



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από παραπροϊόντα του αρωματικού φυ-
τού *Salvia rosmarinus* (δενδρολίβανου) με χρήση μοντέλων πειραματικού
σχεδιασμού**



Όνομα φοιτήτριας
Κανιούρα Αικατερίνη

Όνομα εισηγήτριας
Στρατή Ειρήνη

ΑΙΓΑΛΕΩ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2024



School of Food Sciences
Department of Food Science and Technology

THESIS

Extraction of phenolic compounds from by-products of the aromatic plant *Salvia rosmarinus* (rosemary) using experimental design models



Name of Student

Kanioura Aikaterini

Name of Supervisor

Strati Eirini

AIGALEO, MARCH 2024

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο ‘Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από παραπροϊόντα του αρωματικού φυτού *Salvia rosmarinus* (δεντρολίβανου) με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού’ που παρουσιάστηκε από την Κατιούρα Αικατερίνη και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

ΕΙΡΗΝΗ ΣΤΡΑΤΗ

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

ΣΙΝΑΝΟΓΛΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΑ

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

ΤΣΙΑΚΑ ΘΑΛΕΙΑ

Δήλωση Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κανιούρα Αικατερίνη του Ευάγγελου, με αριθμό μητρώου 17032 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστήμων Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα 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, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Κανιούρα Αικατερίνη



Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή εργασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της. Ειδικότερα, ευχαριστώ θερμά το διδακτικό και ερευνητικό προσωπικό, κυρίως την επίκουρη καθηγήτρια Δρ. Ειρήνη Στρατή και την επίκουρη καθηγήτρια Δρ. Θάλεια Τσιάκα για την πολύτιμη καθοδήγηση, βοήθεια και υποστήριξή τους με σκοπό την περάτωση της εργασίας. Επιπλέον, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τον σύντροφό μου για την απaráμιλλη στήριξη που μου προσέφεραν καθ' όλη την περίοδο των σπουδών μου.

Περίληψη

Τα αρωματικά φυτά είναι γνωστά από την αρχαιότητα για την θεραπευτική τους ιδιότητα και την συμβολή τους στον τομέα της φαρμακευτικής, της διατροφής και της αισθητικής. Διαθέτουν αυτά τα χαρακτηριστικά λόγω της περιεκτικότητάς τους σε βιοενεργές ενώσεις, ειδικότερα σε φαινολικές ενώσεις και πτητικά συστατικά. Η βιολογική δράση τους τα καθιστά κατάλληλα αντιοξειδωτικά, ως φυσικά εναλλακτικά των αντίστοιχων συνθετικών. Χρησιμοποιούνται σε νωπή ή ξηρή μορφή, ως εκχυλίσματα και ως αιθέρια έλαια. Στην παρούσα εργασία, ερευνήθηκε η αξιοποίηση των στερεών αποβλήτων, από την διαδικασία εκχύλισης αιθέριων ελαίων δενδρολίβανου (*Salvia rosmarinus*) μέσω της απόσταξης ατμού, για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων. Εκχυλίσματα από δείγματα φύλλων δενδρολίβανου, κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου και φύλλων παραπροϊόντων δενδρολίβανου εξετάστηκαν ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) μέσω της μεθόδου Folin - Ciocalteu, ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα με την μέθοδο FRAP και ως προς την ικανότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας με την μέθοδο ABTS^{•+}. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική εκχύλισης με υπερήχους (UAE). Η διεργασία βελτιστοποιήθηκε με το μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού Box - Behnken, με σκοπό την εύρεση των παραμέτρων που αποδίδουν στην μέγιστη παραλαβή φαινολικών ενώσεων. Οι παράμετροι μέγιστης ανάκτησης πολυφαινολών ήταν: Περιεκτικότητα αιθανόλης 100% w/w, χρόνος εκχύλισης 40 min, ισχύς υπερήχων 80% W και αναλογία διαλύτη/ξηρού δείγματος 38.59 mL/g. Σε αυτές τις συνθήκες, τα αποτελέσματα των δειγμάτων δενδρολίβανου για τις μεθόδους F-C, FRAP και ABTS^{•+} ήταν: 12.88±0.08 mg GAE/g ξηρού δείγματος, 5.37±0.12 mg Fe⁺²/g ξηρού δείγματος και 24.31±0.15 mg TE/g ξηρού δείγματος (φύλλα δενδρολίβανου), 13.08±0.68mg GAE/g ξηρού δείγματος, 26.16±0.11 mg Fe⁺²/g ξηρού δείγματος και 72.44±3.57 mg TE/g ξηρού δείγματος (κονιοποιημένα φύλλα δενδρολίβανου), 6.68±0.47 mg GAE/g ξηρού δείγματος, 7.03±0.08 mg Fe⁺²/g ξηρού δείγματος και 29.06±0.63 mg TE/g ξηρού δείγματος (φύλλα παραπροϊόντων δενδρολίβανου) αντίστοιχα. Τέλος, τα αποτελέσματα των δειγμάτων εξετάστηκαν ως προς την συσχέτισή τους με τον δείκτη Pearson Correlation Coefficient, όπου είχαν θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους, με $r > 0.8$, εκτός από την συσχέτιση TPC - ABTS^{•+} ($r = 0.41$). Συμπερασματικά, τα παραπροϊόντα δενδρολίβανου έχουν επαρκή αντιοξειδωτική δράση για την χρήση τους στην βιομηχανία τροφίμων.

Λέξεις – Κλειδιά: Αρωματικά φυτά, δενδρολίβανο, *Salvia rosmarinus*, παραπροϊόντα, στερεά απόβλητα, εκχύλιση, βιοενεργές ενώσεις, φαινολικές ενώσεις, ολικό φαινολικό περιεχόμενο, αντιοξειδωτική δράση, πειραματικός σχεδιασμός

Abstract

Aromatic plants have been known since ancient times for their therapeutic properties and their contribution to the fields of medicine, nutrition and cosmetics. They possess these characteristics due to their content of bioactive compounds, especially phenolic compounds and volatile components. Their biological action makes them suitable antioxidants, as natural alternatives to the synthetic equivalents. They are used in fresh or dry form, as extracts and as essential oils. In the present work, the utilization of the solid residues of rosemary (*Salvia rosmarinus*), from the process of extracting essential oils by way of steam distillation, was investigated for phenolic compounds obtainment. Extracts from samples of rosemary leaves, powdered rosemary leaves and leaves of rosemary by-products were tested for total phenolic content (TPC) with the Folin - Ciocalteu method, antioxidant capacity with the FRAP method and free radical scavenging capacity with the ABTS•⁺ method. The extraction was carried out with the Ultrasound Assisted Extraction (UAE) technique. It was optimised with the experimental design model Box - Behnken, in order to find the parameters resulting in the maximum recovery of phenolic compounds. The parameters of maximum extraction of polyphenols were: Ethanol content 100% w/w, extraction time 40 min, ultrasound power 80% W and solvent/dry sample ratio 38.59 mL/g. Under these conditions, the results of rosemary samples for the F-C, FRAP and ABTS•⁺ methods were: 12.88±0.08 mg GAE/g dry sample, 5.37±0.12 mg Fe⁺²/g dry sample and 24.31±0.15 mg TE/g dry sample (rosemary leaves), 13.08±0.68mg GAE/g dry sample, 26.16±0.11 mg Fe⁺²/g dry sample and 72.44±3.57 mg TE/g dry sample (powdered rosemary leaves), 6.68±0.47 mg GAE/g dry sample, 7.03±0.08 mg Fe⁺²/g dry sample and 29.06±0.63 mg TE/g dry sample (leaves of rosemary by-products) respectively. Finally, the results of the samples were examined for their correlation with Pearson Correlation Coefficient (PCC). They had a positive linear correlation with each other, with $r > 0.8$, except for the TPC-ABTS•⁺ correlation ($r = 0.41$). In conclusion, rosemary by-products have sufficient antioxidant activity for their use in the food industry.

Keywords: Aromatic plants, rosemary, *Salvia rosmarinus*, by-products, solid waste, extraction, bioactive compounds, phenolic compounds, total phenolic content, antioxidant activity, experimental design

Πίνακας Περιεχομένων

Δήλωση Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας	5
Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract.....	9
Εισαγωγή	13
Κεφάλαιο 1: Τα αρωματικά φυτά και τα παραπροϊόντα τους	15
1.1 Αρωματικά φυτά	15
1.1.1 Εισαγωγή.....	15
1.1.2 Αξιοποίηση αρωματικών φυτών.....	16
1.1.2.1 Δευτερεύοντες μεταβολίτες	16
1.1.2.2 Χρήσεις αρωματικών φυτών	17
1.1.3 Αιθέρια έλαια	18
1.1.3.1 Χημικό προφίλ.....	18
1.1.3.2 Παραλαβή αιθέριων ελαίων	18
1.2 Παραπροϊόντα αρωματικών φυτών.....	21
1.2.1 Εισαγωγή.....	21
1.2.2 Φαινολικά συστατικά βιομάζας αρωματικών φυτών.....	22
1.2.3 Αξιοποίηση στερεών αποβλήτων αρωματικών φυτών.....	23
1.3 Δενδρολίβανο	24
1.3.1 Γενικά στοιχεία	24
1.1.2 Φυτοχημικό προφίλ	25
1.1.3 Χρήσεις δενδρολίβανου	26
1.2 Παραπροϊόντα δενδρολίβανου.....	26
1.2.1 Φυτικοχημική σύσταση	26
1.2.2 Εκχύλιση παραπροϊόντων δενδρολίβανου.....	29
1.2.3 Χρήση παραπροϊόντων δενδρολίβανου στην βιομηχανία τροφίμων	30
Κεφάλαιο 2: Φαινολικές ενώσεις	31
2.1 Δομή	31
2.1.1 Φλαβονοειδή.....	31
2.1.2 Φαινολικά οξέα.....	34
2.1.3 Κουρκουμινοειδή.....	35
2.1.4 Στιλβеноειδή.....	35
2.1.5 Λιγνάνες	36
2.1.6 Ταννίνες.....	37
2.2 Πηγές φαινολικών ουσιών	39
2.3 Δράση φαινολικών ουσιών.....	39
2.4 Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ενώσεων.....	40
2.4.1 Οξείδωση	40

2.4.1.1	Ελεύθερες ρίζες	40
2.4.1.2	Οξειδωτική τάγγιση	41
2.4.2	Αντιοξειδωτικές βιοφαινόλες	43
2.4.2.1	Κατηγορίες αντιοξειδωτικών	44
2.4.2.2	Αντιοξειδωτικά ως πρόσθετα τροφίμων	45
2.4.2.3	Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης	46
2.4.2.4	Μέθοδοι εκχύλισης αντιοξειδωτικών	47
Κεφάλαιο 3:	Εκχύλιση φαινολικών ουσιών από αρωματικά φυτά	48
3.1	Προσέγγιση της εκχύλισης	48
3.2	Κλασικές τεχνικές εκχύλισης	49
3.2.1	Απόσταξη ατμού (<i>Steam Distillation, SD</i>)	49
3.2.2	Υδροαπόσταξη (<i>Hydrodistillation, HD</i>)	50
3.2.3	Εκχύλιση με διαλύτη - Εκχύλιση Soxhlet (<i>Soxhlet Extraction, SS</i>)	50
3.2.4	Διαβροχή (<i>Maceration</i>)	51
3.3	Σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης	51
3.3.1	Εκχύλιση με μικροκύματα (<i>Microwave Assisted Extraction, MAE</i>)	51
3.3.2	Εκχύλιση με υπερήχους (<i>Ultrasound Assisted Extraction, UAE</i>)	51
3.3.3	Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (<i>Supercritical Fluid Extraction, SFE</i>)	52
3.3.4	Εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού (<i>Pressurized Liquid Extraction PLE</i>)	53
3.3.5	Εκχύλιση με ένζυμα (<i>Enzyme Assisted Extraction, EAE</i>)	53
3.3.6	Εκχύλιση με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (<i>Pulsed-Electric Field Extraction, PEF</i>)	53
Κεφάλαιο 4:	Πειραματικός σχεδιασμός (<i>Design of Experiments, DOE</i>)	55
4.1	Γενικά στοιχεία	55
4.2	Μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης – Response Surface Methodology (RSM)	55
4.3	Σχεδιασμός Box – Behnken (Box – Behnken Design, BBD)	57
4.3	Στατιστική ανάλυση δεδομένων	58
Κεφάλαιο 5:	Υλικά και μεθοδολογία	59
5.1	Προετοιμασία του δείγματος	59
5.2	Υλικά - Όργανα	59
5.3	Διαγράμματα πειραματικής πορείας	60
5.5	Μέθοδος Folin – Ciocalteu για τα 27 δείγματα φύλλων δενδρολίβανου	63
5.6	Πειραματικός Σχεδιασμός – Στατιστική Ανάλυση	64
5.7	Μέθοδος FRAP	65
5.8	Μέθοδος ρίζας ABTS• ⁺ [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid)]	66
Κεφάλαιο 6:	Αποτελέσματα και συζήτηση	68
6.1	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin – Ciocalteu για τα 27 δείγματα φύλλων δενδρολίβανου	68
6.2	Στατιστική ανάλυση	70
6.2.1	Ανάλυση Διακύμανσης ANOVA στα 27 δείγματα φύλλων δενδρολίβανου	70
6.2.2	Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών	82

6.3 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin – Ciocalteu με τις προβλεπόμενες βέλτιστες συνθήκες	83
6.4 Προσδιορισμός της αναγωγικής ισχύος / αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)	87
6.5 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS• ⁺ [2,2'-Azino-Bis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonicacid)].....	88
6.6 Συσχέτιση αποτελεσμάτων μεθόδων Folin - Ciocalteu, FRAP και ABTS• ⁺	89
Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα -Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	93
7.1 Συμπεράσματα	93
7.2 Μελλοντική έρευνα.....	95
Βιβλιογραφία	97
Ελληνική βιβλιογραφία	97
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	97
Πηγές εικόνων	105
Πηγές πινάκων.....	107

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η ανάγκη αξιοποίησης των παραπροϊόντων από βιομηχανίες κατά την επεξεργασία των πρώτων υλών. Η εναπομένουσα βιομάζα είναι συνήθως ιδανική για περαιτέρω κατεργασία, αποφέροντας περισσότερα προϊόντα και κέρδος. Η συνειδητή στροφή προς περιβαλλοντικά φιλικές και βιώσιμες πρακτικές προϋποθέτει την χρήση οικολογικών μεθόδων και υλών για την επίτευξη αυτού του σκοπού.

Συγκεκριμένα, η επεξεργασία αρωματικών φυτών για την παραγωγή αιθέριων ελαίων μέσω απόσταξης παράγει μεγάλες ποσότητες αποβλήτων συγκριτικά με τα παραγόμενα έλαια. Τα απόβλητα αυτά είναι στερεά υπολείμματα, απόνερα και αποστάγματα νερού με φυτική ύλη τα οποία αποτελούν πηγές βιοενεργών ενώσεων. Η χρήση τους επεκτείνεται στους τομείς της γεωργίας, της κτηνοτροφίας, της φαρμακευτικής, της αισθητικής και της τεχνολογίας τροφίμων ως πρώτες ύλες ή ως συμπληρώματα αυτών.

Το φυτοχημικό προφίλ των αρωματικών φυτών πριν από μια μηχανική, χημική και φυσική κατεργασία διαφέρει αρκετά από το προφίλ αυτών μετά. Κατά την απόσταξη πραγματοποιούνται αντιδράσεις όπως η υδρόλυση και η οξείδωση, οι οποίες επιφέρουν αλλαγές στις περιεχόμενες ενώσεις. Η χρήση συγκεκριμένων τεχνικών εκχύλισης και διαλυτών επηρεάζουν την τελική σύσταση των προϊόντων. Επομένως, σε αυτή την εργασία μελετήθηκαν τα εκχυλίσματα φύλλων δενδρολίβανου και φύλλων παραπροϊόντος δενδρολίβανου ως προς το φαινολικό περιεχόμενό τους, μέσω της εκχύλισης με υπερήχους (UAE). Η τεχνική UAE έχει γίνει κοινώς αποδεκτή ως οικονομική, οικολογική και αποτελεσματική μέθοδος για την παραλαβή βιοενεργών ουσιών, καταναλώνοντας λιγότερες ποσότητες ενέργειας και διαλύτη συγκριτικά με άλλες τεχνικές εκχύλισης. Ως διαλύτες επιλέχτηκαν το απιονισμένο νερό και η αιθανόλη, έχοντας χαμηλή τοξικότητα και δυνατότητα χρήσης στην βιομηχανία τροφίμων αφού είναι ασφαλείς για κατανάλωση.

Η εκχύλιση με UAE βελτιστοποιήθηκε με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και με τον πειραματικό σχεδιασμό (Design of Experiments, DOE), όπου το πειραματικό μοντέλο προέβλεψε τις βέλτιστες συνθήκες για την παραλαβή μέγιστων ποσοτήτων φαινολικών ενώσεων από τα δείγματα δενδρολίβανου. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στους παράγοντες που επηρέασαν περισσότερο την παραλαβή του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) των δειγμάτων δενδρολίβανου, καθώς έτσι διαμορφώθηκαν οι συνθήκες επίτευξης ενός συνδυασμού μέγιστου TPC και χαμηλότερου δυνατού χρόνου, κόστους και ενέργειας για μελλοντικές χρήσεις.

Πέρα από την περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, τα αρωματικά φυτά έχουν αντιοξειδωτικές και αντιριζικές ιδιότητες, οπότε έγινε ανάλυση των δράσεων αυτών στα δείγματα δενδρολίβανου με τις κατάλληλες μεθόδους (Folin - Ciocalteu, FRAP και ABTS•⁺).

Η γραμμική συσχέτιση των μεθόδων από τον δείκτη Pearson Correlation Coefficient είναι θετική, έχοντας υψηλό δείκτη μεταξύ τους, $r > 0.80$, εκτός από την συσχέτιση TPC-ABTS•⁺ ($r = 0.41$).

Έχοντας αναλύσει και συγκρίνει τα αποτελέσματα μεταξύ των φύλλων δενδρολίβανου και φύλλων παραπροϊόντος δενδρολίβανου, εξάχθηκαν συμπεράσματα όσον αφορά την πιθανή εκμετάλλευση των στερεών αποβλήτων του αρωματικού φυτού σε βιομηχανικό επίπεδο, ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες σε προϊόντα τροφίμων.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η παραλαβή και η ανάλυση των βιοδραστικών ενώσεων, ειδικότερα των φαινολικών ενώσεων, που μπορούν να εξαχθούν από αποσμημένα στερεά απόβλητα δενδρολίβανου. Η εξέταση αξιοποίησης των υπολειμμάτων από τις παραπάνω βιομηχανίες έχει πραγματοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό, για την βιώσιμη χρήση τους σε περαιτέρω τομείς. Λαμβάνοντας υπόψη την τωρινή βιβλιογραφία, ελάχιστες έρευνες έχουν λάβει μέρος για την αξιολόγηση των παραπροϊόντων δενδρολίβανου από απόσταξη ατμού ως προς την αντιοξειδωτική τους ιδιότητα, χρησιμοποιώντας τεχνικές εκχύλισης υψηλής ενέργειας. Ακόμα λιγότερες είναι οι έρευνες που κάνουν χρήση του πειραματικού μοντέλου Box - Behnken για την βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης, με σκοπό την μεγιστοποίηση της παραλαβής των φαινολικών ενώσεων.

Κεφάλαιο 1: Τα αρωματικά φυτά και τα παραπροϊόντα τους

1.1 Αρωματικά φυτά

1.1.1 Εισαγωγή

Με τον όρο αρωματικά φυτά χαρακτηρίζονται τα φυτά που χρησιμοποιούνται για την αρωματική τους ιδιότητα. Είναι γνωστά ως θεραπευτικά και αρωματικά φυτά (Medicinal and Aromatic Plants) ή θεραπευτικά βότανα, λόγω της θεραπευτικής τους ικανότητας (Rodino S. και Butu M., 2019).

Ιστορικά, τα θεραπευτικά και αρωματικά φυτά είχαν, και εξακολουθούν να έχουν, σημαντική θέση σε κάθε πολιτισμό παγκοσμίως, στους τομείς της μαγειρικής, της φαρμακευτικής, της αισθητικής και της επιστήμης τροφίμων. Η αρχαιότερη γραπτή αναφορά χρήσης των φυτών χρονολογείται περίπου 5000 χρόνια πριν, σε μια Σουμεριακή πήλινη πινακίδα από την Ναγκπούρ, όπου αναγράφονται φαρμακευτικές συνταγές (Solomou κ.ά., 2016).

Η ελληνική χλωρίδα διαθέτει πολλά είδη αρωματικών φυτών, παραδείγματα αυτών εμφανίζονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 Αρωματικά φυτά στην Ελλάδα

<i>Sideritis sp.</i>	<i>Pimbinella anisum</i>	<i>Mentha sp.</i>
<i>Origanum sp.</i>	<i>Origanum dictamnus</i>	<i>Lepidium sp.</i>
<i>Crocus sp.</i>	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Phacelia tanacetifolia</i>
<i>Salvia sp.</i>	<i>Origanum majorana</i>	<i>Phoeniculum vulgare</i>
<i>Jasminum officinalis</i>	<i>Lavandula spica</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
<i>Sinapis sp.</i>	<i>Matricaria chamomila</i>	<i>Thymus sp.</i>
<i>Hypericum perforatum</i>	<i>Urtica sp.</i>	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
<i>Aloysia citriodora</i>	<i>Crithmum maritimum</i>	<i>Cuminum cyminum</i>
<i>Mentha viridis</i>	<i>Coriandrum sativum</i>	<i>Ocimum basilicum</i>

Πηγή: Solomou κ.ά., 2016

1.1.2 Αξιοποίηση αρωματικών φυτών

Τα αρωματικά φυτά φαίνεται να έχουν μεγάλη ζήτηση στην αγορά, καθώς σύμφωνα με τους [Rodino S. και Butu M. 2019](#), διακινούνται περίπου 3000 διαφορετικά είδη αρωματικών βοτάνων παγκοσμίως. Η αυξημένη παραγωγή και χρήση τους βασίζεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε δευτερεύοντες μεταβολίτες.

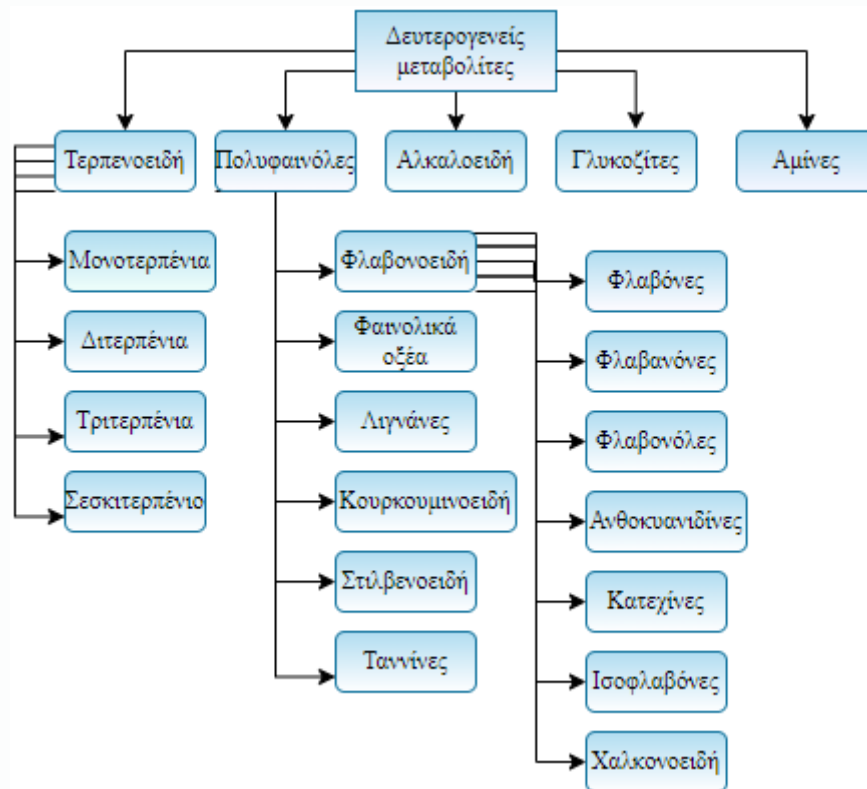
1.1.2.1 Δευτερεύοντες μεταβολίτες

Τα φυτικά προϊόντα έχουν τους κατάλληλους μηχανισμούς για την προστασία και την ευημερία τους. Οι πρωτεύοντες μεταβολίτες, οι οποίοι είναι οι υδρογονάνθρακες, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τα αμινοξέα, τα νουκλεοτίδια και τα οργανικά οξέα, είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των φυτών και τις μεταβολικές διεργασίες τους. Οι δευτερεύοντες μεταβολίτες βοηθούν στην προσαρμοστικότητα των φυτών στο περιβάλλον τους, χωρίς των οποίων θα κινδύνευε η επιβίωσή τους ([Croteau R. κ.ά. 2000](#); [Rodino S. και Butu M., 2019](#)).

Οι δευτερεύοντες μεταβολίτες, γνωστοί και ως φυτοχημικά ή βιοενεργές ενώσεις, είναι πολύτιμες ενώσεις για τους τομείς της φαρμακευτικής, της αισθητικής, της διατροφής, της γεωργίας και της κτηνοτροφίας. Τέτοιες ενώσεις είναι, μεταξύ άλλων, οι πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, ταννίνες), οι βιταμίνες (καροτενοειδή, τοκοφερόλες), τα τερπενοειδή, τα πολυπεπίδια, τα φαινυλοπροπανοειδή και οι κινόνες. Η βιολογική δράση τους δίνει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντιριζική, και αντικαρκινική ενίσχυση, δρώντας ως πιθανοί προληπτικοί και προστατευτικοί παράγοντες ενάντια σε παθήσεις, οξειδώσεις και σε πρόωρη γήρανση ([Christaki κ.ά. 2012](#); [Rodino S. και Butu M., 2019](#)).

Από τους δευτερεύοντες μεταβολίτες, οι πολυφαινόλες είναι από τις πιο αξιοσημείωτες ομάδες ενώσεων. Ως βιοενεργές ενώσεις, περιέχονται σε μεγάλο ποσοστό του συνόλου των φυτικών προϊόντων. Λόγω της ιδιαίτερης προσοχής που έχει δοθεί στα αρωματικά φυτά, μελέτες έχουν ταυτοποιήσει πάνω από 8000 φαινολικές δομές, των οποίων οι μισές είναι τα φλαβονοειδή ([Rodino S. και Butu M., 2019](#)).

Η κατηγοριοποίηση των δευτερευόντων μεταβολιτών παρατίθεται στην [Εικόνα 1.1](#).



Εικόνα 1.1 Κατηγοριοποίηση φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών (Rodino και Butu, 2019)

1.1.2.2 Χρήσεις αρωματικών φυτών

Έχοντας υπόψη τις δυνατότητες των θεραπευτικών και αρωματικών βοτάνων, είναι αναμενόμενη η εκτενής χρήση τους σε διάφορους τομείς ως πρώτες ύλες, αυτούσια ή για παρασκευάσματα και προϊόντα. Στην αγορά, βρίσκονται με την μορφή νωπών και ξηρών φύλλων, μίσχων, λουλουδιών και παράγωγά τους (εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια, ανθόνερα).

Συγκεκριμένα, στον τομέα της φαρμακευτικής, η υγεία του πληθυσμού (προσεγγιστικά το 80% των αναπτυσσόμενων χωρών) βασίζεται σε φυτικά φάρμακα (Christaki κ.ά. 2012). Πέρα από την χρήση βοτάνων για θεραπεία με παραδοσιακούς τρόπους, αξιοποιούνται στην παραγωγή φυσικών ή ημι-συνθετικών φαρμάκων (Solomou κ.ά., 2016). Η δράση τους είναι προληπτική, προστατευτική ή και θεραπευτική ενάντια σε είδη καρκίνου και σε καρδιαγγειακές, αναπνευστικές, φλεγμονώδεις και εντερικές παθήσεις (Christaki κ.ά. 2012; Solomou κ.ά. 2016).

Στον τομέα της αισθητικής, τα εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια ενσωματώνονται στα καλλυντικά για την βελτίωση και την ενίσχυση των ευεργετικών ικανοτήτων τους, καθώς και για την πρόσδοση χρώματος και αρώματος (Solomou κ.ά. 2016).

Όσον αφορά την γεωργία, μερικά βότανα μπορούν να δράσουν ως παρασιτοκτόνα, ενώ στην κτηνοτροφία ως πρόσθετα στις ζωοτροφές για ανάπτυξη των ζώων και βελτίωση των ζωϊκών προϊόντων. Ο αντιμικροβιακός χαρακτήρας τους βοηθά στην ελαχιστοποίηση της χρήσης αντιβιοτικών (Christaki κ.ά. 2012).

Τέλος, στην γαστρονομία και την βιομηχανία τροφίμων, τα αρωματικά φυτά και τα καρυκεύματα προσδίδουν άρωμα και γεύση στα προϊόντα. Η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους ιδιότητα έχουν προστατευτικό ρόλο στα επεξεργασμένα τρόφιμα, δρώντας ως συντηρητικά (Christaki κ.ά. 2012.; Solomou κ.ά. 2016).

1.1.3 Αιθέρια έλαια

Η χρήση των αιθέριων ελαίων λόγω των πολύμορφων δυνατοτήτων τους είναι ευρέως εμφανής. Χρησιμοποιούνται σε ζωοτροφές, ως συντηρητικά και ενισχυτικά γεύσης/οσμής, ως αρώματα και ως φάρμακα (Christaki κ.ά. 2012).

1.1.3.1 Χημικό προφίλ

Τα αιθέρια έλαια είναι ρευστά πτητικά έλαια, με υδροφοβικό χαρακτήρα και μεγάλη συγκέντρωση πολύπλοκων ενώσεων. Είναι λιποδιαλυτά και διαλύονται από οργανικούς διαλύτες χαμηλής πυκνότητας (Christaki κ.ά. 2012).

Η σύστασή τους αποτελείται από πολλές και διαφορετικές ενώσεις, πολικές και μη πολικές, σε ποικίλες ποσότητες. Περιέχουν περίπου 20-60 ενώσεις, από τις οποίες υπάρχουν δύο ή τρεις ως οι κύριες ενώσεις, λόγω της αυξημένης περιεκτικότητάς τους. Οι υπόλοιπες είναι σε απειροελάχιστες ποσότητες. Το κάθε φυτό έχει τις χαρακτηριστικές του κύριες ενώσεις, οι οποίες παρέχουν την βιολογική δράση τους. Αυτές οι ενώσεις είναι δευτερεύοντες μεταβολίτες, κυρίως τερπενοειδή και φαινυλοπροπένια με χαμηλό σημείο βρασμού (Bakkali F. κ.ά. 2008).

1.1.3.2 Παραλαβή αιθέριων ελαίων

Η παραλαβή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί από διάφορα σημεία του φυτού, δηλαδή φύλλα, μίσχοι, λουλούδια, κλαδιά, ρίζες, καρποί, ξύλα, φρούτα και φλοιοί (Bakkali F. κ.ά. 2008; Christaki κ.ά. 2012). Οι κύριες οικογένειες των αρωματικών φυτών θεωρούνται οι *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Brassicaceae*, *Lamiaceae* και *Rosaceae* (Πίνακας 1.2) (Solomou κ.ά.

2016; de Elguea-Culebras κ.ά. 2022). Τα σημαντικότερα συστατικά αιθέριων ελαίων μερικών αρωματικών φυτών παρατίθενται στον Πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.2 Κύριες οικογένειες αρωματικών φυτών, με τα αντίστοιχα γένη και είδη

Οικογένεια	Γένος και είδος
<i>Apiaceae</i>	<i>Anethum graveolens</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Petroselinum crispum</i> , <i>Pimpinella anisum</i>
<i>Asteraceae</i>	<i>Calendula officinalis</i>
<i>Brassicaceae</i>	<i>Brassica spp.</i>
<i>Lamiaceae</i>	<i>Hyssopus officinalis</i> , <i>Lavandula spp.</i> , <i>Melissa officinalis</i> , <i>Mentha spp.</i> , <i>Nigella sativa</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Origanum spp.</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salvia spp.</i> , <i>Satureja spp.</i> , <i>Thymus spp.</i> , <i>Thymbra capitata</i>
<i>Rosaceae</i>	<i>Rosa spp.</i>

Πηγή: de Elguea-Culebras κ.ά. 2022

Η μεθοδολογία και οι συνθήκες απόσταξης και εκχύλισης για την παραλαβή των ελαίων δεν είναι τυποποιημένες για κάθε αρωματικό φυτό. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την χημική δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φυτών διαμορφώνουν την διαδικασία εξαγωγής τους. Επιπλέον, οι περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την ανάπτυξη και την συγκομιδή, καθώς και η επιλογή του μέρους του φυτού επηρεάζουν το αποτέλεσμα. Τα αιθέρια έλαια με την σειρά τους, λόγω της πολύπλοκης και ποικίλης δομής τους, έχουν διαφορετική τελική μορφή αναλόγως της μεθόδου που χρησιμοποιείται και των καταστάσεων που επικρατούν. Επομένως, ανάλογα με τις ανάγκες του τελικού προϊόντος, η παραγωγή αιθέριων ελαίων ακολουθεί διαφορετικές παραμέτρους για την διεκπεραίωσή της (Bakkali F. κ.ά. 2008). Γενικά, οι μέθοδοι που προτιμούνται είναι οι αποστάξεις ατμού ή υδροαποστάξεις. Άλλες μέθοδοι αποτελούν η ψυχρή έκθλιψη, η εκχύλιση με διαλύτες, η εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO₂ και η παραλαβή ελαίων από κορεσμένα λίπη (enfleurage) (Bakkali F. κ.ά., 2008; Bernath J.,2009).

Πίνακας 1.3 Αρωματικά φυτά με τα αντίστοιχα κύρια συστατικά αιθέριων ελαίων τους

Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία	Κύριο συστατικό
Πελαργόνιο ¹	<i>Pelargonium spp.</i>	Λιναλοόλη, ισομενθόνη, κιντρονελλόλη, γερανιόλη
Σιτρονέλα ¹	<i>Cymbopogon spp.</i>	Κιτρονέλλα, κιτρονελλόλη γερανιόλη
Πατσουλί ¹	<i>Pogostemon cabin</i>	Πατσουλόλη, αζουλένιο
Ευκάλυπτος ¹	<i>Eucalyptus spp.</i>	Ευκαλυπτόλη, φελλαδρένιο, πιπεριτόνη
Ίασμος ¹	<i>Jasminum spp.</i>	Οξικός εστέρας βενζυλίου, φυτόλη, ισοφυτόλη
Μάραθο ¹	<i>Foeniculum vulgare</i>	Ανηθόλη, μεθυλική χαβικόλη
Λεβάντα ¹	<i>Lavandula spp.</i>	Οξικός εστέρας λιναλοόλης, βορνεόλη, καμφορά, γερανιόλη
Φασκόμηλο ¹	<i>Salvia officinalis</i>	Θουγιόνη, ευκαλιπτόλη, καμφορά, βορνεόλη
Θυμάρι ¹	<i>Thymus vulgaris</i>	Θυμόλη, καρβακρόλη, βορνεόλη
Κόλιανδρος ¹	<i>Coriandrum sativum</i>	α-λιναλοόλη, γερανιόλη, οξικός εστέρας γερανόλης
Άνηθος ¹	<i>Anethum graveolens</i>	δ-καρβόνη, δ-λιμονένιο, φελλαδρένιο
Άγριο κύμινο ¹	<i>Carum carvy</i>	δ-καρβόνη, λιμονένιο, διϋδροκαρβόνη
Μέντα ¹	<i>Menta piperita</i>	Μενθόλη, μενθόνη, πιπένιο, οξικός μεθυλεστέρας
Δυόσμος ¹	<i>Menta spicata</i>	λ-καρβόνη
Χαμομήλι ¹	<i>Matricaria recutita</i>	Χαμαζουλένιο, α-βισαβολόλη, φαρνεσένιο, οξειδίο της βισαβολόλης
Γεράνιο ²	<i>Pelargonium graveolens</i>	Γερανιόλη, κιτρονελλόλη, λιναλοόλη
Πέπερο ³	<i>Piper spp.</i>	Ελεμόλη, β-καρουφυλλένιο, β-κουβεβένιο, κουβεβόλη
Τειόδεντρο ⁴	<i>Melaleuca alternifolia</i>	γ-τερπινένιο, τερπινεν-4-όλη
Δενδρολίβανο ^{4,6}	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α-πινένιο, 1,8-κιεόλη, καμφορά, καμφένιο
Κιτριά ⁴	<i>Citrus medica</i>	Λιμονένιο
Ωκιμον ⁵	<i>Ocimum spp.</i>	Ευγενόλη, μεθυλική χαβικόλη, καμφορά

Πηγές Sumathykuty M.A κ.ά., 1999³; Bernath .J, 2009¹; ,Inouye S.κ.ά., 2001⁴; Ghorbanpour M. και Hatami M., 2015²; Tak κ.ά., 2016⁶; Maurya S. και Sangwan N.S, 2020⁵

1.1.3.3 Χρήση αιθέριων ελαίων

Η παρουσία φαινολών, αλκοολών και αλδεϋδών στα αιθέρια έλαια τούς προσδίδει την ιδιότητα της κυτταροτοξικότητας, χωρίς να είναι γονιδιοτοξικά. Η ισχύ της δράσης εξαρτάται από την σύσταση του ελαίου, καθιστώντας τα χρήσιμα ενάντια σε παθογόνα και παράσιτα σε ζωντανούς οργανισμούς, σε θαλασσινά και γεωργικά προϊόντα. Επίσης, έχει αναφερθεί η αντιοξειδωτική, αντιοτοξογενική, υπολιπιδαιμική ικανότητα και δράση ως πεπτικό διεγερτικό (Christaki κ.ά., 2012). Η κυτταροτοξικότητα των ελαίων τούς δίνει την δυνατότητα να έχουν προοξειδωτικό ρόλο, συνεπώς αντισηπτικό και αντιμικροβιακό, καθώς και αντικαρκινικό ρόλο. Έρευνες έχουν δείξει πως η στοχευμένη διαταραχή του μιτοχονδριακού συστήματος από τα προοξειδωτικά συστατικά έχει μειώσει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων και το μέγεθος κυττάρων όγκων (Bakkali F. κ.ά., 2008).

1.2 Παραπροϊόντα αρωματικών φυτών

1.2.1 Εισαγωγή

Η εξαγωγή αιθέριων ελαίων εκχυλίζεται με την διαδικασία της απόσταξης σε ποσοτό 93%, αφήνοντας ένα 7% να ανακτηθεί με άλλες επεξεργασίες (Rafiq κ.ά., 2024) Τα αιθέρια έλαια από τα αρωματικά φυτά παραλαμβάνονται με τις μεθόδους εκχύλισης και απόσταξης, όπως απόσταξη ατμού, υδροαπόσταξη, εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες, εκχύλιση με μικροκύματα, εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO₂ κ.ά. Οι διαδικασίες αυτές όμως αποφέρουν μικρό ποσοστό προϊόντος, έως 8% w/w του ξηρού φυτού (Skendi κ.ά.,2022). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσών αποβλήτων, σε μορφή στερεής μάζας (μίσχοι, φύλλα, ρίζες, σπόροι, φλούδες, φλοιοί), απόνερων και ανθόνερων, ανάλογα με την τεχνική εκχύλισης (Skendi κ.ά.,2022).

Πέρα από την παραγωγή αιθέριων ελαίων, η συσσώρευση των αποβλήτων προκύπτει από τα παραπροϊόντα του τομέα της γεωργίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την οικολογική και οικονομική επιβάρυνση του περιβάλλοντος και της αγοράς. Η εναπομείνασα βιομάζα περιέ-

χει βιοενεργές ουσίες που δεν απομακρύνθηκαν κατά την επεξεργασία των φυτικών προϊόντων αλλά μπορούν να αξιοποιηθούν, αποφέροντας κέρδος και ενισχύοντας την βιώσιμη ανάπτυξη (Skendi κ.ά.2022).

1.2.2 Φαινολικά συστατικά βιομάζας αρωματικών φυτών

Η φύση των επεξεργασιών των φυτικών προϊόντων προκαλούν αλλαγές στην χημική σύστασή τους. Οι υψηλές θερμοκρασίες και η έκθεση στο οξυγόνο επιφέρουν το φαινόμενο της υδρόλυσης, της οξείδωσης και της θερμικής υποβάθμισης, διασπώντας προϋπάρχουσες ενώσεις και δημιουργώντας νέες (de Elguea-Culebras κ.ά. 2022).

Συνεπώς, το σύνολο των φαινολικών συστατικών και η περιεκτικότητα αυτών στα αρωματικά φυτά διαφέρουν από αυτά των αποβλήτων των αντίστοιχων φυτών. Παρ' όλα αυτά, ερευνητές έχουν βρει και ταυτοποιήσει φαινολικές ενώσεις από βιομάζες αρωματικών φυτών, δείχνοντας πως είναι δυνατή η επεξεργασία τους για την παραλαβή σημαντικών ποσών φαινολικών ενώσεων. Μερικά παραδείγματα των πολυφαινολών σε απόβλητα δίνονται στον Πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4 Φαινολικά συστατικά σε μερικά απόβλητα από αρωματικά φυτά

Φυτικό προϊόν	Είδος φυτών	Είδος αποβλήτων	Βιοδραστικές ενώσεις
Βασιλικός	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Απόνερα εκχύλισης	Φαινολικές ενώσεις
Λεβαντίνη	<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	Στερεά απόβλητα	Φαινολικά οξέα
Υσσώπος	<i>Hyssopus officinalis</i>	Στερεά απόβλητα	Φαινολικά οξέα
Λεβάντα	<i>Lavandula X intermedia</i>	Στερεά απόβλητα	Φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, παράγωγα του υδροξυκινναμοϋλκινικού οξέους, γλυκοζίτες υδροξυκινναμωμικών οξέων
Ρίγανη	<i>Poliomintha longiflora</i>	Ανθόνερο και στερεά απόβλητα	Φαινολικά οξέα, πτητικά συστατικά αιθέριων ελαίων
Δενδρολίβανο	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Στερεά απόβλητα	Φαινολικά οξέα

Ισπανικό φασκόμηλο	<i>Salvia lavandulifolia</i>	Στερεά απόβλητα	Φαινολικά οξέα
Θυμάρι	<i>Thyme mastichina L.</i>	Στερεά απόβλητα	Φαινολικά οξέα
Αλόε βέρα	<i>Aloe barbadensis Miller</i>	Ρίζα	Ανθρακινόνες: Αλοεαποναρίνη-I και αλοεσαποναρίνη-II

Πηγή Saha J. and Basak BB, 2020

Οι de Elguea κ.ά. 2022 αναφέρουν πως η επιλογή διαλύτη επηρεάζει σημαντικά την τελική φυτοχημική σύσταση του εκχυλίσματος. Η περιεκτικότητα αιθανόλης σε αναλογίες 55-75% αποδίδει μεγαλύτερη ποσότητα ροσμαρινικού οξέος, ενώ υψηλότερες περιεκτικότητες αποσπών παράγωγα διτερεπενικών φαινολικών.

1.2.3 Αξιοποίηση στερεών αποβλήτων αρωματικών φυτών

Η παρουσία φαινολικών συστατικών στα στερεά απόβλητα προσδίδει σε αυτά αντιοξειδωτικό, αντιριζικό και αντιγηραντικό χαρακτήρα, καθιστώντας τα κατάλληλα για χρήση ως συντηρητικά και βιοενεργές ενώσεις στην βιομηχανία τροφίμων, κτηνοτροφίας και αισθητικής (Saha J. και Basak B.B., 2020; de Elguea-Culebras κ.ά. 2022). Επιπλέον, θεωρούνται χρήσιμα ως παρασιτοκτόνα με αντιμυκητιακή, αντιβακτηριακή και αντιφλεγμονώδη δράση (de Elguea-Culebras κ.ά. 2022). Τέλος, βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί η συμβολή των πολυφαινολών στην προστασία της υγείας, δρώντας ως αντικαρκινικοί, πιθανώς αναλγητικοί παράγοντες και ουσίες που καθυστερούν την πορεία νευρολογικών παθήσεων (Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον) (Skendi κ.ά. 2022).

Αξίζει να σημειωθεί πως στα αποσμημένα στερεά υπολείμματα των αρωματικών φυτών απουσιάζουν τα αρώματα, οι γεύσεις και τα χρώματα που χαρακτηρίζουν τα φυτά, λόγω της εξαγωγής των ουσιών υπεύθυνα για αυτά. Παράλληλα, τα συντηρητικά των τροφίμων προτιμάται να είναι ουδέτερα, έτσι ώστε να μην επηρεάζουν τα οργανοληπτικά στοιχεία. Συνεπώς, τα απόβλητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συντηρητικά στα προϊόντα τροφίμων αλλά και στις ενεργές συσκευασίες τους (Skendi κ.ά. 2022). Ενεργή συσκευασία ορίζεται η συσκευασία στην οποία έχουν προστεθεί συστατικά εσωτερικά ή εξωτερικά για την βελτίωση και ενίσχυση της λειτουργίας της (Hobday κ.ά. 2010).

1.3 Δενδρολίβανο

1.3.1 Γενικά στοιχεία

Το δενδρολίβανο, επιστημονικής ονομασίας *Salvia rosmarinus* (συνώνυμο *Rosmarinus officinalis*), ανήκει στην οικογένεια Χειλανθών (*Lamiaceae*). Είναι ένα κοινό θαμνώδες φυτό της Μεσογειακής χλωρίδας αλλά καλλιεργήσιμο παγκοσμίως (Macedo κ.ά. 2020). Η ονομασία *Salvia* προέρχεται από την λατινική λέξη *salveo* που σημαίνει “να είναι σε καλή υγεία”, λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων των φυτών του γένους. Η ονομασία *rosmarinus* σημαίνει “δροσιά της θάλασσας”, λόγω της τοποθεσίας που αναπτύσσονται τα συγκεκριμένα φυτά (Garden, M.B.).

Μορφολογικά, το φυτό έχει ύψος μεταξύ 60-200 εκατοστών με χαρακτηριστικά φύλλα σχήματος βελόνας. Τα φύλλα έχουν διαφορετικά χρώματα στην κάθε επιφάνεια, με σκούρο πράσινο στην πάνω και άσπρο στην κάτω (Sasikumar B., 2012). Τα άνθη του είναι μικρά σε χρώματα του λευκού, μπλε ή λιλά (Εικόνα 1.2). Το σύνολο των επιμέρων στοιχείων του φυτού είναι αξιοποιήσιμα, καθώς τα φύλλα χρησιμοποιούνται ως νωπή ή ξηρή δρόγη, ενώ τα φύλλα, τα άνθη και τα κλαδιά ως απόσταγμα σε μορφή αιθέριου ελαίου (Sasikumar B., 2012; Santos κ.ά. 2015).



Εικόνα 1.2 Δενδρολίβανο *Salvia rosmarinus* (Encyclopædia Britannica).

Το αρωματικό φυτό έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στους τομείς της υγείας, της αισθητικής και της διατροφής λόγω των βιοενεργών ενώσεων που περιέχει. Οι σημαντικότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες που παρατηρούνται στο δενδρολίβανο είναι, μεταξύ άλλων, φαινολικά διτερπένια, φλαβονοειδή, τριτερπένια και φαινολικά οξέα (Sharifi-Rad κ.ά. 2019). Η παρουσία και η περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων στο φυτό εξαρτάται από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες, ενώ η παρουσία τους στο παραγόμενο αιθέριο έλαιο εξαρτάται επίσης από το μέρος του φυτού και από την τεχνική εξαγωγής τους (Sharifi-Rad κ.ά. 2019).

1.1.2 Φυτοχημικό προφίλ

Το αρωματικό φυτό δενδρολίβανο έχει εξετασθεί εκτενώς ως προς τις περιεχόμενες ενεργές ενώσεις του, καθώς η ύπαρξή τους το καθιστούν σημαντικό για ιατρική χρήση. Διαθέτει αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντιακή, αντιθρομβωτική, αντικαταθλιπτική και αντιοξειδωτική ιδιότητα ως αποτέλεσμα των περιεχόμενων βιοδραστικών ενώσεων. Η ακριβής ταυτοποίηση των ενώσεων υπεύθυνα για μια συγκεκριμένη βιολογική ιδιότητα δύσκολα επιχειρείται, λόγω της συνεργατικής δράσης των μεταβολιτών μεταξύ τους (Macedo κ.ά., 2020). Οι Santos κ.ά., 2015 αναφέρουν πως ίσως η συνεργατική δράση των φυσικοχημικών να ενισχύουν τις βιολογικές δράσεις των φυτών, καθώς είναι ανώτερες από αυτές των μεμονωμένων συστατικών .

Επιπλέον, η διαφοροποίηση της σύστασης και περιεκτικότητας ενώσεων βασίζεται στις επιρροές του περιβάλλοντος, των γενετικών χαρακτηριστικών, του τρόπου συγκομιδής, της φαινολογικής εποχής συγκομιδής, των μεθόδων επεξεργασίας και εκχύλισης των φυτών , καθώς και των συνθηκών διεκπεραίωσής τους (Santos κ.ά., 2015).

Βιβλιογραφικά, σε επιμέρη σημεία του φυτού δενδρολίβανου απαντώνται οι κύριες πτητικές ενώσεις καμφορά, α-πινένιο, β-πινένιο, ευκαλυπτόλη, β-καρνοφυλλένιο, μυρκένιο, βορνεόλη, καμφένιο, 1,8-κινεόλη, βερμπενόνη και αιθυλεστέρας της βορνεόλης. Επιπλέον, οι φαινολικές ενώσεις και τα καροτενοειδή που περιέχονται στο δενδρολίβανο είναι το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη, το ροσμαρινικό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, η λουτεολίνη, η απιγενίνη, η ναρινγκίνη, η κερκετίνη, η καμφερόλη (Santos κ.ά., 2015).

1.1.3 Χρήσεις δενδρολίβανου

Οι βιολογικές δράσεις του δενδρολίβανου οφείλονται στην σύστασή του σε δευτερεύοντες μεταβολίτες, καθώς του προσδίδουν τις ιδιότητές τους.

Ειδικότερα, η αντιμικροβιακή ικανότητα του αρωματικού φυτού σχετίζεται με τα πτητικά συστατικά 1,8-κινεόλη, ευγενόλη, α-πινένιο και καμφορά και με τα φαινολικό καρνοσικό οξύ. Μάλιστα, η αντιμικροβιακή ικανότητα του εκχυλίσματος δενδρολίβανου είχε μεγαλύτερη ισχύ από μερικά συντηρητικά τροφίμων (Santos κ.ά. 2015).

Η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση του φυτού το καθιστούν κατάλληλο για προστατευτικό παράγοντα έναντι στην οξείδωση και την μικροβιακή ανάπτυξη των τροφίμων. Από τις βιοενεργές ουσίες, οι ενώσεις που συνδέονται με την αντιοξειδωτική ιδιότητα είναι τα φαινολικά διτερπένια (ροσμανόλη, ισοροσμανόλη, επιροσμανόλη, καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη) και τα φαινολικά οξέα (καφεϊκό οξύ και ροσμαρινικό οξύ) (Hosseini κ.ά., 2018).

Επίσης, η αντικαρκινική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιδιαβητική, η αντιελκογόνα, η αντικαταθλιπτική και η αντιθρομβωτική ικανότητα (Santos κ.ά. 2015) προσφέρουν τις θεραπευτικές τους ιδιότητες σε θεραπευτικά και φαρμακευτικά σκευάσματα.

Βιβλιογραφικά, το δενδρολίβανο έχει χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία νευρολογικών, καρδιαγγειακών, γαστρεντερικών, ηπατικών παθήσεων και παθήσεων του αναπαραγωγικού συστήματος (Macedo κ.ά. 2020).

1.2 Παραπροϊόντα δενδρολίβανου

Η επεξεργασία του αρωματικού φυτού μέσω της διαδικασίας της απόσταξης για την παραλαβή αιθέριων ελαίων αποφέρει μικρό ποσοστό προϊόντος, ενώ παράλληλα παράγονται μεγάλες ποσότητες αποσμημένης βιομάζας ως απόβλητα. Τα απόβλητα αυτά αποτελούνται από φυτικά υλικά που περιέχουν επιθυμητές ενώσεις, οι οποίες παραλαμβάνονται με περαιτέρω επεξεργασίες. Λόγω της φύσεως της βιομάζας, η προσέγγιση της παραλαβής των φαινολικών ενώσεων γίνεται έχοντας υπόψη τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της (de Elguea-Culebras κ.ά. 2022).

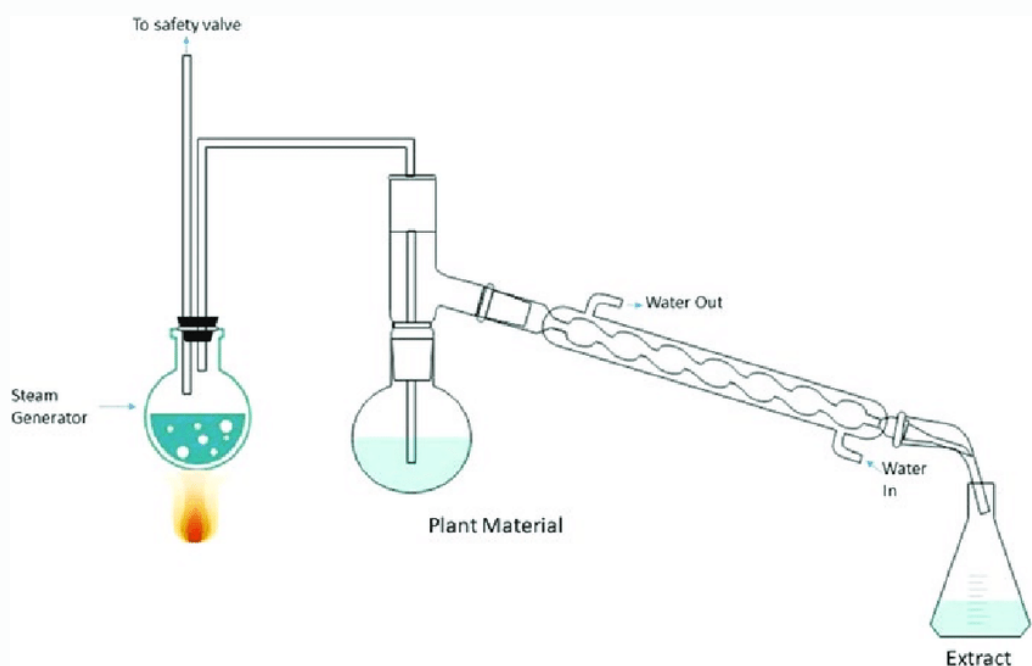
1.2.1 Φυσικοχημική σύσταση

Τα παραπροϊόντα αρωματικών φυτών ως στερεό υπόλειμμα της εκάστης διαδικασίας απόσταξης έχουν ανάλογη φυσικοχημική σύσταση. Στις περιπτώσεις που η απόσταξη γίνεται

με λιγότερους όγκους νερού και η επαφή του φυτού με αυτό είναι περιορισμένη, όπως στην απόσταξη χωρίς διαλύτες με μικροκύματα και στην απόσταξη με ατμό, δεν παρατηρείται μεγάλη απώλεια πολικών ενώσεων. Αντιθέτως, στην υδροαπόσταξη υπάρχει απώλεια πολικών ενώσεων στα υγρά απόβλητα, καθιστώντας το στερεό υπόλειμμα φτωχό σε πολικές φαινολικές ενώσεις (de Elguea-Culebras κ.ά. 2022).

Σκοπός της ατμοαπόσταξης (Εικόνα 1.3) είναι η εκχύλιση πτητικών ενώσεων με υψηλό σημείο βρασμού, παραλαμβάνοντας αιθέρια έλαια, αλκαλοειδή και φαινολικές ουσίες (Sruthi κ.ά. 2023). Αυτό συμβαίνει με την αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος (κοντά στους 100°C) με την χρήση ξηρού, υπέρθερμου ή κορεσμένου ατμού, διασπώντας τον φυτικό ιστό και απελευθερώνοντας αρωματικές ενώσεις και αιθέρια έλαια (Pushpangadan P. και George V., 2012; Rafiq κ.ά. 2024). Στη συνέχεια, ο παραγόμενος ατμός συμπυκνώνεται με την πτώση της θερμοκρασίας σε διφασικό μείγμα νερού και ελαίου (Rafiq κ.ά. 2024; Sruthi κ.ά. 2023). Το μείγμα διαχωρίζεται σε αιθέριο έλαιο που περιλαμβάνει λιποδιαλυτές ενώσεις και σε υδρόλυμα (γνωστό ως ανθόνερο) που περιλαμβάνει υδατοδιαλυτές ενώσεις (Irmak S. και Erbatur O., 2008).

Πέρα από τις πολικές ενώσεις του ελαίου, μέρος των ενεργών ενώσεων του φυτού μεταφέρονται στο εκχύλισμα, λόγω της χαμηλής επιλεκτικότητας της εκχύλισης. Ακόμα, ενισχύεται η αντίδραση της υδρόλυσης λόγω των υψηλών θερμοκρασιών (Irmak S. και Erbatur O., 2008).



Εικόνα 1.3 Διάγραμμα εκχύλισης με ατμοαπόσταξη (Silori κ.ά. 2019).

Η εναπομείνσα βιομάζα είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και μη πτητικές ενώσεις που δεν μεταφέρθηκαν στο εκχύλισμα της ατμοαπόσταξης, γεγονός που καθιστά τα παραπροϊόντα αρκετά σημαντικά για περαιτέρω κατεργασία. Οι υψηλές θερμοκρασίες της εκχύλισης προκαλούν θερμικό στρες στην βιομάζα, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση και χημική μεταβολή των βιοενεργών ενώσεων (Truzzi κ.ά. 2022). Μη πτητικές και μη θερμικά υποβαθμισμένες ενώσεις που παραμένουν στην στερεή βιομάζα αποτελούν, μεταξύ άλλων, οι φαινολικές ενώσεις και τα τερπενοειδή (Oreopoulou A. και Tsinogiannis D., 2019; Christaki κ.ά. 2022).

Η διεξαγωγή ερευνών πάνω στα παραπροϊόντα του δενδρολίβανου από την υδροαπόσταξη έκανε δυνατή την ταυτοποίηση των κύριων φυτοχημικών ουσιών τους (Πίνακας 1.5). Έγινε χρήση διαλυτών αιθανόλης (EtOH), μεθανόλης (MeOH), νερού με καυστικό κάλιο (H₂O+KOH) και υπερκρίσιμο ρευστό CO₂. Οι τεχνικές εκχύλισης ήταν εκχύλιση με μικροκύματα χωρίς διαλύτες (SFME), εκχύλιση Soxhlet (SxE), εκχύλιση με υπερήχους (UAE), εκχύλιση με υδατόλουτρο (WBE), εκχύλιση με ανάδευση (SE) και εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (SFE) (de Elguea-Culebras κ.ά. 2022).

Πίνακας 1.5 Κύριες ενώσεις στα στερεά απόβλητα του φυτού δενδρολίβανου (*Salvia rosmarinus*)

Φαινολικές ενώσεις		Τεχνική εκχύλισης	Διαλύτης	Τεχνικές εκχύλισης
Φαινολικά διτερπένια	Καρνοσικό οξύ	Υδροαπόσταξη	EtOH/ MeOH/ H ₂ O (+KOH)/CO ₂	SxE/UAE/ WBE/SE/SF
	Καρνοσόλη	Υδροαπόσταξη	EtOH/MeOH / CO ₂	SxE/UAE/ WBE/SFE
Υδροξικιναμωμικά οξέα και παράγωγα	Καφεϊκό οξύ	Υδροαπόσταξη	H ₂ O (+KOH)	SE
	Φερουλικό οξύ	Υδροαπόσταξη	MeOH	SxE
	Ροσμαρινικό οξύ	Υδροαπόσταξη	EtOH/MeOH / H ₂ O (+KOH)	SxE/UAE/ WBE/SE/SFE
Φλαβανόνες	Εσπεριδίνη	Υδροαπόσταξη	MeOH	SxE

Φλαβόνες	Γενκβανίνη	Υδροαπόσταξη	EtOH	SxE/UAE
	Κιρσιμαριτίνη	Υδροαπόσταξη	EtOH	UAE

Πηγή: de Elguea-Culebras κ.ά., 2022

1.2.2 Εκχύλιση παραπροϊόντων δενδρολίβανου

Οι [Christaki κ.ά. 2012](#) ανέλυσαν δείγμα παραπροϊόντος δενδρολίβανου ύστερα από ατμοαπόσταξη, με την μέθοδο υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας LC-DAD-MS. Στο δείγμα ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις ροσμαρινικού οξέος, καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος, αποτελώντας το 95% του ολικού μετρήσιμου φαινολικού περιεχομένου.

Οι [Vella και Laratta 2023](#) ανέλυσαν δείγμα στερεής βιομάζας δενδρολίβανου εκχυλίσματος από υπερήχηση, με μέγιστη τιμή φαινολικού περιεχομένου 24.14 mg GAE/g ξηρού δείγματος. Οι συνθήκες εκχύλισης ήταν περιεκτικότητα αιθανόλης 80%, χρόνος εκχύλισης 60 min και θερμοκρασία 70°C.

Ακόμα, οι [Hosseini κ.ά. 2018](#) εκχύλισαν κονιοποιημένα φύλλα παραπροϊόντων δενδρολίβανου, με αποτέλεσμα ολικού φαινολικού περιεχομένου 185.16 mg GAE/g ξηρού δείγματος. Η εκχύλιση με υπερήχους έλαβε μέρος σε συνθήκες 56.26% υδατικού διαλύματος αιθανόλης, χρόνου εκχύλισης 12.60 min και ισχύος υπερήχων 200 W.

Το σύνολο του φυτού (φύλλα, άνθη, μίσχοι) εξετάστηκε ως προς την περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες στην έρευνα των [Irakli κ.ά. 2023](#). Πραγματοποιήθηκαν η τεχνική εκχύλισης με υπερήχους (UAE), η τεχνική εκχύλισης με μικροκύματα (MAE), η τεχνική εκχύλισης Soxhlet και η επιταχυνόμενη τεχνική εκχύλισης με διαλύτη (ASE). Τα αποτελέσματα ήταν σε εύρος 119.6 - 145.3 mg GAE/g εκχυλίσματος, σε αντίστοιχη κατά αύξουσα σειρά UAE < Soxhlet < MAE < ASE.

Οι [Skendi κ.ά. 2022](#), αναφέρουν έρευνες όπου ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι φαινολικές ενώσεις (mg ανά g στερεού υπολείμματος δενδρολίβανου), από την εκχύλιση με ατμοαπόσταξη ([Πίνακας 1.6](#)). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με υδατικά διαλύματα ή καθαρά διαλύματα αιθανόλης και μεθανόλης.

Πίνακας 1.6. Ποσότητες φαινολικών ενώσεων σε mg ανά g στερεού παραπροϊόντος δενδρολίβανου από απόσταξη ατμού

Φαινολικές ενώσεις	Διαλύτης	Περιεκτικότητα (mg/g)
--------------------	----------	-----------------------

Φαινολικά διτεροπένια	Καρνοσικό οξύ	MeOH MeOH	23.10 39.64
	Καρνοσόλη	MeOH 70%	22.12
Υδροξικινναμικά οξέα και παράγωγα	Καφεϊκό οξύ	MeOH 70%	0.37
	Χλωρογενικό οξύ	EtOH 70%	0.03
	Ροσμαρινικό οξύ	MeOH 50%	3.7
		EtOH 70%	1.5
Βερμπασκοσίδη	MeOH 70%	24.7	
Φλαβόνες	Λουτεολίνη	MeOH 70%	0,71
			0.01

Πηγή Skendi κ.ά. 2022

Βιβλιογραφικά, τα αποτελέσματα διαφέρουν μεταξύ τους, λόγω των διαφορετικών παραγόντων που επηρεάζουν το φυτοχημικό προφίλ των φυτών, όπως περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες, ο τρόπος κατεργασίας του δείγματος, η μέθοδος εκχύλισης, οι παράμετροι της εκχύλισης και τα μέρη του δείγματος που εξετάστηκαν (φύλλα, κλαδιά, άνθη). Έχοντας γνώση των κατάλληλων συνθηκών, είναι δυνατή η βέλτιστη παραλαβή των βιοενεργών ενώσεων από τα αποσμημένα απόβλητα αρωματικών φυτών.

1.2.3 Χρήση παραπροϊόντων δενδρολίβανου στην βιομηχανία τροφίμων

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, η σύσταση από φαινολικές ενώσεις και αντιοξειδωτικές ουσίες καθορίζουν τις ιδιότητες του φυτικού προϊόντος. Η ύπαρξη υψηλής περιεκτικότητας βιοενεργών ενώσεων στα παραπροϊόντα δενδρολίβανου συνεπάγεται με την ύπαρξη αντιοξειδωτικών, αντιριζικών και αντιμικροβιακών ικανοτήτων της αποσμημένης βιομάζας. Η ανάγκη για περισσότερες βιοδραστικές ενώσεις, καθώς και η απομάκρυνση από τα συνθετικά συντηρητικά, αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακά για πιο φυσικά συστατικά, επιβάλλει την αναζήτηση πιο αποτελεσματικών πηγών πολυφαινολών και αντιοξειδωτικών.

Ειδικότερα, τα στερεά παραπροϊόντα δενδρολίβανου είναι εγκεκριμένα ως ημι-φυσικά συντηρητικά από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, με τον κωδικό E392 (de Elguea-Culebras κ.ά. 2022). Είναι δυνατή η αξιοποίησή τους στην βιομηχανία τροφίμων, ως αντιοξειδωτικά σε προϊόντα κρέατος και ψαριών.

Κεφάλαιο 2: Φαινολικές ενώσεις

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μια αυξημένη ανάγκη των καταναλωτών για προϊόντα με θετικές επιδράσεις στην υγεία. Οι απαιτήσεις τους για ενίσχυση των προϊόντων με θρεπτικές ουσίες που συμβάλλουν σε καλύτερη υγεία οδηγούν τους ερευνητές και τις βιομηχανίες στην μελέτη και την αξιοποίηση βιοενεργών ενώσεων. Η παρουσία τους έχει συνδεθεί με την υγεία τόσο στην βιομηχανία της αισθητικής όσο και στην βιομηχανία των τροφίμων (de Araújo κ.ά. 2020). Οι πολυφαινόλες ανήκουν σε αυτές τις ενώσεις και εμφανίζονται κυρίως σε φρούτα και λαχανικά. Γενικά, έχουν τον ρόλο της προστασίας των φυτών ενάντια στο υπεριώδες φως, στις δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου, στα παράσιτα και στα παθογόνα (Brglez Mojzer κ.ά., 2016). Από αυτές, σημαντικότερες για την βιολογική τους δράση στα τρόφιμα και ποτά αποτελούν τα φλαβονοειδή και οι ταννίνες (Σφλώμος Κ., 2019, σσ 88).

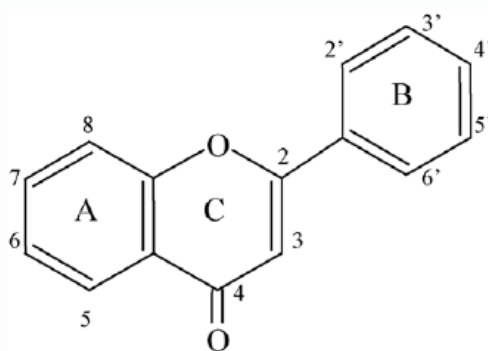
2.1 Δομή

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, προϊόντα από τον δευτερεύων μεταβολισμό των φυτών. Αποτελούν μια μεγάλη ετερογενής ομάδα με μεγάλη ποικιλομορφία. Η ομάδα έχει εύρος από ενώσεις με έναν απλό βενζοϊκό δακτύλιο με μία υδροξυλομάδα μέχρι μόρια με πολλαπλούς βενζοϊκούς δακτύλιους και πολλές υδροξυλομάδες, καθιστώντας αναγκαία την κατάταξή τους σε ομάδες και υποομάδες (Brglez Mojzer κ.ά. 2016). Εμφανίζονται σε ελεύθερη μορφή ή ενωμένες με οξέα, σάκχαρα (γλυκοζίτες) και άλλες υδατοδιαλυτές ή μη ενώσεις (de Araújo κ.ά. 2020). Διαχωρίζονται σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, κουρκουμινοειδή, στιλβενοειδή, λιγνάνες και ταννίνες, ανάλογα με την χημική τους δομή (Brglez Mojzer κ.ά. 2016).

2.1.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν έως το 60% των διαιτητικών φαινολικών ενώσεων και ως την πιο κοινή ένωση σε φρούτα και λαχανικά, έχουν αισθητή επίδραση στα οργανοληπτικά τους στοιχεία και στη σύνθεση βιταμινών και ενζύμων (de Araújo κ.ά. 2020). Λόγω της δράσης τους ως βιταμίνη, αναφέρονται βιβλιογραφικά και ως Βιταμίνες P (Σφλώμος Κ., 2019, σσ 88).

Η δομή τους χαρακτηρίζεται από έναν σκελετό βασισμένο στην φλαβόνη (Εικόνα 2.1) και είναι πολυδρόζυ - παράγωγα της 2-φαιnyλοβενζο-γ-πυρόνης (μεθυλαιθέρες ή γλυκοζίτες τους) (Σφλώμος Κ., 2019, σσ 88). Οι διαφορές στον άνθρακα του δακτύλου C που συνδέεται με τον δακτύλιο B, στην οξείδωση και ακορεστότητά του είναι γνώμονες κατάταξης των ενώσεων σε υποομάδες (Panche κ.ά. 2016; de Araújo κ.ά. 2020): ανθοκυανίνες, φλαβανόλες (κατεχίνες), φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβόνες και χαλκονοειδή (Πίνακα 2.1) (Panche κ.ά., 2016).



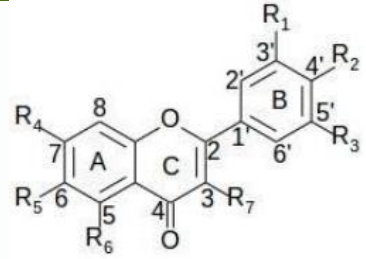
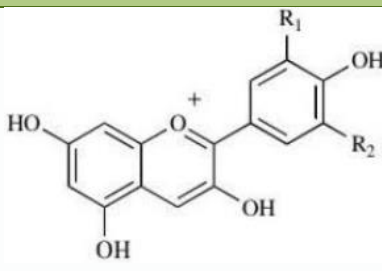
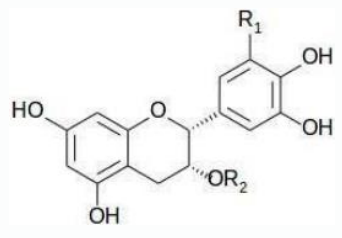
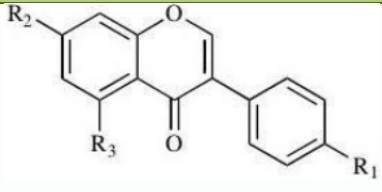
Εικόνα 2.1 Δομή φλαβόνης (Cushnie and Lamb, 2005)

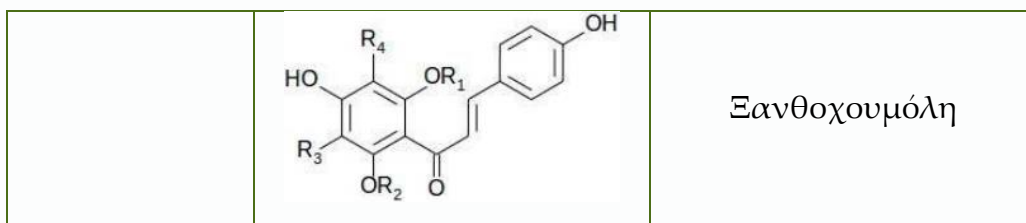
Κύριες φυτικές πηγές φλαβονοειδών είναι: κρεμμύδι, γλυκέρυζα, μπρόκολο, τσάι, μήλο, εσπεριδοειδή, μούρα, σόγια (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Η εκχύλιση φλαβονοειδών από φυτά αποτελεί πρόκληση, λόγω της ενζυμικής υποβάθμισής τους όταν προέρχονται από φρέσκο δείγμα ή δείγμα που δεν έχει υποστεί ξήρανση. Ο διαλύτης της εκχύλισης πρέπει να είναι εκλεκτικός για την εκχύλιση συγκεκριμένων ενώσεων. Οι ισοφλαβόνες, οι φλαβανόνες, οι μεθυλιωμένες φλαβόνες και οι φλαβονόλες είναι λιγότερο πολικές και απαιτούν οργανικούς διαλύτες όπως χλωροφόρμιο, διαιθυλικός εστέρας ή αιθυλικό οξικό άλας. Μείγματα με αλκοόλη ή υδατικά μείγματα αλκοόλης είναι ιδανικά για εκχύλιση φλαβονοειδών γλυκοσίδων και πιο πολικών αγλυκόνων. Οι κατεχίνες, οι προανθοκυανιδίνες και οι συμπυκνωμένες ταννίνες μπορούν να εκχυλιστούν με νερό (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Οι βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών συμπεριλαμβάνουν αντιοξειδωτική ισχύ, αντικαρκινικές ιδιότητες, αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική και αντιθρομβωτική δράση (Brglez Mojzer κ.ά., 2016; de Araújo κ.ά., 2020).

Πίνακας 2.1 Κατάταξη φλαβονοειδών με αντίστοιχες δομές και αντιπροσωπευτικές ενώσεις

Κατάταξη	Δομή	Αντιπροσωπευτικές ενώσεις
Φλαβονοειδή		
Φλαβονόλες		Κουερσετίνη
Φλαβόνες		Απιγενίνη
Φλαβανόνες		Ναριγκενίνη
Ανθοκυανιδίνες		
Ανθοκυανιδίνες		Δελφινιδίνη
		Πελαργονιδίνη
Κατεχίνες		
Κατεχίνες		Κατεχίνη
		Επικατεχίνη
		Επιγαλλοκατεχίνη
		Επιγαλλοκατεχίνη-3-γαλλική
Ισοφλαβόνες		
Ισοφλαβόνες		Νταϊντζεΐνη
		Γενιστεΐνη
Χαλκονοειδή		
Χαλκονοειδή		Ισολικιριτιγενίνη



Πηγή: Brglez Mojzer κ.ά., (2016)

2.1.2 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα (Πίνακας 2.2) αποτελούν το 33% των φαινολικών ενώσεων που καταναλώνονται. Διαχωρίζονται σε δύο ομάδες: σε υδροξυβενζοϊκά οξέα και σε υδροξικιναμωμικά οξέα με τα αντίστοιχα παράγωγά τους (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

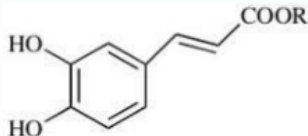
Κύριες φυτικές πηγές φαινολικών οξέων είναι: λαχανικά (σπανάκι, μπρόκολο, λαχανίδα), φρούτα (μούρα, μήλο), ροφήματα (κρασί, τσάι, καφές, χυμό εσπεριδοειδών, μύρα), δημητριακά και ελαιόλαδο (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Η εκχύλιση δεν είναι δυνατή από οργανικούς διαλύτες, λόγω των αδιάλυτων ομοιοπολικών δεσμών των φαινολικών οξέων με πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος. Η απελευθέρωσή τους πραγματοποιείται με την βασική ή την όξινη υδρόλυση ή μίξη αυτών (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Η βιολογική επίδραση των οξέων περιληπτικά μπορεί να είναι αντικαταθλιπτική, αντιπερτασική, αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντιπεργλυκαιμική, νευροπροστατευτική και αντιδιαρροϊκή (Brglez Mojzer κ.ά., 2016; de Araújo κ.ά., 2020).

Πίνακας 2.2 Κατάταξη φαινολικών οξέων με αντίστοιχες δομές και αντιπροσωπευτικές ενώσεις

Κατάταξη	Δομή	Αντιπροσωπευτικές ενώσεις
Φαινολικά οξέα		
Υδροξυβενζοϊκά οξέα και παράγωγα		Ελλαγικό οξύ
		Γαλλικό οξύ

Υδροξυκινναμωμικά οξέα και παράγωγα		Καφεικό οξύ
		Χλωρογενικό οξύ
		Φερούλικό οξύ
		Ροσμαρινικό οξύ

Πηγή: Brglez Mojzer κ.ά., (2016)

2.1.3 Κουρκουμνοειδή

Το φυτό κουρκουμάς είναι γνωστό στην παραδοσιακή ινδική φαρμακευτική ως αντισηπτικό και ως αντιφλεγμονώδες. Βασικό ενεργό συστατικό που δίνει αυτές τις βιολογικές δράσεις είναι η κουρκουμίνη που ανήκει στα κουρκουμνοειδή (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Κύριες φυτικές πηγές κουρκουμνοειδών είναι: κουρκουμάς, μουστάρδα (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Τα κουρκουμνοειδή (Πίνακας 2.3) είναι ευαίσθητα στην υποβάθμιση από έκθεση στο φως, στις υψηλές θερμοκρασίες και στο οξυγόνο, καθιστώντας την εκχύλιση με κλασικές μεθόδους αναποτελεσματική (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

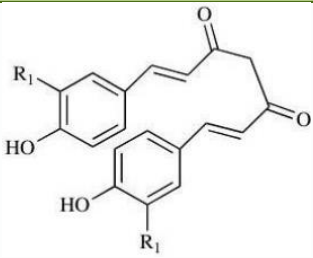
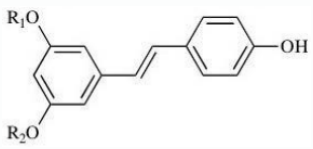
2.1.4 Στιλβеноειδή

Οι πολυφαινόλες αυτής της ομάδας (Πίνακας 2.3) συναντώνται σε μεγάλες ποσότητες στα σταφύλια και τα παράγωγά τους, με κύρια ένωση την ρεσβερατρόλη. Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται υπό μελέτη για την αντικαρκινική της ιδιότητα, πάνω στην οποία μπορεί να βασίζεται το “γαλλικό παράδοξο”. Όπως και το πτεροστιλβένιο και την πικεατανόλη, η ρεσβερατρόλη διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Κύριες φυτικές πηγές στιλβеноειδών είναι: σταφύλια και παράγωγα, μούρα και φυστίκια (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Κατάλληλοι διαλύτες για την εκχύλιση στιλβеноειδών είναι οι αλκοόλες, συγκεκριμένα η μεθανόλη και η αιθανόλη, σε μια πληθώρα μεθόδων εκχύλισης (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Πίνακας 2.3 Κατάταξη κουρκουμοειδών και στιλβενοειδών με αντίστοιχες δομές και αντιπροσωπευτικές ενώσεις

Κατάταξη	Δομή	Αντιπροσωπευτικές ενώσεις
Κουρκουμοειδή		
Κουρκουμοειδή		Κουρκουμίνη
Στιλβενοειδή		
Στιλβενοειδή		Πικεατανόλη
		Πτεροστιλβένιο
		Ρεσβερατρόλη

Πηγή: Brglez Mojzer κ.ά., (2016)

2.1.5 Λιγνάνες

Οι λιγνάνες (Πίνακας 2.4) είναι πολυσύχναστες ως φυτοοιστρογόνα, καθώς βρίσκονται σε μικρές ποσότητες σε πολλά φυτά έχοντας θέση στην διαμόρφωση κυτταρικού τοιχώματος (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Κύριες φυτικές πηγές λιγνάνων είναι: κονιοποιημένος λιναρόσπορος, αλεύρι, σόγια και ελαιόλαδο (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Όπως με τα φαινολικά οξέα, πρέπει να προηγηθεί όξινη υδρόλυση για την απελευθέρωση αγλυκόνων από το φυτικό σύμπλεγμα, ώστε να πραγματοποιηθεί εκχύλιση των λιγνάνων (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Οι λιγνάνες είναι οι φαινολικές ενώσεις με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση στο ελαιόλαδο. Πέρα από την αντικαρκινική ιδιότητα που διαθέτουν οι πολυφαινόλες, προστατεύουν ενάντια σε καρδιαγγειακές παθήσεις, στα συμπτώματα εμμηνόπαυσης και στην οστεοπόρωση (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

2.1.6 Ταννίνες

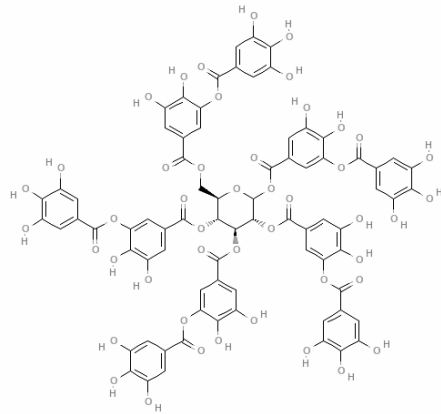
Οι ταννίνες (Πίνακας 2.4) ανήκουν στα άμορφα υλικά φυτικής προέλευσης, έχουν μεγάλο μοριακό βάρος και στυφή γεύση. Κατατάσσονται στις δεψικές ύλες διότι έχουν την δυνατότητα να δέφουν το δέρμα (Σφλώμος Κ., 2019, σσ 90). Μπορούν να δημιουργήσουν συμπλέγματα με άλλα μακρομόρια, έχοντας έτσι ποικιλομορφία στην δομή και τις χημικές ιδιότητες. Έχοντας αυτά υπόψη, οι πολυφαινόλες αυτές διαχωρίζονται σε συμπυκνωμένες ταννίνες και σε υδρολυόμενες ταννίνες (de Araújo κ.ά., 2020).

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες σχηματίζονται από τον πολυμερισμό μονομερικών φλαβον-3-ολών ενώ οι υδρολυόμενες έχουν υδατάνθρακες και υδροξύλια εστεροποιημένα με φαινολικές ομάδες (de Araújo κ.ά., 2020).

Κύριες φυτικές πηγές ταννίνων είναι: διάφορα σιτάρια (σόργο, κριθάρι), διάφορα φασόλια, φρούτα (μπανάνα, μήλο, χουρμάδες, σταφύλια, ροδάκινα), κρασί, τσάι, ξηροί καρποί και κακάο (Brglez Mojzer κ.ά., 2016; Σφλώμος Κ., 2019, σσ 90).

Η προτιμότερη και συχνότερη εκχύλιση είναι με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα και πολικούς ή μη πολικούς διαλύτες για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

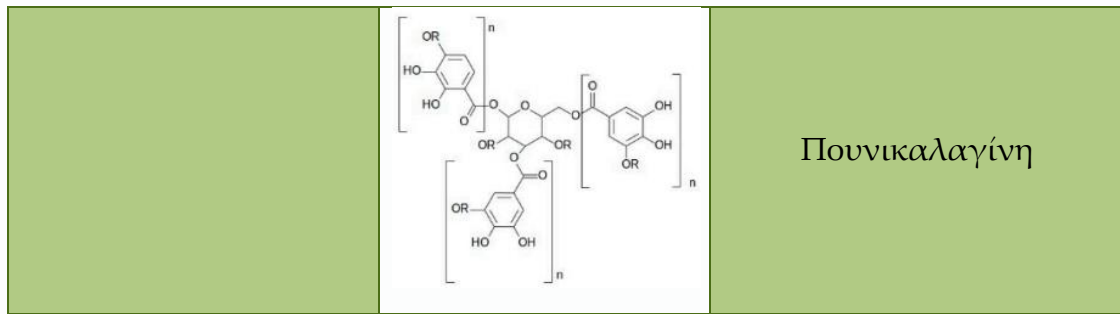
Οι ταννίνες διαθέτουν θετικές βιολογικές δράσεις σε μικρές ποσότητες με αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη ιδιότητα και προστατευτική ισχύ του καρδιαγγειακού συστήματος. Θεωρείται, όμως, πως μπορούν να δράσουν αρνητικά σε μεγάλες ποσότητες, έχοντας καρκινικές και αντι-θρεπτικές ικανότητες (Brglez Mojzer κ.ά., 2016). Βιβλιογραφικά, το ταννικό οξύ (Εικόνα 2.2), αντιπροσωπευτική ένωση των ταννίνων, έχει προκαλέσει βλάβες στο συκώτι (Σφλώμος Κ., 2019, σσ 90).



Εικόνα 2.2 Δομή ταννικού οξέος (National Center for Biotechnology Information, 2024)

Πίνακας 2.4 Κατάταξη λιγνάνων και ταννίνων με αντίστοιχες δομές και αντιπροσωπευτικές ενώσεις

Κατάταξη	Δομή	Αντιπροσωπευτικές ενώσεις
Λιγνάνες		
Λιγνάνες		Εντεροδιόλη
		Εντερολακτόνη
		Σεκοϊσολαρκικρεσινόλη
Ταννίνες		
Συμπυκνωμένες ταννίνες - προκυανιδίνες		Προκυανιδίνη Β1
		Προκυανιδίνη Β4
Υδρολύμενες ταννίνες: Γαλλοταννίνες Ελλαγιταννίνες		Θεογαλλίνη



Πηγή: Brglez Mojzer κ.ά., (2016)

2.2 Πηγές φαινολικών ουσιών

Οι ενώσεις απαντώνται σε όλο το φυτικό βασίλειο, αλλά οι βασικές πηγές είναι τα φρούτα και τα λαχανικά, καθώς και τα βότανα, οι καρποί, οι σπόροι, τα καρυκεύματα και παράγωγά τους. Παραδειγματικά, μεγάλες ποσότητες πολυφαινολών βρίσκονται σε κεράσια, σταφύλια, μούρα, εσπεριδοειδή, μήλα και τροπικά φρούτα, ενώ στα λαχανικά συναντώνται στα κρεμμύδια, σπανάκι, μπρόκολο, ντομάτα, καρότα, φασόλια και ελιές. Από την ομάδα των βοτάνων, καρπών και καρυκευμάτων, σημαντικά τρόφιμα είναι το κακάο, το μαύρο και πράσινο τσάι, ο καφές, το σέλινο, το γαρίφαλο, η μέντα, το δενδρολίβανο, ο κουρκουμάς, το φασκόμηλο, ο μαϊντανός, ο άνηθος, το θυμάρι και η πιπερόριζα (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Μερικές ενώσεις υπάρχουν σε πολλά φυτικά προϊόντα, όπως η κουερσετίνη, ενώ άλλες σε συγκεκριμένα τρόφιμα, όπως οι ισοφλαβόνες σε προϊόντα σόγιας. Η παρουσία πολυφαινολών και η ποσότητά τους στα φυτά διαφέρει μεταξύ τους, εξαρτώμενη από πολλούς παράγοντες. Ειδικότερα, εξαρτάται από το είδος του φυτού, το κλίμα, τους παράγοντες γεωργίας και καλλιέργειας, το στάδιο ωρίμανσης, την αποθήκευση, την προστασία ενάντια σε οξειδώσεις και τέλος την επεξεργασία των φυτικών προϊόντων (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

2.3 Δράση φαινολικών ουσιών

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν σκοπό την προστασία των φυτών στα οποία περιέχονται, ενάντια σε εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Ενισχύουν την αντίσταση ενάντια στις δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) και αζώτου (Reactive Nitrogen Species), το υπεριώδες φως, τα παράσιτα, τα παθογόνα και τους θηρευτές φυτών (Brglez Mojzer κ.ά., 2016). Ακόμα, μεταφέρουν ηλεκτρόνια σε ελεύθερες ρίζες και αντιμετωπίζουν το οξειδωτικό στρες (Brglez Mojzer κ.ά., 2016; de Araújo κ.ά., 2020). Έρευνες αναφέρουν τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των πολυφαινολών, ενώ έχει αποδειχθεί

πως δρουν προληπτικά και ανασταλτικά ενάντια σε διάφορες παθήσεις, συμπεριλαμβανομένου καρδιαγγειακών και τύπων καρκίνου (Brglez Mojzer κ.ά., 2016 ; de Araújo κ.ά., 2020).

Επιπλέον, παρατηρείται πως οι πολυφαινόλες μπορούν να προσφέρουν στην βιομηχανία τροφίμων, λόγω των οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους και των αντιοξειδωτικών δράσεών τους ως συντηρητικά που βελτιώνουν το χρώμα, την γεύση, την σύσταση, το άρωμα, την παρουσίαση και την φυσικοχημική ακεραιότητα των τροφίμων.

2.4 Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ενώσεων

Βασικός σκοπός της βιομηχανίας τροφίμων είναι η παρασκευή ποιοτικών προϊόντων που παραμένουν αναλλοίωτα για όλο το χρονικό διάστημα μέχρι την ημερομηνία λήξεως. Αυτό κατορθώνεται με την χρήση συντηρητικών που διασφαλίζουν την οργανοληπτική σταθερότητα και αναχαιτίζουν την μικροβιακή ανάπτυξη στα τρόφιμα. Ένα από τα κύρια φαινόμενα που προκαλούν μεταβολές στα τρόφιμα είναι η οξείδωση και κύρια πρόληψη κατά της είναι τα αντιοξειδωτικά.

2.4.1 Οξείδωση

Ως οξειδωτική καταπόνηση ή οξειδωτικό stress ή οξείδωση ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, όπου τα οξειδωτικά υπερτερούν (Dudonne κ.ά., 2009). Σε αυτή την περίπτωση, υπάρχει κίνδυνος αρνητικών επιπτώσεων σε μερικά μόρια, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, RNA και DNA, οδηγώντας σε ασθένειες, όπως καρκίνος, αρτηριοσκλήρωση και πρόωρη γήρανση (Lourenco κ.ά., 2019).

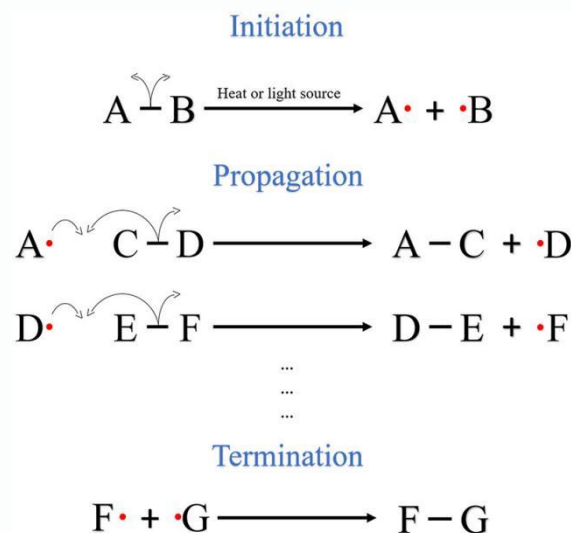
2.4.1.1 Ελεύθερες ρίζες

Η οξείδωση προκαλείται από την πλεονάζουσα παρουσία δραστικών μορφών τριών στοιχείων: οξυγόνου (Reactive Oxygen Species), αζώτου (Reactive Nitrogen Species) και θείου (Reactive Sulfur Species). Παράγονται δραστικές μορφές και ελεύθερες ρίζες, όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), ατομικό οξυγόνο ($O\cdot$), υπεροξείδιο ($O_2\cdot^-$) και ελεύθερη ρίζα νιτρικού οξειδίου ($NO\cdot$) (Carocho κ.ά., 2018).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι ένας γενικός όρος που χαρακτηρίζει τις ελεύθερες ρίζες από το οξυγόνο (Chib κ.ά., 2020). Οι ελεύθερες ρίζες με την σειρά τους, είναι

άτομα ή μόρια που διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα (Σφλώμος Κ., 2019, σσ 210).

Η πορεία αντιδράσεων ελεύθερων ριζών είναι, όπως φαίνεται στην [Εικόνα 2.3](#), σε τρία στάδια.



Εικόνα 2.3 Αντιδράσεις ελεύθερων ριζών [Carocho κ.ά., 2018](#).

Η πρώτη φάση, η έναρξη, όπου πραγματοποιείται ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών, η δεύτερη φάση, η αναπαραγωγή, όπου οι ρίζες αντιδρούν με άλλα μόρια μέχρι την τρίτη φάση, την λήξη, όπου διαμορφώνονται σε άλλα προϊόντα ([Carocho κ.ά., 2018](#)).

Η δημιουργία των δραστικών μορφών οξυγόνου, συνεπώς και των ελεύθερων ριζών, αποτελεί μέρος των μεταβολικών διεργασιών στο ανθρώπινο σώμα, ως παραπροϊόντα παραγωγής κυτταρικής ενέργειας και λειτουργιών. Εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν την ισορροπία οξειδωτικών - αντιοξειδωτικών είναι το στρες, η ρύπανση, η έκθεση στην ραδιενέργεια και τα χημικά βιομηχανιών, καθώς και ο ανθυγιεινός τρόπος ζωής (κάπνισμα, υπερβολική άσκηση, κακή διατροφή κλπ.) ([Carocho κ.ά., 2018](#); [Lourenco κ.ά., 2019](#)).

2.4.1.2 Οξειδωτική τάγγιση

Το φαινόμενο της οξείδωσης απαντάται σε κάθε βιολογικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων. Η οξείδωση στα τρόφιμα οδηγεί στην υποβάθμιση της ποιότητας και της ασφάλειάς τους, με αντιδράσεις οξείδωσης και αυτοοξείδωσης με σημαντικές ενώσεις (πρωτεΐνες, λίπη, βιταμίνες). Η πιο κοινή οξείδωση είναι αυτή των λιπών, η οξειδωτική τάγγιση, παράγοντας υπεροξειδία λιπιδίων .

Η οξειδωτική τάγγιση πραγματοποιείται καταλυτικά με το ένζυμο λιποξειδάση, όταν το οξυγόνο αντιδρά με τους διπλούς δεσμούς των λιπαρών οξέων, παράγοντας την ελεύθερη ρίζα υπεροξειδικού λιπιδίου (LOO•). Πέρα από την λιποξειδάση, η αντίδραση καταλύεται από την έκθεση στο φως, την θέρμανση (υψηλές θερμοκρασία κατά το ψήσιμο ή τηγάνισμα), το οξυγόνο ή τα μεταλλικά ιόντα (σίδηρος) και άλλα ένζυμα. Περισσότερο επιρρεπή είναι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και τα τρόφιμα πλούσια σε αυτά (Wasowicz κ.ά., 2004; Min B. και Ahn D.U., 2005; Carocho κ.ά., 2018; Chib κ.ά., 2020;).

Οι Min B. και Ahn D.U 2005 και Wasowicz κ.ά. 2004 περιγράφουν την αλυσιδωτή αντίδραση της οξειδωτικής τάγγισης ως εξής:

Έναρξη



όπου η εκκίνηση πραγματοποιείται όταν μια δραστική μορφή αποσπάει ένα ασταθές άτομο υδρογόνου από μια μεθυλομάδα του λιπιδίου LH, δημιουργώντας την ελεύθερη ρίζα L•.

Αναπαραγωγή

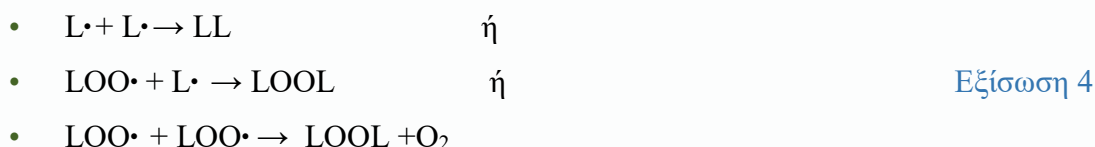


όπου υπό αερόβιες συνθήκες το αλκαδιένιο L• (σταθεροποιημένη ρίζα από μοριακό ανασχεδιασμό) αντιδρά με μόριο οξυγόνου για την δημιουργία της ελεύθερης ρίζας υπεροξειδικού λιπιδίου LOO•.



όπου επαναλαμβάνεται η απόσπαση ασταθούς H• άλλων λιπιδίων από την ρίζα LOO•, σχηματίζοντας υπεροξειδίο του λιπιδίου LOOH, με ενδιάμεσο στάδιο την Εξίσωση 2.

Λήξη



όπου οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με άλλες ρίζες ή με τον εαυτό τους, τερματίζοντας την οξειδωση.

Κατά συνέπεια, η οξειδωση έχει αρνητικές επιπτώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, με ανεπιθύμητη οσμή, γεύση, υφή και εμφάνιση. Έχει δηλωθεί πως τα τρόφιμα χαρακτηρίζονται από το φαινόμενο της ζεσταμένης γεύσης (Warmed-Over Food). Η ζεσταμένη γεύση περιγράφεται ως η γεύση και οσμή του χαρτονιού και τάγγισης σε λιπαρό και άπαχο κρέας, καθώς και κακή μυρωδιά ψαριού στα ψάρια. Ακόμα, έχει αρνητικές επιπτώσεις στην θρεπτική αξία του, καθώς διασπώνται και δεσμεύονται τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, οι πρωτεΐνες, οι βιταμίνες και δημιουργούνται τοξικές ενώσεις (πχ. κετόνες, εποξειδία, αλδεϋδες) (Carocho κ.ά., 2018; Wasowicz κ.ά., 2004).

2.4.2 Αντιοξειδωτικές βιοφαινόλες

Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια που αναχαιτίζουν το φαινόμενο της οξείδωσης. Η παρουσία τους σε μικρότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με αυτές των οξειδωτικών μειώνουν σημαντικά ή προλαμβάνουν τις αντιδράσεις και τα επακόλουθα αποτελέσματα (Moharram και Youssef, 2014). Εμφανίζονται φυσικά ενδογενώς στο αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού και εξωγενώς στα τρόφιμα, ενώ εμφανίζονται συνθετικά, όπως η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA) και το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) (Xu κ.ά., 2017; Dudonne κ.ά., 2009).

Η απομάκρυνση από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά, λόγω της πιθανής τους τοξικότητας, οδηγεί πολλές βιομηχανίες στα φυσικά αντιοξειδωτικά από τα τρόφιμα. Συγκεκριμένα, τα φρούτα, τα λαχανικά και τα αρωματικά φυτά είναι πλούσια σε ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή πολυφαινόλες, καροτενοειδή και βιταμίνες (Πίνακας 2.5) (Xu κ.ά., 2017).

Πίνακας 2.5 Κατάταξη φυσικών αντιοξειδωτικών με τις αντίστοιχες ενώσεις και πηγές

Αντιοξειδωτικά	Παραδείγματα ενώσεων		Κύριες πηγές
Φαινολικές ενώσεις	Γαλλικό οξύ Ανθοκυάνες	Ταννίνες Φλαβόνες Κατεχίνες	Φρούτα, λαχανικά, ξηροί καρποί, βότανα, κρασί, τσάι, κακάο, καφές

	Φλαβανό- λες		
Καροτενοειδή	β-καροτέ- νιο α-καροτέ- νιο	Λυκοπέ- νιο Λουτεΐνη	Φρούτα, λαχανικά
Βιταμίνες	Βιταμίνη Ε Βιταμίνη C		Όσπρια, δημητριακά Φρούτα, λαχανικά
Τερπενικά σώ- ματα	Τερπένια Καμφορές		Αιθέρια έλαια βοτάνων, α- ρωματικών φυτών, εσπερι- δοειδών

Πηγή: Σφλώμος Κ., 2019, σσ 213; Lourenco κ.ά., 2019

2.4.2.1 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

Σύμφωνα με τους [Moharram και Youssef 2014](#), τα αντιοξειδωτικά κατατάσσονται πρωτίστος ανάλογα με την λειτουργία τους και δευτερευόντως ως ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά και τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά. Τα πρωτεύοντα αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες δίνοντάς τους ηλεκτρόνια, σπάζοντας την αλυσίδα. Στην δομή είναι κυρίως φαινολικά και είναι αντιοξειδωτικά μέταλλα, βιταμίνες και φυτοχημικά (φλαβονοειδή, κατεχίνες, β-καροτένιο, λυκοπένιο, καροτενοειδή, διτερπένιο μαύρου πιπεριού, σκόρδου, κύμινου, θυμαριού) ([Chib κ.ά., 2020](#); [Moharram και Youssef, 2014](#)). Άλλα σημαντικά αντιοξειδωτικά είναι τα συνθετικά BHA, BHT, PG και οι τοκοφερόλες ([Wasowicz κ.ά., 2004](#)).



Εξίσωση 5

Οι ελεύθερες ρίζες αντιοξειδωτικών A• είναι σταθερές, διότι το μονήρες ηλεκτρόνιο μπορεί να μετεγκατασταθεί στον φαινολικό δακτύλιο που δυσκολεύει την αντίδραση με λιπαρά οξέα. Οδηγούν στην λήξη με την αντίδρασή τους με άλλες ελεύθερες ρίζες.



Εξίσωση 6

Τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά εμποδίζουν την πραγματοποίηση της οξείδωσης ως αναγωγικούς παράγοντες ή χηλικές ενώσεις μετάλλων (όπως κιτρικό οξύ και EDTA), ως παράγοντες δέσμευσης οξυγόνου ή αναγωγικούς παράγοντες (όπως ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλες) και ως ουσίες που ανακαλούν πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά (όπως ασκορβικό οξύ) (Wasowicz κ.ά., 2004).

Η δεύτερη κατηγορία διαφοροποιεί τα αντιοξειδωτικά σε ενζυμικά (ενδογενή παραγόμενα) τα οποία είναι ένζυμα, μόρια μικρού μοριακού βάρους και ενζυμικούς συμπαράγοντες, και σε μη ενζυμικά τα οποία είναι τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται συνήθως από την διατροφή (Moharram και Youssef, 2014).

2.4.2.2 Αντιοξειδωτικά ως πρόσθετα τροφίμων

Τα πρόσθετα τροφίμων χρησιμοποιούνται με σκοπό την συντήρηση των προϊόντων, την διατήρηση ή την ενίσχυση της γεύσης, οσμής, υφής και όψης τους. Ελέγχονται από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority) της Ευρωπαϊκής Ένωσης, από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration) των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, από την Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization) και την Επιτροπή των Πρόσθετων Τροφίμων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας των Ηνωμένων Εθνών και από τον Διατροφικό Κώδικα (Codex Alimentarius) (Carocho κ.ά., 2018). Εξετάζονται με βάση δεδομένων και πληροφοριών σχετικά με την χημική τους δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες, την χρήση τους και τα αποτελέσματα τοξικολογικών μελετών (Lourenco κ.ά., 2019).

Οι πολυφαινόλες αξιοποιούνται ως πρόσθετα με την μορφή εκχυλισμάτων βοτάνων (δενδρολίβανο, ρίγανη, θυμάρι) και φυτών (ιπποφαές, μύρτιλο). Τα εκχυλίσματα είναι πλούσια σε φλαβονοειδή και λοιπές φαινολικές ενώσεις που τα καθιστά αποτελεσματικά ακόμα και σε ποσότητες <0.01% που χρησιμοποιούνται (Σφλώμος Κ., 2019, σσ 248).

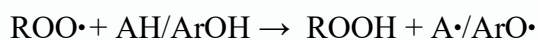
Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων έχει δώσει έγκριση στο εκχύλισμα δενδρολίβανου (*Rosmarinus officinalis*, syn: *Salvia rosmarinus*) για χρήση ως πρόσθετο τροφίμων. Ο κωδικός του είναι E392 και δεν έχει οριστεί Ανώτατη Ανεκτή Πρόσληψη

(Acceptable Daily Intake), λόγω της ασφάλειάς του. Χρησιμοποιείται σε προϊόντα επεξεργασμένου κρέατος, ψαριού, πατατών, αυγών, ξηρών καρπών, σε τσίγλες, σε συμπληρώματα διατροφής, σε σνακ και γάλα σε σκόνη (Carocho κ.ά., 2018).

2.4.2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Οι μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης βασίζονται στην ποσοτική και ποιοτική ένδειξή της. Οι μέθοδοι βασισμένες στην μεταφορά ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer) μετρούν την δυνατότητα των εξεταζόμενων ενώσεων να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου (Moharram και Youssef, 2014).

Ο μηχανισμός της δέσμευσης είναι:



Εξίσωση 7

όπου ArOH μια φαινόλη και ROO• μια ελεύθερη ρίζα. Η ρίζα ArO• είναι σταθερή λόγω συντονισμού.

Σε αυτές τις μεθόδους, ένας φθορίζον αισθητήρας και το εξεταζόμενο αντιοξειδωτικό αντιδρούν με την ελεύθερη ρίζα. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζεται ως η διαφορά της φθορίζουσας καμπύλης πτώσης του αισθητήρα παρουσίας και απουσίας του αντιοξειδωτικού (Moharram και Youssef, 2014).

Αντιθέτως, στις μεθόδους βασισμένες στην μεταφορά μονού ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer) τα αντιοξειδωτικά αντιδρούν με τον φθορίζον ή χρωστικό αισθητήρα, που δρα ως οξειδωτικός παράγοντας. Η δράση προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά ως την ικανότητα μείωσης ενός οξειδωτικού που συνοδεύεται με χρωματική αλλαγή. Η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών έχει άμεση σχέση με την αλλαγή του χρώματος και την μειωμένη ή αυξημένη απορρόφηση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Υπάρχουν μέθοδοι αποχρωματισμού όπως [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid (ABTS•⁺)] (Trolox - Equivalent Antioxidant Capacity) και [2,2-di (4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl (DPPH)] και μέθοδοι αυξημένης απορρόφησης λόγω αντίδρασης του αντιοξειδωτικού με τον δείκτη όπως Folin - Ciocalteu, FRAP και CUPRAC (Moharram και Youssef, 2014).

Αξίζει να σημειωθεί πως μέθοδοι που βασίζονται σε σταθερή ελεύθερη ρίζα, προσδιορίζουν την ανάσχεση ελεύθερης ρίζας ή την αντιοξειδωτική δράση, πληροφορίες που δεν είναι πάντα ακριβείς. Υπάρχει διαφορά μεταξύ της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής ιδιότητας. Η πρώτη έννοια εκφράζει την ικανότητα να περιορίζει την οξείδωση ενώ η δεύτερη εκφράζει την ικανότητα των ενώσεων να αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες. Η αντιοξειδωτική ικανότητα

προσδιορίζεται με μεγαλύτερη ακρίβεια όταν βρίσκεται στο εξεταζόμενο τρόφιμο (Moharram και Youssef, 2014).

2.4.2.4 Μέθοδοι εκχύλισης αντιοξειδωτικών

Η εκχύλιση φυτικών προϊόντων για την παραλαβή βιοενεργών ενώσεων παρουσιάζει προκλήσεις λόγω των φυτικών συμπλεγμάτων και των περίπλοκων δομών που περιέχουν. Αυτό καθιστά την αποδέσμευση των ενώσεων από τα φυτά απαιτητική. Η πολυπλοκότητα των φυτών, το φυτικό σύμπλεγμα και οι διαφοροποιήσεις στην χημική δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες καθιστούν αδύνατη την εκχύλιση πολυφαινολών με μια συγκεκριμένη μέθοδο. Το είδος του διαλύτη (πολικός ή μη πολικός), το είδος εκχύλισης (για παράδειγμα με μικροκύματα, με υπερήχους, με υψηλή υδροστατική πίεση) και οι συνθήκες διεκπεραίωσης της μεθόδου επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Επιπλέον, τα αποτελέσματα κάθε εκχύλισης θα διαφέρουν μεταξύ τους, διότι η προέλευση του εξεταζόμενου φυτικού προϊόντος και τρόπος αποθήκευσης είναι σημαντικοί παράγοντες (Lourenco κ.ά., 2019).

Οι διάφορες τεχνικές εκχύλισης αναφέρονται αναλυτικότερα στην επόμενη ενότητα.

Κεφάλαιο 3: Εκχύλιση φαινολικών ουσιών από αρωματικά φυτά

Τα αρωματικά φυτά διαθέτουν βιοενεργές ενώσεις στην φυσικοχημική τους σύσταση, οι οποίες λόγω των θεραπευτικών και βιολογικών δράσεών τους έχουν γίνει αντικείμενο εκτενούς έρευνας για την μελέτη και αξιοποίησή τους. Ο συνήθης τρόπος απομόνωσης και εξέτασης των δευτερευόντων μεταβολιτών είναι με τεχνικές εκχύλισης. Οι τεχνικές εκχύλισης κατατάσσονται στις κλασικές τεχνικές (απόσταξη με ατμό, υδροαπόσταξη, εκχύλιση με διαλύτη, διαβροχή) και στις σύγχρονες τεχνικές (εκχύλιση με υπερήχους, εκχύλιση με μικροκύματα, εκχύλιση με ένζυμα, εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό, εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό, εκχύλιση με υψηλή υδροστατική πίεση, εκχύλιση με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο) (Jones WP και Kinghorn AD, 2012; Prado κ.ά., 2015; Xu κ.ά., 2017).

3.1 Προσέγγιση της εκχύλισης

Η επιτυχής παραλαβή των επιθυμητών ενώσεων από τα εξεταζόμενα φυτικά προϊόντα βασίζεται σε μια εμπειριστατωμένη μελέτη των εμπλεκόμενων φαινομένων κατά την εκχύλιση, των παραγόντων που την επηρεάζουν και των φυτών που αναλύονται.

Η επιλογή δείγματος για την μελέτη του δημιουργεί προκλήσεις. Η φυσικοχημική σύσταση του φυτού είναι διαφοροποιημένη μεταξύ των επιμέρων σημείων του και μεταξύ των φυτών του ίδιου είδους (Jones WP και Kinghorn AD, 2012). Παραδειγματικά, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στις ποσότητες των εκχυλισμάτων αιθέριων ελαίων σε φυτό *Rosmarinus officinalis* ίδιου γένους και είδους, στα οποία η συγκομιδή ήταν σε διαφορετικές φαινολογικές εποχές (άνθηση, ωρίμανση καρπών) και περιοχές (Jordan κ.ά. 2013). Οι Sultana κ.ά., αναφέρουν πως σε φρούτα και δημητριακά, οι εσωτερικοί ιστοί (πολτός, μεσοκάρπιο) είναι φτωχότεροι σε διαλυτές φαινολικές ενώσεις από τους εξωτερικούς (επιδέρμιες και υποδέρμιες στρώσεις).

Επόμενο σημαντικό βήμα είναι η προετοιμασία του δείγματος. Η ξήρανση είναι απαραίτητη για την διατήρηση των επιπέδων υγρασίας σε γνωστά επίπεδα, καθώς και για την μικροβιακή σταθερότητα κατά την επεξεργασία και αποθήκευση (Jones WP και Kinghorn AD, 2012). Ακόμα, η κονιοποίηση των φυτών διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες, αποδεσμεύοντας τα βιοενεργά συστατικά και αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής με τον διαλύτη (Oreopoulou κ.ά., 2019).

Επιπρόσθετα, η ποικιλομορφία των φυτοχημικών επηρεάζει την διαλογή του διαλύτη της εκχύλισης. Είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψη η πολικότητα και το χημικό προφίλ των ενώσεων που θα παραληφθούν, ώστε να χρησιμοποιηθεί ο κατάλληλος διαλύτης. Οι πολικοί διαλύτες όπως το νερό, η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, η προπανόλη και τα υδατικά διαλύματά τους εκχυλίζουν τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά (πολλές φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και ανθοκυανιδίνες). Από την άλλη, οργανικοί διαλύτες, όπως μίγματα εξανίου ή αιθανικού αιθυλεστέρα με ακετόνη, μεθανόλη ή αιθανόλη, εκχυλίζουν λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά (Xu κ.ά., 2017). Ακόμα, η φύση του διαλύτη όσον αφορά την τοξικότητα, την περιβαλλοντική ρύπανση και το κόστος έχει σημασία ανάλογα με την εφαρμογή των προϊόντων. Επιβάλλεται η χρήση μη τοξικών και εγκεκριμένα από την οδηγία DIRECTIVE 2009/32/EC του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου ως ασφαλή προς κατανάλωση (food grade) διαλυτών στην βιομηχανία τροφίμων (Skendi κ.ά., 2022). Τέλος, η περιεκτικότητά του στο μείγμα διαλύτη - δείγματος πρέπει να είναι στο σωστό εύρος ώστε να μην υπάρχει κορεσμός από άλλα, ανεπιθύμητα συστατικά (Lourenco κ.ά., 2019).

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της εκχύλισης είναι η θερμοκρασία, ο χρόνος και το pH κατά την διεργασία. Η παρατεταμένη έκθεση των βιοενεργών συστατικών σε υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να προκαλέσει υδρόλυση και θερμική υποβάθμιση των θερμοευαίσθητων ενώσεων (Skendi κ.ά., 2022).

3.2 Κλασικές τεχνικές εκχύλισης

Οι κλασικές τεχνικές εκχύλισης είναι διεργασίες εκχύλισης στερεού - υγρού ή υγρού - υγρού συστήματος διαλύτη - δείγματος, υπό συνθήκες θέρμανσης ή/και ανάδευσης (Lourenco κ.ά., 2019), για την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών.

3.2.1 Απόσταξη ατμού (Steam Distillation, SD)

Η μέθοδος της εκχύλισης βασίζεται στην εξαγωγή πτητικών ουσιών που έχουν υψηλό σημείο βρασμού, με την χρήση κορεσμένου ή υπέρθερμου αέρα. Οι πτητικές ενώσεις μεταφέρονται από το δείγμα (στερεό ή υγρό) στον ατμό απορροφώντας την θερμότητα και ύστερα διαχέονται μέχρι να συμπυκνωθούν λόγω ψύξης. Το τελικό αποτέλεσμα διαχωρίζεται σε πτητικά έλαια και ανθόνερο ως διφασικό μείγμα.

Η απόσταξη με ατμό διαχωρίζεται σε ξηρή απόσταξη με ατμό, σε απευθείας απόσταξη με ατμό και σε υδροαπόσταξη. Η κατηγοριοποίηση είναι με γνώμονα την επαφή των ενώσεων με το νερό και τον ατμό.

Τα θετικά της μεθόδου είναι η απουσία προϊόντων οργανικού διαλύτη, το χαμηλό κόστος, η εύκολη πρόσβαση στην μεθοδολογία, η έλλειψη περαιτέρω επεξεργασιών και η δυνατότητα παραγωγής σε βιομηχανική κλίμακα.

Παράλληλα, στα αρνητικά της μεθόδου περιλαμβάνονται η πιθανής υδρόλυση και θερμική υποβάθμιση των πτητικών ενώσεων, οι υψηλές ανάγκες ενέργειας και το μεγάλο χρονικό διάστημα της διεργασίας (Prado κ.ά., 2015).

3.2.2 Υδροαπόσταξη (Hydrodistillation, HD)

Η υδροαπόσταξη παραλαμβάνει πτητικά οργανικά και μη οργανικά συστατικά με την χρήση απιονισμένου νερού. Η μέθοδος βασίζεται στην αποδέσμευση αρωματικών ενώσεων (τερπένια ή φυτοστερόλες) κατά την θερμική διάσπαση των κυτταρικών δομών σε φυτικές βιομάζες. Η απλότητα της μεθόδου συνοδεύεται από υδρόλυση και θερμική υποβάθμιση των αρωματικών ενώσεων. Τα ανεπιθύμητα φαινόμενα μειώνονται όταν η υδροαπόσταξη συνοδεύεται με σύγχρονες τεχνικές, όπως η εκχύλιση με μικροκύματα (Lizárraga-Velázquez κ.ά., 2020).

3.2.3 Εκχύλιση με διαλύτη - Εκχύλιση Soxhlet (Soxhlet Extraction, SS)

Η εκχύλιση Soxhlet εξάγει τα φυτοχημικά από τα φυτά με την βύθισή τους σε διαλύτη, εξάγοντας και εισάγοντας παράλληλα διαλύτη και δείγμα. Έτσι δημιουργείται ένα συνεχές και μη συνεχές σύστημα.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η διατήρησης της ισορροπίας μάζας με την εισαγωγή νέων φυτών στο δείγμα, η υψηλή θερμοκρασία του συστήματος, η έλλειψη του σταδίου της διήθησης και η δυνατότητα κλιμάκωσης της παραγωγής λόγω του χαμηλού κόστους της.

Αντιθέτως, τα μειονεκτήματα της εκχύλισης είναι η μεγάλη διάρκεια της μεθόδου, η μεγάλη ποσότητα στερεών αποβλήτων, η πιθανή υδρόλυση και θερμική αποσύνθεση των θερμοευαίσθητων ενώσεων, δεν υπάρχει δυνατότητα ανάδευσης για την εγρήγορση της πορείας αλλά είναι αναγκαία η εξάτμιση των μεγάλων ποσών επιλεκτικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν (Lopez-Bascon και Luque de Castro, 2020).

3.2.4 Διαβροχή (*Maceration*)

Η τεχνική αυτή είναι ευρέως εφαρμοσμένη λόγω της απλότητας της διεργασίας και του χαμηλού κόστους. Παρέχει όμως την μικρότερη απόδοση σε βιοενεργές ενώσεις σε σχέση με τις σύγχρονες εκχυλίσεις και σε μεγάλο χρονικό διάστημα. Η χαμηλότερη απόδοση οφείλεται στην ανάγκη της ανάκτησής τους από τον διαλύτη μέσω της εξάτμισης (Lizárraga-Velázquez κ.ά., 2020).

3.3 Σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης

Οι σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης είναι οι νεότερες προσεγγίσεις στην εκχύλιση που δεν μοιράζονται τα μειονεκτήματα των κλασικών μεθόδων. Τουναντίον, μερικές από τις τεχνικές ακολουθούν τις πρακτικές που αναφέρονται στην Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, κατηγοριοποιώντας τις ως “πράσινες τεχνικές”. Κάποιες από τις πρακτικές είναι η μείωση παραγώγων, η χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών, η πρόληψη της περιβαλλοντικής ρύπανσης και η ασφαλέστερη χρήση/σύνθεση χημικών (Azmir κ.ά., 2013).

3.3.1 Εκχύλιση με μικροκύματα (*Microwave Assisted Extraction, MAE*)

Η αρχή της μεθόδου είναι η παραλαβή διαλυτών μεταβολιτών μέσω των διαλυτών υπό ενέργεια μικροκυμάτων.

Τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης είναι ο μικρός χρόνος θέρμανσης, ο μικρότερος εξοπλισμός, οι μειωμένες θερμικές διαβαθμίσεις, η μειωμένη χρήση οργανικών διαλυτών και η αυξημένη ανάκτηση μεταβολιτών. Μειονέκτημα θεωρείται η επιλεκτικότητα στην εκχύλιση ακέραιων οργανικών και οργανομεταλλικών ενώσεων (Azmir κ.ά., 2013).

3.3.2 Εκχύλιση με υπερήχους (*Ultrasound Assisted Extraction, UAE*)

Σπηλαίωση ορίζεται το φαινόμενο της παραγωγής, ανάπτυξης και κατάρρευση φουσκών. Απαντάται σε υγρά και σε στερεά που περιέχουν υγρά. Η εκχύλιση UAE, όμως, έχει την δυνατότητα να απομακρύνει οργανικά και ανόργανα συστατικά από το φυτικό σύμπλεγμα, με την ένταση της ενέργειας υπερήχων. Η αύξηση στην ισχύ της ενέργειας υπερήχων μπορεί να ενισχύσει την μεταφορά μάζας και την επιφάνεια επαφής μεταξύ των δύο φάσεων, καθώς

και την διαπερατότητα των κυττάρων από τον διαλύτη (Azmir κ.ά., 2013, Vella και Laratta, 2023).

Η πορεία της εκχύλισης εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων των φυτικών προϊόντων, την περιεκτικότητά τους σε υγρασία, από τον επιλεγμένο διαλύτη και τις συνθήκες διεξαγωγής της εκχύλισης (θερμοκρασία, συχνότητα, χρόνος και πίεση της υπερήχησης) (Azmir κ.ά., 2013).

Ως προτερήματα της εκχύλισης χαρακτηρίζονται ο μειωμένος χρόνος εκχύλισης, η ελαχιστοποιημένη ποσότητα του διαλύτη και οι λιγότερες ενεργειακές ανάγκες. Το κεντρικό φαινόμενο της UAE βοηθά στην ανάδευση και την μεταφορά μάζας και ενέργειας. Ακόμα, προτερήματα είναι οι χαμηλές θερμοκρασίες εκχύλισης, η βελτιστοποιημένη διαχείριση της διεργασίας και η αυξημένη απόδοση των κλασσικών τεχνικών εκχύλισης, όταν γίνονται σε συνδυασμό με την UAE (Azmir κ.ά., 2013).

Από την άλλη μεριά, η υπερήχηση μπορεί να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου μέσα στις φούσκες, οδηγώντας στον σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου που μπορούν να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα του εκχυλίσματος (Rodríguez-Rojo κ.ά., 2012).

3.3.3 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

Το κρίσιμο σημείο είναι το σημείο συγκεκριμένης θερμοκρασίας και πίεσης, πάνω από το οποίο δεν υπάρχουν υγρές και αέριες φάσεις. Επομένως, στις υπερκρίσιμες περιοχές τα ρευστά έχουν αέριες ιδιότητες, χωρίς να μπορούν να υγροποιηθούν με αλλαγές στην θερμοκρασία και πίεση. Οι ιδιότητες αερίων του ιξώδους, της επιφανειακής τάσης, της διάχυσης και της πυκνότητας βοηθούν στην γρήγορη εκχύλιση με μεγάλο ποσοστό απόδοσης σε βιοδραστικές ενώσεις.

Ο καλύτερος διαλύτης για αυτή την τεχνική είναι το διοξείδιο του άνθρακα, λόγω της βολικής φυσικοχημικής του κατάστασης να μετατρέπεται σε υπερκρίσιμο υγρό.

Τα θετικά χαρακτηριστικά της εκχύλισης SFE είναι η βελτιωμένη μεταφορά μάζας, η μειωμένη χρονική διάρκεια της διεργασίας, η ευρεία επιλεκτικότητα, η έλλειψη θερμικής υποβάθμισης, η δυνατότητα εκχύλισης μικρών δειγμάτων, είναι οικολογικό στην χρήση οργανικών διαλυμάτων και δημιουργίας αποβλήτων και είναι βοηθητικό στην βελτιστοποίηση της εκχύλισης, δίνοντας πληροφορίες για αυτή (Azmir κ.ά., 2013).

3.3.4 Εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού (*Pressurized Liquid Extraction PLE*)

Γνωστή και ως ενισχυμένη εκχύλιση με διαλύτες (Enhanced Solvent Extraction, ESE), οι συνθήκες υψηλών πιέσεων διατηρούν σε ρευστή μορφή τους διαλύτες σε αυξημένες θερμοκρασίες, ενισχύοντας την εκχύλιση. Τα φαινόμενα που λαμβάνουν μέρος είναι η αύξηση της διαλυτότητας, η μείωση του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης των διαλυτών, καθώς και την ενίσχυση της μεταφοράς μαζών.

Η πράσινη τεχνική PLE υπερτερεί της εκχύλισης Soxhlet, σε χρήση διαλύτη και χρόνο (Azmir κ.ά., 2013).

3.3.5 Εκχύλιση με ένζυμα (*Enzyme Assisted Extraction, EAE*)

Η εκχύλιση με ένζυμα είναι μια μέθοδος εξαγωγής ενώσεων που είναι δεσμευμένα στα φυτικά συμπλέγματα. Η ανάκτηση των συγκρατημένων συστατικών πραγματοποιείται με την διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την υδρόλυση ουσιών του συμπλέγματος (πολυσακχαρίδια, λιπιδικά σώματα) από ορισμένα ένζυμα: κυτταρινάση, πεκτινάση και α-αμυλάση.

Η εκχύλιση διαχωρίζεται σε δύο υποομάδες, ανάλογα με την προσέγγισή της, σε υδάτινη εκχύλιση με ένζυμα (Enzyme Assisted Aqueous Extraction, EAQE) και σε εκχύλιση με ένζυμα κρύας πίεσης (Enzyme Assisted Cold Pressing, EACP). Η πρώτη συνήθως χρησιμοποιείται για την εκχύλιση ελαίων από καρπούς ενώ η δεύτερη για την υδρόλυση της κυτταρικής δομής τους (Azmir κ.ά., 2013).

Οι παράγοντες που επιδρούν στην εκχύλιση αποτελούν το σχήμα των σωματιδίων των φυτικών προϊόντων, η αναλογία στερεού/νερού, η σύνθεση και ποσότητα των ενζύμων και ο χρόνος υδρόλυσης. Το τελευταίο φαινόμενο επηρεάζεται από την περιεχόμενη υγρασία των φυτών.

Έρευνες μαρτυρούν την ασφαλέστερη και αποτελεσματικότερη εκχύλιση μεταβολιτών από φυτικά προϊόντα με την EACP, ενώ η EAE χαρακτηρίζεται οικολογική για την χρήση νερού ως διαλύτη (Azmir κ.ά., 2013).

3.3.6 Εκχύλιση με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (*Pulsed-Electric Field Extraction, PEF*)

Η τεχνική PEF βασίζεται στην βελτιστοποίηση της εκχύλισης με την διάσπαση των δομών κυτταρικών μεμβράνων των φυτικών προϊόντων, μειώνοντας τον χρόνο της μεθόδου. Αυτό

λαμβάνει μέρος σε ηλεκτρικό πεδίο, όπου το κύτταρο διαπερνάται από ένα ηλεκτρικό δυναμικό και διαχωρίζεται μοριακά. Ύστερα, τα μόρια δημιουργούν πόρους στην μεμβράνη για την αύξηση της διαπερατότητας, λόγω της απώθησης που προκλήθηκε από τον δυναμικό μετασχηματισμό. Η θερμοκρασία παραμένει σε χαμηλά επίπεδα, μειώνοντας την πιθανότητα της θερμικής υποβάθμισης φυσικοχημικών (Azmir κ.ά., 2013).

Κεφάλαιο 4: Πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiments, DOE)

4.1 Γενικά στοιχεία

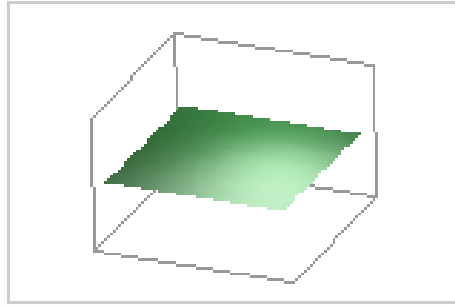
Ο πειραματικός σχεδιασμός (Design of experiments, DOE) αποτελεί μια τεχνική σχεδιασμού πειραμάτων και ανάλυσης των αποτελεσμάτων. Ο σχεδιασμός πραγματοποιείται με μια σειρά δοκιμών, των οποίων οι μεταβλητές αλλάζουν συστηματικά για την λήψη και επεξεργασία των πληροφοριών. Αυτά τα δεδομένα οδηγούν στην δημιουργία ενός μαθηματικού μοντέλου, με το οποίο εξετάζεται η επίδραση και η συσχέτιση κάθε μεταβλητής με την τιμή απόκρισης και τελικά παρέχει τις βέλτιστες συνθήκες για την επιθυμητή διεργασία. Ο πειραματικός σχεδιασμός είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την βελτίωση των πειραματικών συνθηκών της διεργασίας που εξετάζεται με σκοπό την υψηλότερη αποτελεσματικότητα. Κάνοντας χρήση ειδικευμένων προγραμμάτων για την δημιουργία πειραματικών σχεδιασμών, είναι δυνατή η οπτικοποίηση των δεδομένων και η εξαγωγή συμπερασμάτων (Whitford κ.ά., 2018).

4.2 Μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης – Response Surface Methodology (RSM)

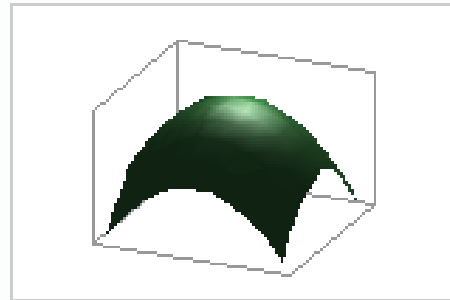
Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM), ή αλλιώς μεθοδολογία Box – Wilson, χρησιμοποιεί στατιστικές τεχνικές για να βοηθήσει στην κατανόηση και βελτίωση της απόκρισης. Η RSM, βασισμένη στους παραγοντικούς σχεδιασμούς Central Composite Design (CCD) και Box – Behnken Design (BBD) καθορίζει τις βέλτιστες συνθήκες μέσα από έναν περιορισμένο αριθμό πειραμάτων και εκτιμά τα πιθανά αποτελέσματα για τον σχεδιασμό μιας διεργασίας (Humbird και Fei, 2016).

Η υποψία ύπαρξης κυρτότητας στην επιφάνεια απόκρισης καλεί την χρήση της RSM. Η κυρτότητα οφείλεται στην εισαγωγή τετραγωνικών παραμέτρων στην εξίσωση επιφάνειας απόκρισης, σε αντίθεση με την εξίσωση για έναν παραγοντικό σχεδιασμό. Αυτή η διαφορά είναι χρήσιμη για:

- ο Την κατανόηση και περιγραφή μιας επιφάνειας απόκρισης, δίνοντας πληροφορίες για την επιρροή των μεταβλητών στην απόκριση ενδιαφέροντος.
- ο Την εύρεση βέλτιστων παραμέτρων για την απόκριση.
- ο Την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών λειτουργίας (Minitab).



Εικόνα 4.1 Επιφάνεια απόκρισης χωρίς κυρτότητα (Minitab).



Εικόνα 4.2 Επιφάνεια απόκρισης με κυρτότητα (Minitab).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η RSM βασίζεται σε δύο τύπους σχεδιασμούς επιφάνειας απόκρισης:

Central Composite Designs

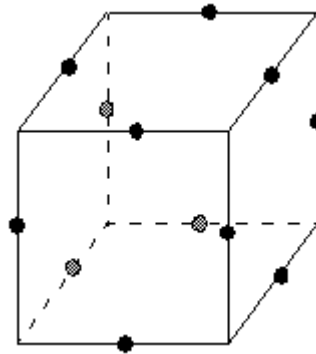
- ο Οι σχεδιασμοί CCD χρησιμοποιούνται όταν καλείται η εκτέλεση διαδοχικών πειραματισμών, καθώς οι σχεδιασμοί μπορούν να συμπεριλάβουν πληροφορίες από ένα παραγοντικό πείραμα που σχεδιάστηκε σωστά. Μπορούν να ταιριάζουν ένα πλήρες τετραγωνικό μοντέλο.

Box – Behnken Designs

- ο Συγκριτικά με τους σχεδιασμούς CCD, οι σχεδιασμοί BBD διαθέτουν λιγότερα σημεία σχεδιασμού που τους καθιστά να έχουν λιγότερο κόστος για ίδιο αριθμό μεταβλητών. Διαθέτουν 3 επίπεδα ανά μεταβλητή, ενώ οι CCD διαθέτουν έως 5 επίπεδα. Άλλη διαφορά είναι πως οι BBD δεν συμπεριλαμβάνουν σειρές πειραμάτων των οποίων όλες οι μεταβλητές είναι στις πιο ακραίες συνθήκες τους, όπως οι υψηλότερες ή χαμηλότερες τιμές. Τέλος, οι σχεδιασμοί BBD εκτιμούν αποτελεσματικά τους συντελεστές πρώτης και δεύτερης τάξης αλλά δεν είναι κατάλληλα για διαδοχικά πειράματα (Minitab).

4.3 Σχεδιασμός Box – Behnken (Box – Behnken Design, BBD)

Ο σχεδιασμός BBD, ως σχεδιασμός απόκρισης επιφάνειας, δεν βασίζεται σε πλήρης ή κλασματικούς παραγοντικούς σχεδιασμούς. Όπως φαίνεται στην [Εικόνα 4.3](#), στη μέση κάθε υποτομέα της διάστασης $k-1$ υπάρχουν τα σημεία σχεδιασμού. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, για ελάχιστο αριθμό μεταβλητών (τρεις μεταβλητές) τα σημεία βρίσκονται στην μέση των άκρων του πειραματικού χώρου ([Ait-Amir κ.ά., 2020](#)).



Εικόνα 4.3 Παράδειγμα BBD με τρεις μεταβλητές ([Minitab](#)).

Ο σχεδιασμός BBD δεν είναι κατάλληλος για διαδοχικά πειράματα αλλά μπορεί να μελετήσει διαδοχικά την επίδραση των μεταβλητών, με την προϋπόθεση να είναι σταθεροί οι υπόλοιποι μεταβλητές κατά την μελέτη των πρώτων μεταβλητών.

Ακολουθεί ο Πίνακας 4.1 όπου καταγράφονται ο αριθμός πειραμάτων και ο αριθμός συντελεστών που πρέπει να εκτιμηθούν σε περίπτωση 3,4,5 και 6 μεταβλητών για σχεδιασμό BBD ([Ait-Amir κ.ά., 2020](#)). Συνήθως, προτιμάται η προσθήκη δύο επιπλέον δοκιμών ως κεντρικά σημεία για 3 και 4 μεταβλητές (σύνολο τρία κεντρικά σημεία), ώστε η διακύμανση των σημείων στον πειραματικό χώρο να είναι η ίδια τόσο στην μέση του σχεδιασμού όσο και στο εξωτερικό του σχεδιασμού.

Πίνακας 4.1 Αριθμός πειραμάτων σε σχεδιασμό Box – Behnken ([Ait-Amir κ.ά., 2020](#))

Αριθμός μεταβλητών	3	4	5	6
Αριθμός συντελεστών	10	15	21	28
Αριθμός πειραμάτων	13	25	41	49

4.3 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Οι πειραματικοί σχεδιασμοί απαιτείται να ακολουθούνται από στατιστική ανάλυση των δεδομένων, με σκοπό την έκφραση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων. Ειδικότερα, η εύρεση στατιστικά σημαντικών παραμέτρων στο μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού για κάθε αποτέλεσμα απόκρισης γίνεται με την ανάλυση διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA) και την αξιολόγησή τους με στατιστικούς δείκτες, όπως p -value, F -value, βαθμοί ελευθερίας (Degrees of Freedom, DF), σύνολο τετραγώνων (Sum of Squares, SS), μέσο σύνολο τετραγώνων (Mean Sum of Squares, MSS), συντελεστές προσδιορισμού R^2 , $R^2(\text{adj})$ και $R^2(\text{pred})$.

Τα δεδομένα αποδόθηκαν σε γραφήματα Pareto, παραγοντικά γραφήματα (Factorial Plot) και ισοϋψές καμπύλες (Contour Plot) για την καλύτερη κατανόηση και έκφραση των επιδράσεων και αλληλεπιδράσεων των μεταβλητών στην απόκριση.

Τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού με την σειρά τους εξετάστηκαν με την μέθοδο Tukey, όπου χρησιμοποιείται pairwise post-hoc test για την εύρεση ύπαρξης ή μη διαφοράς μεταξύ των μέσων τιμών όλων των πιθανών ζευγαριών. Αποτελέσματα με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους αναγράφονται με διαφορετικό γράμμα.

Η συσχέτιση μεταξύ δύο μεταβλητών εκτιμήθηκε με τον στατιστικό δείκτη Pearson's Correlation Coefficient (r) με βάση την γραμμικότητά της σχέσης τους.

Κεφάλαιο 5: Υλικά και μεθοδολογία

5.1 Προετοιμασία του δείγματος

Τα φύλλα δενδρολίβανου και τα φύλλα παραπροϊόντος δενδρολίβανου (*S. rosmarinus*) αποκομίστηκαν από την εταιρία Natural Food Additives G.P. (<https://www.natural-foodadditives.com>) (Αθήνα, Ελλάδα). Τα φύλλα παραπροϊόντος είναι απόβλητα ατμοαπόσταξης φύλλων δενδρολίβανου.

Δείγμα κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου παρασκευάστηκε από την κονιοποίηση φύλλων δενδρολίβανου σε μηχανή πολυκόφτη.

5.2 Υλικά - Όργανα

Δείγματα

- ▶ Φύλλα δενδρολίβανου *S. rosmarinus*
- ▶ Φύλλα παραπροϊόντος δενδρολίβανου *S. rosmarinus*
- ▶ Κονιοποιημένα φύλλα δενδρολίβανου *S. rosmarinus*

Αντιδραστήρια- Διαλύτες

- ▶ Αιθανόλη 99.8%
- ▶ Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Merck KGaA, Γερμανία)
- ▶ Κορεσμένο διάλυμα Na₂CO₃
- ▶ Ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH-CH₃COONa 300 mM, pH=3.6
- ▶ TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) (Sigma Chemical)
- ▶ Τριγλωριούχος σίδηρος εξαϋδρικός, FeCl₃•6H₂O (Sigma Chemical)
- ▶ Απιονισμένο νερό

Εργαστηριακός εξοπλισμός

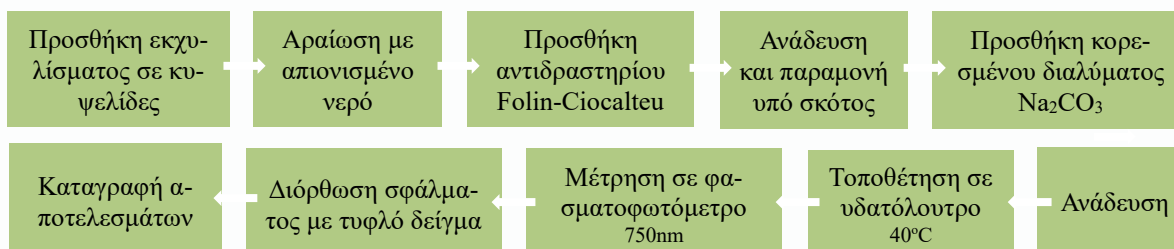
- ▶ Ποτήρια ζέσεως διάφορων όγκων
- ▶ Θερμόμετρο
- ▶ Δοχεία Falcon των 15 mL και 50 mL
- ▶ Μικροσύριγγες με αντίστοιχες πιπέτες των 10-100 µL και 100-1000 µL
- ▶ Πλαστικές κυψελίδες των 4,0 mL

- ▶ Σωληνάρια Eppendorf των 5,0 mL
- ▶ Ηλεκτρονικός ζυγός (Chyo Balance Corporation, Ιαπωνία)
- ▶ Ομογενοποιητής υπερήχων Sonoplus HD 2070 (Bandelin Sonoplus, Βερολίνο, Γερμανία)
- ▶ Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV - Vis Spectrophotometer Spectro 23 RS (Labomed Inc., ΗΠΑ)
- ▶ Φυγόκεντρος Centrifuge Cencom II (J.P. Selecta, S.A., Ισπανία)
- ▶ Υδατόλουτρο Memmert W270 (Mettler GmbH + Co., Γερμανία)
- ▶ Λογισμικό στατιστικής ανάλυσης Minitab (Minitab, LLC. PA, ΗΠΑ)

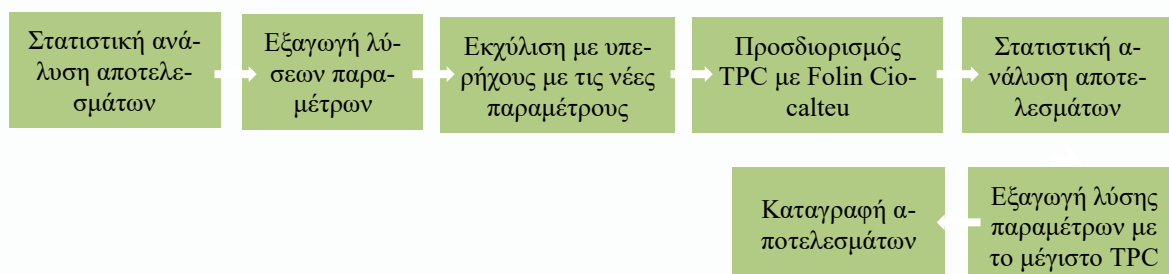
5.3 Διαγράμματα πειραματικής πορείας



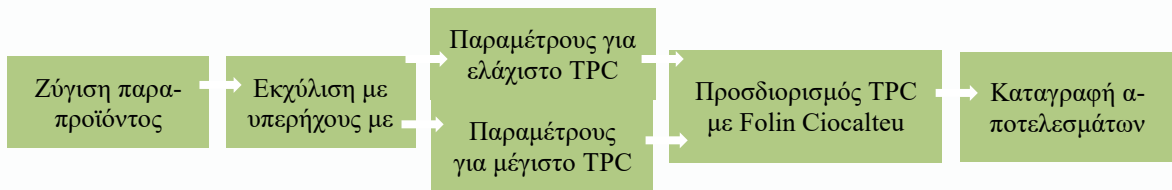
Διάγραμμα 5.1. Εκχύλιση φαινολικών ουσιών με υπερήχους από δείγμα φύλων δενδρολίβανου.



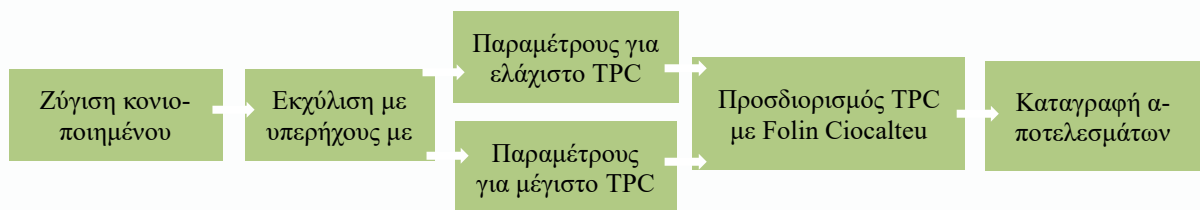
Διάγραμμα 5.2. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content) με την μέθοδο Folin – Ciocalteu.



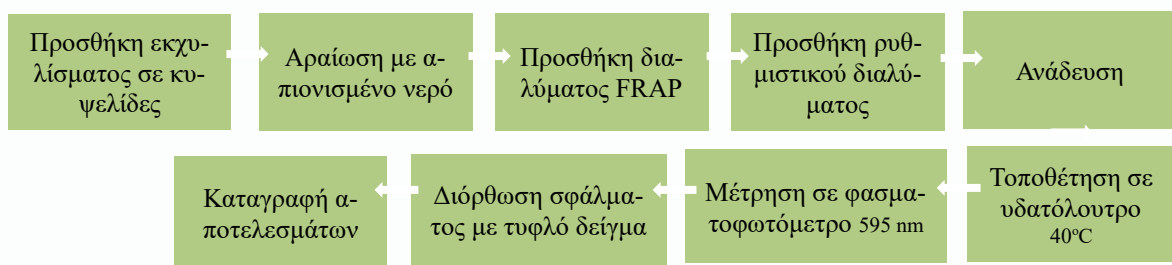
Διάγραμμα 5.3. Εύρεση βέλτιστων παραμέτρων για μέγιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο.



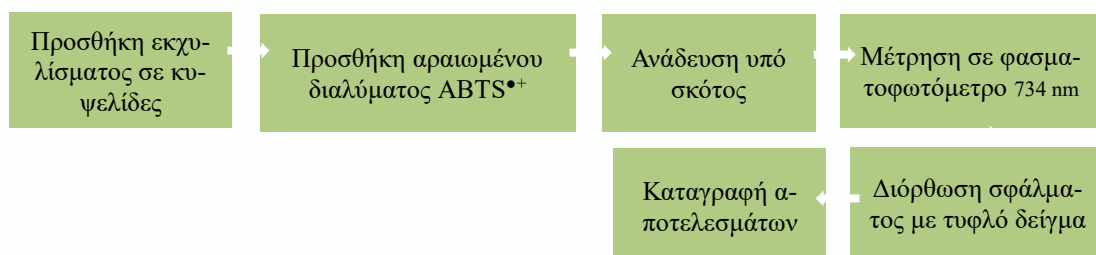
Διάγραμμα 5.4. Εκχύλιση με υπερήχους και προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου για δείγμα φύλλων παραπροϊόντος δενδρολίβανου.



Διάγραμμα 5.5. Εκχύλιση με υπερήχους και προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου για δείγμα κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου.



Διάγραμμα 5.6. Προσδιορισμός αναγωγικής ισχύος/αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) φύλλων δενδρολίβανου, φύλλων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου.



Διάγραμμα 5.7. Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS•⁺ φύλλων δενδρολίβανου, φύλλων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου.

5.4 Εκχύλιση με υπερήχους

Πίνακας 5.1. Πειράματα Box – Behnken δενδρολίβανου

<i>Run order</i>	Περιεκτικότητα EtOH (% w/w)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ισχύς US (% W)	Αναλογία διαλύτη/δείγματος (mL/g)
1	60	10	50	60
2	60	25	80	20
3	100	25	50	60
4	100	25	50	20
5	20	25	20	40
6	60	25	80	60
7	60	10	80	40
8	100	25	20	40
9	20	25	50	60
10	100	40	50	40
11	20	25	80	40
12	60	40	50	20
13	60	40	20	40
14	60	10	20	40
15	20	25	50	20
16	60	40	50	60
17	60	25	20	20
18	60	25	50	40
19	100	10	50	40
20	60	25	50	40
21	60	40	80	40
22	60	25	20	60
23	20	10	50	40
24	60	10	50	20
25	100	25	80	40
26	20	40	50	40
27	60	25	50	40

Πραγματοποιήθηκε σειρά εκχυλίσεων 27 δειγμάτων φύλλων δενδρολίβανου. Το κάθε δείγμα είχε βάρος 0.500 ± 0.050 g και τοποθετήθηκε σε δοχείο Falcon των 50.0 mL.

Προστέθηκε σε κάθε δοχείο Falcon η αντίστοιχη αναλογία διαλυτών αιθανόλης και νερού σύμφωνα με τον Πίνακα 5.1. Ύστερα τοποθετήθηκε στον ομογενοποιητή υπερήχων, καθώς βρισκόταν σε παγόλουτρο για την σταθεροποίηση της θερμοκρασίας του διαλύματος (κάτω από 40°C). Αντίστοιχα, η ισχύ των υπερήχων και ο χρόνος εκχύλισης ρυθμίστηκαν ανάλογα με την σειρά πειράματος που προτάθηκε από το μοντέλο πρόβλεψης του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken.

Μεταφέρθηκε η υγρή φάση του δείγματος με την χρήση πιπέτας σε δοχείο Falcon των 15 mL, με ενδιάμεσο στάδιο την φυγοκέντριση σε περίπτωση που ήταν θολό το υγρό δείγμα.

Τα δείγματα παρέμειναν για συντήρηση σε συνθήκες κατάψυξης.

5.5 Μέθοδος Folin – Ciocalteu για τα 27 δείγματα φύλλων δενδρολίβανου

Προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) των 27 δειγμάτων εκχύλισης με την μέθοδο Folin - Ciocalteu, όπου οι φαινολικές ενώσεις ανάγουν το αντιδραστήριο (άλατα μολυνδαινίου και βολφραμίου). Τα αναγόμενα οξείδια έχουν κυανό χρώμα ανάλογα με την περιεκτικότητα σε φαινολικό περιεχόμενο.

Για κάθε δείγμα, έγινε λήψη εκχυλίσματος όγκου 100,0 μL με μικροσύριγγα σε πλαστική κυψελίδα των 4,0 mL. Προστέθηκαν 2400,0 μL απιονισμένου νερού και 200,0 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και παραμονή στο σκότος για 8'. Έπειτα, έγινε προσθήκη 500,0 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 , αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 40°C για 30 min υπό σκότος.

Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων (σε θερμοκρασία δωματίου) με φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 750 nm. Η μέτρηση έγινε για κάθε δείγμα εις τριπλούν και το αποτέλεσμα διορθώθηκε με την αφαίρεση της απορρόφησης του τυφλού δείγματος.

Το TPC εκφράζεται ως mg Gallic Acid Equivalents (GAE) ανά g ξηρού δείγματος, με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος εύρους 25-2600 mg/L ($y = 0.0005x + 0.0783$, $R^2=0.9989$)

Ακολούθησε η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την εξαγωγή τριών σειρών πειραμάτων συνθηκών μέγιστης εκχύλισης ολικού φαινολικού περιεχομένου (Πίνακας 5.4). Επαναλαμβάνεται η διαδικασία για κάθε ομάδα δειγμάτων (φύλλων δενδρολίβανου, φύλ-

λων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου) σε συνθήκες που προβλέπεται βέλτιστη παραλαβή και σε συνθήκες που παρατηρήθηκε η μέση και η ελάχιστη παραλαβή. Η ποσότητα του κάθε παραπάνω δείγματος που προστέθηκε στην κυψελίδα αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5.2. Ποσότητες δείγματος στις κυψελίδες εκφρασμένες σε μL

Δενδρολίβανο			Παραπροϊόν δενδρολίβανου			Κονιοποιημένο δενδρολίβανο		
Μέγιστο	Μέσο	Ελάχιστο	Μέγιστο	Μέσο	Ελάχιστο	Μέγιστο	Μέσο	Ελάχιστο
TPC	TPC	TPC	TPC	TPC	TPC	TPC	TPC	TPC
50	100	100	40	40	40	10	10	10

Τα εκχυλίσματα μέσης και ελάχιστης παραλαβής επιλέχθηκαν ως τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν υπό αυτές τις συνθήκες:

Πίνακας 5.3 Παράμετροι εκχυλίσεων για μέση (M) και ελάχιστη (E) παραλαβή φαινολικών ουσιών φύλλων δενδρολίβανου, φύλλων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου

Εκχύλιση	Περιεκτικότητα EtOH (% w/w)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ισχύς US (% W)	Αναλογία διαλύτη/δείγματος (mL/g)
M (Run 26)	20	40	50	40
E (Run 23)	20	10	50	40

5.6 Πειραματικός Σχεδιασμός – Στατιστική Ανάλυση

Με σκοπό την παραλαβή μιας αποτελεσματικής σειράς πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Minitab. Με τον πειραματικό σχεδιασμό Box - Behnken Design, το μοντέλο πρόβλεψης πρότεινε έναν συνδυασμό 4 παραμέτρων με 3 επίπεδα τιμών την καθεμία, τυχαίας σειράς για αποφυγή συστηματικών σφαλμάτων. Ελήφθησαν 27 πειράματα με διαφορετικούς συνδυασμούς τεσσάρων παραμέτρων: περιεκτικότητα αιθανόλης στο διάλυμα, χρόνος, ισχύς υπερήχων και αναλογία διαλύματος/δείγματος.

Έχοντας τα αποτελέσματα περιεκτικότητας ολικού φαινολικού περιεχομένου για τα 27 δείγματα εκφρασμένα ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση, έγινε η στατιστική ανάλυσή τους

με ανάλυση διακύμανσης ANOVA. Εξετάστηκε η στατιστική σημαντικότητα σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p < 0.05$) για κάθε παράμετρο, το τετράγωνό της καθώς και την γραμμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Παρήχθησαν διαγράμματα με τα αποτελέσματα ενώ παράλληλα δόθηκε η εξίσωση πρόβλεψης. Έχοντας βάλει ως συνθήκη την παραλαβή του μέγιστου TPC για αυτές τις παραμέτρους, παρήχθησαν τρεις λύσεις για βέλτιστες τιμές:

Πίνακας 5.4 Σειρές πειραμάτων για την βέλτιστη εκχύλιση TPC

Run Order	Περιεκτικότητα EtOH (% w/w)	Χρόνος (s)	Ισχύς US (% W)	Αναλογία διαλύματος-δείγματος (mL/g)
1 ^a	100.00	40	80	38.59
2 ^b	100.00	40	80	60.00
3 ^c	91.80	40	80	20.00

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των παραπάνω πειραμάτων με Tukey's Honest Significant Difference test εξετάζει την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ανάμεσά τους.

Αποτελέσματα με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους αναγράφονται στους πίνακες και στα διαγράμματα με διαφορετικά γράμματα.

5.7 Μέθοδος FRAP

Προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα τριών εκχυλισμάτων (εκχυλίσματα από μέγιστη, μέση και ελάχιστη παραλαβή φαινολικών ουσιών) ανά ομάδα (φύλλων δενδρολίβανου, φύλλων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου) με την μέθοδο FRAP. Στην μέθοδο αυτή, εξετάζεται η ικανότητα του αντιοξειδωτικού να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο, ώστε να γίνει η αναγωγή του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη (Fe^{+3} -TPTZ) σε δισθενή σίδηρο (Fe^{+2} -TPTZ). Παρασκευάστηκε το διάλυμα FRAP με ανάμιξη 100,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος, 10,0 mL $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ και 10,0 mL TRTZ.

Παραλήφθηκαν από κάθε εκχύλιση x ποσότητα δείγματος σε πλαστικές κυψελίδες των 4,0 mL.

Έγινε αραιώση με (2000 - x) μL απιονισμένο νερό. Οι ποσότητες του κάθε δείγματος αναφέρονται στον Πίνακα 5.2. Προστέθηκαν 900,0 μL διαλύματος FRAP και 500,0 μL ρυθμιστικού διαλύματος $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$. Αναδεύτηκε το διάλυμα και θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 40°C για 90 min.

Μετρήθηκε η απορρόφηση με φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 595 nm. Η μέτρηση έγινε για κάθε δείγμα εις τριπλούν και το αποτέλεσμα διορθώθηκε με την αφαίρεση της απορρόφησης του τυφλού δείγματος.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράστηκε σε mg Fe^{+2} ανά g ξηρού δείγματος, με την χρήση της καμπύλης αναφοράς δισθενούς σιδήρου σε εύρος 25-1800 μM ($y = 0.0003x + 0.0081$, $R^2=0,9969$).

5.8 Μέθοδος ρίζας $\text{ABTS}^{\bullet+}$ [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid)]

Εκτιμήθηκε η αντιριζική δράση των τριών εκχυλισμάτων (εκχυλίσματα από μέγιστη, μέση και ελάχιστη παραλαβή φαινολικών ουσιών) ανά ομάδα (φύλλων δενδρολίβανου, φύλλων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου) με την μέθοδο της ρίζας $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Στη μέθοδο αυτή, οι φαινολικές ενώσεις εξετάζονται για την ικανότητά τους να δεσμεύσουν την ελεύθερη ρίζα, δίνοντας υδρογόνο ή ηλεκτρόνιο, αποχρωματίζοντας την μπλε - πράσινη ένωση.

Η παρασκευή διαλύματος ρίζας $\text{ABTS}^{\bullet+}$ πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από Lantzouraki κ.ά., 2014. Στη συνέχεια, αραιώθηκε μέρος του αντιδραστηρίου με αιθανόλη ώστε η απορρόφηση να πλησιάζει την μονάδα ($A_{734\text{nm}} \approx 1$).

Παραλήφθηκαν από κάθε εκχύλισμα x ποσότητα δείγματος σε πλαστικές κυψελίδες των 4,0 mL (Πίν 5.2). Έγινε προσθήκη 3000,0 μL αραιωμένου διαλύματος ρίζας $\text{ABTS}^{\bullet+}$ και αναδεύτηκε για 1 min υπό σκότος. Η μέτρηση απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο έλαβε μέρος μέσα στα επόμενα 8 min, σε μήκος κύματος 734 nm.

Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου έγινε με αιθανόλη έναντι απιονισμένου νερού. Η μέτρηση των δειγμάτων έγινε για κάθε ένα εις τριπλούν και το αποτέλεσμα διορθώθηκε με την αφαίρεση από την απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος ρίζας $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

Η αντιριζική δράση εκφράζεται ως $\text{mg Trolox Equivalent}$ s (TE) ανά g ξηρού δείγματος, με την χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox 0.20-1.50 mM ($y = 0.2876x - 0.002$, $R^2=0.9995$)

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα και συζήτηση

6.1 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin – Ciocalteu για τα 27 δείγματα φύλλων δενδρολίβανου

Πίνακας 6.1 Πειραματικά αποτελέσματα μεθόδου Folin - Ciocalteu δενδρολίβανου

Δοκιμή	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg GAE/g ξ.δ) ± SD	Αρχική θερμοκρασία (°C)	Τελική θερμοκρασία (°C)
1	0.926 ± 0.169	28	14
2	2.185 ± 0.404	21	15
3	1.503 ± 0.284	19	14
4	1.756 ± 0.084	19	24
5	1.181 ± 0.152	27	21
6	3.110 ± 0.536	26	18
7	2.119 ± 0.341	25	16
8	1.753 ± 0.039	22	23
9	1.737 ± 0.090	29	14
10	3.248 ± 0.243	20	5
11	3.073 ± 0.678	22	11
12	3.290 ± 0.391	24	16
13	2.265 ± 0.439	26	25
14	1.197 ± 0.182	29	14
15	1.660 ± 0.155	21	18
16	2.421 ± 0.134	26	13
17	1.938 ± 0.056	24	18
18	2.442 ± 0.400	25	21
19	1.738 ± 0.056	22	12
20	2.759 ± 0.156	23	20
21	5.846 ± 0.180	27	38
22	1.880 ± 0.318	22	13
23	0.307 ± 0.104	25	18
24	1.532 ± 0.176	27	25
25	5.760 ± 0.184	22	21
26	2.959 ± 0.325	28	19
27	2.260 ± 0.127	27	18

Στον Πίνακα 6.1 αναγράφονται τα αποτελέσματα από την μέθοδο Folin-Ciocalteu για τα 27 πειράματα. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο δόθηκε σε mg γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος.

Παρατηρείται πως υπάρχει μια σειρά πειραμάτων με την μέγιστη παραλαβή φαινολικών ουσιών (21), μια σειρά με την μέση παραλαβή (26) και μια σειρά με την ελάχιστη παραλαβή (23). Οι συνθήκες αυτές παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.2):

Πίνακας 6.2 Παράμετροι για μέγιστη (B), μέση (M) και ελάχιστη (E) παραλαβή φαινολικών ουσιών

<i>Εκχύλιση</i>	<i>Περιεκτικότητα EtOH (% w/w)</i>	<i>Χρόνος εκχύλισης (min)</i>	<i>Ισχύς US (% W)</i>	<i>Αναλογία διαλύτη/δείγματος (mL/g)</i>
<i>B (Run 21)</i>	60	40	80	40
<i>M (Run 26)</i>	20	40	50	40
<i>E (Run 23)</i>	20	10	50	40

Σημειώνεται πως οι συνθήκες για την μέση και ελάχιστη εκχύλιση φαινολικών ουσιών είναι παρόμοιες, με διαφορά τον χρόνο εκχύλισης. Το φαινολικό περιεχόμενο αυξήθηκε με την αύξηση του χρόνου, λόγω της μεγαλύτερης διάρκειας εκχύλισης (Wang κ.ά., 2008).

Οι διαφορές μεταξύ της μέγιστης και μέσης εκχύλισης φαινολικών ουσιών είναι η περιεκτικότητα σε αιθανόλη και η ισχύς των υπερήχων. Έχει εκτιμηθεί πως η περιεκτικότητα αιθανόλης μεταξύ 50-75% σε διάλυμα αιθανόλης-νερού είναι ο βέλτιστος διαλύτης για την μεγιστοποίηση της εκχύλισης του ολικού φαινολικού περιεχομένου από παραπροϊόντα σταφυλιού και ελιάς. Αυτό συμβαίνει διότι γίνεται περισσότερη εκχύλιση πολικών ουσιών πολυφαινολών με έναν πολικό οργανικό διαλύτη (Paini κ.ά., 2016). Επιπλέον, η ύπαρξη ύδατος προκαλεί την διόγκωση του φυτικού πλέγματος, διευκολύνοντας την εισχώρηση του διαλύτη και την διαλυτοποίηση των περιεχόμενων συστατικών (Vella και Laratta, 2023). Η αναλογία όμως θα διαφέρει ανάλογα με το φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος και το δίκτυο του φυτού που εξετάζεται (Oreopoulou κ.ά., 2019).

Η αυξημένη ισχύ υπερήχων οδήγησε στην άνοδο της θερμοκρασίας του εκχυλίσματος. Το εκχύλισμα B είχε τελική θερμοκρασία 38°C ενώ τα εκχυλίσματα M και E είχαν τελική θερμοκρασία 18 και 19°C αντίστοιχα (Πίνακας 6.1). Η άνοδος της θερμοκρασίας ευνόησε την παραλαβή φαινολικών ουσιών λόγω της υψηλότερης διαπερατότητας των τοίχων των κυττάρων, των φαινομένων μεταφοράς μάζας και θερμότητας καθώς και λόγω της υψηλότερης

διαλυτότητας του διαλύτη. Συνοπτικά, μεγαλύτερη παραλαβή εμφανίζεται στο εύρος 20-80°C (Oreopoulou κ.ά., 2019)

Η αναλογία διαλύτη - δείγματος μένει σταθερή και στα τρία εκχυλίσματα. Έχει παρατηρηθεί πειραματικά πως η αναλογία 40:1 ήταν βέλτιστη για την παραλαβή φαινολικών ουσιών από κινέζικο φυτό, ενώ αυξάνοντας την αναλογία δεν απέδωσε περισσότερο (Oreopoulou κ.ά., 2019).

6.2 Στατιστική ανάλυση

6.2.1 Ανάλυση Διακύμανσης ANOVA στα 27 δείγματα φύλλων δενδρολίβανου

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των 27 δειγμάτων φύλλων δενδρολίβανου από την μέθοδο Folin – Ciocalteu με την χρήση ανάλυσης διακύμανσης ANOVA.

Εξετάστηκαν οι παράγοντες: περιεκτικότητα σε αιθανόλη EtOH (% w/w), χρόνος εκχύλισης (min), ισχύς υπερήχων (% W), αναλογία διαλύτη/δείγματος (mL/g), καθώς και το τετράγωνό τους και η γραμμική αλληλεπίδρασή τους ως προς την στατιστική σημαντικότητα τους και την επιρροή τους στις τελικές τιμές.

Πίνακας 6.3 Ανάλυση διακύμανσης ANOVA παραμέτρων εκχύλισης φύλλων δενδρολίβανου

	Source	F-Value	P-Value
	Model	5.29	0.003
	Linear	14.14	0.000
	EtOH content (%)	4.22	0.062
	Extraction time (min)	26.82	0.000
	US power (%)	25.39	0.000
	Solvent/material ratio (mL/g)	0.11	0.745
	Square	2.51	0.098
	EtOH content (%)*EtOH content (%)	0.54	0.476
	Extraction time (min)*Extraction time (min)	0.06	0.816
	US power (%)*US power (%)	2.73	0.124
	Solvent/material ratio (mL/g)*Solvent/material ratio (mL/g)	3.60	0.082
	2-Way Interaction	1.26	0.345
	EtOH content (%)*Extraction time (min)	0.70	0.418
	EtOH content (%)*US power (%)	2.41	0.146

<i>EtOH content (%)</i> * <i>Solvent/material ratio (mL/g)</i>	0.06	0.813
<i>Extraction time (min)</i> * <i>US power (%)</i>	3.82	0,074
<i>Extraction time (min)</i> * <i>Solvent/material ratio (mL/g)</i>	0.04	0.850
<i>US power (%)</i> * <i>Solvent/material ratio (mL/g)</i>	0.52	0.484
<i>Error</i>		
<i>Lack-of-Fit</i>	8.52	0.110
<i>Pure Error</i>		
<i>Total</i>		

Ορίζοντας το επίπεδο σημαντικότητας ως $\alpha > 0,3$, παρατηρείται πως σε μερικούς παράγοντες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, καθώς η τιμή p είναι αρκετά μεγαλύτερη, που οδήγησε στην αφαίρεσή τους. Παρ' όλο που ο παράγοντας D έχει υψηλή τιμή p ($p=0.745$), δεν μπορεί να αφαιρεθεί, διότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα στον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, ως ο παράγοντας της αναλογίας διαλύτη/δείγματος.

Οπότε, ύστερα από την απόρριψη των παραπάνω τιμών, οι υπολογισμοί από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA είναι:

Πίνακας 6.4 Ανάλυση διακύμανσης ANOVA παραμέτρων εκχύλισης φύλλων δενδρολίβανου χωρίς τους μη στατιστικά σημαντικούς παράγοντες

<i>Source</i>	<i>DF</i>	<i>Adj SS</i>	<i>Adj MS</i>	<i>F-Value</i>	<i>P-Value</i>
<i>Model</i>	8	33.4642	4.1830	11.73	0.000
<i>Linear</i>	4	26.1871	6.5468	18.35	0.000
<i>EtOH content (%)</i>	1	1.9529	1.9529	5.47	0.031
<i>Extraction time (min)</i>	1	12.4237	12.4237	34.83	0,000
<i>US power (%)</i>	1	11.7592	11.7592	32.97	0.000
<i>Solvent/material ratio (mL/g)</i>	1	0.0512	0.0512	0.14	0.709
<i>Square</i>	2	4.3912	2.1956	6.16	0.009
<i>US power (%)</i> * <i>US power (%)</i>	1	1.9995	1.9995	5.61	0.029
<i>Solvent/material ratio (mL/g)</i> * <i>Solvent/material ratio (mL/g)</i>	1	1.5190	1.5190	4.26	0.054
<i>2-Way Interaction</i>	2	2.8859	1.4429	4.05	0.035
<i>EtOH content (%)</i> * <i>US power (%)</i>	1	1.1183	1.1183	3.14	0.094
<i>Extraction time (min)</i> * <i>US power (%)</i>	1	1.7676	1.7676	4.96	0.039
<i>Error</i>	18	6.4207	0.3567		

<i>Lack-of-Fit</i>	16	6.2932	0.3933	6.17	0.148
<i>Pure Error</i>	2	0.1275	0.0638		
<i>Total</i>	26	39.8849			

Από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 6.4), οι παράγοντες που είναι στατιστικά σημαντικοί ($p < 0,05$) είναι οι: Περιεκτικότητα σε αιθανόλη, Χρόνος εκχύλισης, Ισχύς υπερήχων, το τετράγωνο της Ισχύος υπερήχων και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ Χρόνου εκχύλισης – Ισχύος υπερήχων. Εν αντιθέσει, ο παράγοντας Lack-of-Fit δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$), δηλαδή το μοντέλο πρόβλεψης εφαρμόζεται σωστά με τις παραμέτρους.

Ο έλεγχος του μοντέλου γίνεται και με την εξέταση των στατιστικών μέτρων R^2 , $R^2(\text{adjacent})$ και $R^2(\text{predicted})$. Ο όρος R^2 , ή συντελεστής προσδιορισμού, δίνει πληροφορίες για την διακύμανση των εξαρτώμενων μεταβλητών που το μοντέλο μπορεί να εξηγήσει, σε εύρος 0-100%. Αντίστοιχα, ο όρος $R^2(\text{adjacent})$ προσαρμόζεται με τον αριθμό παραγόντων, αυξάνοντας όταν αυτοί βελτιώνουν το μοντέλο, ενώ ο όρος $R^2(\text{predicted})$ δείχνει την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου (Πίν 6.5).

Πίνακας 6.5 Συντελεστές προσδιορισμού για το μοντέλο πρόβλεψης

S	R^2	$R^2(\text{adj})$	$R^2(\text{pred})$
0.597249	83.90%	76.75%	57.42%

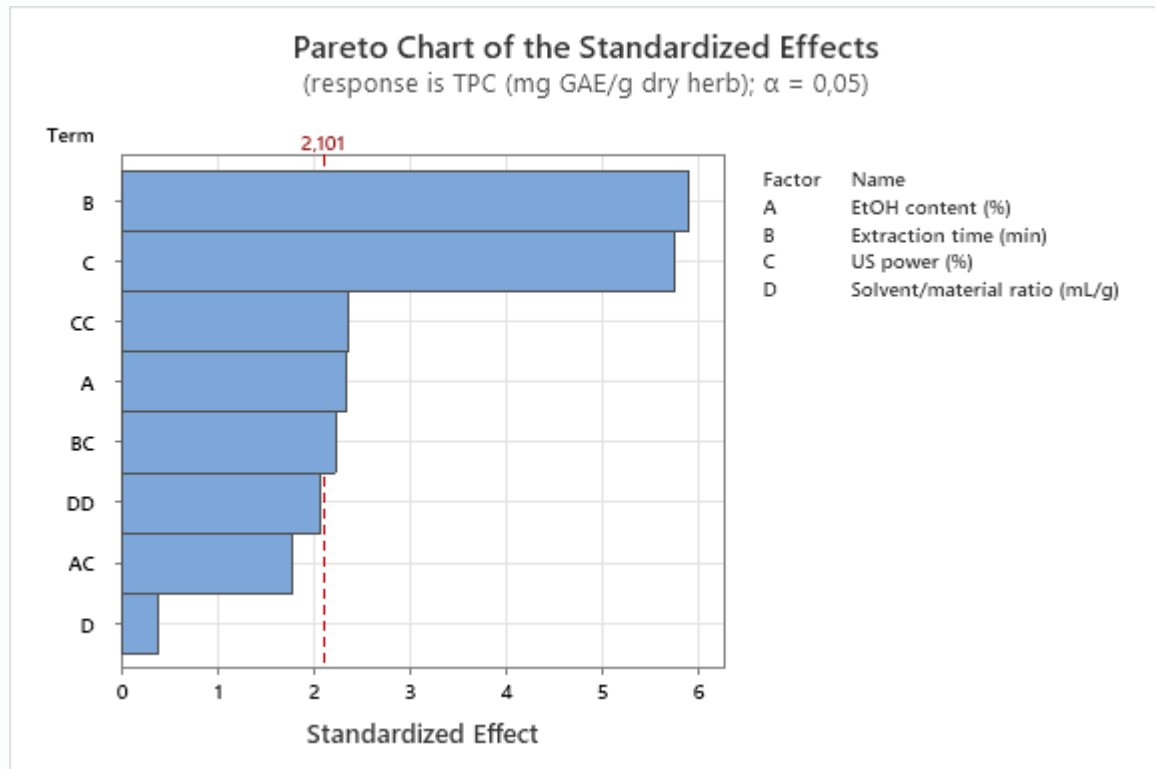
Από τον Πίνακα 6.5, ο συντελεστής προσδιορισμού ($R^2=0.839$) είναι υψηλός, δείχνοντας πως 0,161% του συνόλου των μεταβολών δεν εξηγήθηκαν από το μοντέλο πρόβλεψης. Ο συντελεστής $R^2(\text{adjacent})$ πιθανόν να είναι εμφανώς μικρότερος από τον συντελεστή R^2 επειδή το μέγεθος παραγόντων δεν ήταν ικανοποιητικό. Ο συντελεστής $R^2(\text{predicted})$ έχει χαμηλή τιμή, δείχνοντας πως δεν υπάρχει καλή συσχέτιση των θεωρητικών (προβλέψιμων) τιμών με τις πειραματικές τιμές.

Πίνακας 6.6 Εξίσωση πρόβλεψης του ολικού φαινολικού περιεχομένου

$$\begin{aligned}
 \text{TPC (mg GAE/g ξηρού δείγματος)} = & 1.25 - 0,0119 \text{ EtOH content (\%)} - 0.0060 \text{ Extraction time (min)} \\
 & - 0.0925 \text{ US power (\%)} + 0.0942 \text{ Solvent/material ratio (mL/g)} \\
 & + 0.000621 \text{ US power (\%)*US power (\%)} \\
 & - 0.001218 \text{ Solvent/material ratio (mL/g)*Solvent/material ratio (mL/g)} \\
 & + 0.000441 \text{ EtOH content (\%)*US power (\%)}
 \end{aligned}$$

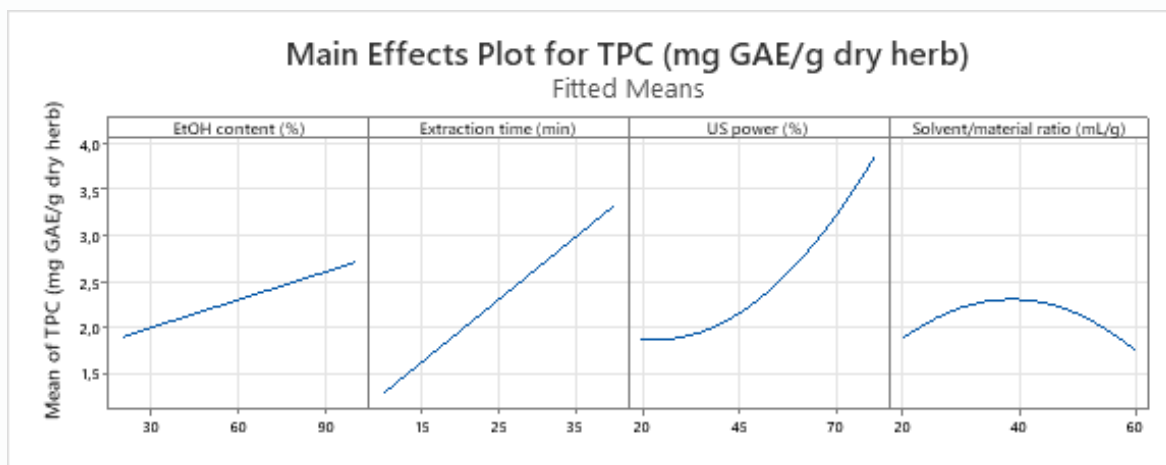
+ 0.001477 Extraction time (min)*US power (%)

Ακολουθούν διαγράμματα για την εξέταση της επίδρασης των παραγόντων στο μοντέλο πρόβλεψης, καθώς και των σχέσεων μεταξύ τους.



Γράφημα 6.1 Ραβδόγραμμα (Pareto) επίδρασης των παραμέτρων στο TPC για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Γράφημα 6.1), οι παράμετροι που είναι δεξιά της κόκκινης γραμμής είναι στατιστικά σημαντικοί. Κατά αύξουσα σειρά, μεγαλύτερη επίδραση έχουν: γραμμική αλληλεπίδραση μεταξύ χρόνου εκχύλισης και ισχύος υπερήχων < περιεκτικότητα αιθανόλης < τετράγωνο της ισχύος υπερήχων < ισχύς υπερήχων < χρόνος εκχύλισης. Η παράμετρος της αναλογίας διαλύτη/δείγματος, το τετράγωνό της και η γραμμική αλληλεπίδραση της περιεκτικότητας αιθανόλης με την ισχύ υπερήχων δεν είναι στατιστικά σημαντικοί και δεν επηρεάζουν την υψηλή απόδοση σε φαινολικές ενώσεις.

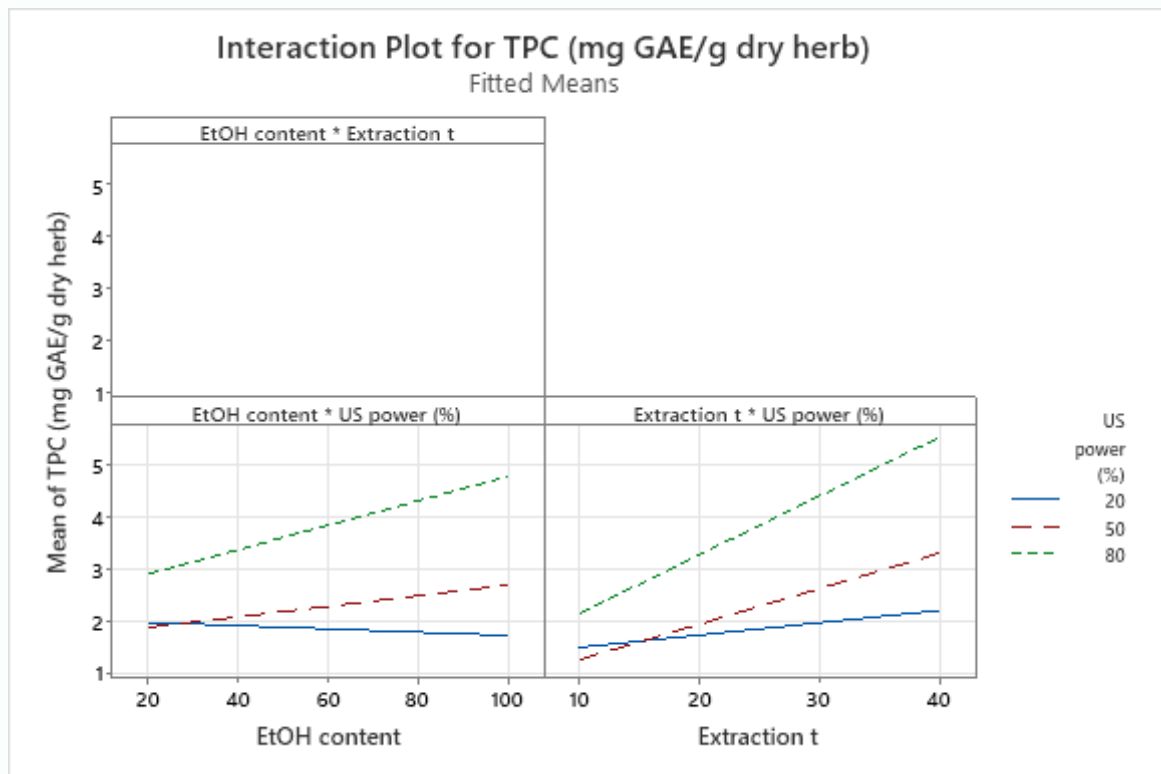


Γράφημα 6.2 Γραφήματα επιδράσεων (Factorial Plot) παραγόντων μεταξύ της μέσης τιμής TPC και των τιμών των μεταβλητών παραμέτρων: Περιεκτικότητα αιθανόλης, χρόνος εκχύλισης, ισχύς και αναλογία διαλύτη/ουσίας.

Το Γράφημα 6.2 αναπαριστά την σχέση της μέσης τιμής TPC με τις διάφορες τιμές των παραμέτρων. Η ύπαρξη κλίσης δείχνει πως υπάρχει επίδραση μεταξύ τους, καθώς η τιμή στον άξονα x μεταβάλλεται ανάλογα ή αντιστρόφως ανάλογα με τις τιμές στον άξονα y.

Συγκεκριμένα, η καμπύλη Μέση τιμή TPC – Περιεκτικότητα αιθανόλης παρουσιάζει αύξηση, με μέγιστο να εμφανίζεται πέρα του 90% περιεκτικότητας σε διαλύτη. Η καμπύλη Μέση τιμή TPC – Χρόνος εκχύλισης έχει μεγαλύτερη κλίση, δηλαδή ο χρόνος εκχύλισης έχει μεγαλύτερη επίδραση στο αποτέλεσμα, κορυφώνοντας πέρα των 35 min. Αυτό επαληθεύεται και από το γράφημα 6.1 Pareto. Αντίστοιχα, μεγάλη κλίση εμφανίζεται στο γράφημα Μέση τιμή TPC – Ισχύς υπερήχων όπου εμφανίζεται επίδραση μετά τα 45%, με μέγιστο άνω των 70% ισχύος υπερήχων.

Οι προηγούμενες παράμετροι επηρεάζουν την απόδοση σε TPC, όπως υπέδειξε η ανάλυση διακύμανσης ANOVA, ως στατιστικά σημαντικοί παράγοντες. Εν αντιθέσει, η παράμετρος Αναλογία διαλύτη/ουσίας δεν είναι στατιστικά σημαντική, οπότε δεν επηρεάζει το TPC. Η ύπαρξη κλίσης στην καμπύλη δεν αντικατοπτρίζει τις επιδράσεις της παραμέτρου, οπότε μπορεί να αποδοθεί στην τύχη.



Γράφημα 6.2.3 Γραφήματα (Factorial Plot) αλληλεπιδράσεων μεταξύ της μέσης τιμής TPC και των τιμών των γραμμικών αλληλεπιδράσεων των μεταβλητών παραμέτρων: Περιεκτικότητα αιθανόλης, χρόνος εκχύλισης, ισχύς και αναλογία διαλύτη/ουσίας.

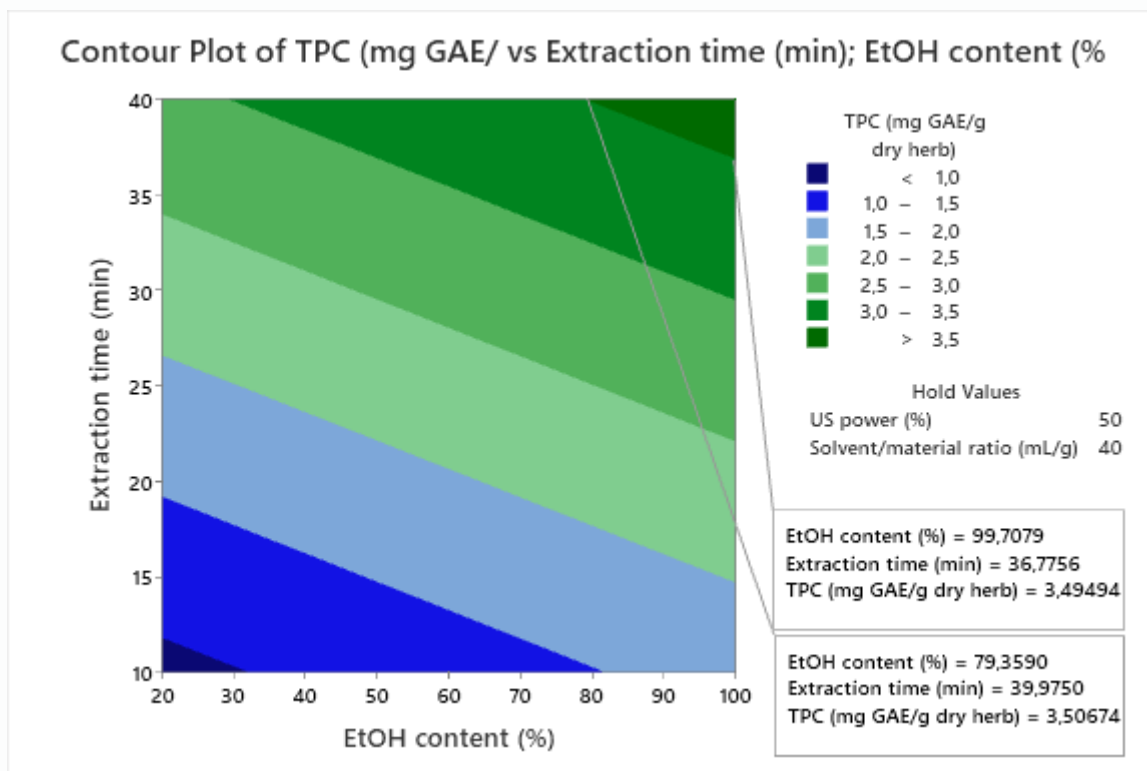
Το Γράφημα 6.3 αναπαριστά την σχέση μεταξύ της μέσης τιμής TPC και μιας παραμέτρου, υπό την συνθήκη μιας δεύτερης παραμέτρου, δηλαδή της γραμμικής αλληλεπίδρασής τους.

Στην καμπύλη Μέση τιμή TPC – Γραμμική αλληλεπίδραση Περιεκτικότητας αιθανόλης με τον Χρόνο εκχύλισης δε παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Από τον Πίνακα 6.1, η γραμμική αλληλεπίδραση τους είναι στατιστικά μη σημαντική.

Από την άλλη, η ανάλυση διακύμανσης δείχνει πως οι άλλες δύο αλληλεπιδράσεις είναι στατιστικά σημαντικές που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα. Στην καμπύλη Μέση τιμή TPC – Γραμμική αλληλεπίδραση Περιεκτικότητας αιθανόλης με την Ισχύ υπερήχων, εμφανίζονται μη παράλληλες γραμμές, δηλαδή το αποτέλεσμα επηρεάζεται από την τιμή του δεύτερου μεταβλητού παράγοντα. Σε αυτή την περίπτωση, η μέση τιμή TPC είναι μέγιστη αν για 80% ισχύος υπερήχων, η περιεκτικότητα αιθανόλης είναι 100%.

Παράλληλα, στην καμπύλη Μέση τιμή TPC – Γραμμική αλληλεπίδραση Χρόνος εκχύλισης με την Ισχύ υπερήχων, σημειώνεται πως παρουσιάζεται μέγιστη μέση τιμή TPC αν επιλεγεί 80% ισχύος υπερήχων για 40 min.

Άλλος τρόπος αξιολόγησης των παραμέτρων και πώς επηρεάζουν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με την αλληλεπίδρασή τους είναι οι ισοϋψείς καμπύλες (Contour Plot). Η ισοϋψής καμπύλη παρέχει μια δισδιάστατη όψη της σχέσης μεταξύ μιας σταθερής τιμής απόκρισης και δύο συνεχών μεταβλητών. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν σημεία με την ίδια τιμή απόκρισης.

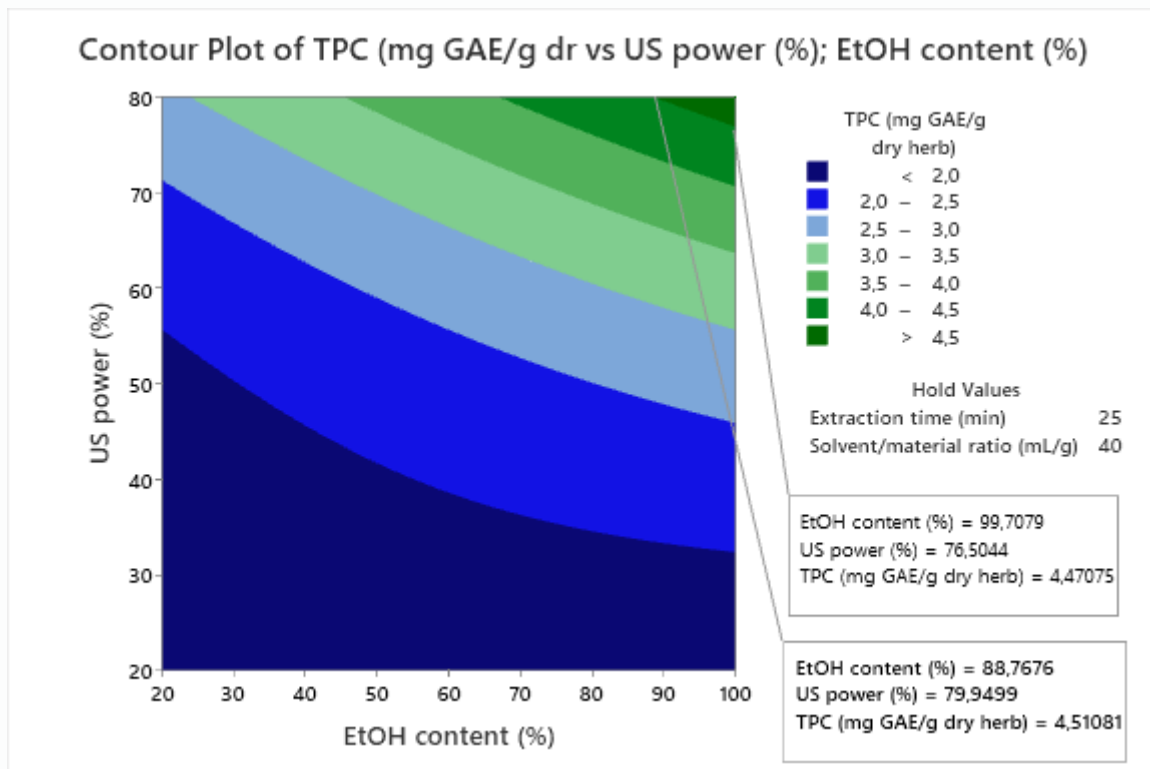


Γράφημα 6.4 Ισοϋψής καμπύλη (Contour Plot) χρόνου εκχύλισης – περιεκτικότητας αιθανόλης.

Σύμφωνα με το [Γράφημα 6.4](#), οι δύο μεταβλητές με την τιμή απόκρισης παρουσιάζουν ανάλογη σχέση. Με την αύξηση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη και του χρόνου εκχύλισης, αυξάνεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι μεταβλητές ισχύς υπερήχων και αναλογία διαλύτη/δείγματος παραμένουν σταθερές.

Για μέγιστη απόδοση TPC >3.5 mg GAE/g ξηρού δείγματος η περιεκτικότητα αιθανόλης πρέπει να κυμαίνεται >79 % ενώ ο χρόνος εκχύλισης >36 min.

Αξιοπρόσεκτη είναι η απεικόνιση της επίδρασης του χρόνου εκχύλισης. Η αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης αποδίδει μικρή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, αλλά κλιμακώνεται γρήγορα με την παράταση της εκχύλισης.

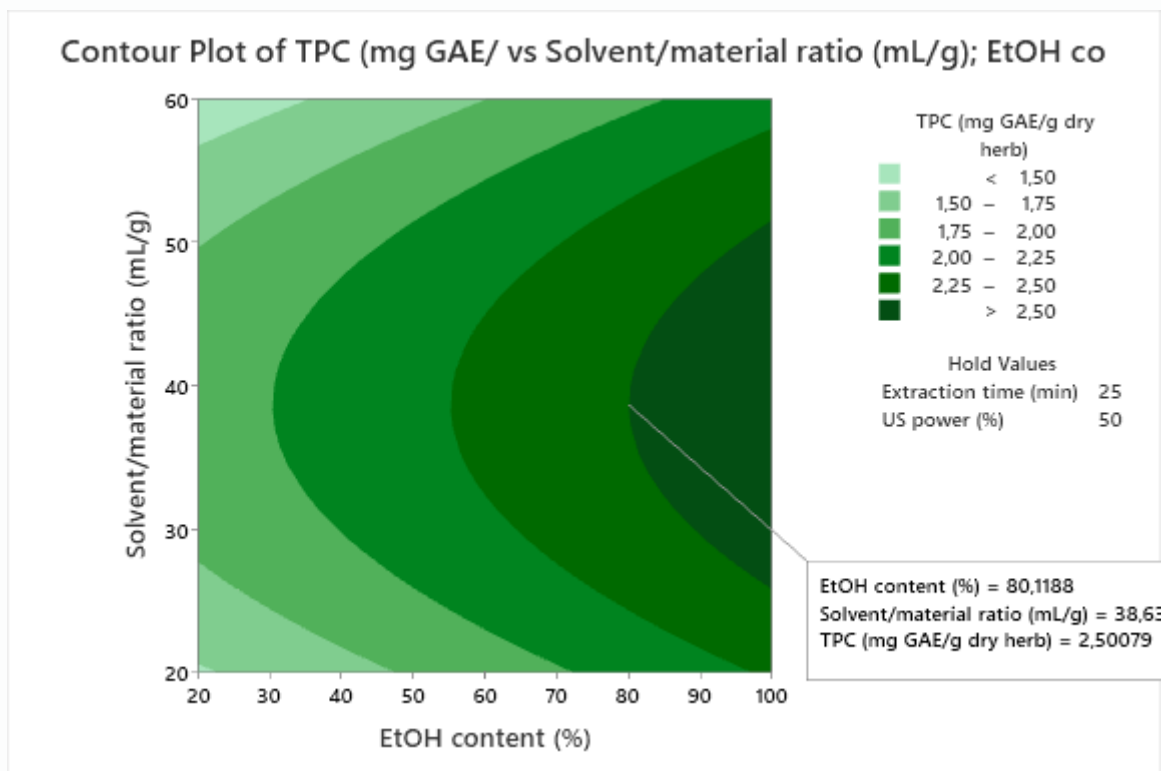


Γράφημα 6.5 Ισοϋψής καμπύλη (Contour Plot) ισχύος – περιεκτικότητας αιθανόλης.

Η καμπύλη στο [Γράφημα 6.5](#) εμφανίζει μια ανάλογη σχέση μεταξύ των δυο μεταβλητών και της τιμής απόκρισης. Με την αύξηση των δύο παραμέτρων, υπάρχει μεγαλύτερη παραλαβή φαινολικών ενώσεων. Οι μεταβλητές χρόνος εκχύλισης και αναλογία διαλύτη/δείγματος είναι σταθερές.

Οπότε για τιμές περιεκτικότητας αιθανόλης >88% και για τιμές ισχύος >76% υπάρχει μέγιστη απόδοση σε TPC > 4.5 mg GAE/g ξηρού δείγματος.

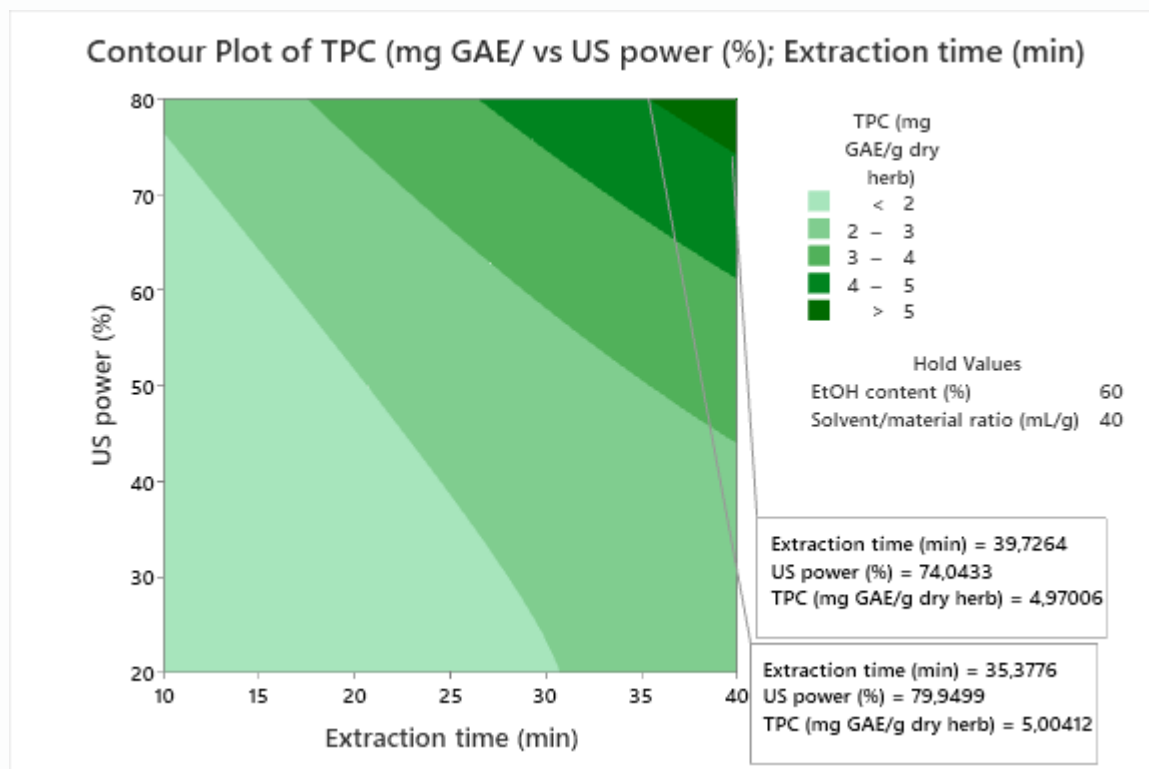
Για τιμές <60% ισχύος υπερήχων, η περιεκτικότητα αιθανόλης δεν έχει μεγάλη επιρροή στην παραλαβή υψηλών τιμών φαινολικών ενώσεων, ακόμα και στην 100% περιεκτικότητα. Είναι σημαντική η υψηλή ισχύς υπερήχων για τα βέλτιστα αποτελέσματα.



Γράφημα 6.6 Ισοϋψής καμπύλη (Contour Plot) αναλογίας διαλύτη/δείγματος με περιεκτικότητα αιθανόλης.

Έχοντας σταθερές τις μεταβλητές χρόνου εκχύλισης και ισχύος υπερήχων, η παράμετρος αναλογίας διαλύτη/ουσίας έχει ένα εύρος μέσα στο οποίο εμφανίζει μέγιστη τιμή TPC >2.5 mg GAE/g ξηρού δείγματος. Στο [Γράφημα 6.6](#), για τιμές περιεκτικότητας αιθανόλης >80%, οι τιμές της αναλογίας πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 25-50 mL/g για βέλτιστες τιμές ολικού φαινολικού περιεχομένου. Οι μεταβλητές χρόνος εκχύλισης και ισχύος υπερήχων είναι σταθερές.

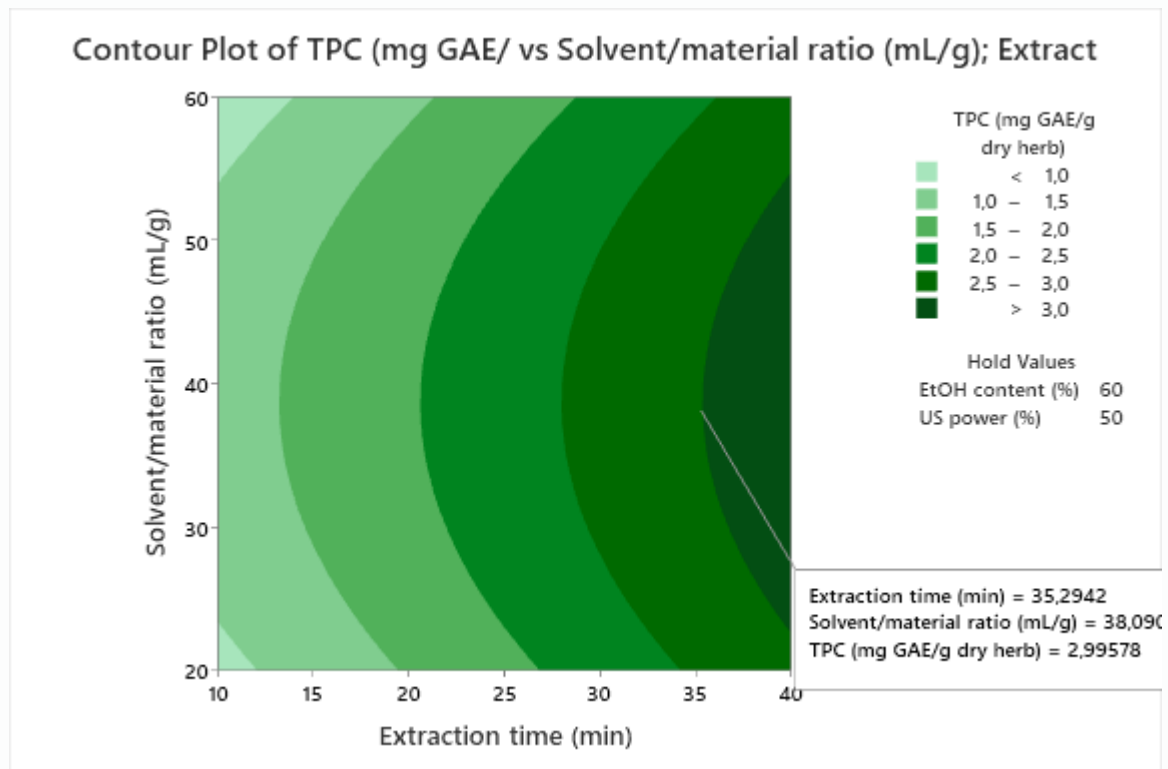
Οι δύο μεταβλητές δεν παρουσιάζουν ανάλογη ή αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την τιμή απόκρισης. Η αναλογία διαλύτη/δείγματος έχει μεγάλο εύρος τιμών που αλληλοεπιδρά με άλλες παραμέτρους, ως στατιστικά μη σημαντική παράμετρος. Είναι αποτελεσματικότερη στην τιμή 40:1 mL/g, όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία. Η περιεκτικότητα σε αιθανόλη αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα σε υψηλές τιμές.



Γράφημα 6.7 Ισοϋψής καμπύλη (Contour Plot) ισχύς υπερήχων με χρόνο εκχύλισης.

Όπως φαίνεται στο [Γράφημα 6.7](#), υπό σταθερή περιεκτικότητα αιθανόλης και αναλογίας διαλύτη/δείγματος, η μέγιστη τιμή TPC >5,0 mg GAE/g ξηρού δείγματος παρουσιάζεται στο εύρος τιμών των παραμέτρων ισχύος >74% και χρόνου εκχύλισης >35 min.

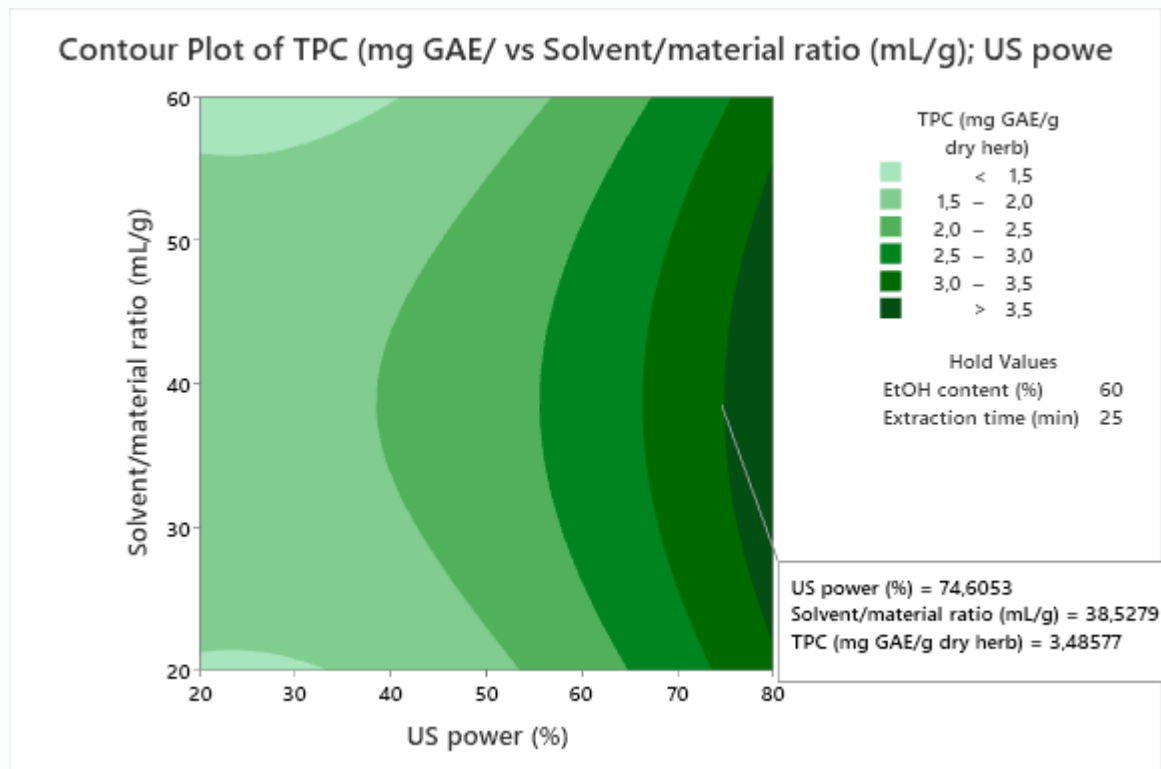
Οι παράμετροι με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εμφανίζουν ανάλογη σχέση, η συνεργασία των οποίων αποδίδει τις υψηλότερες τιμές περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων. Οι υψηλές τιμές του χρόνου και της ισχύος έχουν σημαντική επιρροή στο αποτέλεσμα, όπως φαίνεται στις προηγούμενες ισοϋψείς καμπύλες.



Γράφημα 6.8 Ισοϋνής καμπύλη (Contour Plot) αναλογίας διαλύτη/δείγματος με χρόνο εκχύλισης.

Όσον αφορά το [Γράφημα 6.8](#), η μέγιστη τιμή TPC > 3,0 mg GAE/g ξηρού δείγματος βρίσκεται στο εύρος της αναλογίας διαλύτη/ουσίας 22-54 mL/g και του χρόνου εκχύλισης >35 min. Οι μεταβλητές περιεκτικότητας αιθανόλης και ισχύος υπερήχων είναι σταθερές.

Αντίστοιχα με το [Γράφημα 6.6](#), η αναλογία διαλύτη/δείγματος αποφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα περίπου για τιμή 40:1 mL/g. Ο χρόνος εκχύλισης εξακολουθεί να έχει μεγαλύτερη ισχύ σε υψηλές τιμές.



Γράφημα 6.9 Ισοϋψής καμπύλη (Contour Plot) αναλογίας διαλύτη/δείγματος με ισχύ υπερήχων.

Τέλος, για το [Γράφημα 6.9](#) αναφέρεται πως για σταθερές τιμές στις μεταβλητές περιεκτικότητας αιθανόλης και χρόνου εκχυλίσεως, η μέγιστη τιμή TPC >3.5 mg GAE/g ξηρού δείγματος εμφανίζεται στο εύρος αναλογίας 22-54 mL/g και ισχύος >74%.

Ομοίως με τα [Γραφήματα 6.2](#) και [6.8](#), η αναλογία διαλύτη/δείγματος έχει μεγάλο εύρος τιμών, γεγονός που καθιστά την επιρροή της μικρή. Η ισχύς υπερήχων είναι πιο αποτελεσματική σε πολύ υψηλές τιμές.

Έχοντας υπόψη τις ισοϋψείς καμπύλες των παραμέτρων, παρατηρείται πως για την παραλαβή των μέγιστων τιμών ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC >5 mg GAE/g ξηρού δείγματος) ο ιδανικός συνδυασμός είναι μεταξύ των υψηλότερων τιμών χρόνου εκχυλίσεως και ισχύος. Αυτό επαληθεύεται από το [Γράφημα 6.1](#), όπου οι παράμετροι αυτοί έχουν την μεγαλύτερη επίδραση στην τιμή απόκρισης ολικού φαινολικού περιεχομένου.

6.2.2 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών

Κάνοντας χρήση του στατιστικού προγράμματος Minitab, έγινε βελτιστοποίηση των τιμών απόκρισης. Η ενέργεια πραγματοποιήθηκε έχοντας υπόψη τα αποτελέσματα των 27 πειραμάτων εκχύλισης και λαμβάνοντας από το μοντέλο πρόβλεψης τρεις λύσεις βέλτιστων συνθηκών για μέγιστη απόδοση ολικού φαινολικού περιεχομένου από την εκχύλιση των δειγμάτων φύλλων δενδρολίβανου.

Οι τρεις λύσεις εμφανίζονται στον Πίνακα 6.7.

Πίνακας 6.7 Βέλτιστες προβλεπόμενες συνθήκες για θεωρητικές τιμές μέγιστης απόδοσης TPC

Πείραμα	Περιεκτικότητα EtOH (% w/w)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ισχύς US (% W)	Αναλογία διαλύτη/δείγματος (mL/g)	TPC (mg GAE/g dry herb) Fit
1 ^a	100.00	40	80	38.59	6.46
2 ^b	100.00	40	80	60.00	5.91
3 ^c	91.80	40	80	20.00	5.85

Σύμφωνα με το μοντέλο πρόβλεψης, η λύση 1 θα έχει την μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικές ενώσεις, έχοντας 95% προβλεψιμότητα πως θα είναι στο εύρος 4.75-8.17 (Πίνακας 6.8).

Πίνακας 6.8 Πρόβλεψη μέγιστης απόδοσης TPC

Variable	Setting			
EtOH content (%)	100			
Extraction time (min)	40			
US power (%)	80			
Solvent/material ratio (mL/g)	38,59			
Response	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
TPC (mg GAE/g dry herb)	6.46	0.55	(5.30; 7.62)	(4.75; 8.17)

Επιπρόσθετα, εξετάστηκαν οι τρεις λύσεις (Best 1, Best 2, Best 3) με Tukey Pairwise Test ως προς την στατιστική διαφορά τους. Σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, οι τρεις λύσεις είναι

στατιστικά σημαντικά διαφορετικές μεταξύ τους. Αυτό συμβολίζεται στα αποτελέσματα με διαφορετικά γράμματα.

6.3 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin – Ciocalteu με τις προβλεπόμενες βέλτιστες συνθήκες

Έχοντας λάβει τα προτεινόμενα πειράματα με τις παραμέτρους που θα βελτιστοποιήσουν την παραλαβή των φαινολικών ενώσεων, γίνεται επανάληψη του αντιδραστηρίου Folin - Ciocalteu για το δείγμα φύλλων δενδρολίβανου, σύμφωνα με τον Πίνακα 5.4.

Πίνακας 6.9 Αποτελέσματα μεθόδου Folin - Ciocalteu των βέλτιστων συνθηκών για μέγιστη εκχύλιση φαινολικών ενώσεων εκχυλίσματος φύλλων δενδρολίβανου

Best	Θεωρητικό TPC (mg GAE/g ξ.δ)	Πειραματικό TPC (mg GAE/g ξ.δ) ± SD	Αρχική θερμοκρασία (°C)	Τελική θερμοκρασία (°C)
1 ^a	6.461	12.88 ± 0.08	28	10
2 ^b	5.91	10.31 ± 1.51	28	18
3 ^c	5.85	5.02 ± 0.23	22	2

Αξιοπρόσεκτη είναι η διαφορά μεταξύ θεωρητικού και πειραματικού αποτελέσματος TPC στα Best1 και Best2. Το μοντέλο πρόβλεψης έχει συντελεστή προσδιορισμού R² (pred):57.42%, δηλαδή η πιθανότητα οι πειραματικές τιμές να βρίσκονται στα προβλεπόμενα όρια των θεωρητικών τιμών είναι σχεδόν 1 στις 2. Η πρόβλεψη της απόδοσης σε TPC ήταν ανακριβής, όμως η λύση Best1 αποδείχθηκε πως ήταν η βέλτιστη για την μέγιστη απόδοση σε φαινολικές ουσίες.

Η περιεκτικότητα αιθανόλης 100% είχε την υψηλότερη απόδοση από τις τρεις λύσεις (Best1). Όπως προαναφέρθηκε, κάθε διάλυμα επηρεάζει διαφορετικά κάθε δείγμα ανάλογα με το είδος, το φαινολικό περιεχόμενο και το δίκτυο του φυτού. Πάνω σε αυτό, η αιθανόλη επηρεάζει την στρώση φωσφολιπιδίων στις μεμβράνες των κυττάρων, με αποτέλεσμα να ευνοεί την διαπερατότητά τους (Oreopoulou κ.ά., 2019).

Ο χρόνος εκχύλισης και η ισχύς των υπερήχων βρίσκονται στις μέγιστες τιμές που αποδίδουν μεγαλύτερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, σύμφωνα με τα γραφήματα Pareto και ισοϋψών καμπύλων. Η αναλογία διαλύτη/δείγματος είναι πιο αποτελεσματική προσεγγίζοντας την τιμή 40:1, ενώ ελαττώνεται η ισχύς όσο μεταβάλλεται στα άκρα του εύρους τιμών της,

όπως φάνηκε στα γραφήματα ισοϋψών καμπύλων.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα από τις εκχυλίσεις των φύλλων δενδρολίβανου, φύλλων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου στις βέλτιστες συνθήκες και στις συνθήκες μέσης και ελάχιστης απόδοσης σε φαινολικές ουσίες (Πίνακας 6.10), συγκριτικά. Οι ποσότητες του κάθε δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για κάθε σειρά πειραμάτων δίνονται στον Πίνακα 5.2.

Πίνακας 6.10 Παράμετροι εκχυλίσεων για μέγιστη (B), μέση (M) και ελάχιστη (E) παραλαβή φαινολικών ουσιών

<i>Run order</i>	Περιεκτικότητα EtOH (% w/w)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ισχύς US (% W)	Αναλογία διαλύτη/δείγματος (mL/g)
<i>B (Run Best1)</i>	100	40	80	38.59
<i>M (Run 26)</i>	20	40	50	40.00
<i>E (Run 23)</i>	20	10	50	40.00

Αξιοσημείωτη παρατήρηση η σταθερή τιμή της αναλογίας διαλύτη/δείγματος στα 40:1 σε όλες τις συνθήκες εκχύλισης.

Πίνακας 6.11 Πειραματικά αποτελέσματα μεθόδου Folin - Ciocalteu των παραμέτρων για μέγιστη (B), μέση (M) και ελάχιστη (E) παραλαβή φαινολικών ουσιών για φύλλα δενδρολίβανου

<i>Run order</i>	TPC (mg GAE/g ξ.δ) ± SD	Αρχική θερμοκρασία (°C)	Τελική θερμοκρασία (°C)
<i>B (Run Best1)</i>	12.88 ± 0.08	28	10
<i>M (Run 26)</i>	2.96 ± 0.33	28	19
<i>E (Run 23)</i>	0.31 ± 0.10	25	18

Πίνακας 6.12 Πειραματικά αποτελέσματα μεθόδου Folin - Ciocalteu των παραμέτρων για μέγιστη (B), μέση (M) και ελάχιστη (E) παραλαβή φαινολικών ουσιών για φύλλα παραπροϊόντος δενδρολίβανου

<i>Run order</i>	TPC (mg GAE/g ξ.δ) ± SD	Αρχική θερμοκρασία (°C)	Τελική θερμοκρασία (°C)
<i>B (Run Best1)</i>	6.68 ± 0.47	28	24
<i>M (Run 26)</i>	2.03 ± 0.26	29	18
<i>E (Run 23)</i>	1.28 ± 0.27	30	21

Ομοίως με το δείγμα φύλλων δενδρολίβανου, οι διαφορές στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο μεταξύ των τριών εκχυλισμάτων οφείλονται στις συνθήκες που επηρεάζουν την παραλαβή.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα φύλλα παραπροϊόντος δενδρολίβανου έχουν εμφανώς λιγότερο φαινολικό περιεχόμενο από τα φύλλα δενδρολίβανου στις βέλτιστες συνθήκες, είναι παραπλήσιο στις μέσες συνθήκες και μεγαλύτερο στις ελάχιστες συνθήκες.

Ως αρωματικό φυτό, το δενδρολίβανο υπέστη επεξεργασία αφαίρεσης αιθέριων ελαίων μέσω της ατμοαπόσταξης. Συνεπώς, το φαινολικό περιεχόμενο που παραλήφθηκε δεν περιείχε λιποδιαλυτές φαινολικές ενώσεις, αλλά αυτό δεν μείωσε σημαντικά το σύνολο των φαινολικών. Η επεξεργασία μπορεί να προκάλεσε ζημιές στα φυτικά κύτταρα και να ευνόησε την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων (Oreopoulou κ.ά., 2019).

Πίνακας 6.13 Πειραματικά αποτελέσματα μεθόδου Folin - Ciocalteu των παραμέτρων για μέγιστη (B), μέση (M) και ελάχιστη (E) παραλαβή φαινολικών ουσιών για κονιοποιημένα φύλλα δενδρολίβανου

<i>Run order</i>	TPC (mg GAE/g ξ.δ.) ± SD	Αρχική θερμοκρασία (°C)	Τελική θερμοκρασία (°C)
<i>B (Run Best1)</i>	13.08 ± 0.68	29	24
<i>M (Run 26)</i>	46.43 ± 1.36	29	23
<i>E (Run 23)</i>	38.52 ± 4.90	30	24

Όσον αφορά το κονιοποιημένο δείγμα δενδρολίβανου, η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις αυξάνεται με την σειρά B < E < M. Σύμφωνα με τον Πίνακα 6.13, η περιεκτικότητα της αιθανόλης στις συνθήκες μέσης απόδοσης είναι μικρότερη (20% w/w) όπως και η ισχύς υπερήχων (50% W) σε σχέση με τις βέλτιστες συνθήκες. Επιπλέον, μεγαλύτερη παραλαβή από τις βέλτιστες συνθήκες εμφανίζεται και στις συνθήκες ελάχιστης απόδοσης, με διαφορά χαμηλότερου χρόνου (10 min), περιεκτικότητας (20% w/w) και ισχύος (50% W).

Η κονιοποίηση του δείγματος αυξάνει την επιφάνεια του δενδρολίβανου που έρχεται σε επαφή με τον διαλύτη, επιτυγχάνοντας αύξηση στην μεταφορά μάζας. Επίσης, η μηχανική διεργασία της κονιοποίησης διασπά τις μεμβράνες των κυττάρων, απελευθερώνοντας τις φαινολικές ουσίες. Συγκεκριμένα για το δενδρολίβανο, ανάλογα με τον διαλύτη, το εκχύλισμα και το μέγεθος των κονιοποιημένων σωματιδίων, η απόδοση σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο πολλαπλασιάζεται από δύο έως και δέκα φορές. Μάλιστα, η απόδοση μεγαλώνει περισσότερο όταν γίνεται χρήση υδατικού διαλύματος αιθανόλης, γεγονός που φανερώνει πως μετά την μηχανική διεργασία διευκολύνεται η εκχύλιση υδατοδιαλυτών ουσιών (Oreopoulou κ.ά., 2019).

Το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu όμως αλληλεπιδρά και με άλλες αναγωγικές ουσίες που δεν συμπεριλαμβάνονται στις φαινολικές ενώσεις, οδηγώντας σε θετικό σφάλμα στα αποτελέσματα. Η αυξανόμενη επιφάνεια, η διάρρηξη των κυττάρων και η απελευθέρωση των ενώσεων συμβάλλουν στην υπερεκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Brglez Mojzer κ.ά., 2016).

Η διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ των βέλτιστων συνθηκών σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες μπορεί να οφείλεται στην ευαισθησία του δείγματος. Η υψηλότερη ενέργεια των υπερήχων και ο μεγαλύτερος χρόνος εκχύλισης αποφέρουν λιγότερα αποτελέσματα, έχοντας αντιστρόφως ανάλογη ισχύ από τα φύλλα δενδρολίβανου. Η εκχύλιση με υπερήχους είναι δυνατή να προκαλέσει φαινόμενα οξειδωσης λόγω της δημιουργίας ελεύθερων ριζών, καθώς σχηματίζονται ρίζες υδροξυλίου από την υπερήχηση του νερού. Οι ρίζες συνδυάζονται για να σχηματίσουν υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξειδώνουν τις φαινολικές ενώσεις, όσο παρατείνεται ο χρόνος εκχύλισης (Oreopoulou κ.ά., 2019).

6.4 Προσδιορισμός της αναγωγικής ισχύος / αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)

Προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων φύλλων δενδρολίβανου, φύλλων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου στις τρεις σειρές πειραμάτων εκχύλισης, εκφρασμένη σε μάζα mg δισθενούς σιδήρου (Fe^{+2}) ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος.

Πίνακας 6.14 Αποτελέσματα μεθόδου FRAP των παραμέτρων για μέγιστη (B), μέση (M) και ελάχιστη (E) παραλαβή φαινολικών ουσιών φύλλων δενδρολίβανου, φύλλων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου

Μάζα Fe (II) mg/g ξηρού δείγματος ± SD			
<i>Run order</i>	Φύλλα Δενδρολίβανου	Φύλλα Παραπροϊόντος Δενδρολίβανου	Κονιοποιημένα Φύλλα Δενδρολίβανου
<i>B (Run Best1)</i>	5.37 ± 0.12	7.03 ± 0.08	26.16 ± 0.11
<i>M (Run 26)</i>	2.53 ± 0.02	3.50 ± 0.15	26.73 ± 0.18
<i>E (Run 23)</i>	0.74 ± 0.04	3.01 ± 0.28	26.98 ± 0.37

Συγκρίνοντας τις πρώτες δυο στήλες δειγμάτων, η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται από τις συνθήκες ελάχιστης παραλαβής (E) προς τις συνθήκες μέγιστης παραλαβής (B). Υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των συνθηκών B, M και E για τα φύλλα δενδρολίβανου, έχοντας φθίνουσα αύξηση, όπως παρουσιάστηκε στο TPC.

Από την άλλη, τα φύλλα παραπροϊόντος δενδρολίβανου έχουν διαφορά μεταξύ B με M και E αλλά οι συνθήκες M και E εμφανίζουν παραπλήσια αντιοξειδωτική ικανότητα. Η διαφορετική παράμετρος σε αυτές τις συνθήκες είναι ο χρόνος εκχύλισης, δείχνοντας πως δεν έχει μεγάλη επίδραση στο αποτέλεσμα. Επιπλέον, η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι μεγαλύτερη στα φύλλα παραπροϊόντος από ότι στα φύλλα δενδρολίβανου. Η διεργασία της απόσταξης ατμού επηρέασε το φυτοχημικό προφίλ του φυτού, προκαλώντας μεταβολές στις προϋπάρχουσες ενώσεις και παράγοντας νέες.

Εν αντιθέσει, τα κονιοποιημένα φύλλα δενδρολίβανου έχουν παραπλήσιες τιμές σε όλες τις συνθήκες, οι οποίες είναι οι μεγαλύτερες μεταξύ των τριών δειγμάτων. Οι παράμετροι του χρόνου εκχύλισης και ισχύος δύναμης υπερήχων δεν έχουν μεγάλη επιρροή στα αποτελέσματα, ενώ φαίνεται η ύπαρξη ύδατος στον διαλύτη ευνοεί αισθητά παραπάνω την εκχύλιση ενώσεων που αποδίδουν την αντιοξειδωτική ικανότητα. Όπως στην μέθοδο TPC, το μέγεθος του δείγματος ενισχύει την ιδιότητα λόγω της αυξημένης επιφάνειας του δείγματος.

Σε περιπτώσεις παραπλήσιων αποτελεσμάτων, προτιμάται η επιλογή με το λιγότερο κόστος και χρόνο. Επομένως, για το δείγμα κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου, θα επιλεγόταν η εκχύλιση στην συνθήκη E, όπου ο χρόνος είναι 10 min και η κατανάλωση του διαλύτη 20 % w/w.

6.5 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+} [2,2'-Azino-Bis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonicacid)]

Προσδιορίστηκε η ικανότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας των δειγμάτων φύλλων δενδρολίβανου, φύλλων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου στις τρεις σειρές πειραμάτων εκχύλισης, εκφρασμένη σε μάζα πρότυπης ουσίας mg TE ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος.

Πίνακας 6.15 Αποτελέσματα μεθόδου ABTS^{•+} των παραμέτρων για μέγιστη (B), μέση (M) και ελάχιστη (E) παραλαβή φαινολικών ουσιών φύλλων δενδρολίβανου, φύλλων παραπροϊόντος και κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου

Μάζα TE mg/g ξηρού δείγματος ± SD			
Run order	Φύλλα Δενδρολίβανου	Φύλλα Παραπροϊόντος Δενδρολίβανου	Κονιοποιημένα Φύλλα Δενδρολίβανου
B (Run Best1)	24.31 ± 0.15	29.06 ± 0.63	72.44 ± 3.57
M (Run 26)	7.85 ± 0.46	9.61 ± 0.08	76.12 ± 7.55
E (Run 23)	2.64 ± 0.24	8.06 ± 0.5	100.04 ± 2.50

Αντίστοιχα, οι συνθήκες B για τις πρώτες δυο στήλες δειγμάτων έχουν τις μέγιστες τιμές αποτελεσμάτων. Η υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη στον διαλύτη μπορεί να ευνοεί την εκχύλιση ενώσεων που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες.

Ευνοούνται επίσης από μηχανικές, χημικές και ενζυμικές διεργασίες που μεταβάλλουν τις ενώσεις στο φυτό. Η διαφορά των αποτελεσμάτων μεταξύ των κονιοποιημένων φύλλων και των άλλων δειγμάτων είναι εμφανής. Η κονιοποίηση είχε σημαντική ισχύ στην εκχύλιση ενώσεων με την αντιρριζική ιδιότητα, έχοντας ξανά τις υψηλότερες τιμές ανάμεσα στα τρία δείγματα.

Παρατηρείται πως στις τιμές των κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου οι τυπικές αποκλίσεις είναι υψηλές, όπως και η διαφορά μεταξύ των τιμών B, M με E. Η μέθοδος της ρίζας

ABTS•⁺ πραγματοποιείται σε ορισμένο χρόνο και τα αποτελέσματα αλλάζουν με την πάροδο δευτερολέπτων, ιδιαίτερα όταν εμπλέκεται συστηματικό υποκειμενικό σφάλμα. Για αυτό το λόγο, δεν γίνεται η εξαγωγή συμπερασμάτων με βάση αυτές τις τιμές καθώς δεν είναι ξεκάθαρο αν τις έχουν επηρεάσει και μέχρι ποιο βαθμό η χρονική ευαισθησία ή οι διαφορετικές παράμετροι της εκχύλισης.

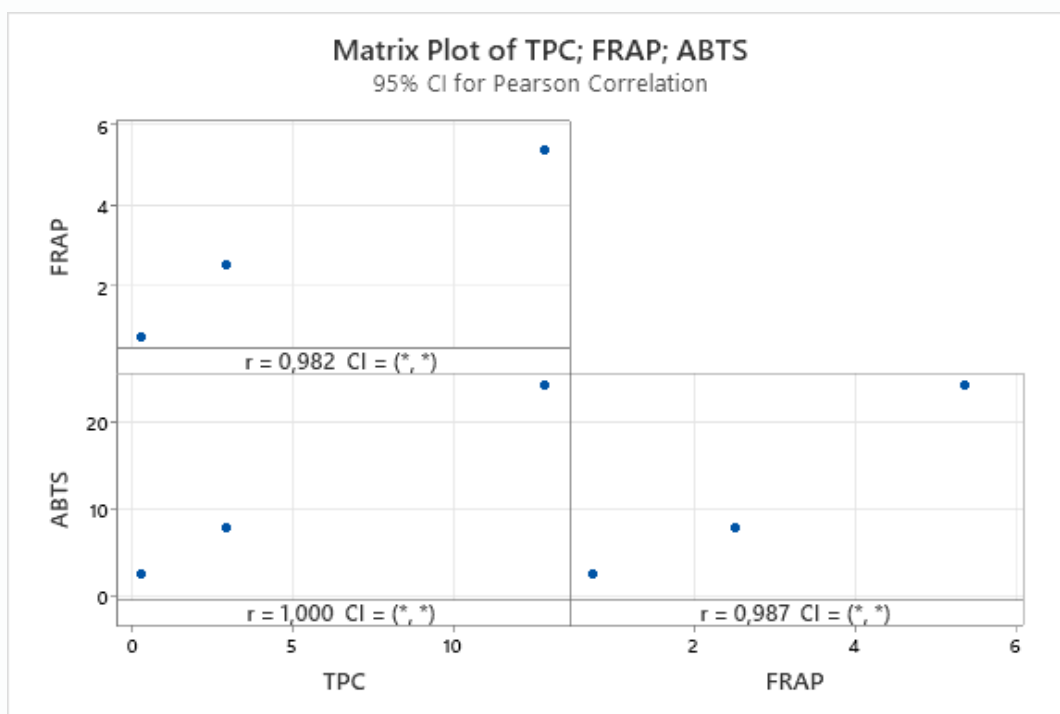
6.6 Συσχέτιση αποτελεσμάτων μεθόδων Folin - Ciocalteu, FRAP και ABTS•⁺

Έγινε χρήση του στατιστικού δείκτη Pearson's Correlation Coefficient (PCC) για την εξέταση της συσχέτισης των αποτελεσμάτων των τριών μεθόδων (Folin - Ciocalteu, FRAP και ABTS•⁺). Ο δείκτης αυτός μετράει την γραμμική συσχέτιση δύο μεταβλητών x και y , παίρνοντας τιμές από -1 σε 1. Συμβολίζοντας τον δείκτη με r , οι τιμές εκφράζουν:

$-1 < r < 0$ αρνητική γραμμική συσχέτιση

$r = 0$ δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση

$r > 0$ θετική γραμμική συσχέτιση



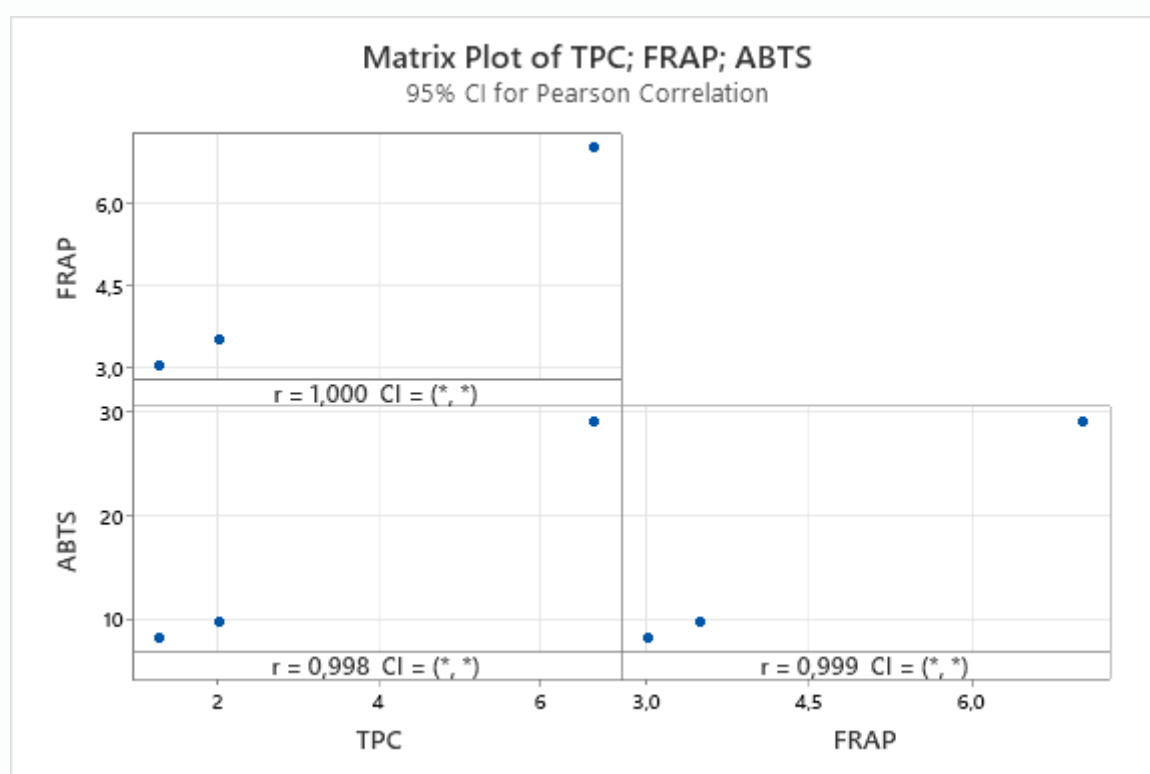
Γράφημα 6.10 Γραμμική συσχέτιση αποτελεσμάτων TPC, FRAP, ABTS για φύλλα δενδρολίβανου με δείκτη PCC για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Πίνακας 6.16 Τιμές δείκτη r αποτελεσμάτων TPC, FRAP, ABTS για φύλλα δενδρολίβανου

Μέθοδος	TPC	FRAP
---------	-----	------

FRAP	0.98	-
ABTS	1.00	0.99

Η συσχέτιση των τριών μεθόδων για δείγμα φύλλων δενδρολίβανου παρουσιάζουν θετική γραμμική συσχέτιση, με υψηλή τιμή r . Μάλιστα, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εμφανίζει τέλεια γραμμική συσχέτιση με την ικανότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας στο δείγμα. Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 6.10**, η αύξηση της μιας μεταβλητής συνοδεύεται με την αναλογική αύξηση της άλλης μεταβλητής.

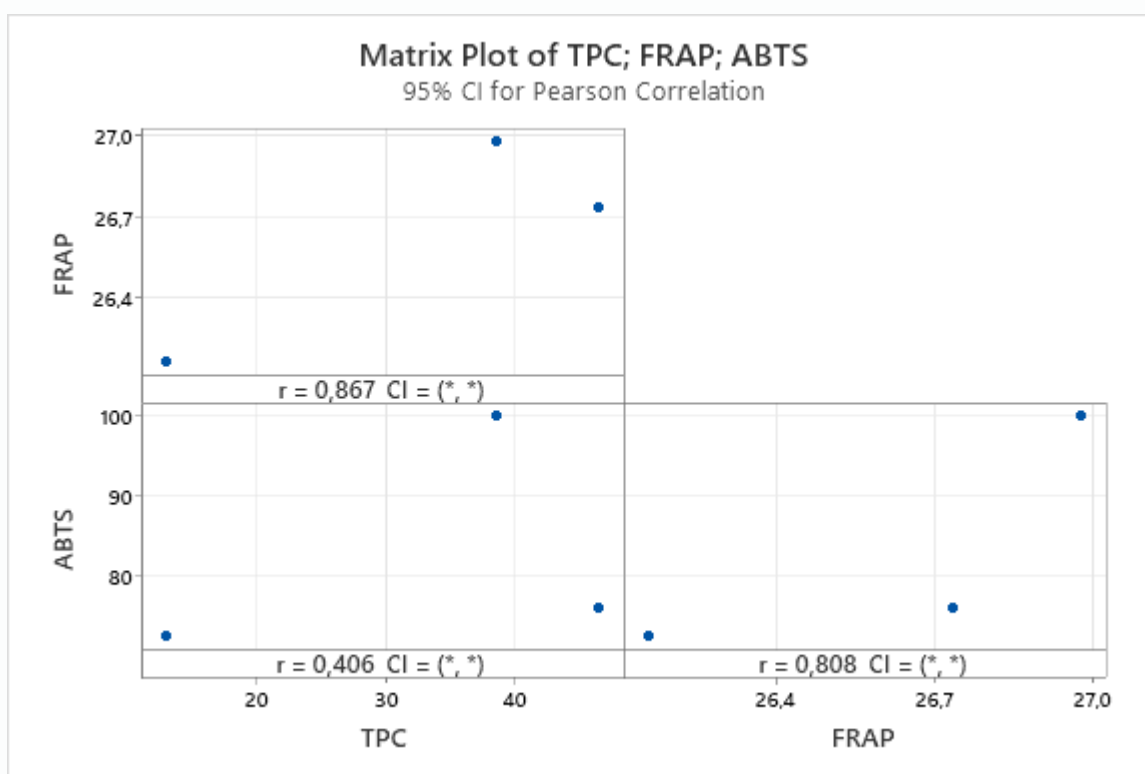


Γράφημα 6.11 Γραμμική συσχέτιση αποτελεσμάτων TPC, FRAP, ABTS για φύλλα παραπροϊόντος δενδρολίβανου με δείκτη PCC για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Πίνακας 6.17 Τιμές δείκτη r αποτελεσμάτων TPC, FRAP, ABTS για φύλλα παραπροϊόντος δενδρολίβανου

Μέθοδος	TPC	FRAP
FRAP	1.00	-
ABTS	0.99	0.99

Ομοίως, υπάρχει θετική γραμμική συσχέτιση των τριών μεθόδων για δείγμα φύλλων παραπροϊόντος δενδρολίβανου, με πολύ υψηλές τιμές r . Τέλεια γραμμική συσχέτιση χαρακτηρίζεται η συσχέτιση μεταξύ του ολικού φαινολικού περιεχομένου του δείγματος και της αντιοξειδωτικής ικανότητάς του. Όπως φαίνεται στο [Γράφημα 6.11](#), η αύξηση της μιας μεταβλητής συνοδεύεται με την αναλογική αύξηση της άλλης μεταβλητής.



Γράφημα 6.12 Γραμμική συσχέτιση αποτελεσμάτων TPC, FRAP, ABTS για κονιοποιημένα φύλλα δενδρολίβανου με δείκτη PCC για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Πίνακας 6.18 Τιμές δείκτη r αποτελεσμάτων TPC, FRAP, ABTS για κονιοποιημένα φύλλα

Μέθοδος	TPC	FRAP
FRAP	0.87	-
ABTS	0.41	0.81

Από την άλλη μεριά, το δείγμα κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου δεν εμφανίζει αναλογική σχέση μεταξύ των μεθόδων του. Σύμφωνα με το [Γράφημα 6.12](#), η αύξηση της μιας μεταβλητής δεν συνοδεύεται απαραίτητα από την αύξηση της άλλης. Οι τιμές r είναι στα

όρια θετικής γραμμικής συσχέτισης ($r>0$), με χαμηλότερη την συσχέτιση ανάμεσα στο ολικό περιεχόμενο του δείγματος με την αντιριζική του ιδιότητα.

Σύμφωνα με τον [Moure κ.ά., 2001](#), δεν είναι κοινώς αποδεκτή η ιδέα της συσχέτισης μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πολυφαινόλες. Κάποιες έρευνες υποστηρίζουν την ιδέα, κάποιες άλλες την απορρίπτουν. Η αντιοξειδωτική δράση αλεύρου σπόρου λούπινου αυξανόταν με διαφορετικές ενώσεις όπως φαινολικές, πεπτίδια και φωσφολιπίδια ενώ δεν υπήρχε σχέση μεταξύ τους στις βύνες και στα υπολείμματα κίτρων, μούρων, κρασιών φρούτων και εκχυλισμάτων φυτών.

Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα -Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

7.1 Συμπεράσματα

Είναι γνωστό πως το αρωματικό φυτό δενδρολίβανο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες και αντιοξειδωτικές ουσίες. Διεργασίες μηχανικού, χημικού και ενζυμικού χαρακτήρα επηρεάζουν την χημική σύνθεση, οπότε το επεξεργασμένο φυτό χρήζει περαιτέρω εξέταση για την ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου .

Σε αυτή την εργασία, ερευνάται η αξιοποίηση των στερεών υπολειμμάτων φύλλων δενδρολίβανου, ύστερα από απόσταξη με ατμό και αφαίρεση αιθέριων ελαίων. Τα φύλλα παραπροϊόντος δενδρολίβανου ενδεχομένως να περιέχουν ποσότητες βιοενεργών ενώσεων προς εκμετάλλευση για χρήση σε αγροδιατροφικές βιομηχανίες.

Συγκεκριμένα, έχοντας λάβει εκχυλίσματα από δείγματα δενδρολίβανου (φύλλα δενδρολίβανου, φύλλα παραπροϊόντος δενδρολίβανου και κονιοποιημένα φύλλα δενδρολίβανου), προσδιορίστηκαν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο TPC, η αντιοξειδωτική δράση και η αντιριζική τους ικανότητα με φασματοφωτομετρικές μεθόδους (Folin – Ciocalteu, FRAP, ABTS^{•+}). Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με χρήση υπερήχων (UAE) και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες εκχύλισης με την χρήση μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box - Behnken.

Συγκεφαλαιώνοντας, τα βασικά συμπεράσματα της εργασίας αποτελούν τα κάτωθι:

- Από την στατιστική ανάλυση των εκχυλισμάτων φύλλων δενδρολίβανου, στατιστικά σημαντικοί παράμετροι ($p < 0,05$) είναι η περιεκτικότητα σε αιθανόλη, ο χρόνος εκχύλισης, η ισχύς υπερήχων, το τετράγωνο της ισχύος υπερήχων και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ χρόνου εκχύλισης – ισχύος υπερήχων. Μεγαλύτερη επίδραση φαίνεται να έχουν ο χρόνος εκχύλισης και η ισχύς υπερήχων. Αντιθέτως, η αναλογία διαλύτη/δείγματος δεν είναι στατιστικά σημαντική παράμετρος και δεν επηρεάζει την παραλαβή φαινολικών ουσιών.
- Η παραλαβή μέγιστων τιμών ολικού φαινολικού περιεχομένου πραγματοποιείται για υψηλές τιμές χρόνου εκχύλισης, ισχύος υπερήχων και περιεκτικότητας σε αιθανόλη, με τις οποίες έχει ανάλογη σχέση. Σύμφωνα με το μοντέλο πρόβλεψης του πειραματικού σχεδιασμού, οι βέλτιστες συνθήκες παραλαβής μέγιστου TPC είναι περιεκτικότητα σε

αιθανόλη 100% w/w, χρόνος εκχύλισης 40 min, ισχύος υπερήχων 80% W και αναλογία διαλύτη/δείγματος 38.59 mL/g.

- Οι πειραματικές τιμές των φασματοφωτομετρικών μεθόδων για τα δείγματα δενδρολίβανου στις βέλτιστες συνθήκες είναι οι εξής:
 - Φύλλα δενδρολίβανου απέδωσαν 12.88 ± 0.08 mg GAE/g ξ.δ για TPC, 5.37 ± 0.12 mg Fe⁺²/g ξ.δ για αντιοξειδωτική ικανότητα και 24.31 ± 0.15 mg TE/g ξ.δ για αντιριζική δράση.
 - Φύλλα παραπροϊόντος δενδρολίβανου απέδωσαν 6.68 ± 0.47 mg GAE/g ξ.δ για TPC, 7.03 ± 0.08 mg Fe⁺²/g ξ.δ για αντιοξειδωτική ικανότητα και 29.06 ± 0.63 mg TE/g ξ.δ για αντιριζική δράση.
 - Κονιοποιημένα φύλλα δενδρολίβανου απέδωσαν 13.08 ± 0.68 mg GAE/g ξ.δ για TPC, 26.16 ± 0.11 mg Fe⁺²/g ξ.δ για αντιοξειδωτική ικανότητα και 72.44 ± 3.57 mg TE/g ξ.δ για αντιριζική δράση.
- Όσον αφορά το δείγμα κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου, οι βέλτιστες συνθήκες δεν είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα:
 - Στην μέθοδο Folin – Ciocalteu, η σειρά συνθηκών M (Run 26) απέδωσε το μεγαλύτερο TPC 46.43 ± 1.36 mg GAE/g ξ.δ.
 - Στην μέθοδο FRAP όλες οι σειρές συνθηκών είχαν παραπλήσια αποτελέσματα.
 - Στην μέθοδο ABTS^{•+} υψηλότερη τιμή είχε η σειρά E (Run 23), όμως λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου και της ύπαρξης πιθανών συστηματικών σφαλμάτων, τα συμπεράσματα είναι ανακριβής.
- Η γραμμική συσχέτιση με τον στατιστικό δείκτη PCC κατέταξε την συσχέτιση των φασματοφωτομετρικών μεθόδων μεταξύ τους όπου:
 - Η συσχέτιση των τριών μεθόδων παρουσίασαν θετική γραμμική συσχέτιση για τα δείγματα φύλλων δενδρολίβανου και φύλλων παραπροϊόντος δενδρολίβανου.

- Τέλεια γραμμική συσχέτιση ($r=1$) έχουν για δείγμα φύλλων δενδρολίβανου TPC με ABTS και για δείγμα φύλλων παραπροϊόντος δενδρολίβανου TPC με FRAP.
- Το δείγμα κονιοποιημένων φύλλων δενδρολίβανου εμφανίζει γραμμική συσχέτιση των μεθόδων, δίχως αναλογική σχέση μεταξύ τους.

Συμπερασματικά, η αξιοποίηση των παραπροϊόντος δενδρολίβανου είναι δυνατή καθώς περιέχουν αξιόλογες ποσότητες φαινολικών ενώσεων. Τα ποσά TPC είναι χαμηλότερα, συγκριτικά με τα φύλλα δενδρολίβανου, όμως έχοντας υπόψη την ευνοϊκή επίδραση της διεργασίας κονιοποίησης του δείγματος για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων, μπορεί να αυξηθούν σημαντικά. Επιπλέον, δεδομένου του τεράστιου όγκου των στερεών υπολειμμάτων αρωματικών φυτών που παράγεται συνεχώς, η εκχύλισή τους για την απόκτηση βιοενεργών συστατικών έχει την δυνατότητα να αποφέρει σημαντικές ποσότητες προϊόντων.

7.2 Μελλοντική έρευνα

Η παραλαβή φαινολικών ενώσεων από στερεά απόβλητα αρωματικών φυτών μπορεί να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω, με διαφορετική προσέγγιση και ένα ευρύ φάσμα μεθόδων. Συνολικά, οι προτάσεις για μελλοντική έρευνα είναι οι παρακάτω:

- Χρήση του πειραματικού σχεδιασμού σε δείγματα φύλλων παραπροϊόντος δενδρολίβανου και διαμόρφωση του πειραματικού μοντέλου πρόβλεψης σε αυτά τα δεδομένα.
- Κονιοποίηση των φύλλων σε διαφορετικά μεγέθη και επιλογή του βέλτιστου μεγέθους κόκκων.
- Πραγματοποίηση εκχύλισης σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (έως 70°C), για την βελτίωση διαλυτότητας του διαλύτη και την μεταφορά μάζας.
- Αξιοποίηση των σύγχρονων τεχνικών εκχύλισης και χρήση τους σε συνδυασμό με άλλες σύγχρονες ή κλασικές τεχνικές.
- Αξιοποίηση των οικολογικών διαλυτών DES και NADES, εκμεταλλεύοντας την επιλεκτική εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων λόγω της διαφασικής φύσης τους.
- Ταυτοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων που περιέχονται σε δείγματα παραπροϊόντος δενδρολίβανου με την μέθοδο LC-MS/MS, ανάλογα με τις συνθήκες και τους διαλύτες

που επιλέχτηκαν. Λαμβάνοντας τα αποτελέσματα υπόψη, επιλογή κατάλληλου διαλύτη και τεχνικών εκχύλισης για την επιλεκτική παραλαβή των επιθυμητών ουσιών.

Βιβλιογραφία

Ελληνική βιβλιογραφία

Σφλώμος, Κ. (2019), Βιολειτουργικά Τρόφιμα, Πρόσθετα & Συμπληρώματα Διατροφής, 2η έκδοση, Αθήνα, Εκδόσεις Τσότρας

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

Ait-Amir, B., Pougnet, P., & El Hami, A. (2020). 6—Meta-Model Development. Στο A. El Hami & P. Pougnet (Επιμ.), *Embedded Mechatronic Systems 2 (Second Edition)* (σσ. 157–187). ISTE. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-190-1.50006-2>

Araújo, Fábio Fernandes de, David de Paulo Farias, Iramaia Angélica Neri-Numa, και Glau-
cia Maria Pastore. ‘Polyphenols and their applications: An approach in food chemis-
try and innovation potential’. *Food Chemistry* 338 (15 Φεβρουάριος 2021): 127535.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>.

Azmir, J., I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A.
Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, και A. K. M. Omar. ‘Techniques for extrac-
tion of bioactive compounds from plant materials: A review’. *Journal of Food Engi-
neering, SI: Extraction and Encapsulation*, 117, τχ. 4 (1 Αύγουστος 2013): 426–36.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential
oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

Bernath, J. Aromatic plants. *In Cultivated Plants, Primarily as Food Sources*; Fuleky, G.,
Ed.; EOLSS: Paris, France, 2009; Volume 2, pp. 329–352.

Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols:
Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Ef-
fects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(7), 901. [https://doi.org/10.3390/mole-
cules21070901](https://doi.org/10.3390/mole-
cules21070901)

- Carocho, Márcio, Patricia Morales, και Isabel C. F. R. Ferreira. ‘Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives’. *Trends in Food Science & Technology* 71 (1 Ιανουάριος 2018): 107–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>.
- Chib, Ankita, Neeraj Gupta, Anju Bhat, Nadira Anjum, και Garima Yadav. ‘Role of antioxidants in food’. *International Journal of Chemical Studies* 8 (1 Ιανουάριος 2020): 2354–61. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i1aj.8621>.
- Christaki, Efterpi, Eleftherios Bonos, Ilias Giannenas, και Panagiota Florou-Paneri. ‘Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds’. *Agriculture* 2, τχ. 3 (Σεπτέμβριος 2012): 228–43. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030228>.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- de Elguea-Culebras, Gonzalo Ortiz de, Enrique Melero Bravo, και Raúl Sánchez-Vioque. ‘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 (1 Ιανουάριος 2022): 114261. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114261>.
- Dudonné, Stéphanie, Xavier Vitrac, Philippe Coutière, Marion Woillez, και Jean-Michel Mérellon. ‘Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays’. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, τχ. 5 (11 Μάρτιος 2009): 1768–74. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>.
- Garden, M.B. *Salvia Rosmarinus*. Διαθέσιμο από: <https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=b968>
- Hobday, D., S. P. J. Higson, και C. Mena. ‘17 - Role of diagnostic packaging in food supply chain management’. Στο *Delivering Performance in Food Supply Chains*, επιμέλεια

Carlos Mena και Graham Stevens, 349–65. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, 2010. <https://doi.org/10.1533/9781845697778.5.349>.

Hosseini H , Bolourian S , Yaghoubi Hamgini E , Ghanuni Mahababadi E . Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of polyphenols from dried rosemary leaves using response surface methodology. *J Food Process Preserv.* 2018; 42:e13778. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13778>

Humbird, D., & Fei, Q. (2016). Chapter 20—Scale-Up Considerations for Biofuels. Στο C. A. Eckert & C. T. Trinh (Επιμ.), *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization* (σσ. 513–537). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63475-7.00020-0>

Irakli, Maria, Adriana Skendi, Elisavet Bouloumpasi, Stamatia Christaki, Costas G. Biliaderis, και Paschalina Chatzopoulou. ‘Sustainable Recovery of Phenolic Compounds from Distilled Rosemary By-Product Using Green Extraction Methods: Optimization, Comparison, and Antioxidant Activity’. *Molecules* 28, τχ. 18 (Ιανουάριος 2023): 6669. <https://doi.org/10.3390/molecules28186669>.

Irmak, S., και O. Erbatur. ‘11 - Additives for environmentally compatible active food packaging’. Στο *Environmentally Compatible Food Packaging*, επιμέλεια Emo Chiellini, 263–93. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, 2008. <https://doi.org/10.1533/9781845694784.2.263>.

Jones, William P., και A. Douglas Kinghorn. ‘Extraction of Plant Secondary Metabolites’. Στο *Natural Products Isolation*, επιμέλεια Satyajit D. Sarker, Zahid Latif, και Alexander I. Gray, 323–51. *Methods in Biotechnology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. <https://doi.org/10.1385/1-59259-955-9:323>.

Jordán, Maria J., Vanesa Lax, Maria C. Rota, Susana Lorán, και José A. Sotomayor. ‘Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract’. *Industrial Crops and Products* 48 (1 Ιούλιος 2013): 144–52. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.031>.

- Lantzouraki, D. Z., Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P. G., Glamočlija, J., Ćirić, A., Soković, M., Heropoulos, G., & Proestos, C. (2014). Antiradical–antimicrobial activity and phenolic profile of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from different cultivars: A comparative study. *RSC Advances*, 5(4), 2602–2614. <https://doi.org/10.1039/C4RA11795F>
- Lizárraga-Velázquez, Cynthia E., Nayely Leyva-López, Crisantema Hernández, Erick Paul Gutiérrez-Grijalva, Jesús A. Salazar-Leyva, Idalia Osuna-Ruiz, Emmanuel Martínez-Montaño, κ.ά. ‘Antioxidant Molecules from Plant Waste: Extraction Techniques and Biological Properties’. *Processes* 8, τχ. 12 (Δεκέμβριος 2020): 1566. <https://doi.org/10.3390/pr8121566>.
- López-Bascón, M. A., και M. D. Luque de Castro. ‘Chapter 11 - Soxhlet Extraction’. Στο *Liquid-Phase Extraction*, επιμέλεια Colin F. Poole, 327–54. *Handbooks in Separation Science*. Elsevier, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6>.
- Lourenço, Sofia C., Margarida Moldão-Martins, και Vítor D. Alves. ‘Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications’. *Molecules* 24, τχ. 22 (Ιανουάριος 2019): 4132. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>.
- Macedo, Lucas Malvezzi de, Érica Mendes dos Santos, Lucas Militão, Louise Lacalendola Tundisi, Janaína Artem Ataide, Eliana Barbosa Souto, και Priscila Gava Mazzola. ‘Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L., Syn *Salvia Rosmarinus* Spenn.) and Its Topical Applications: A Review’. *Plants* 9, τχ. 5 (Μάιος 2020): 651. <https://doi.org/10.3390/plants9050651>.
- Min, Byungrok, και Dong Uk Ahn. ‘Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products -A review’. *Food Sci. Biotechnol* 14 (1 Ιανουάριος 2005): 152–63.
- Moharram, H, και Mohammed Youssef. ‘Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review’. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* 11 (1 Ιανουάριος 2014): 31–42.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., José Núñez, M., & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145–171. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5)

- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). *Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters* (σσ. 243–259). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00025-6>
- Paini, M., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Perego, P., Binello, A., & Cravotto, G. (2016). Influence of ethanol/water ratio in ultrasound and high-pressure/high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 349–358. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12956>
- Panche, A. N., A. D. Diwan, και S. R. Chandra. ‘Flavonoids: an overview’. *Journal of Nutritional Science* 5 (29 Δεκέμβριος 2016): e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- Prado, Juliana M., Renata Vardanega, Isabel C. N. Debien, Maria Angela de Almeida Meireles, Lia Noemi Gerschenson, Halagur Bogegowda Sowbhagya, και Smain Chemat. ‘Chapter 6 - Conventional extraction’. Στο *Food Waste Recovery*, επιμέλεια Charis M. Galanakis, 127–48. San Diego: Academic Press, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800351-0.00006-7>.
- Pushpangadan, P., και V. George. ‘4 - Basil’. Στο *Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)*, επιμέλεια K. V. Peter, 55–72. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, 2012. <https://doi.org/10.1533/9780857095671.55>.
- Rafiq, Aasima, Bushra Manzoor, Mariya Nayeem, Abida Jabeen, και Quraazah A. Amin. ‘Chapter Ten - Extraction of essential oils’. Στο *Extraction Processes in the Food Industry*, επιμέλεια Seid Mahdi Jafari και Sahar Akhavan-Mahdavi, 279–98. *Unit Operation and Processing Equipment in the Food Industry*. Woodhead Publishing, 2024. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819516-1.00005-3>.
- Ribeiro-Santos, Regiane, Denise Carvalho-Costa, Carlos Cavaleiro, Helena S. Costa, Tânia Gonçalves Albuquerque, Maria Conceição Castilho, Fernando Ramos, Nathália R. Melo, και Ana Sanches-Silva. ‘A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)’. *Trends in Food Science & Technology* 45, τχ. 2 (1 Οκτώβριος 2015): 355–68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.015>.

- Rodino, Steliana, και Marian Butu. '3 - Herbal Extracts—New Trends in Functional and Medicinal Beverages'. Στο *Functional and Medicinal Beverages*, επιμέλεια Alexandru Mihai Grumezescu και Alina Maria Holban, 73–108. Academic Press, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00003-0>.
- Rodríguez-Rojo, S., A. Visentin, D. Maestri, και M. J. Cocero. 'Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents'. *Journal of Food Engineering* 109, τχ. 1 (1 Μάρτιος 2012): 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.029>.
- Saha, Ajoy, και B. B. Basak. 'Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants'. *Industrial Crops and Products* 145 (1 Μάρτιος 2020): 111979. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111979>.
- Sasikumar, B. '25 - Rosemary'. Στο *Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)*, επιμέλεια K. V. Peter, 452–68. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, 2012. <https://doi.org/10.1533/9780857095671.452>.
- Sharifi-Rad, Javad, Shahira M. Ezzat, Mahitab H. El Bishbishy, Dima Mnayer, Farukh Sharopov, Ceyda S. Kılıç, Monica Neagu, κ.ά. 'Rosmarinus Plants: Key Farm Concepts towards Food Applications'. *Phytotherapy Research* 34, τχ. 7 (2020): 1474–1518. <https://doi.org/10.1002/ptr.6622>.
- Skendi, Adriana, Maria Irakli, Paschalina Chatzopoulou, Elisavet Bouloumpasi, και Costas G. Biliaderis. 'Phenolic extracts from solid wastes of the aromatic plant essential oil industry: Potential uses in food applications'. *Food Chemistry Advances* 1 (1 Οκτώβριος 2022): 100065. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100065>.
- Solomou, Alexandra, Konstantinos Martinos, Elpiniki Skoufogianni, και Nicholas Danalatos. 'Medicinal and aromatic plants in Greece and their future prospects: a review' 4 (15 Ιούνιος 2015): 9–20. <https://doi.org/10.12735/as.v4i1p09>.

- Sruthi, D., M. Dhanalakshmi, H. C. Yashavantha Rao, Ramalingam Parthasarathy, και C. Jayabaskaran. 'Chapter 1 - Extraction, isolation, and characterization of phytochemicals, the bioactive compounds of plants'. Στο Recent Frontiers of Phytochemicals, επιμέλεια Siddhartha Pati, Tanmay Sarkar, και Dibyajit Lahiri, 1–8. Elsevier, 2023. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19143-5.00033-5>.
- Sultana, Bushra, Farooq Anwar, και Muhammad Ashraf. 'Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts'. *Molecules* 14, τχ. 6 (Ιούλιος 2009): 2167–80. <https://doi.org/10.3390/molecules14062167>.
- Truzzi, Eleonora, Mohamed Aymen Chaouch, Gaia Rossi, Lorenzo Tagliacruzchi, Davide Bertelli, και Stefania Benvenuti. 'Characterization and Valorization of the Agricultural Waste Obtained from Lavandula Steam Distillation for Its Reuse in the Food and Pharmaceutical Fields'. *Molecules* 27, τχ. 5 (Ιανουάριος 2022): 1613. <https://doi.org/10.3390/molecules27051613>.
- Vella, Filomena Monica, και Bruna Laratta. 'Rosemary Essential Oil Extraction and Residue Valorization by Means of Polyphenol Recovery'. *Biology and Life Sciences Forum* 26, τχ. 1 (2023): 8. <https://doi.org/10.3390/Foods2023-15024>.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106(2), 804–810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.062>
- Wąsowicz, Erwin, Anna Gramza, Marzanna Heś, Henryk H. Jeleń, Józef Korczak, Maria Małecka, Sylwia Mildner-Szkudlarz, Magdalena Rudzińska, Urszula Samotyja, και Renata Zawirska-Wojtasiak. 'OXIDATION OF LIPIDS IN FOOD'. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 54, τχ. 1s (31 Μάρτιος 2004): 87–100.
- Whitford, W. G., Lundgren, M., & Fairbank, A. (2018). Chapter 8—Cell Culture Media in Bioprocessing. Στο G. Jagschies, E. Lindskog, K. Łacki, & P. Galliher (Επιμ.), *Biopharmaceutical Processing* (σσ. 147–162). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00008-6>

Xu, Dong-Ping, Ya Li, Xiao Meng, Tong Zhou, Yue Zhou, Jie Zheng, Jiao-Jiao Zhang, και Hua-Bin Li. 'Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources'. *International Journal of Molecular Sciences* 18, τχ. 1 (Ιανουάριος 2017): 96. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>.

Πηγές εικόνων

Εικόνα 1.1:

Rodino, Steliana, και Marian Butu. '3 - Herbal Extracts—New Trends in Functional and Medicinal Beverages'. Στο Functional and Medicinal Beverages, επιμέλεια Alexandru Mihai Grumezescu και Alina Maria Holban, 73–108. Academic Press, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00003-0>.

Εικόνα 1.2:

Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "rosemary". Encyclopedia Britannica, 21 Feb. 2024, Διαθέσιμο από: <https://www.britannica.com/plant/rosemary>.

Εικόνα 1.3:

Silori, Gaurav & Kushwaha, Naveen & Kumar, Vimal. (2019). Essential Oils from Pines: Chemistry and Applications. 10.1007/978-3-030-16546-8_10.

Εικόνα 2.1:

Antimicrobial activity of flavonoids - Scientific Figure on ResearchGate. Διαθέσιμο από: https://www.researchgate.net/figure/The-skeleton-structure-of-the-flavones-a-class-of-flavonoids-with-rings-named-and_fig1_7446344

Εικόνα 2.2:

National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 16131300, Tannic Acid. Διαθέσιμο από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tannic-Acid>.

Εικόνα 2.3:

Carocho, Márcio, Patricia Morales, και Isabel C. F. R. Ferreira. 'Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives'. Trends in Food Science & Technology 71 (1 Ιανουάριος 2018): 107–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>.

Εικόνες 4.1 - 4.2 - 4.3:

Minitab, What are response surface designs, central composite designs, and Box-Behnken designs? Διαθέσιμο από: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/>

Πηγές πινάκων

Πίνακας 1.1:

Solomou, Alexandra, Konstantinos Martinos, Elpiniki Skoufogianni, και Nicholas Danalatos. ‘Medicinal and aromatic plants in Greece and their future prospects: a review’ 4 (15 Ιούνιος 2015): 9–20. <https://doi.org/10.12735/as.v4i1p09>.

Πίνακας 1.2:

de Elguea-Culebras, Gonzalo Ortiz de, Enrique Melero Bravo, και Raúl Sánchez-Vioque. ‘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 (1 Ιανουάριος 2022): 114261. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114261>.

Πίνακας 1.3:

Sumathykutty, M. A., J. Madhusudana Rao, K. P. Padmakumari, και C. S. Narayanan. ‘Essential Oil Constituents of Some Piper Species’. *Flavour and Fragrance Journal* 14, τχ. 5 (1999): 279–82. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199909/10\)14:5<279::AID-FFJ821>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5<279::AID-FFJ821>3.0.CO;2-0).

Inouye, Shigeharu, Toshio Takizawa, και Hideyo Yamaguchi. ‘Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact’. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, τχ. 5 (1 Μάιος 2001): 565–73. <https://doi.org/10.1093/jac/47.5.565>.

Bernáth, J., & Fuleky, G. (2009). Aromatic plants. Cultivated plants, primarily as food sources, 2, 329-352.

Ghorbanpour, Mansour, και Mehrnaz Hatami. ‘Changes in Growth, Antioxidant Defense System and Major Essential Oils Constituents of Pelargonium Graveolens Plant Exposed to Nano-Scale Silver and Thidiazuron’. *Indian Journal of Plant Physiology* 20, τχ. 2 (1 Ιούνιος 2015): 116–23. <https://doi.org/10.1007/s40502-015-0145-8>.

Tak, Jun-Hyung, Eduardo Jovel, και Murray B Isman. ‘Comparative and Synergistic Activity of Rosmarinus Officinalis L. Essential Oil Constituents against the Larvae and an Ovarian Cell Line of the Cabbage Looper, Trichoplusia Ni (Lepidoptera: Noctuidae): Activity of Rosemary Essential Oil Constituents against Cabbage Looper Larvae and Ovarian Cells’. *Pest Management Science* 72, τχ. 3 (Μάρτιος 2016): 474–80. <https://doi.org/10.1002/ps.4010>.

Maurya, Shiwani, και Neelam Singh Sangwan. ‘Profiling of Essential Oil Constituents in Ocimum Species’. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 90, τχ. 3 (1 Σεπτέμβριος 2020): 577–83. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01123-8>.

Πίνακας 1.4:

Saha, Ajoy, και B. B. Basak. ‘Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants’. *Industrial Crops and Products* 145 (1 Μάρτιος 2020): 111979. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111979>.

Πίνακας 1.5:

de Elguea-Culebras, Gonzalo Ortiz de, Enrique Melero Bravo, και Raúl Sánchez-Vioque. ‘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 (1 Ιανουάριος 2022): 114261. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114261>.

Πίνακας 1.6:

Skendi, Adriana, Maria Irakli, Paschalina Chatzopoulou, Elisavet Bouloumpasi, και Costas G. Biliaderis. ‘Phenolic extracts from solid wastes of the aromatic plant essential oil industry: Potential uses in food applications’. *Food Chemistry Advances* 1 (1 Οκτώβριος 2022): 100065. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100065>.

Πίνακες 2.1 - 2.2 - 2.3 - 2.4:

Brglez Mojzer, Eva, Maša Knez Hrnčič, Mojca Škerget, Željko Knez, και Urban Bren. ‘Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects’. *Molecules* (Basel, Switzerland) 21, τχ. 7 (11 Ιούλιος 2016): 901. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>.

Πίνακας 2.5:

Σφλώμος, Κ. (2019), Βιολειτουργικά Τρόφιμα, Πρόσθετα & Συμπληρώματα Διατροφής, 2η έκδοση, Αθήνα, Εκδόσεις Τσότρας

Lourenço, Sofia C., Margarida Moldão-Martins, και Vítor D. Alves. ‘Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications’. *Molecules* 24, τχ. 22 (Ιανουάριος 2019): 4132. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>.

Πίνακας 4.1:

Ait-Amir, B., Pougnet, P., & El Hami, A. (2020). 6—Meta-Model Development. Στο A. El Hami & P. Pougnet (Επιμ.), *Embedded Mechatronic Systems 2 (Second Edition)* (σσ. 157–187). ISTE. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-190-1.50006-2>