διαλυτοποίησης και της απελευθέρωσης των δεσμευμένων στη μήτρα ειδών ([Gil-Martín et al., 2022](#)). Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα διάχυσης του διαλύτη εντός της μήτρας/υποστρώματος, τόσο ευκολότερη είναι η αποσταθεροποίηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου εντός της δομής της και υψηλότερη η διαλυτοποίηση των ενώσεων-στόχων ([Alara, Abdurahman and Ukaegbu, 2021](#)). Με σκοπό την ικανοποίηση όλων αυτών των συνθηκών, η πολικότητα του διαλύτη (ή των διαλυτών) καθίσταται ιδιαίτερα κρίσιμη παράμετρος, δεδομένου ότι καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την εκλεκτικότητα του

συστήματος διαχωρισμού και συνεπώς, τα διάφορα φαινορικά συστατικά που μπορούν να ανακτηθούν από το εκχύλισμα. Έτσι, οι διαλύτες με διαφορετική πολικότητα έχουν σημαντική επίδραση στην απόδοση, το προφίλ σύνθεσης και την αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών παρασκευασμάτων. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν ακριβείς ενδείξεις σχετικά με τους διαλύτες για συγκεκριμένες (πολυ)φαινόλες ή φαινορικά κλάσματα, εκτός από την αρχή της κλασικής Χημείας «όμοιο διαλύει όμοιο». Τα φαινορικά παράγωγα είναι γενικά πολικά και συνεπώς περισσότερο υδρόφιλα παρά λιπόφιλα. Παρόλο που η ειδική υδρο/λιποφιλικότητα τους εξαρτάται από τον αριθμό και τη σύζευξη των φαινολικών ομάδων, οι πολικοί πρωτικοί διαλύτες παρέχουν γενικά καλύτερα αποτελέσματα εκχύλισης, καθώς έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια των διαλυτοποιημένων ουσιών. Ως εκ τούτου, οι αλειφατικές αλκοόλες (π.χ. μεθανόλη, αιθανόλη) σε μείγματά τους με νερό και οι πολικοί οργανικοί διαλύτες (π.χ. ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας) είναι οι πιο δημοφιλείς επιλογές για την εκχύλιση φαινολικών από φυτικά παραπροϊόντα (Gil-Martín *et al.*, 2022).

Ένα μεγάλο μέρος των πρωτοκόλλων εκχύλισης περιλαμβάνει διαλύτες που δεν θεωρούνται GRAS (Generally Recognized As Safe), οι οποίοι είναι τοξικοί, βιολογικά επιθετικοί και συνεπώς ακατάλληλοι για τις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών ή φαρμάκων. Ως εκ τούτου, η υψηλή τοξικότητα της μεθανόλης την καθιστά ακατάλληλη για εφαρμογές που περιλαμβάνουν επαφή ή κατάποση από τον άνθρωπο. Αντίθετα, η αιθανόλη, αν και ακριβότερη, είναι χαμηλής τοξικότητας, φιλική προς το περιβάλλον, παρέχει εκχυλίσεις με υψηλό περιεχόμενο πολυφαινολών και είναι κατάλληλη για διεργασίες μεγάλης κλίμακας (Shi *et al.*, 2005; Chávez-González *et al.*, 2020). Με βάση αυτή τη φιλική προς το περιβάλλον προοπτική, η γλυκερόλη έχει εισέλθει πλήρως στη σκηνή της πράσινης χημείας ως ένας νέος υποψήφιος για την αντικατάσταση των οργανικών διαλυτών (Manousaki *et al.*, 2016; Makris and Lalas, 2020). Η πρωτική γλυκερόλη, που απαντάται φυσικά στα φυτά, μοιράζεται με τα υδροαιθανολικά μείγματα καλές ικανότητες για την εκχύλιση φαινολικών ουσιών λόγω της σχετικά χαμηλής διηλεκτρικής σταθεράς της ($\epsilon = 42,5$), η οποία μειώνει την πολικότητα ($\epsilon_{\text{νερού}} = 80,1$) και διευκολύνει τη διαλυτοποίηση των μετρίως υδατοδιαλυτών μορίων, όπως κάποια φαινορικά μόρια (Shehata *et al.*, 2015).

Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης (διαβροχή, φιλτράρισμα, έγχυση) τείνουν να αντικαθίστανται τα τελευταία χρόνια από πλέον ανεπτυγμένες αντίστοιχες μη συμβατικές (υπέρηχοι, μικροκύματα, παλμικό ηλεκτρικό πεδίο) ακολουθώντας την τάση προς την ανάπτυξη “πράσινων” μεθόδων, οι οποίες αφορούν ουσιαστικά την ελαχιστοποίηση των ρύπων, των αποβλήτων, της χρησιμοποιούμενης ενέργειας και του χρόνου εκχύλισης, εμφανίζοντας όμως υψηλές αποδόσεις εκχύλισης και εκχυλίσματα άριστης ποιότητας. Ορισμένα παραδείγματα συμβατικών και μη μεθόδων εκχύλισης σε φυτικούς ιστούς παρουσιάζονται στη συνέχεια (Πίνακας 1.8).

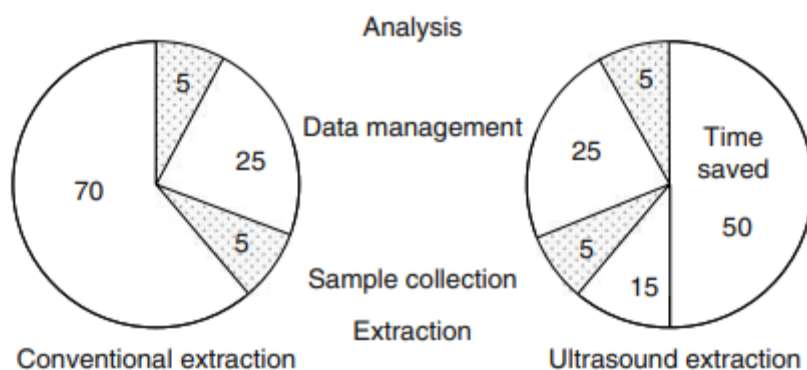
Πίνακας 1.8: Παραδείγματα εκχυλίσεων φυτικών πρώτων υλών με συμβατικές & μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, καθώς και συνδυασμό αυτών

Μέθοδος Εκχύλισης	Πρώτη Ύλη	Εκχυλιζόμενα Συστατικά	Βιβλιογραφία
Infusion (έγχυση) & Decoction	Τζίντζερ	Φαινολικά	Mahmudati, Wahyono and Djunaedi, 2020
Maceration (Διαβροχή) & Ultrasound Assisted Extraction (Υπέρηχοι)	Μαύρο σταφύλι Sardasht	Φαινολικά, Ανθοκυανίνες	Matini <i>et al.</i> , 2020
Percolation (Φιλτράρισμα)	Αλεσμένη ελαιοκράμβη, σόγια & ηλίανθος	Φυτικό Έλαιο	Avram <i>et al.</i> , 2014
Soxhlet & SuperCritical CO ₂ (Υπερκρίσιμο CO ₂)	Μυκητιακή βιομάζα	Βλεννικό οξύ	Thomas, Virtanen and Wiebe, 2018
Pressurized Liquid Extraction (Εκχύλιση υγρού υπό πίεση)	Μαύρο μούρο (<i>Morus nigra L.</i>)	Φαινολικά & Ανθοκυανίνες	Espada-Bellido <i>et al.</i> , 2018
Microwave Assisted Extraction (Μικροκύματα)	Μέντα (<i>Mentha rotundifolia</i>)	Τερπενοειδή	García-Sarrió <i>et al.</i> , 2018
Ultrasound Assisted Extraction (Υπέρηχοι)	Κράνμπερι	Ανθοκυανίνες	Xue <i>et al.</i> , 2021
Ενζυμική Εκχύλιση	Ιαπωνικός δυόσμος	Αιθέριο έλαιο	Shimotori <i>et al.</i> , 2020
Pulsed Electric Field extraction (Παλμικό ηλεκτρικό πεδίο)	Ελιές	Ελαιόλαδο	Tamborrino <i>et al.</i> , 2022

1.5.2 Εκχύλιση με Υπερήχους

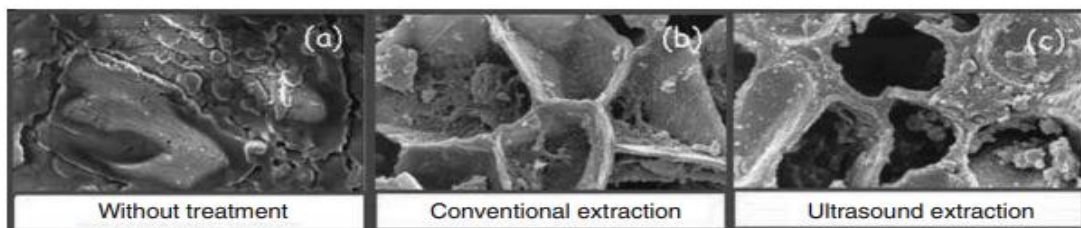
Η εκχύλιση με υπερήχους χρησιμοποιείται για την απόσπαση φυτικών συστατικών και αποσκοπεί στην μείωση του χρόνου εκχύλισης σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους, στην ελαχιστοποίηση της κατανάλωσης διαλύτη αλλά και στην αύξηση των αποδόσεων εκχύλισης και βελτίωσης της ποιότητας των εκχυλισμάτων. Οι πρώτες εφαρμογές σχετίζονταν με τον προσδιορισμό των μετάλλων στα τρόφιμα. Από τότε, διάφορες ενώσεις έχουν εκχυλιστεί αποτελεσματικά, όπως αρωματικές ενώσεις, αντιοξειδωτικά, έλαια, χρωστικές κ.λπ.

Η τεχνική της εκχύλισης με υπερήχους (UAE) είναι εύκολο να εφαρμοστεί λόγω της σχετικής απλής οργανολογία της και του χαμηλού κόστους εξοπλισμού της. Βασίζεται στη χρήση ενέργειας που προέρχεται από υπερήχους (ηχητικά κύματα με συχνότητες άνω των 20 kHz) για τη διευκόλυνση της απόσπασης αναλυτών από στερεό δείγμα μέσω διαλύτη, ο οποίος επιλέγεται ανάλογα με τη φύση των προς εκχύλιση διαλυμένων ουσιών. Η UAE έχει χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή διαφόρων οργανικών ενώσεων από διαφορετικές μήτρες και ο χρόνος εκχύλισης μπορεί να μειωθεί από 3 έως και 10 φορές (Εικόνα 1.4) σε σύγκριση με τις καθιερωμένες συμβατικές μεθόδους εκχύλισης (Carrera *et al.*, 2012).



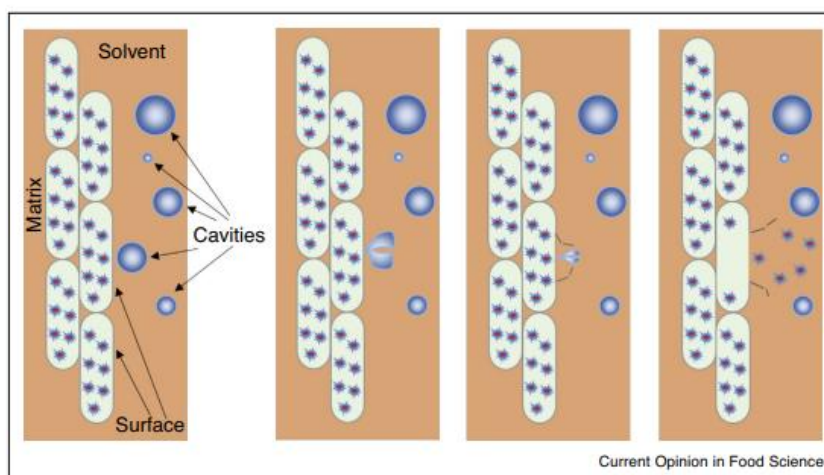
Εικόνα 1.4: Σχετική κατανάλωση χρόνου σε διαφορετικά βήματα για μία διαδικασία ανάλυσης τροφίμου, Ötles, 2009

Οι ιστοί των τροφίμων αποτελούνται από κύτταρα τα οποία με τη σειρά τους περιβάλλονται από τοιχώματα. Ορισμένα κύτταρα υπάρχουν υπό τη μορφή αδένων (εξωτερικοί ή εσωτερικοί) οι οποίοι περιέχουν τις ενώσεις-στόχους (γενικά δευτερογενείς μεταβολίτες). Χαρακτηριστικό τέτοιων αδένων (όταν είναι εξωτερικοί) είναι ότι ο φλοιός τους είναι πολύ λεπτός και μπορεί εύκολα να καταστραφεί ή να διαρρηχθεί. Όσον αφορά τους εσωτερικούς αδένες, ο βαθμός άλεσης της φυτικής ύλης που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Κατά την εκχύλιση με υπερήχους, αρχικά, καταστρέφεται το στρώμα της επιδερμίδας και εκκρίνεται έλαιο του φυτικού ιστού. Στη συνέχεια, όταν οι αδένες υποβληθούν σε πιο έντονες θερμικές καταπονήσεις και τοπικές υψηλές πιέσεις που προκαλούνται από τη σπηλαίωση (σχηματισμός ενός κενού χώρου μέσα σε ένα στερεό αντικείμενο ή σώμα λόγω της δημιουργίας μικροφουσαλίδων που συμπιέζονται και αποσυμπιέζονται) (Εικόνα 1.5), η συσσώρευση πίεσης μέσα στους αδένες προκαλεί τη ρήξη τους (Ötles, 2009).



Εικόνα 1.5: Ηλεκτρονικό μικρογράφημα σπόρων κύμινου (α-ανέπαφοι, δ-συμβατικά εκχυλισμένοι, γ-εκχύλιση με υπερήχους), Ötles, 2009

Η έκρηξη των φυσαλίδων σπηλαίωσης στην επιφάνεια ενός προϊόντος έχει ως αποτέλεσμα την μικρο-εκτόξευση, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αποφλοίωση της επιφάνειας, τη διάβρωση και τη διάσπαση σωματιδίων (Εικόνα 1.6). Επιπλέον, η έκρηξη φυσαλίδων σπηλαίωσης σε υγρό μέσο οδηγεί σε μακρο-αναταράξεις και σε μικροανάμιξη (Chemat *et al.*, 2017) με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διάχυση των ενώσεων-στόχων στο διαλύτη.



Εικόνα 1.6: Μηχανισμός απελευθέρωσης δραστικών ενώσεων από κύτταρα με κύματα υπερήχων, (Panja, 2018)

Η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από μία πρώτη ύλη, όπως τρόφιμο ή αρωματικό φυτό, επηρεάζεται από ένα πλήθος παραγόντων, όπως η χημική δομή των φαινολικών ενώσεων, η χρησιμοποιούμενη μέθοδος εκχύλισης, η σύσταση και ο χρόνος αποθήκευσης της πρώτης ύλης. Σε περιπτώσεις εκχύλισης με διαλύτη, η μέθοδος επηρεάζεται επιπλέον από την πολικότητα του διαλύτη, τον χρόνο εκχύλισης, τη θερμοκρασία, την αναλογία δείγματος/διαλύτη, την ενέργεια που δίνεται στο σύστημα (π.χ. στην εκχύλιση με υπερήχους και μικροκύματα), την εφαρμοζόμενη πίεση και από ιδιότητες συνυφασμένες με τα αρωματικά φυτά, όπως η σύνθεση τους σε φαινολικές ενώσεις. Η εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από αρωματικά φυτά, προϋποθέτει τα δείγματα να είναι αλεσμένα και ομογενοποιημένα. Η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη και μίγμα αλκοόλης-νερού αποτελούν συχνούς διαλύτες σε τέτοιου είδους εκχυλίσεις (Costa *et al.*, 2015)

1.5.3 Πειραματικός Σχεδιασμός

Γενικά, είναι γνωστό πως η παραδοσιακή μέθοδος One-Factor-at-a-Time (OFAT) που εφαρμόζεται για τη βελτιστοποίηση μιας διαδικασίας με σκοπό την επίτευξη του επιθυμητού, ανά περίπτωση, αποτελέσματος, απαιτεί γενικά μεγάλο αριθμό πειραμάτων, ενώ το αποτέλεσμα συχνά δεν είναι το βέλτιστο δυνατό, καθώς δεν δύναται να αξιολογηθούν και να συνεκτιμηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραμέτρων της διαδικασίας. Αυτό έχει ως συνέπεια τη σπατάλη μεγάλων ποσοτήτων υλικών, χρόνου και ενέργειας με σκοπό την βελτιστοποίηση ενός πειράματος (Prajapati, Patel and Mishra, 2020). Ένα σχεδιασμένο πείραμα ή ένα μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού αποτελεί μια σειρά από εκτελέσεις ή δοκιμές, στις οποίες πραγματοποιούνται παράλληλα και σκοπίμως αλλαγές στις μεταβλητές ή παραμέτρους μιας διαδικασίας, όπως για παράδειγμα μια εκχύλιση, και στη συνέχεια παρατηρούνται οι αποκρίσεις ή μετρούμενα μεγέθη τα οποία αφορούν αυτήν τη διαδικασία (πχ. απόδοση εκχύλισης). Στη βιομηχανία, τα σχεδιασμένα πειράματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συστηματική διερεύνηση της διαδικασίας ή των μεταβλητών οι οποίες επηρεάζουν την ποιότητά ενός προϊόντος. Αφού προσδιοριστούν οι συνθήκες διαδικασίας και τα συστατικά του προϊόντος τα οποία επηρεάζουν την ποιότητά του, είναι εφικτό να γίνουν κατευθυνόμενες, καθορισμένες και στοχευμένες δοκιμές βελτίωσης με σκοπό την παραλαβή επιθυμητών αποτελεσμάτων. Αντίστοιχα στην έρευνα, αξιοποιείται με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων ή επιθυμητών συνθηκών κατά την διεξαγωγή ενός πειράματος καθώς και στην ελάττωση των διεξαγόμενων πειραμάτων συγκριτικά με τη μέθοδο OFAT. Τα σχεδιασμένα πειράματα διεκπεραιώνονται συχνά σε τέσσερις φάσεις: σχεδιασμός, έλεγχος, βελτιστοποίηση και επαλήθευση. Ένα παράδειγμα μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού, αποτελεί το μοντέλο Box-Behnken. Το μοντέλο Box-Behnken είναι ένα ειδικό είδος πειραματικού σχεδιασμού επιφάνειας απόκρισης το οποίο δεν περιλαμβάνει ενσωματωμένο παραγοντικό ή κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό και απαιτεί μόνο τρία (3) επίπεδα τιμών σε κάθε μελετώμενη μεταβλητή για να διεξάγει ένα πείραμα. Επινοήθηκε από τους George E. P. Box και Donald Behnken το 1960 και θεωρείται ακόμα πιο “επιδέξιος” και ισχυρός μεταξύ πολλών άλλων μεθόδων σχεδιασμού. Κατά τη μέθοδο αυτή, κάθε παράγοντας, ή ανεξάρτητη μεταβλητή, τοποθετείται σε μία από τις τρεις ίσες τιμές, που συνήθως κωδικοποιούνται ως -1, 0, +1. (‘Box–Behnken design’, 2023; *What is a designed experiment?*). Χαρακτηριστικά παραδείγματα μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού σε ερευνητικές εργασίες παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 1.9).

Πίνακας 1.9: Παραδείγματα εφαρμογής πειραματικού σχεδιασμού σε ερευνητικές εργασίες

Ερευνητικό θέμα	Μέθοδος Πειραματικού Σχεδιασμού	Βιβλιογραφία
Περιγραφή διαδικασίας πρόσληψης αζώτου από μικροφύκη σε φωτοβιοαντιδραστήρες συνεχούς λειτουργίας	Model-Based design of Experiments (Droop & Monod models)	Saccardo <i>et al.</i> , 2023
Μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) για την ταυτόχρονη εκτίμηση της χλωροθαλιδόνης και της ηλεκτρικής μετοπρολόλης	Design of Experiment-based Taguchi Othogonal Array	Prajapati, Patel and Shah, 2021
Ανάλυση υπολειμμάτων εντομοκτόνων σε μέλι με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας	Plackett Burman design	Souza <i>et al.</i> , 2021
Επεξεργασία λυμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων με οργανικούς πηκτικούς παράγοντες	Full Factorial Design with Center Point (FFDCP)	Muniz, Pereira and Borges, 2021
Βελτιστοποίηση Εκχύλισης Φαινολικών Ενώσεων με Μικροκύματα από την Βρετανική Καμφορά (<i>Inula Britannica L.</i>)	Box-Behnken Design	Ivanova and Trendafilova, 2022

2. Σκοπός Εργασίας

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των παραπροϊόντων επεξεργασίας μελισσόχορτου τα οποία προκύπτουν κατά την βιομηχανική παραγωγή αιθέριων ελαίων ύστερα από την απόσταξή του, καθώς και η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης των εκχυλισμάτων τους. Μείζονος σημασίας κρίνεται επίσης η αξιολόγηση του πειραματικού μοντέλου που δημιουργήθηκε βάσει πειραματικού σχεδιασμού, με σκοπό την πρόβλεψη των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή εφαρμογή του στην βιομηχανία για την παραλαβή βιοδραστικών εκχυλισμάτων. Χαρακτηρίστηκε ακόμη, το φυτοχημικό προφίλ των εν λόγω εκχυλισμάτων με την χρήση της μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας συζευγμένης με Φασματομετρία Μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS/MS) σε αρνητικό ιοντισμό.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποκτά η μελέτη των πιθανών δράσεων-εφαρμογών των βιοδραστικών ενώσεων των παραπροϊόντων επεξεργασίας μελισσόχορτου τόσο στη βιομηχανία τροφίμων ως συντηρητικά και αντιοξειδωτικά μέσα όσο και σε βιομηχανίες καλλυντικών αλλά και φαρμάκων με σκοπό την δημιουργία προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Το μελισσόχορτο και κατά συνέπεια τα απόβλητα του, αποτελούν μια ύλη πλούσια σε φαινορικά οξέα και φλαβονοειδή τα οποία είναι υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική και δεσμευτική στις ελεύθερες ρίζες, δράση τους. Μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η χρήση του ως φάρμακο φυτικής βάσης μειώνει το στρες και το άγχος, προάγει τον ύπνο, βελτιώνει την όρεξη και ανακουφίζει τον πόνο και την δυσφορία που προκαλείται από την δυσπεψία. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει πλέον η μελέτη του φυτού αλλά και παραπροϊόντος του ως προς τις αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές δράσεις του. Ως εκ τούτου, γίνεται αντιληπτή η σημασία της αξιοποίησης ενός τόσο πλούσιου δευτερογενούς προϊόντος μιας και δύναται να χρησιμοποιηθεί ευρεία σε ποικίλους τομείς.

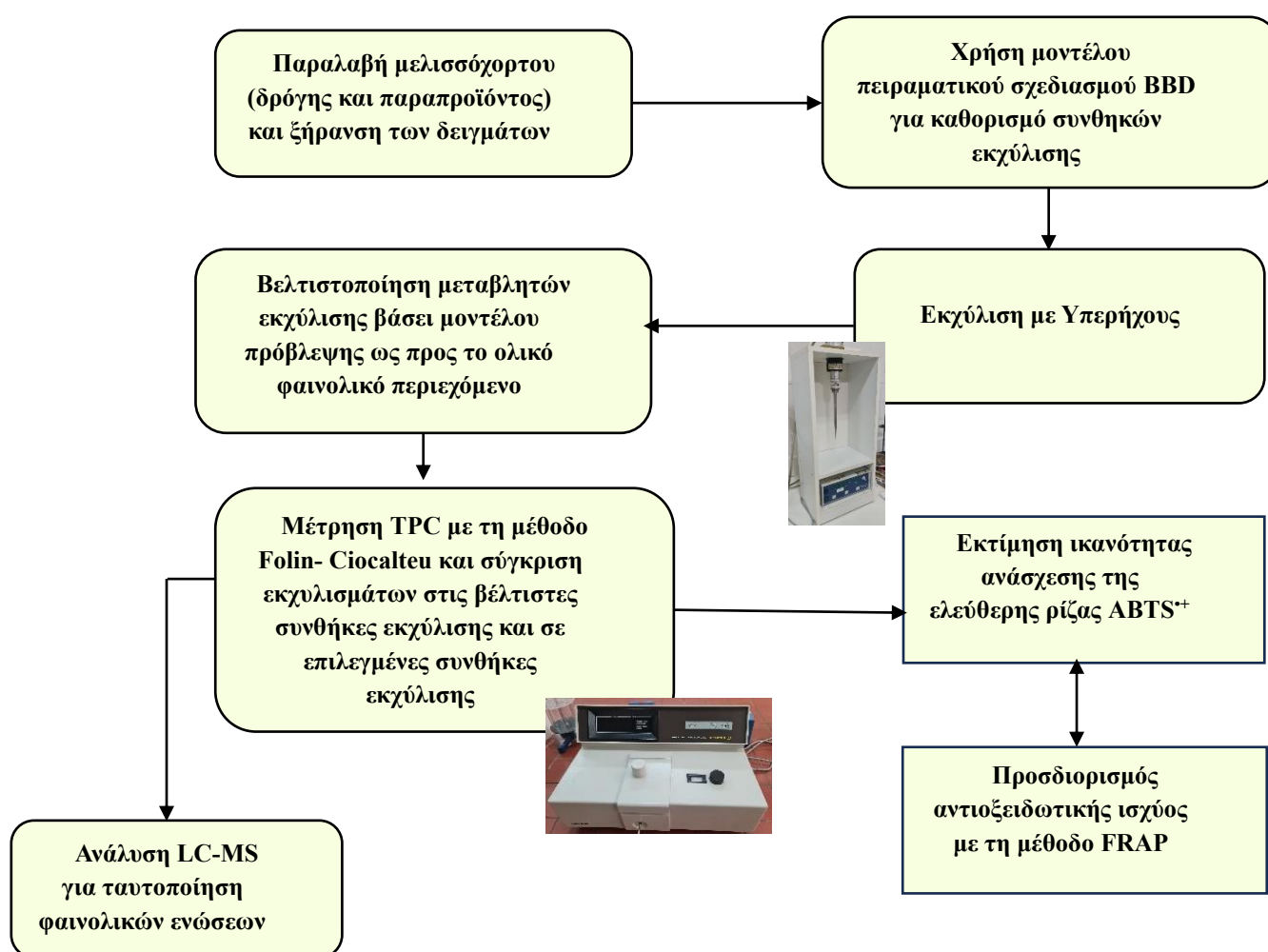
Σχετικά με το πειραματικό μέρος της εργασίας, η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από το ξηρό προϊόν και τα παραπροϊόντα μελισσόχορτου πραγματοποιήθηκε με χρήση υπερήχων και υδατοαιθανολικό διαλύτη σε 3 επίπεδα τιμών περιεκτικότητας αιθανόλης (20, 60 και 100%). Με σκοπό την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου τόσο του ξηρού προϊόντος όσο και των παραπροϊόντων επεξεργασίας μελισσόχορτου, εφαρμόστηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε στα 750 nm ενώ το σύνολο του φαινολικού περιεχομένου εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος (GAE)/g ξηρού δείγματος (dry herb). Εν συνεχεία, η αντιοξειδωτική δράση της ξηρής δρόγης στις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης καθώς και επιλεγμένων εκχυλισμάτων παραπροϊόντων, εκτιμήθηκε μέσω της μεθόδου FRAP στην οποία, ύστερα από κατάλληλη κατεργασία, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 595 nm και τα αποτελέσματα εκφράστηκε σε mg Fe(III) που ανήχθησαν σε Fe(II) ανά γραμμάριο μελισσόχορτου. Μετρήθηκε επίσης και η ικανότητα ανάσχεσης της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+}, όπου η απορρόφηση εκτιμήθηκε στα 734 nm και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg ισοδυνάμων πρότυπης ουσίας Trolox ανά γραμμάριο μελισσόχορτου. Τέλος, τα δείγματα παραπροϊόντων μελισσόχορτου αξιολογήθηκαν ως προς το φυτοχημικό τους προφίλ με την αναλυτική μέθοδο Υγρής

Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS/MS). Σε ό,τι αφορά στην ανάλυση με το φασματόμετρο μάζας, πραγματοποιήθηκε με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), με αρνητικό ιοντισμό για όλες τις υπό προσδιορισμό ουσίες και σάρωση θυγατρικού ιόντος (product ion scan) σε λειτουργία πολλαπλών μεταπτώσεων (multiple monitoring reaction, MRM). Έγινε συνολικά ταυτοποίηση 20 φαινολικών ενώσεων σε επιλεγμένα εκχυλίσματα παραπροϊόντων μελισσόχορτου, εκ των οποίων 16 φαινολικά οξέα, 3 φλαβόνες και 1 φλαβονόλη.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Πειραματική Πορεία

Η επεξεργασία του δείγματος μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* sp.), τόσο της δρόγης όσο και του παραπροϊόντος, οι εκχυλίσεις με υπερήχους καθώς και οι φασματοφωτομετρικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Στο Σχήμα 3.1 παρουσιάζεται το περιεκτικό διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας η οποία ακολουθήθηκε καθ' όλη την εργασία.



Σχήμα 3.1 Διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας καθ' όλη την εργασία

3.2 Αναλώσιμα και Οργανολογία

3.2.1 Αντιδραστήρια, Διαλύτες και Πρότυπες Ουσίες

Για την διεξαγωγή των εκχυλίσεων χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη από την εταιρία PanReac. Όσον αφορά τις φασματοφωτομετρικές αναλύσεις, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu προέρχεται από την Thermo Fisher, ο τριχλωριούχος ένυδρος σίδηρος από την Fisher Scientific UK, ο δισθενής ένυδρος θειικός σίδηρος και το υδροχλωρικό οξύ παρελήφθησαν από την ChemLab, το οξικό οξύ από την Penta Chemicals, το ανθρακικό νάτριο από την Merck, το γαλλικό οξύ, τα αντιδραστήρια και TPTZ και το υπερθειικό νάτριο από την Alfa Aesar, το ABTS από την Glentham life sciences και τέλος η Trolox παρελήφθη από την Fisher Scientific UK. Για τις αναλύσεις LC-MS, η μεθανόλη, το νερό, το ακετονιτρίλιο και το φορμικό οξύ αγοράστηκαν από την Merck. Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκχυλίσεις και τις φασματοφωτομετρικές αναλύσεις ήταν αναλυτικής καθαρότητας και οι πρότυπες ενώσεις ήταν καθαρότητας $\geq 95\%$.

3.2.2 Συσκευές και Επιστημονικά όργανα

Η διαδικασία εκχύλισης με υπερήχους πραγματοποιήθηκε με συσκευή υπερήχων Bandelin Sonoplus HD 2070 (20 kHz) της εταιρίας BANDELIN Electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Germany) εξοπλισμένη με αισθητήρα (probe) διαμέτρου 6 mm.

Ο ζυγός με τον οποίο έγιναν οι μετρήσεις των δειγμάτων είναι ηλεκτρονικός με ακρίβεια στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο του γραμμαρίου, της Chyo Balance Corporation (Japan).

Η συσκευή φυγοκέντρισης με την οποία διεξήχθη η φυγοκέντριση των εκχυλισμάτων είναι η Centrifuge Cencom II και ανήκει στην εταιρία J.P. Selecta, S.A. (Abrera, Spain) με μέγιστη φυγοκεντρική ταχύτητα 4000 rpm και μέγιστη φυγόκεντρο δύναμη 1790 G. Διαθέτει γωνιακό στροφείο για 6 δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 mL.

Οι φασματοφωτομετρικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis Spectro 23 της Labomed Incorporation (Los Angeles, USA) με ικανότητα ανάλυσης 4 δειγμάτων σε κυψελίδες πλάτους 10 mm και χωρητικότητας 4 mL. Πραγματοποιεί μετρήσεις σε μήκη κύματος από 320 έως 1100 nm.

Χρησιμοποιήθηκε επίσης υδατόλουτρο Memmert W270 της Memmert GmbH + Co. (Schwabach, Germany) με μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας στους 100°C.

Για την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε σύστημα LC-MS/MS, αποτελούμενο από τον υβριδικό φασματογράφο μάζας 3200 QTrap® τριπλού τετραπόλου-παγίδας ιόντων της εταιρείας Sciex, USA με διπλή πηγή ιοντισμού (Turbo-V), με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI), ενώ το σύστημα HPLC ήταν το 1200 της εταιρείας Agilent. Επίσης, το σύστημα HPLC περιλαμβάνει έναν G1379B απαερωτή, μια G1312A διπλή αντλία, έναν G1329 αυτόματο δειγματολήπτη και μια G1316A στήλη διαχωρισμού (Agilent, USA). Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων διεξήχθη με στήλη αντίστροφης φάσης

Agilent Eclipse Plus C-18 (εσωτερική διάμετρος 50 mm x 2,1 mm, μέγεθος σωματιδίων 3,5 μm).

3.3 Δείγμα Παραπροϊόντος Επεξεργασίας Μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*)

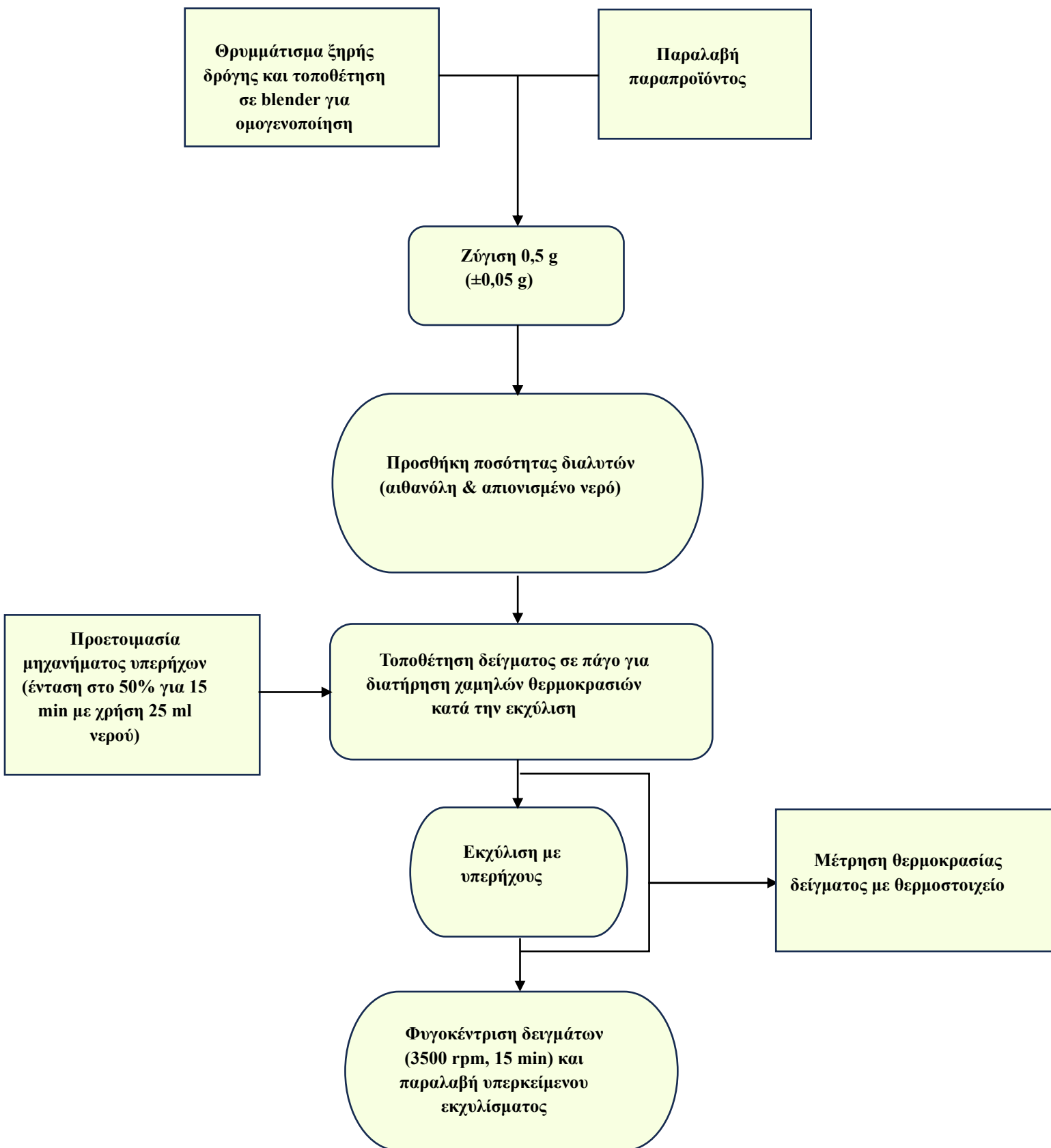
Με σκοπό την διεκπεραίωση της ερευνητικής εργασίας, το δείγμα παραπροϊόντος, βιομηχανικής επεξεργασίας μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*), αλλά και δρόγη του φυτού, παρελήφθησαν από την εταιρία «KOZANIROSES» του Δήμου Βοΐου Κοζάνης, ([Συνεταιρισμός Αρωματικών Φυτών Βοΐου Κοζάνης \(kozaniroses.gr\)](http://kozaniroses.gr)). συνεταιρισμός παραγωγής αιθέριων ελαίων. Το φυτό καλλιεργήθηκε σε ανοιχτό πεδίο στο Μικρόκαστρο Κοζάνης και συγκομίσθηκε το φθινόπωρο του 2022. Το παραπροϊόν προέρχεται από υδροαπόσταξη ολόκληρου του στελέχους του φυτού έπειτα από ξήρανση δύο ημερών. Ο φυτικός ιστός φυλάχθηκε για δύο ημέρες σε αποθήκη υπό σκιά μέχρι την απόσταξη, η οποία πραγματοποιήθηκε στις 23/10/2022. Για την απόσταξη χρησιμοποιήθηκαν 0,200 kg φυτού, με χρήση 2,5 L νερού και διήρκησε συνολικά 2,5 ώρες.

3.4 Προκατεργασία Δείγματος

Η ξηρή δρόγη κονιοποιήθηκε σε αναδευτήρα (blender) και διατηρήθηκε σε ψυγείο στους 4°C καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Το παραπροϊόν υπέστη ξήρανση στους 45°C για 12 ώρες με αποτέλεσμα την μείωση της υγρασίας σε ποσοστό 5,06%. Ύστερα διατηρήθηκε στις ίδιες συνθήκες με αυτές της δρόγης έως ότου πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις

3.5 Εκχύλιση Φαινολικών Ενώσεων από τα Δείγματα Μελισσόχορτου

Στο [Σχήμα 3.2](#) παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής το οποίο περιγράφει τη γενική μέθοδο η οποία ακολουθήθηκε κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων τόσο από την ξηρή δρόγη όσο και από τα παραπροϊόντα επεξεργασίας μελισσόχορτου με υπερήχους.



Σχήμα 3.2: Διάγραμμα ροής της μεθόδου εκχύλισης φαινολικών ενώσεων από δείγμα μελισσόχορτου με υπερήχους

3.6 Πειραματικός Σχεδιασμός Εκχύλισεων

Τεχνικές εκχύλισης με χρήση υψηλής ενέργειας, όπως η εκχύλιση με υπερήχους (UAE), εφαρμόζονται ευρέως τα τελευταία χρόνια για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων. Για τη βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών εκχύλισης με υπερήχους εφαρμόστηκε πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiment, DOE). Η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από τα παραπροϊόντα επεξεργασίας του μελισσόχορτου, πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή ενός σχεδιασμού τριών επιπέδων με μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (RSM). Τα μοντέλα RSM προσδιορίζουν τις σημαντικές πειραματικές παραμέτρους και βελτιστοποιούν ταυτόχρονα τα επίπεδά τους, προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη απόκριση, ενώ διενεργείται ο ελάχιστος αναγκαίος αριθμός πειραμάτων. Στην εν λόγω ερευνητική εργασία, ο πειραματικός σχεδιασμός διεξήχθη με το μοντέλο Box-Behnken (Box-Behnken Design, BBD) με την βελτιστοποίηση τεσσάρων παραμέτρων με τρία επίπεδα τιμών η καθεμία. Βάσει αυτών των δεδομένων, το μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού προτείνει μέσω της εξίσωσης $N = 2k(k - 1) + C_p$ (όπου k : ο αριθμός των μεταβλητών και C_p : ο αριθμός των κεντρικών σημείων), 27 πειράματα (runs) (Πίνακας 3.1). Τα 27 προτεινόμενα από το μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού πειράματα διεξήχθησαν με τυχαία σειρά, προκειμένου να αποτραπούν τυχόν συστηματικά σφάλματα και προκαταλήψεις στο σύστημα. Επιπλέον, το μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού περιλαμβάνει τη διεξαγωγή τριών πειραμάτων με πανομοιότυπες πειραματικές συνθήκες υπό τις ενδιάμεσες τιμές των μεταβλητών, αποκαλούμενες ως κεντρικά σημεία.

Οι παράμετροι οι οποίες βελτιστοποιήθηκαν κατά την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από την ξηρή δρόγη και τα παραπροϊόντα επεξεργασίας μελισσόχορτου με υπερήχους, είναι το ποσοστό του διαλύτη σε αιθανόλη (A, % v/v, με το υπόλοιπο να είναι νερό, Ethanol Content), ο χρόνος εκχύλισης (B, min, Extraction Time), η αναλογία διαλύτη/υπόστρωμα (C, mL/g, Solvent/Material) και η ένταση του μηχανήματος υπερήχων (D, %, US Power) ενώ ως απόκριση ή μετρούμενο μέγεθος ορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) των εκχυλισμάτων.

Πίνακας 3.1: ΜΟΝΤΕΛΟ BOX-BEHNKEN (4 παράμετροι (factors), 3 επίπεδα τιμών (value levels) για κάθε παράμετρο, σύνολο πειραμάτων=27 πειράματα (runs))

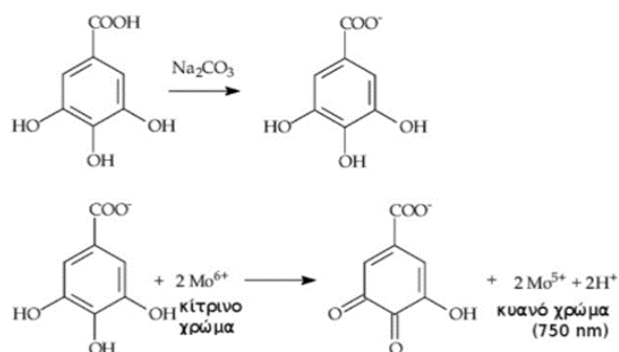
Run Order	Ethanol Content (%)	Extraction Time (min)	Solvent/Material (mL/g)	US Power (%)
1	60	25	60	20
2	20	25	60	50
3	100	25	40	20
4	100	25	20	50
5	60	10	40	20
6	100	40	40	50
7	60	25	60	80
8	20	10	40	50

9	100	25	40	80
10	60	40	20	50
11	60	25	20	80
12	60	40	40	80
13	100	10	40	50
14	60	25	40	50
15	60	10	20	50
16	60	10	60	50
17	20	25	40	80
18	20	40	40	50
19	60	25	20	20
20	60	25	40	50
21	20	25	40	20
22	100	25	60	50
23	60	10	40	80
24	60	40	60	50
25	60	40	40	20
26	60	25	40	50
27	20	25	20	50

3.7 Φασματοφωτομετρικές Αναλύσεις Εκχυλισμάτων Ξηρής Δρόγης και Παραπροϊόντος Επεξεργασίας Μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*)

3.7.1 Μέτρηση Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου με τη Μέθοδο Folin-Ciocalteu (F-C)

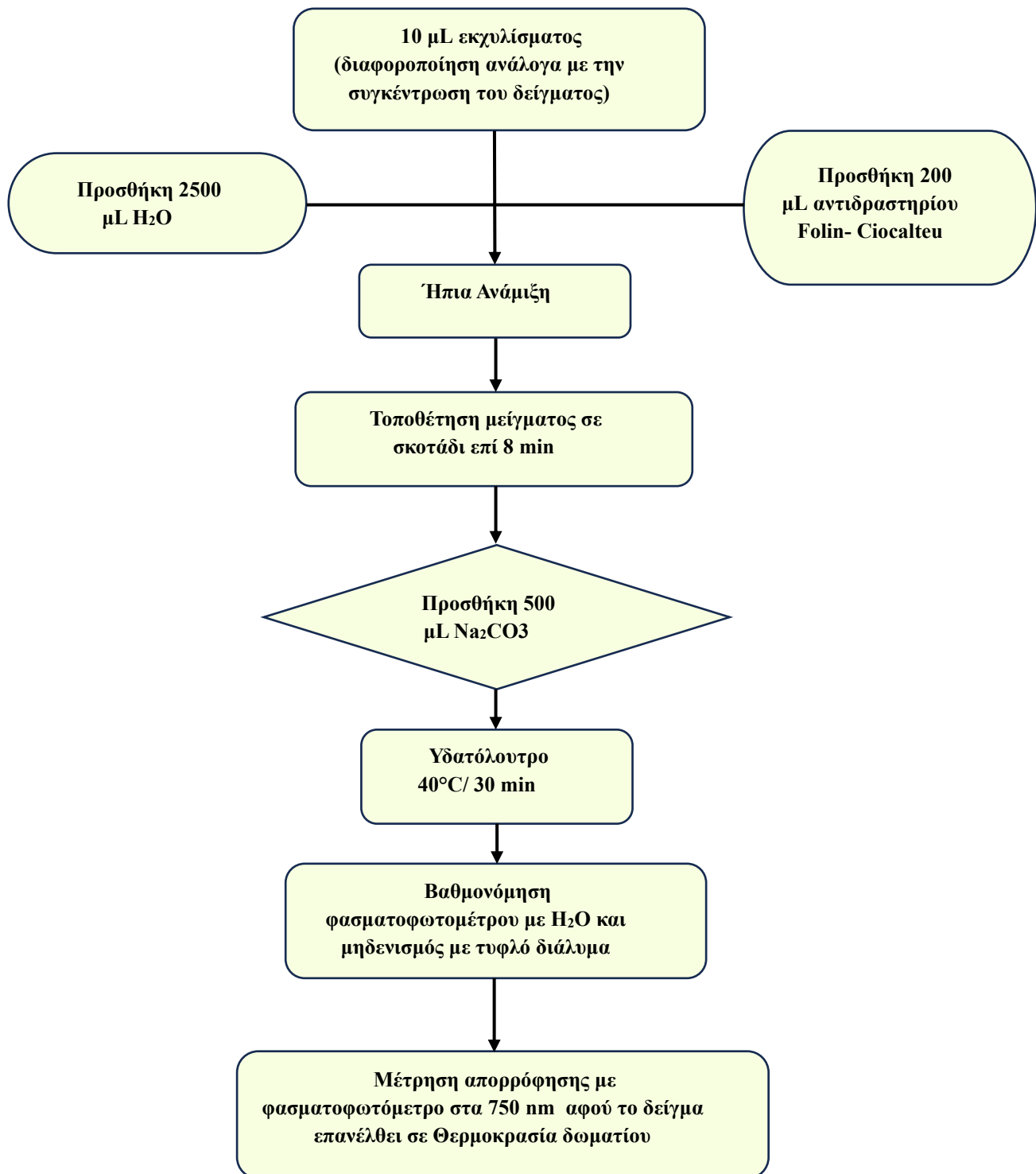
Η ποσοτικοποίηση του φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων εκχύλισης μελισσόχορτου (ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων) πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά με τη μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 750 nm. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (F-C) αποτελείται από άλατα μολυβδαινίου (Mo) και



Εικόνα 3.1 Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο F-C μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου

βολφραμίου (W). Σε αλκαλικό περιβάλλον, η φαινολική ένωση οξειδώνεται, και το αντιδραστήριο ανάγεται προς οξείδια που έχουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου (Εικόνα 3.1). Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου, η συγκέντρωση του οποίου εκφράζεται σε ισοδύναμα ενός επιλεγμένου προτύπου. Παρόλο που ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, η μέθοδος προσδιορισμού είναι απλή, πρακτική και με αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Παρακάτω φαίνεται το διάγραμμα ροής (Σχήμα 3.3) της μεθόδου η οποία ακολουθήθηκε έως τη μέτρηση της απορρόφησης στο φάσμα του ορατού.

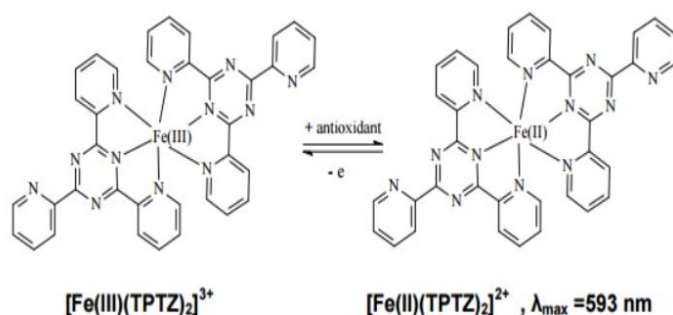
Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη ($y = 0,0005x + 0,0783$, όπου y η απορρόφηση του διαλύματος και x η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στο δείγμα), μέσω της οποίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών του δείγματος εκφρασμένη σε ισοδύναμα του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά γραμμάριο δείγματος (mg GAE/g). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.



Σχήμα 3.3: Διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας κατά την μέτρηση του TPC με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu σε δείγματα μελισσόχορτου

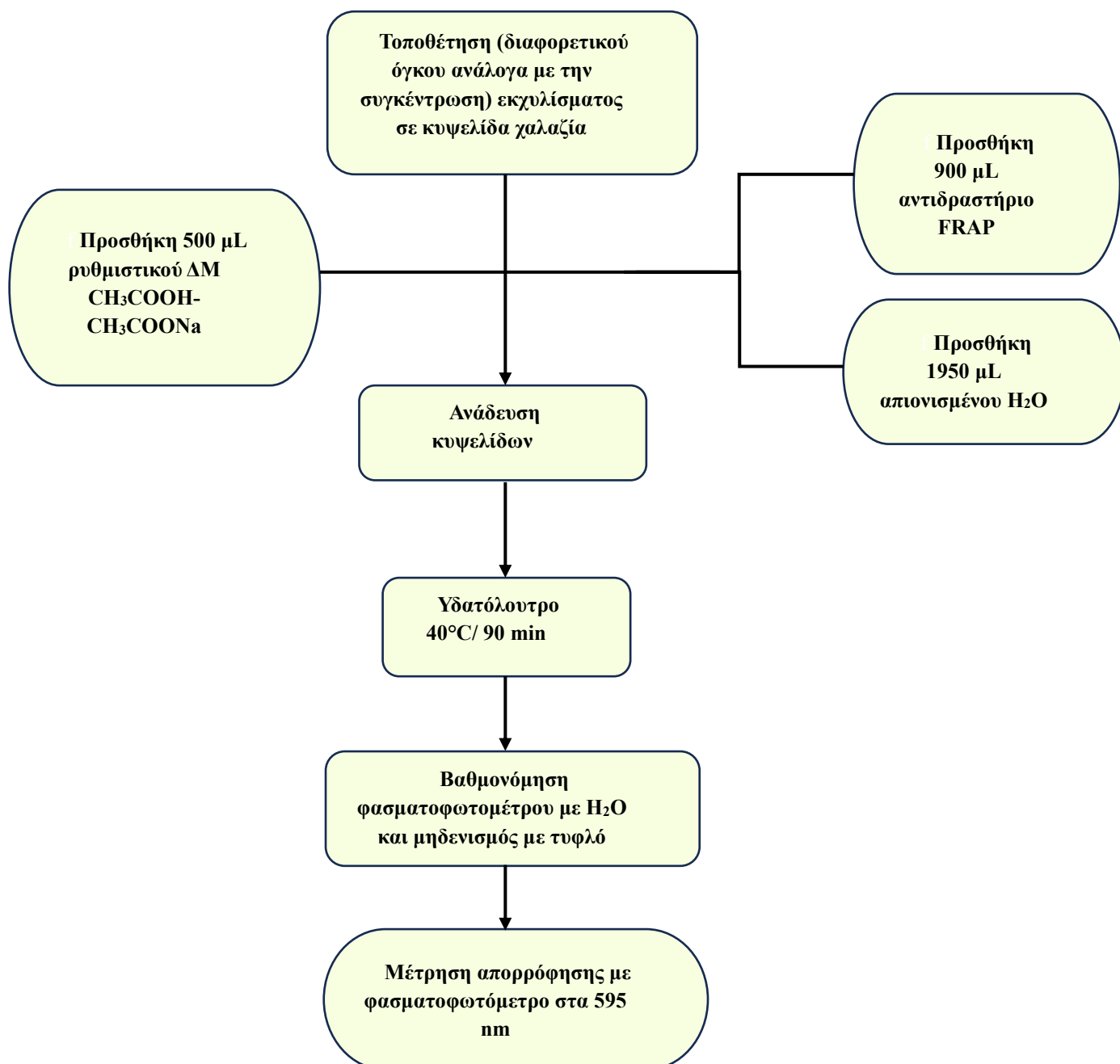
3.7.2 Προσδιορισμός Αναγωγικής Ισχύος/Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με τη Μέθοδο FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Μετά την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων (ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων). Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν ουσίες οι οποίες επιβραδύνουν ή εμποδίζουν την οξείδωση άλλων, συνήθως πολύτιμων μορίων και, συνεπώς, μπορούν να χαρακτηριστούν ως αναγωγικά. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται αποκλειστικά στην ικανότητα του δείγματος να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο για την αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου στην 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη (Fe(III)-TPTZ) προς δισθενή σίδηρο (Fe(II)-TPTZ) (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 Αντίδραση αναγωγής του σιδήρου.

Το τελικό προϊόν με έντονο μπλε χρώμα, το οποίο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm, ποσοτικοποιείται φασματοφωτομετρικά και υποδεικνύει την αναγωγική ισχύ των προς εξέταση αντιοξειδωτικών. Η οξειδοαναγωγική αντίδραση πραγματοποιείται σε όξινο περιβάλλον (pH=3,6) με σκοπό τη διατήρηση της διαλυτότητας του σιδήρου στο διαλύτη. Η δοκιμή FRAP είναι απλή, γρήγορη και οικονομικά αποδοτική, ενώ δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό. Στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 3.4) φαίνεται η πορεία που ακολουθήθηκε.

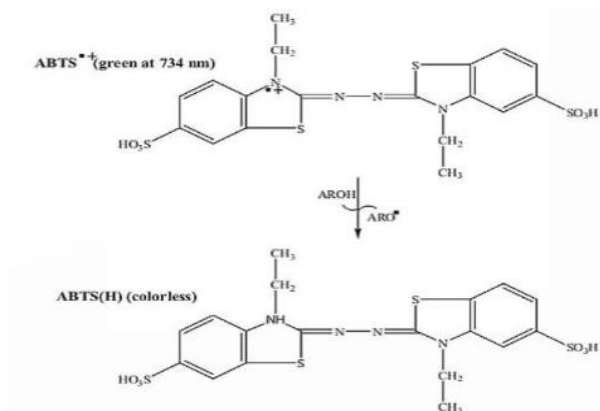


Σχήμα 3.4: Διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας κατά την μέτρηση της αναγωγικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP σε δείγματα μελισσόχορτου

Η αναγωγική/αντιοξειδωτική ισχύς του δείγματος προσδιορίστηκε μέσω της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης ($y = 0,0003x + 0,0081$, όπου y η απορρόφηση του διαλύματος και x η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στο δείγμα), με πρότυπα διαλύματα συμπλοκοποιημένου δισθενούς σιδήρου. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η ποσότητα του τρισθενούς σιδήρου που ανήχθη σε δισθενή από τις αντιοξειδωτικές ενώσεις ανά γραμμάριο του δείγματος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

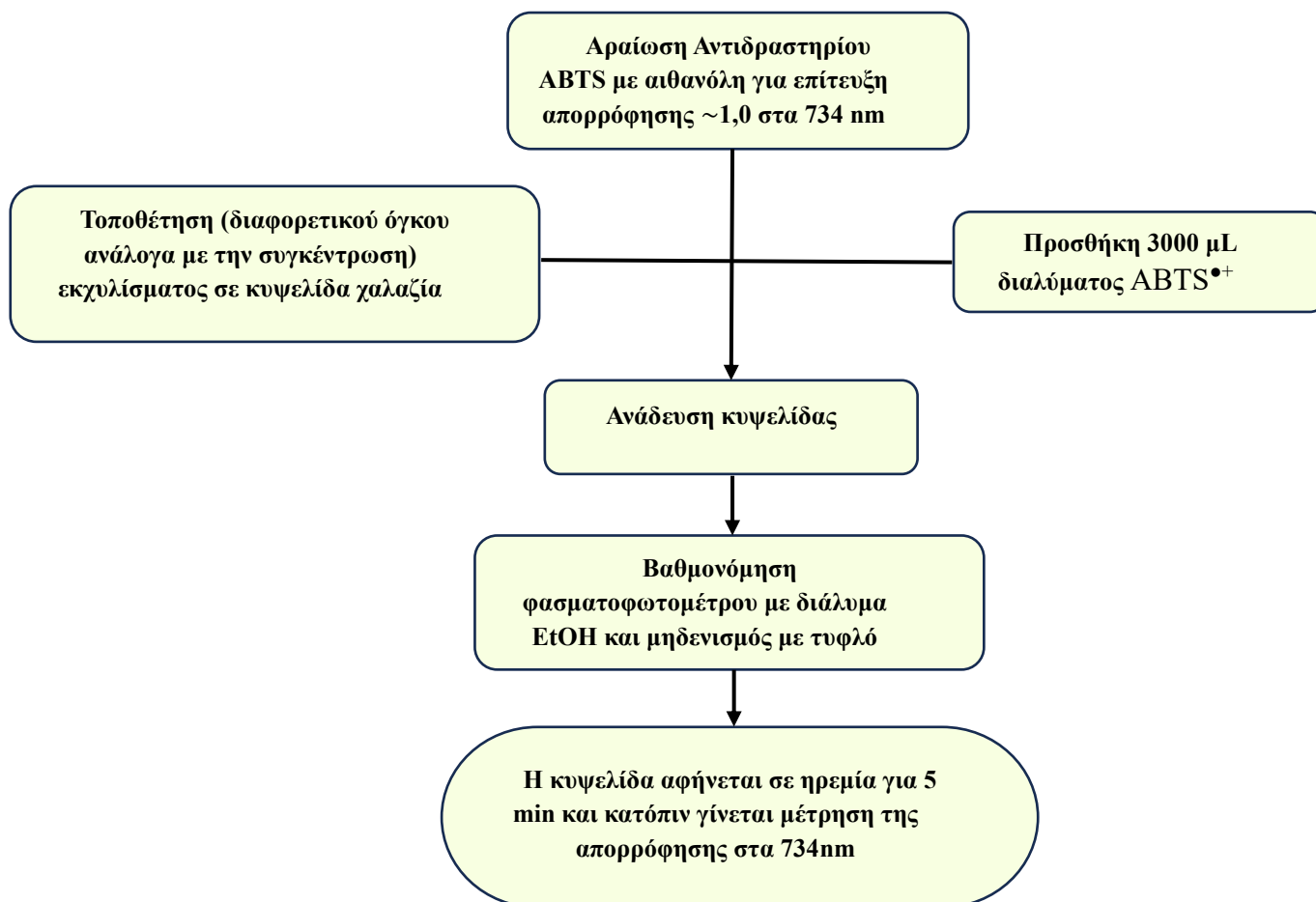
3.7.3 Εκτίμηση της Ικανότητας Δέσμευσης/Ανάσχεσης της Σταθερής Ελεύθερης Ρίζας ABTS^{•+}

Η δοκιμή βασίζεται στην ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να δεσμεύσει την ελεύθερη κατιοντική ρίζα ABTS^{•+} [2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλο-βενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)]. Η μεθοδολογία η οποία εφαρμόζεται για την εκτίμηση της αντιριζικής ισχύος τόσο των λιπόφιλων όσο και των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών, βασίζεται σε μια αντίδραση αποχρωματισμού. Η μονοκατιοντική ρίζα ABTS^{•+} χρώματος μπλε-πράσινου (μέγιστο απορρόφησης στα 734 nm) σχηματίζεται άμεσα από την οξείδωση του μη ριζικού μορίου ABTS με υπερθειικό κάλιο ή νάτριο. Παρουσία μορίων που χαρακτηρίζονται ως δότες υδρογόνου, η ρίζα ABTS^{•+} μειώνεται ποσοτικά ανάλογα με τη δραστικότητα του δότη υδρογόνου, τη συγκέντρωσή του και τη διάρκεια διεξαγωγής της αντίδρασης. Η σάρωση της ρίζας ABTS^{•+} πραγματοποιείται είτε με τη μεταφορά ενός υδρογόνου είτε με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από μια αντιριζική ένωση (AH) (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3 Δομή της ρίζας ABTS^{•+} που απορροφά στα 734nm

Είναι μια σύντομη, λειτουργικά απλή και ακριβής διαδικασία για τη συστηματική εκτίμηση της ικανότητας σάρωσης ελευθέρων ριζών εκχυλισμάτων φυτών ή τροφίμων. Το παρακάτω διάγραμμα ροής (Σχήμα 3.5) περιγράφει την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την εκτίμηση ανάσχεσης της ρίζας.



Σχήμα 3.5: Διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας κατά την εκτίμηση της ικανότητας ανάσχεσης της ελεύθερης ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ σε δείγματα μελισσόχορτου

Η δοκιμή $ABTS^{\bullet+}$ παρέχει μια εκτίμηση για τη δραστικότητα του δείγματος απέναντι στη συγκεκριμένη ρίζα, η οποία εκφράστηκε ως συγκέντρωση αυτών σε ισοδύναμα της πρότυπης ουσίας Trolox (Trolox Equivalents, TE) μέσω της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης ($y = 0,2876x - 0,002$, όπου y η απορρόφηση του διαλύματος και x η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στο δείγμα). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

3.8 Μέθοδος LC-MS/MS για την Ταυτοποίηση Φαινολικών Ενώσεων των Εκχυλισμάτων Ξηρής Δρόγης και Παραπροϊόντων Επεξεργασίας Μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*)

Η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) αποτελεί μία ενόργανη αναλυτική μέθοδο διαχωρισμού συστατικών (μορίων) μεταξύ ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων οι οποίες εμπεριέχονται σε ένα φυσικό ή τεχνητό μίγμα, βάσει ορισμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) αποτελεί επίσης μία προηγμένη αναλυτική μέθοδο η οποία παρέχει στοιχεία για τη δομική ταυτότητα των επιμέρους συστατικών με υψηλή μοριακή εξειδίκευση και

ευαισθησία ανίχνευσης. Ο συνδυασμός των δύο αυτών μεθόδων (LC-MS) συνεπάγεται τη δημιουργία μιας αναλυτικής τεχνικής η οποία συνδυάζει τις ικανότητες διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας με τις δυνατότητες ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της φασματομετρίας μάζας. Αυτή η διαδοχική ή συζευγμένη τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση βιοχημικών, οργανικών και ανόργανων ενώσεων οι οποίες συνήθως απαντώνται σε σύνθετα δείγματα φυσικής και βιολογικής προέλευσης. Δύναται να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα τομέων, όπως η βιοτεχνολογία, η μελέτη του περιβάλλοντος, η επεξεργασία τροφίμων και συναντά μεγάλη εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.

Για την εν λόγω ανάλυση, το είδος υγρής χρωματογραφίας το οποίο εφαρμόστηκε είναι η HPLC (High Performance Liquid Chromatography) αντίστροφης φάσης. Ο διαχωρισμός των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων επεξεργασίας μελισσόχορτου, διεξήχθη με στήλη αντίστροφης φάσης (εσωτερική διάμετρος 50 mm x 2,1 mm, μέγεθος σωματιδίων 3,5 μm). Η κινητή φάση συνίσταται από νερό – 0,2% (v/v) φορμικό οξύ (φορμικό οξύ, FA) (διαλύτης A) και ακετονιτρίλιο – 0,1% (v/v) φορμικό οξύ (διαλύτης B). Ο αρχικός ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 300 μL/min και το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης ξεκινούσε, αρχικά με 10% B, ακολούθησε γραμμική βαθμιδωση 10-20% B σε 0,5 min και γραμμική βαθμιδωση 20-30% B στα 4 min. Ο ρυθμός ροής αυξήθηκε στα 350 μL/min και η βαθμιδωση συνεχίστηκε γραμμικά με 30-50% B στα 4,1 min, διατηρήθηκε σταθερή για 0,40 min, ξαναέγινε γραμμική 50-65% B στα 5,10 min και συνέχισε να αυξάνεται γραμμικά 65-100% B στα 7 min. Η σύσταση της κινητής φάσης παρέμεινε σταθερή για 1 min στα 350 μL/min, ο ρυθμός ροής μειώθηκε και πάλι στα 300 μL/min και 100% B για 1 min, και στη συνέχεια μειώθηκε γραμμικά από 100%-10% B στα 9,10 min και τέλος πραγματοποιήθηκε επανεξισορρόπηση της στήλης, σταθερά στα 10 % B από 9,10 min έως 15 min. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 25 °C και ο όγκος ένεσης πρότυπων ενώσεων και δειγμάτων ήταν 5 μL. Τα ξηρά υπολείμματα των δειγμάτων επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε κατάλληλο όγκο μεθανόλης-FA 0,1% v/v, ενώ πριν την εισαγωγή του στο σύστημα LC-MS/MS φιλτραρίστηκαν μέσω φίλτρων πολυεστέρα (PET), διαμέτρου 13 mm και μεγέθους πόρων μεμβράνης 0,45 μm. Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βαθμού καθαρότητας LC-MS (Kritsi *et al.*, 2023). Σε ό,τι αφορά στην ανάλυση με το φασματόμετρο μάζας, πραγματοποιήθηκε με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), με αρνητικό ιοντισμό για όλες τις υπό προσδιορισμό ουσίες και σάρωση θυγατρικού ιόντος (product ion scan) σε λειτουργία πολλαπλών μεταπτώσεων (multiple monitoring reaction, MRM). Για την θραυσματοποίηση και την ταυτοποίηση όσο το δυνατόν περισσότερων βιοδραστικών ενώσεων στα εκχυλίσματα, πραγματοποιήθηκε σάρωση των ιόντων με information dependent acquisition (IDA)-triggered MS/MS πειράματα (Kritsi *et al.*, 2023). Η ανάλυση έλαβε χώρα σε εύρος 5 ppm για κάθε m/z. Ο Πίνακας 3.2 περιλαμβάνει τις βέλτιστες συνθήκες για τον ιοντισμό και τη θραυσματοποίηση (MS/MS) των ενώσεων σε IDA. Για την ανάλυση των δεδομένων και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Analyst Software Version 1.6 (Sciex, USA).

Πίνακας 3.2: Συνθήκες για EMS και IDA πειράματα

MS/MS συνθήκες	
Παράμετροι	Τιμές παραμέτρων
Scan rate (amu/s)	4000
Curtain gas (psi)	30
CAD gas (psi)	Medium (EMS)/High (IDA)
Temperature (°C)	550
Gas 1 (psi)	45
Gas 2 (psi)	45
Ion spray needle voltage (V)	-4500
Declustering potential (V)	-30
Entrance potential (V)	-7.5
Collision energy (V)	-10 (EMS)/-30 (IDA)
C2B	-300 (EMS)/-450 (IDA)
IPA threshold for EPI experiments	10000 counts
Peak selected for the EPI scan	Two most intense peaks
Q1 resolution	Low
Collision energy spray EPI	10
EPI scans mass range	50-700 amu
Linear ion trap (LIT) dynamic fill time (ms)	250
EPI scan rate (amu/s)	1000

3.9 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης Minitab (Minitab Statistical Software Inc. Version 21). Οι υπολογισμοί έγιναν με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, και τιμές P-Values $\leq 0,05$ υποδεικνύουν ότι μία μεταβλητή καθίσταται στατιστικά σημαντική. Για όλες τις μετρήσεις, υπολογίστηκε ο μέσος όρος καθώς και η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) με δύο σημαντικά ψηφία. Οι τιμές επεξεργάστηκαν και ομαδοποιήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού εργαλείου ANOVA (One way, Tukey Test). Η στατιστική ομαδοποίηση των τιμών κατά τη μέτρηση των αποτελεσμάτων των φασματοφωτομετρικών μεθόδων πραγματοποιήθηκε με την χρήση της μεθόδου Tukey, η οποία καθορίζει αν η συσχέτιση μεταξύ μιας σειράς δεδομένων είναι στατιστικά σημαντική.

4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Βελτιστοποίηση Εκχύλισης Φαινολικών Ενώσεων από Δείγμα Μελισσόχορτου με Πειραματικό Σχεδιασμό

4.1.1 Χρήση Μοντέλου Box-Behnken για Βελτιστοποίηση Εκχύλισης

Ο πειραματικός σχεδιασμός επιφάνειας απόκρισης που πραγματοποιήθηκε είχε ως σκοπό την κατεύθυνση της διαδικασίας εκχύλισης σε μια πιο ακριβή και περιορισμένη πειραματική περιοχή των μεταβλητών. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken. Οι τιμές των μεταβλητών οι οποίες βελτιστοποιήθηκαν στην εν λόγω εργασία κωδικοποιήθηκαν σε μια ακραία υψηλή (+1), μία ενδιάμεση (0) και μια ακραία χαμηλή (-1). Τα 27 προτεινόμενα από το μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού πειράματα διεξήχθησαν με τυχαία σειρά, προκειμένου να αποτραπούν τυχόν συστηματικά σφάλματα και προκαταλήψεις στο σύστημα. Οι κωδικοποιημένες και πραγματικές τιμές των μεταβλητών για τον πειραματικό σχεδιασμό παρουσιάζονται στη συνέχεια (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1: Κωδικοποιημένες και πραγματικές τιμές των μεταβλητών των συνθηκών πειραματικού σχεδιασμού κατά την εκχύλιση με υπερήχους

Κωδικοποιημένες Τιμές	-1	0	+1
Περιεκτικότητα Διαλύτη σε Αιθανόλη (% v/v) : A	20	60	100
Χρόνος Εκχύλισης (min) : B	10	25	40
Ένταση Υπερήχων (%) : C	20	50	80
Διαλύτης/Υπόστρωμα (mL/g) : D	20	40	60

4.1.2 Προσδιορισμός Φαινολικού Περιεχομένου στο Ξηρό Προϊόν Μελισσόχορτου με την Μέθοδο F-C

Παρακάτω φαίνονται τα προτεινόμενα από το μοντέλο Box-Behnken πειράματα και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total Phenolic Content, TPC) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν, το οποίο προσδιορίστηκε μέσω της φασματοφωτομετρικής μεθόδου Folin-Ciocalteu και μέσω της καμπύλης αναφοράς απορρόφησης-συγκέντρωσης (Πίνακας 4.2). Αναγράφονται επίσης και οι θερμοκρασίες του υπό εκχύλιση διαλύματος αμέσως πριν την έναρξη της εκχύλισης (αρχική θερμοκρασία) και κατά τη λήξη αυτής (τελική θερμοκρασία).

Πίνακας 4.2: Απόδοση των εκχυλίσεων ξηρής δρόγης μελισσόχορτου σε TPC μετρούμενη τη μέθοδο Folin-Ciocalteu στις συνθήκες του πειραματικού σχεδιασμού με τυχαία σειρά (Μέσος όρος \pm SD)

Run Order	Συνδυασμοί Κωδικοποιημένων Τιμών (A, B, C, D)	Μέσος όρος συνολικού φαινολικού περιεχομένου ξηρού προϊόντος (mg GAE/g dry herb) \pm SD	Αρχική Θερμοκρασία (°C)	Τελική Θερμοκρασία (°C)
1	0, 0, -1, +1	13,56 \pm 0,48	21,4	16,5
2	-1, 0, 0, +1	30,2 \pm 2,4	22,9	16,7
3	+1, 0, -1, 0	0,031	18,6	12,2
4	+1, 0, 0, -1	0,881 \pm 0,093	19,8	18,4
5	0, -1, -1, 0	3,13 \pm 0,34	23,1	15,4
6	+1, +1, 0, 0	1,24 \pm 0,32	22,7	16,9
7	0, 0, +1, +1	26,7 \pm 3,2	26,8	33,6
8	-1, -1, 0, 0	24,1 \pm 4,0	24,3	30,9
9	+1, 0, +1, 0	1,77 \pm 0,33	20,8	54,1
10	0, +1, 0, -1	36,0 \pm 2,7	21,3	31,8
11	0, 0, +1, -1	35,7 \pm 4,2	20,7	28,5
12	0, +1, +1, 0	37,2 \pm 5,5	21,8	21,4
13	+1, -1, 0, 0	0,313 \pm 0,067	17,5	24,2
14	0, 0, 0, 0	16,4 \pm 2,4	21,5	14,5
15	0, -1, 0, -1	13,6 \pm 1,5	20,5	21,8
16	0, -1, 0, +1	5,9 \pm 3,3	24,0	27,8
17	-1, 0, +1, 0	50,9 \pm 6,1	26,5	17,6
18	-1, +1, 0, 0	41,24 \pm 0,90	25,6	25,7
19	0, 0, -1, -1	15,27 \pm 0,95	23,1	36,8
20	0, 0, 0, 0	18,7 \pm 6,4	26,2	30,6
21	-1, 0, -1, 0	51,3 \pm 1,8	26,7	41,0
22	+1, 0, 0, +1	0,64 \pm 0,28	20,8	19,8
23	0, -1, +1, 0	12,8 \pm 1,3	22,5	29,4
24	0, +1, 0, +1	34,1 \pm 3,7	25,6	24,5
25	0, +1, -1, 0	20 \pm 2,4	25,6	15,7
26	0, 0, 0, 0	21,3 \pm 6,9	25,3	24,5
27	-1, 0, 0, -1	49,66 \pm 0,67	24,1	33,6

Οι πειραματικές συνθήκες εκχύλισης οι οποίες έδωσαν τη μέγιστη, μια μέση και την ελάχιστη τιμή ολικού φαινολικού περιεχομένου, χάριν κωδικοποίησης ονομάστηκαν Max (Run 21, με μέγιστη απόδοση TPC στην ξηρή δρόγη), Mid (Run 7, με μέτρια απόδοση TPC στην ξηρή δρόγη) και Min (Run 13, με ελάχιστη απόδοση TPC στην ξηρή δρόγη). Οι συνθήκες φαίνονται αναλυτικά παρακάτω (Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.3: Συνθήκες εκχύλισης στο ξηρό προϊόν μελισσόχορτου με μέγιστη (max), ενδιάμεση (mid) και ελάχιστη (min) απόδοση σε TPC κατά τον πειραματικό σχεδιασμό

Συνθήκες Εκχύλισης	Ethanol content (%)	Extraction time (min)	US power (%)	Solvent/material ratio (mL/g)
Max (Run 21)	20	25	20	40
Mid (Run 7)	60	25	80	60
Min (Run 13)	100	10	50	40

4.1.3 Στατιστικά Σημαντικοί Παράγοντες

Για την εκτίμηση της σημαντικότητας των παραμέτρων που εξετάζονται και της καταλληλότητας του προτεινόμενου μοντέλου του πειραματικού σχεδιασμού επιφάνειας απόκρισης, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης, ANOVA. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4.1) παρουσιάζονται οι μεταβλητές οι οποίες εισήχθησαν στην ανάλυση και μεταξύ άλλων η στατιστική τιμή *P-Value* των μεταβλητών γραμμικά, τετραγωνικά και οι γραμμικές αλληλεπιδράσεις αυτών ανά δύο, η οποία δηλώνει εάν η μεταβλητή ή ο συνδυασμός αυτών αποτελεί στατιστικά σημαντικό παράγοντα για την

Source	F-Value	P-Value
Model	8.82	0.000
Linear	29.16	0.000
Ethanol content (%)	90.60	0.000
Extraction time (min)	16.32	0.002
US power (%)	7.27	0.019
Solvent/material ratio (mL/g)	2.45	0.143
Square	0.64	0.643
Ethanol content (%)*Ethanol content (%)	0.18	0.682
Extraction time (min)*Extraction time (min)	0.55	0.471
US power (%)*US power (%)	0.60	0.455
Solvent/material ratio (mL/g)*Solvent/material ratio (mL/g)	0.65	0.436
2-Way Interaction	0.72	0.643
Ethanol content (%)*Extraction time (min)	1.21	0.292
Ethanol content (%)*US power (%)	0.02	0.886
Ethanol content (%)*Solvent/material ratio (mL/g)	1.70	0.216
Extraction time (min)*US power (%)	0.98	0.343
Extraction time (min)*Solvent/material ratio (mL/g)	0.16	0.700
US power (%)*Solvent/material ratio (mL/g)	0.24	0.634
Error		
Lack-of-Fit	10.61	0.089
Pure Error		
Total		

Εικόνα 4.1: Ανάλυση Διακύμανσης των προς βελτιστοποίηση μεταβλητών εκχύλισης (γραμμικά, τετραγωνικά και ανά δύο)

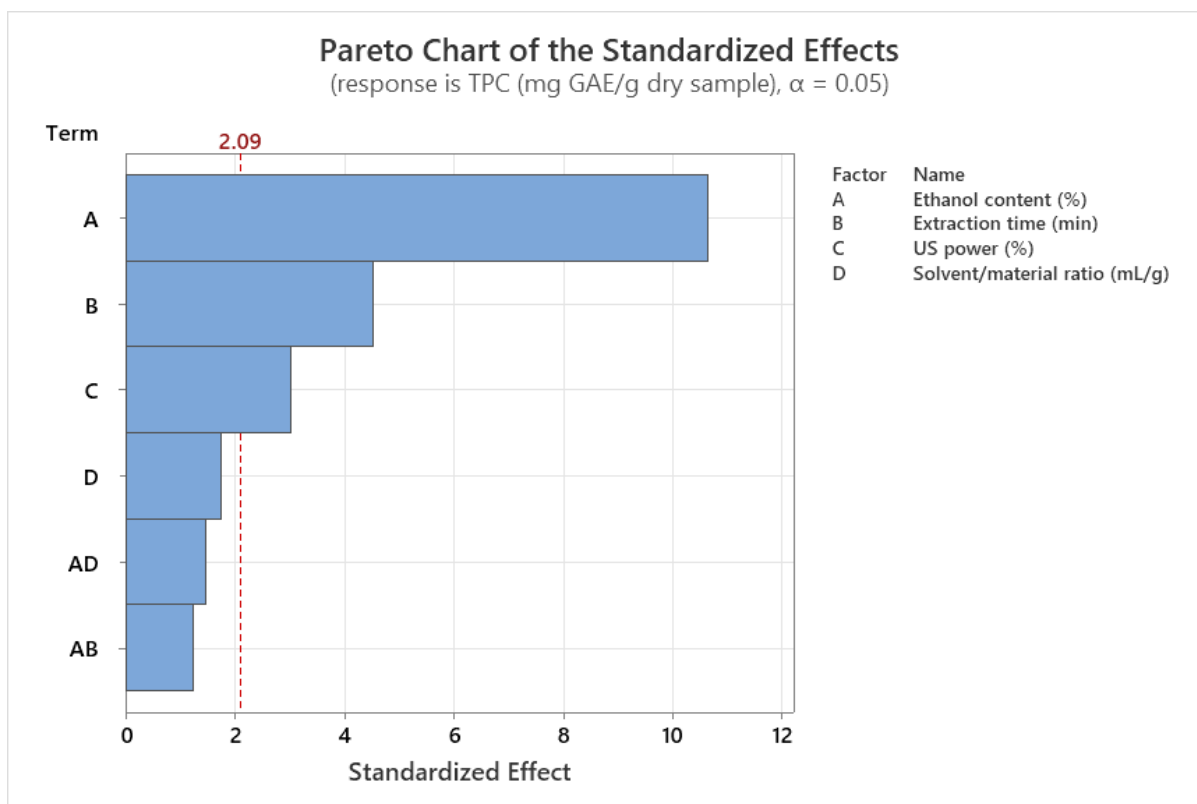
βελτιστοποίηση της εκχύλισης με υπερήχους.

Σε πρώτο στάδιο, απορρίπτονται από το μοντέλο πρόβλεψης ως μη σημαντικές οι μεταβλητές των οποίων η τιμή $P\text{-value} \gg 0,25$. Επίσης, οι γραμμικοί όροι των παραμέτρων της εκχύλισης, δεν απομακρύνονται ποτέ, ακόμα και αν έχουν $P\text{-value} \geq 0,05$, προκειμένου το τελικό μοντέλο που παράγεται να παραμείνει ιεραρχικό. Αφού αφαιρέθηκαν οι αναφερθέντες παράμετροι, επαναλήφθηκε η ανάλυση ANOVA, με επίπεδο εμπιστοσύνης το 95% και παρουσιάζονται στη συνέχεια οι νέες στατιστικές τιμές που προκύπτουν από την Ανάλυση Διακύμανσης μεταξύ των οποίων και οι $P\text{-Values}$ που απέκτησαν οι όροι αυτοί (Εικόνα 4.2).

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	6470.01	1078.33	24.97	0.000
Linear	4	6312.16	1578.04	36.54	0.000
Ethanol content (%)	1	4903.25	4903.25	113.53	0.000
Extraction time (min)	1	883.00	883.00	20.44	0.000
US power (%)	1	393.31	393.31	9.11	0.007
Solvent/material ratio (mL/g)	1	132.60	132.60	3.07	0.095
2-Way Interaction	2	157.85	78.93	1.83	0.187
Ethanol content (%)*Extraction time (min)	1	65.72	65.72	1.52	0.232
Ethanol content (%)*Solvent/material ratio (mL/g)	1	92.14	92.14	2.13	0.160
Error	20	863.78	43.19		
Lack-of-Fit	18	851.76	47.32	7.87	0.118
Pure Error	2	12.02	6.01		
Total	26	7333.79			

Εικόνα 4.2: Ανάλυση Διακύμανσης των προς βελτιστοποίηση μεταβλητών εκχύλισης (γραμμικά, τετραγωνικά και ανά δύο) μετά την πρώτη ανάλυση ANOVA (χωρίς μεταβλητές με $P\text{-Value} \gg 0.25$)

Κατά την εφαρμογή του επιπέδου εμπιστοσύνης 95%, ως στατιστικά σημαντικοί παράγοντες ($P\text{-Value} > 0,05$) θεωρούνται η Περιεκτικότητα διαλύτη σε αιθανόλη (%), ο Χρόνος Εκχύλισης (min) και η Ένταση Υπερήχων (%). Η σημαντικότητα των όρων/μεταβλητών αναπαρίσταται και γραφικά από το διάγραμμα Pareto που ακολουθεί με $\alpha=0,05$ (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3: Διάγραμμα Pareto με $\alpha=0,05$, Στατιστικά σημαντικοί παράγοντες κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων με υπερήχους από δείγματα μελισσόχορτου

Οι μεταβλητές, καθώς και η γραμμική αλληλεπίδρασή τους τίθενται σε φθίνουσα σειρά σημαντικότητας ως προς την επίδρασή τους στην UAE, ανάλογα με την τιμή P που έχει λάβει η κάθε μία βάσει των αποτελεσμάτων της μεθόδου ANOVA. Οι όροι οι οποίοι συγκαταλέγονται στους στατιστικά σημαντικούς ξεπερνούν την κόκκινη διακεκομμένη γραμμή του γραφήματος.

Όσον αφορά την εκτίμηση της ακρίβειας του μοντέλου πρόβλεψης το οποίο κατασκευάστηκε, καθώς και την επιλογή των κατάλληλων προς βελτιστοποίηση παραμέτρων και των τιμών τους οι οποίες επιλέχθηκαν, ο δείκτης Lack-of-Fit αποτελεί ένδειξη αυτών. Βάσει επιλογής επιπέδου εμπιστοσύνης (95%), τιμή $P\text{-Value} > 0,05$ δηλώνει ότι δεν υπάρχει έλλειψη προσαρμογής (Lack-of-Fit) στο μοντέλο το οποίο αντιπροσωπεύει τα πειραματικά δεδομένα καθώς και ότι δεν πραγματοποιήθηκαν ασυνήθιστα μεγάλα σφάλματα ή αποκλίσεις κατά τις μετρήσεις των αποτελεσμάτων. Επιπλέον υποδηλώνει (εφόσον $P\text{-Value}=0,118$) ότι ο πειραματικός σχεδιασμός ενδεχομένως διεξήχθη σωστά.

Μία ακόμη κατηγορία στατιστικών μεταβλητών-δεικτών της αξιοπιστίας του μοντέλου πρόβλεψης και της ικανότητάς του να προβλέπει σωστά, αποτελούν οι συντελεστές συσχέτισης (ή τα αθροίσματα τετραγώνων) R^2 , R^2_{adjusted} και $R^2_{\text{predicted}}$. Παρακάτω φαίνονται οι εν λόγω τιμές που προκύπτουν για το εν λόγω μοντέλο μετά την ανάλυση ANOVA (Εικόνα 4.4).

Model Summary			
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
6,57185	88,22%	84,69%	76,49%

Εικόνα 4.4: Συντελεστές συσχέτισης του μοντέλου πρόβλεψης πειραματικού σχεδιασμού

Το R^2 είναι ένας στατιστικός δείκτης ο οποίος προσδιορίζει πόσο κοντά είναι τα δεδομένα στην προσαρμοσμένη γραμμή παλινδρόμησης. Είναι επίσης γνωστός ως ο συντελεστής προσδιορισμού ή συντελεστής πολλαπλού προσδιορισμού για πολλαπλή παλινδρόμηση. Το R^2 είναι πάντα μεταξύ 0 και 100%: Το 0% υποδηλώνει ότι το μοντέλο δεν εξηγεί καμία μεταβλητότητα των δεδομένων απόκρισης γύρω από τον μέσο όρο του ενώ το 100% υποδηλώνει ότι το μοντέλο εξηγεί όλη τη μεταβλητότητα των δεδομένων απόκρισης γύρω από τον μέσο όρο του. Τιμές R^2 (R -sq) οι οποίες πλησιάζουν την μονάδα (100%) αφορούν μοντέλα πρόβλεψης με καλή προσαρμογή τα οποία προσεγγίζουν τα πραγματικά σημεία δεδομένων. Συνεπώς, τιμή ίση με 88,22% υποδηλώνει μία αρκετά καλή συσχέτιση των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών. Επιπλέον, η παράμετρος R^2_{adjusted} , η οποία προκύπτει από την αφαίρεση δεδομένων από το αρχικό μοντέλο οι οποίες δεν ορίζονται ως στατιστικά σημαντικές, αποτελεί μια επιπλέον εκτίμηση της αξιοπιστίας αυτού. Συγκεκριμένα, όταν $R^2 - R^2_{\text{adjusted}} < 0,2$ (ή 20%) το μοντέλο έχει καλή ικανότητα πρόβλεψης, συνθήκη η οποία ικανοποιείται στην εν λόγω εργασία (88,22%-84,69%=3,53%). Το $R^2_{\text{predicted}}$ δείχνει πόσο καλά ένα μοντέλο παλινδρόμησης προβλέπει τις αποκρίσεις για νέες παρατηρήσεις. Αυτό το στατιστικό μέτρο είναι χρήσιμο για να προσδιοριστεί αν το πειραματικό μοντέλο ταιριάζει στα αρχικά δεδομένα αλλά και αν είναι ικανό να παρέχει έγκυρες προβλέψεις για νέες παρατηρήσεις. Δηλαδή, ο δείκτης $R^2_{\text{predicted}}$, δηλώνει την ικανότητα του μοντέλου να προβλέπει σωστά τα αποτελέσματα υπό συνθήκες πέρα των αρχικών και λαμβάνει τιμή στη συγκεκριμένη περίπτωση ίση με 76,49%.

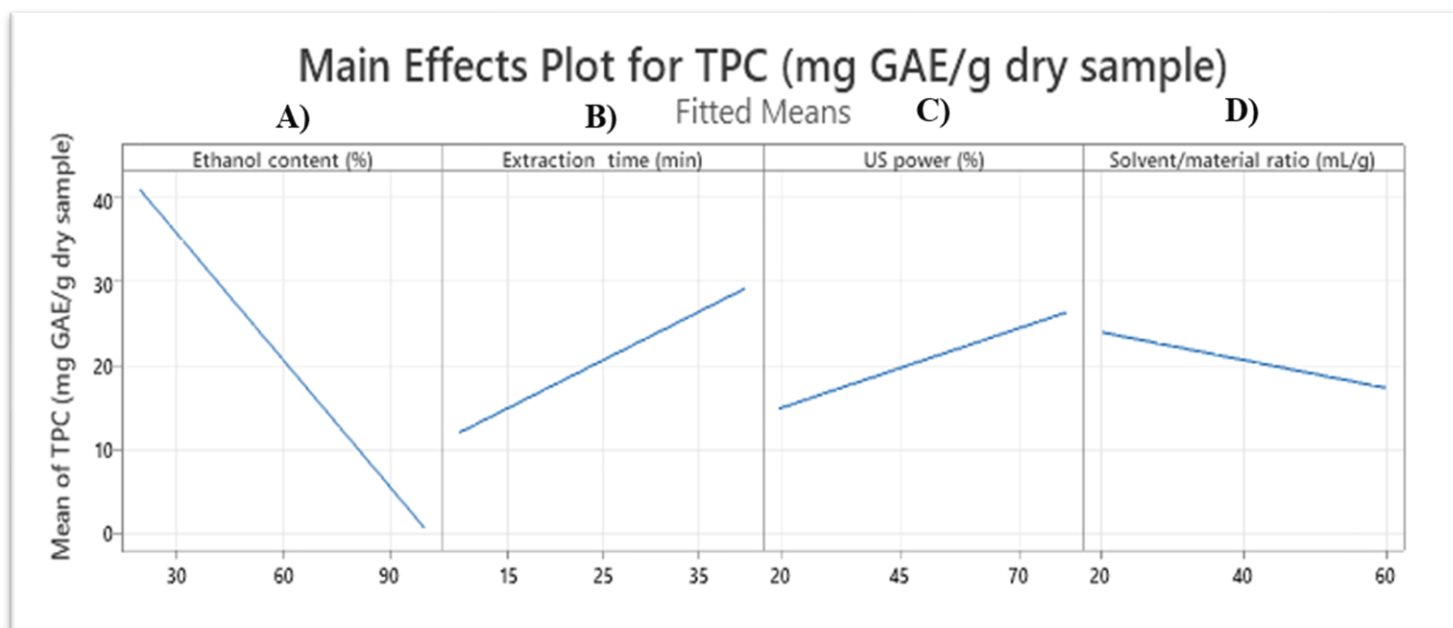
Παρακάτω (Εικόνα 4.5) παρουσιάζεται η εξίσωση πρόβλεψης του TPC την οποία κατασκεύασε το στατιστικό λογισμικό Minitab βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων.

Regression Equation in Uncoded Units

$$\begin{aligned} \text{TPC (mg GAE/g dry sample)} = & 38,0 - 0,576 \text{ Ethanol content (\%)} + 0,977 \text{ Extractiom time (min)} \\ & + 0,1908 \text{ US power (\%)} - 0,526 \text{ Solvent/material ratio (mL/g)} \\ & - 0,00676 \text{ Ethanol content (\%)*Extractiom time (min)} \\ & + 0,00600 \text{ Ethanol content (\%)*Solvent/material ratio (mL/g)} \end{aligned}$$

Εικόνα 4.5: Εξίσωση πρόβλεψης απόδοσης σε TPC κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγμα μελισσόχορτου (Minitab Statistical Software)

Στη συνέχεια, παρατίθενται τα διαγράμματα επιδράσεων παραγόντων (Factorial Plots) τα οποία αφορούν την επίδραση της κάθε μεταβλητής της εκχύλισης ξεχωριστά στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, καθώς και τα διαγράμματα της επίδρασης των σημαντικών αλληλεπιδράσεων των παραγόντων που εμφανίζονται στο τελικό μοντέλο (Εικόνα 4.6, Εικόνα 4.7).

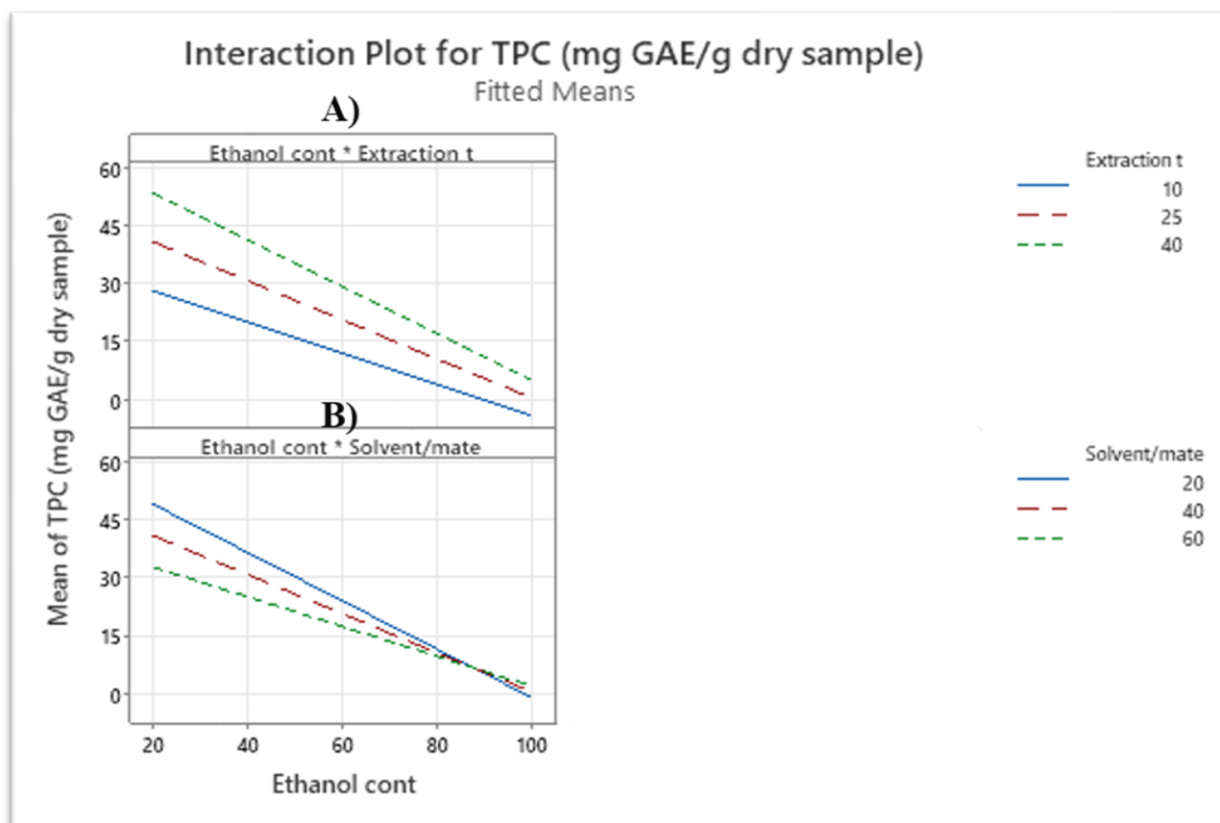


Εικόνα 4.6: Διαγράμματα επιδράσεων παραγόντων (Factorial Plots), γραμμική συσχέτιση των προς βελτιστοποίηση μεταβλητών με την απόδοση σε TPC κατά την εκχύλιση φαινολικών συστατικών με υπερήχους: A) TPC σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (%), B) TPC σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης (min), C) TPC σε συνάρτηση με την ένταση των υπερήχων (%), D) TPC σε συνάρτηση με την αναλογία διαλύτη/υπόστρωμα (mL/g)

Βάσει του ανωτέρω διαγράμματος, εξάγεται το συμπέρασμα ότι κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα μελισσόχορτου, η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (%) ακολουθεί αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την απόδοση σε TPC κατά τη γραμμική τους συσχέτιση, με την κλίση της καμπύλης να είναι μεγάλη. Η μορφή της καμπύλης δηλώνει ότι η συγκεκριμένη παράμετρος επηρεάζει σημαντικά και

περισσότερο από όλες τις υπόλοιπες την απόδοση σε TPC, το οποίο τεκμηριώνεται και από το διάγραμμα Pareto (Εικόνα 4.3). Αντίθετα ο χρόνος εκχύλισης (min) και η ένταση των υπερήχων (%), κατά την αύξηση τους δίνουν υψηλότερες τιμές TPC, έχουν συνεπώς ευθέως ανάλογη σχέση με τις εν λόγω καμπύλες να παρουσιάζουν μικρότερη κλίση από την αντίστοιχη της % περιεκτικότητας σε αιθανόλη. Τέλος, η καμπύλη της αναλογίας διαλύτη/υπόστρωμα (mL/g) μεταβάλλεται σε πολύ μικρό βαθμό, το οποίο σημαίνει πως η συγκεκριμένη παράμετρος δεν επηρεάζει σημαντικά το μετρούμενο μέγεθος. Το συμπέρασμα αυτό αιτιολογείται και με βάση το διάγραμμα Pareto (Εικόνα 4.3), στο οποίο φαίνεται ότι η εν λόγω μεταβλητή δεν επηρεάζει σημαντικά την απόκριση κατά την εκχύλιση.

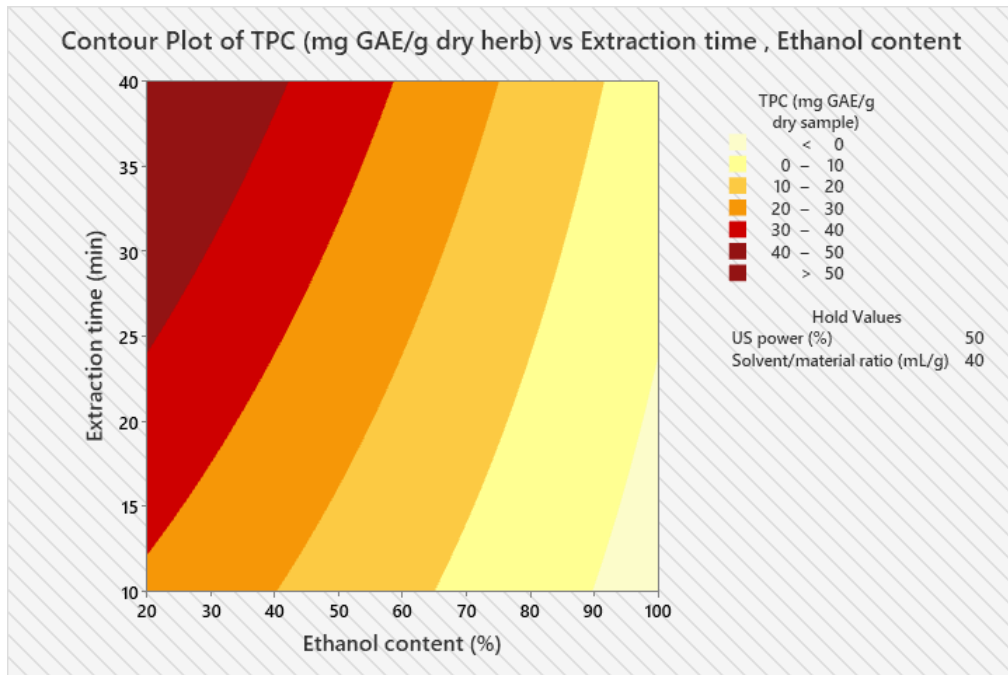
Οι Gündüz, Çiçek and Topuz, 2023, κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων με υπερήχους από το φυτό *Petasites hybridus* της οικογένειας *Asteraceae* αποφάνθηκαν ότι ο χρόνος εκχύλισης συσχετίζεται ευθέως ανάλογα με την απόδοση σε TPC. Οι López, Brousse and Linares, 2023, επίσης κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων με υπερήχους από το φυτό *Plex paraguariensis* της οικογένειας *Aquifoliaceae*, βρήκαν ότι το επίπεδο έντασης των υπερήχων αυξάνει γραμμικά με την απόδοση σε φαινολικές ενώσεις. Επιπλέον, κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων με υπερήχους από το άνθος του φυτού *Opuntia ficus-indica* [L.], οι Brahmi et al., 2022, έδειξαν ότι η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη δίνει μέγιστες τιμές απόδοσης σε TPC σε χαμηλές αλλά όχι ακραίες τιμές (40%), ενώ σε χαμηλότερες ή μεγάλες συγκεντρώσεις, η απόδοση ελαττώνεται. Τέλος, οι Brahmi et al., 2022 κατά την βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκχύλισης με υπερήχους από το φυτό *Opuntia ficus-indica* της οικογένειας *Cactaceae*, απέδειξαν ότι τη βέλτιστη απόδοση σε TPC δίνει διαλύτης με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 40%, ενώ το μετρούμενο μέγεθος λαμβάνει χαμηλότερες τιμές σε ακραίες μικρές ή μεγάλες τιμές περιεκτικότητας σε αιθανόλη.



Εικόνα 4.7: Διαγράμματα επιδράσεων παραγόντων (factorial plots), συσχέτιση αλληλεπίδρασης των προς βελτιστοποίηση μεταβλητών με την απόδοση σε TPC κατά την εκχύλιση φαινολικών συστατικών με υπερήχους: A) TPC σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (%) και τον χρόνο εκχύλισης (min), B) TPC σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (%) και την αναλογία διαλύτη/υπόστρωμα (mL/g)

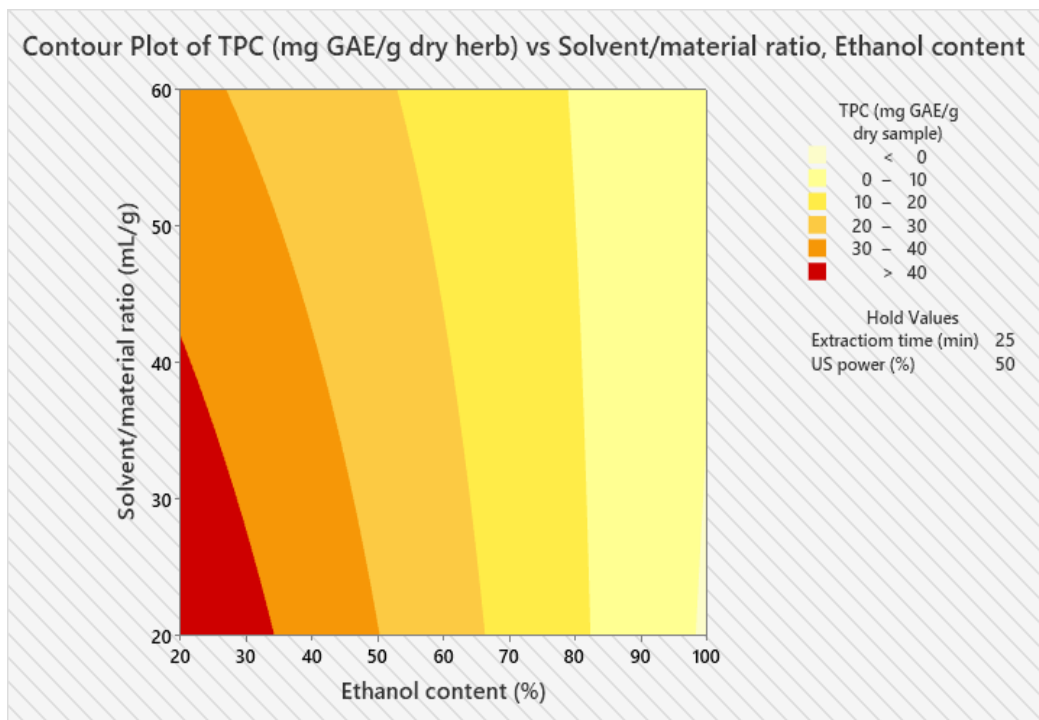
Από τα ανωτέρω διαγράμματα επιδράσεων παραγόντων, προκύπτουν οι αλληλεπιδράσεις των παραμέτρων οι οποίες περιέχονται στο τελικό μοντέλο. Συγκεκριμένα, από το διάγραμμα A), προκύπτει ότι το TPC λαμβάνει υψηλές τιμές σε μικρές περιεκτικότητες αιθανόλης (%) σε συνδυασμό με μεγάλους χρόνους εκχύλισης (min), ενώ σύμφωνα με το διάγραμμα B), η απόδοση σε TPC είναι υψηλή όταν η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (%) και η αναλογία διαλύτη/υπόστρωμα (mL/g) λαμβάνουν χαμηλές τιμές.

Η αλληλεπίδραση των μεταβλητών ανά ζεύγη, διατηρώντας τις υπόλοιπες παραμέτρους σταθερές στο μεσαίο επίπεδο τιμών τους, κατά την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων με υπερήχους από ξηρό δείγμα μελισσόχορτου απεικονίζεται στα παρακάτω διαγράμματα επιφάνειας απόκρισης δύο διαστάσεων (Contour Plots) με τις περιοχές με εντονότερο κόκκινο χρώμα να υποδηλώνουν μεγαλύτερη απόδοση σε TPC.



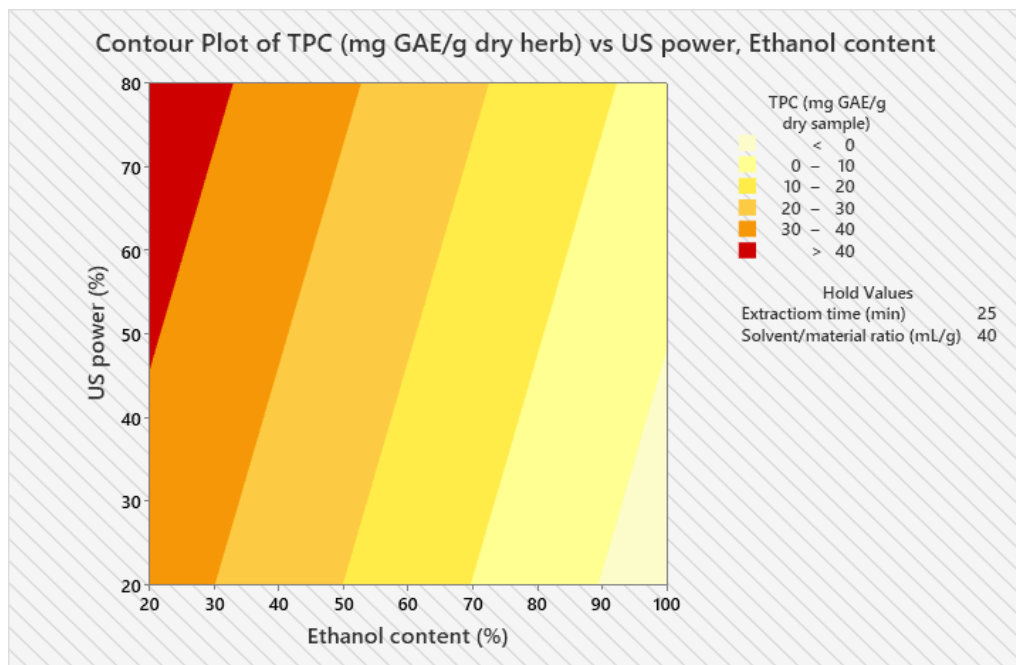
Εικόνα 4.8: Διάγραμμα χρόνου εκχύλισης (min) έναντι της περιεκτικότητας διαλύτη σε αιθανόλη (%) για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων

Στην [Εικόνα 4.8](#) φαίνεται ότι το TPC αυξάνεται κατά την εκχύλιση με υπερήχους όταν ο χρόνος εκχύλισης είναι μεγάλος (25-50 min), ενώ η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη ελαττώνεται (20-40%). Χάριν εξοικονόμησης ενέργειας και αναλώσιμης ύλης ταυτόχρονα, ένας βέλτιστος συνδυασμός των δύο αυτών παραμέτρων θα ήταν 25 min και 20% αντίστοιχα. Συνεπώς οι δύο αυτές μεταβλητές παρουσιάζουν μεταξύ τους αντιστρόφως ανάλογη σχέση με στόχο τη βέλτιστη απόδοση σε TPC.



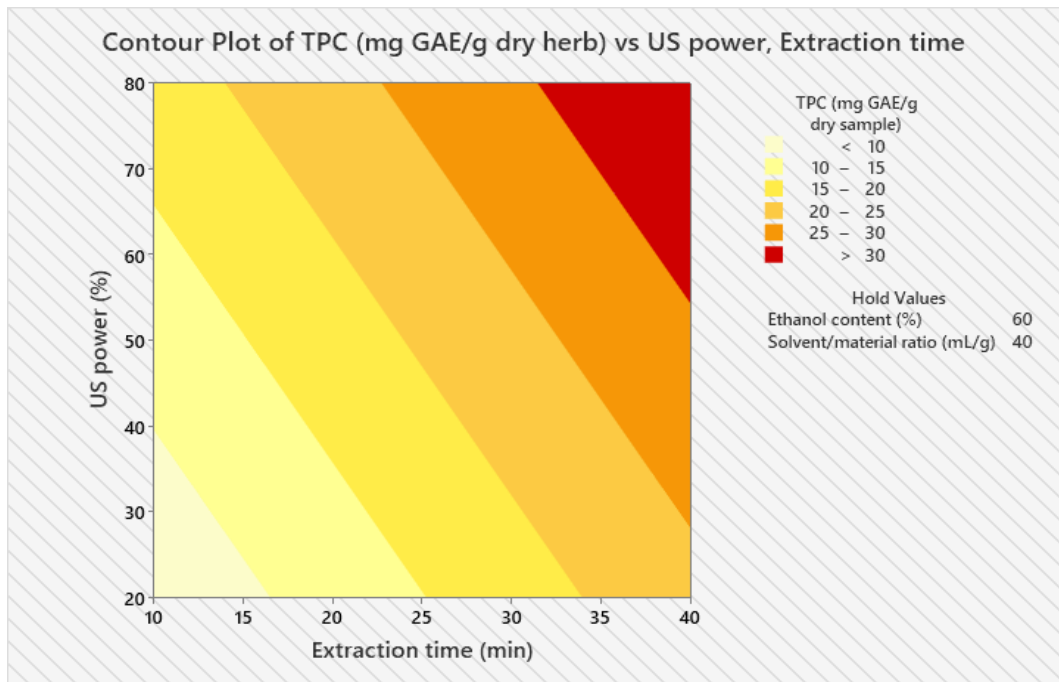
Εικόνα 4.9: Διάγραμμα αναλογίας διαλύτη/υπόστρωμα (mL/g) έναντι της περιεκτικότητας διαλύτη σε αιθανόλη (%) για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων

Βάσει της [Εικόνα 4.9](#), τόσο η αναλογία διαλύτη/υπόστρωμα όσο και η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη αυξάνουν το TPC κατά την εκχύλιση με υπερήχους όταν οι ίδιες ελαττώνονται. Συγκεκριμένα, μέγιστες τιμές TPC επιτυγχάνονται όταν η πρώτη κυμαίνεται μεταξύ 20-40 mL/g ενώ η τελευταία μεταξύ 20-35%. Ένας βέλτιστος συνδυασμός των δύο τιμών θα ήταν 20 mL/g και 20% αντίστοιχα.



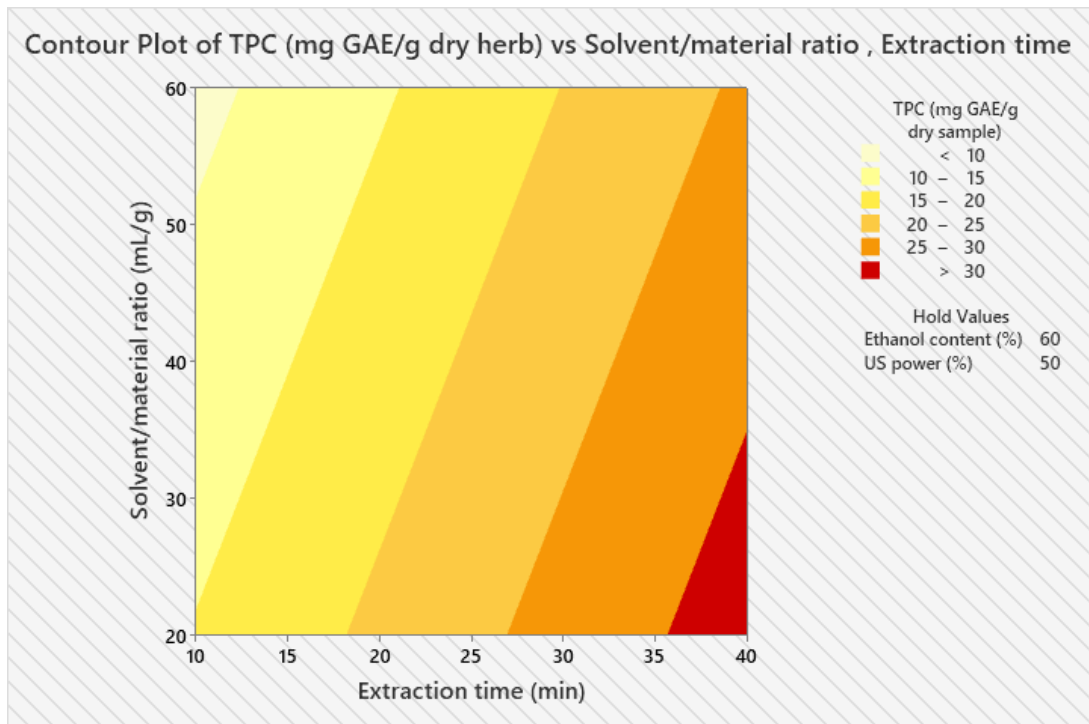
Εικόνα 4.10: Διάγραμμα έντασης υπερήχων (%) έναντι της περιεκτικότητας διαλύτη σε αιθανόλη (%) για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων

Σύμφωνα με την [Εικόνα 4.10](#), αυξημένες τιμές TPC κατά την εκχύλιση με υπερήχους λαμβάνονται όταν η ένταση των υπερήχων είναι υψηλή (50-80%) ενώ η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη ελαττώνεται (20-30%). Χάριν εξοικονόμησης ενέργειας και αναλώσιμων υλικών, ένας βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραμέτρων θα ήταν 50% και 20% αντίστοιχα.



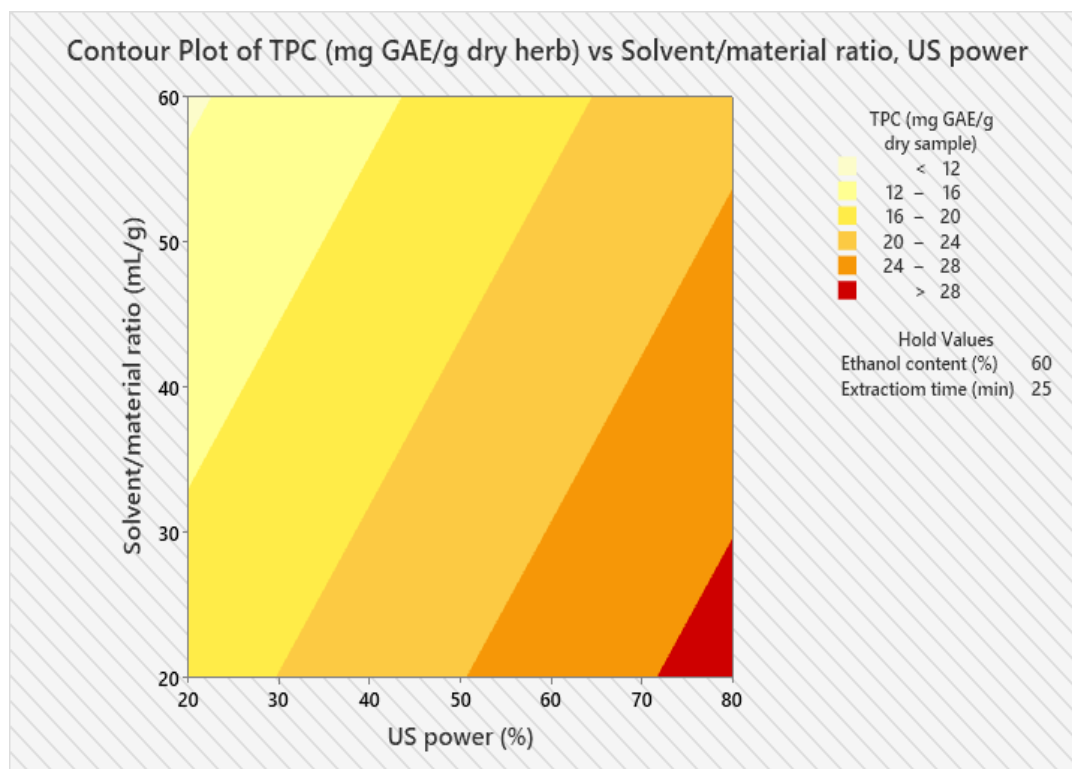
Εικόνα 4.11: Διάγραμμα έντασης υπερήχων (%) έναντι του χρόνου εκχύλισης (min) για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων

Στην [Εικόνα 4.11](#) φαίνεται ότι η % ένταση των υπερήχων και ο χρόνος εκχύλισης (min) παρουσιάζουν μεταξύ τους ανάλογη σχέση και υψηλές τιμές TPC κατά την εκχύλιση με υπερήχους επιτυγχάνονται όσο οι ίδιοι αυξάνονται. Συγκεκριμένα, εύρος τιμών 55-80% και 35-40 min αντίστοιχα δίνουν υψηλότερες αποδόσεις.



Εικόνα 4.12: Διάγραμμα αναλογίας διαλύτη/υπόστρωμα (mL/g) έναντι του χρόνου εκχύλισης (min) για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων

Σύμφωνα με την [Εικόνα 4.12](#), η απόδοση σε TPC αυξάνεται κατά την εκχύλιση με υπερήχους όταν η αναλογία διαλύτη/υπόστρωμα ελαττώνεται και ο χρόνος εκχύλισης αυξάνεται ταυτόχρονα. Η πρώτη μεταβλητή κυμαίνεται μεταξύ 20-30 mL/g ενώ η δεύτερη μεταξύ 35-40 min συνδυαστικά με σκοπό την βέλτιστη εκχύλιση. Για λόγους οικονομίας ενέργειας και αναλώσιμων υλών, ένας ιδανικός συνδυασμός τιμών θα μπορούσε να είναι 20 mL/g και 35 min αντίστοιχα.



Εικόνα 4.13: Διάγραμμα αναλογίας διαλύτη/υπόστρωμα (mL/g) έναντι της έντασης υπερήχων (%) για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων

Βάσει της Εικόνα 4.13, χαμηλές τιμές αναλογίας διαλύτη/υπόστρωμα (20-30%) και υψηλές τιμές έντασης υπερήχων (70-80%) ταυτόχρονα, δίνουν υψηλές τιμές TPC κατά την εκχύλιση με υπερήχους. Χάριν οικονομίας σε πρώτες ύλες και ενέργεια, ένας βέλτιστος συνδυασμός των δύο τιμών θα μπορούσε να είναι 20 mL/g και 70% αντίστοιχα.

Συμπερασματικά και λαμβάνοντας υπόψιν το διάγραμμα Pareto (Εικόνα 4.3), τα διαγράμματα επιδράσεων παραγόντων των μεταβλητών ανεξάρτητα (Εικόνα 4.6) και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 4.7), οι μεταβλητές οι οποίες επηρεάζουν με στατιστική σημαντικότητα την απόδοση σε TPC κατά την εκχύλιση με υπερήχους από ξηρό προϊόν μελισσόχορτου, είναι η % περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη, η % ένταση των υπερήχων και ο χρόνος εκχύλισης (min), ενώ η αναλογία διαλύτη/υπόστρωμα (mL/g) φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά το μετρούμενο μέγεθος. Επιπλέον φαίνεται ότι καμία από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραμέτρων δεν επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης.

4.1.4 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης

Με χρήση του λογισμικού στατιστικής επεξεργασίας Minitab, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αποτελεσμάτων και βάσει αυτών κατασκευάστηκε ένα μοντέλο πρόβλεψης το οποίο προτείνει τρεις συνθήκες βέλτιστης εκχύλισης φαινολικών συστατικών με μέγιστη απόδοση σε TPC (Πίνακας 4.4).

Πίνακας 4.4: Βελτιστοποιημένες προβλεπόμενες πειραματικές συνθήκες εκχύλισης μέγιστης απόδοσης TPC βάσει μοντέλου BBD

Προτεινόμενες βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης	Ethanol content (%)	Extraction time (min)	US power (%)	Solvent/material ratio (mL/g)	TPC (mg GAE/g dry sample) Fit	Composite Desirability
1	20,0000	40	80	20	67,27	1
2	20,0000	40	20	20	55,82	1
3	41,9760	40	80	20	51,30	1

Οι παραπάνω βελτιστοποιημένες πειραματικές συνθήκες θα αναφέρονται χάριν κωδικοποίησης ως Best 1 (για το προτεινόμενο πείραμα 1), Best 2 (για το προτεινόμενο πείραμα 2) και Best 3 (για το προτεινόμενο πείραμα 3) αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της μέτρησης του TPC με τη μέθοδο F-C για τις εν λόγω πειραματικές συνθήκες φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 4.5). Αναγράφονται επίσης και οι θερμοκρασίες στο εσωτερικό του διαλύματος αμέσως πριν την έναρξη της εκχύλισης (αρχική θερμοκρασία) και κατά τη λήξη αυτής (τελική θερμοκρασία).

Πίνακας 4.5: Απόδοση των εκχυλίσεων ξηρής δρόγης μελισσόχορτου σε TPC μετρούμενη τη μέθοδο Folin-Ciocalteu στις βελτιστοποιημένες συνθήκες εκχύλισης του μοντέλου πρόβλεψης (Μέσος όρος \pm SD)

Κωδικοποιημένο δείγμα	Μέσος όρος συνολικού φαινολικού περιεχομένου ξηρού προϊόντος (mg GAE/g dry herb) \pm SD	Αρχική Θερμοκρασία (°C)	Τελική Θερμοκρασία (°C)
Best 1	43,6 \pm 4,5 ^a	23	10
Best 2	50,1 \pm 3,1 ^a	28	21
Best 3	76,2 \pm 1,2 ^b	29	11

Τιμές οι οποίες ακολουθούνται από διαφορετικό δείκτη (^{a, b}), διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά βάσει στατιστικής ομαδοποίησης ($p < 0,05$).

Όπως φαίνεται βάσει αποτελεσμάτων, η συνθήκη εκχύλισης Best 3 δίνει την μέγιστη απόδοση σε TPC συγκριτικά με τις άλλες δύο θεωρητικά βέλτιστες προβλεπόμενες συνθήκες. Κατά την στατιστική ανάλυση ANOVA των εν λόγω τιμών TPC, η συγκεκριμένη τιμή φαίνεται ότι στατιστικά διαφέρει σημαντικά από τις υπόλοιπες, επομένως κατατάσσεται σε διαφορετική στατιστική ομάδα.

Στη συνέχεια παρατίθεται ο Πίνακας 4.6 με σκοπό την σύγκριση των προβλεπόμενων θεωρητικών και πειραματικών τιμών των παραπάνω τριών συνθηκών εκχύλισης.

Πίνακας 4.6: Σύγκριση προβλεπόμενων από το μοντέλο και πειραματικών τιμών απόδοσης σε TPC υπό τις τρεις προβλεπόμενες συνθήκες εκχύλισης με υπερήχους (Μέσος όρος \pm SD)

Κωδικοποιημένο δείγμα	Θεωρητικές τιμές συνολικού φαινολικού περιεχομένου ξηρού προϊόντος (mg GAE/g dry herb)	Πειραματικές τιμές συνολικού φαινολικού περιεχομένου ξηρού προϊόντος (mg GAE/g dry herb) \pm SD
Best 1	67,27	43,6 \pm 4,5
Best 2	55,82	50,1 \pm 3,1
Best 3	51,30	76,2 \pm 1,2

Όσον αφορά τις προβλεπόμενες βέλτιστες αποδόσεις σε TPC κατά τις συνθήκες εκχύλισης Best 1 και Best 3, τα πειραματικά δεδομένα δεν συμπίπτουν κατάλληλα με τις θεωρητικές τιμές, το οποίο ενδεχομένως αποδίδεται στο επίπεδο ικανότητας πρόβλεψης του μοντέλου (76,49%) και στο περιθώριο σφάλματος που υπάρχει σύμφωνα με αυτήν τιμή. Αναφορικά με την συνθήκη Best 1, η προβλεπόμενη απόκριση ισούται με 67,27 mg GAE/g ενώ το Confidence Intervals (CI, 95%) κυμαίνεται από 54,48 έως 80,06, με την πειραματική τιμή να ισούται με 43,6 mg GAE/g. Οι αντίστοιχες τιμές για την συνθήκη Best 3 ισούνται με 51,30 για την προβλεπόμενη τιμή, CI (95%) 42,57 έως 60,03 και πειραματική τιμή 76,2 mg GAE/g. Το δείγμα εκχύλισης υπό τη συνθήκη Best 2 βρίσκεται εντός ορίων CI, με τη θεωρητική τιμή να ισούται με 55,82, το CI (95%) από 43,03 έως 68,61 και πειραματική τιμή ίση με 50,1 mg GAE/g. Αξίζει να αναφερθεί (όπως έχει γίνει ήδη στην Παράγραφο 4.1.3) ότι ένα πλήθος μελετών οι οποίες αφορούν την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από παραπροϊόντα επεξεργασίας αρωματικών φυτών με χρήση υπερήχων, καταλήγει στο ότι η βέλτιστη περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη με σκοπό τη μέγιστη απόδοση σε TPC είναι κοντά στο 40%, όπως συμβαίνει και στο δείγμα εκχύλισης Best 3 του πειραματικού σχεδιασμού στην εν λόγω εργασία.

4.2 Προσδιορισμός Φαινολικού Περιεχομένου, Αντιοξειδωτικής και Αντιριζικής Δράσης σε Δείγματα Ξηρού Προϊόντος και Παραπροϊόντος Μελισσόχορτου

4.2.1 Προσδιορισμός Φαινολικού Περιεχομένου στο Παραπροϊόν Μελισσόχορτου με την Μέθοδο F-C

Όσον αφορά τον προσδιορισμό του TPC στα παραπροϊόντα επεξεργασίας του μελισσόχορτου, επιλέχθηκε να διεξαχθούν εκχυλίσεις και μέτρησή του με ορισμένες συνθήκες. Από τις πειραματικές συνθήκες εκχύλισης οι οποίες εκτελέστηκαν για τη ξηρή δρόγη, οι συνθήκες οι οποίες έδωσαν τη μέγιστη (Max), μια μέση (Mid) και την ελάχιστη (Min) τιμή ολικού φαινολικού περιεχομένου ήταν αυτές οι οποίες εφαρμόστηκαν για αυτόν τον σκοπό (Πίνακας 4.3). Επιλέχθηκαν επίσης από τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες εκχύλισης τις οποίες προέβλεψε το μοντέλο, τα Best 2 και Best 3, εφόσον η συνθήκη εκχύλισης Best 1 δε διαφέρει σημαντικά με την Best 2

όσον αφορά την απόδοση σε TPC στο ξηρό προϊόν. Τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu εξάγονται βάσει της καμπύλης αναφοράς και φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 4.7).

Πίνακας 4.7: Απόδοση των εκχυλίσεων παραπροϊόντων μελισσόχορτου σε TPC μετρούμενη τη μέθοδο Folin-Ciocalteu στις επιλεγμένες συνθήκες εκχύλισης (Μέσος όρος \pm SD)

Κωδικοποιημένο δείγμα	Μέσος όρος συνολικού φαινολικού περιεχομένου παραπροϊόντος (mg GAE/g dry herb) \pm SD	Αρχική Θερμοκρασία (°C)	Τελική Θερμοκρασία (°C)
Best 2	2,16 \pm 0,48 ^a	24	23
Best 3	6,84 \pm 0,68 ^b	28	7
Max (run 21)	6,4 \pm 2,3 ^b	21	20
Mid (run 7)	13,6 \pm 1,8 ^c	26	36
Min (run 13)	0,209 \pm 0,044 ^a	20	36

Τιμές οι οποίες ακολουθούνται από διαφορετικό δείκτη (^{a, b, c}), διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά βάσει στατιστικής ομαδοποίησης ($p < 0,05$).

Με βάση τον ανωτέρω πίνακα, οι συνθήκες εκχύλισης με την ελάχιστη απόδοση (Min) διατηρούν χαμηλές τιμές TPC και στα παραπροϊόντα, ενώ η συνθήκη Best 3 παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση σε σχέση με την αντίστοιχη Best 2, όπως και στο ξηρό προϊόν και ταυτόχρονα στατιστικά συγκρίσιμη τιμή με την συνθήκη με μέγιστη απόδοση κατά τον πειραματικό σχεδιασμό στο ξηρό προϊόν (Max). Αναφορικά με το δείγμα εκχύλισης υπό τη συνθήκη Mid, φαίνεται ότι ενώ το εν λόγω δείγμα στο ξηρό προϊόν παρουσιάζει μία ενδιάμεση τιμή TPC, ως παραπροϊόν η απόδοση είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες. Κατά την διεργασία της υδροαπόσταξης, ένα μέρος των υδατοδιαλυτών φαινολικών μορίων ενδέχεται να απομακρύνεται από το υπόστρωμα κατά το βρασμό του φυτού μέσα σε νερό. Επομένως αναμένεται στα παραπροϊόντα του φυτού να απομένουν κατ' αναλογία περισσότερες ενώσεις διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες. Η συνθήκη εκχύλισης Mid (Πίνακας 4.3) περιλαμβάνει περιεκτικότητα σε αιθανόλη (60%) στον διαλύτη, η οποία είναι μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες Best 2, Best 3 και Max (20, 42 και 20%). Συμπερασματικά, λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε αιθανόλη, το δείγμα της συνθήκης εκχύλισης Mid ίσως αποδίδει τη μεγαλύτερη τιμή TPC στην εκχύλιση των μη πολικών φαινολικών ενώσεων από τα παραπροϊόντα, οι οποίες πιθανώς υπάρχουν σε μεγαλύτερη αναλογία σε σχέση με τις αντίστοιχες υδατοδιαλυτές.

4.2.2 Σύγκριση Απόδοσης σε TPC Μεταξύ Ξηρού Προϊόντος και Παραπροϊόντος Μελισσόχορτου

Όπως φαίνεται, η απόδοση των δειγμάτων μελισσόχορτου σε TPC ελαττώνεται σημαντικά στα παραπροϊόντα επεξεργασίας του συγκριτικά με το δείγμα ξηρής δρόγης. Παρακάτω παρουσιάζεται ο Πίνακας 4.8 με τις αποδόσεις σε TPC τόσο στο ξηρό προϊόν όσο και στο παραπροϊόν επεξεργασίας μελισσόχορτου

Πίνακας 4.8: Σύγκριση απόδοσης σε TPC μεταξύ ξηρού προϊόντος και παραπροϊόντος μελισσόχορτου με τη μέθοδο F-C

Κωδικοποιημένο δείγμα	Μέσος όρος συνολικού φαινολικού περιεχομένου ξηρού προϊόντος (mg GAE/g dry herb) \pm SD	Μέσος όρος συνολικού φαινολικού περιεχομένου παραπροϊόντος (mg GAE/g dry herb) \pm SD
Best 2	50,1 \pm 3,1 ^{c,A}	2,16 \pm 0,48 ^{a,B}
Best 3	76,2 \pm 1,2 ^{d,A}	6,84 \pm 0,68 ^{b,B}
Max (run 21)	51,3 \pm 1,8 ^{c,A}	6,4 \pm 2,3 ^{b,B}
Mid (run 7)	26,8 \pm 3,2 ^{b,A}	13,6 \pm 1,8 ^{c,B}
Min (run 13)	0,313 \pm 0,067 ^{a,A}	0,209 \pm 0,044 ^{a,B}

Τιμές οι οποίες ακολουθούνται από διαφορετικό δείκτη (^{a, b, c, d}) και (^{A, B}) διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά βάσει στατιστικής ομαδοποίησης ($p < 0,05$) ανά στήλη ξεχωριστά ή ανά γραμμή ξεχωριστά, αντίστοιχα.

Η εμφανής ελάττωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου υπό τις ίδιες συνθήκες εκχύλισης, ενδέχεται να αποδίδεται στην επεξεργασία στην οποία υπόκειται το φυτό κατά τη μέθοδο της υδροαπόσταξης με σκοπό την παραγωγή αιθέριων ελαίων. Ένα μέρος των φαινολικών συστατικών του φυτού πιθανώς να καταστρέφεται λόγω των υψηλών θερμοκρασιών οι οποίες επικρατούν. Ιδίως μικρότερα και πολικότερα φαινολικά μόρια, τα οποία είναι υδατοδιαλυτά, ενδεχομένως αποβάλλονται από το φυτικό υπόστρωμα μαζί με το νερό κατά τον βρασμό και συνεπώς σε αυτό ίσως οφείλεται η ελαττωμένη συγκέντρωση φαινολικού περιεχομένου στα παραπροϊόντα επεξεργασίας του φυτού (Christaki *et al.*, 2022). Επιπλέον, η στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη τιμή TPC στο δείγμα εκχύλισης Mid των παραπροϊόντων σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα θα μπορούσε να βασίζεται στην παραπάνω υπόθεση με τη λογική ότι μετά τη μέθοδο της υδροαπόσταξης, οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες μένουν στο φυτικό υπόστρωμα και πιθανώς να μην καταστρέφονται το ίδιο εύκολα από τις υψηλές θερμοκρασίες είναι κατά κύριο λόγο λιγότερο πολικές ενώσεις μεγαλύτερου μοριακού βάρους, διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες. Εφόσον η συνθήκη εκχύλισης Mid στα δείγματα παραπροϊόντος πραγματοποιείται με μεγαλύτερη % περιεκτικότητα σε αιθανόλη στο διαλύτη σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, πιθανώς να ευνοείται η εκχύλιση των προαναφερθέντων ενώσεων, αυξάνοντας έτσι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο αυτού του δείγματος (Yu *et al.*, 2019; Ullah *et al.*, 2023).

4.2.3 Υπολογισμός Αναγωγικής Ισχύος/Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με τη Δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η μέθοδος υπολογισμού της αναγωγικής ισχύος των δειγμάτων διεξήχθη με τη μέθοδο FRAP. Οι συνθήκες εκχύλισης οι οποίες επιλέχθηκαν για τη μέτρηση αυτή στο ξηρό προϊόν μελισσόχορτου, είναι οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης που προτάθηκαν από το μοντέλο πρόβλεψης του πειραματικού σχεδιασμού Best 2 και Best 3. Για την μέτρηση της αναγωγικής ισχύος των παραπροϊόντων μελισσόχορτου, επιλέχθηκε να διεξαχθούν τόσο οι συνθήκες εκχύλισης Best 2 και Best 3 αλλά και επιπλέον οι Max, Mid και Min. Τα αποτελέσματα της μεθόδου φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 4.9) και εκφράζονται σε mg Fe(II) ανά g δείγματος. Η μεθοδολογία της δοκιμής περιγράφεται στην Παράγραφο 3.7.2.

Πίνακας 4.9: Ποσότητα του Fe(III) που ανήχθη σε Fe(II) από τις αναγωγικές/αντιοξειδωτικές ενώσεις ανά γραμμάριο δείγματος μελισσόχορτου (Μέσος όρος \pm SD)

Κωδικοποιημένο δείγμα	Average mg Fe(II)/g herb \pm SD
Best 2 (DP)	102,5 \pm 5,2 ^e
Best 3 (DP)	103,6 \pm 1,9 ^e
Best 2 (BP)	19,11 \pm 0,11 ^a
Best 3 (BP)	18,58 \pm 0,25 ^a
Max (BP)	28,67 \pm 0,53 ^c
Mid (BP)	43,7 \pm 1,3 ^d
Min (BP)	2,251 \pm 0,081 ^b

DP: Dry Product (ξηρό προϊόν μελισσόχορτου)

BP: By-Product (παραπροϊόν μελισσόχορτου)

Τιμές οι οποίες ακολουθούνται από διαφορετικό δείκτη (^a, ^b, ^c, ^d, ^e), διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά βάσει στατιστικής ομαδοποίησης ($p < 0,05$).

Όπως φαίνεται και βάσει στατιστικής ομαδοποίησης, το περιεχόμενο σε mg Fe(II) ανά g δείγματος στα παραπροϊόντα επεξεργασίας μελισσόχορτου είναι εμφανώς μικρότερο συγκριτικά με το ξηρό προϊόν μελισσόχορτου. Όσον αφορά τα παραπροϊόντα, η συνθήκη εκχύλισης Best 3 με τη μέγιστη απόδοση σε TPC στο ξηρό προϊόν εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερη τιμή του μετρούμενου μεγέθους συγκριτικά με τη συνθήκη εκχύλισης Min, ενώ δε διαφέρει σημαντικά με την αντίστοιχη τιμή της εκχύλισης Best 2. Το δείγμα εκχύλισης Mid εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερη απόδοση σε mg Fe(II) σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα των παραπροϊόντων. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο αυξημένο φαινολικό περιεχόμενο του εν λόγω δείγματος, εάν και εφόσον οι μέθοδοι F-C και FRAP συσχετίζονται καλά μεταξύ τους.

4.2.4 Εκτίμηση της Ικανότητας Δέσμευσης/Ανάσχεσης της Ελεύθερης Ρίζας ABTS^{•+}

Η εκτίμηση της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων μελισσόχορτου μετρήθηκε με την δοκιμή ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+}. Οι συνθήκες εκχύλισης οι οποίες επιλέχθηκαν για την διεξαγωγή της εν λόγω μεθόδου είναι ίδιες με αυτές της μεθόδου FRAP (4.2.3). Τα αποτελέσματα της μεθόδου φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 4.10) και εκφράζονται σε mg πρότυπης ουσίας Trolox (Trolox Equivalents, TE). Η μεθοδολογία της δοκιμής περιγράφεται στην Παράγραφο 3.7.3.

Πίνακας 4.10: Συγκέντρωση των ενώσεων με ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων πρότυπης ουσίας Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά γραμμάριο δείγματος μελισσόχορτου (Μέσος όρος \pm SD)

Κωδικοποιημένο δείγμα	Average mg TE/g herb \pm SD
Best 2 (DP)	148,0 \pm 6,2 ^c
Best 3 (DP)	147 \pm 25 ^c
Best 2 (BP)	35,2 \pm 1,7 ^a
Best 3 (BP)	29,91 \pm 0,42 ^a
Max (BP)	30.1 \pm 2.5 ^a
Mid (BP)	37,2 \pm 4,4 ^a
Min (BP)	1,233 \pm 0,038 ^b

DP: Dry Product (ξηρό προϊόν μελισσόχορτου)

BP: By-Product (παραπροϊόν μελισσόχορτου)

Τιμές οι οποίες ακολουθούνται από διαφορετικό δείκτη (^{a, b, c}), διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά βάσει στατιστικής ομαδοποίησης ($p < 0,05$)

Ομοίως με την μέθοδο FRAP και F-C, το περιεχόμενο σε mg TE ανά g δείγματος ελαττώνεται σημαντικά στα παραπροϊόντα επεξεργασίας μελισσόχορτου σε σχέση με το ξηρό δείγμα. Ισχύει επιπλέον και εδώ ότι η συνθήκη εκχύλισης Best 3 δίνει τιμή TPC μεγαλύτερη και με στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τη συνθήκη εκχύλισης Min, ενώ οι τιμές του TPC κατά τις συνθήκες Best 2, Best 3, Max και Mid δε διαφέρουν σημαντικά στην εν λόγω μέθοδο. Γίνεται όπως και στην Παράγραφο 4.2.3, η υπόθεση ότι αυξημένο TPC συνεπάγεται υψηλές τιμές TE, εφόσον οι F-C και ABTS συσχετίζονται καλά μεταξύ τους, με σκοπό να αιτιολογηθεί η υψηλή τιμή του μετρούμενου μεγέθους στο δείγμα εκχύλισης Mid των παραπροϊόντων.

4.2.5 Συσχέτιση Φασματοφωτομετρικών Μεθόδων με τον Στατιστικό Δείκτη Pearson's Correlation

Ο Στατιστικός Δείκτης Pearson's Correlation Coefficient (PCC) αποτελεί έναν δείκτη γραμμικής συσχέτισης μεταξύ δύο διαφορετικών συνόλων δεδομένων. Είναι η αναλογία μεταξύ της συν-διακύμανσης δύο μεταβλητών και του προϊόντος των τυπικών αποκλίσεών τους. Έτσι, είναι ουσιαστικά μια κανονικοποιημένη μέτρηση της συν-διακύμανσης, έτσι ώστε το αποτέλεσμα να λαμβάνει πάντα μια τιμή μεταξύ -1 και 1.

Δείκτης PCC ίσος με 1, δηλώνει τέλεια γραμμική θετική συσχέτιση (ευθέως ανάλογα μεγέθη), ενώ ίσος με -1 δηλώνει τέλεια γραμμική αρνητική συσχέτιση (αντιστρόφως ανάλογα μεγέθη), με το 0 να δηλώνει ότι τα δύο σύνολα δεν συσχετίζονται στατιστικά.

Στη συνέχεια παρατίθεται ο Πίνακας 4.11, στον οποίο αναγράφονται οι ευρεθείσες τιμές του δείκτη PCC κατά τη συσχέτιση των φασματοφωτομετρικών μεθόδων F-C, FRAP και ABTS^{•+}.

Πίνακας 4.11: Συσχέτιση F-C, FRAP και ABTS^{•+} με τον δείκτη PCC

Μέθοδος	F-C	FRAP	ABTS
F-C	-	0,953	0,954
FRAP	0,953	-	0,983
ABTS	0,954	0,983	-

Κατά τη συσχέτιση των F-C και FRAP, ο δείκτης PCC λαμβάνει τιμή 0,953 το οποίο δηλώνει μία πολύ καλή θετικά γραμμική συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων κατά την μέτρηση του TPC και της αναγωγικής ισχύος δειγμάτων ξηρής δρόγης και παραπροϊόντος μελισσόχορτου αντίστοιχα.

Στη συσχέτιση F-C και ABTS, ο PCC λαμβάνει τιμή 0,954, τιμή η οποία δηλώνει επίσης μία πολύ καλή θετικά γραμμική συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων κατά την μέτρηση του TPC και της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας δειγμάτων ξηρής δρόγης και παραπροϊόντος μελισσόχορτου αντίστοιχα.

Ο δείκτης PCC ισούται με 0,983 κατά τη συσχέτιση των FRAP και ABTS. Η τιμή αυτή δηλώνει επίσης μία πολύ καλή θετικά γραμμική συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων κατά την μέτρηση της αναγωγικής ισχύος και της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας δειγμάτων ξηρής δρόγης και παραπροϊόντος μελισσόχορτου αντίστοιχα.

Βάσει των ανωτέρω, συμπεραίνεται ότι το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο σε ένα υπόστρωμα, η αναγωγική ισχύς και η αντιριζική ιδιότητά του, συσχετίζονται μεταξύ τους πολύ καλά και επιπλέον έχουν ευθέως ανάλογη σχέση. Αυτό σημαίνει πως η όποια αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση, ενδεχομένως οφείλεται στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του υποστρώματος. Αυτό επιβεβαιώνει και την υπόθεση η οποία έγινε στην παράγραφο 4.2.3 και 4.2.4, ότι υψηλό TPC σε ένα υπόστρωμα συνεπάγεται και υψηλές τιμές Fe(II) καθώς και TE και το οποίο δικαιολογεί τις αυξημένες τιμές των εν λόγω μεγεθών στο δείγμα εκχύλισης παραπροϊόντων μελισσόχορτου υπό τη συνθήκη Mid.

4.3 Ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) Συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) για την Αξιολόγηση του Φυτοχημικού Προφίλ Φαινολικών Ενώσεων των Εκχυλισμάτων Παραπροϊόντων Επεξεργασίας Μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*)

Η αναλυτική μέθοδος LC-MS/MS, πραγματοποιήθηκε στην εν λόγω εργασία με στόχο την ταυτοποίηση και συγκριτική μελέτη των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων από παραπροϊόντα επεξεργασίας μελισσόχορτου. Για τη συγκριτική μελέτη του φαινολικού προφίλ των εκχυλισμάτων, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα εκχυλίσματα παραπροϊόντων μελισσόχορτου στις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης (Best 3), στις συνθήκες εκχύλισης μεσαίου TPC (Mid) του ξηρού προϊόντος και στις συνθήκες εκχύλισης χαμηλού TPC (Min) του ξηρού προϊόντος. Οι συνθήκες εκχύλισης από τις οποίες προέκυψαν τα δείγματα παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 4.3 και Πίνακας 4.4. Συνολικά έγινε ταυτοποίηση 20 διαφορετικών φαινολικών ενώσεων, ενώ οι συνθήκες και η πειραματική πορεία της μεθόδου αναλύονται στην παράγραφο 3.8.

Παρακάτω παρατίθεται ο Πίνακας 4.12, στον οποίο αναγράφονται οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα των συνθηκών εκχύλισης Best 3, Mid και Min καθώς και τα εύρη των χρόνων έκλουσης μεταξύ όλων των δειγμάτων και τα θραύσματα των μητρικών ενώσεων.

Πίνακας 4.12: Ταυτοποιημένες φαινολικές ενώσεις επιλεγμένων δειγμάτων παραπροϊόντος επεξεργασίας μελισσόχορτου με τη μέθοδο LC-MS/MS

Κορυφή	Ονομασία Ένωσης	Μητρικό Ιόν [M-H] ⁻ (m/z)	Θραύσματα MS/MS (m/z)	Χρόνος Έκλουσης (min)
1	Rosmarinic Acid	359,2	161, 197, 179, 135	3,454-3,493
2	Lithospermic Acid A Isomer	537,3	493, 359	3,859-3,911
3	Lithospermic Acid A	537,2	493, 295, 179, 135	3,911-3,963
4	Salvianic Acid A (Danshensu)	197,1	73, 135, 179, 123	0,811-0,917
5	Yunnaneic Acid F	597,2	345, 179	4,202-4,222
6	Luteolin-7-O-Glucoside	447,3	285	4,299-4,362
7	Caftaric Acid	311,2	149, 179, 135, 87	4,170
8	Luteolin 3'-O-B-D-Glucuronide	461,2	285	5,018-5,089
9	Apigenin	269,1	117, 107, 151	6,549-6,627

10	Myricetin	317,4	317, 286	7,534
11	Salvianolic Acid F	313,3	313, 269	3,663-3,703
12	Salvianolic Acid A	493,3	295, 197	3,896-3,948
13	Rosmarinic Acid Hexoside	521,3	161, 179, 360	4,346-4,429
14	Caffeic Acid Hexoside	341,2	179	4,388
15	Prolithospermic Acid	357,2	159, 269, 203	3,596-3,635
16	Salvianolic Acid C Derivative	553,2	179, 161, 135	4,673
17	Caffeic Acid	179,2	153, 135	0,954-0,991
18	3'-O-(8''-Z-Caffeoyl) rosmarinic acid	537,3	161, 135, 358, 197, 179	3,849-3,911
19	Protocatechuic acid	153,1	109, 108, 153	1,102-1,139
20	Salicylic acid	137,2	93, 137	1,361-1,473

Στη συνέχεια παρατίθεται ο Πίνακας 4.13, ο οποίος αναγράφει την παρουσία ή μη των ταυτοποιηθέντων φαινολικών ενώσεων στα επιλεγμένα δείγματα εκχύλισης των παραπροϊόντων επεξεργασίας μελισσόχορτου.

Πίνακας 4.13: Παρουσία των ταυτοποιηθέντων φαινολικών ενώσεων στα εκχύλιματα των παραπροϊόντων επεξεργασίας μελισσόχορτου υπό τις συνθήκες Best 3, Mid & Min

Κορυφή	Όνομασία Ένωσης	Best 3	Mid	Min
1	Rosmarinic Acid	✓	✓	✓
2	Lithospermic Acid A Isomer	✓	✓	✗
3	Lithospermic Acid A	✓	✓	✓
4	Salvianic Acid A (Danshensu)	✓	✓	✗
5	Yunnaneic Acid F	✓	✓	✗
6	Luteolin-7-O-Glucoside	✓	✓	✗

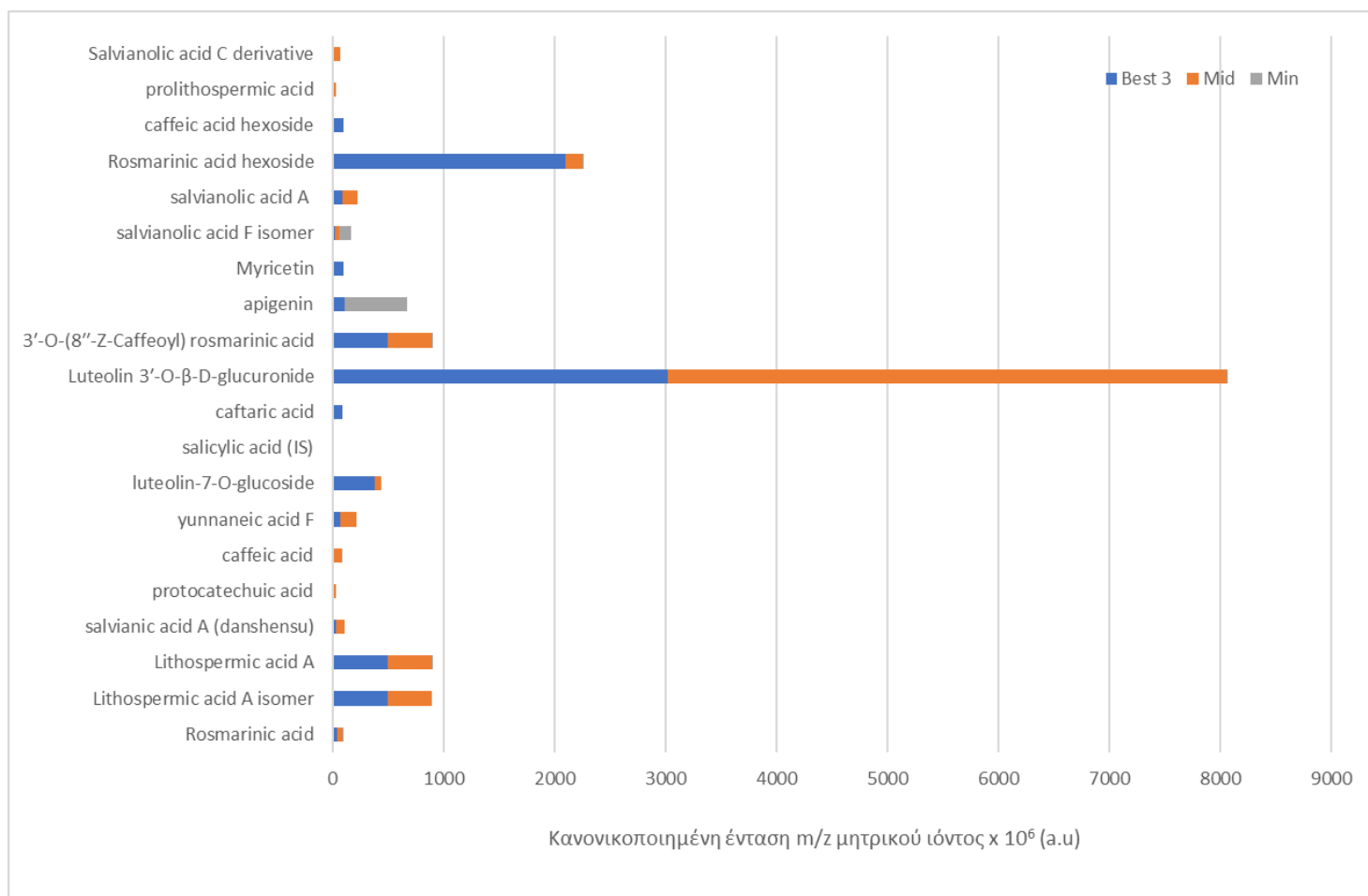
7	Caftaric Acid	✓	✗	✗
8	Luteolin 3'-O-B-D-Glucuronide	✓	✓	?
9	Apigenin	✓	✗	✓
10	Myricetin	✓	✗	✗
11	Salvianolic Acid F isomer	✓	✓	✓
12	Salvianolic Acid A	✓	✓	✗
13	Rosmarinic Acid Hexoside	✓	✓	?
14	Caffeic Acid Hexoside	✓	✗	✗
15	Prolithospermic Acid	✓	✓	✗
16	Salvianolic Acid C Derivative	✗	✓	✗
17	Caffeic Acid	?	✓	?
18	3'-O-(8''-Z-Caffeoyl) rosmarinic acid	✓	✓	?
19	Protocatechuic acid	?	?	✗
20	Salicylic acid	?	?	✗

*Με ? σημειώνονται οι φαινολικές ενώσεις, των οποίων οι κορυφές ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλή ένταση και βρίσκονται στα όρια του θορύβου του οργάνου

Όπως φαίνεται, το εκχύλισμα παραπροϊόντων μελισσόχορτου υπό την συνθήκη Min εμφανίζει ελαττωμένο φαινολικό περιεχόμενο συγκριτικά με το αντίστοιχο της συνθήκης εκχύλισης Best 3. Από τις 16 ταυτοποιημένες ενώσεις του δείγματος Best 3 (12 φαινολικά οξέα, 3 φλαβόνες και 1 φλαβονόλη) στο Min εμφανίζονται μόλις οι 4, οι 3 εκ των οποίων ανήκουν στην ομάδα των φαινολικών οξέων και 1 στις φλαβόνες. Το δείγμα Best 3 προκύπτει από χαμηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη (42% v/v) σε σχέση με το Min (100% v/v). Στο γεγονός αυτό ενδέχεται να οφείλεται η απουσία ταυτοποιηθέντων υδατοδιαλυτών ενώσεων στο δείγμα Min, με τα Rosmarinic acid, Lithospermic acid A και Apigenin να έχουν πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό (*Use of rosemary extracts as a food additive - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food | EFSA, 2008, DeRango-Adem and Blay, 2021*). Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αύξηση του χρόνου εκχύλισης και της έντασης των υπερήχων αυξάνει και τα προς εκχύλιση συστατικά, συνεπώς στην περίπτωση του Best 3 (40 min και 80% αντίστοιχα) έναντι του Min (10 min και 50% αντίστοιχα) ταυτοποιούνται λιγότερες φαινολικές ενώσεις.

Όσον αφορά το δείγμα της συνθήκης εκχύλισης Mid, το ενδιαφέρον για μελέτη του φυτοχημικού του προφίλ έγκειται στο ότι η εν λόγω συνθήκη εκχύλισης στα ξηρό προϊόν μελισσόχορτου δίνει μία ενδιάμεση απόδοση σε TPC, αλλά στα παραπροϊόντα επεξεργασίας του φυτού αποτελεί τη βέλτιστη συνθήκη τόσο κατά την μέτρηση του TPC (Πίνακας 4.7), όσο στον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Πίνακας 4.9) αλλά και κατά την εκτίμηση της ικανότητας ανάσχεσης της ελεύθερης ρίζας (Πίνακας 4.10). Από τις 14 φαινολικές ενώσεις τις οποίες ταυτοποιήθηκαν στο εν λόγω δείγμα, οι 12 ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών οξέων και οι 2 στην ομάδα των φλαβονών, ενώ οι 10 από αυτές φαίνεται να παραλαμβάνονται αποδοτικότερα σε υδατοαλκοολικούς διαλύτες με σχετικά υψηλή περιεκτικότητα αλκοόλης. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως εξηγεί την μεγάλη απόδοση σε TPC στο δείγμα εκχύλισης Mid στα παραπροϊόντα επεξεργασίας του φυτού, μιας και όπως έχει ήδη αναφερθεί, το περιεχόμενο του διαλύτη σε αιθανόλη για τη συγκεκριμένη εκχύλιση είναι μεγαλύτερο από αυτό στις βέλτιστες συνθήκες.

Στην Εικόνα 4.14 απεικονίζεται η συγκριτική μελέτη του φυτοχημικού προφίλ των δειγμάτων εκχύλισης από τα παραπροϊόντα επεξεργασίας μελισσόχορτου όσον αφορά τις κανονικοποιημένες εντάσεις των μητρικών ιόντων.



Εικόνα 4.14: Σωρευμένο ραβδόγραμμα των ταυτοποιηθέντων φαινολικών ενώσεων με τις κανονικοποιημένες εντάσεις των μητρικών ιόντων με σκοπό τη σύγκριση του φυτοχημικού προφίλ των δειγμάτων εκχύλισης παραπροϊόντων μελισσόχορτου

Όσον αφορά το δείγμα Min, με εξαίρεση την ένωση Arigenin η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερη ένταση συγκριτικά με τις υπόλοιπες ενώσεις του δείγματος αλλά και μεταξύ δειγμάτων, παρουσιάζει τόσο περιορισμένο αριθμό φαινολικών ενώσεων όσο και χαμηλές εντάσεις στα μητρικά ιόντα. Ενδιαφέρον λοιπόν αποκτά η σύγκριση των δειγμάτων Best 3 και Mid. Όσον αφορά το πρώτο, παρόλο που το συγκεκριμένο δείγμα αποδίδει χαμηλότερες τιμές TPC σε σχέση με το δείγμα εκχύλισης Mid, παρουσιάζει μεγαλύτερο πλήθος φαινολικών ενώσεων αλλά σε μικρότερη συγκριτικά ένταση. Αντίθετα, η αυξημένη απόδοση σε TPC του εκχυλίσματος υπό τις συνθήκες Mid, αν και με μικρότερο αριθμό ταυτοποιημένων ενώσεων, αιτιολογείται από τις εμφανώς μεγαλύτερες εντάσεις των μητρικών ιόντων. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην υπόθεση, ότι κατά την εκχύλιση του φυτού με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης, στο υπόστρωμα παραμένουν λιγότερο πολικά και μεγαλύτερου μοριακού βάρους φαινολικά μόρια τα οποία διαλύονται καλύτερα σε οργανικούς διαλύτες. Εφόσον η συνθήκη εκχύλισης Mid πραγματοποιείται με μεγαλύτερο % v/v αιθανόλης στο διαλύτη, εικάζεται ότι εκχυλίζεται μεγαλύτερο μέρος των ενώσεων αυτών. Στον αντίποδα, η εκχύλιση υπό τη συνθήκη Best 3 πραγματοποιείται με μεγαλύτερη % αναλογία νερού στον διαλύτη, το οποίο ενδεχομένως ευνοεί την επιπλέον εκχύλιση ορισμένων υδατοδιαλυτών φαινολικών ενώσεων (5 από τις 16 ταυτοποιημένες ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές) και σε αυτό στηρίζεται το μεγαλύτερο εύρος των μορίων-στόχων.

5. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης φαινολικών ενώσεων με χρήση υπερήχων (Ultrasound Assisted Extraction, UAE) από δείγματα ξηρού προϊόντος και παραπροϊόντος απόσταξης μελισσόχορτου με χρήση μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken. Τα παραπροϊόντα επεξεργασίας προέκυψαν μέσω υδροαπόσταξης από το φυτό με σκοπό την βιομηχανική παραγωγή αιθέριων ελαίων. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC), η αντιοξειδωτική ικανότητα και ικανότητα ανάσχεσης της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+} των εκχυλισμάτων μετρήθηκαν με φασματοφωτομετρικές μεθόδους. Τέλος, έγινε εκτίμηση του φυτοχημικού προφίλ επιλεγμένων εκχυλισμάτων παραπροϊόντων επεξεργασίας του μελισσόχορτου με χρήση LC-MS/MS. Βάσει των αποτελεσμάτων της εν λόγω μελέτης προκύπτουν τα εξής:

- Κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα ξηρού προϊόντος μελισσόχορτου με UAE αποδείχθηκε βάσει στατιστικής ανάλυσης, ότι σημαντικοί παράγοντες στην εκχύλιση είναι το % v/v περιεχόμενο του διαλύτη σε αιθανόλη, ο χρόνος εκχύλισης (min) και η % ένταση των υπερήχων με p-values < 0,05, ενώ κρίνεται ως μη σημαντική μεταβλητή η αναλογία διαλύτη/υποστρώματος (mL/g) με p-value = 0,095
- Στατιστικά μη σημαντικές αποδείχθηκαν επίσης οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ όλων των προς βελτιστοποίηση μεταβλητών ανά δύο (2-Way interaction)
- Όσον αφορά το ξηρό προϊόν μελισσόχορτου, εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:
 - Η % περιεκτικότητα διαλύτη σε αιθανόλη, έχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την απόδοση της εκχύλισης σε TPC
 - Ο χρόνος εκχύλισης παρουσιάζει ευθέως ανάλογη σχέση με την απόδοση εκχύλισης σε TPC
 - Η % ένταση των υπερήχων παρουσιάζει ευθέως ανάλογη σχέση με την απόδοση εκχύλισης σε TPC
 - Η αναλογία διαλύτη/υπόστρωμα δεν επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης σε TPC
 - Οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης με μέγιστη απόδοση σε TPC, βέλτιστη αντιοξειδωτική ικανότητα και ικανότητα ανάσχεσης των ελεύθερων ριζών στην δρόγη είναι 42% v/v περιεκτικότητα σε αιθανόλη, χρόνος εκχύλισης 40 min, ένταση υπερήχων 80% και αναλογία διαλύτη/υπόστρωμα 20 mL/g (Πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.1: Αποδόσεις των φασματοφωτομετρικών μεθόδων του δείγματος εκχύλισης υπό τη συνθήκη Best 3 στο ξηρό προϊόν

Μέθοδος	Απόδοση
F-C	76,2 ± 1,2 mg GAE/g herb
FRAP	103,6 ± 1,9 mg Fe(II)/g herb
ABTS	147 ± 25 mg TE/g herb

- Με τη χρήση του στατιστικού δείκτη PCC, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων FRAP, ABTS, F-C και αποδείχτηκε ότι συσχετίζονται καλά μεταξύ τους. Συνεπώς το TPC ενός υποστρώματος, και συγκεκριμένα στα δείγματα μελισσόχορτου, επηρεάζει την αντιοξειδωτική και αντιριζική του δράση.
- Μεταβαίνοντας στα παραπροϊόντα επεξεργασίας μελισσόχορτου, παρατηρήθηκαν τα εξής:
 - Οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης με μέγιστη απόδοση σε TPC, βέλτιστη αντιοξειδωτική ικανότητα και ικανότητα ανάσχεσης των ελεύθερων ριζών είναι 60% περιεκτικότητα σε αιθανόλη, χρόνος εκχύλισης 25 min, 80% ένταση υπερήχων και αναλογία διαλύτη/υπόστρωμα 60 mL/g, συνθήκη η οποία στο ξηρό προϊόν δίνει μία μέση απόδοση σε TPC.

Πίνακας 5.2: Αποδόσεις των φασματοφωτομετρικών μεθόδων του δείγματος εκχύλισης υπό τη συνθήκη Mid στο παραπροϊόν

Μέθοδος	Απόδοση
F-C	13,6 ± 1,8 mg GAE/g herb
FRAP	43,7 ± 1,3 mg Fe(II)/g herb
ABTS	37,2 ± 4,4 mg TE/g herb

- Κατά την εφαρμογή της μεθόδου LC-MS/MS σε 3 δείγματα εκχύλισης παραπροϊόντων μελισσόχορτου ταυτοποιήθηκαν συνολικά 20 φαινολικές ενώσεις, εκ των οποίων 16 ήταν φαινολικά οξέα, 3 ήταν φλαβόνες και 1 ένωση ήταν φλαβονόλη. Από το σύνολο των φαινολικών ενώσεων οι οποίες ταυτοποιήθηκαν, 15 από τις 20 είναι σχετικά μη πολικές ενώσεις, ενώ μόλις 5 είναι υδατοδιαλυτές.
- Τα εκχυλίσματα ξηρού προϊόντος παρουσιάζουν συγκριτικά με τα αντίστοιχα των παραπροϊόντων υψηλότερες τιμές TPC, αντιοξειδωτικής δράση και αντιριζικής δράσης. Η εμφανής ελάττωση του TPC, η οποία εμφανίζεται και στα αποτελέσματα των υπόλοιπων φασματοφωτομετρικών μεθόδων, οφείλεται στην επεξεργασία στην οποία υπόκειται το φυτό κατά την υδροαπόσταξη. Ενδέχεται ένα μέρος των φαινολικών ενώσεων του φυτού να καταστρέφεται λόγω των υψηλών θερμοκρασιών οι οποίες επικρατούν. Επιπλέον, τα υδατοδιαλυτά φαινολικά συστατικά του φυτού ίσως εκχυλίζονται στο νερό κατά το βρασμό αυτού. Αυτό εξηγεί την ελαττωμένη συγκέντρωση σε υδατοδιαλυτές φαινολικές ενώσεις στα

εκχυλίσματα παραπροϊόντων του μελισσόχορτου και ταυτόχρονα την αυξημένη απόδοση σε TPC του εκχυλίσματος υπό την συνθήκη Mid, το οποίο έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα αιθανόλης στον διαλύτη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι, ενδεχομένως, διαλύτης με υψηλότερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη εκχυλίζει περισσότερες φαινολικές ενώσεις από το παραπροϊόν του μελισσόχορτου, καθώς στο εν λόγω υπόστρωμα, η πλειοψηφία των ταυτοποιημένων μορίων είναι περισσότερο ευδιάλυτα σε υψηλές περιεκτικότητες οργανικών πολικών διαλυτών, όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη, και όχι στο νερό.

6. Μελλοντικοί Στόχοι

Με βάση τα αποτελέσματα και συμπεράσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, δύναται να ορισθούν μελλοντικοί στόχοι με σκοπό την ακριβέστερη προσέγγιση της εν λόγω μεθόδου βελτιστοποίησης εκχύλισης φαινολικών ενώσεων από παραπροϊόντα μελισσόχορτου, καθώς και στόχοι που αφορούν την αξιοποίηση της διαδικασίας βελτιστοποίησης στη βιομηχανία των τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα:

- Πειραματικός σχεδιασμός και κατασκευή μοντέλου πρόβλεψης με πειράματα απευθείας σε δείγματα παραπροϊόντων επεξεργασίας μελισσόχορτου, με σκοπό την κατασκευή ακριβέστερου μοντέλου πρόβλεψης βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης
- Ενδεχόμενη εφαρμογή πειραματικού μοντέλου σε βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών για την παραλαβή εκχυλισμάτων με επιθυμητό φαινολικό περιεχόμενο και βιολογικές δράσεις
- Ανάλυση φυτοχημικού προφίλ δειγμάτων ξηρής δρόγης μελισσόχορτου με τη μέθοδο LC-MS/MS με σκοπό τη σύγκριση φαινολικών ενώσεων μεταξύ ξηρού προϊόντος και παραπροϊόντος
- Χρήση και μελέτη διαφορετικής μεθόδου εκχύλισης, όπως για παράδειγμα εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction, MAE) ή της εκχύλισης υγρού υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction, PLE)
- Μελέτη χρήσης του παραπροϊόντος μελισσόχορτου ως πρόσθετο σε τρόφιμα ή ποτά, ως αντιμικροβιακό παράγοντα σε ενεργές συσκευασίες ή για την συντήρηση προϊόντων τροφίμων, όπως τα κρεατοσκευάσματα

7. Βιβλιογραφία

Alara, O.R., Abdurahman, N.H. and Ukaegbu, C.I. (2021) ‘Extraction of phenolic compounds: A review’, *Current Research in Food Science*, 4, pp. 200–214. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>.

Alijaniha, F. *et al.* (2015) ‘Heart palpitation relief with *Melissa officinalis* leaf extract: Double blind, randomized, placebo controlled trial of efficacy and safety’, *Journal of Ethnopharmacology*, 164, pp. 378–384. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.007>.

Andrés, M.F. *et al.* (2018) ‘Nematicidal potential of hydrolates from the semi industrial vapor-pressure extraction of Spanish aromatic plants’, *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), pp. 29834–29840. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9429-z>.

Ashori, A., Hamzeh, Y. and Amani, F. (2011) ‘Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Stalk: Chemical Composition and Fiber Morphology’, *Journal of Polymers and the Environment*, 19(1), pp. 297–300. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10924-010-0279-8>.

Avram, M. *et al.* (2014) ‘Extraction of vegetable oils from ground seeds by percolation techniques’, *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 76(2), pp. 13–22.

Barbosa-Pereira, L. *et al.* (2014) ‘Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef’, *Meat Science*, 97(2), pp. 249–254. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.006>.

Bonilla, J. and Sobral, P.J.A. (2016) ‘Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts’, *Food Bioscience*, 16, pp. 17–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.07.003>.

‘Box–Behnken design’ (2023) *Wikipedia*. Available at: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Box%E2%80%93Behnken_design&oldid=1150349986 (Accessed: 8 June 2023).

Brahmi, F. *et al.* (2022) ‘Optimization of the conditions for ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. flowers and comparison with conventional procedures’, *Industrial Crops and Products*, 184, p. 114977. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114977>.

Camo, J. *et al.* (2011) ‘Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract’, *Meat Science*, 88(1), pp. 174–178. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.019>.

Carpentieri, S. *et al.* (2022) ‘Pulsed Electric Field-Assisted Extraction of Aroma and Bioactive Compounds From Aromatic Plants and Food By-Products’, *Frontiers in Nutrition*, 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.792203> (Accessed: 18 May 2023).

Carrera, C. *et al.* (2012) ‘Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes’, *Analytica Chimica Acta*, 732, pp. 100–104. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>.

Cases, J. *et al.* (2011) ‘Pilot trial of *Melissa officinalis* L. leaf extract in the treatment of volunteers suffering from mild-to-moderate anxiety disorders and sleep disturbances’, *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 4(3), pp. 211–218. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12349-010-0045-4>.

Chávez-González, M.L. *et al.* (2020) ‘Conventional and Emerging Extraction Processes of Flavonoids’, *Processes*, 8(4), p. 434. Available at: <https://doi.org/10.3390/pr8040434>.

Chemat, F. *et al.* (2017) ‘Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review’, *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, pp. 540–560. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>.

Christaki, S. *et al.* (2022) 'Bioactive Profile of Distilled Solid By-Products of Rosemary, Greek Sage and Spearmint as Affected by Distillation Methods', *Molecules*, 27(24). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules27249058>.

Costa, D.C. *et al.* (2015) 'Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications', *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), pp. 336–354. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.009>.

Dastmalchi, K. *et al.* (2008) 'Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract', *LWT*, 41(3), pp. 391–400. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.007>.

DeRango-Adem, E.F. and Blay, J. (2021) 'Does Oral Apigenin Have Real Potential for a Therapeutic Effect in the Context of Human Gastrointestinal and Other Cancers?', *Frontiers in Pharmacology*, 12. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.681477> (Accessed: 24 August 2023).

de Elguea-Culebras, G.O., Bravo, E.M. and Sánchez-Vioque, R. (2022) 'Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market – A review', *Industrial Crops and Products*, 175, p. 114261. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114261>.

Espada-Bellido, E. *et al.* (2018) 'Alternative Extraction Method of Bioactive Compounds from Mulberry (*Morus nigra* L.) Pulp Using Pressurized-Liquid Extraction', *Food Analytical Methods*, 11(9), pp. 2384–2395. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1218-x>.

Faustino, M. *et al.* (2019) 'Agro-Food Byproducts as a New Source of Natural Food Additives', *Molecules*, 24(6), p. 1056. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules24061056>.

García-Sarrió, M.J. *et al.* (2018) 'A new method for microwave assisted ethanolic extraction of *Mentha rotundifolia* bioactive terpenoids', *Electrophoresis*, 39(15), pp. 1957–1965. Available at: <https://doi.org/10.1002/elps.201800115>.

Gil-Martín, E. *et al.* (2022) 'Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products', *Food Chemistry*, 378, p. 131918. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131918>.

Gündüz, M., Çiçek, Ş.K. and Topuz, S. (2023) 'Extraction and optimization of phenolic compounds from butterbur plant (*Petasites hybridus*) by ultrasound-assisted extraction and determination of antioxidant and antimicrobial activity of butterbur extracts', *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 35, p. 100491. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2023.100491>.

Hać-Szymańczuk, E. *et al.* (2019) 'Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) preparations during storage of low-pressure mechanically separated meat (BAADER meat) from chickens', *Food Science and Biotechnology*, 28(2), pp. 449–457. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0491-1>.

Ivanova, V. and Trendafilova, A. (2022) 'OPTIMIZATION OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM INULA BRITANNICA L. USING THE BOX-BEHNKEN DESIGN', *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 41(1), pp. 111–117. Available at: <https://doi.org/10.20450/mjcce.2022.2483>.

Jafari, F. *et al.* (2018) 'Comparison of the Effects of Green Tea and Melissa Officinalis on Weight and Blood Pressure in Welders: A Single-blind, Crossover Clinical Trial', *Journal of Nutrition and Food Security*, 3(3), pp. 130–138.

Kritsi, E. *et al.* (2023) 'Potential Health Benefits of Banana Phenolic Content during Ripening by Implementing Analytical and In Silico Techniques', *Life*, 13(2), p. 332. Available at: <https://doi.org/10.3390/life13020332>.

López, G.G., Brousse, M.M. and Linares, A.R. (2023) 'Kinetic modelling of total phenolic compounds from *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) leaves: Conventional and ultrasound assisted extraction', *Food and Bioproducts Processing*, 139, pp. 75–88. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.03.003>.

Mahmudati, N., Wahyono, P. and Djunaedi, D. (2020) 'Antioxidant activity and total phenolic content of three varieties of Ginger (*Zingiber officinale*) in decoction and

infusion extraction method’, in. *Journal of Physics: Conference Series*. Available at: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1567/2/022028>.

Makris, D.P. and Lalas, S. (2020) ‘Glycerol and Glycerol-Based Deep Eutectic Mixtures as Emerging Green Solvents for Polyphenol Extraction: The Evidence So Far’, *Molecules*, 25(24), p. 5842. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25245842>.

Manousaki, A. *et al.* (2016) ‘Extraction of Antioxidant Phenolics from Agri-Food Waste Biomass Using a Newly Designed Glycerol-Based Natural Low-Transition Temperature Mixture: A Comparison with Conventional Eco-Friendly Solvents’, *Recycling*, 1(1), pp. 194–204. Available at: <https://doi.org/10.3390/recycling1010194>.

Mascoloti Spréa, R. *et al.* (2022) ‘Comparative study on the phenolic composition and in vitro bioactivity of medicinal and aromatic plants from the Lamiaceae family’, *Food Research International*, 161, p. 111875. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111875>.

Matini, S. *et al.* (2020) ‘Optimization of Ultrasound Assisted and Maceration Extraction of Bioactive Compounds of Sardasht Black Grape residue by using Response Surface Methodology’, *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 17(98), pp. 147–158. Available at: <https://doi.org/10.29252/fsct.17.01.13>.

Muniz, G.L., Pereira, M.D.S. and Borges, A.C. (2021) ‘Dairywastewater treatment with organic coagulants: A comparison of factorial designs’, *Water (Switzerland)*, 13(16). Available at: <https://doi.org/10.3390/w13162240>.

Ötleş, S. (ed.) (2009) *Handbook of food analysis instruments*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Peñalvo, G.C. *et al.* (2016) ‘Improving green enrichment of virgin olive oil by oregano. Effects on antioxidants’, *Food Chemistry*, 197, pp. 509–515. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.002>.

Plant Extracts Market Industry Analysis | Types, Advantages, and Forecast (no date) *MarketsandMarkets*. Available at: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/plant-extracts-market-942.html> (Accessed: 6 June 2023).

Prajapati, P., Patel, M. and Shah, S. (2021) 'A robust high-performance thin-layer chromatography method for the simultaneous estimation of chlorthalidone and metoprolol succinate using quality risk assessment and design of experiments-based enhanced analytical quality by design approach', *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 34(3), pp. 229–242. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00764-021-00107-7>.

Prajapati, P., Patel, S. and Mishra, A. (2020) 'Simultaneous estimation of azilsartan medoxomil and chlorthalidone by chromatography method using design of experiment and quality risk management based quality by design approach', *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 33(6), pp. 631–646. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00764-020-00067-4>.

Saccardo, A. *et al.* (2023) 'Droop model identification via model-based design of experiments to describe microalgae nitrogen uptake in continuous photobioreactors', *Chemical Engineering Journal*, 468, p. 143577. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.143577>.

Saha, A. and Basak, B.B. (2020) 'Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants', *Industrial Crops and Products*, 145, p. 111979. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111979>.

Samarth, R.M., Samarth, M. and Matsumoto, Y. (2017) 'Medicinally important aromatic plants with radioprotective activity', *Future Science OA*, 3(4), p. FSO247. Available at: <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0061>.

Sánchez-Escalante, A. *et al.* (2003) 'Antioxidant Action of Borage, Rosemary, Oregano, and Ascorbic Acid in Beef Patties Packaged in Modified Atmosphere', *Journal of Food Science*, 68(1), pp. 339–344. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14162.x>.

Scholey, A. *et al.* (2014) 'Anti-stress effects of lemon balm-containing foods', *Nutrients*, 6(11), pp. 4805–4821. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu6114805>.

Sebranek, J.G. *et al.* (2005) 'Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage', *Meat Science*, 69(2), pp. 289–296. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.010>.

Shakeri, A., Sahebkar, A. and Javadi, B. (2016) 'Melissa officinalis L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology', *Journal of Ethnopharmacology*, 188, pp. 204–228. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>.

Shehata, E. *et al.* (2015) 'Extraction optimisation using water/glycerol for the efficient recovery of polyphenolic antioxidants from two Artemisia species', *Separation and Purification Technology*, 149, pp. 462–469. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.06.017>.

Shi, J. *et al.* (2005) 'Extraction of Polyphenolics from Plant Material for Functional Foods—Engineering and Technology', *Food Reviews International*, 21(1), pp. 139–166. Available at: <https://doi.org/10.1081/FRI-200040606>.

Shimotori, Y. *et al.* (2020) 'Enzyme-assisted extraction of bioactive phytochemicals from Japanese peppermint (*Mentha arvensis* l. cv. "hokuto")', *Journal of Oleo Science*, 69(6), pp. 635–642. Available at: <https://doi.org/10.5650/jos.ess19181>.

Skendi, A. *et al.* (2022) 'Phenolic extracts from solid wastes of the aromatic plant essential oil industry: Potential uses in food applications', *Food Chemistry Advances*, 1, p. 100065. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100065>.

Souza, A.P.F. *et al.* (2021) 'Analysis of insecticide residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using QuEChERS optimized by the Plackett Burman design', *CYTA - Journal of Food*, 19(1), pp. 326–332. Available at: <https://doi.org/10.1080/19476337.2021.1901785>.

Taghouti, I. *et al.* (2022) 'The Market Evolution of Medicinal and Aromatic Plants: A Global Supply Chain Analysis and an Application of the Delphi Method in the Mediterranean Area', *Forests*, 13(5), p. 808. Available at: <https://doi.org/10.3390/f13050808>.

Tamborrino, A. *et al.* (2022) 'Continuous pulsed electric field pilot plant for olive oil extraction process', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 82, p. 103192. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103192>.

Thomas, D.A., Virtanen, T. and Wiebe, M.G. (2018) 'Soxhlet extraction of mucic acid from fungal biomass', *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 53(6), pp. 903–909. Available at: <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1407789>.

Ullah, S. *et al.* (2023) 'Response Surface Methodology-Based Optimized Ultrasonic-Assisted Extraction and Characterization of Selected High-Value Components from Gemlik Olive Fruit', *Chemistry and Biodiversity*, 20(7). Available at: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300107>.

Use of rosemary extracts as a food additive - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food | EFSA (2008). Available at: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/721> (Accessed: 24 August 2023).

Vergara, H., Cózar, A. and Rubio, N. (2020) 'Effect of adding of different forms of oregano (*Origanum vulgare*) on lamb meat burgers quality during the storage time', *CYTA - Journal of Food*, 18(1), pp. 535–542. Available at: <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1794981>.

What is a designed experiment? (no date). Available at: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/basics/what-is-a-designed-experiment/> (Accessed: 8 June 2023).

Xue, H. *et al.* (2021) 'Optimization ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from cranberry using response surface methodology coupled with genetic algorithm and identification anthocyanins with HPLC-MS²', *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(7). Available at: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15378>.

Yu, L. *et al.* (2002) 'Rosemary Extracts as Inhibitors of Lipid Oxidation and Color Change in Cooked Turkey Products During Refrigerated Storage', *Journal of Food Science*, 67(2), pp. 582–585. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10642.x>.

Yu, M. *et al.* (2019) 'Response surface method was used to optimize the ultrasonic assisted extraction of flavonoids from *Crinum asiaticum*', *Saudi Journal of Biological*

Sciences, 26(8), pp. 2079–2084. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.09.018>.

Zeraatpishe, A. *et al.* (2011) ‘Effects of *Melissa officinalis* L. on oxidative status and DNA damage in subjects exposed to long-term low-dose ionizing radiation’, *Toxicology and Industrial Health*, 27(3), pp. 205–212. Available at:
<https://doi.org/10.1177/0748233710383889>.

Ziagova, M.G. *et al.* (2022) ‘Total phenolic content and antioxidant capacity of Greek medicinal and aromatic plant extracts using pulsed electric field followed by ultrasounds extraction process’, *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(7), p. e16639. Available at: <https://doi.org/10.1111/jfpp.16639>.