



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

«Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από παραπροϊόντα βασιλικού με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού και υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας»



ΘΕΟΦΙΛΑΤΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ
ΑΜ: 19684024

ΚΟΛΕΤΣΟΥ ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ
ΑΜ:19684039

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΤΣΙΑΚΑ ΘΑΛΕΙΑ

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2024



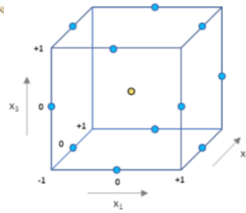
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

SCHOOL OF FOOD SCIENCES

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

Diploma Thesis

“Extraction of phenolic compounds from basil by-products using experimental design models and liquid chromatography-mass spectroscopy”



**THEOFILATOS SPYRIDON
RN: 19684024**

**KOLETSOU GARYFALLIA
RN: 19684039**

SUPERVISOR:

THALIA TSIAKA

ATHENS, MARCH 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από παραπροϊόντα βασιλικού με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού και υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας»

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή
Η πτυχιακή/διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική
Επιτροπή:

A/α	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1.	Τσιάκα Θάλεια	ΕΚΤΑΚΤΟ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΕΣΠΑ/ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ	
2.	Σινάνογλου Βασιλεία	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ - ΚΟΣΜΗΤΟΡΑΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ/ΜΕΛΟΣ	
3.	Κρίτση Ευτυχία	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ/ΜΕΛΟΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Θεοφιλάτος Σπυρίδων του Γερασίμου και Κολέτσου Γαρυφαλλιά του Δήμου με αριθμό μητρώου 19684024 και 19684039 αντίστοιχα, φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουν υπεύθυνα ότι:

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

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

Ο ΔΗΛΩΝ

ΘΕΟΦΙΛΑΤΟΣ

ΣΠΥΡΙΔΩΝ



Η ΔΗΛΟΥΣΑ

ΚΟΛΕΤΣΟΥ

ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ



Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτριά μας Δρ. Τσιάκα Θάλεια, για την καθοδήγηση, την υποστήριξη, την εμπιστοσύνη και τις γνώσεις που μας παρείχε καθ' όλη την πορεία εκπόνησης της πτυχιακής μας εργασίας. Επιπλέον, ευχαριστούμε τον κ. Γιώργο Σωτηρούδη, μέλος του Ειδικού Επιστημονικού & Τεχνικού Προσωπικού του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Τέλος, δεν γίνεται να παραλείψουμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειες και τους φίλους μας για τη διαρκή στήριξη και αγάπη τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μας στο τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων.

Σπύρος-Φιλίνα

Μάρτιος 2024

Περίληψη

Η απόσταξη των αιθέριων ελαίων από τα αρωματικά φυτά παράγει μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων, τα οποία χαρακτηρίζονται από ένα πλούσιο περιεχόμενο σε βιοδραστικά συστατικά. Στην παρούσα εργασία έγινε ανάκτηση των φαινολικών συστατικών από παραπροϊόντα υδροαπόσταξης και επιλεγμένες δρόγες δύο ειδών βασιλικού (Σγουρού ή *Ocimum basilicum* var. *Minimum* & Πλατύφυλλου ή *Ocimum basilicum* var. *Genovese*) εφαρμόζοντας την εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE). Ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken, ο οποίος κατατάσσεται στην μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM), χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση 4 παραγόντων εκχύλισης UAE σε τρία επίπεδα τιμών (-1, 0, +1). Οι 4 ανεξάρτητοι παράγοντες του μοντέλου ήταν η συγκέντρωση της αιθανόλης στο υδατοαιθανολικό διαλύτη εκχύλισης (20-100% v/v), ο χρόνος εκχύλισης (10-40 min), η αναλογία διαλύτη/υλικού (20-60 mL/g), το ποσοστό της έντασης των υπερήχων (20-80%), ενώ η απόκριση του μοντέλου ήταν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total Phenolic Content, TPC). Σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% απορρίφθηκαν οι όροι με $p \gg 0,05$, δηλαδή $p \geq 0,20$, κρατώντας το μοντέλο ιεραρχικό. Το τελικό πειραματικό μοντέλο Box-Behnken θεωρείται ότι είναι αξιόπιστο ($R^2=85,65\%$, $R^2(\text{adj})=78,05\%$, P-value για Lack-of-Fit=0,955) και προβλέπει αξιόπιστα σε ποσοστό 59,04%. Η πιο καθοριστική παράμετρος φάνηκε να είναι η συγκέντρωση της αιθανόλης. Το βέλτιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο ισούται με 18,0 mg GAE/g dry basil και αντιστοιχεί σε συνθήκες εκχύλισης: 20% συγκέντρωση αιθανόλης (%v/v), 10 min χρόνος εκχύλισης, 49,5 mL/g αναλογία διαλύτη/υλικού και 80% έντασης υπερήχων. Η αντιοξειδωτική (FRAP) και αντιριζική (ABTS) δράση προσδιορίστηκαν σε εκχυλίσματα που είχαν προκύψει από συνθήκες που έδωσαν βέλτιστο και χαμηλό TPC. Οι τιμές για TPC και ABTS ήταν υψηλότερες στα δείγματα του πλατύφυλλου βασιλικού, ενώ η τιμή της FRAP ήταν μέγιστη σε δείγμα σγουρού βασιλικού. Το φυτοχημικό προφίλ, και ιδιαίτερα το φαινολικό προφίλ, αναλύθηκε με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS). Με την βοήθεια της βιβλιογραφίας, εντοπίστηκαν συνολικά 64 ενώσεις, εκ' των οποίων κυριάρχες ήταν τα φαινολικά οξέα, οι γλυκοζίτες και τα σαλβιανολικά οξέα. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι εκτός από τις φαινολικές ενώσεις, ταυτοποιήθηκε το παλμιτικό οξύ και παράγωγα άλλων λιπαρών οξέων.

Λέξεις κλειδιά:

Βασιλικός, Παραπροϊόντα υδροαπόσταξης, Εκχύλιση με υπερήχους, Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken, Φαινολικές ενώσεις, Αντιοξειδωτική δράση, Αντιριζική δράση, Υγρή χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS)

Abstract

The distillation of essential oils from aromatic plants produces large quantities of by-products, which are characterized by a rich content of bioactive compounds. In the current study, phenolic compounds were recovered from hydrodistillation by-products and selected dry herbs of two basil species (Greek Basil or *Ocimum basilicum* var. *Minimum* & Genovese Basil or *Ocimum basilicum* var. *Genovese*) by applying Ultrasound-Assisted Extraction (UAE). Box Behnken experimental design, which is classified as Response Surface Methodology (RSM), was used to optimize 4 extraction factors at 3 levels (-1, 0, +1). The 4 Independent factors of the model were ethanol concentration in aqueous ethanol extraction solvent (20-100% v/v), extraction time (10-40 min), solvent/material ratio (20-60 mL/g), percentage of ultrasound intensity (20-80%), while the response of the model was Total Phenolic Content (TPC). According to the analysis of variance for a 95% confidence level, terms with $p >> 0.05$, more specifically $p \geq 0.20$, were rejected, keeping the experimental model hierarchical. The final Box-Behnken design is considered to be reliable ($R^2=85,65\%$, $R^2(\text{adj})=78,05\%$, P-value for Lack-of-Fit=0,955). Moreover, it has a reliable predictive ability of 59.04%. The most determining parameter appeared to be the ethanol concentration. The optimal total phenolic content equals 18.0 mg GAE/g dry basil and corresponds to extraction conditions: 20% ethanol (% v/v), 10 min extraction time, 49.5 mL/g solvent/material ratio and 80% ultrasonic intensity. Antioxidant (FRAP) and antiradical (ABTS) activities were determined in extracts obtained from conditions that gave optimal and Low TPC. The values for TPC and ABTS were highest in the Genovese basil, while the FRAP value was maximum in Greek Basil. The phytochemical profile, particularly the phenolic profile, was analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method. With the aid of literature, a total of 64 compounds were identified, of which phenolic acids, glycosides and salvianolic acids were dominant. It is also interesting that in addition to phenolic compounds, palmitic acid and other fatty acids derivatives were identified.

Keywords:

Basil, Hydrodistillation by-products, Ultrasound-Assisted Extraction (UAE), Box-Behnken Design, Phenolic compounds, Antioxidant activity, Antiradical activity, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Πίνακας περιεχομένων

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	1
1.1. Βασιλικός (<i>Ocimum basilicum</i> L.).....	1
1.1.1. Ορισμός – Προέλευση – Ετυμολογία βασιλικού.....	1
1.1.2. Βοτανική ταξινόμηση – χαρακτηριστικά είδη βασιλικού.....	1
1.1.3. Στοιχεία καλλιέργειας και ανάπτυξης βασιλικού.....	3
1.1.4. Χημική σύσταση και ιδιότητες βασιλικού.....	4
1.1.5. Εφαρμογές και προϊόντα βασιλικού.....	6
1.2. Βιοδραστικές ενώσεις φυτικών υποστρωμάτων.....	8
1.3. Εκχύλιση φυτοχημικών.....	12
1.3.1. Εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound-Assisted extraction, UAE).....	16
1.4. Αιθέρια έλαια.....	22
1.4.1. Σύσταση αιθέριων ελαίων.....	22
1.4.2. Αγορά αιθέριων ελαίων βασιλικού.....	23
1.4.3. Ιδιότητες και χρήσεις των αιθέριων ελαίων βασιλικού.....	24
1.4.4. Κύριοι τρόποι ανάκτησης των αιθέριων ελαίων.....	26
1.5. Νομοθεσία αιθέριων ελαίων και εκχυλισμάτων βασιλικού.....	27
1.6. Παραπροϊόντα αρωματικών φυτών.....	29
1.7. Βελτιστοποίηση εκχυλίσεων.....	34
1.7.1. Γενικά για μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση.....	34
1.7.2. Πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiments, DoE): Γενικές Αρχές.....	36
1.7.3. Σχεδιασμός Box-Behnken (Box-Behnken Design, BBD).....	39
1.7.4. Μηχανική μάθηση (Machine learning).....	41
Κεφάλαιο 2: Σκοπός της εργασίας.....	42
Κεφάλαιο 3: Υλικά και Μέθοδοι.....	44
3.1. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας.....	44
3.2. Προετοιμασία δείγματος.....	45
3.3. Εκχύλιση φαινολικών συστατικών με υπερήχους.....	46
3.4. Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken σε δείγματα βασιλικού.....	47
3.5. Φασματοφωτομετρικές δοκιμές.....	48
3.5.1. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	49
3.5.2. Προσδιορισμός αναγωγικής ισχύος/αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή FRAP.....	50
3.5.3. Εκτίμηση ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS* ⁺	52
3.6. Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) για την ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων επεξεργασίας βασιλικού.....	53

3.7. Στατιστική ανάλυση	55
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα και συζήτηση	56
4.1. Προσαρμογή του πειραματικού μοντέλου Box-Behnken	56
4.2. Επίδραση των παραγόντων εκχύλισης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δρογών.....	62
4.3. Βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για δρόγες βασιλικού	69
4.4. Προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής, αντιριζικής δράσης σε παραπροϊόντα και επιλεγμένα δείγματα δρόγης βασιλικού.	71
4.4.1. Συγκριτική ανάλυση για τις δύο ποικιλίες βασιλικού, δρόγης και παραπροϊόντων.....	73
4.4.2. Συσχέτιση φασματοφωτομετρικών μεθόδων μέσω του στατιστικού δείκτη Pearson's Correlation	77
Κεφάλαιο 5: Ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS).....	81
Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα	93
Κεφάλαιο 7: Μελλοντικές προοπτικές.....	97
Κεφάλαιο 8: Βιβλιογραφία.....	98

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1.1: Βασιλικός (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	1
Εικόνα 1.2: Σημαντικά είδη βασιλικού με την κοινή και επιστημονική τους ονομασία.....	3
Εικόνα 1.3: Βασικά χαρακτηριστικά Βασιλικού	4
Εικόνα 1.4: Προϊόντα με κύριο συστατικό το βασιλικό	8
Εικόνα 1.5: Δομές των κύριων βιοδραστικών συστατικών που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του βασιλικού	9
Εικόνα 1.6: Κατηγορίες φαινολικών συστατικών	10
Εικόνα 1.7: Συμβατικές και μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης	13
Εικόνα 1.8: Το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης	17
Εικόνα 1.9: Η επίδραση των υπερήχων στο φυτικό κύτταρο	17
Εικόνα 1.10: Σύστημα εκχύλισης με αισθητήρα υπερήχων (probe) (Chemat et al., 2017).....	21
Εικόνα 1.11: Σύστημα εκχύλισης με λουτρό υπερήχων (Chemat et al., 2017).....	21
Εικόνα 1.12: Χαρακτηριστικές ενώσεις αιθέριων ελαίων (Gurav et al., 2022).....	22
Εικόνα 1.13: Αύξηση της διεθνούς αγοράς αιθέριου ελαίου βασιλικού από το 2021-2030 (<i>Basil Essential Oil Market Size, Share & Growth Report 2030, 2022</i>).....	23
Εικόνα 1.14: Ιδιότητες και χρήσεις αιθέριων ελαίων στη βιομηχανία (Salanță et al., 2022).....	25
Εικόνα 1.15: Μέθοδοι παραλαβής αιθέριων ελαίων	26
Εικόνα 1.16: α) Τα επιστημονικά άρθρα που δημοσιεύτηκαν στο Scopus ανά έτος, για την αξιοποίηση των αποβλήτων στον τομέα των αρωματικών φυτών β)Απεικονίζεται η γεωγραφική κατανομή επιστημονικών άρθρων που δημοσιεύθηκαν (Marcelino et al., 2023).....	31
Εικόνα 1.17: Αξιοποίηση των παραπροϊόντων που παραμένουν μετά την απόσταξη των αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών (Skendi et al., 2022)	34
Εικόνα 1.18: Σύγκριση των δύο μεθόδων βελτιστοποίησης, OVAT(α απεικόνιση) και πειραματικού σχεδιασμού (β απεικόνιση) (Preu et al., 1998).....	36

Εικόνα 1.19: Τα πειραματικά σημεία (συμπαγείς κύκλοι) ενός σχεδιασμού Box-Behnken με 3 παράγοντες (Benedetti et al., 2022)	39
Εικόνα 1.20: Το νευρωνικό δίκτυο για την βελτιστοποίηση των παραγόντων εκχύλισης (θερμοκρασία, χρόνος, οξύτητα, αναλογία στερεού/υγρού) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Rebollo-Hernanz et al., 2021).	41
Εικόνα 3.1: Διάγραμμα ροής πειραματικής πορείας.....	44
Εικόνα 3.2: (a) Η οργανολογία για την εκχύλιση με υπερήχους (UAE) και (b) το θερμοστοιχείο για την καταγραφή της θερμοκρασίας εκχύλισης.	46
Εικόνα 3.3: Αλλαγή χρώματος στην αντίδραση Folin-Ciocalteu	49
Εικόνα 3.4: Αναγωγή του άχρωμο συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη (Fe 3+ -TPZ) σε δισθενή σίδηρο (Fe 2+ -TPZ) με έντονο μπλε-μωβ χρώμα.	51
Εικόνα 3.5: Η αντίδραση αποχρωματισμού κατά την δέσμευση της ρίζας ABTS *+	52
Εικόνα 3.6: Συνθήκες για IDA πειράματα.	55
Εικόνα 4.1: Εξίσωση πρόβλεψης ολικού φαινολικού περιεχομένου με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken.	60
Εικόνα 4.2: Αναπαρίστανται τα διαγράμματα για τις μεμονωμένες επιδράσεις (main effects) των 4 παραγόντων εκχύλισης ως προς το TPC.	62

Κατάλογος γραφημάτων

Γράφημα 4.1: Ραβδόγραμμα Pareto των κανονικοποιημένων επιδράσεων της εκχύλισης με υπερήχους.....	61
Γράφημα 4.2: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση της έντασης των υπερήχων και του χρόνου εκχύλισης (BD) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. ...	64
Γράφημα 4.3: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση της αναλογίας διαλύτη/υλικού και του χρόνου εκχύλισης (BC) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο	65
Γράφημα 4.4: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση της αναλογίας διαλύτη-υλικού και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (CA) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.....	66
Γράφημα 4.5: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση της έντασης των υπερήχων και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (DA) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.....	67
Γράφημα 4.6: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση του χρόνου εκχύλισης και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (BA) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.....	68
Γράφημα 4.7: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση της έντασης των υπερήχων και της αναλογίας διαλύτη/υλικού (DC) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.....	69
Γράφημα 5.1: Ραβδόγραμμα στο οποίο αναπαρίστανται οι ταυτοποιημένες ενώσεις στα «Best» δείγματα	89
Γράφημα 5.2: Ραβδόγραμμα στο οποίο αναπαρίστανται οι ταυτοποιημένες ενώσεις στα «Low» δείγματα	90

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1.1: Βοτανική ταξινόμηση βασιλικού	2
Πίνακας 1.2: Παραδείγματα εφαρμογών συμβατικών και μη εκχυλίσεων σε φυτικά υποστρώματα. 15	
Πίνακας 1.3: Περιεχόμενο στερεών και υγρών αποβλήτων βασιλικού	30
Πίνακας 1.4: Ιδιότητες και εφαρμογές παραπροϊόντων αρωματικών φυτών	32
Πίνακας 1.5: Παραδείγματα βελτιστοποιημένων εκχυλίσεων με την βοήθεια του πειραματικού σχεδιασμού	38
Πίνακας 1.6: Χαρακτηριστικά παραδείγματα μελετών που εφαρμόζουν την εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE) και την βελτιστοποίηση τους με το πειραματικό μοντέλο Box-Behnken	40
Πίνακας 3.1:Κωδικοποιημένες και πραγματικές τιμές των παραγόντων βελτιστοποίησης της εκχύλισης	48
Πίνακας 4.1: Τα 27 τυχαιοποιημένα πειράματα του μοντέλου Box-Behnken και τα αποτελέσματα του ολικού φαινολικού περιεχομένου για δείγματα ξηρού βασιλικού (δρόγες).....	56
Πίνακας 4.2: Τα 3 κεντρικά σημεία (center points) του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken.....	57
Πίνακας 4.3: Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken.....	58
Πίνακας 4.4: Στατιστικοί δείκτες για το μοντέλο πρόβλεψης	59
Πίνακας 4.5: Θεωρητικές και πειραματικές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης φαινολικών συστατικών 70	
Πίνακας 4.6: Συνθήκες εκχύλισης βασιλικού με βέλτιστη και χαμηλή απόδοση σε TPC.	71
Πίνακας 4.7: Εφαρμογή της βέλτιστης και χαμηλής συνθήκης σε παραπροϊόντα και επιλεγμένες δρόγες βασιλικού.....	72
Πίνακας 4.8: Εστιασμένος πίνακας για τα αποτελέσματα της ποικιλίας «Σγουρού» βασιλικού παραπροϊόντα και δρόγη.....	74
Πίνακας 4.9: Εστιασμένος πίνακας για τα αποτελέσματα της ποικιλίας «Πλατύφυλλου» βασιλικού παραπροϊόντα και δρόγη.....	75
Πίνακας 4.10: Συσχέτιση F-C, FRAP, ABTS** με το δείκτη PCC για όλα τα δείγματα, N=22 (Συμπεριλαμβάνονται οι δρόγες βασιλικού).....	78
Πίνακας 4.11: Συσχέτιση F-C, FRAP, ABTS** με το δείκτη PCC για όλα τα παραπροϊόντα σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού, N=20 (Εξαιρέθηκαν οι δρόγες βασιλικού)	79
Πίνακας 5.1: Επεξήγηση της κωδικοποίησης δειγμάτων παραπροϊόντων επεξεργασίας βασιλικού για την ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο LC-MS/MS.	81
Πίνακας 5.2: Συνολική παρουσίαση των ταυτοποιηθέντων φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα "Best" & "Low" των παραπροϊόντων βασιλικού.....	83

Κατάλογος εξισώσεων

Εξίσωση 1.1: Σχεδιασμός Box-Behnken	40
---	----

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1. Βασιλικός (*Ocimum basilicum* L.)

1.1.1. Ορισμός – Προέλευση – Ετυμολογία βασιλικού

Ο βασιλικός (Εικόνα 1.1), είναι ένα ευρέως γνωστό μονοετές ποώδες αρωματικό βότανο, το οποίο περιέχει μια πληθώρα ωφέλιμων βιοδραστικών ενώσεων και καλλιεργείται τόσο για τη διάθεσή του ως νωπό βότανο, όσο και για την παραγωγή προϊόντων βασισιμένων στο βασιλικό (Corrado et al., 2020).



Εικόνα 1.1: Βασιλικός (*Ocimum basilicum* L.)

Αναπτύσσεται σε κάθετη διάταξη και έχει προέλευση από τη Νοτιοδυτική Ασία (Ινδία, Ταϊλάνδη, Πακιστάν, Ιράν) και τη Νότιο Αφρική. Η άγρια μορφή του, είναι πολυετής και αναπτύσσεται στα νησιά του Ειρηνικού (Sipos et al., 2021). Ευδοκίμει σε τροπικό και υποτροπικό κλίμα, για αυτό και η διάδοση του εξαπλώθηκε στην εύκρατη ζώνη της Μεσογείου (Ελλάδα, Ιταλία, Τουρκία, Αίγυπτο), καθώς την Κεντρική και Νότια Αμερική (Καλιφόρνια, Αριζόνα, Μεξικό). Η κοινή ονομασία του, προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «βασιλεύς», καθώς θεωρείτο το βότανο των βασιλιάδων, λόγω του εκλεπτυσμένου και βασιλικού αρώματός του. Η βοτανική ονομασία του «*Ocimum basilicum* L.,», πηγάζει από την ελληνική λέξη «ώκιμον» προερχόμενη από τη ρίζα του ρήματος «όζειν» που σημαίνει «αναδύει μυρωδιά».

1.1.2. Βοτανική ταξινόμηση – χαρακτηριστικά είδη βασιλικού

Ο βασιλικός ως αρωματικό φυτό, εντάσσεται στο βασίλειο Plantae και ανήκει στην οικογένεια των Lamiales (Χειλανθή) (Πίνακας 1.1). Τα φυτά της οικογένειας των Lamiales, συμπεριλαμβανομένου του βασιλικού, παρουσιάζουν έντονο χαρακτηριστικό άρωμα, φέρουν ελαιοφόρους αγωγούς, εκεί δηλαδή που συσσωρεύεται το αιθέριο έλαιο του φυτού. Οι βλαστοί είναι λεπτοί, με τετράγωνη διατομή και τα άνθη τους αναπτύσσονται στην κορυφή των βλαστών σε πυραμιδική μορφή συνήθως ανά τριάδες. Τα

φύλλα τους είναι απλά, μεγαλύτερα σε μήκος από ότι σε πλάτος, βρίσκονται σε αντίθετη διάταξη και έχουν δυο διαφορετικές επιφάνειες,

Πίνακας 1.1: Βοτανική ταξινόμηση βασιλικού

Βοτανική Ταξινόμηση	
Βασίλειο	Plantae
Συνομοταξία	Magnoliophyta (Angiospermae)
Τάξη	Lamiales
Κλάση	Magnoliopsida
Οικογένεια	Lamiaceae (Labiatae)
Γένος	<i>Ocimum</i>
Είδος	<i>Ocimum basilicum</i>

Στο γένος *Ocimum*, υπάρχουν 60 διαφορετικά είδη, με κάποια από τα σημαντικότερα μέλη του γένους να είναι: το *Ocimum americanum* L. «ο λεμονοβασιλικός», *Ocimum sanctum* ή *tenuiflorum* L. «ο ιερός βασιλικός», *Ocimum gratissimum* L. «ο βασιλικός Τούλσι» και *Ocimum basilicum* L. «ο κοινός βασιλικός ή γλυκός βασιλικός». Κυρίως στον *Ocimum basilicum* ταξινομείται σε έξι διαφορετικούς τύπους με βάση τη μορφολογία του φυλλώματος (Εικόνα 1.2) (Shahrajabian et al., 2020):

- Πλατύφυλλος “Genovese” (*Ocimum basilicum* var. Genovese) που διαθέτει μεγάλο και πλατύ φύλλωμα >3cm
- Τύποι νάνων “Minimum dwarf ή Dwarf bush” με πολύ χαμηλό και μικρό φύλλωμα <1cm
- Θαμνώδεις τύποι, όπως ο Σγουρός “Bush ή Greek basil” (*Ocimum basilicum* var. Minimum) είναι θαμνώδες το φύλλωμα, μικρού μήκους <2cm
- Μωβ βασιλικός “Purple basil” (*Ocimum basilicum* var. Purpurascens) που διαθέτει ερυθροϊώδη απόχρωση φυλλώματος
- Βασιλικός με φύλλα μαρουλιού “Lettuce-leaf basil” (*Ocimum basilicum* var. Crispum) που έχει μεγάλα φύλλα μήκους ≈2-3cm με ανάγλυφες φουσκάλες
- Συμπαγείς και σφαιροειδείς τύποι “ Compact bush basil” με σφαιροειδές σχήμα και μήκος φύλλων <1cm



Εικόνα 1.2: Σημαντικά είδη βασιλικού με την κοινή και επιστημονική τους ονομασία

1.1.3. Στοιχεία καλλιέργειας και ανάπτυξης βασιλικού

Σε αντίθεση με άλλα φυτά που ανήκουν στην οικογένεια των *Lamiaceae* (*Labiatae*), ο βασιλικός αδυνατεί να αναπτυχθεί σε ανταγωνιστικά περιβάλλοντα. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να φυτεύεται σε περιοχές που δεν υπάρχει ανταγωνιστική βλάστηση και να έχει επαρκή πρόσβαση στο φως και το νερό. Ο βασιλικός απαιτεί υψηλή έκθεση στον ήλιο, ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί και να συνθέσει φυτοθρεπτικά συστατικά, ενώ είναι ευαίσθητος στις βροχοπτώσεις και επομένως απαιτείται καλή αποστράγγιση του εδάφους. Παραδοσιακά, ο βασιλικός καλλιεργείται σε χωράφια, που αποτελεί μια οικονομική καλλιεργητική πρακτική. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν, ότι η καλλιέργεια του βασιλικού σε υδροπονικά συστήματα απουσία χώματος, είναι πιο αποδοτική και ο βασιλικός εμφανίζει αυξημένη περιεκτικότητα σε βιοενεργά συστατικά (Maurer et al., 2023). Αυτό οφείλεται στο στρες που δημιουργείται στο φυτό παρουσία μεγάλης ποσότητας νερού. Ο βασιλικός αντιδρά στην κατάσταση αυτή και ενεργοποιεί το μηχανισμό προστασίας του, απελευθερώνοντας μεγαλύτερες ποσότητες αντιοξειδωτικών για να προστατευτεί (Burducea et al., 2019). Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι η χρήση

συμβατικών λιπασμάτων ενισχύει τη νωπή απόδοση, ενώ η εφαρμογή βιολογικών λιπασμάτων, συνήθως οργανικής προέλευσης, επιδρά θετικά στη σύνθεση των παραγόμενων πτητικών ελαίων, οδηγώντας σε βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών της καλλιέργειας (Εικόνα 1.3) (Guerrero-Lagunes et al., 2020).



Εικόνα 1.3: Βασικά χαρακτηριστικά Βασιλικού

1.1.4. Χημική σύσταση και ιδιότητες βασιλικού

Η χημική σύνθεση του βασιλικού, συμπεριλαμβανομένων των αιθέριων ελαίων, παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα, για αυτό ο *Ocimum basilicum* χαρακτηρίζεται ως πολυμορφικός (Shahrajabian et al., 2020). Επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως ο γονότυπος, το είδος, η ποικιλία που επιλέγεται, η γεωγραφική περιοχή, οι συνθήκες ανάπτυξης, η περίοδος της καλλιέργειας και συγκομιδής. Στη χημική σύσταση του βασιλικού, εντοπίζονται κατά μέσο όρο: 92,1% νερό και βασικά θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες (3,15%), υδατάνθρακες (2,65%), εκ των οποίων το 0,3% αποτελεί τα διαλυτά σάκχαρα, το 1,6% αποτελεί τις φυτικές ίνες, το 0,75% είναι άλλοι υδατάνθρακες, ολικά λιπίδια (0,64%) και τέφρα (1,49%) (Tolay, 2021). Ακόμα, το βότανο αυτό, είναι πλούσιο σε τερπένια ,όπως α-πινένιο, καρυοφυλλένιο, λιμονένιο και φαινολικά συστατικά, με κυριότερα τα φαινολικά οξέα και τους γλυκοζίτες φλαβονοειδών, στα οποία αποδίδονται οι εξέχουσες βιολογικές δράσεις του. Αυτές οι ενώσεις, κατά κύριο λόγο εντοπίζονται στα φύλλα του βασιλικού, που συγκεντρώνεται και η μεγαλύτερη ποσότητα αιθέριων ελαίων

και σε μικρότερο βαθμό στα άνθη και τους σπόρους. Το βότανο περιέχει σε ποσοστό 0,04%–1,5% αιθέριο έλαιο, με κυρίαρχα συστατικά τη λιναλοόλη, που είναι μεγάλης μοριακής μάζας μονοτερπενοειδές, δρα ως φυσικός μεταβολίτης και αντιμικροβιακός, αντιοξειδωτικός, αρωματικός παράγοντας, τη μεθυλοχαβικόλη (εστραγκόλη), που είναι μια ουσία φαινυλοπροπενίου με αντιφλεγμονώδη δράση και την ευγενόλη που διαθέτει αντιμυκητιακές και αντιοξειδωτικές δράσεις. Συνολικά, οι χαρακτηριστικές ιδιότητες του βασιλικού είναι:

- Αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις: με στόχο την καταπολέμηση ανεπιθύμητων Gram-θετικών (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* κ.α) και Gram-αρνητικών (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* κ.α) μικροοργανισμών και τη μείωση των φλεγμονών και του πόνου, μπλοκάροντας τις βιοχημικές οδούς της κυκλοοξυγενάσης και λιποξυγενάσης, καταλήγοντας στη ρύθμιση και τη θεραπεία των φλεγμονών. Μελέτες αποδεικνύουν ότι ο βασιλικός παρουσιάζει ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι του *Bacillus cereus*, Gram-θετικού τροφιμογενούς μικροοργανισμού, συγκριτικά με την πενικιλίνη που είναι συμβατικό ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό (Ilić et al., 2021).
- Αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές: με πιο σημαντικές ενώσεις το ροσμαρινικό και κικορικό οξύ, την κερσετίνη και ρουτίνη, που η δραστηρότητά τους εξαρτάται από το είδος του διαλύτη που χρησιμοποιείται (μεθανόλη, αιθανόλη ή νερό) για την παραλαβή τους, παρουσιάζοντας υψηλότερη δράση σε υδατικά εκχυλίσματα (Sandulachi et al., 2021). Τα εκχυλίσματα από φύλλα βασιλικού, περιέχουν αντιοξειδωτικές βιταμίνες όπως α-τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ και σε συνδυασμό με τα φαινολικά συστατικά προστατεύουν έναντι της κυτταρικής βλάβης, της καρκινογένεσης και της περαιτέρω ανάπτυξης όγκων (Ugbogu et al., 2021).
- Αντιμυκητιακές: η κύρια ένωση του βασιλικού που συμβάλει σε αυτή τη δράση είναι η ευγενόλη. Έρευνα, έδειξε ότι το μεθανολικό εκχύλισμα βασιλικού διαθέτει πιο ισχυρή μυκητοστατική και μυκητοκτόνο δράση (Mishra et al., 2022). Αναστέλλει την ανάπτυξη του *Aspergillus flavus* και την παραγωγή της αφλατοξίνης B1, που εντοπίζονται σε τρόφιμα όπως βότανα, μπαχαρικά, ξηρούς καρπούς.
- Εντομοαπωθητικές και αντιπαρασιτικές: προκαλούν αποτρεπτικές και δυσμενείς συνθήκες στην ανάπτυξη εντόμων και παρασίτων σε αποθηκευμένα προϊόντα όπως

σιτηρά, όσπρια. Ειδικότερα, ο *Ocimum gratissimum* και οι πτητικές ενώσεις που εκπέμπει, απωθούν και διαταράσσουν την ωτοκία των εντόμων. Επιπλέον, ο βασιλικός εκκρίνει πτητικές ουσίες, που προσελκύουν φυσικούς εχθρούς των παρασίτων, ενισχύοντας την αντιπαρασιτική δράση του (Azandémè-Hounmalon et al., 2023).

- Νευροπροστατευτικές και ηπατοπροστατευτικές: ιδιαίτερα ο *Ocimum sanctum* (ιερός βασιλικός) χαρακτηρίζεται ως φυσικό τονωτικό για τον ανθρώπινο οργανισμό. Αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ, προάγουν την πρόληψη έναντι του οξειδωτικού στρες, ρυθμίζοντας την αύξηση των προστατευτικών γονιδίων του νευροτροφικού παράγοντα του εγκεφάλου και δρούν έναντι της βλάβης των ηπατικών κυττάρων (Seyed et al., 2021). Αποτελέσματα σε νευρολογικές μελέτες έδειξαν, ότι ο βασιλικός συμβάλει στην καταπολέμηση νευρολογικών διαταραχών όπως τα εγκεφαλικά επεισόδια, το Αλτσχάιμερ, τη νόσο Πάρκινσον, καθώς και τη Νόσο του Χάντινγκτον (Teofilović et al., 2021).

1.1.5. Εφαρμογές και προϊόντα βασιλικού

Ο βασιλικός είναι ένα φυτό που διαθέτει ένα εντυπωσιακό βιοενεργό δυναμικό και μια αξιόλογη πηγή μικροθρεπτικών συστατικών, καθιστώντας το χρήσιμο σε διάφορους τομείς, όπως η γαστρονομία, η βιομηχανία τροφίμων, ποτών, φαρμάκων, καλλυντικών, αρωματοποιίας και ιατρικής, λόγω των θεραπευτικών του ιδιοτήτων. Όλα τα μέρη του βασιλικού είναι εκμεταλλεύσιμα και μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή επιθυμητών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των ολόκληρων ξηρών ή νωπών δρογών, των φύλλων, των ανθών, των βλαστών, των σπόρων και των αιθέριων ελαίων (Gonoreanu et al., 2022). Η υψηλή περιεκτικότητά του σε αιθέρια έλαια, αρωματικές και φαινολικές ενώσεις όπως η λιναλοόλη και το ροσμαρινικό οξύ αυξάνουν την εμπορική αξία του (Ugbogu et al., 2021). Το πλούσιο περιεχόμενό του, καθώς και η ζήτηση για φρέσκα, βιολογικά προϊόντα, οδηγούν την παγκόσμια αγορά βασιλικού να σημειώνει σημαντική αύξηση, που αναμένεται να ξεπεράσει τα 394,4 εκατομμύρια δολάρια, με μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης (CAGR) 4,34% για το χρονικό διάστημα 2022-2027.

Η καλλωπιστική του αξία είναι μεγάλη, για αυτό και συχνά καλλιεργείται ως καλλωπιστικό φυτό και διακοσμεί κήπους, βεράντες, μπαλκόνια προσδίδοντας καλαισθησία

στο περιβάλλον. Επιπλέον, έχει σημαντική συμβολική σημασία σε θρησκευτικές παραδόσεις του χριστιανισμού και του ινδουισμού.

Στη γαστρονομία, ο βασιλικός χρησιμοποιείται φρέσκος και κατεψυγμένος και προστίθεται ως συστατικό σε μεσογειακά εδέσματα (σαλάτες, ζυμαρικά, πίτσα, θαλασσινά), σε παρασκευάσματα όπως το επιτυχημένο προϊόν προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ) «Pesto Genovese» (Romano et al., 2022) και ως μπαχαρικό για να προσδώσει έντονο άρωμα και γεύση στα πιάτα (Sęczyk et al., 2022).

Στη βιομηχανία τροφίμων, γενικά χρησιμοποιείται ως παράγοντας γεύσης και αρώματος σε τρόφιμα, ποτά συνήθως ανθρακούχα και αφεψήματα. Οι βιοενεργές ενώσεις του, όπως οι αντιοξειδωτικές και οι αντιφλεγμονώδεις, μπορούν να ενταχθούν στη παρασκευή και στο σχεδιασμό καινοτόμων λειτουργικών τροφίμων, μέσω της διαδικασίας της ενθυλάκωσης σε βιοαποικοδομήσιμες και βιοσυμβατές πολυμερείς νανοϊνες, οι οποίες, μετά την κατάποση του τροφίμου, απελευθερώνουν όλες τις ευεργετικές ενώσεις στον οργανισμό, προσφέροντας μια ενισχυμένη διατροφική αξία στο τελικό προϊόν. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτές οι ουσίες, είναι χρήσιμες στη σύνθεση φυτικών συντηρητικών και στην παρασκευή ενεργών συσκευασιών, προκειμένου να διατηρηθούν όλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και να παραταθεί η διάρκεια ζωής ενός τροφίμου (Magalhães Brandão et al., 2023). Επίσης, οι βλεννώδεις σπόροι του βασιλικού, γνωστοί και ως «κόμμα βασιλικού», μπορούν να δράσουν ως υποκατάστατο λίπους, γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές σε διάφορα τρόφιμα και προϊόντα, όπως χαμηλού λίπους χορτοφαγικά κρεατοσκευάσματα (μπιφτέκια, λουκάνικα, σαλάμια), αρτοσκευάσματα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος, σάλτσες, φυτικά ροφήματα και τυροκομικά προϊόντα, ζυμαρικά για τη βελτίωση της σταθερότητάς τους, καθώς σε κατεψυγμένα τρόφιμα για τη βελτίωση της υφής και της γεύσης τους.

Οι φαρμακευτικές δράσεις του βασιλικού, είναι αναγνωρισμένες και εφαρμόζονται για τη θεραπεία διάφορων παθολογιών, όπως ο βήχας, το άσθμα, ο πονοκέφαλος, ο πυρετός, οι πεπτικές διαταραχές, οι κοιλιακοί πόνοι και οι δερματικές λοιμώξεις (Qamar et al., 2023). Τόσο τα φύλλα, όσο και τα αιθέρια έλαια του βασιλικού εντάσσονται στην παραγωγή εγκεκριμένων παρασκευασμάτων για ιατρικούς και καλλωπιστικούς σκοπούς. Αποδεδειγμένα περίπου το 80% των ενώσεων που απομονώνονται από φυτά, ενσωματώνονται σε φαρμακευτικά ή διατροφοδραστικά σκευάσματα (nutraceuticals). Τα εκχυλίσματα βασιλικού είναι πηγές ασβεστίου, ψευδαργύρου, βιταμίνης A και σιδήρου, για

αυτό χρησιμοποιούνται σε συμπληρώματα διατροφής και αναλγητικά φάρμακα (Zagoto et al., 2021). Μια άλλη εφαρμογή των ελαίων του, είναι η χρήση τους ως βασικό συστατικό καλλυντικών, όπως κρέμες για την ενυδάτωση και θρέψη προσώπου και σώματος. Είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για ακνεϊκές επιδερμίδες, κατά των τσιμπημάτων από έντομα βοηθώντας στην ανακούφιση και τον περιορισμό της φλεγμονής. Ακόμα, τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται ως αρωματικά σαπούνια και σαμπουάν, λοσιόν με αντισηπτική δράση για τον καθαρισμό και την περιποίηση του δέρματος. Ενσωματώνονται σε σκευάσματα οδοντικής και στοματικής υγιεινής (οδοντόκρεμες, διαλύματα), συμμετέχουν σε αρωματικά προϊόντα για καλλωπισμό (κολώνιες) και για την καταπολέμηση του στρες (έλαια για αρωματοθεραπεία, μασάζ, αρωματικά κεριά), καθώς και ως εντομοαπωθητικά (Castronuovo et al., 2019).

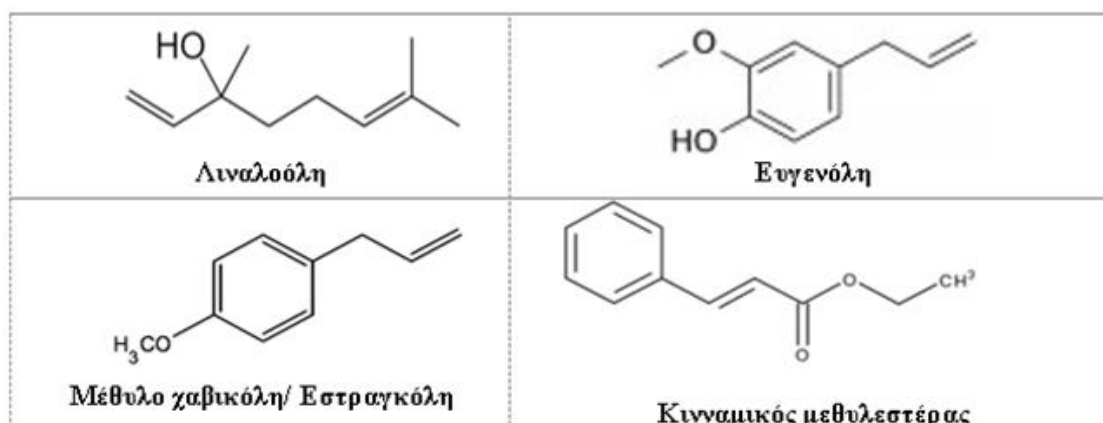


Εικόνα 1.4: Προϊόντα με κύριο συστατικό το βασιλικό

1.2. Βιοδραστικές ενώσεις φυτικών υποστρωμάτων

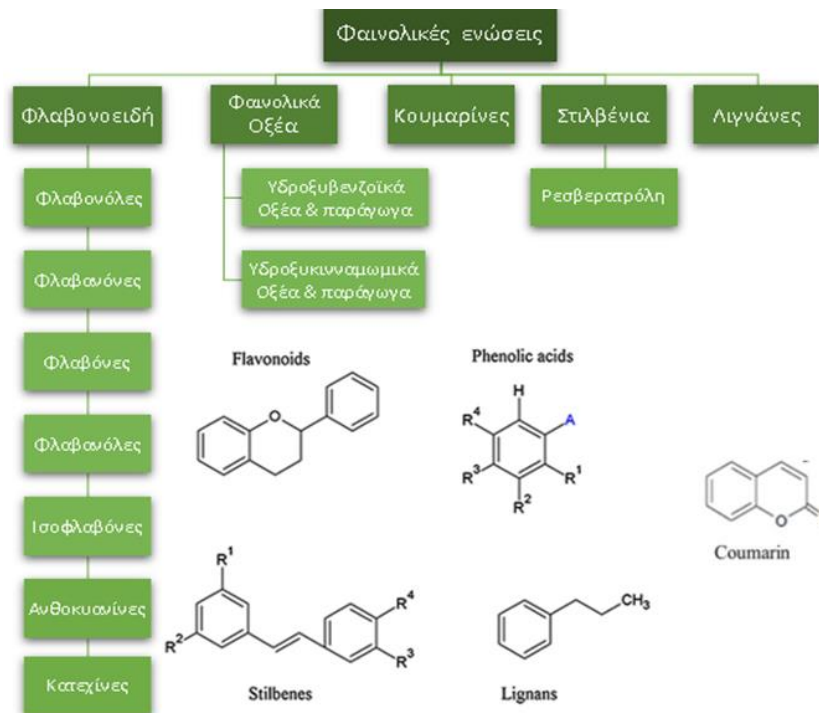
Φυτικά υποστρώματα όπως βότανα, φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, ρίζες, φύλλα, είναι πλούσια σε ενώσεις με υψηλή βιοδραστικότητα. Επιστημονικώς, η έννοια βιοδραστικές ενώσεις, περιλαμβάνει τις ουσίες που διαθέτουν βιολογική δραστηριότητα και προκαλούν φαρμακολογικές ή τοξικολογικές επιδράσεις σε ανθρώπους και ζώα. Ιδίως στα φυτά, ονομάζονται φυτοχημικά. Είναι εξωθρεπτικά συστατικά, που παρουσιάζονται σε μικρές ποσότητες και δομούνται από μόρια με υψηλό θεραπευτικό δυναμικό (Rivero-Montejo et al., 2021). Έχουν την ικανότητα να ελέγχουν τις μεταβολικές διεργασίες, να επάγουν ή αναστέλλουν τη δράση ενζύμων και κυτταρικών υποδοχέων, να δρουν ως αναγωγικοί και χηλικοί παράγοντες και να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (Jayakumari, 2020). Έτσι, προσδίδουν υψηλή αξία στο παραγόμενο προϊόν (όπως αρωματικές, αρτυματικές ύλες, αγροδιατροφικά, φαρμακολογικά παρασκευάσματα) και πολυάριθμα ευεργετικά οφέλη

στην υγεία του καταναλωτή (Roselló-Soto et al., 2019). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τα βιοενεργά συστατικά που προέρχονται από φυτικές πηγές χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή και σύγχρονη ιατρική από το 80% του παγκόσμιου πληθυσμού. Ανάλογα με τη χημική δομή και τη βιοχημική οδό στην οποία εμπλέκονται, καθορίζεται η δράση, η βιοδιαθεσιμότητα, η πέψη και η απορροφησιμότητά τους από τους οργανισμούς. Κάποιες κύριες κατηγορίες βιοδραστικών ενώσεων είναι: φαινολικές ενώσεις (φαινολικά οξέα, υδροξυκιναμικά οξέα, σιλβένια, φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες), ταννίνες, μονο-, δι- και διαδοχικά τερπενοειδή, φαινυλοπροπανοειδή, λιγνάνες, λιπίδια, καρτενοειδή, ρητίνες, αλκαλοειδή, φουρανοκουμαρίνες και ναφθοδιανθρόνες, πρωτεΐνες και πεπτίδια. (Ivanović et al., 2020). Στο βασιλικό (*Ocimum basilicum* L.) περιέχονται τερπενοειδή, αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, φαινολικές ουσίες με ισχυρές δράσεις. Τα κύρια βιοενεργά συστατικά που απαντώνται στο αιθέριο έλαιο βασιλικού, είναι η μέθυλο χαβικόλη/εστραγκόλη, η ευγενόλη, η λιναλοόλη, ο κινναμικός μεθυλεστέρας και η ευκαλυπτόλη (Εικόνα 1.5) (Alkuwayti et al., 2020).



Εικόνα 1.5: Δομές των κύριων βιοδραστικών συστατικών που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του βασιλικού

Μεταξύ αυτών των ενώσεων, αξιοσημείωτο ρόλο κατέχουν οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών επιδράσεων (Panzella et al., 2020). Αποτελούν την κυρίαρχη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, έχουν μικρό μοριακό βάρος, είναι συνήθως υδατοδιαλυτές και παράγονται κυρίως από φυτικούς οργανισμούς. Η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται από 0,5 έως 5,0 g ανά 100 g ξηρού βάρους στους φυτικούς ιστούς. Πρόκειται για οργανικές αρωματικές ενώσεις, που φέρουν στο μόριό τους τουλάχιστον έναν αρωματικό (βενζολικό) δακτύλιο υποκατεστημένο με μία ή και περισσότερες υδροξυλομάδες -OH.



Εικόνα 1.6: Κατηγορίες φαινολικών συστατικών

Ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών μονάδων που διαθέτουν (Εικόνα 1.6), διακρίνονται σε απλές φαινόλες, δηλαδή περιέχουν μία μονάδα (πχ. φαινολικά οξέα) και πολυφαινόλες, οι οποίες διαθέτουν περισσότερες μονάδες φαινόλης όπως δύο (πχ. φλαβονοειδή) και τρεις ή περισσότερες (πχ. ταννίνες). Στις πολυφαινόλες, συγκαταλέγονται τα φλαβονοειδή (φλαβονόλες, φλαβονόνες, φλαβόνες, φλαβανόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανίνες, κατεχίνες), τα φαινολικά οξέα, οι κουμαρίνες, τα στιλβένια και οι λιγνάνες. Στα φυτικά κύτταρα, παρατηρείται ανομοιόμορφη κατανομή των φαινολικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, στα εξωτερικά στρώματα των φυτών ανιχνεύονται υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ουσιών, από ότι στα εσωτερικά τους μέρη. Ακόμα, οι αδιάλυτες φαινόλες εντοπίζονται εντός των κυτταρικών τοιχωμάτων, ενώ οι διαλυτές στα κενοτόπια (Lama-Muñoz & Contreras, 2022). Ορισμένα φαινολικά συστατικά, βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή και αποκαλούνται άγλυκες μορφές, ενώ άλλα συνδέονται με μόρια όπως σάκχαρα και ονομάζονται γλυκοζίτες. Η περιεχόμενη ποσότητα των φαινολικών ενώσεων στους φυτικούς οργανισμούς, όπως είναι και ο βασιλικός, (*Ocimum basilicum* L.), επηρεάζεται από παράγοντες όπως η ποικιλία που επιλέγεται, η γεωγραφική προέλευση, η σύσταση του εδάφους, η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, οι κλιματικές, περιβαλλοντικές συνθήκες και η περίοδος/εποχή ανάπτυξης.

Τα επικρατέστερα φαινολικά συστατικά που συναντώνται στο βασιλικό (*Ocimum basilicum* L.) είναι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, κυρίως με τη μορφή των γλυκοζιτών τους. Τα φαινολικά οξέα, είναι οι πιο διαδεδομένες φυτικές μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις, δομούνται από ένα φαινολικό δακτύλιο και μια ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Βάσει του ανθρακικού σκελετού, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (C6–C1) που προέρχονται από το βενζοϊκό οξύ και τα υδροξυκινναμωμικά οξέα (C6–C3) που προέρχονται από κινναμωμικό οξύ (Sathasivam et al., 2022). Τέτοια οξέα είναι το ροσμαρινικό, το καφεϊκό, το φερουλικό, το κινναμικό, το σιναπικό οξύ τα οποία παράγονται από τα μεταβολικά μονοπάτια των φωσφοπεντοζών, του σικιμικού οξέος και των φαινυλοπροπανοειδών κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού ή κατά την αντίδρασή τους έναντι διάφορων καταστάσεων στρες (Sathasivam et al., 2022). Κυρίως, σε αυτά τα οξέα αποδίδονται η αντιοξειδωτική, αντιριζική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδης δράση του εκχυλίσματος βασιλικού (Romano et al., 2022). Το ροσμαρινικό οξύ, διαθέτει υψηλή αντιοξειδωτική δράση και αξιοποιείται από τις βιομηχανίες τροφίμων ως συντηρητικό τροφίμων ώστε να επεκτείνει τη διάρκεια ζωής των φρέσκων θαλασσινών. Το καφεϊκό οξύ, είναι ένα συνιστώμενο διατροφικό συστατικό, το οποίο εντοπίζεται σε πολλά τρόφιμα και ποτά που καταναλώνουν σε καθημερινή βάση οι άνθρωποι. Το φερουλικό οξύ, διαθέτει διάφορες λειτουργίες με σημαντικότερες την αντικαρκινική, αντική, αντιαλλεργική, αγγειοδιασταλτική και τη ρύθμιση και έκφραση της ενζυμικής και γονιδιακής δραστηριότητας. Το κινναμικό οξύ, δρά ως ενισχυτικό αρώματος και γεύσης, προσδίδοντας έτσι έναν πολυδιάστατο χαρακτήρα σε προϊόντα όπως αλκοολούχα ποτά, γλυκά, αρωματικά έλαια κ.α. Το σιναπικό οξύ, είναι γνωστό για τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις του, καθώς μειώνει τις φλεγμονές που προκύπτουν λόγω ασθενειών και την κυτταρική οξειδωση. Επιπλέον τα οξέα αυτά, δρούν συνεργιστικά με μη φαινολικές ενώσεις όπως βιταμίνες, πτητικές ενώσεις και πεπτίδια, ενισχύοντας έτσι τη δραστηριότητά τους. Οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών εντάσσονται στην ευρύτερη ομάδα των φλαβονοειδών. Η δομή τους χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός σακχάρου που δίνει γλυκύτητα στις ενώσεις αυτές. Η ρουτίνη και η κερσετίνη, είναι οι πιο γνωστές αυτής της κατηγορίας που διαθέτει ο βασιλικός. Συμβάλλουν στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του φυτού και έρευνες τις συσχετίζουν με την ισχυροποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, την πρόληψη τύπων καρκίνου και τη μείωση καρδιαγγειακών παθήσεων. Συχνά, η ανάκτησή τους πραγματοποιείται από ακατέργαστη

φυτική ύλη, με αποτέλεσμα να απαιτείται η απομάκρυνση ανεπιθύμητων παρεμποδίσεων, όπως χρωστικές, λίπη κ.α. (Alara et al., 2021). Η παραλαβή τους, μπορεί ακόμα να γίνει από βιο-υπολείμματα και παραπροϊόντα αγροδιατροφής, που προέρχονται από τις βιομηχανικές επεξεργασίες τροφίμων ως μια πηγή οικονομική, η οποία ταυτόχρονα μειώνει τον όγκο των απορριμμάτων. Η απόδοση της εκχύλισής τους, εξαρτάται από παραμέτρους όπως ο διαλύτης (συνήθως χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες όπως αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, και νερό), η φύση της πρώτης ύλης, το μέγεθος του υλικού, η θερμοκρασία, η διάρκεια της εκχύλισης, το pH που επιλέγεται να είναι χαμηλό για το βέλτιστο διαχωρισμό, και η αναλογία διαλύτη/στερεής μάζας. Επιπλέον, για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό τους, αξιοποιούνται χρωματογραφικές και φασματοφωτομετρικές μέθοδοι (Herrero et al., 2013).

1.3. Εκχύλιση φυτοχημικών

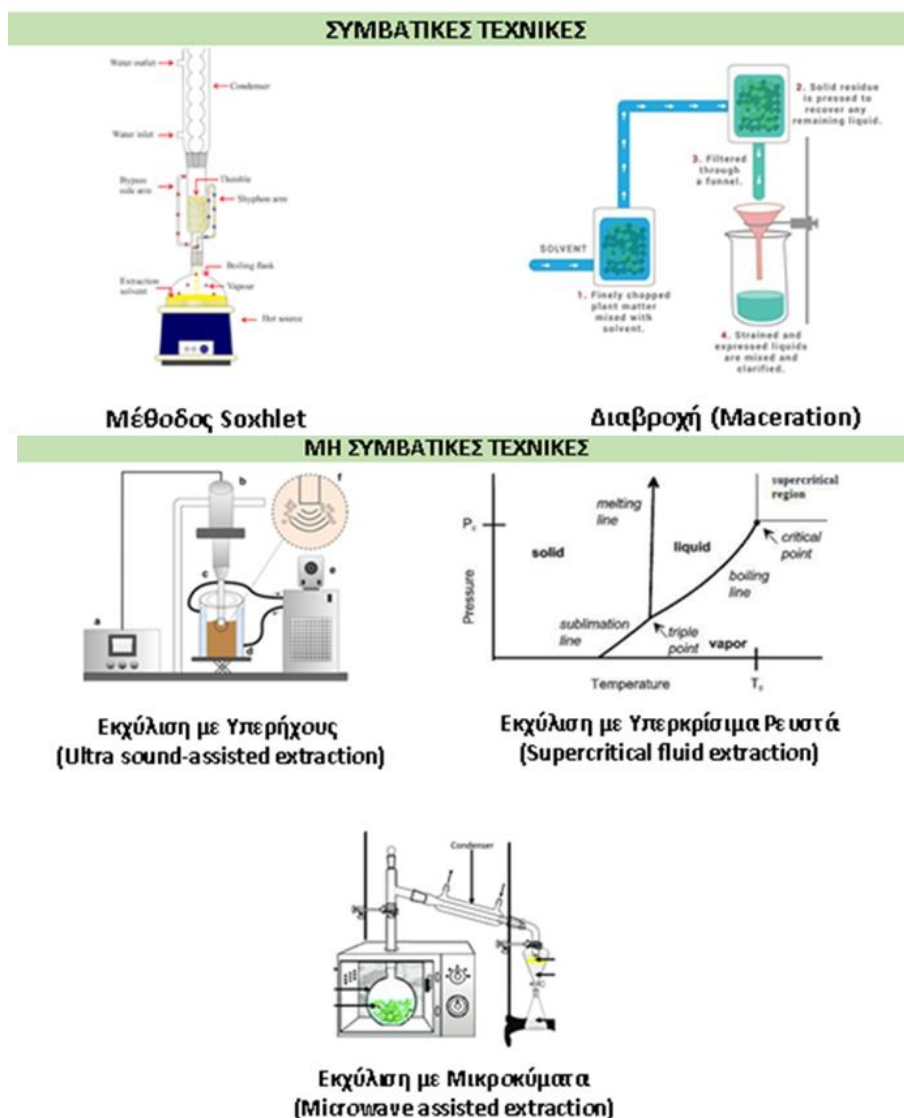
Η εκχύλιση είναι μια διαδικασία μεταφοράς μάζας ενός ή περισσότερων συστατικών από μια φάση σε μια άλλη (Goti & Dasgupta, 2023). Οι εκχυλίσσεις βρίσκουν εφαρμογή τόσο στην αναλυτική χημεία, όσο και στην βιομηχανία. Η ανάκτηση χημικών ενώσεων από μία πολύπλοκη μήτρα μπορεί να είναι το πρώτο στάδιο, είτε για την ένταξη τους σε νέα προϊόντα, είτε για την διευκόλυνση των αναλυτικών μεθόδων που θα ακολουθήσουν (Picot-Allain et al., 2021).

Οι εκχυλίσσεις κατατάσσονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με την φυσική κατάσταση του υπό εκχύλιση υποστρώματος (υγρό ή στερεό), το μέσο εκχύλισης και το είδος της ενέργειας που παρέχεται στο σύστημα. Κατά την εκχύλιση υγρού – υγρού, οι συγκεντρώσεις ισορροπίας μια διαλυμένης ουσίας αποκαθίστανται μεταξύ δύο διαλυτών οι οποίοι δεν αναμειγνύονται μεταξύ τους (πχ. εκχύλιση πολικών φαινολικών ενώσεων από ελαιόλαδο) (Bokhary et al., 2021).

Στην εκχύλιση στερεού – υγρού, συμβαίνει μεταφορά των επιθυμητών ενώσεων από ένα στερεό υπόστρωμα σε έναν διαλύτη μέσω διάλυσης ή εκρόφησης (Siddique et al., 2020). Η χρήση ζεστού νερού για την μεταφορά της καφεΐνης και άλλων υδατοδιαλυτών ενώσεων από τους αλεσμένους κόκκους καφέ στο τελικό ρόφημα αποτελεί ένα παράδειγμα της εκχύλισης στερεού – υγρού. Μια άλλη μέθοδος εκχύλισης είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης, η οποία περιλαμβάνει την προσρόφηση του αναλύτη πάνω σε μία στερεή φάση και την έκλυση του με έναν διαλύτη (Chisvert et al., 2019). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται

ιδιαίτερα για την συμπύκνωση και τον καθαρισμό διαλυμάτων που αναλύονται με υγρή και αέρια χρωματογραφία.

Η επαναστατική έννοια της «πράσινης χημείας» και η αλματώδης τεχνολογική ανάπτυξη γύρω από αυτή επηρέασε σημαντικά την ανάκτηση φυσικών ενώσεων. Μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης έρχονται να συμπληρώσουν ή να αντικαταστήσουν τις συμβατικές τεχνικές (Εικόνα 1.7). Στις τελευταίες, περιλαμβάνονται η διαβροχή, η απόσταξη, η μέθοδος Soxhlet, η έγχυση (infusion), το αφέψημα (decoction), η εξίκμαση (percolation) και η χώνευση (digestion) (Alara et al., 2021).



Εικόνα 1.7: Συμβατικές και μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Τα μειονεκτήματα των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης είναι οι μεγάλες καταναλώσεις διαλύτη και οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης (Bitwell et al., 2023). Αυτό συμβαίνει γιατί η προσφορά ενέργειας, αν υπάρχει, γίνεται με απλή θέρμανση και ανάδευση. Από την άλλη, οι μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης αξιοποιούν τις σύγχρονες τεχνολογίες των υπερήχων, των μικροκυμάτων, των υπερκρίσιμων ρευστών, της υψηλής πίεσης, των ενζύμων και των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (Raspe et al., 2022). Τα κοινά χαρακτηριστικά των μη συμβατικών μεθόδων εκχύλισης είναι η μικρή κατανάλωση πόρων, η μικρή παραγωγή αποβλήτων, η εκλεκτικότητα, οι ικανοποιητικές αποδόσεις εκχύλισης, οι σύντομοι χρόνοι εκχύλισης και η υψηλή ποιότητα του τελικού εκχυλίσματος (Fomo et al., 2020). Οι προκλήσεις για τις μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης εστιάζονται στην επένδυση μεγάλου κεφαλαίου και τα υψηλά λειτουργικά κόστη, ώστε να γίνει μεταφορά και εφαρμογή τους από πιλοτική σε μεγάλη βιομηχανική κλίμακα (Picot-Allain et al., 2021).

Οι παραδοσιακοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις εκχυλίσεις περιλαμβάνουν κυρίως οργανικούς διαλύτες, όπως είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, η ακετόνη και ο πετρελαϊκός αιθέρας (Mehariya et al., 2021). Αυτοί οι διαλύτες έχουν κάποιους περιορισμούς που σχετίζονται με την αυξημένη πτητικότητα, την τάση για ανάφλεξη και πιθανή έκρηξη (Socas-Rodríguez et al., 2021). Επιπλέον, η χρήση των περισσότερων οργανικών διαλυτών επιβαρύνει το περιβάλλον, καθώς παράγονται απόβλητα τα οποία δεν είναι βιοδιασπώμενα. Λύση σε αυτά τα προβλήματα, έρχονται να δώσουν οι εναλλακτικοί διαλύτες, δηλαδή τα ιοντικά υγρά (Ionic liquids, IIs) και οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) (Benvenuto et al., 2019). Τα ιοντικά υγρά είναι αποτέλεσμα ενός συνδυασμού οργανικών κατιόντων και οργανικών ή ανόργανων ανιόντων. Από την άλλη, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούνται από κάποια συστατικά που λειτουργούν ως δέκτες δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptors, HBAs) και κάποια άλλα που λειτουργούν ως δότες δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Donors, HBDs) (Hansen et al., 2021). Συνήθως, οι δέκτες δεσμών υδρογόνου είναι άλατα του τεταρτοταγούς αμμωνίου, ενώ οι δότες δεσμών υδρογόνου είναι αμίνες, καρβοξυλικά οξέα, αλκοόλες, πολυόλες ή υδατάνθρακες. Όταν οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες παρασκευάζονται από πρωτογενείς μεταβολίτες της φύσης, όπως είναι τα αμινοξέα, τα οργανικά οξέα, τα σάκχαρα ή τα παράγωγα χολίνης, τότε ονομάζονται φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Alañón et al., 2020). Τα ιοντικά υγρά και οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες μοιράζονται το ενδιαφέρον γεγονός ότι τα τελικό

μίγμα των συστατικών θα έχει αρκετά χαμηλότερο σημείο τήξεως από τα επιμέρους συστατικά (Hikmawanti et al., 2021). Έτσι, παρουσιάζουν χαμηλή τάση ατμών και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι στην υγρή μορφή τους. Το ιξώδες και η διαλυτότητα τους ποικίλει ανάλογα τις χημικές ενώσεις από τις οποίες συντίθενται. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εκχύλιση με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες δεν απαιτεί την επακόλουθη απομάκρυνση τους. Για αυτό, μπορούν να συνδυαστούν εύκολα με τεχνικές νανοενθυλάκωσης και να χρησιμοποιηθούν ως φορείς ενθυλάκωσης (Basar et al., 2020). Προκειμένου να γίνει εφαρμογή των εναλλακτικών διαλυτών σε μεγαλύτερη κλίμακα, καθίσταται ιδιαίτερη ανάγκη να καλυφθεί το κενό σχετικά με την τοξικότητα που ενδέχεται να έχει το τελικό μίγμα. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα δημοσιευμένων εργασιών στις οποίες πραγματοποιήθηκαν συμβατικές και μη εκχυλίσεις σε φυτικά υποστρώματα.

Πίνακας 1.2: Παραδείγματα εφαρμογών συμβατικών και μη εκχυλίσεων σε φυτικά υποστρώματα

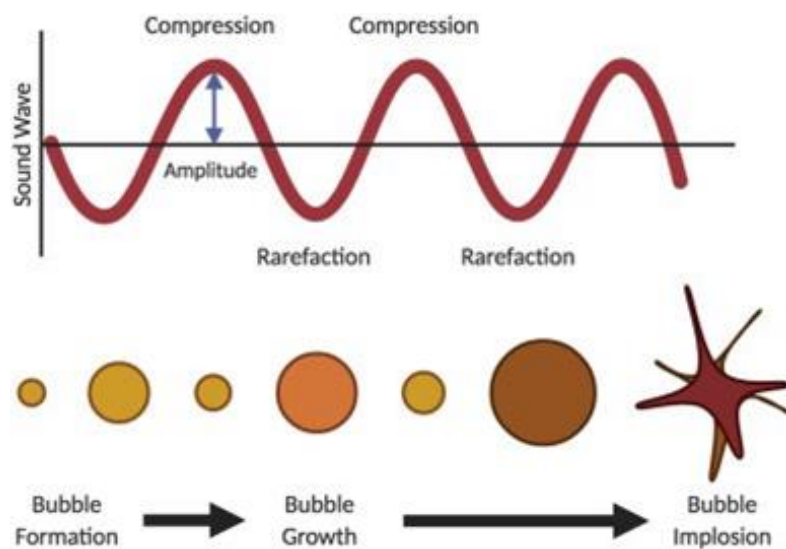
Μέθοδος εκχύλισης	Υπόστρωμα	Εκχυλισμένες ενώσεις	Παραπομπές
Εκχύλιση Soxhlet	Μέντα (<i>Mentha spicata</i>)	Φλαβονόλες & φλαβόνες	(Tzanova et al., 2020)
Διαβροχή	Άγριο θυμάρι (<i>Thymus serpyllum</i> L.)	Φαινολικά συστατικά	(Jovanović et al., 2017)
Εκχύλιση με υπερήχους	Πορφυρή εχινάκεια (<i>Echinacea purpurea</i>)	Κικορικό οξύ & Φαινολικά συστατικά	(Sobhani et al., 2022)
Εκχύλιση με υπερήχους	<i>Phellodendri amurensis</i>	Αλκαλοειδή	(Li et al., 2020)
Εκχύλιση με μικροκύματα	Παραπροϊόν χυμού καρότου	Καροτενοειδή	(Elik et al., 2020)
Εκχύλιση με μικροκύματα	Γαρύφαλλο	Αιθέρια έλαια, πολυφαινολικές και λιγνοκυτταρικές ενώσεις	(Gonzalez-Rivera et al., 2021)
Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά	Φράουλα	Seed oil	(Pavlić et al., 2020)
Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά	Φασκόμηλο (<i>Salvia sclarea</i> L.)	Ροσμαρινικό οξύ	(Chadni et al., 2023)

Εκχύλιση με υγρό υπό πίεση	Παραπροϊόντα Παντζαριών (<i>Beta vulgaris</i> L.)	Φαινολικά συστατικά	(Battistella Lasta et al., 2019)
Εκχύλιση με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων	Ρίγανη (<i>Origanum vulgare</i> L.) Θυμάρι (<i>Thymus serpyllum</i> L.)	Φαινολικά συστατικά	(Carpentieri et al., 2021)
Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση	Χαμομήλι (<i>Matricaria chamomilla</i>)	Φλαβονοειδή	(Franco et al., 2020)

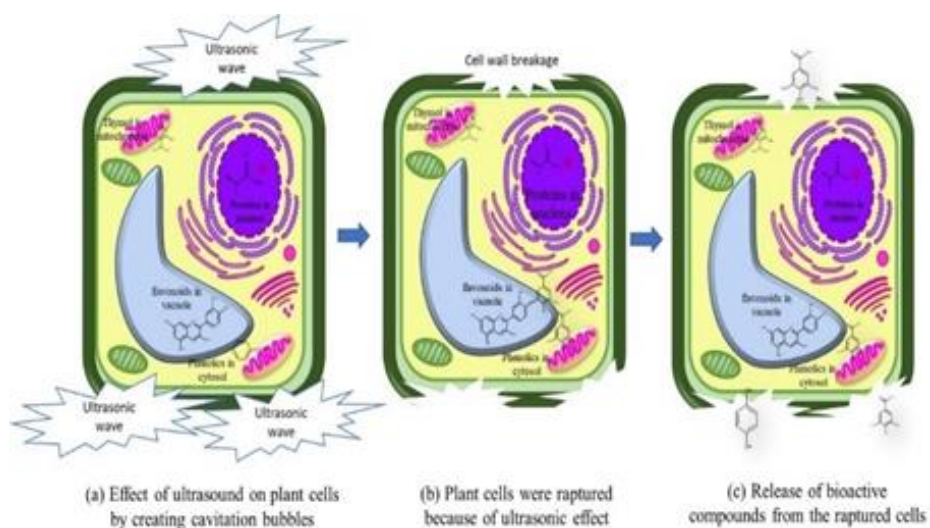
1.3.1. Εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound-Assisted extraction, UAE)

Η χρήση υπερήχων, θεωρείται μια μη θερμική, εναλλακτική τεχνολογία, η οποία επιλέγεται για την εκχύλιση φαινολικών και άλλων βιοδραστικών ενώσεων, σεβόμενη το περιβάλλον. Μειώνει τον απαιτούμενο χρόνο εκχύλισης, την ενέργεια, την κατανάλωση διαλύτη, προσφέρει υψηλή απόδοση εκχύλισης, εκλεκτικότητα και βελτιώνει την ανάκτηση καθαρού προϊόντος (Zimare et al., 2021). Ως υπέρηχος (ultrasound), ορίζεται το μηχανικό κύμα με συχνότητα μεγαλύτερη των 20kHz που αποτελεί όριο της ανθρώπινης ακοής. Η χρήση των υπερήχων στις επιστήμες, είναι επιτυχημένη κυρίως σε τομείς όπως η γεωλογία, η βιολογία, η χημεία, η ιατρική κ.α. Ακόμα, συμβάλλουν σε διάφορες βιομηχανικές πρακτικές, όπως ομογενοποίηση, γαλακτωματοποίηση, παστερίωση, αφυδάτωση, ξήρανση, φιλτράρισμα, απαέρωση, κρυστάλλωση, αδρανοποίηση ενζύμων, μικροοργανισμών και μεταβολή ιξώδους (Amrofo & Ngadi, 2020; Perera & Alzahrani, 2021). Κατά τις εκχυλίσεις, οι υπέρηχοι επιδρούν στην δομή του φυτικού κυττάρου, καταστρέφοντας τα κυτταρικά τοιχώματα του (da Silva Moura et al., 2020). Σε συνδυασμό με την αύξηση της κινητικότητας του διαλύτη λόγω αυτών των διαταραχών, επιτυγχάνεται η διαλυτοποίηση και η αποδέσμευση διάφορων συστατικών, όπως είναι οι φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται στους φυτικούς ιστούς. Αρχή της μεθόδου αποτελεί, η αξιοποίηση της υψηλής συχνότητας κυμάτων υπερήχων, που κυμαίνονται από 20 kHz έως 100 MHz, προκαλώντας συμπίεση και διαστολή στις φυσαλίδες αερίου -ατμού, οι οποίες προκύπτουν από τα μόρια του φυτικού υποστρώματος, που διαχέονται τα κύματα υπερήχων. Αυτό το φαινόμενο, ονομάζεται ακουστική σπηλαίωση και αποτυπώνεται στην Εικόνα 1.8. Κατά τη διάρκεια των κύκλων

διάδοσης, οι φυσαλίδες αποκτούν ένα κρίσιμο μέγεθος και χάνουν την σταθερότητά τους, διότι πραγματοποιείται διάχυση αερίου. Η επίδραση αυτού του μηχανισμού, επιταχύνει τη ρήξη των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων, μειώνει το μέγεθος των σωματιδίων και αυξάνει την επιφάνεια επαφής με το διαλύτη (Perera & Alzahrani, 2021). Επίσης, εντατικοποιεί τη μεταφορά μάζας δίχως μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία των εκχυλισμάτων (da Silva Moura et al., 2020). Απελευθερώνει μεγάλες ποσότητες ενέργειας, καθώς και αναταράξεις σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας ($\approx 5000\text{K}$) και πίεσης ($\approx 2000\text{atm}$) (Yusoff et al., 2022). Έτσι, οι υπέρηχοι διεισδύουν καλύτερα στο διαρρηγμένο κύτταρο, συμβάλλοντας στην απελευθέρωση βιοδραστικών ενώσεων (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.8: Το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαιώσης



Εικόνα 1.9: Η επίδραση των υπερήχων στο φυτικό κύτταρο

Η ισχύς των υπερήχων και η παραγόμενη ενέργεια είναι αντιστρόφως ανάλογες, δηλαδή όσο μεγαλύτερη η ισχύς των υπερήχων, τόσο μικρότερη είναι η ενέργεια που θα παραχθεί. Η τεχνολογία των υπερήχων χωρίζεται σε διαφορετικά εύρη συχνοτήτων και διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες: α) σε υψηλή συχνότητα 100kHz -1MHz χαμηλής ισχύος, 1W cm^{-2} , που χρησιμεύουν σε αναλυτικές τεχνικές, ελέγχους ποιότητας και στην παροχή πληροφοριών αναφορικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες (οξύτητα, σταθερότητα, ωριμότητα) β) σε χαμηλής συχνότητας 16-100kHz υψηλής και ισχύος $10\text{--}1000\text{ W cm}^{-2}$, με τις οποίες γίνονται τροποποιήσεις στις φυσικές και χημικές ιδιότητες των τροφίμων. Στην δεύτερη υποκατηγορία, εστιάζει και η βιομηχανία τροφίμων (Soria & Villamiel, 2010). Επιπλέον, αναφέρεται ότι η τεχνολογία των υπερήχων, είναι αποδοτικότερη σε υγρά τρόφιμα σε ποσοστό 50-66%, λόγω της μεγαλύτερης δραστηριότητας του νερού και παραλαμβάνουν υψηλότερες περιεκτικότητες φαινολικών ενώσεων (π.χ ρουτίνη) και αντιοξειδωτικών, σε σύγκριση με άλλες μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης (Garcia-Castello et al., 2015).

Παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου είναι το είδος διαλύτη και οι συνθήκες υπερήχησης, δηλαδή: η πηγή ενέργειας, η συχνότητα, η ισχύς υπερήχων, η θερμοκρασία, ο χρόνος εκχύλισης, η αναλογία διαλύτη/δείγματος και το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος, εφόσον είναι στερεό (Albero et al., 2019).

Ποικιλία διαλυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε στερεό υπόστρωμα για την εκχύλιση με υπερήχους, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των ενώσεων-στόχων που πρόκειται να παραληφθούν, όπως η πολικότητα, το σημείο τήξης, το σημείο βρασμού, η πυκνότητα, το ειδικό βάρος, η συγγένεια των εκχυλιζόμενων ενώσεων με το διαλύτη εκχύλισης. Ταυτόχρονα, οι συνθήκες εκχύλισης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ώστε η διαδικασία της σπηλαίωσης να είναι επιτυχημένη. Διαλύτες με αυξημένο ιξώδες (π.χ μεθανόλη) και επιφανειακή τάση καθώς και χαμηλή τάση ατμών (που διαθέτουν αιθανόλη και μεθανόλη) ενισχύουν την κινητικότητα και τις αλληλεπιδράσεις των μορίων συνιστά εντονότερη καταστροφή των φυσαλίδων σπηλαίωσης και άρα μειώνουν την αποτελεσματικότητά τους και την απόδοση της εκχύλισης. Παραδείγματα διαλυτών που χρησιμοποιούνται στο σύστημα υπερήχων, είναι οργανικοί διαλύτες όπως: αιθανόλη, αλκοόλες, ακετόνη, ισοπροπανόλη μόνοι τους ή σε συνδυασμό με νερό, το οξινισμένο νερό (οξίνιση με μεταλλικά οξέα ή κιτρικό οξύ) ώστε να προφυλάσσονται οι πολυφαινόλες από την οξειδωτική αποικοδόμηση (Dzah et al., 2020). Το βέλτιστο pH διαλύτη για την εκχύλιση

φαινολικών κυμαίνεται από 1 έως 3. Οι αλκοόλες και η ακετόνη, αναμιγμένες με νερό, έχουν εφαρμοστεί ευρέως για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από φυτικά υλικά και τα απόβλητά τους. Πιο συγκεκριμένα, η αιθανόλη, χαρακτηρίζεται ως ένας κατάλληλος διαλύτης για την εκχύλιση φαινολικών και προτιμάται στο σύστημα των υπερήχων, αφού εμφανίζει την υψηλότερη συγγένεια με τα φαινολικά, καθώς έχει χαμηλή τοξικότητα και βιοδιασπασιμότητά (Shehata et al., 2021).

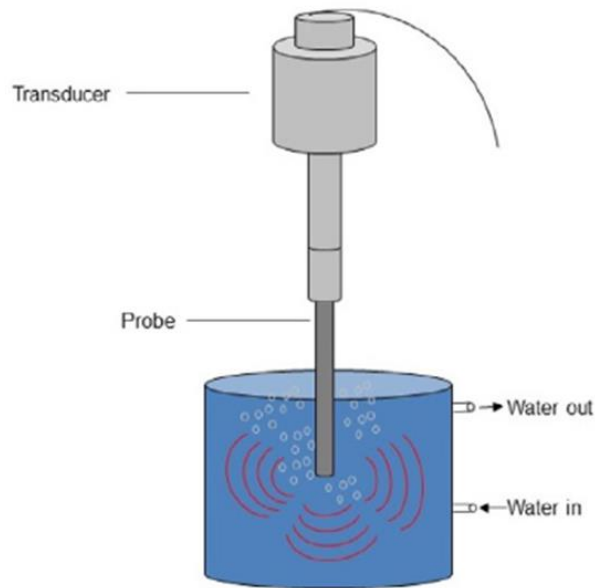
Η πηγή υπερήχων, ερχόμενη σε άμεση επαφή με το υπό εκχύλιση υπόστρωμα, δίνει εντονότερα φαινόμενα σπηλαιώσης και καλύτερη απόδοση, ενώ το αντίθετο ισχύει στην έμμεση επαφή με τις μήτρες των κυτταρικών φυτών. Το εύρος συχνοτήτων, επιδρά στο μέγεθος των σχηματιζόμενων φυσαλίδων. Σε χαμηλές συχνότητες, παρατηρούνται μεγάλες φυσαλίδες σπηλαιώσης, οι οποίες εκρήγνυνται πιο βίαια, πετυχαίνοντας εντονότερη κυτταρική διάρρηξη και αυξημένη διείσδυση του διαλύτη στα φυτικά κύτταρα. Η αυξημένη ισχύς υπερήχων, εντατικοποιεί το φαινόμενο της σπηλαιώσης, προκαλεί υψηλότερες διατμητικές δυνάμεις και μεγαλύτερη παραλαβή πολυφαινολών. Όμως, οι μεταβολές των ενώσεων και η αποικοδόμησή τους είναι πιθανή, διότι σχηματίζονται ρίζες υδροξυλίου (OH^{\cdot}), οι οποίες αντιδρούν με τις φαινολικές ενώσεις παρουσία υψηλής περιεκτικότητας νερού. Το βέλτιστο χρησιμοποιούμενο εύρος ισχύος, συνήθως κυμαίνεται από 30 -50% της ονομαστικής ισχύος της πηγής. Με την άνοδο της θερμοκρασίας εκχύλισης, η διαλυτοποίηση και οι ρυθμοί μεταφοράς μάζας αυξάνονται. Αντιθέτως, το ιξώδες και οι επιφανειακές τάσεις μειώνονται, προκαλώντας μεγαλύτερη είσοδο ατμών διαλύτη στην κοιλότητα της φυσαλίδας, ευνοώντας την εκχύλιση. Θερμοκρασίες άνω των 70°C , έχει αποδειχθεί ότι καταλήγουν σε ταχεία διάσπαση θερμοευαίσθητων ενώσεων, όπως είναι τα φαινολικά συστατικά. Ο χρόνος εκχύλισης, έχει παρόμοια επίδραση με τη θερμοκρασία (Carreira-Casais et al., 2021). Σε γενικές γραμμές, η τεχνολογία των υπερήχων είναι πιο σύντομη και με υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης. Το φαινολικό περιεχόμενο αυξάνεται, με αύξηση του χρόνου εκχύλισης, αν και πάντα ενδέχεται να προκληθεί υποβάθμιση και αποικοδόμηση των εκχυλιζόμενων ουσιών. Ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης με υπερήχους, υπολογίζεται μικρότερος από 30 λεπτά και διαθέτει δύο στάδια. Στο πρώτο, το «στάδιο έκπλυσης» εμφανίζονται έντονοι ρυθμοί εκχύλισης, αφού πραγματοποιείται η διείσδυση του διαλύτη και διαλυτοποίηση των συστατικών των μορίων. Στο δεύτερο στάδιο, της «αργής εκχύλισης», χαρακτηριστική είναι η μεταφορά μάζας των διαλυμένων ουσιών από το φυτό προς τον διαλύτη μέσω διάχυσης και ωσμωτικών διαδικασιών (Ismail et al., 2019).

Αποτελέσματα ερευνών αποδεικνύουν ότι όταν ο διαλύτης βρίσκεται σε υψηλότερη αναλογία προς το στερεό δείγμα, προκύπτει ένα ισχυρό ρεύμα διαλύτη εντός του μείγματος, στο οποίο η ταχύτητα διάδοσης των υπερήχων και η μεταφορά ενέργειας αυξάνονται, επιταχύνοντας το ρυθμό διάχυσης και διαλυτοποίησης των ενεργών συστατικών, διότι η κινητήριος δύναμη είναι ο διαλύτης. Η αυξημένη αναλογία διαλύτη/δείγματος, συνδέεται με περισσότερη επιφάνεια επαφής μεταξύ διαλύτη και του στερεού δείγματος, για αυτό επιλέγεται το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος να είναι όσο το δυνατό πιο μικρό (Stevanato & da Silva, 2019).

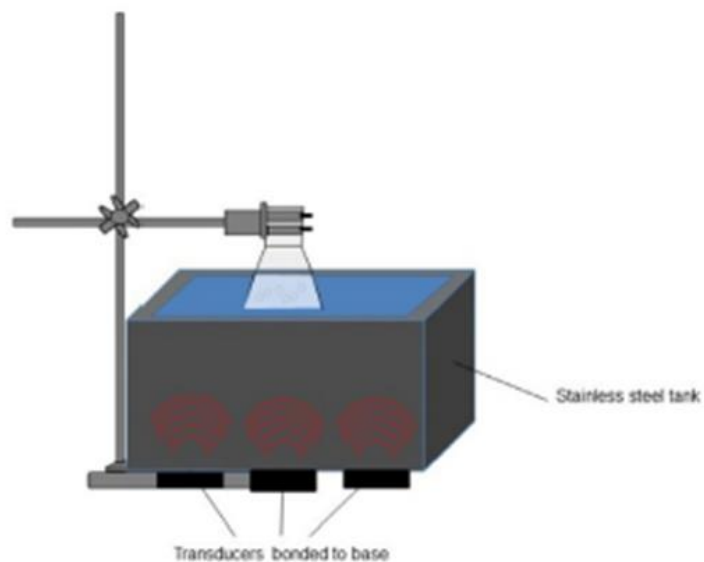
Οι υπέρηχοι μπορούν να εφαρμοστούν χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά συστήματα. Η πρώτη οργανολογία αφορά τον αισθητήρα υπερήχων (Εικόνα 1.10) και η δεύτερη οργανολογία αφορά το λουτρό υπερήχων (Εικόνα 1.11) (Chemat et al., 2017). Με το λουτρό, που συνήθως λειτουργεί μόνο σε χαμηλές συχνότητες 20-40 kHz, η υπερήχηση είναι έμμεση, διότι τα κύματα μεταφέρονται μέσω του νερού στο δοχείο που εμπεριέχει το δείγμα. Είναι πιο προσιτό οικονομικά, εύκολο στη λειτουργία, προλαμβάνει τυχόν επιμολύνσεις, αλλά, παρουσιάζει περιορισμένη αναπαραγωγικότητα, ανομοιόμορφη κατανομή ενέργειας αφού η ενέργεια περνά διαμέσω του λουτρού και στη συνέχεια διαμέσω του δείγματος, καταλήγοντας, σε μειωμένη ισχύ σπηλαίωσης, ρυθμό εξαγωγής και απόδοση του συστήματος. Ο αισθητήρας υπερήχων (probe) βρίσκεται σε άμεση επαφή με το δείγμα, εφόσον βυθίζεται εντός του δοχείου εκχύλισης. Τροφοδοτεί με υψηλής έντασης υπερήχους (100 φορές μεγαλύτερους από του λουτρού) το σύστημα, πετυχαίνοντας αποτελεσματικότερο φαινόμενο σπηλαίωσης, ελαχιστοποιεί τις απώλειες ενέργειας και γι' αυτό χαρακτηρίζεται ως ισχυρότερο εργαλείο για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων.

Παρά τα αρκετά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η τεχνολογία των υπερήχων, ενυπάρχουν και μειονεκτήματα τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές βλάβες στο παραλαμβανόμενο προϊόν. Η υψηλή ισχύς υπερήχων σε συνδυασμό με τις ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης που επικρατούν στο στάδιο της σπηλαίωσης, προξενούν την εμφάνιση ελεύθερων ριζών. Η χρήση υδατικών διαλυτών, εντείνει το σχηματισμό ριζών υποβαθμίζοντας περαιτέρω το υπό εκχύλιση υπόστρωμα. Η διατμητική τάση που προκύπτει λόγω των στροβιλισμών από τα κύματα των υπερήχων οδηγεί σε αδρανοποίηση των εκχυλιζόμενων ενώσεων λόγω πιθανών αποικοδομήσεων ουσιών, οξειδώσεων και φυσικοχημικών αλλαγών που μπορεί να λαμβάνουν χώρα. Σε πρώτες ύλες

με αυξημένη λιποπεριεκτικότητα μπορεί να επέλθει οξειδωτική τάγγιση, υποστρώματα που διαθέτουν έντονα χρώματα να αποχρωματιστούν και τυχόν ευχάριστες οσμές και γεύσεις να μετατραπούν σε ανεπιθύμητες. Τέλος, οι μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις για αυτή την τεχνική, καθιστούν απαιτητικότερη από ενεργειακή και οικονομική άποψη, τη χρήση τους σε βιομηχανική κλίμακα.



Εικόνα 1.10: Σύστημα εκχύλισης με αισθητήρα υπερήχων (probe) (Chemat et al., 2017)

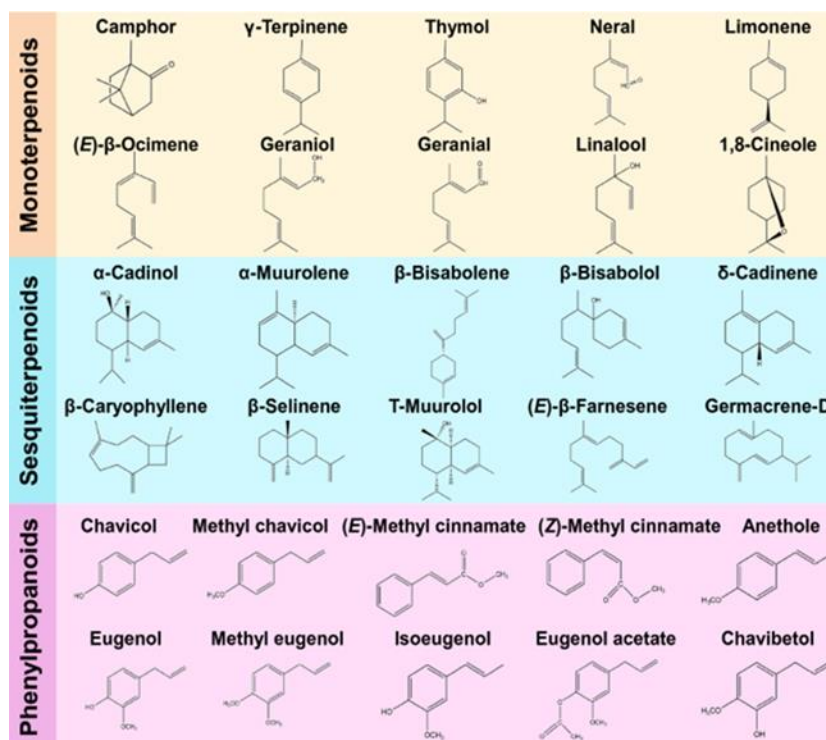


Εικόνα 1.11: Σύστημα εκχύλισης με λουτρό υπερήχων (Chemat et al., 2017)

1.4. Αιθέρια έλαια

1.4.1. Σύσταση αιθέριων ελαίων

Σύμφωνα με την 7^η έκδοση της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, τα αιθέρια έλαια (essential oils, EO) ορίζονται ως: «αρωματικά προϊόντα, συνήθως πολύπλοκης σύνθεσης, που προέρχονται από βοτανικά καθορισμένη φυτική πρώτη ύλη. Η ανάκτησή τους, πραγματοποιείται μέσω διάφορων τεχνικών, όπως απόσταξη με ατμό, νερό, ξηρή απόσταξη ή με κατάλληλη μηχανική μέθοδο χωρίς θέρμανση. Ένα αιθέριο έλαιο, συνήθως διαχωρίζεται από την υδατική φάση με μια φυσική μέθοδο προκειμένου να μην υποστεί σημαντική αλλαγή στη χημική του σύνθεση», όπως τα τερπένια και οι ενώσεις φαινυλοπροπανοειδών (El-Ekiaby, 2019). Τα φυτά συνθέτουν αυτές τις ενώσεις, για να προστατευτούν από τις περιβαλλοντικές, βιοτικές και αβιοτικές μεταβολές. Εντοπίζονται και παράγονται στα εναέρια μέρη όπως οι βλαστοί, τα άνθη, τα φύλλα στα οποία παρουσιάζονται οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθέριων ελαίων, σε ειδικούς αποθηκευτικούς και εκκριτικούς χώρους που αποκαλούνται ελαιογόνοι αδένες. Εκεί, συγκεντρώνεται η υψηλότερη ποσότητα πτητικών οργανικών ενώσεων (volatile organic compounds, VOCs). Αποδεδειγμένα, οι πτητικές ενώσεις διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, για αυτό είναι και τα πιο χρησιμοποιούμενα φυσικά προϊόντα σε παγκόσμιο επίπεδο (Tangrao et al., 2022).

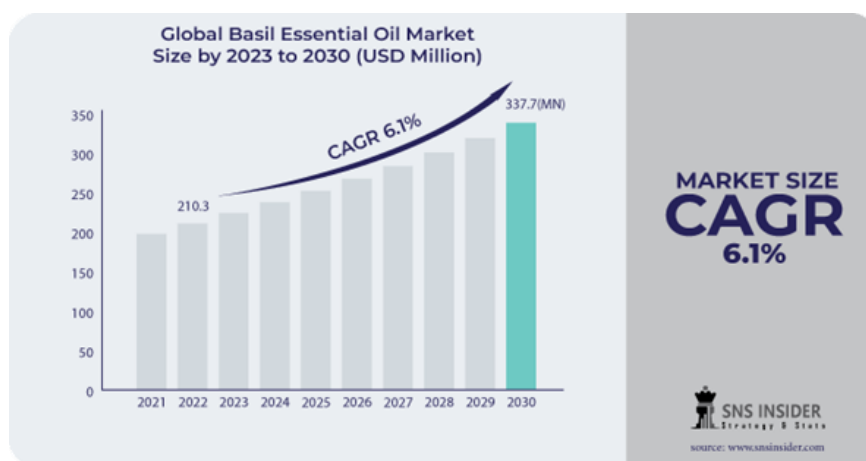


Εικόνα 1.12: Χαρακτηριστικές ενώσεις αιθέριων ελαίων (Gurav et al., 2022)

Πέρα από αυτές τις ενώσεις, περιέχονται και άλλα προϊόντα αποδόμησης, τα οποία δημιουργούνται κατά τη διάρκεια των ενζυμικών, χημικών και φυσικών διεργασιών. Αυτά τα άχρωμα συνήθως υγρά μείγματα, έχουν ελαιώδη σύσταση, διαθέτουν τερπενικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (<300Da) και βρασμού, κυρίως μονοτερπένια (C-10) (π.χ. Camphor, Linalool), σесκιτερπένια (C-15) (π.χ. α-Cadinol, δ-Cadinene) και άλλες αρωματικές και αλειφατικές ενώσεις (Εικόνα 1.12) (Gurav et al., 2022). Είναι αδιάλυτα στο νερό και διαλυτά στην αιθανόλη, στον αιθέρα, σε άλλα έλαια και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος βρίσκονται σε υγρή μορφή (Sarma & Singh, 2020).

1.4.2. Αγορά αιθέριων ελαίων βασιλικού

Σε παγκόσμια κλίμακα, η αγορά των αιθέριων ελαίων διαρκώς διευρύνεται. Για το 2022 εκτιμήθηκε σε 88,9 εκατομμύρια δολάρια και μέχρι το τέλος του 2032 εκτιμάται να φτάσει τα 159,5 εκατομμύρια δολάρια. Το μεγαλύτερο μερίδιο, κατέχει η Νότια Ασία σε ποσοστό 25% της συνολικής αξίας, αφού μόνο η Ινδία παράγει το 1/3 της συνολικής αγοράς. Πιο συγκεκριμένα, η διεθνής αγορά του αιθέριου ελαίου βασιλικού για το 2022, ανήλθε τα 210,3 εκατομμύρια δολάρια, ενώ έως το 2030 αναμένεται να ξεπεράσει τα 337,7 εκατομμύρια δολάρια, διαθέτοντας μέσο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 6,1% για την περίοδο πρόβλεψης 2023-2030 (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13: Αύξηση της διεθνούς αγοράς αιθέριου ελαίου βασιλικού από το 2021-2030 (*Basil Essential Oil Market Size, Share & Growth Report 2030, 2022*)

1.4.3. Ιδιότητες και χρήσεις των αιθέριων ελαίων βασιλικού

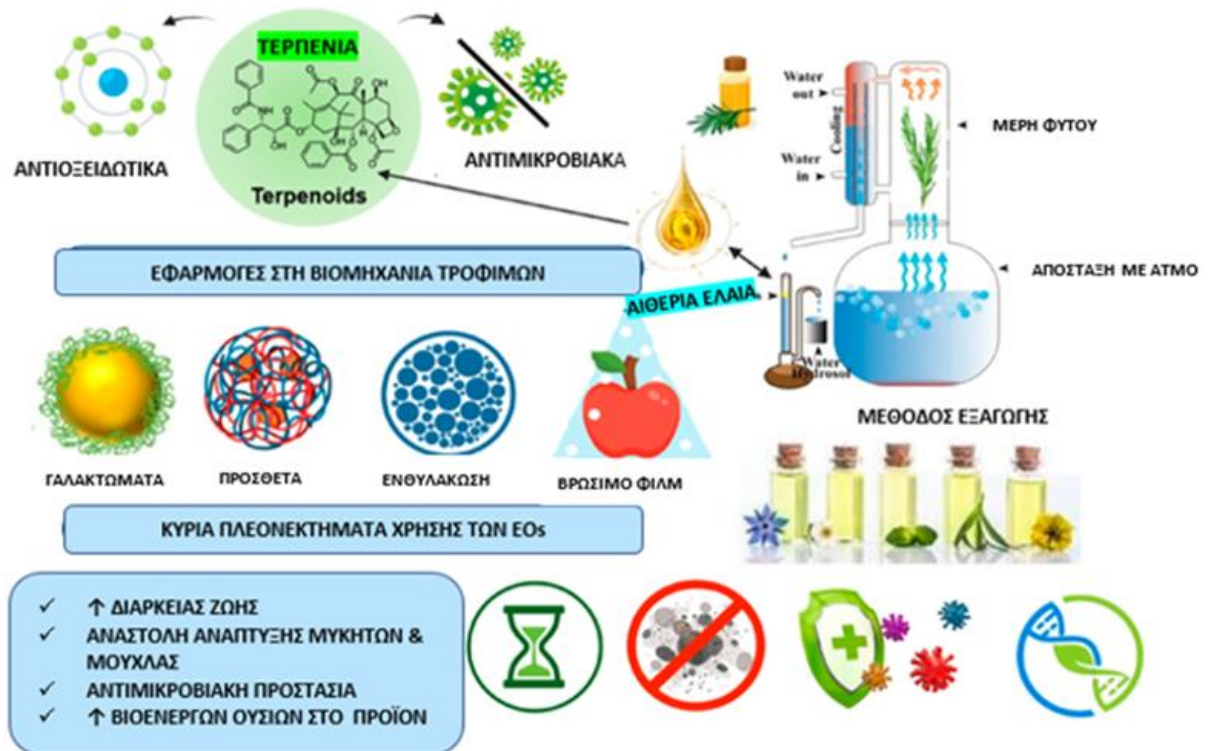
Η χρήση των αιθέριων ελαίων και ιδιαίτερα του βασιλικού, αποσκοπεί στην ενίσχυση της ποιότητας και της ασφάλειας της τροφικής αλυσίδας, στην βελτίωση της διατροφικής αξίας διάφορων προϊόντων και στην αειφορία του γεωργικού τομέα. Τα αιθέρια έλαια, έχουν τη δυνατότητα να καταπολεμούν και να αναστέλλουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών όπως βακτήρια (κυρίως Gram-θετικά) και μύκητες, που μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στα προϊόντα (Amor et al., 2021). Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι βιοαποικοδομήσιμα και σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) είναι αναγνωρισμένα ως ασφαλή (Generally Recognized As Safe, GRAS) και αποδεκτά για ανθρώπινη χρήση (An et al., 2019).

Έτσι, μπορούν να αξιοποιηθούν ως συντηρητικά τροφίμων με σκοπό την αποφυγή της οξείδωσης των τροφίμων, την βελτίωση της διατηρησιμότητάς τους. Ακόμα, δρουν ως πρόσθετα επηρεάζοντας τη γεύση, το άρωμα των διάφορων προϊόντων, αντικαθιστώντας τις τεχνητές ύλες. Πέρα από τις τεχνολογικές ιδιότητες, τα αιθέρια έλαια προσφέρουν ιδιαίτερα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία καθώς έχουν αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση.

Επιπλέον, σημαντική είναι η συμμετοχή τους και στο γεωργικό τομέα. Χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ασθενειών των καρπών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης έπειτα από τη συγκομιδή. Με αυτή τη βιώσιμη στρατηγική, πραγματοποιείται έλεγχος των ελαττωμάτων που μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και ελαχιστοποιούνται οι αλλοιώσεις και οι απώλειες, ιδίως σε καλλιέργειες τροπικών φρούτων, όπως μπανάνα, μάνγκο, ανανά και παπάγια. Οι βιολογικές δράσεις που παρέχουν οι πτητικές οργανικές ενώσεις τους, επικεντρώνονται στην αναστολή της δράσης μικροοργανισμών υπεύθυνων για διάφορες ασθένειες έπειτα από τη συγκομιδή όπως *Aspergillus spp.*, *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea* και *Penicillium italicum* (Bolto et al., 2020).

Μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον, παρουσιάζει η τεχνική της ενθυλάκωσης, που εφαρμόζεται αρκετά στην περίπτωση των αιθέριων ελαίων. Πρόκειται για μια προηγμένη σύγχρονη διαδικασία, που στηρίζεται στη δημιουργία μιας εξωτερικής μεμβράνης ή ενός υλικού επικάλυψης που επιδιώκει να προστατεύσει και να διατηρήσει όλες τις βιοενεργές, πτητικές και θερμοευαίσθητες ουσίες που εγκλείονται εντός του. Η αξία αυτής της διαδικασίας, έγκειται στη δυνατότητα διαφύλαξης της ακεραιότητας των δραστικών

ενώσεων, όπως τα αιθέρια έλαια. Έπειτα, αυτές οι ενώσεις ενθυλακώνονται και ενσωματώνονται σε προϊόντα όπως τρόφιμα, φάρμακα και καλλυντικά. Η ενθυλάκωση, επίσης, βελτιώνει την απόδοση των φυτοφαρμάκων, των λιπασμάτων και άλλων τοξικών αγροχημικών που χρησιμοποιούνται στη γεωργία, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της παραγωγής και της επισιτιστικής ασφάλειας (Salanță & Croptona, 2022).



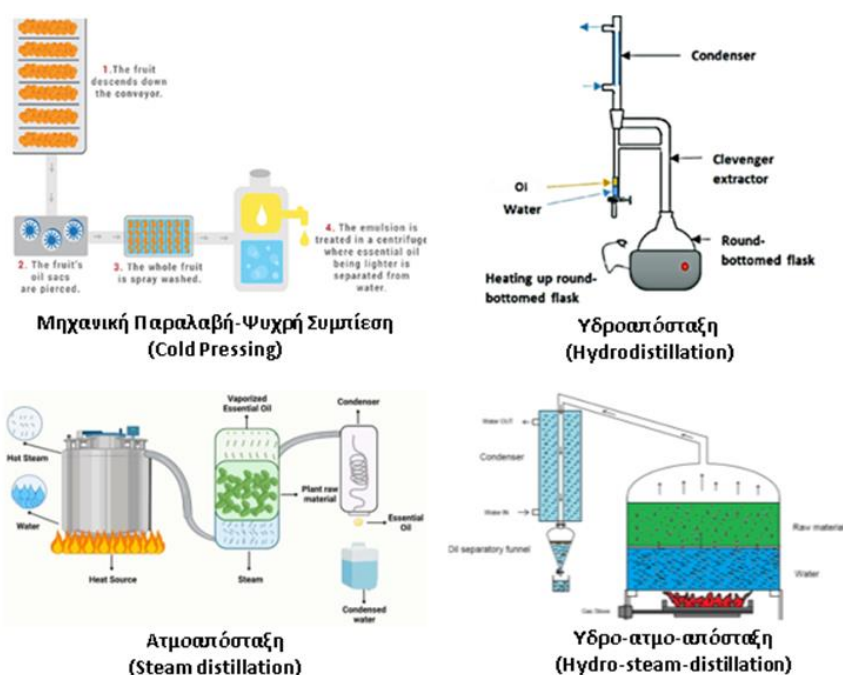
Εικόνα 1.14: Ιδιότητες και χρήσεις αιθέριων ελαίων στη βιομηχανία (Salanță et al., 2022)

1.4.4. Κύριοι τρόποι ανάκτησης των αιθέριων ελαίων

Τα αιθέρια έλαια απομονώνονται από τα εναέρια μέρη του φυτού, τα εκκριτικά κύτταρα και εξάγονται με δύο κύριες τεχνικές :

- I. την αζεοτροπική απόσταξη (υδροαπόσταξη, ατμοαπόσταξη, υδρο-ατμο-απόσταξη)
- II. εκχύλιση με τη χρήση διαλυτών.

Συμβατικές διαδικασίες αποτελούν η απόσταξη με ατμό ή υδροαπόσταξη, και μη συμβατικές η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων και μικροκυμάτων, στην περίπτωση που το φυτικό υλικό διαθέτει θερμοευαίσθητα συστατικά, όπως συμβαίνει στα άνθη, και η μηχανική έκθλιψη (Fometu et al., 2019). Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής και ο ρυθμός παραγωγής, επηρεάζουν την ποιότητα και την ποσότητα του ανακτηθέντος ελαίου και εξαρτώνται από τον τύπο του φυτικού υλικού που υποβάλλεται στη διαδικασία εξαγωγής και τη μελλοντική χρήση του ελαίου (Đorđević et al., 2022). Για παράδειγμα, η μέθοδος της απόσταξης με ατμό επιλέγεται για την απομόνωση αιθέριων ελαίων από φλούδες φυτών και καρπών, ενώ για τα άνθη συνήθως προτιμάται η μέθοδος της υδροαπόσταξης. Κατά τη διάρκεια της παραλαβής, πρέπει να πραγματοποιείται έλεγχος και παρακολούθηση των συνθηκών διεξαγωγής όπως η θερμοκρασία, η πίεση, η διάρκεια εξαγωγής, ώστε να εξασφαλιστεί η ποιότητα των παραλαμβανόμενων αιθέριων ελαίων. Στην Εικόνα 1.15 παρουσιάζονται, συνολικά, οι χαρακτηριστικές μέθοδοι παραλαβής αιθέριων ελαίων.



Εικόνα 1.15: Μέθοδοι παραλαβής αιθέριων ελαίων

Η πιο διαδεδομένη και παραδοσιακή τεχνική ανάκτησης αιθέριων ελαίων είναι η απόσταξη. Στηρίζεται στην διαφορετική τάση ατμών μεταξύ των συστατικών του διαλύματος. Τα αιθέρια έλαια που παραλαμβάνονται με την απόσταξη, έχουν υψηλή καθαρότητα διότι δεν έρχονται σε επαφή με διαλύτες πέρα από το νερό. Συνεπώς μπορούν να ενταχθούν σε τρόφιμα και στην σύνθεση φυτικών προϊόντων όπως φάρμακα, καλλυντικά ή αρώματα (Kant & Kumar, 2022). Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες:

- I. Υδροαπόσταξη / απόσταξη με νερό
- II. Ατμοαπόσταξη /απόσταξη με ατμό
- III. Απόσταξη με νερό και ατμό /υδρο-ατμο-απόσταξη

Ανάλογα με το μέρος του φυτού που απομονώνεται για την παραλαβή των αιθέριων ελαίων με απόσταξη, προηγείται μια προκατεργασία του φυτικού δείγματος. Τα άνθη συνήθως δεν απαιτούν θρυμματισμό και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ολόκληρα, τα φύλλα αλέθονται ώστε να απελευθερωθούν πιο εύκολα τα συστατικά τους, οι σπόροι συνθλίβονται και οι ρίζες και τα αποξηραμένα φυτά ψιλοκόβονται.

1.5. Νομοθεσία αιθέριων ελαίων και εκχυλισμάτων βασιλικού

Τα εκχυλίσματα αρωματικών φυτών που εμπίπτουν στον κανονισμό (ΕΚ) 1333/2008 και άρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα στην βιομηχανία τροφίμων είναι τα εκχυλίσματα δενδρολίβανου (E 392) και το εκχύλισμα κιλάιας (E 999). Τα εκχυλίσματα δενδρολίβανου κατατάσσονται στην λειτουργική κατηγορία των αντιοξειδωτικών και εφαρμόζονται, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, κυρίως σε λιπαρά τρόφιμα όπως είναι τα λίπη, έλαια και οι σκόνες γάλακτος. Το εκχύλισμα κιλάιας προστίθεται συνήθως σε ποτά και αρωματισμένα ροφήματα. Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) 1333/2008, τα εκχυλίσματα βασιλικού δεν χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων, αλλά ως αρωματικές ύλες, διότι τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα δεν περιλαμβάνονται στον κοινοτικό κατάλογο προσθέτων. Οι κανονισμοί (ΕΚ) 1333/2008, (ΕΚ) 1334/2008 και ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών διακρίνει τις αρωματικές ύλες από τα πρόσθετα τροφίμων. Αυτό σημαίνει ότι στις αρωματικές ύλες, δεν αποδίδεται ο εγκεκριμένος αριθμός Ε. Βέβαια, για να χρησιμοποιηθεί μια ύλη όπως είναι το εκχύλισμα βασιλικού ως αρωματική πρέπει να περιέχεται στον κατάλογο των flavourings. Ο ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών καθορίζει και θέτει τις προδιαγραφές για τις αρωματικές ύλες που παράγονται από τον βασιλικό. Οι αρωματικές ύλες που προέρχονται από το βασιλικό είναι το αιθέριο έλαιο και το εκχύλισμα του. Στο

άρθρο 45 του κώδικα Τροφίμων και Ποτών ορίζεται ότι το «Αιθέριο Έλαιο Βασιλικού» (Basil oil) είναι το προϊόν που λαμβάνεται με απόσταξη των ανθισμένων κορυφών του φυτού *Ocimum Basilicum* L. Αυτό πρέπει να έχει ειδικό βάρος (25°C) 0,895-0,930, δείκτη διάθλασης (20°C) 1,477-1,495 και οπτική στροφή (10cm, 25°C) -6° έως -22°. Επιπλέον, στο άρθρο 46 του κώδικα Τροφίμων και Ποτών ορίζεται ότι το «Φυσικό άρωμα (ή Εκχύλισμα) Βασιλικού (Sweet Basil Extract) είναι το προϊόν περιεκτικότητας τουλάχιστον 0,1% σε αιθέριο έλαιο που λαμβάνεται είτε με απευθείας εκχύλιση είτε από το αντίστοιχο αιθέριο έλαιο. Μεταξύ άλλων, οι αρωματικές ύλες κατατάσσονται στις αρτυματικές ύλες οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να προσδίδουν μια ιδιαίτερη οσμή ή γεύση στο τρόφιμο και να το κάνουν πιο εύληπτο από των καταναλωτή. Το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα βασιλικού δεν θεωρούνται πρόσθετα μπορεί να θεωρηθεί ως πλεονέκτημα για την επισήμανση των τροφίμων γιατί οι καταναλωτές φαίνεται να έχουν αλλάξει συνήθειες και να προτιμούν πιο βιολογικά και «φυσικά» προϊόντα. Στο κοινοτικό μητρώο, όπου περιέχονται όλοι οι ισχυρισμοί υγείας και διατροφής, δεν έχει εντοπιστεί κάποιος εγκεκριμένος ισχυρισμός επί θεμάτων υγείας που να σχετίζεται με τα εκχυλίσματα βασιλικού ή των φαινολικών συστατικών που διαθέτουν τα εκχυλίσματα. Αν τεκμηριωθούν σε επιστημονικό βάθος και καταρτιστεί σωστά ο φάκελος για τον ισχυρισμό υγείας των εκχυλισμάτων βασιλικού, θα μπορούσαν να αποδώσουν προστιθέμενη αξία στο τελικό προϊόν. Η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από τον βασιλικό συνηθίζεται να γίνεται με αιθανόλη, μεθανόλη ή ακόμα και με νερό. Η μεθανόλη είναι πιο αποδοτική και περισσότερο τοξική από την αιθανόλη η οποία σε ελεγχόμενη ποσότητα θεωρείται food grade. Πέρα από τα τοξικολογικά δεδομένα, η τοξικότητα της μεθανόλης αποδεικνύεται από την έμφαση και τα πιο αυστηρά όρια που θέτει η νομοθεσία. Η οδηγία 2009/32/ΕΚ του ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του συμβουλίου αφορά την προσέγγιση των νομοθεσιών των κρατών μελών που αφορούν τους διαλύτες εκχύλισης οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των τροφίμων και των συστατικών τους. Στο παράρτημα 1 της οδηγίας 2009/32/ΕΚ η αιθανόλη κατατάσσεται στους διαλύτες εκχύλισης που πρέπει να χρησιμοποιούνται υπό συνθήκες ορθής παρασκευαστικής πρακτικής και δεν τίθενται συγκεκριμένα αριθμητικά όρια. Ένας διαλύτης εκχύλισης θεωρείται ότι χρησιμοποιείται υπό συνθήκες ορθής παρασκευαστικής πρακτικής εφόσον η χρήση του αφήνει υπολείμματα ή παράγωγα μόνο σε ποσότητες τεχνικά αναπόφευκτες που δεν ενέχουν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, η καθαρότητα για την αιθανόλη προβλέπεται

στα 450 mg/kg κατ' ανώτατο όριο (εκφραζόμενη επί ξηρού). Σύμφωνα με το παράρτημα 1 της οδηγίας, η μέγιστη περιεκτικότητα μεθανόλης σε υπολείμματα στα τρόφιμα που οφείλονται στους διαλύτες εκχύλισης κατά την προετοιμασία αρωματικών υλών από φυσικές αρωματικές ύλες είναι 1.5 mg/kg τροφίμου.

1.6. Παραπροϊόντα αρωματικών φυτών

Στην επιστημονική επικαιρότητα, παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση των μελετών που εστιάζουν στην αξιοποίηση των παραπροϊόντων και των αποβλήτων, που προέρχονται από τη γεωργική καλλιέργεια, την παραγωγική διαδικασία των βιομηχανιών τροφίμων και την περαιτέρω επεξεργασία φυτικών υλικών, όπως των αρωματικών φυτών. Αυτές, οδηγούν στη συσσώρευση δευτερογενών προϊόντων, που συνήθως αναφέρονται σε υπολείμματα που προέρχονται από τη συγκομιδή (κλαδιά, ρίζες, φύλλα), διαδικασίες όπως η απόσταξη, μέρη του φυτού που δεν αξιοποιήθηκαν στο κύριο προϊόν ή νερό που απορρίπτεται από τις διάφορες επεξεργασίες. Τα παραπροϊόντα, εμφανίζονται είτε σε στερεή μορφή ως βιομάζα, είτε ως υγρά υπολείμματα όπως υδρολύματα ή λύματα. Η αυξημένη παγκόσμια ζήτηση των αρωματικών φυτών, οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή αποβλήτων από τις βιομηχανίες. Η βιομηχανία των αρωματικών φυτών υπολογίζεται πως παράγει περίπου 30 εκατομμύρια τόνους αποβλήτων ετησίως (Wei et al., 2022). Σύμφωνα με έρευνες, η αναλογία των παραγόμενων αιθέριων ελαίων και της βιομάζας που χρησιμοποιείται είναι μικρή και για την παραγωγή 1kg αιθέριων ελαίων, προκύπτουν 100kg στερεών αποβλήτων (de Elguea-Culebras et al., 2022). Γενικά ισχύει ότι, η απόδοση της απόσταξης των αιθέριων ελαίων δεν υπερβαίνει τα 4%, οδηγώντας σε μεγάλες ποσότητες αποσταγμένης αποσημμένης βιομάζας >95% του αρχικού φυτικού υλικού. Για παράδειγμα, μόνο στη Γαλλία εντός του έτους 2016, η παραγωγή αιθέριου ελαίου λεβάντας ανήλθε τους 1.439 τόνους και παράλληλα προέκυψαν 140.000 τόνοι στερεών αποβλήτων.

Τα αγροβιομηχανικά απόβλητα, κυρίως αυτά που προέρχονται από τα αρωματικά φυτά, έχουν την ικανότητα να διατηρούν σε ποσοστό 30-60% τα μόρια υψηλής προστιθέμενης αξίας και μπορούν να αποτελέσουν δυνητικές οικονομικές εναλλακτικές πηγές ανάκτησης λειτουργικών βιοενεργών ουσιών, όπως φαινολικές ουσίες, φυσικά αντιοξειδωτικά, τερπένια και αλκαλοειδή. Τα παραγόμενα υπολείμματα αρωματικών φυτών, έχουν αξιολογηθεί για την παραλαβή πολυφαινολών σε υψηλή περιεκτικότητα, ενώ

εμφανίζουν μικρότερη αντοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τη φρέσκια φυτική ύλη (Alexandri et al., 2023).

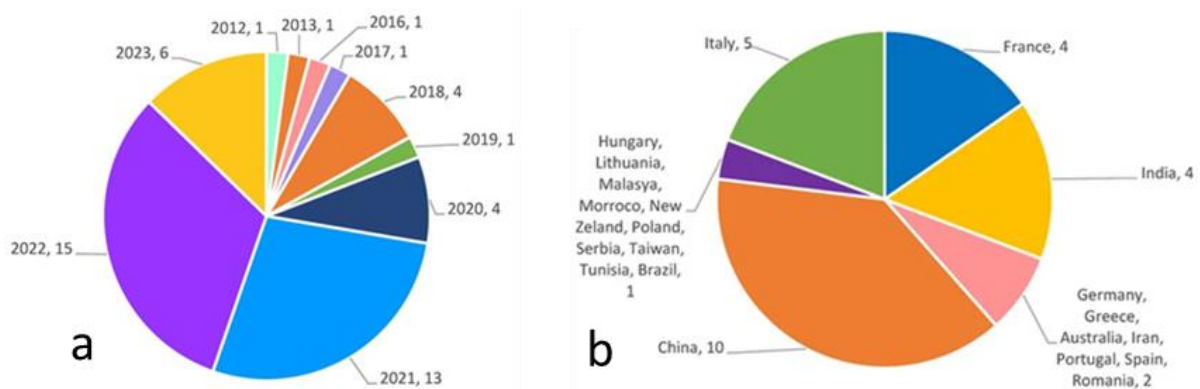
Τα υδρολύματα των αρωματικών φυτών, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον έναντι των στερεών, καθώς παράγονται σε μεγάλες ποσότητες μέσω της υδροαπόσταξης. Με τη διαδικασία της υδροαπόσταξης και τις συνθήκες που επικρατούν, επιτυγχάνεται καλύτερη πρόσβαση στο περιεχόμενο της φυτικής μήτρας, γιατί πραγματοποιείται καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος (Jasicka-Misiak et al., 2021). Η έκπλυση των ενώσεων μπορεί να ενισχυθεί με την περαιτέρω εκχύλιση με πολικούς διαλύτες, όπως η μεθανόλη ή αιθανόλη, με στόχο την ανάκτηση περισσότερων ενώσεων από τα υλικά μετά το πέρας της υδροαπόσταξης (Luca et al., 2023). Ανάλογα με τις χημικές αντιδράσεις (οξειδωση, υδρόλυση, θερμοδιάσπαση) που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια των επεξεργασιών όπως της απόσταξης, τις μεθόδους, τους διαλύτες που επιλέγονται και το χρονικό διάστημα που απαιτούν, επηρεάζεται το φυτοχημικό προφίλ και η απόδοση ανάκτησής τους. Παρακάτω παρατίθεται ένας ενδεικτικός πίνακας (Πίνακας 1.3), με συστατικά και φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στη στερεή βιομάζα και στα υγρά απόβλητα βασιλικού.

Πίνακας 1.3: Περιεχόμενο στερεών και υγρών αποβλήτων βασιλικού

	Στερεή Βιομάζα		Υγρά απόβλητα
Συστατικά	Κυτταρίνη (35-40%)	Φαινολικές Ενώσεις	Ροσμαρινικό οξύ
	Ημικυτταρίνη (25-30%)		Καφεϊκό οξύ
	Λιγνίνη (15-20%)		Π-Κουμαρικό οξύ
	Ρουτίνη		
	Λουτεολίνη-7-ο-γλυκοζιτης		

Οι σύγχρονες ανάγκες της αγοράς τροφίμων και υγείας επικεντρώνονται στην εύρεση νέων φυτοδραστικών συστατικών, τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν από τις βιομηχανίες και στοχεύουν στην παραγωγή καινοτόμων λειτουργικών προϊόντων που ανταποκρίνονται στις σύγχρονες απαιτήσεις του καταναλωτή για πιο “φυσικές επιλογές”. Για αυτό, ο κλάδος εξελίσσεται διαρκώς τόσο ερευνητικά όσο και οικονομικά. Στην Εικόνα 1.16 παρουσιάζονται: (α) τα αυξανόμενα επιστημονικά άρθρα τα οποία δημοσιεύονται στη βάση δεδομένων Scopus, αντικατοπτρίζοντας το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα για την αξιοποίηση παραπροϊόντων από αρωματικά φυτά και (β) οι

επιστημονικές δημοσιεύσεις ανά χώρα, που προβάλλουν την ενεργή συμμετοχή των χωρών στον τομέα της διαχείρισης των παραπροϊόντων αρωματικών φυτών. Το υψηλότερο ποσοστό ερευνητικής δραστηριότητας, εντοπίζεται στην Ασία και κυρίως στην Κίνα που είναι γνωστή για την εφαρμογή αρωματικών φυτών στην παραδοσιακή ιατρική και ακολουθούν οι μεσογειακές χώρες (Marcelino et al., 2023). Σύμφωνα με την νέα Κοινή Αγροτική Πολιτική για το χρονικό διάστημα 2023-2027, πρόκειται να δοθούν μεγαλύτερες χρηματοδοτήσεις σε οικολογικές πρακτικές, όπως η διαχείριση των φυτικών παραπροϊόντων, υποστηρίζοντας τους στόχους της Ευρωπαϊκής Πράσινης Συμφωνίας για την προστασία του περιβάλλοντος, τη βιώσιμη και οικολογική κυκλική οικονομία.



Εικόνα 1.16: α) Τα επιστημονικά άρθρα που δημοσιεύτηκαν στο Scopus ανά έτος, για την αξιοποίηση των αποβλήτων στον τομέα των αρωματικών φυτών β) Απεικονίζεται η γεωγραφική κατανομή επιστημονικών άρθρων που δημοσιεύθηκαν (Marcelino et al., 2023)

Τα υποπροϊόντα αυτά, με την ορθή διαχείριση και ανακύκλωσή τους, μπορούν να αξιοποιηθούν ως πολύτιμοι πόροι για τη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων, καλλυντικών και να μετατραπούν σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, συνδράμοντας στη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και τη βιωσιμότητα των βιομηχανιών (Saha & Basak, 2020). Δεν χαρακτηρίζονται ως επιβλαβή για το οικοσύστημα, διότι είναι ουδέτερα ως προς το αποτύπωμα άνθρακα και δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον με διοξείδιο του άνθρακα. Ωστόσο, η λανθασμένη διαχείριση των αποβλήτων, μπορεί να επιφέρει περιβαλλοντικές επιπτώσεις λόγω της ακατάλληλης διάθεσης, όπως η ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και η δημιουργία εστιών μόλυνσης, βλάπτοντας ολόκληρο το οικοσύστημα. Για αυτό, η αξιοποίησή τους κρίνεται μείζονος σημασίας (Chiocchio et al., 2021).

Πίνακας 1.4: Ιδιότητες και εφαρμογές παραπροϊόντων αρωματικών φυτών

Είδος Φυτού	Τύπος απορριμμάτων	Ιδιότητες	Εφαρμογή
Βασιλικός (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	Παραπροϊόντα απόσταξης	Τα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα διαθέτουν υψηλή συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις που είναι πολύτιμη πηγή βιοενεργών ενώσεων, όπως τα αντιοξειδωτικά.	Βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων.
Ρίγανη (<i>Origanum vulgare</i> var. <i>aureum</i>)			
Σαμπούκο (<i>Sambucus nigra</i> L.)	Υδρολύματα	Ενεργά συστατικά φλοιού και μίσχων του φυτού	Βιομηχανία καλλυντικών, ως τονωτικό δέρματος ή για θεραπευτικά λουτρά.
Δενδρολίβανο (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	Στερεά παραπροϊόντα απόσταξης ή Νερό μετά την απόσταξη	Βιοδραστικές ενώσεις με αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή δράση, κυρίως πολυφαινόλες.	Βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.
Φασκόμηλο (<i>Salvia fruticosa</i> L.)			
Μέντα (<i>Mentha spicata</i> L.)			
Λεμονόχορτο (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Υδρολύματα ή Μη αποσταγμένη υδατική φάση	Αιθέριο έλαιο πλούσιο σε κιτράλη σε μορφή γαλακτώματος ή Πολυσακχαρίτες πλούσιοι σε γλυκόζη και αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.	Λειτουργικό συστατικό στη σύνθεση τσαγιού <i>matcha</i> , προσφέρει γεύση και παράταση διάρκειας ζωής. ή Εφαρμογή ως λειτουργική διαιτητική ίνα στη βιομηχανία τροφίμων.

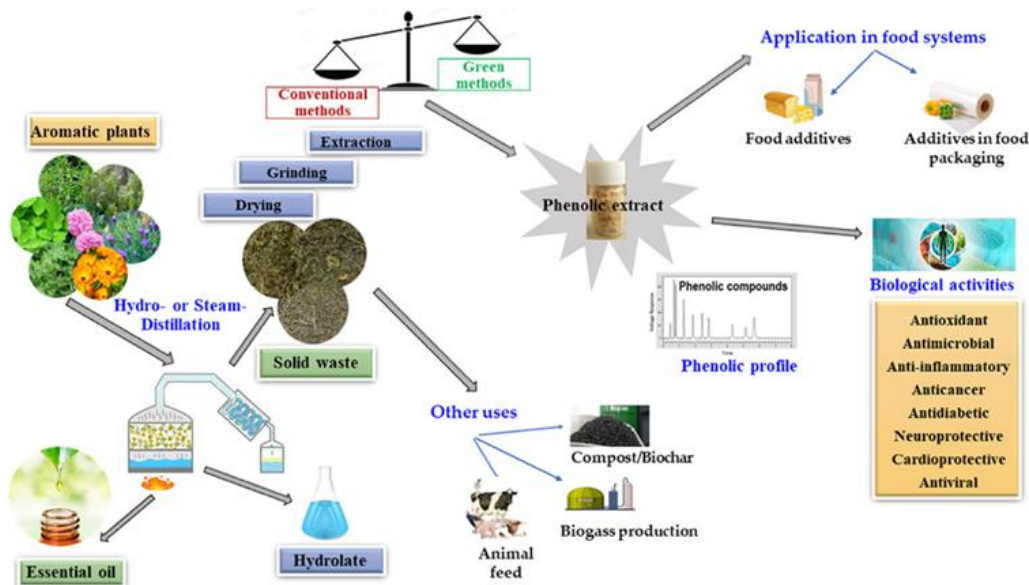
Υπάρχουν διάφορες εναλλακτικές χρήσεις αυτών των “πράσινων” παραπροϊόντων, όπως η απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών και η ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα υγείας, όπως τα συμπληρώματα διατροφής και καλλωπισμού, όπως οι κρέμες, τα καλλυντικά, τα αρώματα, δημιουργώντας προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Επίσης, τα παραπροϊόντα περιέχουν θρεπτικά συστατικά τα οποία χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων (Skendi et al., 2022). Ορισμένα, έχουν εφαρμοστεί ως πρόσθετα έναντι της αμαύρωσης, διότι διαθέτουν υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών οξέων (πχ. ασκορβικό, μηλικό, φωσφορικό), φαινολικών ουσιών και ως αντιμικροβιακοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Παράδειγμα αποτελούν τα νερά (hydrosols) που προκύπτουν από την υδροατμοαπόσταξη βασιλικού, δεντρολίβανου και φασκόμηλου, τα οποία είναι

πλούσιες πηγές βιοενεργών φυτοχημικών (Subiria-Cueto et al., 2021). Επιπλέον, δίνουν τη δυνατότητα παράτασης της διάρκειας ζωής τροφίμων, όπως για παράδειγμα, φαίνεται από τη χρήση αιθανολικών εκχυλισμάτων από τα στερεά παραπροϊόντα λεβάντας και λεμονόχορτου σε προϊόντα αρτοποιίας. Στη βιομηχανία τροφίμων τα απόβλητα αυτά, μπορούν ακόμα να χρησιμοποιηθούν ως ενισχυτές γεύσης, αρώματος και χρώματος. Χαρακτηριστική είναι η χρήση των απορριπτόμενων φύλλων λυκίσκου (*Humulus Lupulus* L.), για να συντηρήσουν και να προσδώσουν γεύση στη μπίρα. Άλλες βιώσιμες πρακτικές που συνδυάζουν την αξιοποίηση των παραπροϊόντων φυτικών υποστρωμάτων με την επιστημονική καινοτομία περιλαμβάνουν την παραγωγή:

- Ζωοτροφών και συμπληρωμάτων διατροφής ζώων: χαρακτηριστική είναι η χρήση των παραπροϊόντων εκχύλισης του φυτού *Panax ginseng* ως μια πηγή πρωτεΐνης και τα στερεά απόβλητα δενδρολίβανου (*Rosmarinus Officinalis* L.), τα οποία αποτελούν ιδανικά συστατικά για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού των ζώων (Chiocchio et al., 2021).
- Βιοκαυσίμων όπως το μεθάνιο, την αιθανόλη: έχουν τη δυνατότητα να αντικαθιστούν μερικώς το πετρέλαιο και τη βενζίνη. Ως πρώτη ύλη, μπορούν να αξιοποιηθούν η βιομάζα μέντας, φασκόμηλου για βιοκαύσιμα. Ακόμα, το παραγόμενο βιοέλαιο που προκύπτει από παραπροϊόντα λεμονόχορτου έχει αξιολογηθεί ως καύσιμο με θερμαντική αξία.
- Βιοαερίου: η βιομάζα που προκύπτει από τα αγρο-απόβλητα όπως του λεμονόχορτου είναι πιο αποδοτική λύση συγκριτικά με την κοπριά.
- Βιοπροσροφητικών για τον καθαρισμό των λυμάτων: Η βιομάζα που προκύπτει έπειτα από τη διαδικασία της απόσταξης παραπροϊόντων μέντας, λεμονόχορτου έχει την ικανότητα να δεσμεύσει τα βαρέα μέταλλα και τις χρωστικές. Επιπλέον, έρευνες έχουν αποδείξει ότι ο ενεργός άνθρακας που εντοπίζεται στη βιομάζα της σιτρονέλλας (*Java citronella*) μπορεί να απορροφήσει τοξικές χρωστικές όπως το Congo red.
- Βιοπαρασιτοκτόνων και Βιολογικών φυτοφαρμάκων: παράδειγμα αποτελεί η αξιοποίηση των φύλλων ρίγανης (*Poliomintha longiflora* A. Gray) και μαράθου (*Foeniculum vulgare*) ύστερα από την απόσταξη ως μια βιώσιμη εναλλακτική προστασίας των καλλιεργειών. Ακόμα, το υδρόλυμα του βασιλικού έχει αποδειχτεί

οτι μπορεί να αντιμετωπίσει το παράσιτο αφίδα του βαμβακιού (*Aphis gossypii*) (Traka et al., 2018).

- Κομπόστ, με τη χρήση της υπολειπόμενης βιομάζας για την αύξηση της γονιμότητας του εδάφους και την παροχή θρεπτικών ουσιών (Zaccardelli et al., 2021).



Εικόνα 1.17: Αξιοποίηση των παραπροϊόντων που παραμένουν μετά την απόσταξη των αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών (Skendi et al., 2022)

1.7. Βελτιστοποίηση εκχυλίσεων

1.7.1. Γενικά για μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση

Κάθε πειραματικό πρόβλημα, όπως μια χημική αντίδραση ή μια εκχύλιση, χαρακτηρίζεται από τους παράγοντες και τις πειραματικές αποκρίσεις. Οι παράγοντες (factors) αποτελούν τις ανεξάρτητες μεταβλητές, οι οποίες ρυθμίζονται εκούσια σε επιλεγμένες τιμές, ενώ οι αποκρίσεις (responses) ή εξαρτημένες μεταβλητές είναι μετρήσιμα μεγέθη τα οποία υποδεικνύουν τα αποτελέσματα ενός πειράματος (Benedetti et al., 2022). Οι παράγοντες διακρίνονται σε ποιοτικούς (τύπος διαλύτη, τύπος αντιδραστηρίου κλπ.) και σε ποσοτικούς (θερμοκρασία, χρόνος, ποσότητα αντιδραστηρίου κλπ.). Οι διαφορετικές τιμές που μπορούν να λάβουν οι ανεξάρτητες μεταβλητές, ονομάζονται επίπεδα τιμών (levels of factors). Κατά την βελτιστοποίηση, οι παράγοντες και τα διάφορα επίπεδα τιμών διερευνώνται στοχεύοντας την βέλτιστη απόκριση.

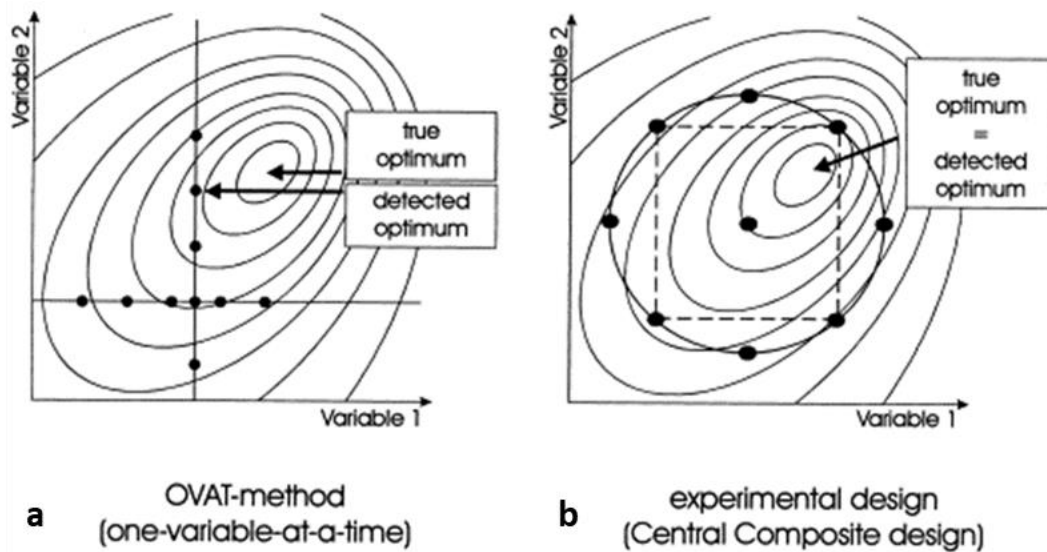
Γενικότερα, οι μέθοδοι βελτιστοποίησης μιας διεργασίας είναι δυνατόν να ταξινομηθούν με βάση την μονοπαραγοντική ή την πολυπαραγοντική ανάλυση που υφίστανται (Sudha et al., 2017). Στην παραδοσιακή μονοπαραγοντική ανάλυση, η βελτιστοποίηση πραγματοποιείται με την παρακολούθηση της επίδρασης ενός παράγοντα, κάθε φορά, σε μια πειραματική απόκριση. Αυτό το είδος βελτιστοποίησης ονομάζεται “one-variable-at-time” (OVAT) ή εναλλακτικά “one-factor-at-time” (OFAT) επειδή εκτός από μία μεταβλητή, οι άλλες παραμένουν σταθερές (Izadiyan & Hemmateenejad, 2016; Paulo & Santos, 2017). Η προσέγγιση της βελτιστοποίησης ενός παράγοντα την φορά εμπεριέχει αρκετούς περιορισμούς, οι οποίοι σχετίζονται κυρίως με τον αυξημένο αριθμό πειραμάτων και την εξαγωγή ελλιπούς πληροφορίας. Όταν μελετάται η κύρια επίδραση ενός παράγοντα (main effects), αγνοούνται οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις των παραγόντων. Έτσι, εξετάζεται ένα σχετικά μικρό πεδίο της πειραματικής περιοχής και υπάρχει η πιθανότητα να μην βρεθεί η πραγματικά βέλτιστη τιμή του μετρούμενου μεγέθους. Ακόμα, ο αυξημένος αριθμός πειραμάτων οδηγεί σε αρνητικό οικονομικό και περιβαλλοντικό αποτύπωμα, διότι καταναλώνονται περισσότεροι πόροι για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Πολλά από τα παραπάνω προβλήματα αντιμετωπίζονται εφαρμόζοντας πολυπαραγοντικές τεχνικές, όπως είναι τα μοντέλα του πειραματικού σχεδιασμού και οι αλγόριθμοι της τεχνητής νοημοσύνης (Fontoura et al., 2023; Uhoraningoga et al., 2018).

Οι πολυπαραγοντικές τεχνικές προσφέρουν τα εξής πλεονεκτήματα:

- Εκτέλεση μικρού αριθμού πειραμάτων
- Μελέτη της αλληλεπίδρασης των παραγόντων
- Κάλυψη ικανής πειραματικής περιοχής έτσι ώστε να ερμηνευτεί καλύτερα το φαινόμενο (πχ εκχύλιση)
- Μεγάλη πιθανότητα εύρεσης της πραγματικής βέλτιστης τιμής του μετρούμενου μεγέθους
- Παραγωγή εξίσωσης πρόβλεψης της πειραματικής απόκρισης με ρύθμιση των παραγόντων σε επιθυμητές τιμές

Στην Εικόνα 1.18 αποτυπώνεται γραφικά η σύγκριση μεταξύ της βελτιστοποίησης του ενός παράγοντα την φορά και ενός μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού, του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (Central Composite Design). Επιβεβαιώνεται ότι με την μονοπαραγοντική βελτιστοποίηση (Εικόνα 1.18a) αναλύεται σχετικά μικρή περιοχή, ενώ με

την πολυπαραγοντική βελτιστοποίηση (Εικόνα 1.18b) αναλύεται πολύ μεγαλύτερη περιοχή στην οποία υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα εύρεσης της πραγματικής βέλτιστης τιμής.



Εικόνα 1.18: Σύγκριση των δύο μεθόδων βελτιστοποίησης, OVAT(a απεικόνιση) και πειραματικού σχεδιασμού (b απεικόνιση) (Preu et al., 1998).

1.7.2. Πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiments, DoE): Γενικές Αρχές

Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει ένα πλήθος στατιστικών εργαλείων, τα οποία χρησιμοποιούνται για την συστηματική κατάταξη και ποσοτικοποίηση της σχέσεως αιτίας-αποτελέσματος μεταξύ των παραμέτρων και των αποκρίσεων μιας διεργασίας (Janjovic et al., 2021). Ανάλογα τον σκοπό της μελέτης, τα μοντέλα του πειραματικού σχεδιασμού χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά τα μοντέλα ελέγχου ή σάρωσης παραγόντων (Screening Design Models), τα οποία χρησιμοποιούνται για την επιλογή των σημαντικών ανεξάρτητων μεταβλητών σε πειράματα ή διαδικασίες που περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό παραγόντων (≥ 5), καθώς και τον προσδιορισμό του εύρους τιμών των σημαντικών παραμέτρων (Paulo & Santos, 2017). Μερικά παραδείγματα αυτού του είδους πειραματικού σχεδιασμού, είναι ο 2^3 πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός, ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός και ο σχεδιασμός Plackett-Burman. Ο έλεγχος των παραγόντων με τα παραπάνω μοντέλα, συμβαίνει χρησιμοποιώντας 2 επίπεδα τιμών, μία ελάχιστη (-1) και μία μέγιστη τιμή (+1). Η σάρωση πραγματοποιείται μεταξύ αυτών των δύο τιμών διότι στόχος είναι η παραγωγή ενός γραμμικού μοντέλου που θα περιλαμβάνει όρους μικρού

βαθμού, δηλαδή τις κύριες γραμμικές επιδράσεις και τις τυχόν αλληλεπιδράσεις των παραγόντων.

Η δεύτερη κατηγορία πειραματικού σχεδιασμού είναι η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Design, RSM) κατά την οποία πραγματοποιείται η βελτιστοποίηση των σημαντικών παραγόντων (Paulo & Santos, 2017). Η βελτιστοποίηση γίνεται τουλάχιστον με 3 επίπεδα τιμών και στοχεύει στην εύρεση του μέγιστου ή ελάχιστου σημείου στον πειραματικό χώρο. Τα πιο γνωστά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για αυτό τον σκοπό είναι ο σχεδιασμός Box-Behnken και ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite Design, CCD). Τα μοντέλα της επιφάνειας απόκρισης δεν είναι γραμμικά αλλά μεγαλύτερης τάξης, συνήθως δευτέρου βαθμού (Benedetti et al., 2022). Σε σύγκριση με τον σχεδιασμό ελέγχου παραγόντων, η μεθοδολογία της επιφάνειας απόκρισης απαιτεί την διεξαγωγή περισσότερων πειραμάτων, τα οποία οδηγούν στην βαθύτερη κατανόηση του μελετώμενου φαινομένου/διαδικασίας. Στον Πίνακα 1.5 παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα πειραματικού σχεδιασμού που εφαρμόστηκαν για την βελτιστοποίηση εκχυλίσεων.

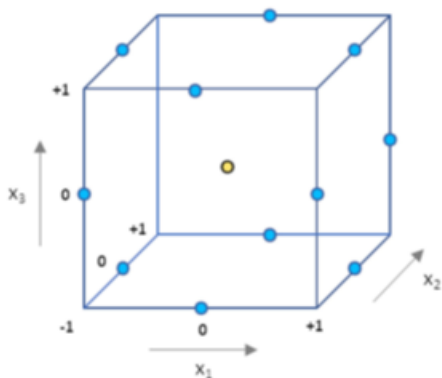
Τα απαιτούμενα βήματα του σχεδιασμού και της ανάλυσης των μοντέλων πραγματοποιούνται με την βοήθεια ειδικών λογισμικών, όπως είναι το Design-Expert, Statistica, Statgraphics, Minitab, SAS, SPSS, JMP και το MODDE (Ebrahimi-Najafabadi et al., 2014).

Πίνακας 1.5: Παραδείγματα βελτιστοποιημένων εκχυλίσεων με την βοήθεια του πειραματικού σχεδιασμού

Τίτλος εργασίας	Μέθοδος Πειραματικού Σχεδιασμού	Παραπομπές
Optimization of the extraction process of minerals from <i>Salvia officinalis</i> L. using factorial design methodology	Full factorial design 2 ³	(Mitić et al., 2019)
An Optimized Method for Extraction and Characterization of Phenolic Compounds in <i>Dendranthema indicum</i> var. <i>aromaticum</i> Flower	Central Composite Design	(Zhong et al., 2019)
Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from <i>Thymus comosus</i> Heuff. Ex Griseb. Et Schenk (wild thyme) and their bioactive potential	D - Optimal Design	(Babotă et al., 2022)
Astaxanthin Extraction from Marine Crustacean Waste Streams: An Integrate Approach between Microwaves and Supercritical Fluids	Central Composite Design & Full Factorial Design	(Nunes et al., 2021)
Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Phenolics from <i>Citrus aurantium</i> L. Blossoms and Evaluation of Free Radical Scavenging, Anti-HMG-CoA Reductase Activities	Box-Behnken Design	(Hao et al., 2019)
Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for bioactive components from coffee leaves using the Taguchi design and response surface methodology	Taguchi Design & Box Behnken Design	(Chen et al., 2020)

1.7.3. Σχεδιασμός Box-Behnken (Box-Behnken Design, BBD)

Ο σχεδιασμός Box-Behnken παρουσιάζει αξιοσημείωτες στατιστικές ιδιότητες για την βελτιστοποίηση διαδικασιών. Στην πραγματικότητα, είναι ένα περιστρεφόμενο μοντέλο και ορίζεται ως σχεδόν-ορθογωνικό (quasi-orthogonal) (Benedetti et al., 2022). Αυτό σημαίνει ότι η διακύμανση μεταξύ των περισσότερων παραγόντων είναι μηδέν και για τους υπόλοιπους παράγοντες είναι πολύ κοντά στο μηδέν. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.19, τα πειραματικά σημεία αυτού του σχεδιασμού εντοπίζονται στο μέσο κάθε άκρης και στο κέντρο ενός υπερκύβου (Das & Tesfamariam, 2022).



Εικόνα 1.19: Τα πειραματικά σημεία (συμπαγείς κύκλοι) ενός σχεδιασμού Box-Behnken με 3 παράγοντες (Benedetti et al., 2022)

Με αυτήν την κατανομή των πειραματικών σημείων, εξασφαλίζεται ότι όλοι οι παράγοντες δεν ρυθμίζονται ταυτόχρονα στα ακραία τους επίπεδα, δηλαδή στις μέγιστες ή ελάχιστες τιμές (Narendran et al., 2019). Για αυτό τον λόγο, ο σχεδιασμός Box-Behnken καθίσταται ιδιαίτερα χρήσιμος όταν τα όργανα πρέπει να δουλεύουν υπό ορισμένες συνθήκες ασφάλειας και όταν το κόστος λειτουργίας πρέπει να διατηρείται χαμηλό. Επιπλέον, το κόστος της βελτιστοποίησης μπορεί και παραμένει σχετικά χαμηλό γιατί απαιτείται μικρός αριθμός πειραμάτων, ο οποίος οφείλεται στην έλλειψη ενσωματωμένου παραγοντικού σχεδιασμού και στην επιλογή μόλις τριών επιπέδων τιμών. Τα τρία επίπεδα τιμών που επιλέγονται κωδικοποιούνται ως -1, 0, +1 και αντιστοιχούν σε μία ελάχιστη, σε μία μεσαία και σε μία μέγιστη τιμή (Pereira et al., 2021). Στις περιπτώσεις που χρειάζεται να γίνει διερεύνηση των ακραίων συνθηκών πρέπει να χρησιμοποιηθούν άλλα μοντέλα βελτιστοποίησης, όπως είναι ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Rakić et al., 2014). Ο

αριθμός των πειραματικών σημείων ενός σχεδιασμού Box-Behnken δίνεται από την Εξίσωση 1.1:

$$N = 2k(k - 1) + C_0$$

Εξίσωση 1.1: Σχεδιασμός Box-Behnken

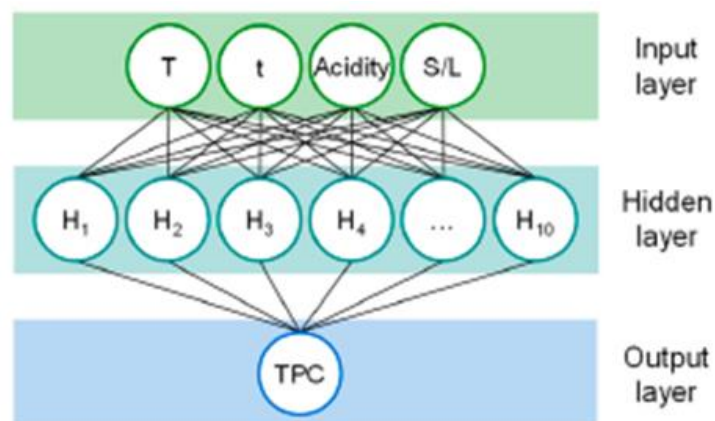
Όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων και C_0 είναι ο αριθμός των κεντρικών σημείων. Στα κεντρικά σημεία, όλοι οι παράγοντες ρυθμίζονται στις μεσαίες τους τιμές προκειμένου να εκτιμηθεί το σφάλμα. Ο Πίνακας 1.6 περιλαμβάνει κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα βελτιστοποίησης των εκχυλίσεων με υπερήχους (UAE) με την βοήθεια του πειραματικού μοντέλου Box-Behnken.

Πίνακας 1.6: Χαρακτηριστικά παραδείγματα μελετών που εφαρμόζουν την εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE) και την βελτιστοποίηση τους με το πειραματικό μοντέλο Box-Behnken

Υπόστρωμα	Εκχυλισμένες ενώσεις	Παράγοντες βελτιστοποίησης	Παραπομπές
<i>Portulaca oleracea</i> L. Μίσχοι και φύλλα	Φλαβονοειδή	Περιεκτικότητα αιθανόλης στο υδατοαιθανολικό διάλυμα εκχύλισης (% v/v), αναλογία διαλύτη υλικού (ml/g), θερμοκρασία εκχύλισης (°C)	(Liu et al., 2023)
<i>Ilex guayusa</i> Loes. (Guayusa) - Φύλλα	Φαινολικά συστατικά	Θερμοκρασία εκχύλισης (°C), χρόνος εκχύλισης (min), περιεκτικότητα αιθανόλης στο υδατοαιθανολικό διάλυμα εκχύλισης (% v/v)	(Arteaga-Crespo et al., 2020)
<i>Thymus broussonnetii</i> Φύλλα	Φαινολικά συστατικά	Ποσοστό προστιθέμενου νερού στους Φυσικούς Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες (% v/v), θερμοκρασία εκχύλισης (°C), χρόνος εκχύλισης (min)	(Kaoui et al., 2021)

1.7.4. Μηχανική μάθηση (Machine learning)

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία διέρχεται μια τέταρτη βιομηχανική επανάσταση, η οποία αναφέρεται και ως "Βιομηχανία 4.0" (Industry 4.0). Κύρια χαρακτηριστικά αυτής της περιόδου είναι η μηχανική μάθηση, η τεχνητή νοημοσύνη, η ροή μεγάλων δεδομένων (big data) και η σύνδεση του εξοπλισμού με τεχνικές που εμπίπτουν στο "διαδίκτυο των πραγμάτων" (Internet of Things, IoT). Η μηχανική μάθηση αναφέρεται σε μια οικογένεια τεχνικών, οι οποίες επιτρέπουν στα προγράμματα υπολογιστών να εκπαιδεύονται σε συγκεκριμένα μοτίβα ή τάσεις από ιστορικά δεδομένα, προκειμένου να εκτελούν σύνθετες εργασίες, όπως πρόβλεψη, ταξινόμηση και ομαδοποίηση (Arboretti et al., 2022). Εκχυλίσεις στις οποίες χρειάζεται να γίνει αξιολόγηση μεγάλου όγκου δεδομένων ή αρκετών παραγόντων, η μηχανική μάθηση φαίνεται ιδιαίτερα χρήσιμη (Freiesleben et al., 2020). Η μηχανική μάθηση μπορεί να χωριστεί σε επιβλεπόμενη μάθηση (supervised learning), μη-επιβλεπόμενη μάθηση (unsupervised learning), σε ημι-επιβλεπόμενη (semi-supervised) και σε ενισχυτική μάθηση (reinforcement learning). Αυτό που έχει περισσότερο εφαρμογή στις εκχυλίσεις είναι τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα που εκπαιδεύονται μέσω της επιβλεπόμενης μάθησης (Arboretti et al., 2022). Τα νευρωνικά δίκτυα έχουν τρία επίπεδα: Τα εσωτερικά, τα μεσαία και τα εξωτερικά (Rebollo-Hernanz et al., 2021). Οι Rebollo-Hernanz et al. μελέτησαν την βελτιστοποίηση της εκχύλισης φαινολικών συστατικών από φλοιούς καφέ με πειραματικό σχεδιασμό και τεχνητά νευρωνικά δίκτυα. Αν και οι δύο τεχνικές έφεραν αξιόπιστα αποτελέσματα, πιο αποδοτικοί και αξιόπιστη φάνηκε να είναι η βελτιστοποίηση με νευρωνικά δίκτυα.



Εικόνα 1.20: Το νευρωνικό δίκτυο για την βελτιστοποίηση των παραγόντων εκχύλισης (θερμοκρασία, χρόνος, οξύτητα, αναλογία στερεού/υγρού) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Rebollo-Hernanz et al., 2021).

Κεφάλαιο 2: Σκοπός της εργασίας

Ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*) είναι ένα αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό που βρίσκεται εφαρμογές σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, αρωμάτων και καλλυντικών. Ο βασιλικός εντοπίζεται ως συστατικό σε προϊόντα τροφίμων, συμπληρώματα και καλλυντικά είτε με την αυτούσια μορφή του φυτού είτε ως εκχύλισμα ή αιθέριο έλαιο. Ένα ευρέως διαδεδομένο προϊόν, στο οποίο χρησιμοποιείται ο πλατύφυλλος βασιλικός, είναι η σάλτσα «Pesto». Το πιο σημαντικό μερίδιο αγοράς καταλαμβάνουν, πρωτίστως, τα αιθέρια έλαια του βασιλικού και στη συνέχεια, τα πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις εκχυλίσματά του. Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται ευρέως ως αρωματικές ύλες και ως συντηρητικά. Τα εκχυλίσματα που περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις, όπως είναι οι φαινολικές ενώσεις, χρησιμοποιούνται σε συμπληρώματα, καλλυντικά και καινοτόμα ή λειτουργικά τρόφιμα με σκοπό να προσδώσουν ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία. Η εκτεταμένη καλλιέργεια του βασιλικού, ιδίως στις Μεσογειακές χώρες, και οι διάφορες επεξεργασίες που υφίσταται το φυτό (πχ. απόσταξη για την παραλαβή αιθέρων ελαίων), παράγουν μια σειρά από παραπροϊόντα που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν με τρόπο φιλικό προς το περιβάλλον και κερδοφόρο για την επιχείρηση, με τη δημιουργία νέων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ειδικά, η απόσταξη των αιθέρων ελαίων παράγει στερεά και υγρά παραπροϊόντα που είναι πλούσια σε πολυφαινόλες. Προς αυτή την κατεύθυνση, οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι:

- Η παραλαβή εκχυλισμάτων από παραπροϊόντα υδροαπόσταξης αιθέρων ελαίων δύο ειδών βασιλικού (Σγουρός ή *Ocimum basilicum* var. *Minimum* & Πλατύφυλλος ή *Ocimum basilicum* var. *Genovese*)
- Η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης με υπερήχους, χρησιμοποιώντας τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken
- Η εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων από δρόγες και παραπροϊόντα βασιλικού
- Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης των εκχυλισμάτων
- Η αξιολόγηση του φυτοχημικού προφίλ επιλεγμένων εκχυλισμάτων μέσω της χρήσης υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)

- Η συσχέτιση των συνθηκών εκχύλισης με τις in vitro δράσεις και το φυτοχημικό προφίλ των εκχυλισμάτων.

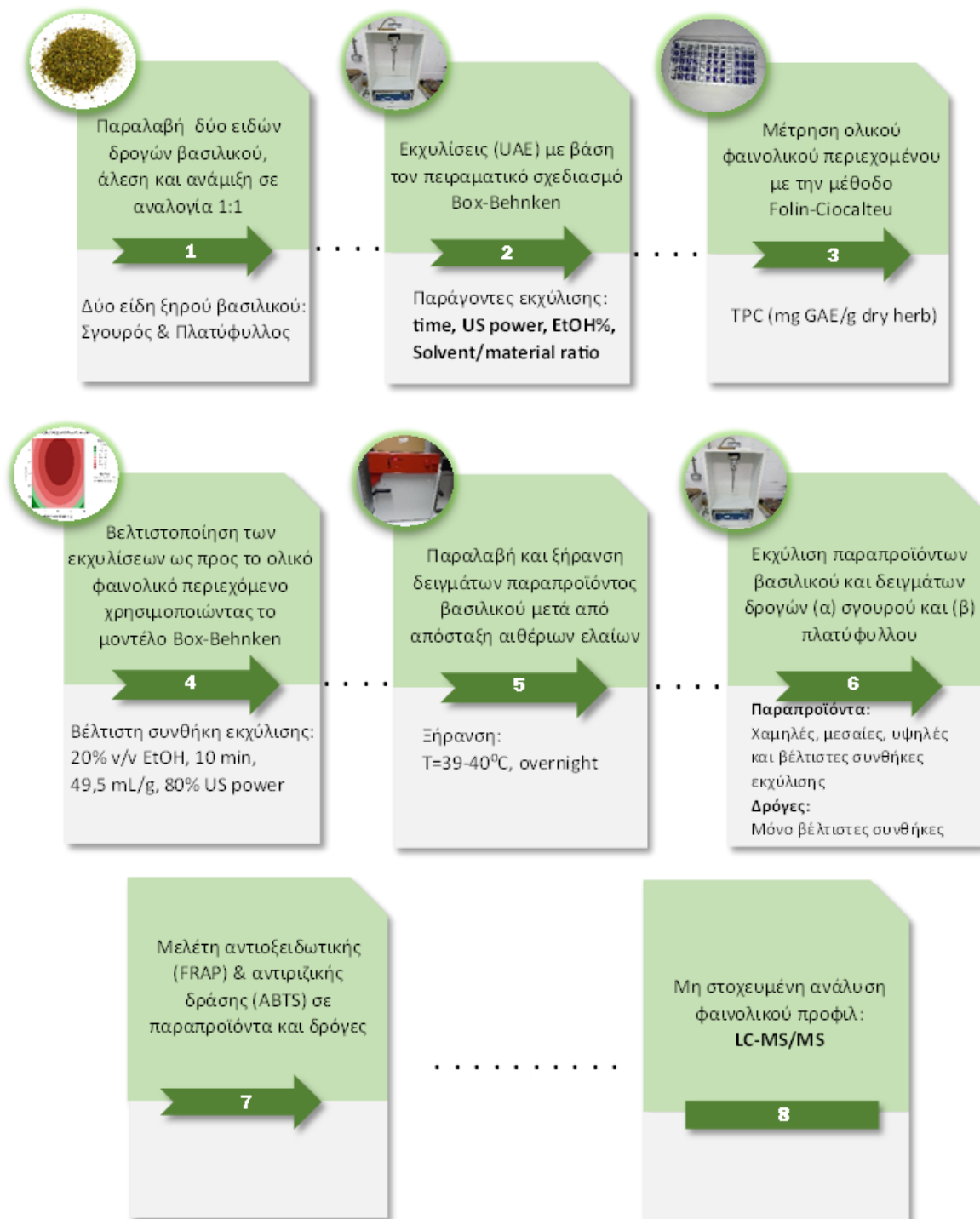
Η εκχύλιση με υπερήχους (ultrasound-assisted extraction, UAE), η οποία κατατάσσεται στις μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης ή στις τεχνικές εκχύλισης υψηλών ενεργειών, απαιτεί μικρότερο χρόνο και μικρότερη κατανάλωση διαλυτών σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, όπως η εκχύλιση στερεού-υγρού υπό ανάδευση και η μέθοδος Soxhlet. Τα υπό εξέταση δείγματα ήταν ομογενοποιημένος ξηρός βασιλικός (δρόγες βασιλικού) και στερεά παραπροϊόντα υδροαπόσταξης αιθέριων ελαίων από το φυτό.

Η βελτιστοποίηση της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken, λαμβάνοντας ως απόκριση το ολικό φαινολικό περιεχόμενο που προσδιορίστηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu. Οι προς βελτιστοποίηση παράγοντες ήταν ο χρόνος εκχύλισης (min), το ποσοστό αιθανόλης (% v/v) στο υδατοαιθανολικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης εκχύλισης, το ποσοστό της εφαρμοζόμενης έντασης των υπερήχων (% επί της μέγιστης ονομαστικής έντασης του οργάνου υπερήχων) και η αναλογία διαλύτη-υλικού (mL/g). Η αξιολόγηση του φυτοχημικού προφίλ επιλεγμένων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS), με σκοπό την ταυτοποίηση των βιοδραστικών ενώσεών τους και την αξιολόγηση της επίδρασης των συνθηκών εκχύλισης στο προφίλ τους. Επιπλέον, το φυτοχημικό προφίλ των εκχυλισμάτων συσχετίστηκε με την αντιοξειδωτική και αντιριζική τους δράση, οι οποίες προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους FRAP και ABTS^{•+}, αντίστοιχα.

Καθώς είναι γνωστό πως τα παραπροϊόντα βασιλικού διαθέτουν πλούσιο φαινολικό περιεχόμενο και έχουν την δυνατότητα να προσδώσουν προστιθέμενη αξία σε προϊόντα διατροφής, συμπληρώματα, καλλυντικά και φάρμακα, η εφαρμογή των νέων τεχνικών εκχύλισης σε συνδυασμό με νέες τεχνολογίες, όπως η (νανο)ενθουλάκωση, η μεταφορά τους από το εργαστήριο σε μεγάλη κλίμακα και η εντατικοποίησή τους αποτελούν μελλοντικούς στόχους της παρούσας έρευνας. Τέλος, η βιωσιμότητα θα πρέπει να βρίσκεται στο επίκεντρο όλων των διαδικασιών και βελτιστοποιήσεων των επόμενων ετών.

Κεφάλαιο 3: Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας



Εικόνα 3.1: Διάγραμμα ροής πειραματικής πορείας

Τα δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εργασία, προέρχονται από δρόγη και παραπροϊόντα βασιλικού που παραχωρήθηκαν ευγενικά από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Έπειτα, τα παραπροϊόντα υπέστησαν ξήρανση σε φούρνο του εργαστηρίου Γάλατος του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η άλεση του υλικού, η ζύγιση των δειγμάτων, οι εκχυλίσεις, οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι υπολογισμού φαινολικού περιεχομένου Folin-Ciocalteu, αναγωγικής ισχύος /αντιοξειδωτικής δράσης FRAP, της ικανότητας δέσμευσης / ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας με τη ABTS^{•+}, εκπονήθηκαν στο εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του τμήματος. Στην Εικόνα 3.1, παρουσιάζεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε στο πείραμα.

3.2. Προετοιμασία δείγματος

Τα παραπροϊόντα και οι δρόγες βασιλικού προέρχονται από δύο είδη, τον πλατύφυλλο (*Ocimum basilicum* var. *Genovese*) και τον σγουρό βασιλικό (*Ocimum basilicum* var. *Minimum*). Τα ξηρά τμήματα του φυτού αποτελούνται κυρίως από φύλλα και μίσχους. Μετά την άφιξη τους στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, οι δρόγες βασιλικού υπέστησαν άλεση έτσι ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής τους. Τα παραπροϊόντα βασιλικού προέκυψαν ύστερα από υδροαπόσταξη αιθέριων ελαίων που πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αυτά τα υποστρώματα λήφθηκαν κατά παρτίδες και αφορούσαν τους μήνες Σεπτέμβρη και Οκτώβρη του 2022. Τα παραπροϊόντα που μελετήθηκαν, ήταν στερεά και βρίσκονταν σε νωπή μορφή. Προκειμένου να απομακρυνθεί η υγρασία και καταστούν πιο σταθερά, τα νωπά δείγματα υπέστησαν ξήρανση σε φούρνο που λειτούργησε σε θερμοκρασίες 39 - 40 °C και για διάστημα μιας νύχτας. Επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος συνδυασμός θερμοκρασίας – χρόνου, γιατί τα φαινολικά συστατικά είναι θερμοευαίσθητα. Υψηλότερες θερμικές επεξεργασίες θα μπορούσαν να καταστρέψουν ή να μειώσουν τον ολικό φαινολικό περιεχόμενο και να οδηγήσουν σε μη αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα. Μετά την ξήρανση, ακολούθησε η άλεση των ξηρών παραπροϊόντων και η αποθήκευσή τους. Τα δείγματα του φυτού και των παραπροϊόντων βασιλικού αποθηκεύτηκαν αεροστεγώς σε θερμοκρασία 4°C, μέχρι την επόμενη χρήση τους.

3.3. Εκχύλιση φαινολικών συστατικών με υπερήχους

Η εκχύλιση με υπερήχους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός αισθητήρα υπερήχων Sonopuls HD 4400 (Bandelin, Sonoplus, Berlin, Germany). Η πορεία των εκχυλίσεων άρχισε με την ζύγιση 0,5 g δείγματος φυτού ή παραπροϊόντος βασιλικού. Τα δείγματα του φυτού τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάκια τύπου «Falcon» και διαλύθηκαν σε διαφορετικά ποσοστά αιθανόλης όπως τα όριζε ο πειραματικός σχεδιασμός. Στη συνέχεια και σύμφωνα με το μοντέλο Box – Behnken πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με υπερήχους για διαφορετικούς χρόνους και με διαφορετικά ποσοστά ενέργειας υπερήχων. Με την βοήθεια ενός παγόλουτρου, η θερμοκρασία εκχύλισης διατηρήθηκε σχετικά σταθερή στους 26 °C. Η μέτρηση της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκε με την χρήση θερμοστοιχείου. Προκειμένου να παραληφθούν καθαρά εκχυλίσματα, αυτά φυγοκεντρήθηκαν στις 3500 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά. Αφού έγινε η φυγοκέντρηση, ανακτήθηκε το υπερκείμενο και φυλάχθηκε στους -18 °C μέχρι την επόμενη ανάλυση. Στην Εικόνα 3.2 φαίνεται το σύστημα της εκχύλισης με τον παγόλουτρο (a απεικόνιση) και το θερμοστοιχείο (b απεικόνιση).



Εικόνα 3.2: (a) Η οργανολογία για την εκχύλιση με υπερήχους (UAE) και (b) το θερμοστοιχείο για την καταγραφή της θερμοκρασίας εκχύλισης.

3.4. Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken σε δείγματα βασιλικού

Η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης επιτεύχθηκε εφαρμόζοντας μια μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης σε υποστρώματα δρόγης βασιλικού. Πιο συγκεκριμένα, η εύρεση βέλτιστων παραμέτρων για την παραλαβή φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με τον πειραματικό σχεδιασμό Box – Behnken και το λογισμικό Minitab (Minitab, LLC, PA, USA). Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει 4 παράγοντες με 3 επίπεδα τιμών. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.1, τα πραγματικά επίπεδα τιμών έχουν κωδικοποιηθεί και καταταχθεί ως χαμηλό (-1), μεσαίο (0) και υψηλό (+1). Δίνοντας κωδικοποιημένες τιμές στους παράγοντες, κανονικοποιείται όποια διαφορά ή απόκλιση που μπορεί να υπάρξει λόγω διαφορετικών μονάδων μέτρησης. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές που επιλέχθηκαν να μελετηθούν είναι το ποσοστό αιθανόλης (% v/v) (20 – 100% v/v), ο χρόνος εκχύλισης (10 – 40 min), η αναλογία διαλύτη-υλικού (20 – 60 mL/g) και το ποσοστό ενέργειας υπερήχων (20 – 80%). Η εξαρτημένη μεταβλητή του πειραματικού σχεδιασμού ήταν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, το οποίο εκφράστηκε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg GAE/g dry herb). Το μοντέλο Box – Behnken προέβλεψε 27 πειράματα με 3 κεντρικά σημεία (center points). Σε 3 εκχυλίσεις, όλοι οι παράγοντες παρέμειναν σταθεροί στα μεσαία επίπεδα τιμών για να ελεγχθεί αν το σύστημα λειτουργεί επαναλήψιμα και αναπαραγωγίμα. Επιπλέον, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τυχαιοποιημένη σειρά προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση τυχόν συστηματικών σφαλμάτων. Οι 27 εκχυλίσεις, οι οποίες ορίστηκαν από τον πειραματικό σχεδιασμό, πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα δρόγης και όχι παραπροϊόντων. Αξιοποιήθηκε αποκλειστικά η δρόγη γιατί αυτή βρισκόταν σε μεγαλύτερες διαθέσιμες ποσότητες. Προκειμένου να ληφθούν αντιπροσωπευτικά δείγματα δρόγης βασιλικού για την κατασκευή του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού, τα προτεινόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα που προήλθαν από ανάμιξη ίσων μαζών δρόγης πλατύφυλλου και δρόγης σγουρού βασιλικού (pooled samples). Οι μέσες τιμές του ολικού φαινολικού περιεχομένου των 27 πειραμάτων προσαρμόστηκαν σε ένα πολυωνυμικό μοντέλο δεύτερης τάξης ως εξής:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{33} X_{32} + \beta_{44} X_{42} + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4$$

Πίνακας 3.1:Κωδικοποιημένες και πραγματικές τιμές των παραγόντων βελτιστοποίησης της εκχύλισης

Ανεξάρτητες μεταβλητές	Σύμβολα	Κωδικοποιημένες τιμές		
		-1	0	+1
		Πραγματικές τιμές		
Συγκέντρωση αιθανόλης στο υδατοαιθανολικό διαλύτη εκχύλισης (% v/v/)	A	20	60	100
Χρόνος εκχύλισης (min)	B	10	25	40
Αναλογία διαλύτη – υλικού (mL/g)	C	20	40	60
Ένταση υπερήχων (%)	D	20	50	80

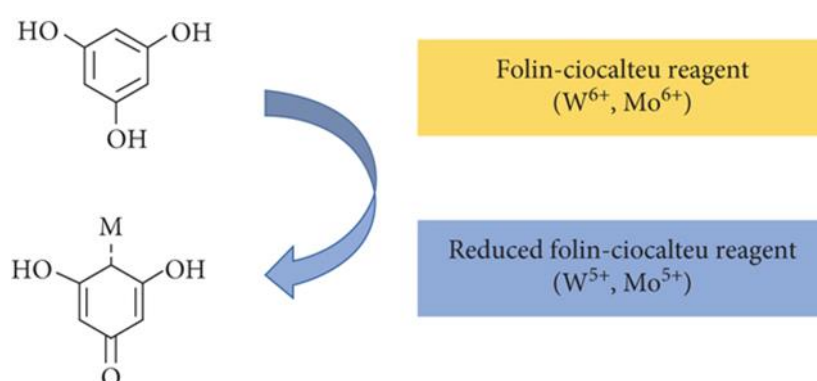
3.5. Φασματοφωτομετρικές δοκιμές

Τα παραπροϊόντα της απόσταξης βασιλικού και γενικά αρωματικών φυτών, εν δυνάμει χαρακτηρίζονται ως προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, λόγω των ευεργετικών βιολογικών ιδιοτήτων τους και ταυτόχρονα του μικρού τους κόστους. Συνεπώς, η παραλαβή βιοδραστικών μορίων, όπως οι φαινολικές ενώσεις, που είναι από τις κυριότερες κατηγορίες φυτοχημικών, οδηγούν σε ένα νέο τρόπο εκμετάλλευσής τους. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον, για τη μελέτη των φαινολικών ενώσεων αποδίδεται στο γεγονός ότι η εκτίμησή τους δίνει μια πρώτη χαρακτηριστική εικόνα για το εύρος του φάσματος του βιολογικού τους δυναμικού. Η ποσοτικοποίηση του φαινολικού περιεχομένου (TPC) επηρεάζει και συμβάλει στον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής, αντιριζικής και αντιμικροβιακής ισχύος των εκχυλισμάτων. Η αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζουν, δεν πρέπει να συγχέεται με την αντιριζική ικανότητά τους. Η έντονη αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή η αναστολή της οξείδωσης, δεν είναι απαραίτητα αλληλένδετη με την αντιριζική δράση, δηλαδή την αντίδραση με μια συγκεκριμένη ρίζα ώστε να δεσμευτεί και να εξουδετερωθεί (Chrysargyris et al., 2020). Όμως, και οι δύο δράσεις μπορούν να συσχετιστούν ισχυρά με την υψηλή περιεκτικότητα των μελετούμενων δειγμάτων σε φαινολικές ενώσεις (TPC)(Mahmoudi et al., 2020). Έτσι, μελετήθηκε για τους σκοπούς της εργασίας, η ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά (TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, η αντιοξειδωτική ικανότητα – αναγωγική ισχύς μείωσης του σιδήρου του Fe^{3+} σε Fe^{2+} με τη μέθοδο FRAP και η ικανότητα δέσμευσης –ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας $ABTS^{\bullet+}$.

3.5.1. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αρχή μεθόδου

Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (total phenolic content, TPC) προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu (F-C). Με αυτή τη μέθοδο, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να ποσοτικοποιηθούν στο σύνολο τους και παράγοντες όπως το είδος του δείγματος που αναλύεται, οι ιδιότητες του διαλύτη (π.χ πολικότητα) καθώς και οι συνθήκες εκχύλισης είναι καθοριστικοί. Το αλκαλικό βέλτιστο pH (≈ 10), ρυθμίζεται με ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3), ώστε να αντιδράσουν οι φαινολικές ενώσεις με το αντιδραστήριο F-C. Οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται και το αντιδραστήριο ανάγεται προς οξειδία που έχουν το χαρακτηριστικό έντονο κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου. Η χρωματική αλλαγή η οποία παρατηρείται, είναι από το αρχικό ανοιχτό κίτρινο σε έντονο κυανό (Εικόνα 3.3). Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του φαινολικού περιεχομένου.



Εικόνα 3.3: Αλλαγή χρώματος στην αντίδραση Folin-Ciocalteu

Πειραματική πορεία

Αρχικά, σε πλαστικές κυψελίδες των 4,0 ml, τοποθετείται η προκαθορισμένη ποσότητα του δείγματος (10 - 200 μL) με αυτόματη πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου, μαζί με 2500,0 μL απεσταγμένου H_2O και 200,0 μL αντιδραστηρίου F-C. Μετά από έντονη ανάδευση με vortex και φύλαξη σε σκοτεινό μέρος για 8 min, προστίθενται 500,0 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 και υποβάλλεται ξανά σε ανάδευση. Έπειτα, για την επιτάχυνση της αντίδρασης και τον πιο γρήγορο σχηματισμό κυανού χρωματισμού, τοποθετείται σε υδατόλουτρο για

30 min με σταθερή θερμοκρασία 40° C σε συνθήκες σκότους. Μόλις αναπτυχθεί το επιθυμητό κυανό χρώμα και οι κυψελίδες αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος, πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης (A_{750}) στα $\lambda=750\text{nm}$, σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis Spectro 23 της Labomed Incorporation (Los Angeles, USA) για κάθε δείγμα. Παράλληλα, για την διόρθωση των σφαλμάτων που προκύπτουν λόγω των αντιδραστηρίων που συνυπάρχουν και ενδέχεται να έχουν κάποια ελάχιστη απορρόφηση, κατασκευάζεται “τυφλό” δείγμα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε δείγμα.

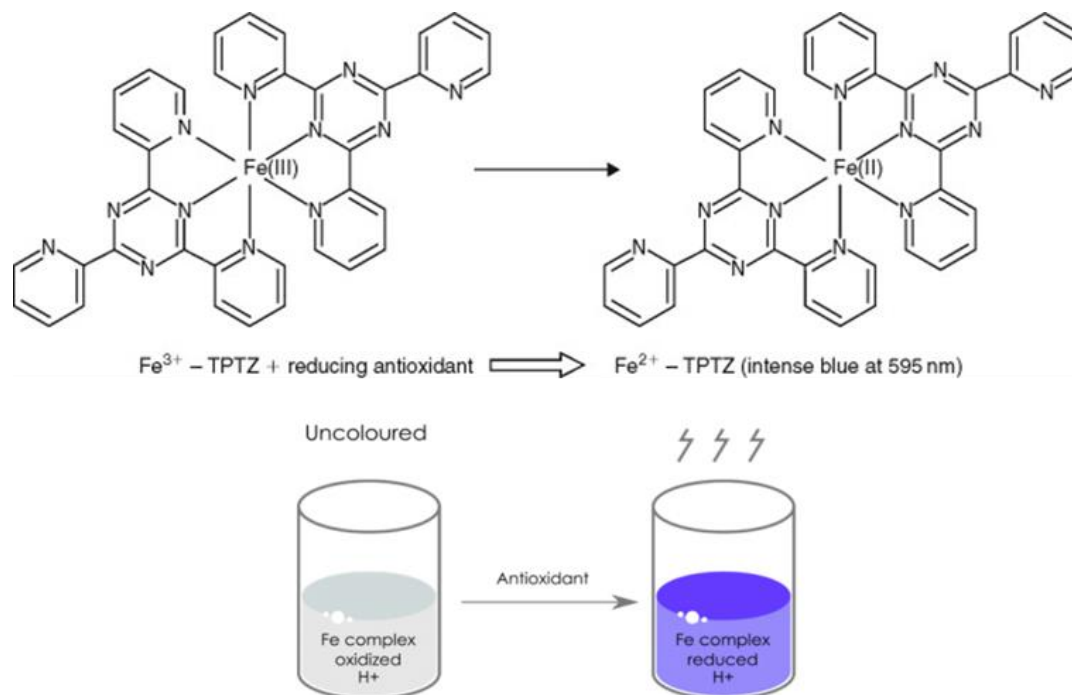
Έκφραση Αποτελέσματος

Η έκφραση της περιεκτικότητας των ολικών φαινολικών κάθε δείγματος, υπολογίζονται από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ($y=0,0005x+0,0783$, όπου y η απορρόφηση του διαλύματος και x η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στο δείγμα) μεταξύ της απορρόφησης και της συγκέντρωσης (mg/L) πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος και εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά γραμμάριο (g) δείγματος ξηρού βασιλικού (mg GAE/g dry basil). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

3.5.2. Προσδιορισμός αναγωγικής ισχύος/αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή FRAP

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) αποτελεί μια φασματοφωτομετρική μέθοδο, ταχεία, άμεση, χαμηλού κόστους με αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Υπολογίζει την ολική αντιοξειδωτική δύναμη (αναγωγική ικανότητα) του δείγματος (Svečnjak et al., 2020). Ουσιαστικά, προσδιορίζεται η δυνατότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να ανάγουν το άχρωμο σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη (Fe^{3+} -TPTZ) σε δισθενή σίδηρο (Fe^{2+} -TPTZ) με έντονο μπλε-μωβ χρώμα. Το περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση, είναι όξινο ($\text{pH}= 3,6$) ώστε να διευκολύνεται η διαλυτοποίηση του σιδήρου, με θερμοκρασία 37 °C και η τελική απορρόφηση του δείγματος μετράται στα 595nm (Wojtunik-Kulesza, 2020).



Εικόνα 3.4: Αναγωγή του άχρωμο συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη (Fe^{3+} -TPTZ) σε δισθενή σίδηρο (Fe^{2+} -TPTZ) με έντονο μπλε-μωβ χρώμα.

Πειραματική πορεία

Ως οξειδωτικό μέσο χρησιμοποιείται το άλας του τρισθενούς σιδήρου $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$ και η μέθοδος λαμβάνει χώρα σε όξινες συνθήκες, $pH = 3,6$, με την επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος ($CH_3COOH-CH_3COONa$). Σε πλαστικές κυψελίδες των 4,0 ml τοποθετείται καθορισμένη ποσότητα δείγματος (10-500 μ L), σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιείται αραιώση του αρχικού δείγματος, ώστε η απορρόφηση που δίνουν να είναι εντός του εύρους απορροφήσεων με βάση τις οποίες έχει κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς. Ακόμα, προστίθεται 1950 ή 1500 μ L απεσταγμένο H_2O (ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος), 900 μ L διαλύματος "FRAP" (το οποίο παρασκευάζεται με την ανάμειξη 200ml ρυθμιστικού διαλύματος με 20ml διαλύματος $FeCl_3 \times 6 H_2O$ συγκέντρωσης 20mM και 20ml διαλύματος 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη "TPTZ" 10mM) και 500 μ L ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια, αναδεύεται το δείγμα με vortex και αφήνεται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 40° C για 90 min και έπειτα μετράται φασμαφωτομετρικά σε απορρόφηση 595nm. Για την αποφυγή θετικών σφαλμάτων, κατασκευάζεται "τυφλό" δείγμα. Η διαδικασία μετρήσεων επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε δείγμα.

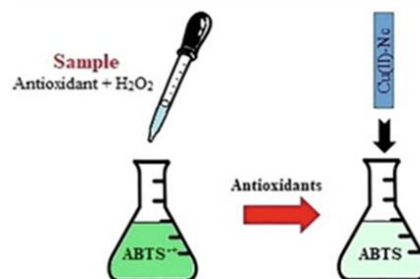
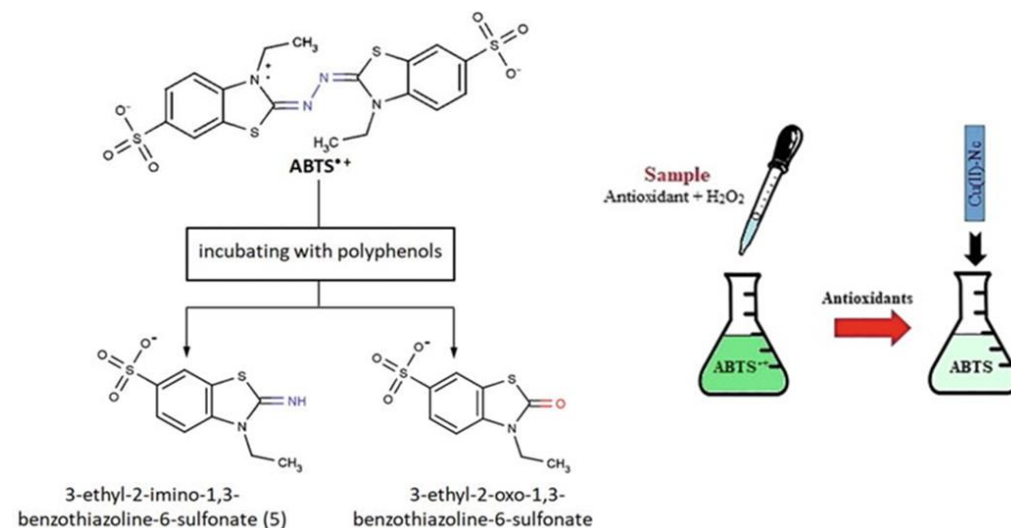
Έκφραση Αποτελέσματος

Μέσω της σύγκρισης των τιμών της απορρόφησης A_{595nm} της πρότυπης καμπύλης αναφοράς ($y=0,0003x+0,0081$, $R^2=0,9996$, όπου y η απορρόφηση του διαλύματος και x η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στο δείγμα) και των δειγμάτων ποσοτικοποιείται ο Fe^{2+} που εντοπίζεται στα δείγματα. Ο Fe^{2+} είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης του συμπλόκου Fe^{3+} με τα αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στο δείγμα και συνεπώς η αντιοξειδωτική ισχύς εκφράζεται με την ποσοτικοποίηση του Fe^{2+} . Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως η ποσότητα του τρισθενούς σιδήρου που ανήχθη σε δισθενή από τις αντιοξειδωτικές ενώσεις ανά γραμμάριο (g) του δείγματος ($mg Fe^{2+}/g$).

3.5.3. Εκτίμηση ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας $ABTS^{\bullet+}$

Αρχή μεθόδου

Η χρήση της μονοκατιοντικής ρίζας 2,2'-αζινο-δις(3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) "ABTS^{•+}" εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της αντιριζικής δράσης λιπόφιλων και υδρόφιλων συστατικών. Είναι μια ταχεία και απλή μέθοδος, η οποία εφαρμόζεται σε ευρεία κλίμακα στα φυτικά εκχυλίσματα. Εκτιμάται, η αντιριζική ισχύς διαφόρων ουσιών συμπεριλαμβανομένων και των φαινολικών. Η μέθοδος, βασίζεται σε μια αντίδραση αποχρωματισμού. Αρχικά, η ρίζα διαθέτει μπλε-πράσινο χρώμα με μέγιστη απορρόφηση στα 734nm. Με την ύπαρξη μορίων που είναι δότες υδρογόνου, η ρίζα ABTS^{•+} μειώνεται ποσοτικά ανάλογα με τη δραστικότητα του δότη H^+ , τη συγκέντρωση και τη διάρκεια της αντίδρασης.



Εικόνα 3.5: Η αντίδραση αποχρωματισμού κατά την δέσμευση της ρίζας $ABTS^{\bullet+}$

Πειραματική πορεία

Αρχικά, το διάλυμα της ρίζας αραιώνεται με αιθανόλη ώστε να δώσει τιμή απορρόφησης $A_{734nm} \approx 1$. Σε πλαστικές κυψελίδες των 4,0 ml, εισάγεται ο κατάλληλος όγκος των δειγμάτων, ορισμένα τοποθετήθηκαν αραιωμένα σε αναλογία 1:4, ώστε η απορρόφηση που δίνουν να είναι εντός των ορίων που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς. Έπειτα, προστίθεται το αραιωμένο διάλυμα ABTS^{•+} και αναδεύεται σε συνθήκες σκότους με vortex για 1 min. Μετά από 8 min και εντός 5 min μετράται η απορρόφηση σε A_{734nm} . Η διαδικασία πραγματοποιείται εις τριπλούν.

Έκφραση Αποτελέσματος

Η δοκιμή ABTS^{•+} προσδιορίζει την ικανότητα του δείγματος στο να δεσμεύει τη συγκεκριμένη ρίζα, η οποία εκφράζεται ως συγκέντρωση αυτών σε ισοδύναμα της πρότυπης ουσίας Trolox (TE, Trolox Equivalents) δηλαδή (mg TE/g), μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς ($y=0,2876x-0,002$, $R^2=0,9995$ όπου y η απορρόφηση του διαλύματος και x η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στο δείγμα).

3.6. Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) για την ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων επεξεργασίας βασιλικού.

Για την ποιοτική και συγκριτική αξιολόγηση του φυτοχημικού προφίλ και την ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών που εμπεριέχονται στα εκχυλίσματα των παραπροϊόντων βασιλικού με τελικό σκοπό την επαναξιολόγηση και επαναχρησιμοποίησή τους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος LC-MS/MS. Η μη στοχευμένη προσέγγιση επιλέχθηκε, διότι επιδιώκεται η ταυτοποίηση όσο το δυνατό περισσότερων μεταβολιτών στα υπό μελέτη δείγματα, ώστε να συσχετιστούν με συγκεκριμένες συνθήκες εκχύλισης και με συγκεκριμένες δράσεις των εκχυλισμάτων.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση, λήφθηκε 1ml εκχυλίσματος και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση υπό κενό (speed vaccum) για την απομάκρυνση του διαλύτη, δηλαδή της αιθανόλης. Το ξηρό υπόλειμμα που απέμεινε ζυγίστηκε και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 500 και 700 μ l μεθανόλης. Με κατάλληλο όγκο μεθανόλης-FA 0,1% v/v, επαναδιαλυτοποιήθηκαν τα ξηρά υπολείμματα των μελετούμενων δειγμάτων και φιλτραρίστηκαν μέσω ειδικών φίλτρων πολυεστέρα (PET), διαμέτρου 13 mm

και μεγέθους πόρων μεμβράνης 0,45 μm , λίγο πριν εισαχθούν στο σύστημα LC-MS/MS. Όλοι οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες ήταν βαθμού καθαρότητας LC-MS (Kritsi et al., 2023).

Μέσω της στήλης αντίστροφης φάσης Agilent Eclipse Plus C-18 (με εσωτερική διάμετρο 50 mm x 2,1 mm και μέγεθος σωματιδίων 3,5 μm), επιτεύχθη ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων. Το διάλυμα νερού– 0,2% (v/v) φορμικού οξέος (φορμικό οξύ, FA) αποτελεί το “διαλύτη Α” και το διάλυμα ακετονιτρίλιου – 0,1% (v/v) φορμικού οξέος αποτελεί το “διαλύτη Β” σχηματίζοντας μαζί την κινητή φάση του συστήματος. Ο αρχικός ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ και το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης ήταν αρχικά 10% Β, γραμμική βαθμίδωση 10-20% Β σε 0,5 min και γραμμική βαθμίδωση 20-30% Β στα 4 min. Παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού ροής στα 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ και συνεχίστηκε η βαθμίδωση γραμμικά με 30-50% Β στα 4,1 min, παρέμεινε σταθερή για 0,40 min, ξαναέγινε γραμμική 50-65% Β στα 5,10 min και συνέχισε να αυξάνεται γραμμικά 65-100% Β στα 7 min. Η σύσταση της κινητής φάσης, διατηρήθηκε σταθερή στα 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ για 1 min, έπειτα πάλι σημειώθηκε μείωση του ρυθμού ροής στα 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 100% Β για 1 min, μειώθηκε περαιτέρω γραμμικά από 100%-10% Β στα 9,10 min και τελικά έγινε επανεξισορρόπηση της στήλης, σταθερά στα 10 % Β από 9,10 min έως 15 min. Ο ενέσιμος όγκος των δειγμάτων ήταν 5 μL και εντός της στήλης η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 25 °C.

Αναφορικά με τη φασματομετρία μάζας, χρησιμοποιήθηκε πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), με αρνητικό ιοντισμό για όλες τις υπό προσδιορισμό ουσίες και πραγματοποιήθηκε σάρωση θυγατρικού ιόντος (product ion scan) σε λειτουργία πολλαπλών μεταπτώσεων (multiple monitoring reaction, MRM). Εκτελώντας σάρωση των ιόντων με information dependent acquisition (IDA)-triggered MS/MS πειράματα, επιτεύχθηκε η μέγιστη δυνατή θραυσματοποίηση και η ταυτοποίηση βιοδραστικών ενώσεων μέσα από τα εκχυλίσματα με βάση φάσματα μάζας και βιβλιογραφικών δεδομένων (Kritsi et al., 2023). Για την διαδικασία ανάλυσης, το εύρος ήταν 5 ppm για κάθε m/z . Τέλος, οι πιο ευνοϊκές συνθήκες για τον ιοντισμό και τη θραυσματοποίηση (MS/MS) των ενώσεων σε IDA συνθήκες, παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Εικόνα 3.6: Συνθήκες για IDA πειράματα.

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

3.7. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού αναλύθηκαν στατιστικά με τη χρήση του λογισμικού Minitab (Minitab Statistical Software Inc. Version 21). Όλες οι πειραματικές μετρήσεις, διεξήχθησαν εις τριπλούν για να καταγραφούν οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation) τους. Τα αποτελέσματα του ολικού φαινολικού περιεχομένου, της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης αναλύθηκαν και ομαδοποιήθηκαν με τη χρήση της μονόδρομης ανάλυσης διακύμανσης ANOVA (One way και Tuckey test) εφαρμόζοντας επίπεδο εμπιστοσύνης 95% (τιμές $p\text{-value} \leq 0,05$), υποδεικνύοντας ότι μία μεταβλητή καθίσταται στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ομαδοποίηση των τιμών που λήφθηκαν από τις μετρήσεις των φασματοφωτομετρικών μεθόδων, πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Statistica (trial version 14.0.1, TIBCO Software Inc., USA). Τέλος, η αξιολόγηση των συσχετίσεων των μεθόδων για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου, της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης έγινε με τον συντελεστή της συσχέτισης Pearson (Pearson's Correlation Coefficient) χρησιμοποιώντας το λογισμικό Minitab (Minitab Statistical Software Inc. Version 21).

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1. Προσαρμογή του πειραματικού μοντέλου Box-Behnken

Οι συνθήκες εκχύλισης των 27 τυχαιοποιημένων πειραμάτων που προτάθηκαν από τον πειραματικό σχεδιασμό, καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου παρουσιάζονται στον Πίνακας 4.1.

Πίνακας 4.1: Τα 27 τυχαιοποιημένα πειράματα του μοντέλου Box-Behnken και τα αποτελέσματα του ολικού φαινολικού περιεχομένου για δείγματα ξηρού βασιλικού (δρόγες).

Αριθμός δοκιμής StdOrder	Συγκέντρωση αιθανόλης %	Χρόνος εκχύλισης (min)	Αναλογία διαλύτη-υλικού (mL/g)	Ένταση υπερήχων %	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg GAE/g dry basil) (\pm stdev), n= 3 ¹
18	100	25	20	50	1.62 \pm 0.16
16	60	40	60	50	13.8 \pm 3.0
15	60	10	60	50	12.0 \pm 3.3
11 ²	20	25	40	80	20.10 \pm 0.64
12	100	25	40	80	1.137 \pm 0.047
17	20	25	20	50	14.40 \pm 0.49
2	100	10	40	50	0.63 \pm 0.11
27	60	25	40	50	10.4 \pm 2.3
21	60	10	40	20	5.2 \pm 5.8
20 ⁴	100	25	60	50	0.19 \pm 0.11
26	60	25	40	50	19.1 \pm 1.2
1	20	10	40	50	15.86 \pm 0.47
24	60	40	40	80	4.6 \pm 2.0
10	100	25	40	20	0.72 \pm 0.45
7	60	25	20	80	8.9 \pm 5.1
13	60	10	20	50	2.06 \pm 0.51
8	60	25	60	80	8.6 \pm 7.0
9	20	25	40	20	13.41 \pm 0.90
22	60	40	40	20	16.657 \pm 0.095
25 ³	60	25	40	50	9.8 \pm 1.2
23	60	10	40	80	17.7 \pm 1.6
3	20	40	40	50	16.7 \pm 2.0
14	60	40	20	50	13.3 \pm 3.2
4	100	40	40	50	0.849 \pm 0.096
5	60	25	20	20	7.26 \pm 0.40
19	20	25	60	50	14.5 \pm 8.7
6	60	25	60	20	2.8 \pm 2.9

¹ Ο αριθμός των επαναλήψεων

² Πείραμα με το υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο

³ Πείραμα με το μεσαίο ολικό φαινολικό περιεχόμενο

⁴ Πείραμα με το χαμηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.1, οι τιμές του ολικού φαινολικού περιεχομένου κυμαίνονται στο εύρος 0.19-20.10 mg GAE/g dry basil και η μεσαία τιμή είναι ίση με 9.8 ± 1.2 mg GAE/g dry basil. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (20.10 ± 0.64 mg GAE/g dry basil) εντοπίζεται στο πείραμα 11, με συνθήκες εκχύλισης: 20% συγκέντρωση αιθανόλης, 25 min χρόνος εκχύλισης, 40 mL/g διαλύτη-υλικού και 80% ένταση υπερήχων. Αντίθετα, η χαμηλότερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (0.19 ± 0.11) εντοπίζεται στο πείραμα 20, με συνθήκες εκχύλισης: 100% συγκέντρωση αιθανόλης, 25 min χρόνος εκχύλισης, 60 mL/g διαλύτη-υλικού και 50% ένταση υπερήχων. Η μεσαία συγκέντρωση φαινολικών (9.8 ± 1.2 mg GAE/g dry basil) εντοπίζεται στο πείραμα 25, με συνθήκες εκχύλισης: 60% συγκέντρωση αιθανόλης, 25 λεπτά χρόνος εκχύλισης, 40 mL/g αναλογία διαλύτη-υλικού και 50% ένταση υπερήχων. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι το υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο συνδέεται με την χαμηλή συγκέντρωση αιθανόλης, ενώ το χαμηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο συνδέεται με την υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, καθώς στα πειράματα που χρησιμοποιείται ως διαλύτης εκχύλισης αποκλειστικά η αιθανόλη παρατηρείται ότι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο δεν ξεπερνάει την τιμή 1.62 ± 0.16 mg GAE/g dry basil.

Πίνακας 4.2: Τα 3 κεντρικά σημεία (center points) του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken.

Αριθμός δοκιμής (StdOrder)	Αρχική θερμοκρασία εκχύλισης (°C)	Τελική θερμοκρασία εκχύλισης(°C)	Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο (mg GAE/g dry basil))	Μέσος όρος ολικού φαινολικού περιεχομένου \pm τυπική απόκλιση (mg GAE/g dry basil))
27	25,6	7,3	10,4	13,1 \pm 5,2
26	20,4	30,2	19,1	
25	21,7	16,8	9,8	

Τα κεντρικά σημεία ενός πειραματικού σχεδιασμού λειτουργούν ως δείκτες της επαναληψιμότητας, της αναπαραγωγιμότητας και της αξιοπιστίας του μοντέλου πρόβλεψης. Η επαναληψιμότητα ή/και η αναπαραγωγιμότητα μπορεί να αξιολογηθεί μέσα από την σύγκριση του μεγέθους του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης. Στην παρούσα έρευνα, ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken περιλαμβάνει 3 κεντρικά σημεία, τα οποία παρουσιάζουν μέσο όρο 13,1 mg GAE/g dry basil και τυπική απόκλιση 5,2 mg GAE/g dry basil (Πίνακας 4.2.) Η τυπική απόκλιση παρουσιάζεται υψηλή σε σχέση με την τιμή του

μέσου όρου και έτσι η μέθοδος φαίνεται να μην είναι ιδιαίτερα αναπαραγωγίμη. Από τον Πίνακα 4.2 παρατηρείται ότι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δοκιμών 27 (10,4 mg GAE/g ξηρού βασιλικού) και 25 (9,8 mg GAE/g ξηρού βασιλικού) είναι αρκετά κοντά, ενώ το ολικό φαινολικό περιεχόμενο της δοκιμής 26 (19,1 mg GAE/g ξηρού βασιλικού) αποκλείει από τις άλλες δύο. Μία πιθανή εξήγηση για αυτές τις διαφοροποιήσεις μπορεί να είναι οι διαφορετικές μέρες που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ή οι διαφορετικές τελικές θερμοκρασίες των τριών εκχυλίσεων. Το πείραμα 26 που παρουσιάζει την υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο, διαθέτει και την υψηλότερη τελική θερμοκρασία εκχύλισης (30,2 °C).

Πίνακας 4.3: Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken.

Όροι	DF	Adj SS	Adj MS	F-value	P-value
Μοντέλο	9	956.93	106.325	11.27	0.000
A	1	672.36	672.363	71.3	0.000*
B	1	12.93	12.929	1.37	0.258
C	1	1.58	1.577	0.17	0.688
D	1	18.73	18.725	1.99	0.177
AA	1	45.1	45.105	4.78	0.043*
CC	1	47.97	47.97	5.09	0.038*
DD	1	21	20.999	2.23	0.154
BC	1	22.28	22.278	2.36	0.143
BD	1	150.76	150.762	15.99	0.001*
Σφάλμα (Error)	17	160.32	9.430		
Έλλειψη προσαρμοστικότητας (lack-of-fit)	2	54.18	27.090		0.955
Συνολικά (Μοντέλο + Σφάλμα)	26	1117.24			

* Όροι με $p \leq 0.05$

Το αρχικό μοντέλο Box-Behnken περιείχε όλους τους γραμμικούς και τετραγωνικούς όρους των κύριων επιδράσεων, καθώς και τους όρους των αλληλεπιδράσεων των παραμέτρων. Προκειμένου να αξιολογηθεί η σημαντικότητα και η καταλληλότητα των όρων και του μοντέλου Box-Behnken, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA). Εφαρμόζοντας την ανάλυση διακύμανσης για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, αφαιρέθηκαν οι μη στατιστικά σημαντικοί όροι που είχαν τιμή $p \gg 0.05$, συγκεκριμένα τιμή $p \geq 0,20$.

Πρέπει να σημειωθεί πως προκειμένου το τελικό μοντέλο να παραμείνει ιεραρχικό, δεν αφαιρέθηκε από αυτό καμία από τις κύριες γραμμικές αλληλεπιδράσεις των

παραμέτρων της εκχύλισης ανεξάρτητα από την τιμή ρ τους. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές ρ που κατέχουν η αναλογία διαλύτη-υλικού, ο χρόνος εκχύλισης και η ένταση υπερήχων είναι 0.688, 0.258 και 0.177, αντίστοιχα. Για να διατηρηθεί η ιεραρχία του πειραματικού μοντέλου Box-Behnken, μετά την απόρριψη βασικών παραγόντων (B, C, D), χρειάζεται να απορριφθούν και όροι μεγαλύτερης τάξης που περιέχουν τους τρεις βασικούς. Στην περίπτωση που συνέβαινε κάτι τέτοιο, θα πρόκυπτε ένα μοντέλο που θα περιλάμβανε ελάχιστους όρους και ίσως οδηγούσε σε σφάλμα (bias). Οι όροι που απορρίφθηκαν από το αρχικό μοντέλο Box-Behnken αφορούν 5 αλληλεπιδράσεις και τον τετραγωνικό όρο του χρόνου εκχύλισης (BB). Οι 5 αλληλεπιδράσεις που απορρίφθηκαν ήταν:

- Η συγκέντρωση αιθανόλης με την ένταση υπερήχων (AD)
- Η συγκέντρωση αιθανόλης με την αναλογία διαλύτη-υλικού (AC)
- Η συγκέντρωση αιθανόλης με τον χρόνο εκχύλισης (AB)
- Η αναλογία διαλύτη-υλικού με την ένταση υπερήχων (CD)

Λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές των στατιστικών δεικτών R-sq, R-sq(adj), R-sq(pred) και την τιμή P της έλλειψης προσαρμοστικότητας μπορεί να ειπωθεί ότι το τελικό μοντέλο πρόβλεψης είναι αξιόπιστο. Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.4, ο συντελεστής προσδιορισμού R-sq (85,65 %) και ο διορθωμένος συντελεστής προσδιορισμού R-sq(adj) (78,05 %) πλησιάζουν το 100% και δεν διαφέρουν μεταξύ τους πάνω από 20% ($R^2 - R^2(\text{adj}) = 7,6\%$). Ακόμα, στον Πίνακα 4.4 φαίνεται ο δείκτης R-sq(pred), ο οποίος εκφράζει την ικανότητα αξιόπιστης πρόβλεψης του μοντέλου. Στην προκειμένη περίπτωση, το R-sq(pred) ισούται με 59.04 % και σημαίνει ότι στα 100 πείραματα, προβλέπει αξιόπιστα τα 59. Ένας άλλος στατιστικός δείκτης που αναφέρεται στην προσαρμογή και την επάρκεια του μοντέλου είναι η «έλλειψη προσαρμοστικότητας» (lack-of-fit). Η τιμή P αυτού του δείκτη παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.3 και ισούται με 0.955. Αυτό σημαίνει ότι για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p \leq 0.05$), η έλλειψη προσαρμοστικότητας θεωρείται στατιστικά μη σημαντική. Επομένως, το μοντέλο παρουσιάζει επάρκεια και εφαρμογή στα πειραματικά δεδομένα.

Πίνακας 4.4: Στατιστικοί δείκτες για το μοντέλο πρόβλεψης

R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
85.65%	78.05%	59.04%

Τελικά, η εξίσωση πρόβλεψης που λήφθηκε με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken είναι η εξής:

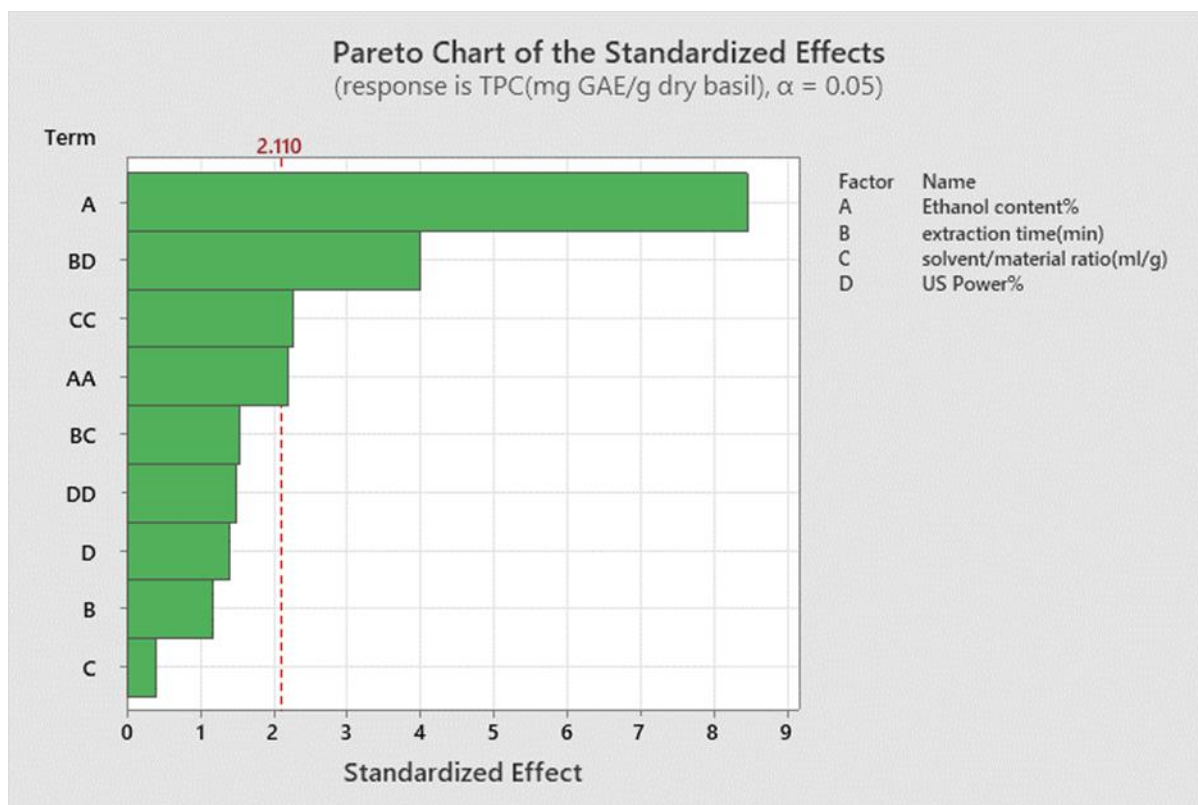
Regression Equation in Uncoded Units

$$\begin{aligned} \text{TPC(mg GAE/g dry basil)} = & -28.3 + 0.0185 \text{ Ethanol content\%} + 1.066 \text{ extraction time(min)} \\ & + 0.780 \text{ solvent/material ratio(ml/g)} + 0.591 \text{ US Power\%} \\ & - 0.001714 \text{ Ethanol content\%*Ethanol content\%} \\ & - 0.00707 \text{ solvent/material ratio(ml/g)*solvent/material ratio(ml/g)} \\ & - 0.00208 \text{ US Power\%*US Power\%} \\ & - 0.00787 \text{ extraction time(min)*solvent/material ratio(ml/g)} \\ & - 0.01364 \text{ extraction time(min)*US Power\%} \end{aligned}$$

Εικόνα 4.1: Εξίσωση πρόβλεψης ολικού φαινολικού περιεχομένου με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken.

Όπου:

- Ethanol Content%: Γραμμικός όρος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο υδατοαιθανολικό διαλύτη εκχύλισης
- Extraction time(min): Γραμμικός όρος του χρόνου εκχύλισης
- Solvent/material ratio(mL/g): Γραμμικός όρος της αναλογίας διαλύτη-υλικού
- US power%: Γραμμικός όρος της έντασης των υπερήχων
- Ethanol content%*Ethanol content%: Τετραγωνικός όρος της συγκέντρωσης της αιθανόλης
- Solvent/material ratio(mL/g)* Solvent/material ratio(mL/g): Τετραγωνικός όρος της αναλογίας διαλύτη-υλικού
- US power%* US power%: Τετραγωνικός όρος της έντασης των υπερήχων
- Extraction time(min)*Solvent/material ration(mL/g): Όρος που αναφέρεται στην αλληλεπίδραση του χρόνου εκχύλισης με την αναλογία διαλύτη-υλικού
- Extraction time(min)*US power: Όρος που αναφέρεται στην αλληλεπίδραση του χρόνου εκχύλισης με την ένταση των υπερήχων

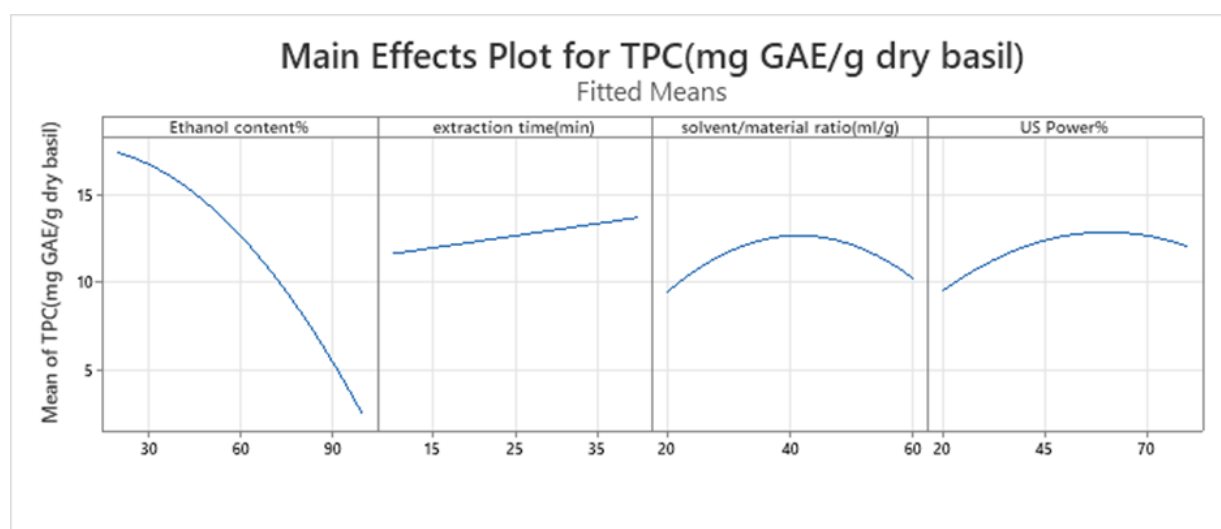


Γράφημα 4.1: Ραβδόγραμμα Pareto των κανονικοποιημένων επιδράσεων της εκχύλισης με υπερήχους

Το ραβδόγραμμα Pareto (Γράφημα 4.1) αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο απεικόνισης των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης που φαίνονται στον Πίνακα 4.3. Πιο συγκεκριμένα, το διάγραμμα Pareto παρέχει την δυνατότητα οπτικοποίησης και κατάταξης των όρων του μοντέλου κατά φθίνουσα σειρά σημαντικότητας. Οι παράμετροι που ξεπερνούν την κάθετη κόκκινη γραμμή στο θεωρούνται στατιστικά σημαντικοί ($p \leq 0.05$) διότι ξεπερνούν το επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Με βάση τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι στατιστικά σημαντικοί όροι ($p \leq 0.05$) θεωρούνται η συγκέντρωση της αιθανόλης (A, τιμή $p=0.000$), η αλληλεπίδραση του χρόνου εκχύλισης με την ένταση των υπερήχων (BD, τιμή $p=0.001$), ο τετραγωνικός όρος της αναλογίας διαλύτη-υλικού (CC, τιμή $p=0.038$) και ο τετραγωνικός όρος της συγκέντρωσης της αιθανόλης (AA, τιμή $p=0.043$). Όπως φαίνεται στο Γράφημα 4.1 και στον Πίνακα 4.3, η συγκέντρωση της αιθανόλης αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα κατά την εκχύλιση (UAE) του ολικού φαινολικού περιεχομένου.

4.2. Επίδραση των παραγόντων εκχύλισης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δρογών.

Στην Εικόνα 4.2 αναπαρίστανται τα διαγράμματα κύριων επιδράσεων (main effects plot) ξεχωριστά, οι επιδράσεις που ασκούν η συγκέντρωση της αιθανόλης, ο χρόνος εκχύλισης, η αναλογία διαλύτη-υλικού και η ένταση των υπερήχων, δηλαδή οι κύριες παράμετροι, στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Σύμφωνα με την Εικόνα 4.2, μπορούν να επιβεβαιωθούν κάποιες παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε σχέση με την σημαντικότητα των όρων.



Εικόνα 4.2: Αναπαρίστανται τα διαγράμματα για τις μεμονωμένες επιδράσεις (main effects) των 4 παραγόντων εκχύλισης ως προς το TPC.

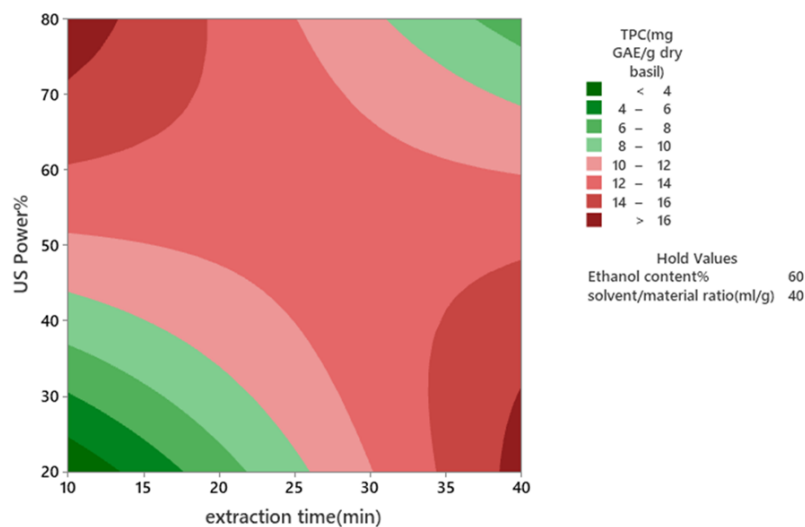
Η ανεξάρτητη μεταβλητή που φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο την τιμή του ολικού φαινολικού περιεχομένου είναι η συγκέντρωση της αιθανόλης στο υδατοαιθανολικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης από 20 έως 100 % συνεπάγεται την απότομη μείωση του ολικού φαινολικού περιεχόμενου. Από την άλλη μεριά, η μορφή των διαγραμμάτων που αντιστοιχούν στον χρόνο εκχύλισης, στην αναλογία διαλύτη-υλικού και στην ένταση των υπερήχων υποδηλώνουν ότι δεν επηρεάζουν σημαντικά το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Μεταβάλλοντας μεμονωμένα τις τιμές εισόδου για τον χρόνο εκχύλισης, την αναλογία διαλύτη/υλικού και το ποσοστό της ονομαστικής έντασης των υπερήχων, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο αλλάζει ελάχιστα. Αν και το διάγραμμα που αναφέρεται στον χρόνο εκχύλισης είναι γραμμικό, αυτό διαθέτει μία μικρή κλίση. Για ένα χρονικό διάστημα 15-35 λεπτών εκχύλιση, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο αυξάνεται λιγότερο από 5 mg GAE/g dry basil. Τα διαγράμματα που αντιστοιχούν στην αναλογία διαλύτη-υλικού και στην ένταση

υπερήχων παρουσιάζουν παρόμοια μορφή. Αρχικά, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο αυξάνεται μέχρι ένα σημείο, το οποίο είναι το μέγιστο, και ύστερα μειώνεται. Σύμφωνα με τις καμπύλες της αναλογίας διαλύτη/υλικού και της έντασης των υπερήχων (Εικόνα 4.2), το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εμφανίζεται μέγιστο περίπου στα 40 mL/g και στα 50 % της ονομαστικής έντασης των υπερήχων.

Στα δισδιάστατα διαγράμματα «Contour Plots» εξετάζεται η επίδραση που έχουν μεταξύ τους, ανά ζεύγη, οι παράμετροι στο μετρούμενο μέγεθος μιας διαδικασίας. Οι πιο κόκκινες (σκούρες) περιοχές δηλώνουν πώς σε αυτές τις συνθήκες της διαδικασίας μεγιστοποιείται το μετρούμενο μέγεθος. Αρχικά, θα συζητηθούν τα «Contour Plots» που αναφέρονται σε αλληλεπιδράσεις του τελικού μοντέλου πρόβλεψης (Γράφημα 4.2 & Γράφημα 4.3) και στη συνέχεια θα συζητηθούν τα «Contour Plots» που αναφέρονται σε αλληλεπιδράσεις που δεν είναι σημαντικές για το τελικό μοντέλο πρόβλεψης (Γράφημα 4.4, Γράφημα 4.5, Γράφημα 4.6 & Γράφημα 4.7).

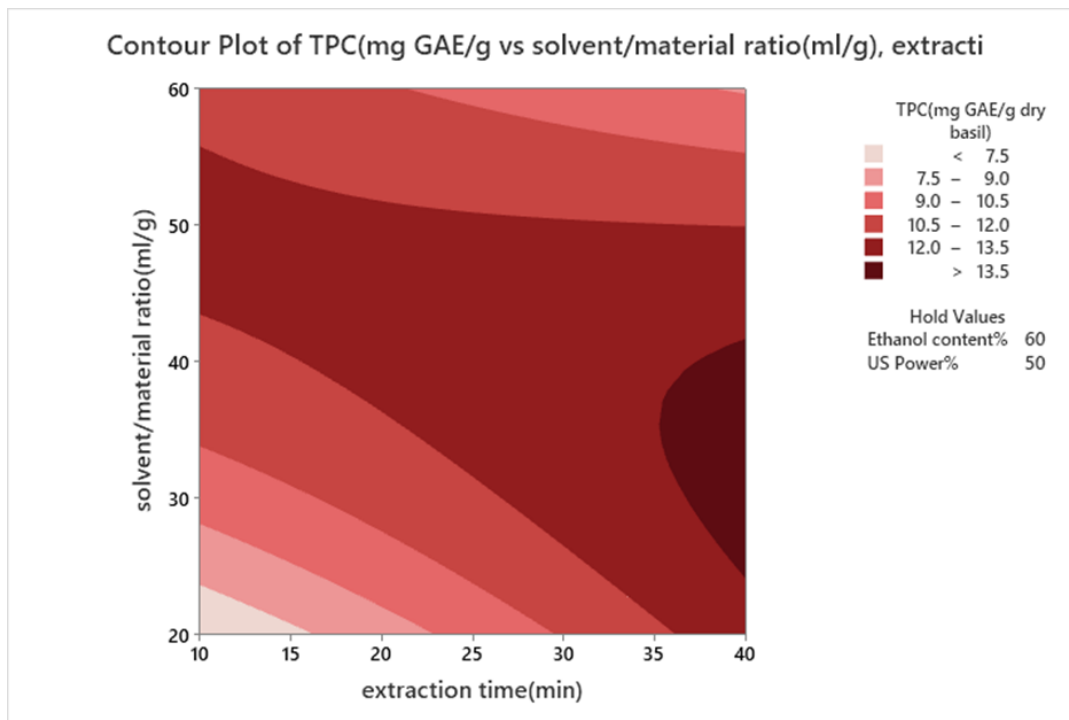
Στο Γράφημα 4.2 παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση των όρων της έντασης των υπερήχων και του χρόνου εκχύλισης (BD). Μελετώντας το Γράφημα 4.2, αναδεικνύεται ότι το μέγιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο προκύπτει από τον συνδυασμό υψηλών εντάσεων υπέρηχων και χαμηλών χρόνων εκχύλισης ή χαμηλών εντάσεων υπέρηχων και υψηλών χρόνων εκχύλισης. Στην περίπτωση που εφαρμοστούν ταυτόχρονα υψηλές εντάσεις και υψηλοί χρόνοι εκχύλισης, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μειώνεται σημαντικά. Αυτή η μείωση μπορεί να αποδοθεί στην εκτεταμένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες έχουν την δυνατότητα να υποβαθμίσουν ή να αποικοδομίσουν ορισμένα φαινολικά συστατικά προς απλούστερες ενώσεις (Shen et al., 2023). Τα έντονα φαινόμενα που συμβαίνουν κατά την σπηλαίωση με υψηλές εντάσεις υπερήχων, οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η ύπαρξη του νερού στον διαλύτη εκχύλισης είναι ένας άλλος παράγοντας που συμβάλλει στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου (hydroxyl radicals, OH^{\bullet}) (El Maaiden et al., 2023). Ακόμα, ο αυξημένος χρόνος εκχύλισης ευνοεί την οξείδωση των φαινολικών συστατικών, καθώς το υπόστρωμα της εκχύλισης εκτίθεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην ενέργεια των υπερήχων. Επομένως, η παραγωγή των ελευθέρων ριζών προκαλείται συνδυαστικά από τις ακραίες τιμές έντασης των υπερήχων και του χρόνου εκχύλισης.

Contour Plot of TPC(mg GAE/g dry vs US Power%, extraction time(min)



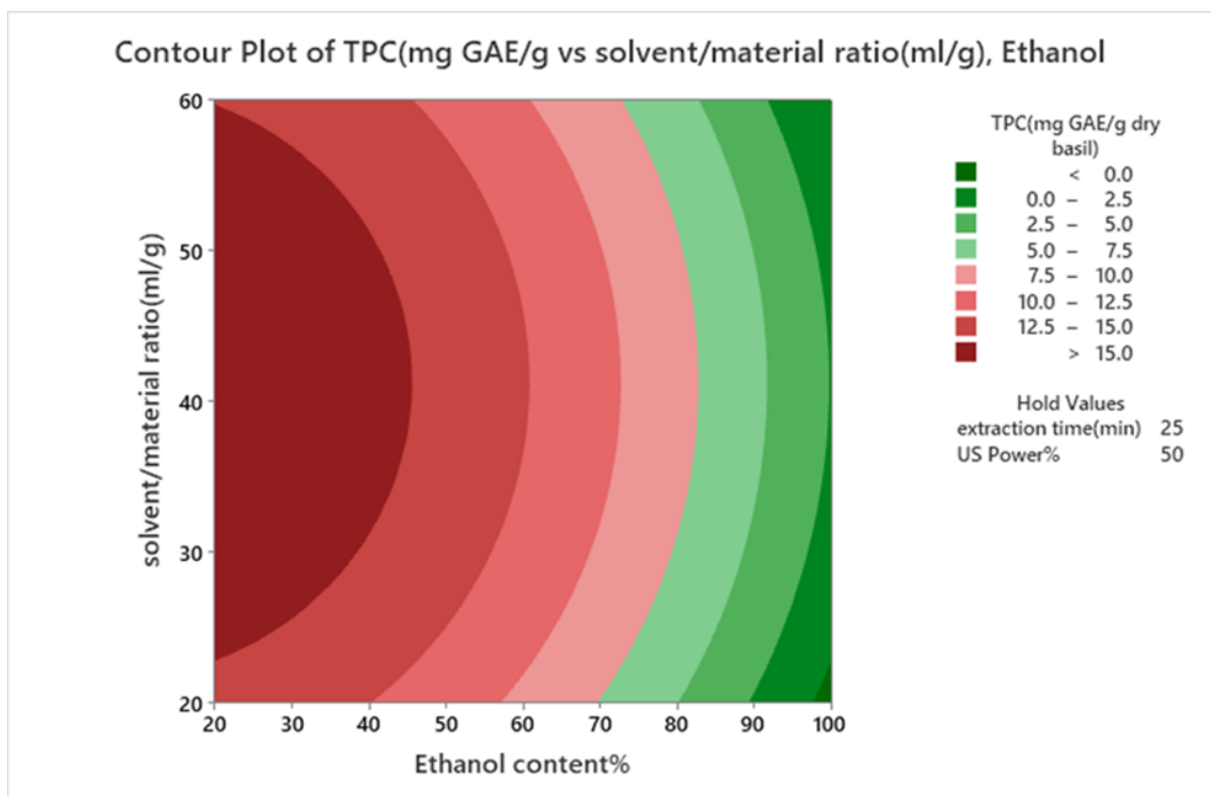
Γράφημα 4.2: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση της έντασης των υπερήχων και του χρόνου εκχύλισης (BD) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Στο Γράφημα 4.3 αναπαρίστανται η αλληλεπίδραση της αναλογίας διαλύτη-υλικού με τον χρόνο εκχύλισης (BC) καθώς οι τιμές της συγκέντρωσης της αιθανόλης (60%) και της έντασης των υπερήχων (50%) είναι σταθερές στα μεσαία επίπεδα τιμών. Σύμφωνα με το Γράφημα 4.3, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μεγιστοποιείται σε υψηλούς χρόνους εκχύλισης (35.5-40 min) και σε σχετικά χαμηλές ή μέτριες εντάσεις υπερήχων (25-41%). Η ταυτόχρονη μείωση του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας διαλύτη-υλικού οδηγεί σε μείωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Όμως, ο συνδυασμός της μείωσης του χρόνου εκχύλισης και της κατάλληλης αύξησης της αναλογίας διαλύτη-υλικού μπορεί να οδηγήσει σε ικανοποιητική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων (12.0-13.5 mg GAE/g dry basil). Για παράδειγμα, για 44-55 ml/g αναλογία διαλύτη υλικού, για 10 λεπτά χρόνου εκχύλισης, 60% περιεκτικότητα αιθανόλης και 50% ένταση υπερήχων είναι δυνατόν να ληφθεί εκχύλισμα με συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων περίπου ίση με 12 mg GAE/g dry basil.



Γράφημα 4.3: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση της αναλογίας διαλύτη/υλικού και του χρόνου εκχύλισης (BC) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο

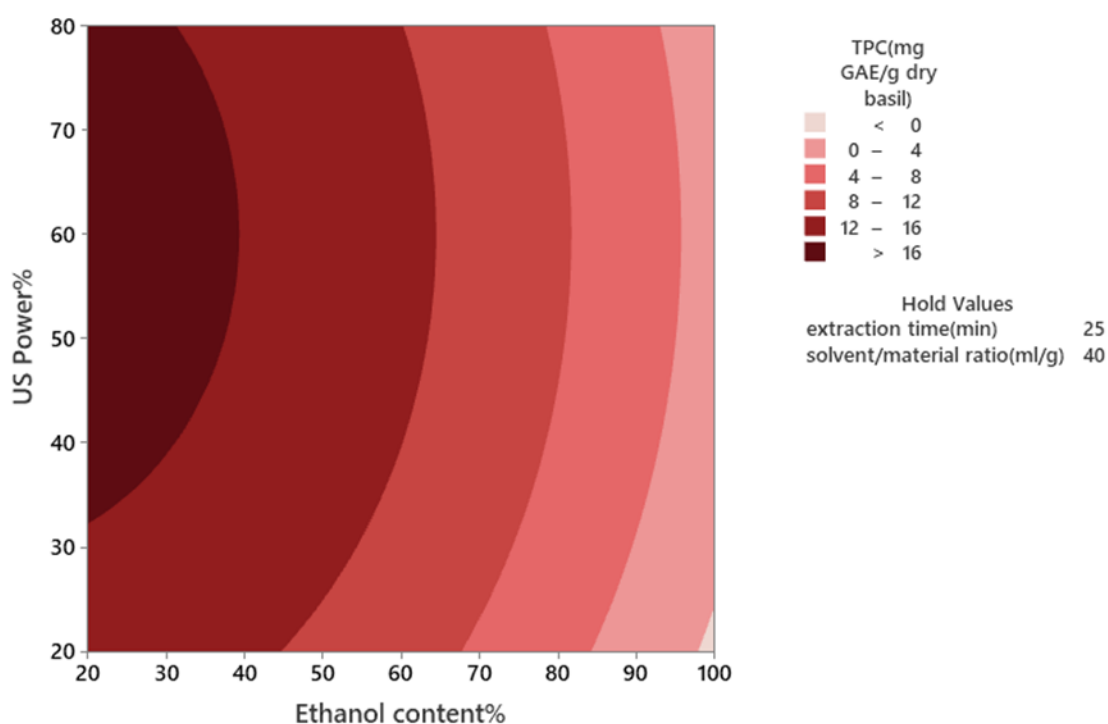
Στο Γράφημα 4.4 μελετάται η αλληλεπίδραση της αναλογίας διαλύτη-υλικού με την συγκέντρωση της αιθανόλης (CA) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Όπως είχε αποδειχθεί και προηγουμένως, η μεταβολή της αναλογίας διαλύτη-υλικού δεν επιφέρει σημαντική μεταβολή στην απόκριση των πειραμάτων. Αυτό φαίνεται από την ευρεία κοίλη περιοχή στον κάθετο άξονο της αναλογίας διαλύτη/υλικού. Συνδυαστικά, όμως, οι μεταβολές της αναλογίας διαλύτη/υλικού και της συγκέντρωσης της αιθανόλης προκαλούν κάποιες αλλαγές στο TPC. Αυξάνοντας την περιεκτικότητα της αιθανόλης (20-35%), σε περιοχές αναλογίας διαλύτη/υλικού 25-58 mL/g και διατηρώντας σταθερές τις τιμές του χρόνου εκχύλισης (25 λεπτά) και της έντασης των υπερήχων (50%), το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μειώνεται. Σημειώνεται ότι στα εύρη τιμών 20-40% αιθανόλη και 23-60mL/g αναλογία διαλύτη υλικού, εκχυλίζεται η μέγιστη ποσότητα ολικού φαινολικού περιεχομένου (>15 mg GAE/g dry basil).



Γράφημα 4.4: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση της αναλογίας διαλύτη-υλικού και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (CA) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Το Γράφημα 4.5, το οποίο εξετάζει την αλληλεπίδραση της έντασης των υπερήχων και της συγκέντρωσης της αιθανόλης, διαθέτει παρόμοια μορφή και ερμηνεία με το Γράφημα 4.4. Αναλυτικότερα, στο Γράφημα 4.5 παρατηρούνται, όπως και στο Γράφημα 4.4, περιοχές με αρκετά ευρεία όρια της ανεξάρτητης μεταβλητής που βρίσκεται στον άξονα γγ' (ένταση υπερήχων). Αυτό υποδηλώνει ότι η ένταση των υπερήχων δεν επηρεάζει σημαντικά την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Κρατώντας σταθερό τον χρόνο εκχύλισης (25 min) και την αναλογία διαλύτη/υλικού (40 mL/g), το μέγιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο προκύπτει από τον συνδυασμό 32,5-80% συγκέντρωσης αιθανόλης και 20-38,8% ονομαστικής έντασης λειτουργίας των υπερήχων.

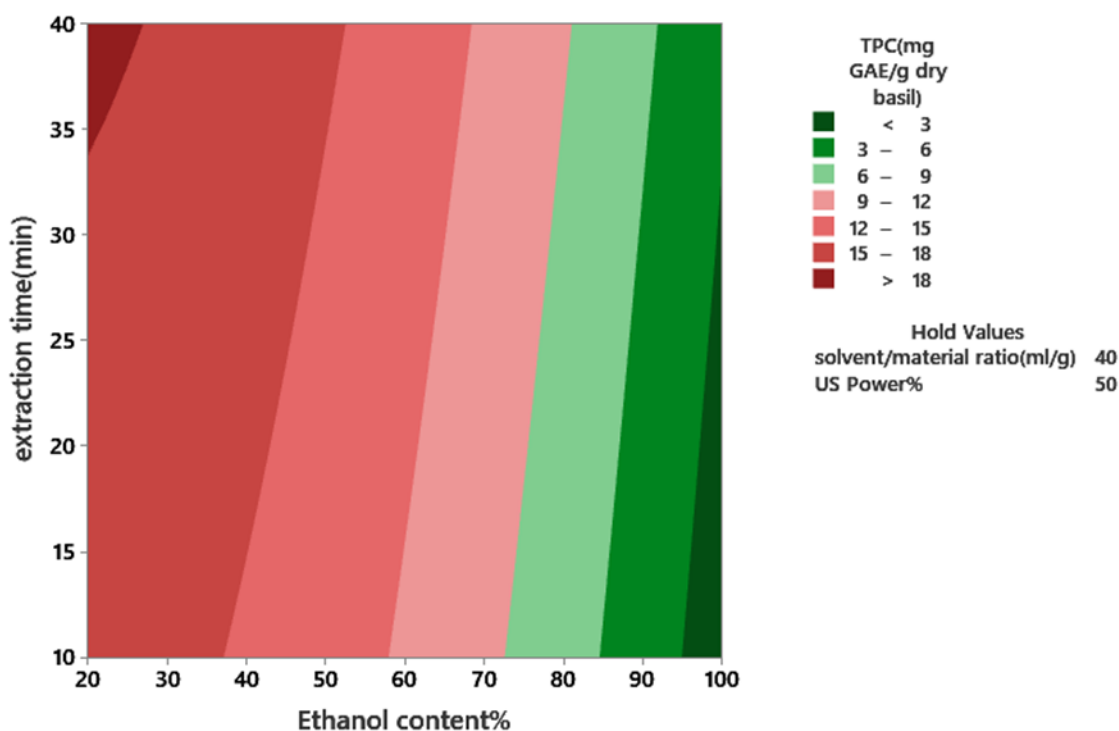
Contour Plot of TPC(mg GAE/g dry basil) vs US Power%, Ethanol content%



Γράφημα 4.5: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση της έντασης των υπερήχων και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (DA) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Στο Γράφημα 4.6 μελετάται η αλληλεπίδραση του χρόνου εκχύλισης και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (BA) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Σύμφωνα με το Γράφημα 4.6, φαίνεται ότι ο συνδυασμός της αύξησης του χρόνου εκχύλισης και της μείωσης της συγκέντρωσης της αιθανόλης οδηγεί σε αύξηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Πιο συγκεκριμένα, χρόνοι εκχύλισης στο εύρος 34.4-40 λεπτά και χαμηλές περιεκτικότητες αιθανόλης στο εύρος 20.4-26.2% βελτιστοποιούν την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών, παράγοντας λίγο παραπάνω από 18 mg GAE/g dry basil. Εφαρμόζοντας 40 λεπτά εκχύλισης και χρησιμοποιώντας 20 % αιθανόλη, επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή 18.4 mg GAE/g dry basil. Ακόμα, για μικρότερους χρόνους εκχύλισης και 20% αιθανόλη, παράγονται εξίσου αξιόλογα ποσά φαινολικών συστατικών (16,4-18 mg GAE/g dry basil)

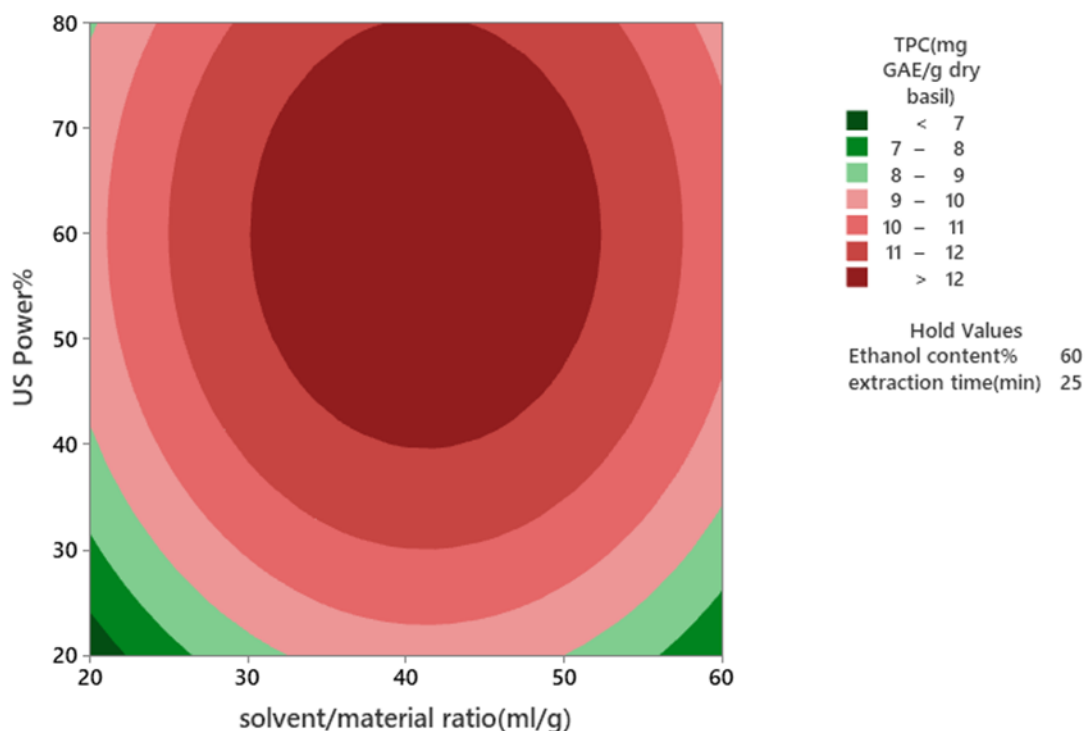
Contour Plot of TPC(mg GAE/g vs extraction time(min), Ethanol content%



Γράφημα 4.6: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση του χρόνου εκχύλισης και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (BA) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Στο Γράφημα 4.7 αναπαρίστανται η αλληλεπίδραση της έντασης των υπερήχων και της αναλογίας διαλύτη/υλικού (DC) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Παρατηρείται ότι οι μέγιστες τιμές TPC (>12 mg GAE/g dry basil) προσδιορίζονται σε μία κυκλική περιοχή του Γράφημα 4.7, όπου εφαρμόζεται ο εξής συνδυασμός των παραγόντων αλληλεπίδρασης: 30-52 mL/g διαλύτη/υλικού και 40-80% ένταση των υπερήχων. Η ταυτόχρονη μείωση της έντασης των υπερήχων και της αναλογίας διαλύτη-υλικού οδηγεί σε μείωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Αυτή η μείωση των φαινολικών συστατικών εξηγείται από την μη αποτελεσματική διάχυση που προκαλείται λόγω ανεπαρκούς ενέργειας και έλλειψης κατάλληλης ποσότητας διαλύτη εκχύλισης. Η μέγιστη περιοχή αποκρίσεων (>12 mg GAE/g dry basil) συσχετίζεται με αναλογίες διαλύτη-υλικού (30.2-52.3 mL/g) που αντιστοιχούν στην αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ διαλύτη και φυτικού υποστρώματος. Κατά την αποκατάσταση της ισορροπίας, παρατηρείται η πιο αποτελεσματική διάχυση, ενώ πάνω ή κάτω από αυτήν παρατηρείται μείωση στην απόδοση της εκχύλισης φαινολικών ενώσεων..

Contour Plot of TPC(mg GAE/g vs US Power%, solvent/material ratio(ml/g)



Γράφημα 4.7: Δισδιάστατο διάγραμμα (Contour Plot) στο οποίο μελετάται η αλληλεπίδραση της έντασης των υπερήχων και της αναλογίας διαλύτη/υλικού (DC) ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο

4.3. Βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για δρόγες βασιλικού

Χρησιμοποιώντας το πειραματικό μοντέλο Box-Behnken που παρήχθη από το στατιστικό πρόγραμμα Minitab (Εικόνα 4.1), δίνεται η δυνατότητα της πρόβλεψης και επιλογής συγκεκριμένων βέλτιστων τιμών ολικού φαινολικού περιεχομένου. Οι θεωρητικές, αλλά και πειραματικές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης φαινολικών συστατικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5. Η στατιστική σύγκριση των τριών διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης οδήγησε στην επιλογή μίας συνθήκης, η οποία εφαρμόστηκε στη συνέχεια σε παραπροϊόντα και επιλεγμένες δρόγες βασιλικού.

Συγκρίνοντας τις αποκρίσεις των πειραματικών βέλτιστων λύσεων με τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης (Confidence Intervals, CI) φαίνεται ότι το μοντέλο προέβλεψε αξιόπιστα γιατί όλες οι πειραματικές τιμές του TPC βρέθηκαν εντός οριών εμπιστοσύνης (Πίνακας 4.5). Αναλυτικότερα, το TPC της πρώτης πειραματικής λύσης ισούται με 18,0 mg GAE/g dry basil και βρίσκεται εντός διαστήματος εμπιστοσύνης 95% (17,00-28,06). Ακόμα, το TPC της δεύτερης πειραματικής λύσης ισούται με 19,6 mg GAE/g dry basil και βρίσκεται

εντός διαστήματος εμπιστοσύνης 95% (13,82-27,42). Τέλος, το TPC της τρίτης πειραματικής λύσης ισούται με 24,6 mg GAE/g dry basil και βρίσκεται εντός διαστήματος εμπιστοσύνης 95% (13,65-26,55).

Πίνακας 4.5: Θεωρητικές και πειραματικές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης φαινολικών συστατικών

Παράγοντες εκχύλισης	Αριθμός βέλτιστης λύσης			Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg GAE/g dry basil)					
				Θεωρητικά βέλτιστες λύσεις			Πειραματικά βέλτιστες λύσεις TPC (\pm stdev), n= 3 ¹		
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
% Συγκέντρωση αιθανόλης (% v/v)	20	20	28,15	22,53	20,62	20,10	18,0 \pm (1,4) ^a	19,6 \pm (1,8) ^a	24,6 \pm (4,5) ^a
Χρόνος εκχύλισης (min)	10	40	40						
Αναλογία διαλύτη/υλικού (mL/g)	49,5	20	20						
% Ένταση υπερήχων (W)	80	20	20						
Διαστήματα εμπιστοσύνης (CI, 95%)				17,00-28,06	13,82-27,42	13,65-26,55	-	-	-
Κατανάλωση αιθανόλης για τον διαλύτη εκχύλισης (mL)				-	-	-	4,95	2	2,8

¹ Αριθμός επαναλήψεων

^a Οι λύσεις που βρίσκονται στην ίδια γραμμή και εμφανίζουν το ίδιο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0.05$)

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.5, οι τρεις πειραματικά-βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης αποδίδουν TPC που ισούται με 18,0 mg GAE/g dry basil, 19,6 mg GAE/g dry basil και 24,6 mg GAE/g dry basil, αντιστοίχως. Με την βοήθεια της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA), διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$) μεταξύ των παραπάνω πειραματικών τιμών ολικού φαινολικού περιεχομένου. Εφόσον οι τρεις τιμές βρίσκονται στην ίδια στατιστική ομάδα, η επιλογή της βέλτιστης λύσης πραγματοποιήθηκε με βάση τον συντομότερο χρόνο εκχύλισης προκειμένου να υπάρξει επίσπευση της πειραματικής διαδικασίας. Η πρώτη βέλτιστη λύση διαθέτει τον μικρότερο χρόνο εκχύλισης (10 min), αλλά απαιτεί την μεγαλύτερη ένταση υπερήχων (80%) και την μεγαλύτερη

κατανάλωση αιθανόλης (4,95 mL). Στην παρούσα εργασία, η σχετικά μεγαλύτερη κατανάλωση πόρων (ενέργειας και αιθανόλης) δεν λειτούργησε ως αποτρεπτικός παράγοντας διότι η κλίμακα της εκχύλισης ήταν εργαστηριακού επιπέδου, δηλαδή μικρή. Ωστόσο, μία βιομηχανία που πραγματοποιεί εκχυλίσεις πολύ μεγαλύτερης κλίμακας, καταναλώνοντας αρκετά περισσότερους πόρους, ενδεχομένως να έβρισκε εμπόδιο κάτι τέτοιο. Απ' την άλλη, ο σύντομος χρόνος εκχύλισης θεωρείται ανταγωνιστικό πλεονέκτημα εντός μια γραμμής παραγωγής και θα μπορούσε να είναι καθοριστικός παράγοντας και για την βιομηχανία. Η επιλογή της βέλτιστης συνθήκης δεν είναι μονοπαραγοντική, αλλά εξαρτάται κάθε φορά από το σκοπό της εκχύλισης, τις απαιτήσεις και τις προσδοκίες που διαθέτει ένα εργαστήριο ή σε μεγαλύτερη κλίμακα μια βιομηχανία. Επομένως, για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας, η βέλτιστη συνθήκη εκχύλισης που επιλέχθηκε ήταν η πρώτη, η οποία είχε συνθήκες εκχύλισης: 20% v/v συγκέντρωση αιθανόλης, 10 λεπτά χρόνο εκχύλισης, 49,5 mL/g αναλογία διαλύτη/υλικού και 80% ονομαστικής έντασης λειτουργίας υπερήχων.

4.4. Προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής, αντιριζικής δράσης σε παραπροϊόντα και επιλεγμένα δείγματα δρόγης βασιλικού.

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου TPC των παραπροϊόντων επεξεργασίας βασιλικού με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, επιλέχθηκαν να πραγματοποιηθούν εκχυλίσεις και μετρήσεις σε δύο ορισμένες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκαν οι συνθήκες της βέλτιστης λύσης που πρέκυψε από το πειραματικό μοντέλο (Πίνακας 4.5) και τις συνθήκες του πειράματος που έδωσε χαμηλές τιμές TPC (Πίνακας 4.1.). Οι δύο διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης συνοψίζονται στον Πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6: Συνθήκες εκχύλισης βασιλικού με βέλτιστη και χαμηλή απόδοση σε TPC.

Συνθήκες Εκχύλισης	Περιεκτικότητα Αιθανόλης (%)	Χρόνος Εκχύλισης (min)	Ισχύς Υπερήχων (%)	Αναλογία διαλύτη/δείγματος (mg/g)
Βέλτιστο TPC (Best)	20	10	80	49,5
Χαμηλό TPC (Low)	100	25	50	60

Οι δύο διαφορετικές συνθήκες UAE (Πίνακας 4.6) εφαρμόστηκαν στα πέντε διαθέσιμα παραπροϊόντα καθώς και σε δρόγες πλατύφυλλου και σγουρού βασιλικού. Οι ίδιες συνθήκες, αξιοποιήθηκαν και για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ισχύς-αντιοξειδωτικής δράσης, ο οποίος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο FRAP και την ικανότητα δέσμευσης-ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+}, η οποία διεξήχθη με τη μέθοδο ABTS.

Πίνακας 4.7: Εφαρμογή της βέλτιστης και χαμηλής συνθήκης σε παραπροϊόντα και επιλεγμένες δρόγες βασιλικού

Παραπροϊόν/Δρόγη	Συνθήκες Εκχύλισης	FRAP*	ABTS ^{•+} **	TPC*
Βασιλικός Σγουρός 16/9/22 (ΒΣ16-9)	Βέλτιστο TPC (B)	61,51±0,45 ³	37,0±1,3 ^{4',5'}	13,19±0,36 ^{2'',3'',4''}
	Χαμηλό TPC (L)	1,466±0,091 ¹	1,340±0,086 ^{1'}	nd*
Βασιλικός Σγουρός 15/10/22 (ΒΣ15-10)	Βέλτιστο TPC (B)	162,59±6,22 ⁸	40,3±4,0 ^{5',6',7'}	10,88±0,17 ^{1'',2''}
	Χαμηλό TPC (L)	3,373±0,089 ¹	2,03±0,15 ^{1'}	nd*
Βασιλικός Πλατύφυλλος 19/10/22 (Π19)	Βέλτιστο TPC (B)	36,35±0,43 ²	46,9±4,5 ^{6',7',8'}	15,4±1,2 ^{4'',5'',6''}
	Χαμηλό TPC (L)	1,92±0,059 ¹	2,21±0,19 ^{1'}	nd*
Βασιλικός Πλατύφυλλος 20/10/22 (Π20)	Βέλτιστο TPC (B)	136,21±1,83 ⁶	65,8±4,6 ^{10',11'}	25,2±1,3 ^{8'',9''}
	Χαμηλό TPC (L)	2,994±0,072 ¹	1,97±0,21 ^{1'}	nd*
Βασιλικός Πλατύφυλλος 1 (Π1)	Βέλτιστο TPC (B)	102,95±2,49 ⁵	72,22±0,38 ^{11'}	18,6±3,0 ^{6'',7''}
	Χαμηλό TPC (L)	2,420±0,061 ¹	3,96±0,37 ^{1'}	nd*
Βασιλικός Σγουρός Δρόγη	Βέλτιστο TPC (B)	204,20±11,26 ⁹	49,1±2,1 ^{7',8'}	15,0±0,5 ^{3'',4'',5''}
Βασιλικός Πλατύφυλλος Δρόγη	Βέλτιστο TPC (B)	56,91±2,47 ³	71,1±6,5 ^{11'}	26,8±1,5 ^{9''}

*FRAP(Ferric Reducing/Antioxidant Power): Προσδιορισμός Αναγωγικής Ισχύος/ Αντιοξειδωτικής Ικανότητας

*ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid): Εκτίμηση της Ικανότητας Δέσμευσης/ Ανάσχεσης της Σταθερής Ελεύθερης Ρίζας ABTS^{•+}

*TPC (Total Phenolic Content): Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου

*nd(not detected): Μη ανιχνεύσιμο

*±standard deviation: Τυπική απόκλιση

*1-9, 1'-11', 1''-9'' : Στατιστικές ομάδες για τις μεθόδους FRAP, ABTS και TPC. Δείγματα με διαφορετικό αριθμό, ανά στήλη, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p≤0,05)

Μελετώντας τον Πίνακα 4.7, γίνεται κατανοητή η διαφορετική συμπεριφορά των παραπροϊόντων καθώς και των δειγμάτων σκέτου σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού. Τα αποτελέσματα, αποκαλύπτουν τις διακυμάνσεις που υπάρχουν μεταξύ των δύο ποικιλιών βασιλικού, λόγω διαφορετικών βοτανικών χαρακτηριστικών και των παραπροϊόντων που έχουν υποστεί επεξεργασίες, με των δρόγων ξηρού βασιλικού. Επιπλέον, παράγοντες που διαφοροποιούν τα αποτελέσματα, είναι οι ημερομηνίες συλλογής, παρασκευής παραπροϊόντων και σκέτων δειγμάτων και οι μέθοδοι εκχύλισης, οι οποίες επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, την αντιοξειδωτική και αντιριζική δραστηριότητα (Medfai et al., 2020).

4.4.1. Συγκριτική ανάλυση για τις δύο ποικιλίες βασιλικού, δρόγης και παραπροϊόντων

Αναλύοντας ξεχωριστά τα δεδομένα για τις δύο ποικιλίες, καθώς και για τα δείγματα που προέρχονται από παραπροϊόντα και δρόγες ξηρού βασιλικού, προκύπτουν κάποια πορίσματα.

- Εστιάζοντας στην ποικιλία “Σγουρού” βασιλικού (Πίνακας 4.8): για τα παραπροϊόντα του ισχύει ότι σε βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, δίνουν υψηλές τιμές αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης, σε αντίθεση με τις μειωμένες τιμές που δίνονται στις χαμηλές συνθήκες. Ακόμα, τα δύο παραπροϊόντα “σγουρός 16/9/22 ΓΠΑ” και “σγουρός 15/10/22 ΓΠΑ”, τα οποία ανήκουν στην ίδια στατιστική ομάδα (2^η) στις βέλτιστες συνθήκες, παρουσιάζουν μέτριο φαινολικό περιεχόμενο, συγκριτικά με τη δρόγη σγουρού βασιλικού. Ταυτόχρονα, στις χαμηλές συνθήκες το φαινολικό περιεχόμενο των παραπροϊόντων σγουρού βασιλικού είναι μη ανιχνεύσιμο. Ενώ, η δρόγη του “σγουρού” βασιλικού δίνει ακόμα μεγαλύτερες τιμές στις μεθόδους FRAP, ABTS καθώς και αυξημένο ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Αποδεικνύοντας ότι, οι ελαττωμένες τιμές των παραπροϊόντων έναντι της δρόγης, αποδίδονται στην επεξεργασία που υφίσταται το φυτό κατά τη διαδικασία της υδροαπόσταξης με στόχο την παραγωγή αιθέριων ελαίων, η οποία έχει αντίκτυπο στη χημική σύνθεση των παραπροϊόντων (Moccia et al., 2020). Οι υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούν ενδέχεται να προκαλέσουν μερική καταστροφή βιοδραστικών συστατικών, όπως των φαινολικών. Κυρίως, τα πολικότερα και πιο μικρά φαινολικά μόρια, τα οποία είναι πιο υδατοδιαλυτά, πιθανώς απομακρύνονται από το φυτικό υπόστρωμα μαζί

με το νερό κατά τη διάρκεια του βρασμού, σε αυτό ίσως να οφείλεται η παρατηρούμενη μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών, αλλά και άλλων αντιοξειδωτικών και αντιριζικών συστατικών στα παραπροϊόντα του φυτού.

Πίνακας 4.8: Εστιασμένος πίνακας για τα αποτελέσματα της ποικιλίας «Σγουρού» βασιλικού παραπροϊόντα και δρόγη

Παραπροϊόν/Δρόγη	Συνθήκες Εκχύλισης	FRAP*	ABTS***	TPC*
Βασιλικός Σγουρός 16/9/22 (BΣ16-9)	Βέλτιστο TPC	61,51±0,45 ³	37,0±1,3 ^{4,5'}	13,19±0,36 ^{2',3',4''}
	Χαμηλό TPC	1,466±0,091 ¹	1,340±0,086 ^{1'}	nd*
Βασιλικός Σγουρός 15/10/22 (BΣ15-10)	Βέλτιστο TPC	162,59±6,22 ⁸	40,3±4,0 ^{5,6',7'}	10,88±0,17 ^{1'',2''}
	Χαμηλό TPC	3,373±0,089 ¹	2,03±0,15 ^{1'}	nd*
Βασιλικός Σγουρός Δρόγη	Βέλτιστο TPC	204,20±11,26 ⁹	49,1±2,1 ^{7,8'}	15,0±0,5 ^{3'',4'',5''}

Για τα παραπροϊόντα “πλατύφυλλου” βασιλικού, παρατηρείται το ίδιο μοτίβο (Πίνακας 4.9), δηλαδή ότι οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, παρέχουν καλύτερα αποτελέσματα. Το φαινολικό περιεχόμενο για τη “δρόγη” πλατύφυλλου είναι εμφανώς μεγαλύτερο συγκριτικά με των παραπροϊόντων. Η αντιριζική δράση της δρόγης, είναι μεγαλύτερη από του παραπροϊόντος “πλατύφυλλου 19/10/22 ΓΠΑ”, ενώ ταυτόχρονα ανήκει στην ίδια στατιστική ομάδα (^{11'}) με τα άλλα δύο παραπροϊόντα “πλατύφυλλος 20/10/22 ΓΠΑ” και “πλατύφυλλος 1”. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της “δρόγης” πλατύφυλλου, εμφανίζεται μεγαλύτερη σε σχέση με του παραπροϊόντος “πλατύφυλλος 19/10/22 ΓΠΑ”. Παράλληλα, είναι μικρότερη από τα άλλα δύο παραπροϊόντα “πλατύφυλλος 20/10/22 ΓΠΑ” και “πλατύφυλλος 1”. Το γεγονός αυτό, μπορεί να αποδοθεί στην παρατεταμένη επεξεργασία που επιδέχονται τα παραπροϊόντα, η οποία ενδέχεται να οδηγήσει σε απελευθέρωση φυτοχημικών ενώσεων που ήταν δεσμευμένες εντός κυτταρικών τοιχωμάτων ή άλλων δομών (πχ γλυκοζίτες), που εμφανίζουν αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση. Επιπροσθέτως, ορισμένες βιοενεργές ενώσεις κατά τις διάφορες επεξεργασίες, μπορεί να διασπαστούν σε απλούστερες, αποκτώντας μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα και αντιοξειδωτική ικανότητα (Leonard et al., 2020).

Πίνακας 4.9: Εστιασμένος πίνακας για τα αποτελέσματα της ποικιλίας «Πλατύφυλλου» βασιλικού παραπροϊόντα και δρόγη

Παραπροϊόν/Δρόγη	Συνθήκες Εκχύλισης	FRAP*	ABTS***	TPC*
Βασιλικός Πλατύφυλλος 19/10/22 (Π19)	Βέλτιστο TPC	36,35±0,43 ²	46,9±4,5 ^{6',7',8'}	15,4±1,2 ^{4'',5'',6''}
	Χαμηλό TPC	1,92±0,059 ¹	2,21±0,19 ^{1'}	nd*
Βασιλικός Πλατύφυλλος 20/10/22 (Π20)	Βέλτιστο TPC	136,21±1,83 ⁶	65,8±4,6 ^{10',11'}	25,2±1,3 ^{8'',9''}
	Χαμηλό TPC	2,994±0,072 ¹	1,97±0,21 ^{1'}	nd*
Βασιλικός Πλατύφυλλος 1	Βέλτιστο TPC	102,95±2,49 ⁵	72,22±0,38 ^{11'}	18,6±3,0 ^{6'',7''}
	Χαμηλό TPC	2,420±0,061 ¹	3,96±0,37 ^{1'}	nd*
Βασιλικός Πλατύφυλλος Δρόγη	Βέλτιστο TPC	56,91±2,47 ³	71,1±6,5 ^{11'}	26,8±1,5 ^{9''}

- Συγκρίνοντας τις δύο ποικιλίες, το “σγουρό” και “πλατύφυλλο” βασιλικό μεταξύ τους (Πίνακας 4.7), διαπιστώνεται ότι ο “σγουρός” βασιλικός διαθέτει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τον “πλατύφυλλο”, όπως υποδεικνύουν οι τιμές FRAP. Από την άλλη πλευρά, ο “πλατύφυλλος” παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιριζική δράση σύμφωνα με τις τιμές ABTS και ολική φαινολική περιεκτικότητα TPC. Η αυξημένη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων, δεν συνεπάγεται απαραίτητα με αυξημένη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση. Οι φαινόλες διαθέτουν ποικίλες δράσεις, κάποιες είναι πιο αποτελεσματικές ως αντιοξειδωτικά, άλλες ως αντιριζικά και άλλες συνεισφέρουν περισσότερο στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο TPC χωρίς να εκδηλώνουν κάποια αξιοσημείωτη δράση.

Συνολικά, τα παραπροϊόντα βασιλικού τα οποία συγκομίστηκαν τέλη φθινοπώρου παρουσιάζουν υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο έναντι αυτών που συλλέχθηκαν αρχές φθινοπώρου. Σε γενικές γραμμές, η βέλτιστη περίοδος συγκομιδής για την μέγιστη παραλαβή φαινολικών συστατικών, είναι πριν την έναρξη της ανθοφορίας, δηλαδή την τέταρτη εβδομάδα ανάπτυξης. Εκείνη την περίοδο, εντοπίζονται τα υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ουσιών, αρώματος και γεύσης του βασιλικού. Έπειτα, όλες οι θρεπτικές ουσίες που συσσωρεύονται, οδηγούνται προς τα άνθη για να συμβάλλουν στη διαδικασία της

αναπαραγωγής (Birenboim et al., 2022). Στη μελέτη αυτή, εντοπίζεται υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο σε παραπροϊόντα βασιλικού που συγκομίστηκαν τέλη φθινοπώρου. Αυτό οφείλεται, στο γεγονός ότι ο βασιλικός (*Ocimum basilicum* L.) αποτελεί ένα θερμόφιλο φυτό, το οποίο αναπτύσσεται άριστα σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Ωστόσο, οι θερμοκρασιακές μεταπτώσεις και κυρίως η μείωση της θερμοκρασίας που καταγράφεται στα τέλη του φθινοπώρου, προκαλεί στο φυτό αβιοτικό στρες. Πιθανά για αυτό το λόγο ο φυτικός οργανισμός, προκειμένου να αμυνθεί και να επιβιώσει, συνθέτει μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών ουσιών (Gavrić et al., 2021).

Με τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, οι οποίες περιλαμβάνουν πιο σύντομο χρονικό διάστημα εκχύλισης (10min) και υδατοαιθανολικό διαλύτη συνολικού όγκου 25 mL, με μικρή αναλογία αιθανόλης (20% αιθανόλη και 80% νερό), η εκχυλιζόμενη ποσότητα φαινολικών ουσιών από το φυτικό υλικό είναι αποτελεσματική, καθώς οι αντιοξειδωτικές και αντιριζικές δράσεις είναι πιο ικανοποιητικές. Οι δράσεις αυτές δεν συνδέονται απαραίτητα με τη συγκέντρωση του φαινολικό περιεχομένου. Εξαρτώνται από το φυτοχημικό προφίλ του φυτού, δηλαδή σε συγκεκριμένες ενώσεις που μπορεί να βρίσκονται σε υψηλή περιεκτικότητα και εκδηλώνουν αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση. Αντίθετα, οι χαμηλές συνθήκες οι οποίες δίνουν χαμηλότερες τιμές φαινολικών ενώσεων, αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης, εκτελούνται μόνο με διαλύτη 100% αιθανόλη με συνολικό όγκο διαλύτη 30 mL. Το υδατοαιθανολικό διάλυμα εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες, αποδεδειγμένα διαθέτει μεγαλύτερη βιοπροσβασιμότητα στις κυτταρικές δομές, χάρις στο νερό που διογκώνει τη μήτρα του δείγματος και στο σύστημα νερού και αιθανόλης που ευνοεί τη διάλυση συστατικών ενδιάμεσης πολικότητας. Οπότε πιθανά τα περισσότερα φαινολικά συστατικά που εκχυλίζονται να είναι ενδιάμεσης πολικότητας (Aboulghazi et al., 2022). Έτσι, με τη χρήση υδατοαιθανολικού διαλύτη επιταχύνεται η διαλυτοποίηση ενδιάμεσης πολικότητας φαινολικών ουσιών (Xu et al., 2016). Επικρατεί λοιπόν, μειωμένη απόδοση στην εκχύλιση, όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης ξεπερνά το 60% (Dailey & Vuong, 2015). Παράλληλα, η αύξηση της ισχύος των υπερήχων προκαλεί αύξηση της απόδοσης των φαινολικών ενώσεων και της εκχύλισης των βιοενεργών ουσιών, όπως συμβαίνει και στις βέλτιστες συνθήκες που εφαρμόζεται ένταση υπερήχων 80% έναντι των συνθηκών που παρέχουν χαμηλά TPC, που εφαρμόζεται ένταση υπερήχων 20%. Φυσικά, η αύξηση της εντάσεως και της ισχύος υπερήχων πρέπει να διαθέτει και ένα όριο, διότι παρουσία υψηλής

περιεκτικότητας νερού, οι υπέρηχοι παράγουν ελεύθερες ρίζες και επιφέρουν αποδόμηση των φαινολικών συστατικών (Dzah et al., 2020). Τέλος, με την αύξηση της αναλογίας διαλύτη προς στερεή μάζα δείγματος έως 50:1 (mL/g), επηρεάζεται ο μηχανισμός της διάχυσης, ο οποίος στηρίζεται στη διαφορά της βαθμίδας συγκέντρωσης διαλύτη και στερεού δείγματος. Δηλαδή, όσο πραγματοποιείται προσθήκη διαλύτη, η διάχυση βρίσκεται σε εξέλιξη, έως ότου επέλθει η κατάσταση ισορροπίας, στην οποία το φαινολικό περιεχόμενο εντός του δείγματος έχει εξαντληθεί, λόγω της επιτυχούς εκχύλισής του. Η περαιτέρω αύξηση της αναλογίας, δεν ενισχύει την απόδοση της εκχύλισης, αυτό παρατηρείται στις συνθήκες εκχύλισης χαμηλού TPC, οι οποίες για αναλογία 60:1 (mL/g), δίνουν μειωμένες τιμές ανακτώμενων βιοδραστικών ουσιών. (Le et al., 2019).

4.4.2. Συσχέτιση φασματοφωτομετρικών μεθόδων μέσω του στατιστικού

Δείκτη Pearson's Correlation

Για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων των φασματοφωτομετρικών μεθόδων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Minitab και μελετήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson's Correlation Coefficient (PCC). Αυτός ο στατιστικός δείκτης, μετρά τη γραμμική συσχέτιση μεταξύ δύο διαφορετικών συνόλων δεδομένων. Πρόκειται για την αναλογία μεταξύ της συν-διακύμανσης δύο μεταβλητών και του προϊόντος των τυπικών αποκλίσεών τους. Το αποτέλεσμα μια κανονικοποιημένης μέτρησης συν-διακύμανσης, παίρνει τιμές μεταξύ -1 και +1.

- Δείκτης PCC = +1, εκφράζει τέλεια θετική γραμμική συσχέτιση (δηλαδή πρόκειται για ανάλογα μεγέθη).
 - Δείκτης PCC = -1, εκφράζει τέλεια αρνητική γραμμική συσχέτιση (δηλαδή πρόκειται για αντιστρόφως ανάλογα μεγέθη).
 - Δείκτης PCC = 0, εκφράζει ότι τα δύο σύνολα δεν συσχετίζονται στατιστικά.
- I. Στον Πίνακα 4.10 παρουσιάζονται οι τιμές του δείκτη PCC που βρέθηκαν κατά τη συσχέτιση των φασματοφωτομετρικών μεθόδων F-C, FRAP, ABTS^{•+} για **όλα τα δείγματα** N=22, δηλαδή τα παραπροϊόντα και τις δρόγες σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού.

Πίνακας 4.10: Συσχέτιση F-C, FRAP, ABTS** με το δείκτη PCC για όλα τα δείγματα, N=22

(Συμπεριλαμβάνονται οι δρόγες βασιλικού)

Μέθοδος	F-C	FRAP	ABTS
F-C	-	0,616	0,958
FRAP	0,616	-	0,655
ABTS	0,958	0,655	-

Κατά τη συσχέτιση των F-C και FRAP για όλα τα δείγματα (N=22), ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson (PCC) που προκύπτει είναι 0,616, υποδηλώνοντας μέτρια συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων κατά τη μέτρηση του TPC και της αναγωγικής ισχύος δειγμάτων ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων βασιλικού. Αυτό σημαίνει, ότι η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να μην οφείλεται αποκλειστικά στις φαινολικές ενώσεις που διαθέτει ο βασιλικός, αλλά και σε άλλα βιοδραστικά συστατικά του που συνεκχυλίζονται .

Για τη συσχέτιση των δύο μεθόδων F-C και ABTS, ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson (PCC) που προκύπτει είναι 0,958. Αυτό υποδηλώνει πολύ ισχυρή θετική γραμμική συσχέτιση, μεταξύ των πειραματικών αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων κατά τη μέτρηση του TPC και της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας δειγμάτων ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων. Συνεπώς, αποδεικνύεται ότι η αντιριζική δράση καθορίζεται από τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών.

Στη συσχέτιση των δύο μεθόδων FRAP και ABTS, για τις δρόγες και τα παραπροϊόντα σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού, ο δείκτης PCC λαμβάνει την τιμή 0,655. Η τιμή αυτή δηλώνει μια μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ των δυο μεθόδων, κατά τη μέτρηση της αναγωγικής ισχύος και της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας δειγμάτων ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων βασιλικού. Ποιοτικά αυτό σημαίνει, ότι η αντιριζική και αντιοξειδωτική δράση δεν καθορίζονται από τις ίδιες ενώσεις, ιδίως στη συγκεκριμένη περίπτωση που εξετάζονται δυο ποικιλίες και δρόγη και παραπροϊόν.

Βάσει των παραπάνω, συμπεραίνεται ότι το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο όλων των δειγμάτων, συσχετίζεται πολύ καλά με την αντιριζική δράση και διαθέτουν ανάλογη σχέση. Ενώ, η αντιοξειδωτική ικανότητα λόγω της μέτριας συσχέτισης με το TPC οφείλεται και σε άλλες ενώσεις των εκχυλισμάτων. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη συσχέτιση μεταξύ αντιριζικής και αντιοξειδωτικής ικανότητας, η οποία είναι μέτρια, υποδηλώνοντας ότι δεν επηρεάζονται από τις ίδιες ενώσεις.

- II. Στον Πίνακα 4.11, παρουσιάζονται οι τιμές του δείκτη PCC που βρέθηκαν κατά τη συσχέτιση των φασματοφωτομετρικών μεθόδων F-C, FRAP, ABTS** για τα **παραπροϊόντα** σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού, N=20.

Πίνακας 4.11: Συσχέτιση F-C, FRAP, ABTS με το δείκτη PCC για όλα τα παραπροϊόντα σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού, N=20 (Εξαιρέθηκαν οι δρόγες βασιλικού)**

Μέθοδος	F-C	FRAP	ABTS
F-C	-	0,738	0,956
FRAP	0,738	-	0,744
ABTS	0,956	0,744	-

Στη συσχέτιση των μεθόδων F-C και FRAP μελετήθηκαν μόνο τα παραπροϊόντα, N=20 δείγματα (Πίνακας 4.11). Ο συντελεστής συσχέτισης τους ισούται με 0,738, υποδηλώνοντας μια ικανοποιητική και καλή θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων κατά τη μέτρηση του TPC και της αναγωγικής ισχύος παραπροϊόντων βασιλικού. Αυτό αποδίδεται, στο γεγονός ότι εξετάστηκαν δείγματα που έχουν υποστεί την ίδια επεξεργασία, αυτή της υδροαπόσταξης. Επιπλέον, αυτή η επεξεργασία μπορεί να προκάλεσε αλλαγές στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση, παρουσιάζοντας μια πιο ενιαία χημική σύνθεση, σε αντίθεση με τα δείγματα δρόγης σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού, που δεν έχουν υποστεί κάποια περαιτέρω επεξεργασία.

Στη συσχέτιση των μεθόδων F-C και ABTS που υποβλήθηκαν τα παραπροϊόντα, ο συντελεστής συσχέτισης λαμβάνει την τιμή 0,956. Από τα παρεχόμενα αποτελέσματα, προκύπτει μια πολύ ισχυρή θετική γραμμική συσχέτιση (Correlation) μεταξύ των δύο μεθόδων. Αυτό δικαιολογείται, διότι η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ παραπροϊόντων, δηλαδή διεγμάτων που έχουν υποστεί την ίδια επεξεργασία, της υδροαπόσταξης. Ακόμα, επιβεβαιώνεται και το εύρημα που λήφθηκε με τη συσχέτιση F-C και ABTS για όλα τα δείγματα (Πίνακας 4.10), δηλαδή ότι η αντιριζική ικανότητα είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου.

Κατά τη συσχέτιση των δύο μεθόδων FRAP και ABTS για τα παραπροϊόντα σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού, ο δείκτης PCC ισούται με 0,744. Ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson (PCC) παρουσιάζει θετική συσχέτιση μεταξύ των δυο μεθόδων, κατά τη μέτρηση της αναγωγικής ισχύος και της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας

των παραπροϊόντων. Αυτό αναδεικνύει ότι η αντιοξειδωτική και αντιριζική ικανότητα των παραπροϊόντων συσχετίζονται σε καλύτερο επίπεδο, από ότι το σύνολο των δειγμάτων (δρόγες και παραπροϊόντα). Παρόλο που η σχέση είναι θετική, η τιμή της συσχέτισης παραμένει λιγότερο ισχυρή, υποδηλώνοντας ότι οι αντιριζικές και αντιοξειδωτικές δράσεις δεν αποδίδονται στις ίδιες ενώσεις, παρά το γεγονός ότι η συγκεκριμένη συσχέτιση διεξήχθη σε δείγματα παραπροϊόντων που έχουν υποστεί την ίδια επεξεργασία.

Συμπερασματικά, η συσχέτιση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των παραπροϊόντων με την αναγωγική ισχύ και την αντιριζική τους δράση είναι περισσότερο ικανοποιητική συγκριτικά με τη συσχέτιση μεταξύ όλων των δειγμάτων (δρόγες & παραπροϊόντα), λόγω της κοινής τους επεξεργασίας, της υδροπόσταξης. Ακόμη, επιβεβαιώνονται τα πορίσματα της συσχέτισης όλων των δειγμάτων, δηλαδή ότι η αντιριζική ιδιότητα και το φαινολικό περιεχόμενο είναι ευθέως ανάλογα, καθώς η αντιοξειδωτική δράση δεν επηρεάζεται τόσο από το φαινολικό περιεχόμενο, αλλά από άλλες ενώσεις που συνεκχυλίζονται.

Κεφάλαιο 5: Ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS)

Το φυτοχημικό προφίλ των παραπροϊόντων υδροαπόσταξης αιθέριων ελαίων βασιλικού αναλύθηκε με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας, συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Ο κύριος στόχος αυτής της ανάλυσης είναι η ποιοτική και συγκριτική ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τυχόν μελλοντικές χρήσεις σε άλλα προϊόντα.

Τα δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία δειγμάτων ονομάστηκε ως «Best» και αφορούσε τα εκχυλίσματα που είχαν προκύψει από τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης (20% v/v αιθανόλη, 10 min χρόνος εκχύλισης, 49,5 mL/g αναλογία διαλύτη/υλικού και 80% ονομαστικής έντασης υπερήχων). Αντίθετα, η δεύτερη κατηγορία δειγμάτων ονομάστηκε ως «Low» και αφορούσε τα εκχυλίσματα που είχαν προκύψει από τις χαμηλές συνθήκες εκχύλισης (100% v/v αιθανόλη, 25 min χρόνος εκχύλισης, 60 mL/g αναλογία διαλύτη/υλικού και 50% ένταση υπερήχων). Η ακριβής κωδικοποίηση του κάθε δείγματος έγινε με τον τρόπο που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.1: Επεξήγηση της κωδικοποίησης δειγμάτων παραπροϊόντων επεξεργασίας βασιλικού για την ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο LC-MS/MS.

Κωδικοποιημένο δείγμα	Ποικιλία παραπροϊόντος βασιλικού	Ημερομηνία συγκομιδής	Συνθήκες Εκχύλισης
BΣ16-9B	Σγουρός	16/09/2022	Βέλτιστες (Best)
BΣ16-9L	Σγουρός	16/09/2022	Χαμηλές (Low)
BΣ15-10B	Σγουρός	15/10/2022	Βέλτιστες (Best)
BΣ15-10L	Σγουρός	15/10/2022	Χαμηλές (Low)
Π19B	Πλατύφυλλος	19/10/2022	Βέλτιστες (Best)
Π19L	Πλατύφυλλος	19/10/2022	Χαμηλές (Low)
Π20B	Πλατύφυλλος	20/10/2022	Βέλτιστες (Best)
Π20L	Πλατύφυλλος	20/10/2022	Χαμηλές (Low)
Π1B	Πλατύφυλλος	Άγνωστη	Βέλτιστες (Best)
Π1L	Πλατύφυλλος	Άγνωστη	Χαμηλές (Low)

Η ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων, πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τα ληφθέντα φάσματα με αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα (Beltrán-Noboia et al., 2022; Darrag et al., 2022; Farag et al., 2016; Pandey & Kumar, 2016). Με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Analyst version 1.6 (SCIEX, USA), εντοπίστηκαν συνολικά 64 ενώσεις οι οποίες ταξινομούνται σε 14 γλυκοζίτες, 13 φαινολικά οξέα, 6 υδροξυ-λιπαρά οξέα, 7 σαλβιανολικά οξέα, 6 εστέρες, 5 φλαβονοειδή, 2 παράγωγα φαινολικών οξέων, 2 τερπενοειδή, 1 αιθέρα, 1 λιγνάνη, 1 λιπαρό οξύ και άλλες 6 οργανικές ενώσεις.

Το λιπαρό οξύ που ανιχνεύθηκε είναι το παλμιτικό, ενώ τα ταυτοποιηθέντα υδροξυ-λιπαρά οξέα είναι το dihydroxy-oleanenoic acid, hydroxy-octadecatrienoic acid, dihydroxy-octadecadienoic acid, dihydroxy-octadecatrienoic acid, hydroxy-oxo-phytodienoic acid, trihydroxy-octadecendic acid. Αν και είχε δοθεί έμφαση στο φαινολικό περιεχόμενο, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι εντοπίστηκαν τα παραπάνω υδροξυ-λιπαρά οξέα και το παλμιτικό οξύ. Η ύπαρξη των ομάδων υδροξυλίου καθιστά τα υδροξυ-λιπαρά οξέα σχετικά πολικά και έτσι μπορεί να διευκολυνθεί η συνεκχύλιση τους με έναν υδατοαιθανολικό διαλύτη εκχύλισης. Όπως έχει αναφερθεί και στην Ενότητα 3.3 (σελ. 53), στην μέθοδο LC-MS/MS χρησιμοποιήθηκε ο αρνητικός ιοντισμός. Με βάση αυτό, επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση των υδροξυ-ξέων διότι οι ομάδες των υδροξυλίων μπορούν να ιοντιστούν αρνητικά πιο εύκολα. Μία πιθανή εξήγηση για την ύπαρξη των υδροξυ-λιπαρών οξέων μπορεί να είναι ότι προέκυψαν ως τμήμα κάποιου εστέρα που αποικοδομήθηκε κατά την εκχύλιση. Μία άλλη πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι ότι αυτές οι ενώσεις βρίσκονται ελεύθερες σε κάποιο μεταβολομικό μονοπάτι του βασιλικού.

Πίνακας 5.2: Συνολική παρουσίαση των ταυτοποιηθέντων φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα "Best" & "Low" των παραπροϊόντων βασιλικού

Όνομασία ένωσης	Μητρικό ιόν [M-H] ⁻ (m/z)	Best	Low
Palmitic acid	255,2	✓	✓
Dihydroxy-oleanenoic acid	471,4	✓	✗
hydroxy-octadecatrienoic acid	293,2	✓	✓
Unknown triterpene	487,3	✓	✗
Dihydroxy-octadecadienoic acid	311,2	✓	✓
Dihydroxy-octadecatrienoic acid	309,2	✓	✓
Hydroxy-oxo-phytodienoic acid	307,2	✓	✓
Dihydroxy dimethoxyflavone	313,1	✓	✓
Trihydroxy-octadecendic acid	329,1	✓	✗
Apigenin	269,0	?*	✗
Unknown triterpene glucoside	679,4	✓	✗
Salvianolic acid C	491,1	✓	✓
1-octen-yl pentosyl glucoside	421,2	✓	✗
Caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether)	487,1	✓	✓
Isoquercetin	463,1	✓	✓
O-caffeoyl rosmarinic acid (isomelitric acid A)	537,1	✓	✗
Quercetin-O-pentosyl-glucoside	595,1	✓	✗
Hydroxy jasmonic acid-O-glucoside	387,2	✓	✓
Unknown caffeoyl ester	193,0	✓	✗
Rosmarinic acid-O-glucoside	521,1	✓	✗

Dihydroxybenzoic acid-O-pentosyl pentoside	447,1	✓	✗
3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid glucoside	359,1	✓	✓
Salvianic acid (danshensu)	197,0	✓	✓
Ethyl caffeate	207,1	✓	✗
Vanillic acid	167,0	✓	✓
Ferulic acid	325	✓	✓
Methyl protocatechuate	167,0	✓	✓
Rosmarinic acid	521,1	✓	✓
p-Coumaric acid	163,0	✓	✓
Methyl gallate	183,0	✓	✗
p-Hydroxybenzoic acid	137,0	✓	✓
Caffeic acid	359,7	✓	✓
Protocatechuic acid	153,1	✓	✓
Ethyl protocatechuate	167,0	✓	✓
Chlorogenic acid	353,1	✓	✓
Gallic acid	169,0	✗	✓
Galloylglucose	331,1	✓	✓
Rosmarinic acid derivate	671, 509, 359	✓	✓
Methyl lithospermate	551, 519	✓	✗
2,3,12-trihydroxy-4,6a,6b,11,12,14b-hexamethyl-8a-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxycarbonyl-1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,11,12a,14, 14a-tetradecahydronicene-4-carboxylic acid derivate	679	✓	✗
Salvianolic acid G	519	✓	✗
Salvianolic acid B	717,2	✓	✗

Lithospermic acid A	537	✓	✗
Salvianolic acid A	493	✓	✓
Sagerinic acid	359	✓	✓
Quercetin 3-O-glucoside	463	✓	✓
Rutin	609, 301	✓	✓
Quercetin-3-O-apiosyl (1–2) galactoside	595	✓	✓
Chicoric acid	473, 311	✓	✓
2-Hydroxy-6-[2-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-methyl-phenoxy]-3-(3-methylbut-2-enyl)benzoic acid	357, 313	✓	✓
Caffeoyl-dihydroxyphenyllactoyltartaric acid	491	✓	✓
Ferulic acid pentoside	325	✓	✓
Nepetoidin glucoside	475,1	✓	✗
Rosmarinic acid glucoside B	521,1	✓	✗
Rosmarinic acid glucoside A	521,1	✓	✗
Salvigenin (5-Hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone)	327,2	✓	✓
Salvianolic acid F	313,1	✓	✓
Salvianolic acid K	555,1	✓	✗
Salvianolic acid H/I	537,1	✓	✓
Fertaric acid (feruloyltartaric acid)	325,1	✓	✓
Caftaric acid (Caffeoyl-tartaric acid)	311,0	✓	✓
Isocitric acid	191,0	✗	✓

**Με ? σημειώνονται οι ενώσεις που εντοπίστηκαν σε χαμηλές εντάσεις, στα όρια του θορύβου του οργάνου*

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5.2, στα «Best» δείγματα ανιχνεύθηκαν 62 φαινολικές ενώσεις, ενώ στα «Low» δείγματα ανιχνεύθηκαν 41 ενώσεις. Στο Γράφημα 5.1 και στο Γράφημα 5.2 φαίνονται τα συνολικά ραβδογράμματα, στα οποία παρουσιάζονται οι κανονικοποιημένες εντάσεις των μητρικών ιόντων των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα «Best» και «Low», αντίστοιχα. Στα «Best», οι περισσότερες ενώσεις έχουν ικανοποιητικές εντάσεις οι οποίες δηλώνουν ένα αυξημένο περιεχόμενο. Αν και στα «Low» εντοπίζονται 41 ενώσεις, οι περισσότερες ενώσεις απ' αυτές έχουν αρκετά χαμηλές κανονικοποιημένες εντάσεις οι οποίες δηλώνουν μία τάση για ένα μικρότερο φαινολικό περιεχόμενο. Τα παραπάνω, έρχονται να επιβεβαιώσουν το υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο στα «Best» και το γεγονός ότι στα «Low» υπάρχει δυσκολία στον προσδιορισμό του TPC με την μέθοδο της F-C.

Συγκρίνοντας το Γράφημα 5.1 και Γράφημα 5.2, γίνεται εμφανές ότι οι δύο κατηγορίες εκχυλισμάτων παρουσιάζουν ένα πολύ διαφορετικό προφίλ ενώσεων, το οποίο μπορεί να αποδοθεί στις αρκετά διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης. Στην περίπτωση των «Best», οι κυρίαρχες κατηγορίες ενώσεων είναι οι γλυκοζίτες (14 ενώσεις), τα φαινολικά οξέα (12 ενώσεις) και τα σαλβιανολικά οξέα (7 ενώσεις). Αντίθετα, στην περίπτωση των «Low», δεν υπάρχει ιδιαίτερη ποικιλία ενώσεων και η κυρίαρχη ομάδα είναι τα φαινολικά οξέα (13 ενώσεις). Τα περισσότερα φαινολικά οξέα, στις χαμηλές συνθήκες, εντοπίζονται σε μικρές εντάσεις. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι έντονες συνθήκες εκχύλισης, δηλαδή οι αυξημένοι χρόνοι και εντάσεις υπερήχων, μπορούν να οδηγήσουν στην καταστροφή ή αποδόμηση ευαίσθητων φαινολικών ενώσεων όπως είναι οι γλυκοζίτες και οι εστέρες (Aloisio et al., 2023). Στις «Best» συνθήκες εντοπίζονται 14 γλυκοζίτες και 6 εστέρες, ενώ στις «Low» συνθήκες ανιχνεύονται 6 γλυκοζίτες και 2 εστέρες. Αν και η ένταση των υπερήχων είναι μικρότερη (50%) έναντι των «Best» (80%), ο χρόνος εκχύλισης στα «Low» δείγματα είναι υψηλότερος (25min) και φαίνεται να επηρεάζει καθοριστικά την αποδόμηση των γλυκοζιτών και των εστέρων σε πιο απλές ενώσεις. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα φαινολικά οξέα εντοπίζονται τόσο στα «Best», όσο και στα «Low» δείγματα. Ωστόσο, στα «Best» δείγματα ταυτοποιούνται οξέα με μεγαλύτερες κανονικοποιημένες εντάσεις οι οποίες υποδηλώνουν το αυξημένο περιεχόμενο στα συγκεκριμένα δείγματα. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί τα φαινολικά οξέα έχουν σχετικά μικρό μοριακό βάρος, το οποίο τους επιτρέπει την εύκολη ανάκτηση τους σε μικρότερους χρόνους. Επιπλέον, τα φαινολικά οξέα διαθέτουν μια μέτρια πολικότητα και έτσι μπορούν να εκχυλιστούν καλύτερα σε

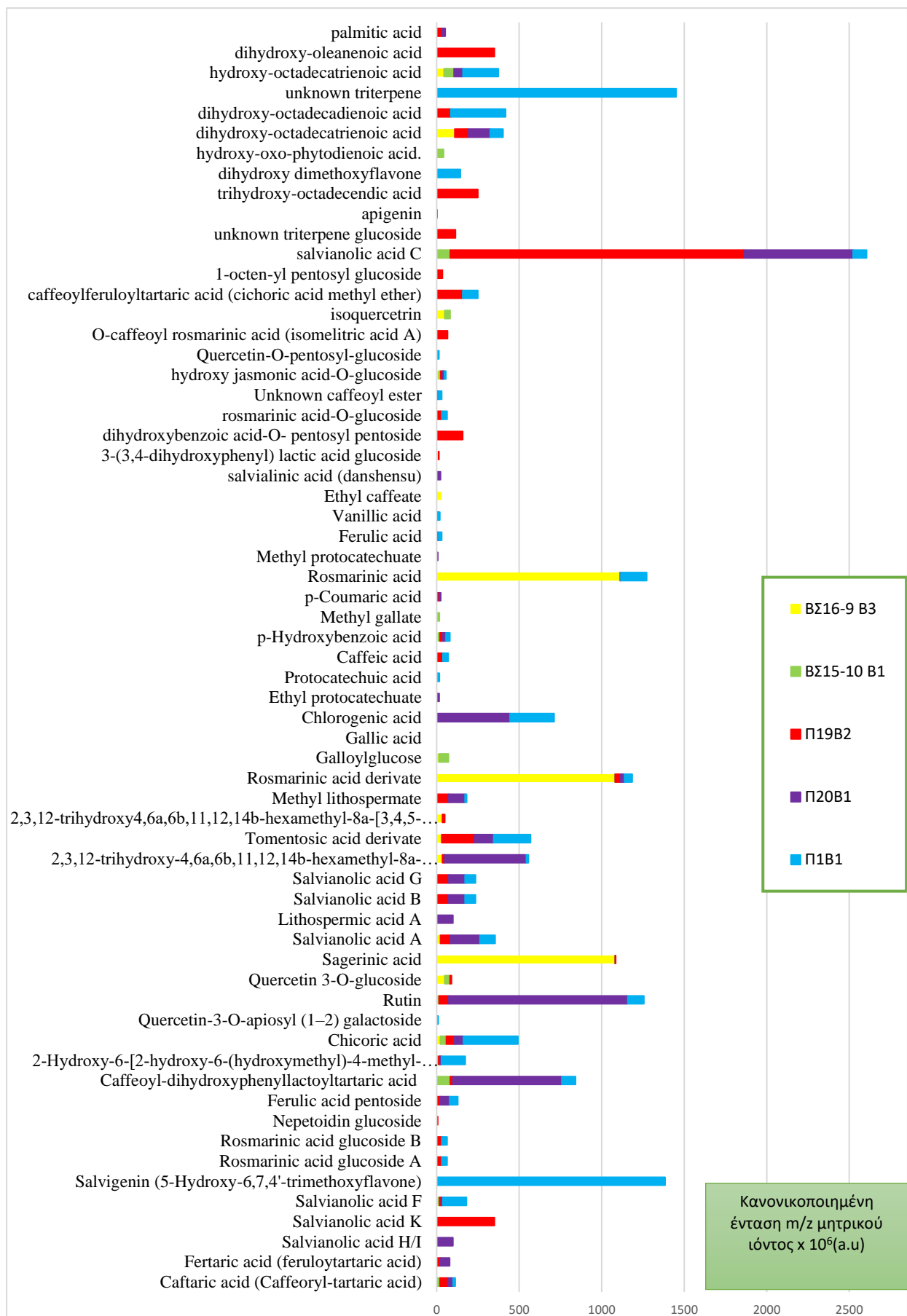
περιβάλλον που πλησιάζει την πολικότητα τους, όπως γίνεται στα δείγματα «Best» (20% αιθανόλη – 80% νερό). Σε αντίθεση, στα δείγματα «Low» που η πολικότητα του διαλύτη εκχύλισης είναι υψηλότερη (100% v/v αιθανόλη), η εκχύλιση των φαινολικών οξέων δυσκολεύεται.

Με φθίνουσα σειρά, οι πιο χαρακτηριστικές ενώσεις για τα «Best» δείγματα είναι τα: Salvianic acid C (φαινολικό οξύ), Unknown triterpene (τερπένιο), Salvigenin (φλαβονοειδές), Rosmarinic acid (φαινολικό οξύ), Rutin (φλαβονοειδές), Rosmarinic acid derivate (παράγωγα φαινολικού οξέος). Η περισσότερο υδατική φύση των εκχυλισμάτων Best (20% EtOH και 80% H₂O) ευνόησε την εκχύλιση των υδατοδιαλυτών φαινολικών ενώσεων, όπως αναδεικνύεται από τα ταυτοποιημένα οξέα. Από την άλλη, για τα «Low» δείγματα, οι ενώσεις που φαίνεται να έχουν μία τάση για υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο είναι το fertaric acid, caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether), hydroxy-octadecatrienoic acid και το ferulic acid pentoside. Η πιο χαρακτηριστική ένωση που έχει την μεγαλύτερη κανονικοποιημένη ένταση είναι το fertaric acid. Οι ενώσεις fertaric acid και ferulic acid pentoside είναι παράγωγα του ferulic acid. Το ferulic acid εντοπίζεται μόνο στο δείγμα P19L1 σε πολύ χαμηλή κανονικοποιημένη ένταση. Αν και τα φαινολικά οξέα φαίνεται να είναι η πιο χαρακτηριστική ομάδα για τις χαμηλές συνθήκες εκχύλισης, παρατηρείται ότι εντοπίζονται 5 λιπαρά οξέα και 1 λιπαρό οξύ (hydroxy-oxo-phytodienoic acid, dihydroxy-octadecatrienoic acid, dihydroxy-octadecadienoic acid, palmitic acid). Ακόμα, μεταξύ άλλων, εντοπίζονται 4 φλαβονοειδή (Salvigenin, Rutin, isoquercetin και dihydroxy dimethoxyflavone) και 6 γλυκοζίτες (Ferulic acid pentoside, Quercetin-3-O-apiosyl (1–2) galactoside, Quercetin 3-O-glucoside, Galloylglucose, 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid glucoside, hydroxy jasmonic acid-O-glucoside).

Συγκρίνοντας τον σγουρό και τον πλατύφυλλο για τα «Best» δείγματα, παρατηρούνται διαφορές στο φαινολικό προφίλ. Αρχικά, ο πλατύφυλλος βασιλικός παρουσιάζει μια μεγαλύτερη ποικιλία ενώσεων από τον σγουρό βασιλικό, κάτι το οποίο συνάδει με τα αποτελέσματα της TPC. Τα salvianolic acids αποτελούν χαρακτηριστικές ενώσεις για τον πλατύφυλλο βασιλικό, καθώς ανιχνεύονται σε όλα τα δείγματα αυτής της ποικιλίας. Μάλιστα, το Salvianolic acid C είναι κυρίαρχο στο δείγμα P19 B2. Ακόμα, το φλαβονοειδές Salvigenin παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή ένταση σε ένα δείγμα πλατύφυλλου και πιο συγκεκριμένα στο P1B1. Απ' την άλλη, το ροσμαρινικό οξύ και παράγωγα του είναι είναι χαρακτηριστικές φαινολικές ενώσεις για τον σγουρό βασιλικό.

Σε σύγκριση με τον σγουρό βασιλικό, ο πλατύφυλλος εμφάνισε υψηλότερες τιμές αντιριζικής δράσης (ABTS^{•+}). Το πλούσιο φαινολικό προφίλ που ταυτοποιήθηκε στα «Best» δείγματα μπορεί να οφείλεται για την ικανή δέσμευση των ελεύθερων ριζών. Μάλιστα, τα δείγματα με την υψηλότερη αντιριζική δράση είναι το Π20Β1 (65,8 TE στο ξηρό δείγμα mg/ g dry herb) και το Π1Β1 (72,2 TE στο ξηρό δείγμα mg/ g dry herb). Οι ενώσεις που πιθανόν να είναι υπεύθυνες για αυτή την υψηλότερη δράση είναι το Chlorogenic acid, τα Salvianolic acids, η Rutin και η Salvigenin. Αυτές τις ενώσεις, φαίνεται να έχουν μία τάση για αυξημένο περιεχόμενο στα δείγματα Π20Β1 & Π1Β1. Σε όλα τα «Low» δείγματα, η αντιοξειδωτική δράση είναι μικρή χωρίς να εμφανίζεται κάποια στατιστικά σημαντική ($p \leq 0,05$) διαφορά μεταξύ των δειγμάτων. Αφού φαίνεται να μην υπερτερεί κάποιο δείγμα, τα φαινολικά συστατικά που εντοπίστηκαν σε υψηλές κανονικοποιημένες εντάσεις στα «Low», δηλαδή το fertaric acid, το caffeoylferuloyltartaric acid, το hydroxy-octadecatrienoic acid και το ferulic acid pentoside, ενδεχομένως να μην επηρεάζουν ιδιαίτερα την αντιριζική δράση.

Σε αντίθεση με το TPC και την αντιριζική δράση, η αντιοξειδωτική δράση (FRAP) εμφανίζεται υψηλότερη σε δείγμα σγουρού βασιλικού και πιο συγκεκριμένα στο ΒΣ15-10 Β1. Για το συγκεκριμένο δείγμα, το φυτοχημικό προφίλ (Γράφημα 5.1) φαίνεται να μην παρουσιάζει ούτε κάποια ποικιλία ενώσεων, ούτε κάποια ένωση που να έχει έντονη ή χαρακτηριστική ένταση. Σύμφωνα, με τα αποτελέσματα της συσχέτισης του Pearson, η μέθοδος FRAP και F-C διαθέτουν μικρό συντελεστή συσχέτισης (0,616). Αυτό υποδηλώνει ότι η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται σε επιπλέον ενώσεις που δεν κατατάσσονται απαραίτητα στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και δεν είναι φαινολικά συστατικά ή παράγωγα τους, είναι κυρίως λιπαρά οξέα και παράγωγα αυτών. Τα τελευταία, φαίνεται να μην μπορούν να αιτιολογήσουν την αυξημένη αντιοξειδωτική δράση λόγω της απουσίας στο δείγμα ΒΣ15-10 Β1 ή λόγω πολύ χαμηλής έντασης (hydroxy-oxo-phytyldienoic acid). Επομένως, ενώσεις που δεν ανιχνεύθηκαν με την μέθοδο της LC-MS/MS μπορεί να είναι υπεύθυνες για την υψηλή τιμή της FRAP του δείγματος ΒΣ15-10 Β1.



Γράφημα 5.1: Ραβδόγραμμα στο οποίο αναπαρίστανται οι ταυτοποιημένες ενώσεις στα «Best» δείγματα



Γράφημα 5.2: Ραβδόγραμμα στο οποίο αναπαρίστανται οι ταυτοποιημένες ενώσεις στα «Low» δείγματα

Η ημερομηνία συγκομιδής αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει το φυτοχημικό προφίλ των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν στις «Best» και «Low» συνθήκες. Παρατηρείται ότι τα δείγματα που συγκομίστηκαν αρχές φθινοπώρου, μπορεί να μην διαθέτουν μεγάλη ποικιλία ενώσεων, αλλά όσες περιορισμένες ενώσεις υπάρχουν εμφανίζονται σε αρκετά μεγάλα περιεχόμενα συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Για παράδειγμα, στις «Best» συνθήκες το *rosmarinic acid* εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο δείγμα σγουρού βασιλικού, που συγκομίστηκε 16 Σεπτεμβρίου 2022 (BΣ16-9 B3) και στις «Low» συνθήκες το *caffeoylferuloyltartaric acid* ανιχνεύεται σε ικανοποιητικό περιεχόμενο στο δείγμα σγουρού βασιλικού, που συγκομίστηκε 16 Σεπτεμβρίου 2022 (BΣ16-9 L1). Ενώ, δείγματα που συγκομίστηκαν τέλη φθινοπώρου, φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλία ενώσεων, άρα πιο πλούσιο φυτοχημικό προφίλ με ικανοποιητική περιεκτικότητα σχεδόν σε όλες τις ενώσεις, όπως συμβαίνει στα δείγματα «Best» πλατύφυλλου βασιλικού που συγκομίστηκε 20 Οκτωβρίου 2022 (P20B1), P1B1 και αντίστοιχα στα δείγματα «Low» πλατύφυλλου βασιλικού που συγκομίστηκαν 19 και 20 Οκτωβρίου 2022 (P19L1 & P20L2) και P1L1. Γενικά, επιστημονικές έρευνες έχουν καταγράψει ότι η συγκομιδή που πραγματοποιείται κατά το μήνα Οκτώβριο αποφέρει υψηλότερες τιμές φαινολικών ουσιών, σε σύγκριση με τους καλοκαιρινούς μήνες (Gavrić et al., 2021). Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι ο βασιλικός είναι ένα θερμοφιλό φυτό με βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης 25-30°C. Σημαντικές αποκλίσεις από αυτές τις θερμοκρασίες ανάπτυξης προκαλούν αβιοτικό στρες στο φυτό. Το αβιοτικό στρες είναι μια συνθήκη που ενεργοποιεί στο φυτό αμυντικούς μηχανισμούς και οδηγεί στη σύνθεση αυξημένων ποσοτήτων δευτερογενών ενώσεων (π.χ. φαινολικές ενώσεις) που δρουν προστατευτικά για το φυτό. Άλλοι αβιοτικοί παράγοντες που αυξάνουν την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών είναι η ξηρασία του εδάφους, η έλλειψη επαρκούς υγρασίας, η μεταβολή του pH εδάφους από το βέλτιστο 5,5-6,5 και η υπεριώδης ακτινοβολία UVB (Mosadegh et al., 2018; Nam et al., 2020). Μία τελευταία παράμετρος που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την συμπεριφορά, αλλά και την χημική σύσταση των φυτών είναι η γεωγραφία της περιοχής. Αυξάνοντας το υψόμετρο, αυξάνεται και η έκθεση των φυτών στην ηλιακή ακτινοβολία. Έτσι, στην προσπάθεια τους να προσαρμοστούν και να αντιμετωπίσουν την UV ακτινοβολία, τα φυτά οδηγούνται στην συσσώρευση μεγαλύτερων ποσοτήτων φαινολικών συστατικών (Kaur et al., 2016).

Συνοψίζοντας, λόγω της έντονης διαφοροποίησης στο φυτοχημικό προφίλ μεταξύ των διαφορετικών φυτικών υποστρωμάτων, είναι εφικτό να προσαρμοστούν οι συνθήκες

εκχύλισης με στόχο την παραλαβή ενός εκχυλίσματος, που ενδεχομένως δεν περιλαμβάνει ευρεία ποικιλία φαινολικών ενώσεων, αλλά διαθέτει σε υψηλές ποσότητες επιθυμητές φαινολικές ουσίες με δράσεις που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Για παράδειγμα, εάν ένα αναλυτικό εργαστήριο ή μια βιομηχανία σε μεγαλύτερη κλίμακα επιδιώκουν την απομόνωση του ροσμαρινικού οξέος, το οποίο είναι το μόνο εγκεκριμένο από τη νομοθεσία, η επιλογή της χρήσης μόνο του σγουρού βασιλικού σε συνδυασμό με τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης (20%v/v αιθανόλη, 10min χρόνο εκχύλισης και 80% ισχύς υπερήχων) είναι εφικτή και αποτελεσματική. Αυτό πρακτικά, παρέχει τη δυνατότητα να προσαρμόζουμε τις συνθήκες εκχύλισης, σύμφωνα με το επιθυμητό προφίλ που θέλουμε να ανακτήσουμε.

Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα

Η παρούσα πτυχιακή εργασία, επικεντρώνεται στην εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης φαινολικών ενώσεων, από δείγματα ξηρών δρόγων και παραπροϊόντων υδροαπόσταξης αιθέριων ελαίων από δύο είδη βασιλικού (Σγουρός ή *Ocimum basilicum* var. *Minimum* & Πλατύφυλλος ή *Ocimum basilicum* var. *Genovese*) με τη βοήθεια υπερήχων (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE) και την αξιοποίηση του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken. Εκτιμήθηκαν χαρακτηριστικές ιδιότητες και δράσεις των εκχυλισμάτων, όπως το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC), η αντιοξειδωτική δράση (FRAP) και η ικανότητα ανάσχεσης της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+} των εκχυλισμάτων, οι οποίες μετρήθηκαν με φασματοφωτομετρικές δοκιμές. Τέλος, αξιολογήθηκε το φυτοχημικό προφίλ επιλεγμένων εκχυλισμάτων μέσω ποιοτικής και συγκριτικής ανάλυσης με χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την παραπάνω μελέτη, απορρέουν τα εξής συμπεράσματα:

➤ Σχετικά με τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken:

- Οι τιμές του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) κυμαίνονται από 0,19 έως 20,10 mg GAE/g dry basil.
- Εφαρμόζοντας την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, απορρίφθηκαν οι μη στατιστικά σημαντικοί όροι που είχαν $p \geq 0,20$. Αποφεύγοντας να αφαιρεθούν αδιακρίτως όλοι όροι που είχαν $p >> 0,05$, επιτεύχθηκε η διατήρηση της ιεραρχίας του μοντέλου.
- Κρίνοντας από τους στατιστικούς δείκτες R^2 (85,65%), $R^2(\text{adj})$ (78,05%) και την p -value του όρου Lack-of-Fit (έλλειψη προσαρμοστικότητας) (0,955) το πειραματικό μοντέλο θεωρείται αξιόπιστο. Σύμφωνα με τον όρο $R^2(\text{pred})$, το μοντέλο προβλέπει αξιόπιστα σε ποσοστό 59,04%.
- Με βάση τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση των τριών κεντρικών σημείων ($13,1 \pm 5,2$ mg GAE/g dry basil), το μοντέλο Box-Behnken φαίνεται να μην είναι ιδιαίτερα αναπαραγωγίμο. Για αυτό, ίσως ευθύνεται το γεγονός ότι τα πειράματα παρουσίασαν μία ανομοιομορφία ως προς τις τελικές θερμοκρασίες εκχύλισης.

- Ως βέλτιστη λύση για την απόκριση του ολικού φαινολικού περιεχομένου, επιλέχθηκε η εκχύλιση με συνθήκες: Συγκέντρωση αιθανόλης 20% v/v, χρόνος εκχύλισης 10 λεπτά, αναλογία διαλύτη/υλικού 49,5 mL/g και ποσοστό ονομαστικής έντασης λειτουργίας των υπερήχων 80%.
 - Οι στατιστικά σημαντικοί όροι ($p \geq 0,05$) είναι ο γραμμικός όρος της συγκέντρωσης της αιθανόλης (% v/v) (A), η αλληλεπίδραση της αναλογίας διαλύτη/υλικού (mL/g) με την ένταση των υπερήχων (%) (BD), ο τετραγωνικός όρος της αναλογίας διαλύτη/υλικού (mL/g) (CC) και ο τετραγωνικός όρος της συγκέντρωσης της αιθανόλης (% v/v) (AA)
 - Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο επηρεάζεται καθοριστικά από τη συγκέντρωση της αιθανόλης στον διαλύτη εκχύλισης (% v/v). Η μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης προκαλεί αύξηση του TPC.
 - Η εφαρμογή υψηλών τιμών εντάσεων για μεγάλα χρονικά διαστήματα εκχύλισης οδηγεί στην υποβάθμιση και αποκοδόμηση των φαινολικών συστατικών.
- Αναφορικά με την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών στα παραπροϊόντα και τη συγκριτική μελέτη της απόδοσης τους με τις δρόγες. Οι ξηρές δρόγες σγουρού και πλατύφυλλου βασιλικού, εμφανίζουν υψηλότερη απόδοση στις μεθόδους F-C, FRAP, ABTS συγκριτικά με τα παραπροϊόντα τους, αποδεικνύοντας ότι οι επεξεργασίες που υφίστανται τα παραπροϊόντα, έχουν αντίκτυπο στη χημική σύνθεση και τις βιοενεργές ιδιότητές τους. Ορισμένες φαινολικές ενώσεις, ενδέχεται να καταστρέφονται στις υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούν στο στάδιο της υδροαπόσταξης και παράλληλα τα πολικότερα και μικρότερα φαινολικά μόρια που είναι πιο υδατοδιαλυτά, πιθανώς να εκχυλίζονται εντός του νερού που βράζει και να μην παραμένουν στο φυτικό υπόστρωμα. Ακόμα, οι βοτανικές διαφορές των δυο ποικιλιών και η ημερομηνία συγκομιδής, φαίνονται να επηρεάζουν την απόδοσή τους με τον εξής τρόπο:
- Ο **σγουρός** βασιλικός διαθέτει υψηλότερη **αντιοξειδωτική** δράση (μέγιστες τιμές που λήφθηκαν για τη δρόγη: $204,20 \pm 11,26 \text{ mgFe}^{+2}/\text{g}$ και για ΒΣ15-10Β: $162,59 \pm 6,22 \text{ mgFe}^{+2}/\text{g}$), σε σχέση με τον πλατύφυλλο (μέγιστες τιμές που λήφθηκαν για τη δρόγη: $56,91 \pm 2,47 \text{ mgFe}^{+2}/\text{g}$ και για Π20Β: $136,21 \pm 1,83 \text{ mgFe}^{+2}/\text{g}$).
 - Ο **πλατύφυλλος** εμφανίζει μεγαλύτερη **αντιριζική** δράση σύμφωνα με τις τιμές που λήφθηκαν στην μέθοδο ABTS (μέγιστες τιμές για τη δρόγη: $72,22 \pm 0,38$

mgTE/g και Π1B:71,1±6,5 mgTE/g) σε σχέση με το σγουρό (μέγιστες τιμές για τη δρόγη: 49,1 ± 2,1 mgTE/g και για ΒΣ15-10B:40,3 ± 4,0 mgTE/g).

- Ο **πλατύφυλλος** παρουσιάζει μεγαλύτερη **ολική φαινολική περιεκτικότητα** TPC (μέγιστες τιμές που λήφθηκαν για τη δρόγη:26,8 ± 1,5 mgGAE/g και για Π20B:25,2 ± 1,3 mgGAE/g), συγκριτικά με το σγουρό (μέγιστες τιμές για τη δρόγη:15,0 ± 0,5 mgGAE/g και για ΒΣ16-9:13,19 ± 0,36 mgGAE/g) .
 - Τα παραπροϊόντα βασιλικού που συγκομίστηκαν τέλη φθινοπώρου, παρουσιάζουν υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο, έναντι αυτών που συλλέχθηκαν αρχές φθινοπώρου.
 - Η αυξημένη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων, δεν συνεπάγεται απαραίτητα με την αυξημένη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση. Οι φαινολικές ενώσεις του βασιλικού ποικίλουν ως προς τη δομή και τη δράση τους .
- Σύμφωνα με το συντελεστή συσχέτισης Pearson Correlation, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων F-C, FRAP, ABTS τόσο σε παραπροϊόντα όσο και σε όλα τα δείγματα και αποδείχτηκε:
- **Αναλογική** σχέση ανάμεσα στο **φαινολικό περιεχόμενο** του υποστρώματος και την **αντιριζική** ικανότητα, αφού ο δείκτης PCC για όλα τα δείγματα ισούται με 0,958 και 0,956 για τα παραπροϊόντα.
 - Η αντιοξειδωτική δράση επηρεάζεται και από άλλες ενώσεις που συνεκχυλίζονται, πέρα των φαινολικών συστατικών, αφού οι τιμές που έλαβε ο δείκτης PCC ήταν 0,616 και 0,738 για όλα τα δείγματα και τα παραπροϊόντα αντίστοιχα.
 - Η αντιριζική και αντιοξειδωτική ικανότητα, δεν αποδίδονται στις ίδιες ουσίες και αυτό επιβεβαιώνεται από τα ανωτέρω ευρήματα καθώς και από τις τιμές του δείκτη PCC 0,655 και 0,744 για όλα τα δείγματα και τα παραπροϊόντα αντίστοιχα.
- Κατά την εφαρμογή της μεθόδου LC-MS/MS στα 5 δείγματα παραπροϊόντων τα οποία εκχυλίστηκαν υπό βέλτιστες (Best) και χαμηλές (Low) συνθήκες απόδοσης TPC, συνολικά ταυτοποιήθηκαν 64 ενώσεις (φαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους, σαλβιανολικά οξέα, λιπαρά οξέα, γλυκοζίτες, φλαβονοειδή, τερπενοειδή, εστέρες, αιθέρες, λιγνάνες και άλλες ενώσεις).
- Η συνθήκη Best φέρει πλουσιότερο φυτοχημικό περιεχόμενο, αφού ταυτοποιούνται 62 ενώσεις από τις συνολικές 64, εκ των οποίων 12 φαινολικά οξέα και 14 γλυκοζίτες

να επικρατούν. Η ένωση που κυριαρχεί σε μεγαλύτερο περιεχόμενο είναι το Salivonic acid C. Στις συνθήκες Low ταυτοποιούνται 41 ενώσεις, εκ των οποίων και η ένωση που εντοπίζεται σε μεγαλύτερο περιεχόμενο είναι το Fertaric acid.

- Τα Low δείγματα διαθέτουν περισσότερα φαινολικά οξέα, αλλά σε χαμηλότερες εντάσεις.
- Τα δείγματα Best εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό γλυκοζιτών και εστέρων.
- Στα δείγματα Best εντοπίζονται τα περισσότερα λιπαρά οξέα και παράγωγά τους, ενώ στα Low παρουσιάζεται μεγαλύτερη ένταση για υδροξυ-λιπαρό οξύ
- Τα αποτελέσματα των φασματοφωτομετρικών μεθόδων F-C, ABTS, συνάδουν με το προφίλ των ταυτοποιημένων ενώσεων
- Η αυξημένη αντιοξειδωτική δράση του Σγουρού βασιλικού αποδίδεται και σε ενώσεις που δεν έχουν ταυτοποιηθεί με τον **αρνητικό ιοντισμό** του LC-MS/MS.
- Το έδαφος, το κλίμα και η γεωγραφία επηρεάζουν περαιτέρω το προφίλ.

Κεφάλαιο 7: Μελλοντικές προοπτικές

Η παρούσα έρευνα θα μπορούσε να αποτελέσει μία καλή βάση για την διερεύνηση άλλων πιο σύνθετων ερωτημάτων. Ένα τέτοιο ερώτημα θα μπορούσε να είναι η βελτιστοποίηση των εκχυλίσεων που γίνονται σε μεγαλύτερη κλίμακα, σε διάφορες βιομηχανίες. Σε βιομηχανικό επίπεδο, ο όγκος αλλά και η ροή των δεδομένων δύναται να είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τις μικρότερες εργαστηριακές κλίμακες. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η επεξεργασία των δεδομένων μπορεί να γίνει πιο εύκολα και αποδοτικά με την μηχανική μάθηση. Ένα άλλο θέμα που θα μπορούσε να εξεταστεί, είναι η εφαρμογή των εκχυλισμάτων σε λειτουργικά τρόφιμα με σύγχρονες τεχνικές νανο-ενθυλάκωσης. Η ενθυλάκωση προσφέρει την προστασία, την ελεγχόμενη και στοχευμένη απελευθέρωση δραστικών συστατικών που βρίσκονται μέσα σε μικροσκοπικά σωματίδια. Ακόμα, τα εκχυλίσματα φαίνεται να είναι πολύ χρήσιμα στην έρευνα που γίνεται σχετικά με την αντικατάσταση συνθετικών συντηρητικών και την ανάπτυξη προϊόντων καθαρής ετικέτας (clean label). Το πειραματικό μοντέλο Box-Behnken που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, βασίστηκε στις δρόγες. Προκειμένου να υπάρχει ένα ακόμα πιο αξιόπιστο μοντέλο πρόβλεψης, θα μπορούσε να γίνει βελτιστοποίηση με βάση τα παραπροϊόντα που έχουν προκύψει από την απόσταξη αιθέριων ελαίων βασιλικού. Τέλος, μια συγκριτική μελέτη μη-συμβατικών μεθόδων εκχύλισης και η σύνδεση της με το φυτοχημικό προφίλ θα βοηθούσε στην εξατομικευμένη επιλογή μεθόδου, αλλά και συνθηκών εκχύλισης προκειμένου να παραχθούν εκχυλίσματα πλούσια σε συγκεκριμένες επιθυμητές ενώσεις και με επιθυμητές, κατά περίπτωση, ιδιότητες και δράσεις.

Κεφάλαιο 8: Βιβλιογραφία

- Aboulghazi, A., Bakour, M., Fadil, M., & Lyoussi, B. (2022). Simultaneous Optimization of Extraction Yield, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Moroccan Propolis Extracts: Improvement of Ultrasound-Assisted Technique Using Response Surface Methodology. *Processes*, *10*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/pr10020297>
- Alañón, M. E., Ivanović, M., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2020). Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. *Arabian Journal of Chemistry*, *13*(1), 1685–1701. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.01.003>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, *4*, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Albero, B., Tadeo, J. L., & Pérez, R. A. (2019). Ultrasound-assisted extraction of organic contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *118*, 739–750. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.007>
- Alexandri, M., Christaki, S., Gkatzionis, K., Mourtzinos, I., & Tsouko, E. (2023). Residual biomass from major aromatic and medicinal flora of the Mediterranean: Challenges towards sustainable integration into food systems within the circular bioeconomy. *Trends in Food Science & Technology*, *139*, 104123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104123>
- Alkuwayti, M. A., El-Sherif, F., Yap, Y.-K., & Khattab, S. (2020). Foliar application of Moringa oleifera leaves extract altered stress-responsive gene expression and enhanced bioactive compounds composition in Ocimum basilicum. *South African Journal of Botany*, *129*, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.001>
- Aloisio, C., Razola-Díaz, M. del C., Aznar-Ramos, M. J., Longhi, M. R., Andreatta, A. E., & Verardo, V. (2023). Optimization of the Extraction Conditions of Bioactive Compounds from Ocimum basilicum Leaves Using Ultrasound-Assisted Extraction via a Sonotrode. *Molecules*, *28*(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/molecules28135286>
- Amor, G., Sabbah, M., Caputo, L., Idbella, M., De Feo, V., Porta, R., Fechtali, T., & Mauriello, G. (2021). Basil Essential Oil: Composition, Antimicrobial Properties, and

- Microencapsulation to Produce Active Chitosan Films for Food Packaging. *Foods*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/foods10010121>
- Ampofo, J. O., & Ngadi, M. (2020). Ultrasonic assisted phenolic elicitation and antioxidant potential of common bean (*Phaseolus vulgaris*) sprouts. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 104974. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104974>
- An, P., Yang, X., Yu, J., Qi, J., Ren, X., & Kong, Q. (2019). α -terpineol and terpene-4-ol, the critical components of tea tree oil, exert antifungal activities in vitro and in vivo against *Aspergillus niger* in grapes by inducing morphous damage and metabolic changes of fungus. *Food Control*, 98, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.013>
- Arboretti, R., Ceccato, R., Pegoraro, L., & Salmaso, L. (2022). Design of Experiments and machine learning for product innovation: A systematic literature review. *Quality and Reliability Engineering International*, 38(2), 1131–1156. <https://doi.org/10.1002/qre.3025>
- Arteaga-Crespo, Y., Radice, M., Bravo-Sanchez, L. R., García-Quintana, Y., & Scalvenzi, L. (2020). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. Leaves using response surface methodology. *Heliyon*, 6(1), e03043. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>
- Azandémè-Hounmalon, G. Y., Logbo, J., Gbèblonoudo Dassou, A., Lokossi, L., Akpla, E., Fiaboe, K. K. M., & Tamò, M. (2023). Investigation of amaranth production constraints and pest infestation reduction by basil intercropping. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100627. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100627>
- Babotă, M., Frumuzachi, O., Gâvan, A., Iacoviță, C., Pinela, J., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., Zhang, L., Lucini, L., Rocchetti, G., Tanase, C., Crișan, G., & Mocan, A. (2022). Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Thymus comosus* Heuff. Ex Griseb. Et Schenk (wild thyme) and their bioactive potential. *Ultrasonics Sonochemistry*, 84, 105954. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105954>
- Basar, A. O., Prieto, C., Durand, E., Villeneuve, P., Sasmazel, H. T., & Lagaron, J. (2020). Encapsulation of β -Carotene by Emulsion Electrospraying Using Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, 25(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules25040981>

- Battistella Lasta, H. F., Lentz, L., Gonçalves Rodrigues, L. G., Mezzomo, N., Vitali, L., & Salvador Ferreira, S. R. (2019). Pressurized liquid extraction applied for the recovery of phenolic compounds from beetroot waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *21*, 101353. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101353>
- Beltrán-Noboa, A., Proaño-Ojeda, J., Guevara, M., Gallo, B., Berrueta, L. A., Giampieri, F., Perez-Castillo, Y., Battino, M., Álvarez-Suarez, J. M., & Tejera, E. (2022). Metabolomic profile and computational analysis for the identification of the potential anti-inflammatory mechanisms of action of the traditional medicinal plants *Ocimum basilicum* and *Ocimum tenuiflorum*. *Food and Chemical Toxicology*, *164*, 113039. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113039>
- Benedetti, B., Caponigro, V., & Ardini, F. (2022). Experimental Design Step by Step: A Practical Guide for Beginners. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *52*(5), 1015–1028. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1848517>
- Benvenuti, L., Zielinski, A. A. F., & Ferreira, S. R. S. (2019). Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? *Trends in Food Science & Technology*, *90*, 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.003>
- Birenboim, M., Chalupowicz, D., Maurer, D., Barel, S., Chen, Y., Falik, E., Kengisbuch, D., & Shimshoni, J. A. (2022). Optimization of sweet basil harvest time and cultivar characterization using near-infrared spectroscopy, liquid and gas chromatography, and chemometric statistical methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *102*(8), 3325–3335. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11679>
- Bitwell, C., Indra, S. S., Luke, C., & Kakoma, M. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, *19*, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>
- Bokhary, A., Leitch, M., & Liao, B. Q. (2021). Liquid–liquid extraction technology for resource recovery: Applications, potential, and perspectives. *Journal of Water Process Engineering*, *40*, 101762. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101762>
- Bolto, B., Zhang, J., Wu, X., & Xie, Z. (2020). A Review on Current Development of Membranes for Oil Removal from Wastewaters. *Membranes*, *10*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/membranes10040065>

- Burducea, M., Zheljzkov, V. D., Lobiuc, A., Pintilie, C. A., Virgolici, M., Silion, M., Asandulesa, M., Burducea, I., & Zamfirache, M.-M. (2019). Biosolids application improves mineral composition and phenolic profile of basil cultivated on eroded soil. *Scientia Horticulturae*, *249*, 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.004>
- Carpentieri, S., Mazza, L., Nutrizio, M., Jambrak, A. R., Ferrari, G., & Pataro, G. (2021). Pulsed electric fields- and ultrasound-assisted green extraction of valuable compounds from *Origanum vulgare* L. and *Thymus serpyllum* L. *International Journal of Food Science & Technology*, *56*(10), 4834–4842. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15159>
- Carreira-Casais, A., Otero, P., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A. G., Carpena, M., Soria-Lopez, A., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/ijerph18179153>
- Castronuovo, D., Russo, D., Libonati, R., Faraone, I., Candido, V., Picuno, P., Andrade, P., Valentao, P., & Milella, L. (2019). Influence of shading treatment on yield, morphological traits and phenolic profile of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Scientia Horticulturae*, *254*, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.077>
- Chadni, M., Isidore, E., Lagalle, F., Langlait, M., Dosso, A., & Ioannou, I. (2023). Optimization of the supercritical extraction of rosmarinic acid from clary sage residue and the antioxidant activity of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, *193*, 105830. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2022.105830>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chen, X., Ding, J., Ji, D., He, S., & Ma, H. (2020). Optimization of ultrasonic-assisted extraction conditions for bioactive components from coffee leaves using the Taguchi design and response surface methodology. *Journal of Food Science*, *85*(6), 1742–1751. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15111>
- Chiocchio, I., Mandrone, M., Tomasi, P., Marincich, L., & Poli, F. (2021). Plant Secondary Metabolites: An Opportunity for Circular Economy. *Molecules*, *26*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/molecules26020495>

- Chisvert, A., Cárdenas, S., & Lucena, R. (2019). Dispersive micro-solid phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *112*, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.005>
- Chrysargyris, A., Mikallou, M., Petropoulos, S., & Tzortzakis, N. (2020). Profiling of Essential Oils Components and Polyphenols for Their Antioxidant Activity of Medicinal and Aromatic Plants Grown in Different Environmental Conditions. *Agronomy*, *10*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050727>
- Corrado, G., Chiaiese, P., Lucini, L., Miras-Moreno, B., Colla, G., & Roupheal, Y. (2020). Successive Harvests Affect Yield, Quality and Metabolic Profile of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Agronomy*, *10*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060830>
- da Silva Moura, E., D'Antonino Faroni, L. R., Fernandes Heleno, F., Aparecida Zinato Rodrigues, A., Figueiredo Prates, L. H., & Lopes Ribeiro de Queiroz, M. E. (2020). Optimal Extraction of *Ocimum basilicum* Essential Oil by Association of Ultrasound and Hydrodistillation and Its Potential as a Biopesticide Against a Major Stored Grains Pest. *Molecules*, *25*(12), 2781. <https://doi.org/10.3390/molecules25122781>
- Dailey, A., & Vuong, Q. V. (2015). Optimization of Aqueous Extraction Conditions for Recovery of Phenolic Content and Antioxidant Properties from Macadamia (*Macadamia tetraphylla*) Skin Waste. *Antioxidants*, *4*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/antiox4040699>
- Darrag, H. M., Almuhanha, H. T., & Hakami, E. H. (2022). Secondary Metabolites in Basil, Bio-Insecticide, Inhibition Effect, and In Silico Molecular Docking against Proteolytic Enzymes of the Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). *Plants*, *11*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/plants11081087>
- Das, S., & Tesfamariam, S. (2022). State-of-the-Art Review of Design of Experiments for Physics-Informed Deep Learning. *ArXiv*. <https://www.semanticscholar.org/paper/State-of-the-Art-Review-of-Design-of-Experiments-Das-Tesfamariam/afea31f0ab101654f080493e90a91d613516789e>
- de Elguea-Culebras, G. O., Bravo, E. M., & Sánchez-Vioque, R. (2022). Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the

- essential oil market – A review. *Industrial Crops and Products*, 175, 114261. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114261>
- Đorđević, N. G., Mančić, S. S., Karabegović, I. T., Cvetković, D. J., Stanojević, J. S., Savić, D. S., & Danilović, B. R. (2022). The effect of distillation methods on the yield, composition and biological activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Advanced Technologies*, 11(2), 16–25. <https://doi.org/10.5937/savteh2202016D>
- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- Ebrahimi-Najafabadi, H., Leardi, R., & Jalali-Heravi, M. (2014). Experimental design in analytical chemistry--part I: Theory. *Journal of AOAC International*, 97(1), 3–11. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.sgeebrahimi1>
- El Maaiden, E., Qarah, N., Ezzariai, A., Mazar, A., Nasser, B., Moustaid, K., Boukcim, H., Hirich, A., Kouisni, L., & El Kharrassi, Y. (2023). Ultrasound-Assisted Extraction of Isoquercetin from *Ephedra alata* (Decne): Optimization Using Response Surface Methodology and In Vitro Bioactivities. *Antioxidants*, 12(3), 725. <https://doi.org/10.3390/antiox12030725>
- El-Ekiaby, W. T. (2019). Basil oil nanoemulsion formulation and its antimicrobial activity against fish pathogen and enhance disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in cultured Nile tilapia. *Egyptian Journal for Aquaculture*, 9(4), 13–33. <https://doi.org/10.21608/eja.2019.18567.1007>
- Elik, A., Yanik, D. K., & Göğüş, F. (2020). Microwave-assisted extraction of carotenoids from carrot juice processing waste using flaxseed oil as a solvent. *LWT*, 123, 109100. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109100>
- Farag, M. A., Ezzat, S. M., Salama, M. M., & Tadros, M. G. (2016). Anti-acetylcholinesterase potential and metabolome classification of 4 *Ocimum* species as determined via UPLC/qTOF/MS and chemometric tools. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 125, 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.037>
- Fometu, S., Shittu, S., Herman, R., & Ayepa, E. (2019). *Essential Oils and their applications-A mini review*. 4, 1–13.

- Fomo, G., Madzimbamuto, T. N., & Ojumu, T. V. (2020). Applications of Nonconventional Green Extraction Technologies in Process Industries: Challenges, Limitations and Perspectives. *Sustainability*, 12(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/su12135244>
- Fontoura, B. H., Perin, E. C., Teixeira, S. D., Lima, V. A. de, & Carpes, S. T. (2023). Multivariate and machine learning approaches for prediction of antioxidant potential in *Bertholletia excelsa* barks. *Journal of King Saud University - Science*, 35(7), 102792. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102792>
- Franco, E. P. D. de, Contesini, F. J., Lima da Silva, B., Alves de Piloto Fernandes, A. M., Wielewski Leme, C., Gonçalves Cirino, J. P., Bueno Campos, P. R., & de Oliveira Carvalho, P. (2020). Enzyme-assisted modification of flavonoids from *Matricaria chamomilla*: Antioxidant activity and inhibitory effect on digestive enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 42–49. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1681989>
- Freiesleben, J., Keim, J., & Grutsch, M. (2020). Machine learning and Design of Experiments: Alternative approaches or complementary methodologies for quality improvement? *Quality and Reliability Engineering International*, 36(6), 1837–1848. <https://doi.org/10.1002/qre.2579>
- Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., & Cassano, A. (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1114–1122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.024>
- Gavrić, T., Jurković, J., Gadžo, D., Čengić, L., Sijahović, E., & Bašić, F. (2021). Fertilizer effect on some basil bioactive compounds and yield. *Ciência e Agrotecnologia*, 45, e003121. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202145003121>
- Gonzalez-Rivera, J., Duce, C., Campanella, B., Bernazzani, L., Ferrari, C., Tanzini, E., Onor, M., Longo, I., Ruiz, J. C., Tinè, M. R., & Bramanti, E. (2021). In situ microwave assisted extraction of clove buds to isolate essential oil, polyphenols, and lignocellulosic compounds. *Industrial Crops and Products*, 161, 113203. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113203>
- Goti, D., & Dasgupta, D. S. (2023). A comprehensive review of conventional and non-conventional solvent extraction techniques. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 12(3), 202–211. <https://doi.org/10.22271/phyto.2023.v12.i3c.14682>

- Govoreanu, E. A., Ion, V. A., Săvulescu, E., Badea, M. L., Popa, V., & Maria, E. (2022). *ANATOMICAL AND BIOCHEMICAL RESEARCH ON THE SPECIES OCIMUM BASILICUM L. (LAMIACEAE) CULTIVATED IN THE NUTRIENT FILM TECHNIQUE SYSTEM*. http://horticulturejournal.usamv.ro/pdf/2022/issue_1/Art68.pdf
- Guerrero-Lagunes, L. A., Ruiz-Posadas, L. del M., Rodríguez-Mendoza, M. de las N., & Soto-Hernández, M. (2020). Quality and Yield of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil under hydroponic cultivation. *Agro Productividad*, 13(9). <https://doi.org/10.32854/agrop.vi.1616>
- Gurav, T. P., Dholakia, B. B., & Giri, A. P. (2022). A glance at the chemodiversity of *Ocimum* species: Trends, implications, and strategies for the quality and yield improvement of essential oil. *Phytochemistry Reviews*, 21(3), 879–913. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09767-z>
- Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., Doherty, B. W., Gurkan, B., Maginn, E. J., Ragauskas, A., Dadmun, M., Zawodzinski, T. A., Baker, G. A., Tuckerman, M. E., Savinell, R. F., & Sangoro, J. R. (2021). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*, 121(3), 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>
- Hao, K., Hu, W., Hou, M., Cao, D., Wang, Y., Guan, Q., Zhang, X., Wang, A., Yu, J., & Guo, B. (2019). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Phenolics from *Citrus aurantium* L. Blossoms and Evaluation of Free Radical Scavenging, Anti-HMG-CoA Reductase Activities. *Molecules*, 24(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/molecules24132368>
- Herrero, M., Castro-Puyana, M., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2013). Chapter 11—Compositional Analysis of Foods. In S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, P. Schoenmakers, & D. Lloyd (Eds.), *Liquid Chromatography* (pp. 295–317). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415806-1.00011-5>
- Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical Extraction Performance Enhancer for Pharmaceutical and Nutraceutical Product Development. *Plants*, 10(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/plants10102091>
- Ilić, Z. S., Milenković, L., Šunić, L., Tmušić, N., Mastilović, J., Kevrešan, Ž., Stanojević, L., Danilović, B., & Stanojević, J. (2021). Efficiency of Basil Essential Oil Antimicrobial

- Agents under Different Shading Treatments and Harvest Times. *Agronomy*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081574>
- Ismail, B. B., Guo, M., Pu, Y., Wang, W., Ye, X., & Liu, D. (2019). Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.11.023>
- Ivanović, M., Islamčević Razboršek, M., & Kolar, M. (2020). Innovative Extraction Techniques Using Deep Eutectic Solvents and Analytical Methods for the Isolation and Characterization of Natural Bioactive Compounds from Plant Material. *Plants*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/plants9111428>
- Izadiyan, P., & Hemmateenejad, B. (2016). Multi-response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian basil using central composite design. *Food Chemistry*, 190, 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.036>
- Jankovic, A., Chaudhary, G., & Goia, F. (2021). Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems. *Energy and Buildings*, 250, 111298. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2021.111298>
- Jasicka-Misiak, I., Shanaida, M., Hudz, N., & Wieczorek, P. P. (2021). Phytochemical and Pharmacological Evaluation of the Residue By-Product Developed from the *Ocimum americanum* (Lamiaceae) Postdistillation Waste. *Foods*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/foods10123063>
- Jayakumari. (2020). Phytochemicals and Pharmaceutical: Overview. In J. K. Patra, A. C. Shukla, & G. Das (Eds.), *Advances in Pharmaceutical Biotechnology: Recent Progress and Future Applications* (pp. 163–173). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2195-9_14
- Jovanović, A. A., Đorđević, V. B., Zdunić, G. M., Pljevljakušić, D. S., Šavikin, K. P., Gođevac, D. M., & Bugarski, B. M. (2017). Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*, 179, 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>

- Kant, R., & Kumar, A. (2022). Review on essential oil extraction from aromatic and medicinal plants: Techniques, performance and economic analysis. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 30, 100829. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100829>
- Kaoui, S., Chebli, B., Baddi, G. A., Basaid, K., Zaafrani, M., & Mir, Y. (2021). Ultrasound-assisted lactic acid based deep eutectic solvent extraction of phenolic antioxidants from *Thymus broussonetii*: A Box – Behnken design approach for optimization. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 842(1), 012022. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/842/1/012022>
- Kaur, T., Bhat, R., & Vyas, D. (2016). Effect of contrasting climates on antioxidant and bioactive constituents in five medicinal herbs in Western Himalayas. *Journal of Mountain Science*, 13(3), 484–492. <https://doi.org/10.1007/s11629-014-3380-y>
- Kritsi, E., Tsiaka, T., Sotiroudis, G., Mouka, E., Aouant, K., Ladika, G., Zoumpoulakis, P., Cavouras, D., & Sinanoglou, V. J. (2023). Potential Health Benefits of Banana Phenolic Content during Ripening by Implementing Analytical and In Silico Techniques. *Life*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/life13020332>
- Lama-Muñoz, A., & Contreras, M. D. M. (2022). Extraction Systems and Analytical Techniques for Food Phenolic Compounds: A Review. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(22), 3671. <https://doi.org/10.3390/foods11223671>
- Le, X. T., Lan Vi, V. L., Toan, T. Q., Bach, L. G., Truc, T. T., & Hai Ha, P. T. (2019). Extraction Process of Polyphenols from Soybean (*Glycine max* L.) Sprouts: Optimization and Evaluation of Antioxidant Activity. *Processes*, 7(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/pr7080489>
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., & Fang, Z. (2020). Application of extrusion technology in plant food processing byproducts: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 218–246. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12514>
- Li, Y., Pan, Z., Wang, B., Yu, W., Song, S., Feng, H., Zhao, W., & Zhang, J. (2020). Ultrasound-assisted extraction of bioactive alkaloids from *Phellodendri amurensis* cortex using deep eutectic solvent aqueous solutions. *New Journal of Chemistry*, 44(22), 9172–9178. <https://doi.org/10.1039/D0NJ00877J>
- Liu, Z.-T., Zhang, Y., Zhang, X.-J., Zhang, T.-T., Zhang, J.-S., & Chen, X.-Q. (2023). Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from *Portulaca oleracea* L., the extraction kinetics and bioactivity of the extract. *Journal of Applied Research on*

- Medicinal and Aromatic Plants*, 37, 100512.
<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2023.100512>
- Luca, S. V., Zengin, G., Sinan, K. I., Skalicka-Woźniak, K., & Trifan, A. (2023). Post-Distillation By-Products of Aromatic Plants from Lamiaceae Family as Rich Sources of Antioxidants and Enzyme Inhibitors. *Antioxidants*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/antiox12010210>
- Magalhães Brandão, R., Roberto Batista, L., Elvis de Oliveira, J., Bispo Barbosa, R., Lee Nelson, D., & Graças Cardoso, M. (2023). In vitro and in vivo efficacy of poly(lactic acid) nanofiber packaging containing essential oils from *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. against *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* in table grapes. *Food Chemistry*, 400, 134087. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134087>
- Mahmoudi, H., Marzouki, M., M'Rabet, Y., Mezni, M., Ait Ouazzou, A., & Hosni, K. (2020). Enzyme pretreatment improves the recovery of bioactive phytochemicals from sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves and their hydrodistilled residue by-products, and potentiates their biological activities. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(8), 6451–6460. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.06.003>
- Marcelino, S., Gaspar, P. D., & Paço, A. (2023). Sustainable Waste Management in the Production of Medicinal and Aromatic Plants—A Systematic Review. *Sustainability*, 15(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/su151813333>
- Maurer, D., Sadeh, A., Chalupowicz, D., Barel, S., Shimshoni, J. A., & Kenigsbuch, D. (2023). Hydroponic versus soil-based cultivation of sweet basil: Impact on plants' susceptibility to downy mildew and heat stress, storability and total antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/jsfa.12860>
- Medfai, W., Contreras, M. del M., Lama-Muñoz, A., Mhamdi, R., Oueslati, I., & Castro, E. (2020). How Cultivar and Extraction Conditions Affect Antioxidants Type and Extractability for Olive Leaves Valorization. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(13), 5107–5118. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b07175>
- Mehariya, S., Fratini, F., Lavecchia, R., & Zuurro, A. (2021). Green extraction of value-added compounds from microalgae: A short review on natural deep eutectic solvents

- (NaDES) and related pre-treatments. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105989. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105989>
- Mishra, A., K. B. K. K., Anjali, & Goyal, I. (2022). Purple basil and the significance of its bioactive compounds. *The Pharma Innovation Journal*, 11(6), 2172–2185.
- Mitić, M., Tošić, S., Pavlović, A., Mašković, P., Kostić, D., Mitić, J., & Stevanović, V. (2019). Optimization of the extraction process of minerals from *Salvia officinalis* L. using factorial design methodology. *Microchemical Journal*, 145, 1224–1230. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.12.047>
- Moccia, F., Agustin-Salazar, S., Verotta, L., Caneva, E., Giovando, S., D’Errico, G., Panzella, L., d’Ischia, M., & Napolitano, A. (2020). Antioxidant Properties of Agri-Food Byproducts and Specific Boosting Effects of Hydrolytic Treatments. *Antioxidants*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/antiox9050438>
- Mosadegh, H., Trivellini, A., Ferrante, A., Lucchesini, M., Vernieri, P., & Mensuali, A. (2018). Applications of UV-B lighting to enhance phenolic accumulation of sweet basil. *Scientia Horticulturae*, 229, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.043>
- Nam, S., Kang, S., & Kim, J. (2020). Maintaining a constant soil moisture level can enhance the growth and phenolic content of sweet basil better than fluctuating irrigation. *Agricultural Water Management*, 238, 106203. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106203>
- Narenderan, S. T., Meyyanathan, S. N., & Karri, V. V. S. R. (2019). Experimental design in pesticide extraction methods: A review. *Food Chemistry*, 289, 384–395. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.045>
- Nunes, A. N., Roda, A., Gouveia, L. F., Fernández, N., Bronze, M. R., & Matias, A. A. (2021). Astaxanthin Extraction from Marine Crustacean Waste Streams: An Integrate Approach between Microwaves and Supercritical Fluids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(8), 3050–3059. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c06534>
- Pandey, R., & Kumar, B. (2016). HPLC–QTOF–MS/MS-based rapid screening of phenolics and triterpenic acids in leaf extracts of *Ocimum* species and their interspecies variation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(4), 225–238. <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1148048>
- Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L., & Napolitano, A. (2020). Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable

- Extraction Methodologies. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2020.00060>
- Paulo, F., & Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 1327–1340. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>
- Pavlić, B., Pezo, L., Marić, B., Tukuljac, L. P., Zeković, Z., Solarov, M. B., & Teslić, N. (2020). Supercritical fluid extraction of raspberry seed oil: Experiments and modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 157, 104687. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104687>
- Pereira, L. M. S., Milan, T. M., & Tapia-Blácido, D. R. (2021). Using Response Surface Methodology (RSM) to optimize 2G bioethanol production: A review. *Biomass and Bioenergy*, 151, 106166. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106166>
- Perera, C. O., & Alzahrani, M. A. J. (2021). Ultrasound as a pre-treatment for extraction of bioactive compounds and food safety: A review. *LWT*, 142, 111114. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111114>
- Picot-Allain, C., Mahomoodally, M. F., Ak, G., & Zengin, G. (2021). Conventional versus green extraction techniques—A comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*, 40, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>
- Preu, M., Guyot, D., & Petz, M. (1998). Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions. *Journal of Chromatography A*, 818(1), 95–108. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00537-8)
- Qamar, F., Sana, A., Naveed, S., & Faizi, S. (2023). Phytochemical characterization, antioxidant activity and antihypertensive evaluation of *Ocimum basilicum* L. in L-NAME induced hypertensive rats and its correlation analysis. *Heliyon*, 9(4), e14644. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14644>
- Rakić, T., Kasagić-Vujanović, I., Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B., & Ivanović, D. (2014). Comparison of Full Factorial Design, Central Composite Design, and Box-Behnken Design in Chromatographic Method Development for the Determination of Fluconazole and Its Impurities. *Analytical Letters*, 47(8), 1334–1347. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.867503>

- Raspe, D. T., da Silva, C., & Cláudio da Costa, S. (2022). Compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: An overview of non-conventional extraction methods and challenges. *Food Bioscience*, *46*, 101593. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101593>
- Rebollo-Hernanz, M., Cañas, S., Taladrid, D., Benítez, V., Bartolomé, B., Aguilera, Y., & Martín-Cabrejas, M. A. (2021). Revalorization of Coffee Husk: Modeling and Optimizing the Green Sustainable Extraction of Phenolic Compounds. *Foods*, *10*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/foods10030653>
- Rivero-Montejo, S. de J., Vargas-Hernandez, M., & Torres-Pacheco, I. (2021). Nanoparticles as Novel Elicitors to Improve Bioactive Compounds in Plants. *Agriculture*, *11*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020134>
- Romano, R., De Luca, L., Aiello, A., Pagano, R., Di Pierro, P., Pizzolongo, F., & Masi, P. (2022). Basil (*Ocimum basilicum* L.) Leaves as a Source of Bioactive Compounds. *Foods*, *11*(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/foods11203212>
- Roselló-Soto, E., Thirumdas, R., Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Putnik, P., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., & Barba, F. J. (2019). 1—An integrated strategy between gastronomic science, food science and technology, and nutrition in the development of healthy food products. In F. J. Barba, J. M. A. Saraiva, G. Cravotto, & J. M. Lorenzo (Eds.), *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds* (pp. 3–21). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00001-9>
- Saha, A., & Basak, B. B. (2020). Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, *145*, 111979. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111979>
- Salanță, L. C., & Crotova, J. (2022). An Update on Effectiveness and Practicability of Plant Essential Oils in the Food Industry. *Plants (Basel, Switzerland)*, *11*(19), 2488. <https://doi.org/10.3390/plants11192488>
- Sandulachi, E., Macari, A., Ghendov-Moșanu, A., Cojocari, D., & Sturza, R. (2021). *Antioxidant and Antimicrobial Activity of Basil, Thyme and Tarragon Used in Meat Products*. <https://doi.org/10.4236/aim.2021.1111043>
- Sarma, M., & Singh, Y. (2020). Essential oils and their pharmacotherapeutics applications in human diseases. *Advances in Traditional Medicine*, *22*. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00477-z>

- Sathasivam, R., Choi, M., Radhakrishnan, R., Kwon, H., Yoon, J., Yang, S. H., Kim, J. K., Chung, Y. S., & Park, S. U. (2022). Effects of various *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analyses of primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.983776>
- Sęczyk, Ł., Ozdemir, F. A., & Kołodziej, B. (2022). In vitro bioaccessibility and activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) phytochemicals as affected by cultivar and postharvest preservation method – Convection drying, freezing, and freeze-drying. *Food Chemistry*, *382*, 132363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132363>
- Seyed, M. A., Ayesha, S., Azmi, N., Al-Rabae, F. M., Al-Alawy, A. I., Al-Zahrani, O. R., & Hawsawi, Y. (2021). The neuroprotective attribution of *Ocimum basilicum*: A review on the prevention and management of neurodegenerative disorders. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *7*(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00295-3>
- Shahrajabian, M. H., Sun, W., & Cheng, Q. (2020). Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): A review. *International Journal of Food Properties*, *23*(1), 1961–1970. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1828456>
- Shehata, M. G., Awad, T. S., Asker, D., El Sohaimy, S. A., Abd El- Aziz, N. M., & Youssef, M. M. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities and UPLC-ESI-MS/MS polyphenolic profile of sweet orange peel extracts. *Current Research in Food Science*, *4*, 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.05.001>
- Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y., Rashid, A., Xu, B., Liang, Q., Ma, H., & Ren, X. (2023). A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, *101*, 106646. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106646>
- Siddique, M. A. B., Tzima, K., Rai, D. K., & Brunton, N. (2020). Conventional Extraction Techniques for Bioactive Compounds from Herbs and Spices. In *Herbs, Spices and Medicinal Plants* (pp. 69–93). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119036685.ch4>
- Sipos, L., Balázs, L., Székely, G., Jung, A., Sárosi, S., Radácsi, P., & Csambalik, L. (2021). Optimization of basil (*Ocimum basilicum* L.) production in LED light environments – a

- review. *Scientia Horticulturae*, 289, 110486.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110486>
- Skendi, A., Irakli, M., Chatzopoulou, P., Bouloumpasi, E., & Biliaderis, C. G. (2022). Phenolic extracts from solid wastes of the aromatic plant essential oil industry: Potential uses in food applications. *Food Chemistry Advances*, 1, 100065.
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100065>
- Sobhani, A., Noormohammadi, N., Moradi, K., Ebrahimi, M., & Khanahmadi, M. (2022). Optimization of heat and ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Echinacea purpurea* using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 31, 100399.
<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100399>
- Socas-Rodríguez, B., Torres-Cornejo, M. V., Álvarez-Rivera, G., & Mendiola, J. A. (2021). Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds from Natural Sources and Agricultural By-Products. *Applied Sciences*, 11(11), Article 11.
<https://doi.org/10.3390/app11114897>
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323–331.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>
- Stevanato, N., & da Silva, C. (2019). Radish seed oil: Ultrasound-assisted extraction using ethanol as solvent and assessment of its potential for ester production. *Industrial Crops and Products*, 132, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.032>
- Subiria-Cueto, R., Coria-Oliveros, A. J., Wall-Medrano, A., Rodrigo-García, J., González-Aguilar, G. A., Martínez-Ruiz, N. del R., & Alvarez-Parrilla, E. (2021). Antioxidant dietary fiber-based bakery products: A new alternative for using plant-by-products. *Food Science and Technology*, 42, ctaAR57520. <https://doi.org/10.1590/fst.57520>
- Sudha, T., Divya, G., Sujaritha, J., & Duraimurugan, P. (2017). REVIEW OF EXPERIMENTAL DESIGN IN ANALYTICAL CHEMISTRY. <https://doi.org/oai:zenodo.org:1036496>
- Svečnjak, L., Marijanović, Z., Okińczyc, P., Marek Kuś, P., & Jerković, I. (2020). Mediterranean Propolis from the Adriatic Sea Islands as a Source of Natural Antioxidants: Comprehensive Chemical Biodiversity Determined by GC-MS, FTIR-ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MS, DPPH and FRAP Assay. *Antioxidants*, 9(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/antiox9040337>

- Tangpao, T., Charoimek, N., Teerakitchotikan, P., Leksawasdi, N., Jantanasakulwong, K., Rachtanapun, P., Seesuriyachan, P., Phimolsiripol, Y., Chaiyaso, T., Ruksiriwanich, W., Jantrawut, P., Van Doan, H., Cheewangkoon, R., & Sommano, S. R. (2022). Volatile Organic Compounds from Basil Essential Oils: Plant Taxonomy, Biological Activities, and Their Applications in Tropical Fruit Productions. *Horticulturae*, *8*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020144>
- Teofilović, B., Tomas, A., Martić, N., Stilinović, N., Popović, M., Čapo, I., Grujić, N., Ilinčić, B., & Rašković, A. (2021). Antioxidant and hepatoprotective potential of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) extract in acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Functional Foods*, *87*, 104783. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104783>
- Tolay, I. (2021). The impact of different Zinc (Zn) levels on growth and nutrient uptake of Basil (*Ocimum basilicum* L.) grown under salinity stress. *PLOS ONE*, *16*(2), e0246493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246493>
- Traka, Ch. K., Petrakis, E. A., Kimbaris, A. C., Polissiou, M. G., & Perdakis, D. Ch. (2018). Effects of *Ocimum basilicum* and *Ruta chalepensis* hydrosols on *Aphis gossypii* and *Tetranychus urticae*. *Journal of Applied Entomology*, *142*(4), 413–420. <https://doi.org/10.1111/jen.12486>
- Tzanova, M., Atanasov, V., Yaneva, Z., Ivanova, D., & Dinev, T. (2020). Selectivity of Current Extraction Techniques for Flavonoids from Plant Materials. *Processes*, *8*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/pr8101222>
- Ugbogu, O. C., Emmanuel, O., Agi, G. O., Ibe, C., Ekweogu, C. N., Ude, V. C., Uche, M. E., Nnanna, R. O., & Ugbogu, E. A. (2021). A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.). *Heliyon*, *7*(11), e08404. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08404>
- Uhoraningoga, A., Kinsella, G. K., Henehan, G. T., & Ryan, B. J. (2018). The Goldilocks Approach: A Review of Employing Design of Experiments in Prokaryotic Recombinant Protein Production. *Bioengineering*, *5*(4), 89. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5040089>
- Wei, L. S., Goh, K. W., Abdul Hamid, N. K., Abdul Kari, Z., Wee, W., & Van Doan, H. (2022). A mini-review on co-supplementation of probiotics and medicinal herbs: Application in aquaculture. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.869564>

- Wojtunik-Kulesza, K. A. (2020). Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes. *Molecules*, 25(22), 5267. <https://doi.org/10.3390/molecules25225267>
- Xu, D.-P., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S., & Li, H.-B. (2016). Extraction of Natural Antioxidants from the *Thelephora ganbajun* Mushroom by an Ultrasound-Assisted Extraction Technique and Evaluation of Antiproliferative Activity of the Extract against Human Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ijms17101664>
- Yusoff, I. M., Mat Taher, Z., Rahmat, Z., & Chua, L. S. (2022). A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International*, 157, 111268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>
- Zaccardelli, M., Roscigno, G., Pane, C., Celano, G., Di Matteo, M., Mainente, M., Vuotto, A., Mencherini, T., Esposito, T., Vitti, A., & De Falco, E. (2021). Essential oils and quality composts sourced by recycling vegetable residues from the aromatic plant supply chain. *Industrial Crops and Products*, 162, 113255. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113255>
- Zagoto, M., Cardia, G. F. E., Rocha, E. M. T. da, Mourão, K. S. M., Janeiro, V., Cuman, R. K. N., Pinto, A. A., Contiero, R. L., & Freitas, P. S. L. de. (2021). Biological activities of basil essential oil: A review of the current evidence. *Research, Society and Development*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20409>
- Zhong, L., Yuan, Z., Rong, L., Zhang, Y., Xiong, G., Liu, Y., & Li, C. (2019). An Optimized Method for Extraction and Characterization of Phenolic Compounds in *Dendranthema indicum* var. *Aromaticum* Flower. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44102-9>
- Zimare, S. B., Mankar, G. D., & Barmukh, R. B. (2021). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total phenolics and flavonoids from the leaves of *Lobelia nicotianifolia* and their radical scavenging potential. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4, 100109. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100109>