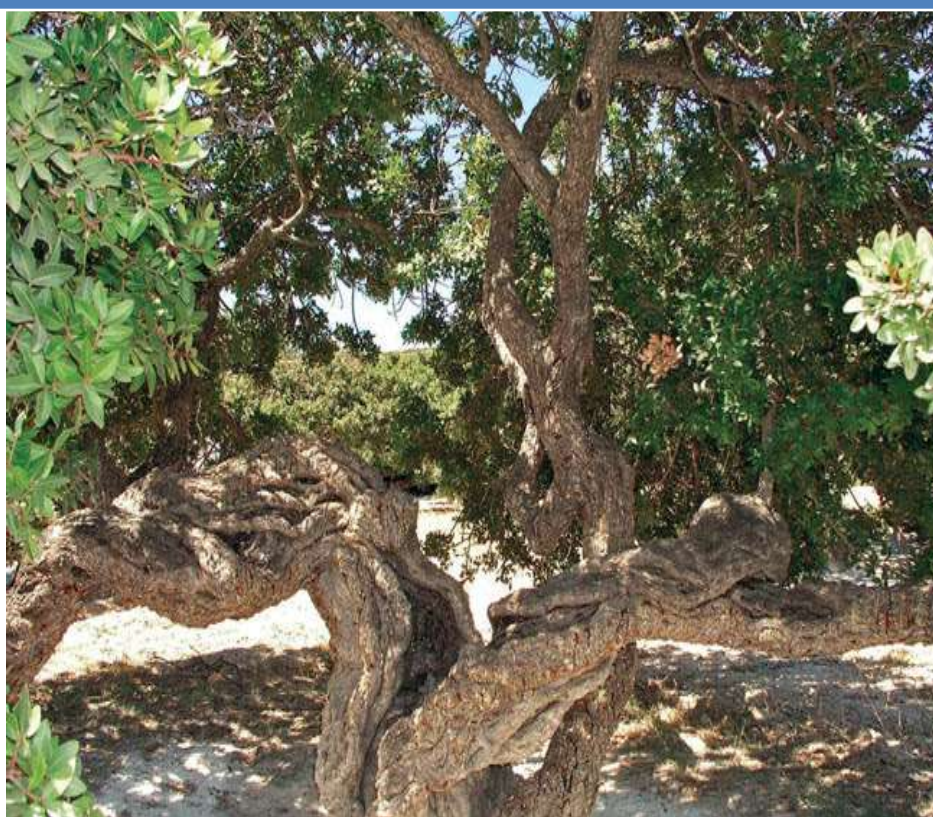




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
Τομέας II: Ανάλυση, Σχεδιασμός &
Ανάπτυξη Διεργασιών & Συστημάτων



**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΧΙΟ**



Διπλωματική Εργασία
ΜΠΑΜΠΟΥΛΗ ΑΡΙΑΝΑ

Επιβλέπουσα: Κροκίδα Μαγδαληνή,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ, Φεβρουάριος 2014



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας II: Ανάλυση, Σχεδιασμός & Ανάπτυξη Διεργασιών & Συστημάτων

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΗΝ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ
ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΧΙΟ

Διπλωματική Εργασία

ΜΠΑΜΠΟΥΛΗ ΑΡΙΑΝΑ

Επιβλέπουσα: Κροκίδα Μαγδαληνή,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΜΠ

Εγκρίθηκε από την τριμελή επιτροπή στις 11/02/2014

Τριμελής Επιτροπή:

Κροκίδα Μαγδαληνή, Αναπλ. Καθηγήτρια ΕΜΠ (Επιβλέπουσα)

Μαγουλάς Κωστής, Καθηγητής ΕΜΠ

Ζιώμας Ιωάννης, Καθηγητής ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ, 11 Φεβρουαρίου 2014

*Αφιερώνεται στους γονείς μου,
Μαρία και Τηλέμαχο...*

Copyright © Μπάμπουλη Αριάννα, 2013
Με επιφύλαξη κάθε δικαιώματος. All rights reserved.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας «Επίδραση μεθόδων εκχύλισης στην αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων Μαστίχας από τη Χίο» πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς, Οργανικής Χημείας καθώς και στο Οριζόντιο εργαστήριο της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Οι αναλύσεις και ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων έγιναν στο εργαστήριο Βιολογικών Ελέγχων, του τμήματος Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στη Φαρμακευτική Σχολή Αθηνών.

Η ανάθεση του θέματος έγινε από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαγδαληνή Κροκίδα, ενώ στην τριμελή εξεταστική επιτροπή συμμετείχαν ο καθηγητής κος Κωστής Μαγουλάς και ο καθηγητής, κος Ιωάννης Ζιώμας.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου σε όσους με βοήθησαν και συνέβαλαν στην περάτωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια της εργασίας, κα Μαγδαληνή Κροκίδα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υποστήριξη και τη συμπαράσταση που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες αρμόζουν στον επιβλέπων μου για το κομμάτι της υπερκρίσιμης εκχύλισης, κο Κωστή Μαγουλά, Καθηγητή ΕΜΠ για τον καθοριστικό ρόλο που έπαιξε στη διαμόρφωση του θέματος και στην υποστήριξη που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα κα Κωνσταντίνα Κυριακοπούλου (εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών), για την βοήθεια της, την υπομονή της, την καθημερινή υποστήριξή της στην οργάνωση και εκτέλεση των πειραματικών δοκιμών και αναλύσεων, καθώς επίσης και την πολύτιμη συμβολή της στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ Βασιλική Λούλη (εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς), για την υποστήριξη της και για τις παρατηρήσεις της στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων της εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Υποψήφιο Διδάκτορα κο Γιώργο Παπαευσταθίου (εργαστήριο Βιολογικών Ελέγχων, Φαρμακευτική Σχολή Αθηνών) για την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου προσέφερε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Φρ. Τρικύλα για την προσφορά (συλλογή και αποστολή) της φρέσκιας πρώτης ύλης (φύλλα σχίνων).

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τα μέλη των Εργαστηρίων Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς και Οργανικής Χημείας, για τη βοήθειά τους σε τεχνικά θέματα, καθώς και για την καλή τους διάθεση καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου Μαρία και Τηλέμαχο, καθώς και στον αδερφό μου Γιώργο, για την αμέριστη και αδιάκοπη στήριξη που μου προσέφεραν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της μεθόδου εκχύλισης στην αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα φύλλων Μαστίχας από τη Χίο.

Η Ελληνική γη είναι πλούσια σε φαρμακευτικά φυτά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το Μαστιχόδεντρο της Χίου, με θεραπευτικές ιδιότητες (θεραπεία ασθενειών όπως το έκζεμα, η διάρροια και λοιμώξεις του λαιμού) που περιγράφονται ήδη από το 15^ο αιώνα. Σήμερα του αποδίδονται και άλλες ιδιότητες όπως η αντιοξειδωτική ικανότητα, ηπατοπροστατευτική και η αντιφλεγμονώδης δράση. Η πλειοψηφία των μελετών που έχουν ως τώρα πραγματοποιηθεί αφορούν τη σύνθεση των καρπών του και του αιθέριου ελαίου από τη ρητίνη ενώ πολύ λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί γύρω από τα φύλλα του.

Τα τελευταία χρόνια δημιουργήθηκε η επιτακτική ανάγκη επαναπροσέγγισης της επιστήμης της Χημείας, ώστε αυτή να συνδράμει στο σχεδιασμό χημικών διεργασιών και προϊόντων, τα οποία θα είναι φιλικά προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Έτσι έχει αναπτυχθεί έντονη ερευνητική δραστηριότητα στις μεθόδους απομόνωσης συστατικών από φυσικές πηγές πολύτιμων για την ανθρώπινη υγεία, όπως τα αντιοξειδωτικά για τα οποία γίνεται συχνά λόγος. Στην έρευνα αυτή σημαντική παράμετρο αποτελεί η αντικατάσταση των χρησιμοποιούμενων οργανικών διαλυτών, οι οποίοι έχουν αποδειχθεί τοξικοί και επιβλαβείς για τον άνθρωπο με εναλλακτικούς διαλύτες, όπως είναι τα ιοντικά υγρά, τα υδατικά συστήματα και το Υπερκρίσιμο CO₂. Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί νέες, καινοτόμες και οικονομικά συμφέρουσες μέθοδοι απομόνωσης αυτών των συστατικών.

Στην παρούσα μελέτη έγιναν εκχυλίσσεις των φύλλων με μεθόδους συμβατικές με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας (εκχύλιση Soxhlet) αλλά και εκχυλίσσεις των φύλλων με νέες μεθόδους, όπως η εκχύλιση με υπερήχους, μικροκύματα αλλά και Υπερκρίσιμη εκχύλιση τους. Οι παραπάνω εκχυλίσσεις συγκρίθηκαν ως προς την απόδοσή τους. Τα φύλλα μελετήθηκαν φρέσκα αλλά και μετά από επεξεργασία τους με ξήρανση υπό κατάψυξη, αποδεικνύοντας πως η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα φιλική προς το δείγμα, καθώς τα ξερά φύλλα έδειξαν τις μεγαλύτερες αποδόσεις αλλά και καλή αντιοξειδωτική δράση. Η σύγκριση των αποδόσεων είχε εξαιρετικά αποτελέσματα για την μέθοδο εκχύλισης με μικροκύματα με διαλύτη το νερό (46,7%w/w απόδοση για τα ξερά φύλλα). Ακολούθησαν η εκχύλιση με υπερήχους με διαλύτες το νερό και την αιθανόλη και η Υπερκρίσιμη εκχύλιση των φύλλων με CO₂. Ακόμη, έγινε προσδιορισμός της κινητικής της ξήρανσης των φύλλων. Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα εκχυλίσματα που λάβαμε μελετήθηκαν ποιοτικά αλλά και ποσοτικά ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, με τιμές IC₅₀ μικρότερες από 0,7mg/ml (για εκχύλιση τόσο ξερών όσο και φρέσκων φύλλων με υπερήχους). Τέλος, έγινε παραλαβή του αιθέριου ελαίου από τα φύλλα με υδροαπόσταξη. Τα εκχυλίσματα που πήραμε με οργανικούς διαλύτες, αλλά και με υδροαπόσταξη αναλύθηκαν με GCMS. Ανάμεσα στα συστατικά βρέθηκαν: Γερμακρένιο-δ, trans-καρσοφυλλένιο, βιταμίνη E, Μυρκένιο, Λιμονένιο, δ-καδινένιο, α-Κοπαένιο και α-καδινόλη. Ζητούμενο είναι η παρούσα μελέτη να οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα τα οποία θα αποτελέσουν την βάση για νέα έρευνα γύρω από τις ουσίες και τη δράση που έχουν τα φύλλα του δέντρου.

ABSTRACT

The aim of this thesis is to study the effect of extraction method on the antioxidant activity of extracts Mastic leaves from Chios Island.

The Greek land is rich in medicinal plants. A typical example is the Mastic tree of Chios, with therapeutic properties (curing diseases like eczema , diarrhea and throat infections) described early in the 15th century. Currently other properties such as antioxidant capacity, hepatoprotective and anti-inflammatory action are attributed to the tree. The majority of the studies carried out so far concern on the composition of the fruit and the essential oil from the resin while very few studies have been performed around the leaves^[3].

In recent years an urgent need to re-approach the science of chemistry was created, so that it can assist in the design of chemical processes and products, which will be friendly to humans and the environment. So this intensive research activity has developed methods of isolating ingredients from natural sources, valuable to human health such as antioxidants, which are often mentioned in our everyday life. In this research, an important parameter is the replacement of the organic solvents which are proved toxic and harmful to humans, with alternative solvents such as ionic liquids, water systems and the supercritical CO₂. At the same time, new, innovative and cost-effective methods of isolating these components are developed.

In the present study, the leaves were extracted by conventional methods with solvents of different polarity (Soxhlet extraction) and new extraction methods, such as ultrasound extraction, microwave extraction and Supercritical extraction. These extractions were compared for their yields. The leaves were studied fresh and after treatment by drying under freezing, demonstrating that this method is especially friendly to the sample, as the freeze dried leaves showed higher yields and great antioxidant activity. The comparison of the yields, showed exceptional performance for the microwave extraction method with solvent water (46.7 %w/w yield for dried leaves). Ultrasound extraction with solvents water and ethanol, and supercritical extraction of leaves with CO₂ followed. Furthermore, a determination of the kinetics of drying the leaves was made. As already mentioned, the extracts were studied qualitatively and quantitatively for their antioxidant activity, with IC₅₀ values of less than 0,7mg/ml (for ultrasound extraction of both fresh and dried leaves). Finally, we isolated the essential oil from the leaves by hydrodistillation. The extracts obtained with organic solvents as long as with hydrodistillation were analyzed by GCMS. Among the ingredients found were: germacrene - δ , trans- caryophyllene, vitamin E, myrcene, limonene, δ -cadinene, α -copaene and a- cadinol. Our goal is the present study to lead to useful conclusions that will consist the basis for new research on the substances and activities of the leaves of Mastic tree.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
i.ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ «ΠΡΑΣΙΝΕΣ» ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ.....	15
ii.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	16
A.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Μαστιχόδεντρο ή Σχίνος (<i>Pistacia lentiscus</i>)	17
1.1. Μαστιχόδεντρο ή Σχίνος από τη Χίο (<i>Pistacia Lentiscus var chia</i>)	18
1.2. Ιδιότητες Μαστίχας	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ	20
2.1.ΞΗΡΑΝΣΗ	20
2.1.1.Καμπύλες ξήρανσης-Ρυθμός ξήρανσης	21
2.1.2. Τύποι ξηραντήρων.....	22
2.1.3.Ξήρανση με κατάψυξη	24
2.2.ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ-ΕΚΧΥΛΙΣΗ.....	27
2.2.1.Εκχύλιση Στερεών με Υγρό διαλύτη	27
2.2.1.1. Εκχύλιση με τη μέθοδο Soxhlet.....	27
2.2.1.2. Εκχύλιση με μικροκύματα	31
2.2.1.3. Εκχύλιση με υπερήχους.....	32
2.2.2.Υπερκρίσιμη εκχύλιση	34
2.2.2.1.Γενικά ιστορικά στοιχεία	35
2.2.2.2.Κρίσιμες - Υπερκρίσιμες συνθήκες.....	35
2.2.2.3.Ιδιότητες Υπερκρίσιμων ρευστών	36
2.2.2.4.Αρχή λειτουργίας της μεθόδου	37
2.2.3. Υδροαπόσταξη (Hydrodistillation).....	40
2.2.3.1.Μέθοδος Υδροαπόσταξης (CLEVENGER)	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	42
3.1. Εισαγωγή	42
3.2. Χαρακτηριστικά των αντιοξειδωτικών	42

3.3. Συνθετικά αντιοξειδωτικά	43
3.4. Φυσικά αντιοξειδωτικά	44
3.5. Οξειδωτικά: Ελεύθερες Ρίζες.....	45
3.5.1. Βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες	46
3.6. Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών.....	47
3.7. Αντιοξειδωτική δράση και ασθένειες.....	47
3.8. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	48
3.8.1. Μέθοδοι προσδιορισμού	48
3.8.1.1. Μέθοδος μέτρησης της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH').....	49
3.8.1.2. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας(TLC).....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	51
4.1. Αέρια χρωματογραφία(GC)	51
4.2. Φασματομετρία μάζας(MS)	51
4.3. ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΤΕΧΝΙΚΗ (GC-MS).....	52
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
i. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	53
ii. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΞΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΦΥΛΛΩΝ	54
5.1. ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΕ ΚΑΤΑΨΥΞΗ	54
5.1.1. Εξοπλισμός-Υλικά	54
5.1.2. Διαδικασία –Αποτελέσματα.....	54
5.2. ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ	57
5.2.1. Εκχύλιση Soxhlet με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας	59
5.2.2. Εκχύλιση με μικροκύματα.....	64
5.2.3. Εκχύλιση με υπερήχους	67
5.2.4. Υπερκρίσιμη Εκχύλιση.....	70
5.2.5. Υδροαπόσταξη(CLEVENGER)	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	79
6.1. Ποιοτικός προσδιορισμός TLC.....	79
6.1.1. Υλικά	79
6.1.2. Διαδικασία προσδιορισμού με τη μέθοδο TLC.....	79
6.1.3. Αποτελέσματα	80
6.2. Ποσοτικός προσδιορισμός DPPH	81
6.2.1. Αρχή της μεθόδου	81

6.2.2. Διαδικασία.....	81
6.2.3. Αποτελέσματα	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΝΑΛΥΣΗ GCMS	85
7.1. Εξοπλισμός- Διαδικασία	85
7.2. Αποτελέσματα ανά μέθοδο.....	85
7.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΥΔΡΟΑΠΟΣΤΑΞΗ	85
7.2.2. ΜΕΘΟΔΟΣ SOXHLET-ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ.....	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
8.1. ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΕ ΚΑΤΑΨΥΞΗ	89
8.2. ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ ΕΚΧΥΛΙΣΕΩΝ	89
8.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	90
8.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΑΝΑ ΜΕΘΟΔΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΕΠΙΛΟΓΟΣ	92
9.1. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ.....	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	96
11.1. ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΕ ΚΑΤΑΨΥΞΗ –ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΦΥΛΛΟ	96
11.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IC ₅₀ - ΠΙΝΑΚΕΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ-ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	97
11.2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ SOXHLET	97
11.2.2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ULTRASOUND.....	100
11.2.3. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MICROWAVE	103
11.2.4. ΚΑΜΠΥΛΗ ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	104
11.3. ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ GCMS	104

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 <i>Pistacia lentiscus</i>	17
Εικόνα 2 Ρητίνη από το μαστιχόδεντρο	17
Εικόνα 3 Μαστιχοφόρος σχίνος	18
Εικόνα 4 Καμπύλες ξήρανσης (α) και ρυθμού ξήρανσης (β)	21
Εικόνα 5 Μεταβολή της υγρασίας του στερεού με το χρόνο	22
Εικόνα 6 Σήραγγες ξήρανσης α: αντιροής, b: ομοροής, c: μικτής ροής με απομάκρυνση του αέρα στο μέσο (Porter et al., 1973)	23
Εικόνα 7: Α: Ξηραντήρας μεταφορικής ταινίας με διαβίβαση του αέρα δια μέσου του προϊόντος, Β: Ξηραντήρες τυμπάνου διαφόρων τύπων.....	23
Εικόνα 8 Διάγραμμα φάσεων του νερού ^[8]	25
Εικόνα 9 Σχηματική διάταξη ξήρανσης με κατάψυξη.....	26
Εικόνα 10 Conventional Soxhlet extractor ^[1]	28
Εικόνα 11 Α: Πειραματική διάταξη σχεδιασμένη για εκχύλιση Soxhlet με υπερήχους ^[1] , Β: Εκχύλιση Soxhlet υποβοηθούμενη από μικροκύματα ^[1]	30
Εικόνα 12 Ενδεικτική σύγκριση συμβατικής τεχνικής με εκχύλιση με μικροκύματα ^[34]	31
Εικόνα 13 Διάγραμμα φάσεων καθαρής ουσίας.....	35
Εικόνα 14 Διάγραμμα ροής Υπερκρίσιμης Εκχύλισης σε στερεά υποστρώματα.	38
Εικόνα 15 Συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger.....	41
Εικόνα 16 Συνθετικά αντιοξειδωτικά.....	43
Εικόνα 17 Ρίζα DPPH	49
Εικόνα 18 Τεχνική TLC.....	50
Εικόνα 19 Διάγραμμα ένος τυπικού τετράπολου GCMS	52
Εικόνα 20 Συσκευή ξήρανσης υπό κατάψυξη (Leybold-Heraeus GT 2A).....	55
Εικόνα 21 Συσκευή Soxhlet εργαστηρίου	59
Εικόνα 22 Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotary evaporator).....	59
Εικόνα 23 Δείγματα δοκιμαστικών εκχυλίσεων Soxhlet.....	60
Εικόνα 24 Πειραματική διάταξη (Digestion System, Start D, Milestone)	64
Εικόνα 25 Λουτρό υπερήχων	67
Εικόνα 26 Πιλοτική μονάδα Υ.Ε. εργαστηρίου Θερμοδυναμικής και Φαινομένων μεταφοράς.....	70
Εικόνα 27 αριστερά: Συσκευή Clevenger, δεξιά: Μέτρηση αιθερίου ελαίου στη συσκευή	78
Εικόνα 28 Α: Χρωματογραφία Α,1:Soxhlet ξερά φύλλα+νερό,2:Soxhlet φρέσκα φύλλα+νερό, Β: Χρωμ.Β,1: Microwave φρέσκα φύλλα,2:Ultrasound φρέσκα φύλλα+νερό,3:HD,4: Microwave ξερά φύλλα,5:Ultrasound ξερά φύλλα +νερό, Γ: Χρωμ.Δ,1:Soxhlet φρέσκα+εξάνιο,2: Soxlet ξερά+εξάνιο,3:Soxhlet φρέσκα+οξικός,4:Soxhlet ξερά+οξικός, Δ: Χρωμ.Ε, 1:Soxhlet φρέσκα+αιθανόλη,2:Soxhlet ξερά+αιθανόλη, 3:Ultrasound φρέσκα+αιθανόλη,4:Ultrasound ξερά+αιθανόλη	79
Εικόνα 29 Αναγωγή της ρίζας DPPH.....	81

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1 Μεταβολή υγρασίας φύλλα μαστίχας	56
Διάγραμμα 2 Σύγκριση αποδόσεων εκχύλισης Soxhlet για τα φρέσκα φύλλα.....	62
Διάγραμμα 3 Σύγκριση αποδόσεων εκχύλισης Soxhlet για τα ξερά φύλλα.....	63
Διάγραμμα 4 Αποδόσεις εκχυλίσεων με μικροκύματα για τα φρέσκα και τα ξερά φύλλα	66

Διάγραμμα 5 Αποδόσεις εκχύλισης φρέσκων φύλλων με υπερήχους.....	68
Διάγραμμα 6 Αποδόσεις εκχύλισης ξερών φύλλων με υπερήχους.....	69
Διάγραμμα 7 Καμπύλη Υ.Ε. για φρέσκα φύλλα.....	74
Διάγραμμα 8 καμπύλη ξήρανσης πείραμα Α.....	75
Διάγραμμα 9 καμπύλη ξήρανσης πείραμα Β.....	76
Διάγραμμα 10 Υ.Ε. Ξερά φύλλα πείραμα Γ.....	77
Διάγραμμα 11 IC ₅₀ φρέσκα φύλλα Μαστίχας.....	83
Διάγραμμα 12 IC ₅₀ ξερά φύλλα Μαστίχας.....	83
Διάγραμμα 13 Αποδόσεις εκχυλίσεων για όλες τις μεθόδους.....	90
Διάγραμμα 14 δράση εκχυλισμάτων ανά μέθοδο εκχύλισης.....	91
Διάγραμμα 15 Soxhlet ξερά φύλλα οξικός αιθυλεστέρας.....	99
Διάγραμμα 16 Soxhlet φρέσκα φύλλα οξικός αιθυλεστέρας.....	99
Διάγραμμα 17 Soxhlet φρέσκα φύλλα αιθανόλη.....	99
Διάγραμμα 18 Soxhlet ξερά φύλλα αιθανόλη.....	99
Διάγραμμα 19 Soxhlet ξερά φύλλα νερό.....	99
Διάγραμμα 20 Ultrasound αιθανόλη φρέσκα 300ml.....	102
Διάγραμμα 21 Ultrasound ξερά νερό 250ml.....	102
Διάγραμμα 22 Ultrasound αιθανόλη ξερά 250ml.....	102
Διάγραμμα 23 Ultrasound αιθανόλη φρέσκα 250ml.....	102
Διάγραμμα 24 Ultrasound φρέσκα νερό 250ml.....	102
Διάγραμμα 25 Ultrasound ξερά νερό 300ml.....	102
Διάγραμμα 26 μέθοδος microwave φρέσκα φύλλα.....	103
Διάγραμμα 27 μέθοδος microwave ξερά φύλλα.....	103
Διάγραμμα 28 Καμπύλη γαλλικού οξέος.....	104

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Μελέτες με χρήση υποβοηθούμενης με υπέρηχους εκχύλισης όπως βρέθηκε στη βιβλιογραφία για ποικιλία συστατικών τροφίμων ^[1]	33
Πίνακας 2 Σύγκριση φυσικοχημικών ιδιοτήτων αέριας, Υπερκρίσιμης και υγρής φάσης.....	36
Πίνακας 3 Διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διεργασίες Υ.Ε.....	37
Πίνακας 4-Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα Υ.Ε.....	39
Πίνακας 5 Υπολογισμός σταθεράς ξήρανσης.....	56
Πίνακας 6 Κοινοί διαλύτες εκχύλισης.....	58
Πίνακας 7 Αποδόσεις εκχυλίσεων Soxhlet για τα φρέσκα φύλλα.....	62
Πίνακας 8 Αποδόσεις εκχυλίσεων Soxhlet για τα ξερά φύλλα.....	63
Πίνακας 9 Αποδόσεις εκχυλίσεων με μικροκύματα για τα φρέσκα και τα ξερά φύλλα.....	65
Πίνακας 10 Αποδόσεις εκχύλισεων με υπερήχους για φρέσκα φύλλα.....	68
Πίνακας 11 Αποδόσεις εκχύλισεων με υπερήχους για ξερά φύλλα.....	69
Πίνακας 12 Τεχνικά χαρακτηριστικά και προδιαγραφές συσκευής.....	71
Πίνακας 13 Συνθήκες Υ.Ε. φρέσκων φύλλων.....	72
Πίνακας 14 Συνθήκες Υ.Ε. για ξερά φύλλα.....	73
Πίνακας 15 Μετρήσεις Υ.Ε. Φρέσκα φύλλα.....	74
Πίνακας 16 Υ.Ε. ξερά φύλλα-πείραμα Α.....	75
Πίνακας 17 Ξερά φύλλα πείραμα Β.....	76
Πίνακας 18 Ξερά φύλλα πείραμα Γ.....	77

Πίνακας 19 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα TLC.....	80
Πίνακας 20 Αποτελέσματα IC ₅₀ για τα εκχυλίσματα φρέσκων φύλλων.....	82
Πίνακας 21 Αποτελέσματα IC ₅₀ για τα εκχυλίσματα των ξερών φύλλων.....	82
Πίνακας 22 Σύγκριση σταθερών φύλλων μαστίχας και φύλλων ιπποφαούς.....	89
Πίνακας 23 Υπολογιστικό φύλλο για κινητική ξήρανσης με κατάψυξη.....	96
Πίνακας 24 μέθοδος Soxhlet εκχύλιση φρέσκα φύλλα αιθανόλη.....	97
Πίνακας 25 μέθοδος Soxhlet εκχύλιση ξερά φύλλα αιθανόλη.....	97
Πίνακας 26 μέθοδος Soxhlet εκχύλιση φρέσκα φύλλα οξικός αιθυλεστέρας.....	97
Πίνακας 27 μέθοδος Soxhlet εκχύλιση ξερά οξικός αιθυλεστέρας.....	98
Πίνακας 28 μέθοδος Soxhlet εκχύλιση ξερά νερό.....	98
Πίνακας 29 μέθοδος ultrasound ξερά φύλλα 300ml νερό.....	100
Πίνακας 30 μέθοδος ultrasound φρέσκα φύλλα 250ml νερό.....	100
Πίνακας 31 μέθοδος ultrasound ξερά φύλλα 250ml νερό.....	100
Πίνακας 32 μέθοδος ultrasound φρέσκα φύλλα αιθανόλη 300ml.....	101
Πίνακας 33 μέθοδος ultrasound φρέσκα φύλλα αιθανόλη 250ml.....	101
Πίνακας 34 μέθοδος ultrasound ξερά φύλλα αιθανόλη 250ml.....	101
Πίνακας 35 μέθοδος microwave ξερά φύλλα.....	103
Πίνακας 36 μέθοδος microwave φρέσκα φύλλα.....	103
Πίνακας 37 Μετρήσεις γαλλικού οξέος.....	104
Πίνακας 38 συστατικά αιθέριου ελαίου.....	104
Πίνακας 39 αιθέριο έλαιο ανάμιξη με εξάνιο.....	105
Πίνακας 40 Φρέσκα φύλλα Soxhlet με εξάνιο.....	106
Πίνακας 41 Ξερά φύλλα Soxhlet με εξάνιο.....	106
Πίνακας 42 Φρέσκα φύλλα Soxhlet με οξικό αιθυλεστέρα.....	107
Πίνακας 43 Ξερά φύλλα Soxhlet με οξικό αιθυλεστέρα.....	107
Πίνακας 44 φρέσκα φύλλα αιθανόλη μέθοδος ultrasound.....	108
Πίνακας 45 SFE Φρέσκα φύλλα καθαρισμός με αιθανόλη.....	109

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 Διαλυτότητα διαφόρων οργανικών ουσιών σε υπερκρίσιμο CO ₂	40
Σχήμα 2-Διάγραμμα ροής Διαδικασίας εκχύλισης φρέσκων και ξερών φύλλων.....	61
Σχήμα 3 Διάγραμμα ροής εκχύλισης με Μικροκύματα φρέσκων και ξερών φύλλων.....	65
Σχήμα 4 Διάγραμμα ροής εκχυλίσεων με υπερήχους.....	67
Σχήμα 5 Διάγραμμα ροής πιλοτικής μονάδας Υ.Ε.	71
Σχήμα 6 Ανάλυση αιθέριου ελαίου, παραλαβή με υδροαπόσταξη.....	85
Σχήμα 7 Ανάλυση αιθέριου ελαίου-παραλαβή με εξάνιο.....	86
Σχήμα 8 Εκχύλιση Soxhlet με διαλύτη εξάνιο ,Α: Φρέσκα φύλλα ,Β: ξερά φύλλα.....	87
Σχήμα 9 Εκχύλιση Soxhlet με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα,Α: Φρέσκα φύλλα,Β: ξερά φύλλα....	88
Σχήμα 10 φρέσκα φύλλα αιθανόλη μέθοδος ultrasound.....	107
Σχήμα 11 Α: Φρέσκα φύλλα, Β: ξερά φύλλα.....	108

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μαστιχόδεντρο ή σχίνος (*Pistacia lentiscus L*) είναι ένας αειθαλής θάμνος της Μεσογείου. Πρόκειται για ένα παραδοσιακό φαρμακευτικό φυτό της Μεσογείου που χρησιμοποιείται ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία διάφορων ασθενειών. Στην λαϊκή ιατρική χρησιμοποιείται ολόκληρος ο θάμνος και πληθώρα των ιδιοτήτων του περιγράφονται ήδη από το 15^ο-16^ο αιώνα. Επιπλέον, σήμερα του αποδίδονται και άλλες ιδιότητες όπως η αντιοξειδωτική ικανότητα, η ηπατοπροστατευτική και η αντι-φλεγμονώδης δράση. Η πλειοψηφία των μελετών που έχουν ως τώρα πραγματοποιηθεί αφορούν τη σύνθεση των καρπών του και του αιθέριου ελαίου από τη ρητίνη, ενώ πολύ λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί γύρω από τα φύλλα του^[2].

Η Μαστίχα της Χίου αναγνωρίστηκε από τα αρχαία χρόνια, τόσο για το ιδιαίτερο άρωμα της, όσο και για τις θεραπευτικές της ιδιότητες. Έχει καταγραφεί ως η πρώτη φυσική τσίκλα του αρχαίου κόσμου, που χρησιμοποιούνταν για τον καθαρισμό των δοντιών και τη φρεσκάδα της αναπνοής. Την χρησιμοποιούσαν ακόμη στην κοσμετολογία, για καθαρισμό του προσώπου και του σώματος. Συμμετείχε ως δραστικό συστατικό σε μια σειρά από φαρμακευτικές συνταγές, που έχουν κατά καιρούς καταγραφεί στις διεθνείς φαρμακοποιίες. Έχει επίσης καταγραφεί στη διάρκεια των αιώνων, λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων της στην υγεία του ανθρώπου και τη συμβολή στην ανακούφιση από ασθένειες, παρουσιάζει ευεργετική δράση κατά των παθήσεων του πεπτικού συστήματος, παρουσιάζει σημαντική αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση, αποτελεί φυσικό αντιοξειδωτικό, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην επούλωση τραυμάτων και την ανάπλαση της επιδερμίδας^[3].

ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ «ΠΡΑΣΙΝΕΣ» ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο ενισχύεται η επιτακτική ανάγκη για επαναπροσδιορισμό της επιστήμης της Χημείας, ώστε αυτή να συνδράμει στο σχεδιασμό χημικών διεργασιών και προϊόντων, φιλικά προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Έτσι δημιουργήθηκε η έννοια της «πράσινης» Χημείας, η οποία μέσα στους στόχους της ενσωματώνει την ελαχιστοποίηση των αρνητικών επιπτώσεων στο φυσικό περιβάλλον από την παραγωγή, χρήση και διάθεση των χημικών προϊόντων. Γι' αυτό το λόγο ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στον τομέα ανάπτυξης νέων τεχνικών οι οποίες θα είναι ταχύτερες, οικονομικότερες αλλά και αποδοτικότερες. Οι πιο διαδεδομένες από αυτές τις τεχνικές, που έχουν βρει ευρεία εφαρμογή μέχρι σήμερα, είναι: η τεχνική της Υπερκρίσιμης εκχύλισης (**YE**), της εκχύλισης με την χρήση Μικροκυμάτων (microwave assisted extraction-**MAE**) και η εκχύλιση με τη χρήση Υπερήχων (ultrasound assisted extraction-**USE**).

Οι τεχνικές αυτές, βασιζόμενες σε διαφορετικές αρχές η κάθε μία, εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες των κυμάτων, των ακτινοβολιών και τις ιδιότητες διαλυτών σε υψηλές συνθήκες (πίεση και θερμοκρασία) και σαν συνέπεια έχουν οδηγήσει στη δραστική μείωση της χρήσης των συμβατικών διαλυτών αλλά και του χρόνου εκχύλισης. Επίσης, μία πολύ σημαντική περιοχή έρευνας είναι η εύρεση διαλυτών: στην κλασική Χημεία οι συνήθως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, είναι στην πλειοψηφία τους οργανικές ενώσεις, οι οποίοι όμως αποδείχθηκαν τοξικοί και επιβλαβείς για τον άνθρωπο. Η επιτακτική ανάγκη αντικατάστασης των οργανικών διαλυτών οδήγησε τα τελευταία χρόνια στην ολοένα αυξανόμενη έρευνα εναλλακτικών διαλυτών όπως τα υδατικά συστήματα, τα Υπερκρίσιμα ρευστά και τα ιοντικά υγρά.

ii. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σήμερα η επιστημονική κοινότητα έχει επιβεβαιώσει και τεκμηριώσει τις ευεργετικές δράσεις της Μαστίχας Χίου που αναφέρθηκαν. Με την εκπόνηση της παρούσας μελέτης στόχος μας είναι η συμβολή στην έρευνα αυτή και η εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων τα οποία θα αποτελέσουν την βάση για νέα, βαθύτερη έρευνα γύρω από την αντιοξειδωτική δράση και τις ουσίες που έχουν τα φύλλα του μαστιχόδεντρου, τα οποία αποτελούν «παραπροϊόν» στην επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία συλλογής των καρπών και της ρητίνης.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού, στην παρούσα εργασία έγινε εφαρμογή σύγχρονων τεχνικών εκχύλισης, κάνοντας χρήση μη τοξικών διαλυτών όπως το CO₂, η αιθανόλη και το νερό αλλά και χρήση κλασικών τεχνικών για σύγκριση της απόδοσης των διεργασιών αλλά και των ποιοτικών χαρακτηριστικών των παραληφθέντων εκχυλισμάτων. Για την αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας των εκχυλισμάτων έγινε χρήση της μεθόδου 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Τέλος, έγινε καθορισμός της ποιοτικής τους σύστασης με αέρια χρωματογραφία (GC-MS). Έτσι η εργασία ακολουθεί την εξής πορεία:

Το θεωρητικό μέρος αποτελείται από τέσσερα κεφάλαια, στα οποία γίνεται προσπάθεια κάλυψης όλων των πτυχών της μελέτης, από την ιδιαιτερότητα των φύλλων έως και την ανάλυση των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν.

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται παρουσίαση του φυτού και των ιδιοτήτων του. Γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στη Μαστίχα από τη Χίο. Στο δεύτερο κεφάλαιο, γίνεται παρουσίαση των μεθόδων με τις οποίες επεξεργαστήκαμε τα φύλλα της Μαστίχας. Αναλύονται συγκεκριμένα οι μέθοδοι ξήρανσης που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα και οι μέθοδοι διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Στο τρίτο κεφάλαιο, πραγματοποιείται εκτεταμένη ανάλυση της δράσης των αντιοξειδωτικών αλλά και των μεθόδων προσδιορισμού της δράσης αυτής, είτε ποιοτικά είτε ποσοτικά. Στο τέταρτο κεφάλαιο του θεωρητικού μέρους, γίνεται αναφορά στην μέθοδο αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της σύστασης των εκχυλισμάτων.

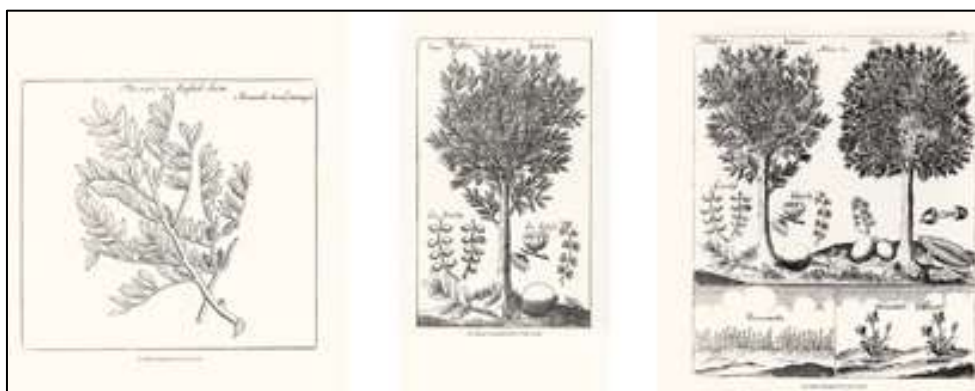
Στο πέμπτο κεφάλαιο της εργασίας γίνεται παρουσίαση της πειραματικής διαδικασίας ανά μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Στο κεφάλαιο αυτό, εκτός από την αρχή κάθε μεθόδου καταγράφονται και τα πειραματικά αποτελέσματα. Για λόγους έμφασης το κεφάλαιο αυτό περιλαμβάνει τη μέθοδο ξήρανσης με κατάψυξη αλλά και όλες τις μεθόδους διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει ακόμη το έκτο κεφάλαιο, όπου περιγράφεται ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων. Χρησιμοποιήθηκε η ποιοτική μέθοδος TLC αλλά έγινε και ποσοτικός προσδιορισμός με DPPH. Στο έβδομο κεφάλαιο, παρουσιάζεται η ανάλυση GCMS για τα δείγματα ενώ στο όγδοο κεφάλαιο γίνεται καταγραφή των συμπερασμάτων μετά την διεξαγωγή της μελέτης.

Στο παράρτημα παρατίθενται αρχικά οι καμπύλες απορρόφησης-συγκέντρωσης που δημιουργήθηκαν για τον υπολογισμό του IC₅₀. Ακολουθούν οι πίνακες με τις μετρήσεις για την κατασκευή των παραπάνω καμπυλών. Τέλος, ακολουθούν οι αναλυτικοί πίνακες που δημιουργήθηκαν από την ανάλυση των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο GCMS.

Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Μαστιχόδεντρο ή Σχίνος (*Pistacia lentiscus*)

Το μαστιχόδεντρο ή σχίνος (*Pistacia lentiscus*), είναι ένας πυκνός αιθαλής θάμνος της οικογένειας *Anacardiaceae*. Είναι γηγενής στην περιοχή της Μεσογείου που εκτείνεται από τη Συρία έως την Ισπανία και ιδιαίτερα στην περιοχή του ελληνικού αρχιπελάγους (*Pistacia lentiscus* var *chia*). Βρίσκεται επίσης στην Πορτογαλία, το Μαρόκο, και τις Κανάριες Νήσους. Καλλιεργείται για την αρωματική ρητίνη του, κυρίως στο ελληνικό νησί της Χίου. Περίπου το 50 μ.Χ., η παραγωγή της ρητίνης από το μαστιχόδεντρο είχε περιοριστεί σχεδόν αποκλειστικά στο ελληνικό νησί της Χίου, στο Αιγαίο πέλαγος.



Εικόνα 1 *Pistacia lentiscus*

Η ρητίνη αυτή, περιέχεται στο φλοιό και όχι στο ξύλο, και προκειμένου να γίνει η συλλογή της γίνονται πολυάριθμες κατακόρυφες τομές. Η συλλογή πραγματοποιείται κατά τους μήνες Ιούνιο, Ιούλιο και Αύγουστο στο δέντρο αλλά και τα μεγαλύτερα κλαδιά. Η ρητίνη ρέει γρήγορα και σκληραίνει σε οβάλ δάκρυα, τα οποία συλλέγονται κάθε 15 ημέρες. Η συλλογή αυτή επαναλαμβάνεται αρκετές φορές μεταξύ Ιουνίου και Σεπτεμβρίου. Η μαστίχα είναι συνήθως στο εμπόριο με τη μορφή σφαιροειδών δακρύων. Τα δάκρυα αυτά είναι διαφανή, με ένα υαλώδες κάταγμα, με υποκίτρινη ή πρασινωπή απόχρωση, η οποία σκουραίνει με την πάροδο του χρόνου^[4].



Εικόνα 2 Ρητίνη από το μαστιχόδεντρο

1.1. Μαστιχόδεντρο ή Σχίνος από τη Χίο (*Pistacia Lentiscus var chia*)

Για την πλήρη ανάπτυξή του απαιτούνται γύρω στα 40-50 χρόνια και ζει περίπου 100 χρόνια. Από τον 5^ο έως 6^ο χρόνο δίνει τη ρητίνη του (μαστίχα) και μετά τον 15^ο χρόνο παράγει από 60 έως 250 γραμμάρια και σε σπάνιες περιπτώσεις μέχρι 400 γραμμάρια. Το μαστιχόδενδρο ευδοκیمی αποκλειστικά και μόνο στη Νότια Χίο. Σύμφωνα με θεωρίες, αυτό οφείλεται στο εύκρατο κλίμα και ειδικότερα στο μικροκλίμα της περιοχής, στα υποθαλάσσια ηφαίστεια και στο ασβεστολιθικό έδαφος.

Από το παρελθόν έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να καλλιεργηθεί ο μαστιχοφόρος σχίνος σε άλλες περιοχές της Ελλάδας αλλά και σε άλλα κράτη, χωρίς όμως επιτυχία. Η προετοιμασία του σχίνου και η συλλογή της μαστίχας είναι πολύ επίπονες εργασίες, που αρχίζουν τον Ιούνιο με το καθάρισμα του εδάφους κάτω από το σχίνο. Το έδαφος, αφού καθαριστεί επιμελώς, στρώνεται με ένα ειδικό άσπρο χρώμα καλά κοσκινισμένο. Κατόπιν αρχίζει το «κέντημα» στον κορμό του δένδρου, που είναι τομές 10-15mm, μία φορά την εβδομάδα για 6-8 εβδομάδες.



Εικόνα 3 Μαστιχοφόρος σχίνος

Για το «κέντημα», εδώ και αιώνες, χρησιμοποιείται το «κεντητήρι» ένα αιχμηρό και αυλακωτό εργαλείο. Το πρώτο χάραγμα, «το ρήνιασμα», γίνεται στις αρχές Ιουλίου, με λίγες αραιές κεντιές χαμηλά στον κορμό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε 6-8 ημέρες με περισσότερες, πυκνές κεντιές. Ο αριθμός των τομών ποικίλει από 20-100 ανάλογα με την ηλικία και το μέγεθος του δένδρου. Η μαστίχα αρχίζει σιγά-σιγά να ρέει από τις τομές σαν δάκρυ. Η μεγαλύτερη ποσότητα πέφτει στο ασπρόχρωμα και κάνει 15-30 μέρες να στερεοποιηθεί, αναλόγως των καιρικών συνθηκών.

Μετά, αρχίζει η συλλογή της χοντλής μαστίχας (των μεγάλων κομματιών), στα μέσα Αυγούστου και της ψιλής μαστίχας από τις αρχές Σεπτεμβρη. Το καθάρισμα της μαστίχας αρχίζει τον Οκτώβριο – Νοέμβριο, αμέσως μετά τη συλλογή. Είναι μια δύσκολη, εξειδικευμένη διαδικασία που γίνεται κομμάτι-κομμάτι με το χέρι, μέχρι η μαστίχα να πάρει την τελική εμπορική της μορφή και να διατεθεί προς πώληση^[5].

1.2. Ιδιότητες Μαστίχας

Ο σχίνος της Μαστίχας (*Pistacia lentiscus*) είναι ένας αειθαλής θάμνος ο οποίος μπορεί να φτάσει ως και τα 8 m ύψος^[6], με μακρά παράδοση στη λαϊκή ιατρική από τους αρχαίους Έλληνες^[7]. Το εναέριο τμήμα της έχει παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί ως διεγερτικό, χάρη στις διουρητικές ιδιότητες του, αλλά και για τη θεραπεία της υπέρτασης, του βήχα, για τον πονόλαιμο, για το έκζεμα, για πόνους στο στομάχι, πέτρες στα νεφρά και ίκτερο^[7, 8]. Τα εναέρια μέρη φαίνεται να έχουν καμία ή μόνο ασθενή αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι των Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων^{[9], [10]}. Η αντιμυκητική δραστηριότητα φαίνεται να έχει μεγαλύτερο ενδιαφέρον έναντι κλινικής ζύμης^[6] και παθογόνων γεωργικών μυκήτων^[11].

Το **αιθέριο έλαιο της ρητίνης** αποδείχθηκε πολύ δραστικό έναντι μικροοργανισμών και μυκήτων, ενώ τα **έλαια από τα φύλλα και τα κλαδιά** έδειξαν μέτρια δραστικότητα έναντι των βακτηρίων και ήταν εντελώς ανενεργά εναντίον των μυκήτων^[12].

Οι φαινολικές ενώσεις των φύλλων αναφέρεται είναι ικανές να εξουδετερώσουν τη ρίζα 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH)^{[13]-[14]}. Επίσης, αποδείχθηκε ότι η παρουσία γαλλικού οξέος και των παραγώγων του, η 1, 2, 3, 4, 6 πενταγαλλογλυκόζη στους καρπούς, παίζουν ένα προστατευτικό ρόλο κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων που προκαλείται από το H₂O₂ στην K562 κυτταρική γραμμή^[15].

Η μαστίχα Χίου (Chios Mastic Gum) είναι επίσης γνωστό ότι περιέχει ενώσεις που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και προκαλούν το θάνατο των HCT116 κύτταρων, ανθρώπινου καρκίνου του παχέος εντέρου in vitro^[16].

Άλλα είδη στον κόσμο, για παράδειγμα στην Αλγερία, η *Pistacia Atlantica* (Betoum) είναι ένα δέντρο το οποίο μπορεί να φτάσει τα 25 m ύψος και έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του πεπτικού έλκους και για την κακοσμία του στόματος^[17].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ

2.1.ΞΗΡΑΝΣΗ

Εισαγωγή

Ως ξήρανση (drying) ή αφυδάτωση (dehydration) ορίζεται η διεργασία απομάκρυνσης (με εξάτμιση ή εξάχνωση) ενός πτητικού υγρού (κυρίως νερού) από στερεά σώματα (κυρίως τρόφιμα). Αποτελεί μια διεργασία ταυτόχρονης μεταφοράς θερμότητας και μάζας, μεταξύ στερεών σωμάτων και αδρανών αερίων ή κενού. Ο ρυθμός απομάκρυνσης της πτητικής ουσίας από το στερεό (ρυθμός ξήρανσης) επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες οι οποίοι μπορούν να ομαδοποιηθούν ως εξής:

- παράγοντες που συνδέονται με τις συνθήκες ξήρανσης
- παράγοντες που συνδέονται με τη φύση του στερεού
- παράγοντες που συνδέονται με το σχεδιασμό της συσκευής ξήρανσης (ξηραντήρας)^[18]

Οι βασικοί λόγοι εφαρμογής της διεργασίας της ξήρανσης είναι ποιοτικοί, για την συντήρηση υψηλής ποιότητας των τροφίμων και σταθερότητα του τελικού προϊόντος, είναι οικονομικοί καθώς με την ελάττωση του βάρους και του όγκου η μεταφορά, η συσκευασία αλλά και η αποθήκευση καθίστανται οικονομικότερες και τέλος είναι τεχνολογικοί, καθώς σε διάφορες διεργασίες απαιτείται ξηρό προϊόν (κοσκίνιση κλπ.)

Αναφορικά τα κυριότερα είδη της ξήρανσης είναι:

- ✓ Ξήρανση σε ρεύμα αέρα
- ✓ Ξήρανση με μικροκύματα
- ✓ Ξήρανση υπό κενό
- ✓ Ξήρανση με κατάψυξη^[19]

Ξήρανση των τροφίμων

Ο περιορισμός της ανάπτυξης και δράσης των μικροοργανισμών μπορεί να επιτευχθεί με μείωση του διαθέσιμου νερού. Στην ξήρανση των τροφίμων επιδιώκεται η απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους του νερού που περιέχουν ώστε να σταματούν πρακτικά οι μικροβιακές δράσεις. Επί πλέον της συντήρησης του τροφίμου η ξήρανση μπορεί να έχει και άλλους στόχους, όπως η μείωση του όγκου που διευκολύνει τη μεταφορά και την αποθήκευση, ή η παρασκευή προϊόντων κατάλληλων για χρήση π.χ. μίγματα για κέικ, για σουπες κ.ά.

Η ξήρανση (drying) στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται για τη διεργασία στην οποία η απομάκρυνση νερού από το τρόφιμο γίνεται με εξάτμιση. Διαφέρει από τη συμπύκνωση (concentration) ως προς το τελικό περιεχόμενο νερού στο τρόφιμο, το οποίο είναι χαμηλότερο στην περίπτωση της ξήρανσης. Αντί του όρου ξήρανση πολλές φορές χρησιμοποιείται ο όρος αφυδάτωση (dehydration).

Σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό διεργασίες απομάκρυνσης νερού με κατάλληλους διαλύτες, ή μείωσης του διαθέσιμου νερού με προσθήκη ζάχαρης ή αλατιού δεν περιλαμβάνονται στον όρο ξήρανση. Ιδιαίτερα πρέπει να αναφερθεί η απομάκρυνση νερού υπό τη μορφή εξάχνωσης πάγου, η οποία καλείται ξήρανση με κατάψυξη η οποία θα αναπτυχθεί εκτενώς στην επόμενη παράγραφο (freeze drying, freeze dehydration).

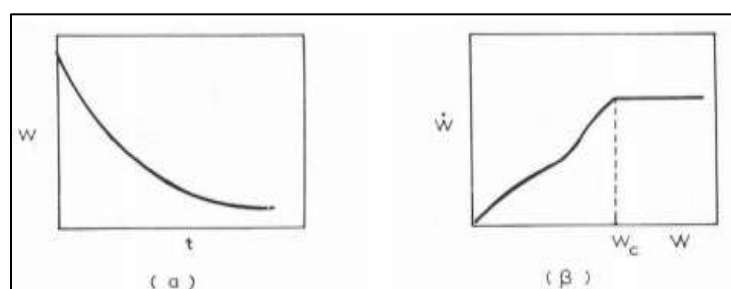
Επίσης η απομάκρυνση νερού είναι εφικτή με διαλύματα ζαχάρων ή αλατιού, υψηλής ωσμωτικής πίεσης, η οποία αποδίδεται με τον όρο ωσμωτική αφυδάτωση (osmotic dehydration).

Η ξήρανση των περισσότερων τροφίμων γίνεται με θέρμανση. Επομένως είναι μία διεργασία στην οποία εμπλέκεται μεταφορά μάζας (νερού) από το τρόφιμο προς το περιβάλλον και μεταφορά θερμότητας από το μέσον θέρμανσης προς το τρόφιμο. Γίνεται σε ξηραντήρες διαφόρων τύπων, στους οποίους ο μηχανισμός μεταφοράς θερμότητας προς το προϊόν και μεταφοράς μάζας από το προϊόν διαφέρει. Στην ξήρανση των τροφίμων ισχύουν οι βασικές αρχές που διέπουν την ξήρανση οποιουδήποτε άλλου προϊόντος. Οι ιδιαιτερότητες των τροφίμων σχετίζονται με το ρόλο του νερού σε αυτά και την ευαισθησία των συστατικών και των ποιοτικών χαρακτηριστικών τους στις θερμικές διεργασίες.^[20]

2.1.1. Καμπύλες ξήρανσης-Ρυθμός ξήρανσης

Η ξήρανση αποτελεί, συνήθως, το τελικό στάδιο επεξεργασίας πριν την συσκευασία και κάνει πολλά υλικά καταλληλότερα για χρησιμοποίηση. Ακόμα η ξήρανση ή αφυδάτωση των βιολογικών υλικών και ιδιαίτερα των τροφίμων, χρησιμοποιείται και ως μέθοδος συντήρησης καθώς, οι μικροοργανισμοί που προκαλούν την καταστροφή των τροφίμων και την αποσύνθεση τους δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν απουσία νερού. Επίσης, πολλά ένζυμα που προκαλούν χημικές αλλαγές στα τρόφιμα και σε άλλα βιολογικά προϊόντα δεν μπορούν να δράσουν χωρίς νερό. Η περιεχόμενη υγρασία στα τρόφιμα πρέπει να κυμαίνεται σε ένα ποσοστό 5% κ.β έως και 10% κ.β περίπου, ώστε να είναι ανενεργοί οι μικροοργανισμοί αλλά και να διατηρηθεί η γεύση και η θρεπτική αξία των τροφίμων.^[18]

Οι καμπύλες ξήρανσης κατασκευάζονται με βάση πειραματικά δεδομένα υγρασίας- χρόνου που λαμβάνονται κατά την ξήρανση υλικών. Κατά την ξήρανση προσδιορίζεται η υγρασία του τροφίμου, εκφρασμένη συνήθως σε ξηρή βάση, σε διάφορες χρονικές στιγμές και η υγρασία ισορροπίας. Με βάση αυτά τα δεδομένα κατασκευάζεται η καμπύλη ξήρανσης με τεταγμένη την υγρασία του τροφίμου ή την ελεύθερη υγρασία αυτού και τετμημένη το χρόνο ξήρανσης. Με αριθμητική διαφόρηση των πειραματικών δεδομένων προκύπτει ο ρυθμός ξήρανσης δηλαδή η μεταβολή της υγρασίας ως προς το χρόνο ξήρανσης και η καμπύλη του ρυθμού ξήρανσης δίνει τη μεταβολή του ρυθμού ξήρανσης ως συνάρτηση της υγρασίας ή της ελεύθερης υγρασίας. Τυπικές μορφές αυτών των καμπυλών δίνονται στην εικόνα 4 (α,β). Στην εικόνα φαίνεται ο αρχικός σταθερός ρυθμός ξήρανσης που ακολουθούν τα περισσότερα προϊόντα, ακολουθούμενος από μειωνόμενο ρυθμό ξήρανσης. Το σημείο στο οποίο παρατηρείται αυτή η μεταβολή του ρυθμού ξήρανσης καλείται κρίσιμη περιεκτικότητα σε υγρασία (w_c).



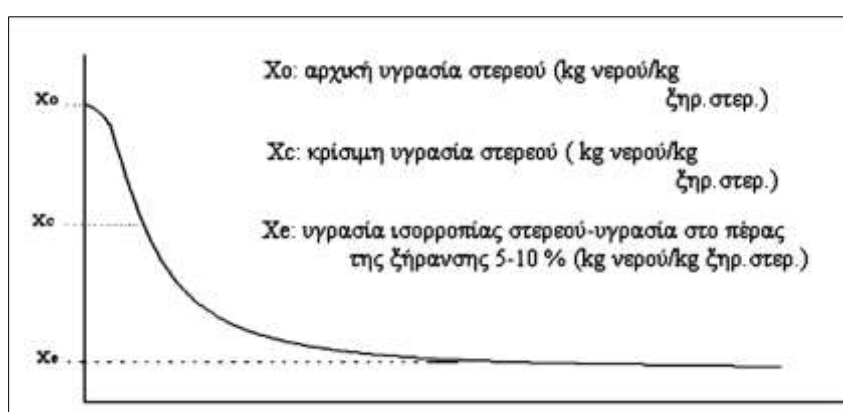
Εικόνα 4 Καμπύλες ξήρανσης (α) και ρυθμού ξήρανσης (β)

Περίοδος σταθερού ρυθμού ξήρανσης: Η επιφάνεια του προϊόντος είναι κορεσμένη με νερό και η απομάκρυνση της υγρασίας ελέγχεται από το ρυθμό εξάτμισης του νερού από την επιφάνεια προς τον περιβάλλοντα χώρο. Η περίοδος αυτή διαρκεί όσο η μεταφορά υγρασίας προς την επιφάνεια είναι ταχύτερη από την εξάτμιση από την επιφάνεια.

Περίοδος μειωνόμενου ρυθμού ξήρανσης: Η μεταφορά υγρασίας προς την επιφάνεια του τροφίμου είναι το ελέγχον στάδιο και η επιφάνεια δεν είναι πια κορεσμένη με νερό. Η περίοδος του μειωνόμενου ρυθμού ξήρανσης αρχίζει σε υγρασία χαμηλότερη από την κρίσιμη υγρασία και ο ρυθμός ξήρανσης σε αυτή μπορεί να μειώνεται γραμμικά με την υγρασία ^[20].

Χαρακτηριστική καμπύλη ξήρανσης

Στην εικόνα 5, παρουσιάζεται μία τυπική καμπύλη μεταβολής υγρασίας του στερεού με το χρόνο.



Εικόνα 5 Μεταβολή της υγρασίας του στερεού με το χρόνο

Η εξίσωση που περιγράφει το φαινόμενο της ξήρανσης είναι απλή, γεγονός ιδιαίτερα επιθυμητό στο σχεδιασμό ξηραντήρα, όπου απαιτούνται επαναληπτικοί υπολογισμοί.

$$-\frac{dX}{dt} = K(X - X_e)$$

Ολοκληρώνοντας έχουμε:

$$X = X_e + (X_0 - X_e) e^{-Kt}$$

K: σταθερά ξήρανσης (s⁻¹), περιγράφει την κινητική της ξήρανσης.

Η εκθετική καμπύλη υγρασίας χρόνου αποτελεί τη χαρακτηριστική καμπύλη του φαινομένου (εικόνα 5)^[19].

2.1.2. Τύποι ξηραντήρων

Οι ξηραντήρες μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τους αδιαβατικούς και τους μη αδιαβατικούς. Στους **αδιαβατικούς** ξηραντήρες η θερμότητα εξάτμισης παρέχεται από ρεύμα αέρα το οποίο απάγει συγχρόνως την εξατμιζόμενη υγρασία. Κατά την περίοδο του σταθερού ρυθμού ξήρανσης η θερμοκρασία του τροφίμου παραμένει κατά προσέγγιση ίση με τη θερμοκρασία υγρού θερμομέτρου. Στους **μη αδιαβατικούς** ξηραντήρες η θερμότητα παρέχεται στο προϊόν με ακτινοβολία ή με αγωγή μέσω επαφής με μία επιφάνεια. Η θερμοκρασία της επιφάνειας του προϊόντος που βρίσκεται σε επαφή με την πηγή θερμότητας αυξάνει και οι υδρατμοί απομακρύνονται με κενό ή με κάποιο αέριο.

Οι **αδιαβατικοί ξηραντήρες** χωρίζονται περαιτέρω σε:

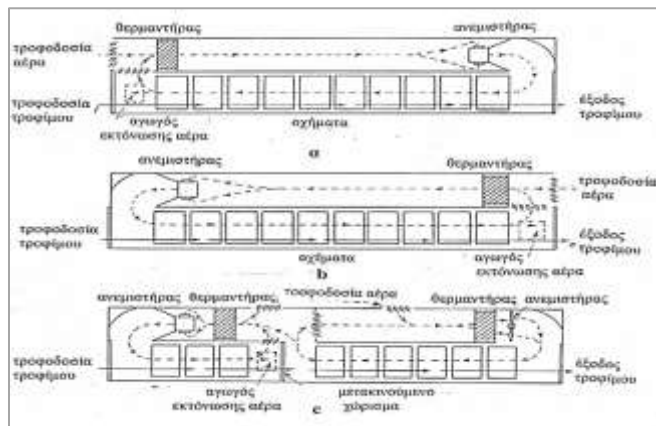
- ✓ ξηραντήρες με ρεύμα αέρα (το οποίο συνήθως περνά υπεράνω της επιφάνειας του προς ξήρανση τροφίμου)
- ✓ ξηραντήρες με αιώρηση μικρότατων σταγονιδίων τροφίμου σε ρεύμα αέρα

Στους ξηραντήρες με ρεύμα αέρα το προϊόν μπορεί να βρίσκεται ακίνητο πάνω σε ράφια (θάλαμοι ξήρανσης, σήραγγες ξήρανσης (Εικόνα 6)) ή να μετακινείται συνεχώς δια μέσου του ξηραντήρα (ξηραντήρες με μεταφορική ταινία (Εικόνα7:A), περιστρεφόμενοι ξηραντήρες).

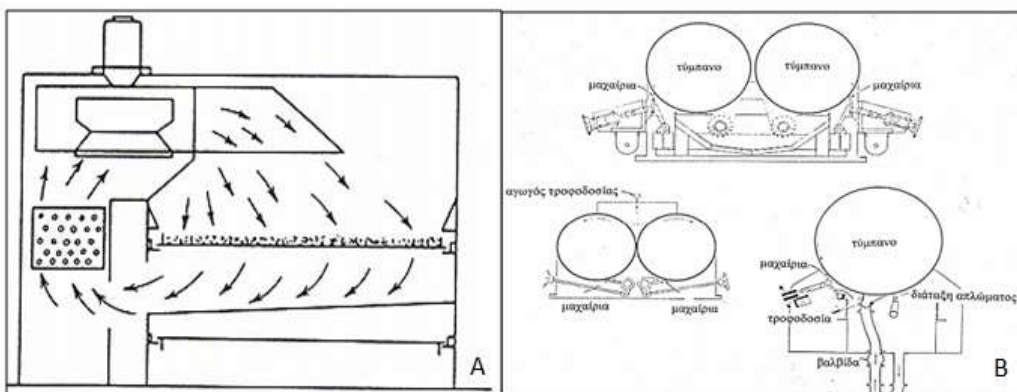
Οι ξηραντήρες με αιώρηση σε αέρα περιλαμβάνουν τους ξηραντήρες με ψεκασμό, τους ξηραντήρες πνευματικής μεταφοράς και τους ξηραντήρες ρευστοστερεάς κλίνης. Ενδεικτικά ακολουθούν ορισμένοι από τους χαρακτηριστικότερους τύπους αδιαβατικών ξηραντήρων που χρησιμοποιούνται :

Οι κύριοι **μη αδιαβατικοί** ξηραντήρες που χρησιμοποιούνται για ξήρανση τροφίμων είναι :

- ✓ οι ξηραντήρες τυμπάνου (Εικόνα 7:B)
- ✓ οι ξηραντήρες κενού
- ✓ οι θάλαμοι ξήρανσης υπό κατάψυξη οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω (που είναι και αυτοί ξηραντήρες κενού)^[19]



Εικόνα 6 Σήραγγες ξήρανσης α: αντιρροής, b: ομορροής, c: μικτής ροής με απομάκρυνση του αέρα στο μέσο (Porter et al., 1973)



Εικόνα 7: A: Ξηραντήρας μεταφορικής ταινίας με διαβίβαση του αέρα δια μέσου του προϊόντος (Porter et al.,1973), B: Ξηραντήρες τυμπάνου διαφόρων τύπων (Heldman and Singh, 1981)

2.1.3. Ξήρανση με κατάψυξη

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της **ξήρανσης με κατάψυξη**. Η παραλαβή του αιθέριου ελαίου και σημαντικών συστατικών από τα φύλλα της Μαστίχας αποτελεί στόχο της παρούσας εργασίας, συνεπώς από τις μεθόδους που αναφέραμε ήδη έγινε η επιλογή της ξήρανσης με κατάψυξη ώστε να επιτευχθεί ο στόχος αυτός.

Εισαγωγή

Στις συμβατικές διεργασίες ξήρανσης (με θέρμανση του υλικού) που αναφέρθηκαν παραπάνω υπάρχουν ορισμένα προβλήματα:

- ✓ ορισμένες ουσίες υφίστανται παραμορφώσεις ή/και φθορές κατά την ξήρανση
- ✓ ορισμένες ουσίες δεν μπορούν να θερμανθούν στην απαιτούμενη θερμοκρασία, γιατί υπάρχει κίνδυνος να υποστούν αλλοιώσεις ή, ειδικά στα τρόφιμα, μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, που να τα καθιστούν δυσάρεστα και ανεπιθύμητα
- ✓ τέλος, με την απλή ξήρανση μόνο το 90%-95% της υγρασίας μιας ουσίας μπορεί να απομακρυνθεί. Σε ευαίσθητες σε αλλοιώσεις ουσίες, όπως π.χ. στα τρόφιμα, το υπολοιπόμενο νερό είναι αρκετό για να διατηρηθεί μια μικρή μεν αλλά υπαρκτή ενζυμική ή/και μικροβιακή δραστηριότητα, με αποτέλεσμα τη βαθμιαία αλλοίωση του προϊόντος.^[21]

Ένας εναλλακτικός τρόπος ξήρανσης αυτών των ευαίσθητων υλικών είναι να ψυχθούν σε χαμηλή θερμοκρασία, και στη συνέχεια το νερό να απομακρυνθεί από αυτά με εξάχνωση. Η διεργασία αυτή ονομάζεται ξήρανση με κατάψυξη ή λυοφιλίωση (lyophilization) επειδή τα παραγόμενα ξηρά προϊόντα είναι ιδιαίτερα λυόφιλα, δηλ. απορροφούν εύκολα το νερό^[20]. Η μέθοδος αυτή βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους, όπως για παράδειγμα στη βιομηχανία τροφίμων αλλά και φαρμακοβιομηχανία (πρωτεΐνες, εμβόλια, κ.ά.). Έχουν αναφερθεί και πιο σπάνιες εφαρμογές της, όπως είναι η συντήρηση αρχαιολογικού ή/και αρχαιακού υλικού^[21].

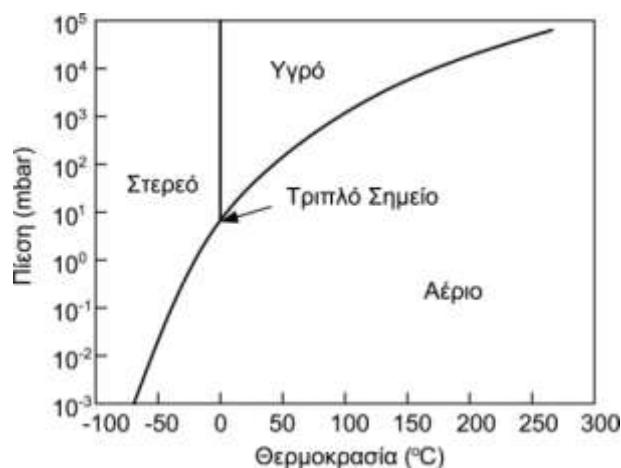
Η ξήρανση υπό κατάψυξη χρησιμοποιήθηκε αρχικά στα 1940 για την παραγωγή ξηρού πλάσματος και αργότερα για την ξήρανση αντιβιοτικών και βιολογικών υλικών^[22]. Σήμερα, εφαρμόζεται σε ποικίλα προϊόντα υψηλής αξίας όπως τρόφιμα που περιέχουν υψηλά ποσοστά πρωτεϊνών και πτητικών ουσιών και είναι επιρρεπή σε αντιδράσεις αμαύρωσης (εκχυλίσματα καφέ ή τσαγιού, φρούτα, λαχανικά, κρέας ή ψάρι) ή φαρμακευτικά προϊόντα^[22, 23], καθώς αποτελεί μία ήπια διεργασία για την παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας.

Η ξήρανση υπό κατάψυξη πραγματοποιείται συνηθέστερα υπό την επίδραση υψηλού κενού^[24], της τάξεως των 0,03 έως 3 mbar. Η εφαρμογή μικροκυμάτων ή η λειτουργία σε ατμοσφαιρική πίεση μπορούν εναλλακτικά να χρησιμοποιηθούν, μειώνοντας το κόστος λειτουργίας^[22].

Πραγματοποιείται σε δύο στάδια: αρχικά το υλικό καταψύχεται και στη συνέχεια ο πάγος απομακρύνεται με εξάχνωση, απευθείας από την στερεή στην αέρια φάση^[25]. Κατά την κατάψυξη, αρχικά το νερό που βρίσκεται στο εσωτερικό του ελεύθερο ή σε μορφή κολλοειδούς διαλύματος μετατρέπεται σε πάγο.

Στη συνέχεια, η θερμοκρασία ψύξης μειώνεται έως ότου κρυσταλλωθούν και τα ευθηκτικά διαλύματα. Η κατάψυξη διαχωρίζει τα υδατικά διαλύματα των τροφίμων σε δύο φάσεις: τον πάγο και τη συμπυκνωμένη φάση των διαλυτών στερεών. Η πίεση που εφαρμόζεται είναι τόση ώστε να διατηρείται η πίεση του πάγου κάτω από το τριπλό του σημείο (χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία η στερεά και υγρή φάση του υλικού μπορούν να συνυπάρξουν). Η κατάσταση αυτή είναι απαραίτητη για να είναι δυνατή η εξάχνωση και όχι η εξάτμιση του νερού^[26]. Η εξάχνωση βασίζεται στη δημιουργία διαφοράς τάσης ατμών μεταξύ του πάγου στο εσωτερικό του υλικού και του ξηρού περιβάλλοντος.

Αρχικά, ο ρυθμός ξήρανσης είναι υψηλός, καθώς υπάρχει μικρή αντίσταση στη ροή θερμότητας και μάζας. Όσο εξελίσσεται η διεργασία, ο ρυθμός μειώνεται, καθώς το ξηρό στρώμα που δημιουργείται γύρω από το υλικό εμποδίζει τη μεταφορά θερμότητας στους κρυστάλλους πάγου. Επίσης, η μεταφορά μάζας μειώνεται όσο αυξάνεται το πάχος του ξηρού στρώματος, εξαιτίας της μείωσης της διάχυσης υγρασίας από τη διεπιφάνεια εξάχνωσης στην επιφάνεια του υλικού^[22].



Εικόνα 8 Διάγραμμα φάσεων του νερού^[8]

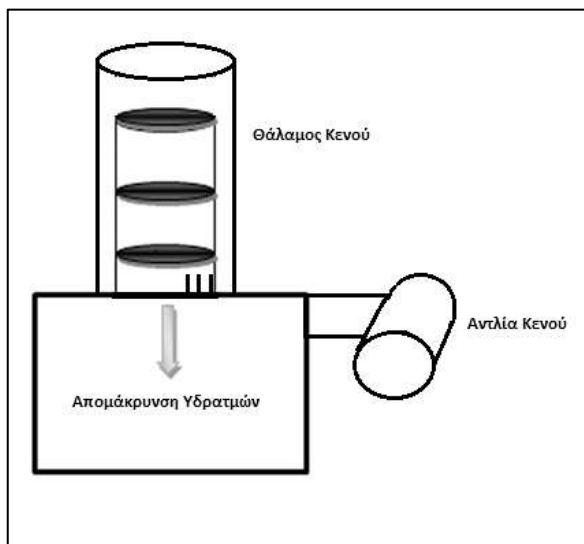
Κατά τη διάρκεια της ξήρανσης η απομάκρυνση της υγρασίας πραγματοποιείται σε δύο στάδια :

Αρχική ξήρανση

Αρχικά, η πίεση μειώνεται και οι κρύσταλλοι πάγου εξαχνώνονται από την επιφάνεια του υλικού με εφαρμογή θερμότητας. Κατά το στάδιο αυτό, απομακρύνεται περίπου το 85-95% του περιεχόμενου νερού. Ο πάγος αρχίζει να εξαχνώνεται όταν παρέχεται η απαιτούμενη λανθάνουσα θερμότητα. Ο ατμός που προκύπτει από την εξάχνωση απομακρύνεται από την επιφάνεια του υλικού χωρίς ο πάγος στο εσωτερικό να λιώνει, εξαιτίας της χαμηλής πίεσης. Η θερμοκρασία στη διεπιφάνεια εξάχνωσης πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία του πάγου ώστε να παρέχεται η θερμότητα εξάχνωσης αλλά όχι αρκετά υψηλή ώστε να προκαλείται τήξη σε κάποιο σημείο του υλικού. Για να πραγματοποιηθεί η εξάχνωση, θα πρέπει η πίεση των υδρατμών στη διεπιφάνεια κατάψυξης που σχηματίζουν οι κρύσταλλοι πάγου στο καταψυγμένο προϊόν να είναι μεγαλύτερη από την πίεση των υδρατμών στον υπόλοιπο χώρο ώστε να προάγεται η ροή ατμών από το εσωτερικό στην επιφάνεια του υλικού.

Δευτερογενής ξήρανση

Το δεύτερο στάδιο ξεκινά όταν έχει απομακρυνθεί όλος ο πάγος από το υλικό και η υγρασία οφείλεται στο δεσμευμένο νερό. Στοχεύει στην εκρόφιση του εναπομείναντος νερού στο εσωτερικό του προϊόντος, η οποία επιτυγχάνεται με ελεγχόμενη αύξηση της θερμοκρασίας κατά τρόπο ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται κάτω από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, και με μείωση της μερικής πίεσης των υδρατμών.



Εικόνα 9 Σχηματική διάταξη ξήρανσης με κατάψυξη

Βασικό στοιχείο της ξήρανσης υπό κατάψυξη αποτελεί το **σύστημα συμπύκνωσης**, το οποίο συμπυκνώνει τους υδρατμούς που προκύπτουν από την εξάχνωση του πάγου. Ο συμπυκνωτής θα πρέπει να λειτουργεί αποτελεσματικά ώστε να μην επιστρέφουν οι υδρατμοί στο προϊόν αλλά και να μη φτάσουν στην αντλία κενού, καθώς θα προκαλέσουν διάβρωση της αντλίας αλλά και επιβράδυνση του ρυθμού εξάχνωσης λόγω μείωσης του κενού ^[27, 28]. Επίσης, μετά το πέρας της ξήρανσης, ο πάγος που έχει συγκεντρωθεί στο συμπυκνωτή, ξεπαγώνει με τη βοήθεια είτε θερμού αέρα, θερμού νερού ή θερμαντικών στοιχείων και απομακρύνεται (Εικόνα 9).

Τα κυριότερα φαινόμενα μεταφοράς θερμότητας και μάζας που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της ξήρανσης υπό κατάψυξη είναι η ακτινοβολία και αγωγή θερμότητας από τη θερμαινόμενη πλάκα και η διάχυση των υδρατμών από τη διεπιφάνεια εξάχνωσης. Η ενέργεια που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η εξάχνωση θεωρείται ότι είναι ίση με τη ροή θερμότητας η οποία παρέχεται από τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του παγωμένου προϊόντος και της πηγής θερμότητας μέσα στο θάλαμο. Η διεπιφάνεια εξάχνωσης δημιουργείται ακριβώς πάνω από το μέτωπο πάγου και η απομάκρυνση του νερού πραγματοποιείται από τη διεπιφάνεια ή πολύ κοντά σε αυτή ^[22].

Η ξήρανση υπό κατάψυξη είναι μία διεργασία που πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες και για το λόγο αυτό, τα αφυδατωμένα προϊόντα θεωρούνται ανώτερα εκείνων που αφυδατώνονται με τη χρήση συμβατικών μεθόδων ^[29]. Η απουσία νερού και η μείωση της ενεργότητας ύδατος σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα περιορίζει τις αντιδράσεις υποβάθμισης των τροφίμων. Επιπλέον, βοηθά στη διατήρηση των θρεπτικών ουσιών, του χρώματος, του αρώματος και της γεύσης ^[25, 30, 31] λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών λειτουργίας. Η απουσία αέρα στο θάλαμο σε συνδυασμό με τη χαμηλή θερμοκρασία ελαχιστοποιεί την υποβάθμιση των τροφίμων που οφείλεται στην οξειδωση ή τη χημική τροποποίησή τους ^[22]. Ακόμα, οι επιφανειακές δυνάμεις που αναπτύσσονται δεν προκαλούν συρρίκνωση κατά τη διάρκεια απομάκρυνσης της υγρασίας, ενώ η κινητικότητα της συμπυκνωμένης φάσης είναι πολύ χαμηλή, με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται καμία δομική μεταβολή και τα υλικά να αποκτούν μία πορώδη δομή. Η πορώδης δομή που αναπτύσσεται επιτρέπει τη γρήγορη ενυδάτωση των τροφίμων, η οποία παράγει προϊόντα όμοια με το νωπό τρόφιμο.

2.2.ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ-ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Για να επιτευχθεί ένας διαχωρισμός πρέπει το προσδιοριζόμενο συστατικό και τα συνυπάρχοντα συστατικά να διαφέρουν σημαντικά τουλάχιστον σε μία φυσική ή χημική ιδιότητα. Λόγω του ότι και οι μέθοδοι διαχωρισμού βασίζονται στη διαφορά φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των συστατικών παραμένει το βασικό πρόβλημα της εκλεκτικότητας της μεθόδου το οποίο αναφέρθηκε παραπάνω. Ένας διαχωρισμός ο οποίος απομακρύνει πλήρως τις συνυπάρχουσες ουσίες μπορεί να οδηγήσει σε μερική απώλεια του προσδιοριζόμενου συστατικού ή αντίστροφα ένας διαχωρισμός ο οποίος ελαχιστοποιεί την απώλεια του προσδιοριζόμενου συστατικού μπορεί να οδηγήσει σε ατελή απομάκρυνση των συνυπαρχόντων ουσιών.

Σκοπός των εφαρμοζόμενων μεθόδων διαχωρισμού αποτελεί η βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών οι οποίες θα οδηγήσουν στη μεγιστοποίηση των υφιστάμενων διαφορών μεταξύ του προσδιοριζόμενου συστατικού και των υπολοίπων ουσιών και έτσι στον αποτελεσματικότερο διαχωρισμό τους. Οι μέθοδοι διαχωρισμού χρησιμοποιούνται και ως μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος, αλλά και ως αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μεθόδων αποτελούν η διήθηση, η φυγοκέντρηση, η απόσταξη, η ιοντοεναλλαγή, η εκχύλιση και η χρωματογραφία.

Ως εκχύλιση ορίζεται η παραλαβή μιας ουσίας Α από μίγμα ουσιών με τη χρήση ενός διαλύτη. Κυρίως χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες. Η εκχύλιση είναι μία από τις σημαντικότερες μεθόδους διαχωρισμού με ευρύτατη εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία συστατικών και δειγμάτων. Η ευρεία χρήση της οφείλεται στην ταχύτητα εκτέλεσης, στην απλότητα και το χαμηλό κόστος, καθώς και στη δυνατότητα εφαρμογής της στη μικρο- και μακρο- ανάλυση ουσιών^[32].

2.2.1.Εκχύλιση Στερεών με Υγρό διαλύτη

Η εκχύλιση οργανικών ουσιών από μίγματα στερεών αποτελεί τον κύριο τρόπο παραλαβής των διαφόρων φυσικών προϊόντων από τις πρωτογενείς πηγές τους. Μια απλή εκχύλιση ενός στερεού μπορεί να γίνει με θέρμανση της ουσίας με ένα διαλύτη και στη συνέχεια απόχυση ή διήθηση του θερμού μίγματος.^[32]

Στην παρούσα εργασία οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- ✓ Εκχύλιση με τη μέθοδο Soxhlet
- ✓ Εκχύλιση με Μικροκύματα
- ✓ Εκχύλιση με Υπέρηχους

2.2.1.1. Εκχύλιση με τη μέθοδο Soxhlet

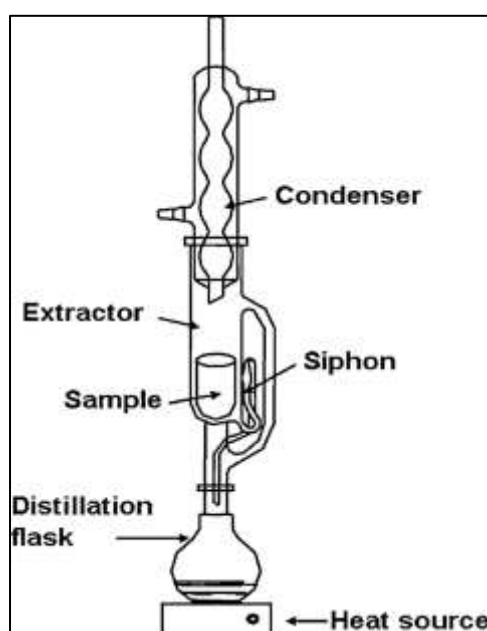
Η εκχύλιση στερεών δειγμάτων με χρήση διαλύτη γνωστή ως εκχύλιση “στερεού-υγρού”, είναι μια από τις παλαιότερες τεχνικές επεξεργασίας στερεών δειγμάτων. Χρησιμεύει όχι μόνο για να αφαιρέσει και να διαχωρίσει ενώσεις από μη διαλυτά, υψηλού μοριακού βάρους κλάσματα αλλά και για το διαχωρισμό άλλων ενώσεων.

Η εκχύλιση αυτή βασίζεται στη διαβροχή του δείγματος, με βάση την κατάλληλη επιλογή διαλυτών με ταυτόχρονη θέρμανση ή/και ανάδευση ώστε να αυξάνεται η διαλυτότητα των ενώσεων και ο ρυθμός μεταφοράς μάζας. Παρά την εκτεταμένη ανάγκη της εκχύλισης αυτής, ιδίως για απομόνωση φυσικών προϊόντων, η τεχνική χαρακτηρίζεται με μεγάλα πρωτόκολλα χαμηλής απόδοσης έως το 1879 όταν ο Von Soxhlet ανέπτυξε ένα νέο σύστημα εξαγωγής (Εκχύλιση Soxhlet) η οποία αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική εκχύλισης^[33]. Η τεχνική αυτή αποτέλεσε τη βάση για πάνω από έναν αιώνα για νέες μεθόδους .

Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της εκχύλισης Soxhlet έχουν χρησιμοποιηθεί ως σημεία εκκίνησης για την ανάπτυξη πολυάριθμων, βελτιωμένων τροποποιήσεων της. Οι περισσότερες τροποποιήσεις της τεχνικής που έχουν αναφερθεί τις τελευταίες δεκαετίες έχουν φέρει την τεχνική Soxhlet κοντά στις πιο πρόσφατες τεχνικές επεξεργασίας στερεού δείγματος, κάνοντας την εκχύλιση συντομότερη με τη χρήση βοηθητικών πηγών ενέργειας ακόμη και με αυτοματοποίηση της εκχύλισης τεχνικές για στερεό παρασκεύασμα δείγματος, συντομεύοντας το χρόνο εκχύλισης με τη χρήση των βοηθητικών πηγών ενέργειας και την αυτοματοποίηση της τεχνικής.^[34]

Συμβατική εκχύλιση Soxhlet

Στην κλασική εφαρμογή της μεθόδου το δείγμα τοποθετείται σε μία «δακτυλήθρα» και γεμίζει σταδιακά με το διαλύτη. Όταν η ποσότητα του υγρού φτάσει στην υπερχειλίση τότε συμβαίνει αναρρόφηση και το υγρό πέφτει πίσω στη φιάλη αποστάξεως, μεταφέροντας έτσι τις εκχυλιζόμενες ουσίες (Εικόνα 10). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται καθώς το υγρό λόγω της θέρμανσης περνά σε μορφή ατμού στο συμπυκνωτήρα και πέφτει στη δακτυλήθρα για να γίνει εκ νέου σιφωνισμός (αναρρόφηση). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι η εκχύλιση να είναι πλήρης. Η εκχύλιση Soxhlet είναι μια συνεχής-διακριτή τεχνική. Στην πραγματικότητα, ο εκχυλιστήρας δρα σαν διαλείπωντος έργου, ωστόσο το εκχύλισμα ανακυκλώνεται μέσα από το δείγμα και το σύστημα τελικά λειτουργεί με τρόπο συνεχή.



Εικόνα 10 Conventional Soxhlet extractor^[1]

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα εκχύλισης Soxhlet

Η συμβατική εκχύλιση Soxhlet έχει κάποια ελκυστικά πλεονεκτήματα:

- ✓ Το δείγμα έρχεται διαρκώς σε επαφή με νέα ποσότητα εκχυλίσματος, διευκολύνοντας την μεταφορά της κατάστασης ισορροπίας
- ✓ Το σύστημα παραμένει σε μία σχετικά υψηλή θερμοκρασία, εξαιτίας της διαρκούς θέρμανσης της φιάλης αποστάξεως από τον μανδύα φθάνοντας την κοιλότητα εκχύλισης σε υψηλό βαθμό
- ✓ Δεν απαιτείται διήθηση με το πέρας της εκχύλισης και μπορεί να γίνει δειγματοληψία ταυτόχρονα με την εκχύλιση μειώνοντας αρκετά το κόστος του βασικού εξοπλισμού
- ✓ Η εκχύλιση Soxhlet είναι μια πολύ απλή μεθοδολογία που απαιτεί ελάχιστη εκπαίδευση
- ✓ Μπορεί να εκχυλίσει μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος από τις νέες εναλλακτικές τεχνικές (υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση, εκχύλιση με χρήση υπερκρίσιμων ρευστών, κ.α.)
- ✓ Πολλές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη μέθοδο Soxhlet σαν βήμα προετοιμασίας του δείγματος^[35-39]

Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της εκχύλισης Soxhlet, σε σύγκριση με άλλες τεχνικές για επεξεργασία στερεού δείγματος είναι:

- ✓ Η μέθοδος είναι χρονοβόρα και απαιτεί μεγάλη ποσότητα οργανικών διαλυτών, οι οποίοι είναι δαπανηροί στην αγορά και την απόρριψη, προσθέτοντας επιπλέον περιβαλλοντικά προβλήματα
- ✓ Τα δείγματα συνήθως εκχυλίζονται στο σημείο ζέσεως του διαλύτη για μεγάλα χρονικά διαστήματα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε θερμική αποσύνθεση θερμοευαίσθητων συστατικών
- ✓ Στην κλασική μέθοδο δεν είναι δυνατή η ανάδευση του εκχυλίσματος ώστε να επισπευθεί η διαδικασία
- ✓ Το εκχύλισμα χρειάζεται να υποστεί ξήρανση μετά το πέρας της εκχύλισης για απομάκρυνση του διαλύτη
- ✓ Τέλος, η αυτοματοποίηση της τεχνικής είναι δύσκολη

Οι πιο πρόσφατες τροποποιήσεις της τεχνικής έχουν στόχο τη βελτίωση της ως προς το χρόνο εκχύλισης, εισάγοντας τη χρήση βοηθητικών μορφών ενέργειας και την αυτοματοποίηση της εισαγωγής του δείγματος προς εκχύλιση^[34]. Παρακάτω θα γίνει αναφορά στις πιο πρόσφατες τροποποιήσεις της μεθόδου:

Εκχύλιση Soxhlet υπό υψηλή πίεση

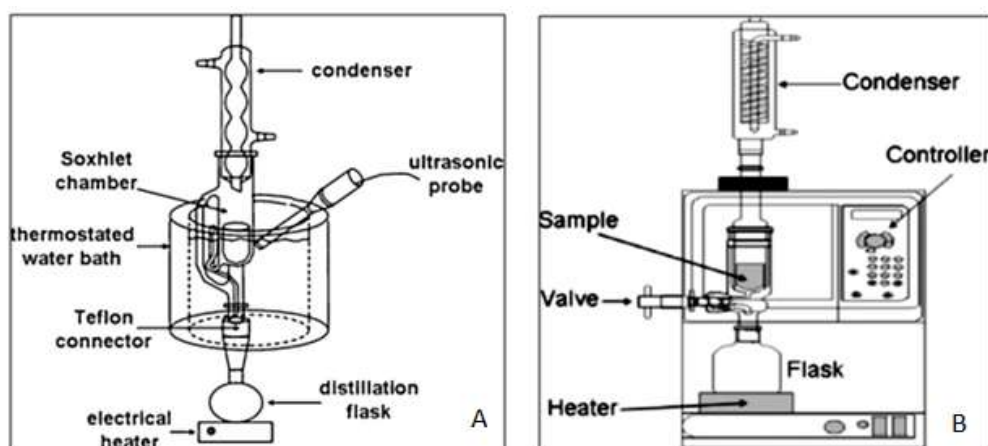
Η εκχύλιση Soxhlet υπό υψηλή πίεση επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση του εκχυλιστήρα σε αυτόκλειστο από ανοξείδωτο χάλυβα ή με τη χρήση υπερκρίσιμου ρευστού^[40]. Η ιδιαιτερότητα της μεθόδου είναι ότι τα εκχυλίσματα δεν φτάνουν στις υπερκρίσιμες συνθήκες^[41]

Αυτοματοποιημένη εκχύλιση Soxhlet

Αυτοματοποίηση της μεθόδου προβλέπει σημαντική οικονομία στο χρόνο εκχύλισης^[42]. Αυτή η συσκευή χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό βρασμού κατά αντirroή και εκχύλισης Soxhlet υποβοηθούμενα από ηλεκτρική θέρμανση, ώστε να εκτελέσει τα δύο στάδια της εκχύλισης (βρασμό και έκπλυση), ακολουθούμενη από την ανάκτηση εκχυλίσματος.

Εκχύλιση Soxhlet υποβοηθούμενη με υπερήχους

Πρόκειται για εκχυλιστήρα με βάση τις φυσικοχημικές αρχές της Soxhlet εκμεταλλευόμενο τις επιδράσεις υπερήχων^[43] σχεδιάστηκε για την εξόρυξη του συνολικού λίπους από ελαιούχους σπόρους, όπως ηλιάνθο, ελαιοκράμβη και σόγια^[44]. Η μέθοδος χρησιμοποιεί τη συμβατική συσκευή Soxhlet, αλλά στεγάζει τη συσκευή σε ένα θερμοστατικό λουτρό όπου εφαρμόζονται υπέρηχοι στο δείγμα. Η εφαρμογή των υπερήχων το δείγμα παρέχει αποτελέσματα παρόμοια με ή καλύτερα από τη συμβατική εκχύλιση Soxhlet. Ωστόσο, μειώνει σημαντικά τον αριθμό των σιφωνισμών της συμβατικής Soxhlet (Εικόνα 11,A).



Εικόνα 11 A: Πειραματική διάταξη σχεδιασμένη για εκχύλιση Soxhlet με υπερήχους^[1], B: Εκχύλιση Soxhlet υποβοηθούμενη από μικροκύματα^[1]

Εκχύλιση Soxhlet υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Η πιο επιτυχής προσπάθεια βελτίωσης της εκχύλισης Soxhlet ήταν η χρήση των μικροκυμάτων, η οποία είναι διαθέσιμη σε μεγάλη ποικιλία εμπορικών εφαρμογών (Εικόνα 11,B). Η υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση Soxhlet παραμένει η πιο ενδιαφέρουσα βελτίωση της μεθόδου και διαφέρει από άλλες υποβοηθούμενες με μικροκύματα μεθόδους εκχύλισης κυρίως σε ορισμένες ή όλες από τις παρακάτω πτυχές^[34]:

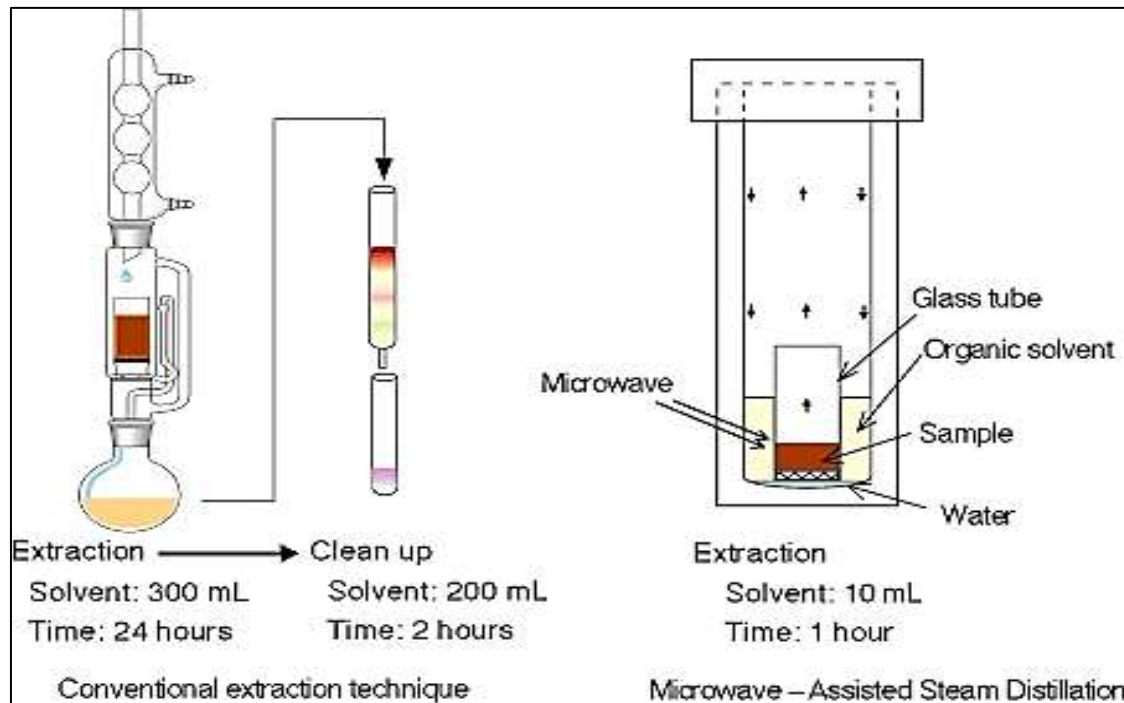
- το δοχείο εκχύλισης είναι ανοικτό, έτσι πάντα δουλεύει σε κανονική πίεση
- η ακτινοβολία των μικροκυμάτων εστιάζει μόνο στο δείγμα
- το στάδιο εκχύλισης εκτελείται σχεδόν όπως στην συμβατική τεχνική Soxhlet
- δεν απαιτείται καμία μεταγενέστερη διήθηση

2.2.1.2. Εκχύλιση με μικροκύματα

Το ενδιαφέρον για την υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση έχει αυξηθεί σημαντικά κατά τα τελευταία χρόνια, ως αποτέλεσμα των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει (π.χ. μείωση του χρόνου εκχύλισης και του όγκου διαλύτη) σε σύγκριση με παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης (π.χ., εκχύλιση Soxhlet). Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης έχουν συσχετιστεί με υψηλές απαιτήσεις σε διαλύτη, μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης και αυξημένο κίνδυνο της υποβάθμισης θερμο-ασταθών συστατικών. Στην εκχύλιση με μικροκύματα ο διαλύτης και το δείγμα περιέχονται σε σφραγισμένα δοχεία εκχύλισης, τα οποία επιτρέπουν στη θερμοκρασία του διαλύτη να αυξηθεί πολύ πάνω από το σημείο βρασμού του, μειώνοντας το χρόνο εκχύλισης και αυξάνοντας ταυτόχρονα την απόδοση της.

Στην εκχύλιση με μικροκύματα με τη βοήθεια των μικροκυμάτων, οι συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης είναι ελεγχόμενες προκαλώντας έτσι εκχύλιση της προσδιοριζόμενης ένωσης στο διαλύτη. Η θέρμανση ξεκινάει από το δείγμα, αφού το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους, όπου η θερμότητα μεταδίδεται από την θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα^[45].

Σε περιπτώσεις επεξεργασίας φυσικών προϊόντων ,που περιέχουν συστατικά ιδιαίτερα ευαίσθητα σε θερμικές καταπονήσεις είναι επιθυμητό η εκχύλιση να πραγματοποιηθεί σε ήπιες και ταυτόχρονα αποδοτικές συνθήκες που θα ελαχιστοποιούν πιθανές αλλοιώσεις. Οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες και να έχουν μικρή αποτελεσματικότητα^[46].



Εικόνα 12 Ενδεικτική σύγκριση συμβατικής τεχνικής με εκχύλιση με μικροκύματα ^[34]

Πλεονεκτήματα εκχύλισης με μικροκύματα

Από την άλλη μεριά, η εκχύλιση με μικροκύματα έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για εκχύλιση φυσικών προϊόντων με αποδόσεις ίδιες με αυτές χρονοβόρων συμβατικών μεθόδων. Χρησιμοποιώντας φούρνους μικροκυμάτων, πλήρεις εκχυλίσσεις μπορούν να ολοκληρωθούν μέσα σε λίγα λεπτά με αποτέλεσμα την μείωση της ποσότητας του διαλύτη αλλά και την κατανάλωσης ενέργειας, απλοποιώντας την διαδικασία και το χειρισμό, επιτυγχάνοντας υψηλότερη καθαρότητα τελικού προϊόντος και εξαλείφοντας την μετέπειτα επεξεργασία των λυμάτων.^[46] Πολλές κατηγορίες φυσικών προϊόντων, όπως τα αιθέρια έλαια^[47], βιοδραστικές ενώσεις από βότανα^[48], GTPs και καφεΐνη^{[49]- [50]}, καθώς και περιβαλλοντικοί ρύποι^[51] έχουν επαρκώς εκχυλιστεί.

Ακόμη, η εκχύλιση με μικροκύματα έχει πρόσφατα εφαρμοστεί για να βοηθήσει την εκχύλιση φυσικών συστατικών από φυτά για την εξαγωγή λιπαρών και θρεπτικών συστατικών, για επεξεργασία πριν από χρωματογραφική ανάλυση^[37], σαν μέθοδος εκχύλισης αιθέριου ελαίου^[52] αλλά και σαν εκλεκτική μέθοδος επιλογής από φυτικά εκχυλίσματα^[53].

2.2.1.3. Εκχύλιση με υπερήχους

Η εφαρμογή της υποβοηθούμενης με υπερήχους εκχύλισης στην τεχνολογία επεξεργασίας τροφίμων αποτελεί μέθοδο με μεγάλο ενδιαφέρον καθώς ενισχύει την εκχύλιση σημαντικών συστατικών από φυτικά αλλά και ζωικά υλικά. Η μέθοδος αυτή, μπορεί να βελτιώσει την εκχύλιση συστατικών όπως πολυφαινόλες, ανθοκυανίνες, αρωματικές ενώσεις, πολυσακχαρίτες, έλαια και λειτουργικές ενώσεις, όταν χρησιμοποιείται ως στάδιο προεπεξεργασίας σε μία λειτουργική μονάδα. Οι υψηλές αποδόσεις που λαμβάνονται με αυτήν την τεχνολογία είναι μείζονος ενδιαφέροντος από βιομηχανική άποψη, δεδομένου ότι η τεχνολογία αυτή είναι το επόμενο βήμα των υφιστάμενων διεργασιών και συνδυάζει την ελάχιστη αλλοίωση της πρώτης ύλης αλλά και του προϊόντος, εφαρμογή σε υδατική εκχύλιση όπου οργανικοί διαλύτες μπορούν να αντικατασταθούν με γενικώς αναγνωρισμένους ως ασφαλείς διαλύτες (GRAS), μείωση της χρήσης διαλυτών και συντόμευση του χρόνου εκχύλισης. Η χρήση των υπερήχων για την εκχύλιση πρώτων υλών υψηλού κόστους είναι μια οικονομική εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές διεργασίες εκχύλισης, αποτελώντας εναλλακτική λύση για τη βιώσιμη ανάπτυξη της βιομηχανίας.^[1]

Στην εκχύλιση με υπερήχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης.

Πλεονεκτήματα εκχύλισης με υπερήχους

Με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Η εκχύλιση με υπερήχους εφαρμόζεται στον προσδιορισμό ενώσεων που είναι θερμικά ασταθείς^[54]. Η εφαρμογή των υπερήχων σαν εργαστηριακή τεχνική για την υποβοήθηση της εκχύλισης φυτικών υλικών είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη.

Πολλές μελέτες έχουν δημοσιευθεί στο παρελθόν για εκχύλιση μεταβολιτών φυτικής προέλευσης^[55], φλαβονοειδών από τρόφιμα χρησιμοποιώντας μια σειρά διαλυτών^[56] αλλά και βιοδραστικών από βότανα^[57]. Η εκχύλιση με υπερήχους μπορεί να μειώσει την απαίτηση σε διαλύτη, επιτρέποντας τη χρήση εναλλακτικών διαλυτών πιο ελκυστικών οικονομικά, φιλικότερων στο περιβάλλον αλλά και ασφαλέστερων για την υγεία^[1].

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) συνοψίζονται διάφορες εφαρμογές της μεθόδου σε εκχυλίσεις που περιλαμβάνουν βότανα, λάδι, πρωτεΐνες και βιοδραστικά από φυτικά υλικά (π.χ. φλαβόνες, πολυφαινόλες).

Πίνακας 1 Μελέτες με χρήση υποβοηθούμενης με υπέρηχους εκχύλισης όπως βρέθηκε στη βιβλιογραφία για ποικιλία συστατικών τροφίμων^[1]

Προϊόν	Διαδικασία εκχύλισης με υπερήχους	Διαλύτης	Απόδοση	Συγγραφείς μελέτης
Έλαια Αμυγδάλου	Διαλείποντος έργου, 20kHz	CO ₂ σε υπερκρίσιμες συνθήκες	30% αύξηση της απόδοσης ή μείωση του χρόνου εκχύλισης	Riera et al.(2004)
Εκχυλίσματα Βοτάνων(μάραθο, λυκίσκο, καλέντουλα, μέντα)	Διαλείποντος υπό ανάδευση, 20-2400kHz	νερό και αιθανόλη	έως 34% αύξηση της απόδοσης (σε συνδυασμό με την ανάδευση)	Vinatoru(2001)
Σαπωνίνες Ginseng	Διαλείποντος έργου, 38,5kHz	νερό, μεθανόλη και n-βουτανόλη	3 φορές αύξηση του ρυθμού εκχύλισης	Wu et al.(2001)
Πιπερόριζα	Διαλείποντος έργου, 20kHz	CO ₂ σε υπερκρίσιμες συνθήκες	30% αύξηση της απόδοσης ή μείωση του χρόνου εκχύλισης	Balachandran et al. (2006)
Πρωτεΐνες Σόγιας	Συνεχούς έργου, 20 kHz 3 W/gr	νερό και υδροξείδιο του νατρίου	53% και 23% αύξηση της απόδοσης σε σχέση με ισοδύναμες συνθήκες	Moulton and Wang.(1982)
Ισοφλαβόνες Σόγιας	Διαλείποντος έργου, 24kHz	νερό και διαλύτες	έως 15% αύξηση της απόδοσης	Rostagno et al. (2003)
Ερυθρίνη από το κινέζικο δέντρα Scholar	Διαλείποντος έργου, 20kHz	νερό και μεθανόλη	έως 20% αύξηση σε 30 λεπτά	Paniwyrnk et al.(2001)
Καρνοσικό οξύ από τριαντάφυλλο	Διαλείποντος έργου, 20 και 40kHz	βουτανόνη και οξικός αιθυλεστέρας	Μείωση του χρόνου εκχύλισης	Albu et al.(2004)
πολυφαινόλες, αμινοξέα και καφεΐνη από πράσινο τσάι	Διαλείποντος έργου, 40kHz	νερό	Αυξημένη απόδοση στους 65C°, σε σχέση με τους 85 C°	Xia et al.(2006)
Πυρεθρίνες από λουλούδια	Διαλείποντος έργου, 20 και 40kHz	εξάνιο	Αυξημένη απόδοση στους 40 C°, σε σχέση με τους 66 C°	Romdhane ad Gourdan.(2002)

Εφαρμογές-Βότανα και εκχύλιση ελαίων

Η μέθοδος εκχύλισης με υπέρηχους έχει αναγνωρισθεί για πιθανές βιομηχανικές εφαρμογές στη φυτο-φαρμακευτική βιομηχανία για ευρύ φάσμα φυτικών εκχυλισμάτων. Το 2001 δημοσιεύτηκε ^[57] μια επισκόπηση εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών από βότανα. Η δημοσίευση αναφέρει τη βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης με υπέρηχους σε σύγκριση με κλασικές μεθόδους χρησιμοποιώντας σαν διαλύτες νερό και αιθανόλη για μάραθο, λυκίσκο, καλέντουλα και μέντα. Οι αποδόσεις ήταν 34%, 18%, 2% και 3%, στο νερό αντίστοιχα και 34%, 12%, 3% και 7%, αντίστοιχα για την αιθανόλη. Σε επόμενη μελέτη ^[58] για υδατική εκχύλιση του γλυκοζίτη Geniposide από το φρούτο Gardenia εφαρμόστηκε εκχύλιση με υπέρηχους σε 0,15 W cm⁻², και η απόδοση της εκχύλισης του αυξήθηκε κατά 16,5%, σε σύγκριση με κλασική εκχύλιση όπου χρησιμοποιήθηκαν 40 ml/g του όγκου διαλύτη προς το βάρος του φρούτου. Για τον σχεδιασμό διατάξεων εκχύλισης με υπέρηχους μεγάλης κλίμακας έχουν προταθεί δεξαμενές υπό ανάδευση με συστήματα ελέγχου της θερμοκρασίας. Άλλες εφαρμογές της τεχνικής αποτελούν η εκχύλιση πρωτεϊνών και βιοδραστικών από φυτικά υλικά όπως πολυφαινόλες, ανθοκυάνες, τρυγικό οξύ, αρωματικές ενώσεις, πολυσακχαρίτες και λειτουργικές ενώσεις. Αναφορές έχουν γίνει ακόμη και για βιοδραστικά από υλικά ζωικής προέλευσης^[1].

2.2.2.Υπερκρίσιμη εκχύλιση

Η Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (Υ.Ε.) είναι μία μέθοδος διαχωρισμού που εκμεταλλεύεται την υψηλή διαλυτική ικανότητα των υπερκρίσιμων ρευστών και για την οποία τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται αυξημένο ενδιαφέρον. Οι βασικοί λόγοι, που εξηγούν την ιδιαίτερη κινητικότητα στην περιοχή της Υ.Ε., είναι οι ακόλουθοι:

- i. **Η ραγδαία αύξηση του κόστους ενέργειας** κατέστησε ιδιαίτερα ακριβές τις παραδοσιακές ενεργοβόρες μεθόδους διαχωρισμού, όπως η απόσταξη, και έστρεψε το ενδιαφέρον προς άλλες, οι οποίες απαιτούν λιγότερη ενέργεια, όπως η Υ.Ε.
- ii. **Οι νέοι υγειονομικοί κανονισμοί και οι απαγορεύσεις**, που επεβλήθησαν στη χρήση ορισμένων τυπικών βιομηχανικών διαλυτών (χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες κλπ), καθώς και οι νέοι αυστηρότεροι περιβαλλοντικοί κανονισμοί για την επεξεργασία και διάθεση των βιομηχανικών αποβλήτων, οδήγησαν σε αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις δυνατότητες χρήσεις του CO₂ σαν μη τοξικού διαλύτη.
- iii. **Το αυξημένο ενδιαφέρον για υλικά που δεν παρασκευάζονται ή διαχωρίζονται με τις παραδοσιακές τεχνικές.**

Ήδη σήμερα λειτουργούν μονάδες Υ.Ε. κυρίως για την απομάκρυνση της καφεΐνης από τον καφέ, την παραγωγή βύνης από το λυκίσκο, την παραγωγή ενζύμων και φαρμακευτικών ουσιών κλπ.

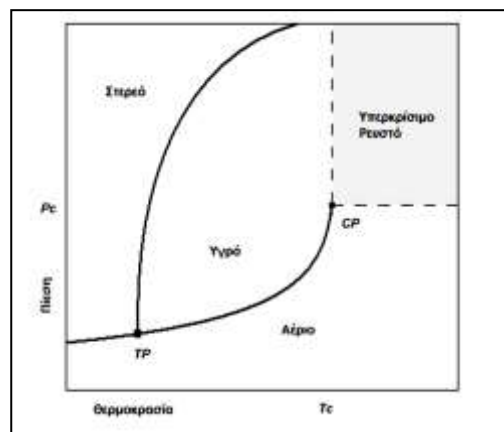
2.2.2.1. Γενικά ιστορικά στοιχεία

Οι πρώτες παρατηρήσεις και πειράματα σχετικά με τη διαλυτότητα ουσιών σε υπερκρίσιμα ρευστά ανάγονται στον προηγούμενο αιώνα. Περί το μέσον του 19^{ου} αιώνα ο Andrews μέτρησε με αξιοθαύμαστη ακρίβεια τις κρίσιμες ιδιότητες του CO₂: T_c=30.92°C (έναντι 31.1°C) και P_c=73 atm (έναντι 72.8 atm). Το 1879 οι Hanney και Hogarth περιέγραψαν την αυξημένη διαλυτότητα αρκετών ανόργανων αλάτων σε αιθανόλη σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την κρίσιμη (T_c=234°C). Μειώνοντας την πίεση παρατήρησαν την καταβύθιση των αλάτων υπό μορφή χιονιού. Οι παρατηρήσεις τους αυτές προκάλεσαν αρκετή συζήτηση και αμφισβητήθηκαν έντονα, έως ότου τελικά να γίνουν αποδεκτές και η επιστημονική κοινότητα να πεισθεί ότι πρόκειται για ένα νέο φαινόμενο και όχι απλώς για αύξηση της διαλυτότητας εξ αιτίας της αυξημένης θερμοκρασίας.

Οι έρευνες συνεχίστηκαν σε όλη τη διάρκεια του 19^{ου} και μέχρι τα μέσα του 20^{ου} αιώνα είχαν γίνει μετρήσεις σε σημαντικό αριθμό συστημάτων. Από το 1950-1970 παρατηρείται μία αύξηση του ενδιαφέροντος ειδικά για τη διαλυτότητα του ναφθαλενίου σε υπερκρίσιμα ρευστά (Υ.Ρ.). Ο πιο συνηθισμένος διαλύτης είναι το διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο προτιμάται εξ αιτίας της χαμηλής κρίσιμης θερμοκρασίας του (304.2K), της σχετικά χαμηλής κρίσιμης πίεσης (73.8bar), καθώς και του χαμηλού του κόστους, της ατοξικότητας και της μη αναφλεξιμότητάς του. Άλλοι διαλύτες οι οποίοι έχουν αναφερθεί σε μικρότερο βαθμό στη βιβλιογραφία είναι το νερό, το μεθάνιο, το αιθυλένιο, το αιθάνιο και το φθοροφόρμιο.^[59]

2.2.2.2. Κρίσιμες - Υπερκρίσιμες συνθήκες

Προκειμένου να κατανοήσουμε την έννοια της Υπερκρίσιμης εκχύλισης και των Υπερκρίσιμων ρευστών, θα πρέπει να οριστεί πρώτα η έννοια των κρίσιμων συνθηκών (κρίσιμη θερμοκρασία και πίεσης). Ως κρίσιμη θερμοκρασία, (T_c), μίας καθαρής ουσίας ονομάζεται η θερμοκρασία πάνω από την οποία η ουσία δε μπορεί να υγροποιηθεί όσο και αν συμπιεστεί, ενώ κρίσιμη πίεση, (P_c), η πίεση πάνω από την οποία η ουσία δε μπορεί να αεριοποιηθεί όσο και αν θερμανθεί. Η κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση αποτελούν χαρακτηριστικές ιδιότητες και έχουν συγκεκριμένες τιμές για κάθε στοιχείο και ο συνδυασμός τους ορίζει ένα σημείο πάνω στο διάγραμμα φάσεων που ονομάζεται κρίσιμο σημείο (CP) (Εικόνα 13). Όταν μία καθαρή ουσία βρίσκεται σε θερμοκρασία και πίεση πάνω από τις κρίσιμες τιμές (CP), τότε παρουσιάζει ιδιότητες που δε θα μπορούν να το χαρακτηρίσουν ούτε ως υγρό, αλλά ούτε ως αέριο. Γι' αυτό το λόγο η ουσία θεωρείται ότι βρίσκεται σε μία νέα κατάσταση 'υβρίδιο' που ονομάζεται Υπερκρίσιμη. Στο διάγραμμα των φάσεων μίας καθαρής ουσίας εκτός από την περιοχή του στερεού, του υγρού και του αερίου, ανοίγεται και η περιοχή του Υπερκρίσιμου ρευστού. Το ρευστό όταν έρθει σε αυτή την υβριδική κατάσταση αποκτά μοναδικές ιδιότητες οι οποίες παρουσιάζονται στη συνέχεια^{[59],[60]}.



Εικόνα 13 Διάγραμμα φάσεων καθαρής ουσίας

2.2.2.3. Ιδιότητες Υπερκρίσιμων ρευστών

Συνεπώς, υπερκρίσιμα ρευστά ονομάζονται τα ρευστά τα οποία βρίσκονται σε συνθήκες πάνω από τις κρίσιμες. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του να βρεθεί μία ουσία πάνω από το κρίσιμο σημείο είναι οι ιδιότητες οι οποίες αποκτά. Σε αυτήν την κατάσταση εμφανίζει ιδιότητες παρόμοιες τόσο με αυτές των υγρών όσο και με αυτές των αερίων. Αυτό γίνεται αντιληπτό αν δούμε τις τιμές που λαμβάνουν ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες του ρευστού όπως η πυκνότητα, ο συντελεστής διάχυσης και το ιξώδες, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές ενός υγρού ή ενός αερίου.

Πίνακας 2 Σύγκριση φυσικοχημικών ιδιοτήτων αέριας, Υπερκρίσιμης και υγρής φάσης.

Φάση	Πυκνότητα (g/cm ³)	Συντελεστής διάχυσης (cm ² /s)	Ιξώδες (cps)
Αέριο	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²
Υπερκρίσιμο ρευστό	0,3 – 0,8	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻² - 10 ⁻¹
Υγρό	1	<10 ⁻⁵	1

Οι χαμηλές τιμές του συντελεστή διάχυσης και του ιξώδους, καθώς και η σχεδόν μηδενική επιφανειακή τάση των Υπερκρίσιμων ρευστών τους προσδίδει πολύ καλές ρεολογικές ιδιότητες. Γι' αυτό το λόγο και υπερτερούν έναντι των υγρών διαλυτών σε διεργασίες εκχύλισης, π.χ. στη διαδικασία εκχύλισης κάποιου ελαίου από μια φυτική πρώτη ύλη, όπου η αντίσταση στη μεταφορά του ελαίου από το στερεό στο διαλύτη είναι μεγάλη.

Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι τα Υπερκρίσιμα ρευστά εμφανίζουν πυκνότητα πολύ μεγαλύτερη των αερίων και συγκρίσιμη μ' αυτή των υγρών, έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη διαλυτική τους ικανότητα. Αυτό εξηγείται διότι, λόγω μείωσης της μεταξύ τους απόστασης ενισχύονται οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων. Όμως, ένα επιπλέον πλεονέκτημα των Υπερκρίσιμων ρευστών έναντι των υγρών διαλυτών, είναι το γεγονός πως με μείωση της θερμοκρασίας υπό σταθερή πίεση ή μικρή αύξηση της πίεσης υπό σταθερή θερμοκρασία μπορούμε να αυξήσουμε κατά πολύ την πυκνότητά τους και κατά αυτόν τον τρόπο να μεταβάλλουμε τη διαλυτική τους ικανότητα ανάλογα με τις ανάγκες μας. Η ιδιότητα αυτή καθιστά τα Υπερκρίσιμα ρευστά κατάλληλους διαλύτες σε διεργασίες όπου επιθυμούμε την επιλεκτική διάλυση ουσιών ^{[59],[60]}.

Το διοξείδιο του άνθρακα ως διαλύτης σε Υπερκρίσιμες διεργασίες

Ο αριθμός των ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μια διαδικασία Υπερκρίσιμης εκχύλισης είναι μεγάλος ^[61]. Ο ακόλουθος πίνακας παρουσιάζει τους πιο συνηθισμένους ^{[59],[60], [61]}.

Η ουσία που έχει βρει τη μεγαλύτερη εφαρμογή σήμερα ως διαλύτης σε διαδικασίες Υπερκρίσιμης εκχύλισης είναι το CO₂ και ο λόγος είναι οι ιδιότητες που παρουσιάζει. Αυτή η ευρεία χρήση του οφείλεται στο ότι:

- ✓ Είναι πτητικό (αέριο) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και επομένως μπορεί να διαχωριστεί εύκολα με μια απλή εκτόνωση.
- ✓ Έχει χαμηλή τιμή κρίσιμης θερμοκρασία 31,1 °C.
- ✓ Χαμηλή τιμή κρίσιμης πίεσης 73,9 bar.
- ✓ Είναι μη τοξικό.
- ✓ Μη αναφλέξιμο.
- ✓ Λόγω τετραπολικής ροπής μπορεί και διαλύει ως ένα βαθμό πολικά μόρια.
- ✓ Επιτρέπεται η χρήση του σε τρόφιμα και φάρμακα.
- ✓ Έχει χαμηλό κόστος.
- ✓ Είναι εύκολα διαθέσιμο.
- ✓ Και είναι φιλικό προς το περιβάλλον.

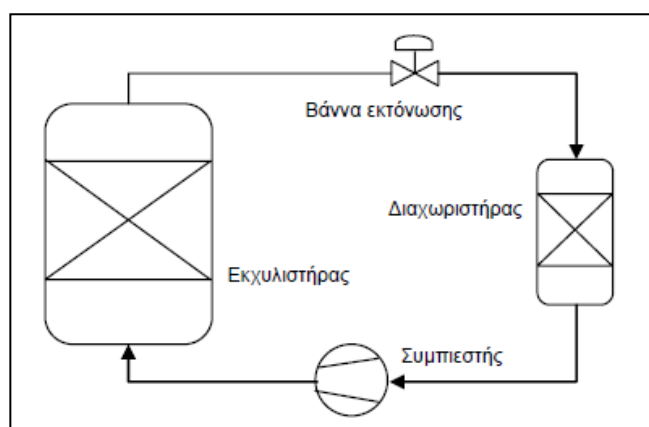
Πίνακας 3 Διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διεργασίες Υπερκρίσιμης εκχύλισης

Διαλύτης	Κρίσιμη θερμοκρασία	Κρίσιμη πίεση	Κρίσιμη πυκνότητα (g/mL)
Διοξείδιο του άνθρακα (CO₂)	31,10	73,9	0,469
Νερό (H₂O)	373,946	220,64	0,322
Μεθάνιο (CH₄)	-82,75	46,0	0,162
Αιθάνιο (C₂H₆)	32,15	48,7	0,203
Προπάνιο (C₃H₈)	96,65	42,5	0,217
Αιθυλένιο (C₂H₄)	9,25	50,4	0,215
Προπυλένιο (C₃H₆)	91,75	46,0	0,232
Μεθανόλη (CH₃OH)	239,45	80,9	0,272
Αιθανόλη (C₂H₅OH)	240,75	61,4	0,276
Ακετόνη(C₃H₆O)	234,95	47,0	0,278

2.2.2.4. Αρχή λειτουργίας της μεθόδου

Η Υπερκρίσιμη εκχύλιση, ανάλογα με τη φύση του εκχυλιζόμενου προϊόντος, διακρίνεται σε δύο κατηγορίες. Στην 1^η κατηγορία, στην οποία ανήκει η πλειονότητα των εφαρμογών, αφορά περιπτώσεις όπου η προς εκχύλιση ουσία βρίσκεται εγκλωβισμένη μέσα σε ένα στερεό υπόστρωμα (π.χ. εκχύλιση αιθέριου ελαίου από κάποιο αρωματικό φυτό), ενώ στη 2^η κατηγορία ανήκουν οι περιπτώσεις όπου η προς εκχύλιση ουσία είναι συστατικό υγρού μείγματος (διαχωρισμός μείγματος EtOH/H₂O).

Η εκχύλιση ουσιών από στερεά υποστρώματα έχει βρει εμπορική εφαρμογή τα τελευταία 15 χρόνια κυρίως σε διεργασίες μεγάλης κλίμακας όπως, η απομάκρυνση της καφεΐνης από τον καφέ ^{[62],[63]} και τα φύλλα του μαύρου τσαγιού ^[64], η εκχύλιση αρωματικών και φαρμακευτικών ουσιών ^[65] και γενικότερα ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου, σε στερεά υποστρώματα, διενεργείται φέρνοντας σε επαφή το Υπερκρίσιμο ρευστό με το υπόστρωμα σε συνεχή ροή. Εν συνεχεία το μείγμα του Υπερκρίσιμου διαλύτη μαζί με τα διαλυμένα συστατικά οδηγείται εντός των διαχωριστήρων όπου, με μια απλή εκτόνωση, το CO₂ μεταπίπτει στην αέρια κατάσταση όπου και απελευθερώνει τα διαλυθέντα συστατικά. Στη συνέχεια ο απαλλαγμένος πλέον από προσμίξεις διαλύτης ανακυκλώνεται και τροφοδοτείται εκ νέου στον εκχυλιστήρα για επαναχρησιμοποίηση. Η διαδικασία συνεχίζεται έως εξάντλησης των δραστικών συστατικών. Το διάγραμμα της διεργασίας φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα. Ένα βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι τα προϊόντα στην έξοδο του διαχωριστήρα είναι απαλλαγμένα από την παρουσία διαλύτη και είναι έτοιμα προς περαιτέρω χρήση.



Εικόνα 14 Διάγραμμα ροής Υπερκρίσιμης Εκχύλισης σε στερεά υποστρώματα.

2.2.2.5. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

Στη συνέχεια θα αναπτυχθούν τα πλεονεκτήματα της Υ.Ε., που την καθιστούν ελκυστική έναντι των κλασικών μεθόδων διαχωρισμού, και τα μειονεκτημά της, τα οποία έχουν εμποδίσει μέχρι στιγμής την ευρεία βιομηχανική εφαρμογή της.

Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα αυτά φαίνονται στον Πίνακα 2 και οφείλονται στις ιδιότητες των Υπερκρίσιμων ρευστών (Υ.Ρ.) και στις συνθήκες της Υ.Ε. Το βασικότερο ίσως πλεονέκτημα της Υ.Ε. έναντι των άλλων μεθόδων διαχωρισμού αποτελεί το γεγονός ότι οι συνήθεις θερμοκρασίες λειτουργίας είναι κοντά στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Συνεπώς είναι δυνατός ο διαχωρισμός θερμοευαίσθητων ουσιών (π.χ. βιταμινών, ενζύμων κλπ), που με τις παραδοσιακές μεθόδους ήταν δύσκολος και συχνά αδύνατος. Εξίσου σημαντικό πλεονέκτημα της Υ.Ε. είναι το γεγονός ότι οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες (CO₂, C₂H₂, C₂H₆) είναι πτητικοί και με μικρή πτώση της πίεσης κάτω από την κρίσιμή τους, απομακρύνονται εύκολα σαν αέρια αφήνοντας καθαρή τη διαλυμένη ουσία. Ο συνδυασμός των δύο προηγούμενων πλεονεκτημάτων οδηγεί σε χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, η οποία συχνά μειώνεται στο 50% της αντίστοιχης ενέργειας για το διαχωρισμό με απόσταξη. Άλλο ενδιαφέρον πλεονέκτημα της Υ.Ε. είναι η εκλεκτικότητα, που παρουσιάζεται με κατάλληλη επιλογή του κατάλληλου διαλύτη και συνδιαλύτη και των συνθηκών εκχύλισης.

Τέλος, πολύ ενδιαφέρον πλεονέκτημα της Υ.Ε. είναι η μη τοξικότητα των συνήθων διαλυτών, ιδιότητα που επιτρέπει τη χρήση της σε διαχωρισμούς βρωσίμων ουσιών ή φαρμακευτικών συστατικών μεγάλης καθαρότητας.

Ωστόσο, ορισμένα χαρακτηριστικά των Υ.Ρ αποτελούν ταυτόχρονα και μειονεκτήματα που προκαλούν εμπόδια για την ευρεία βιομηχανική εφαρμογή της Υ.Ε. Το βασικότερο εξ αυτών είναι η υψηλή πίεση λειτουργίας, που συχνά φθάνει και τις 300 atm. Από αυτό πηγάζουν και άλλα μειονεκτήματα, όπως το υψηλό πάγιο κόστος και η ασυνεχής λειτουργία ειδικά σε περιπτώσεις επεξεργασίας στερεών.

Το πάγιο κόστος αυξάνεται συχνά και λόγω των ειδικών συνθηκών ασφαλείας, που πρέπει να λαμβάνονται όταν χρησιμοποιούνται εύφλεκτοι διαλύτες (C₂H₂, C₂H₆ κλπ). Τέλος, σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί και το γεγονός ότι η επιλογή των διαλυτών και συνδιαλυτών γίνεται με τρόπο εμπειρικό, αφού ως τώρα δεν έχει αναπτυχθεί κάποιο αξιόπιστο μοντέλο προσομοίωσης της θερμοδυναμικής ισορροπίας στερεών ή υγρών φάσεων με Υ.Ρ. το οποίο θα επιτρέψει την επιλογή του άριστου διαλύτη ή συνδιαλύτη και των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας, χωρίς την ανάγκη χρονοβόρων και δαπανηρών πειραματικών μετρήσεων^[59].

Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου όπως αναλύθηκαν παραπάνω συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα^[59] :

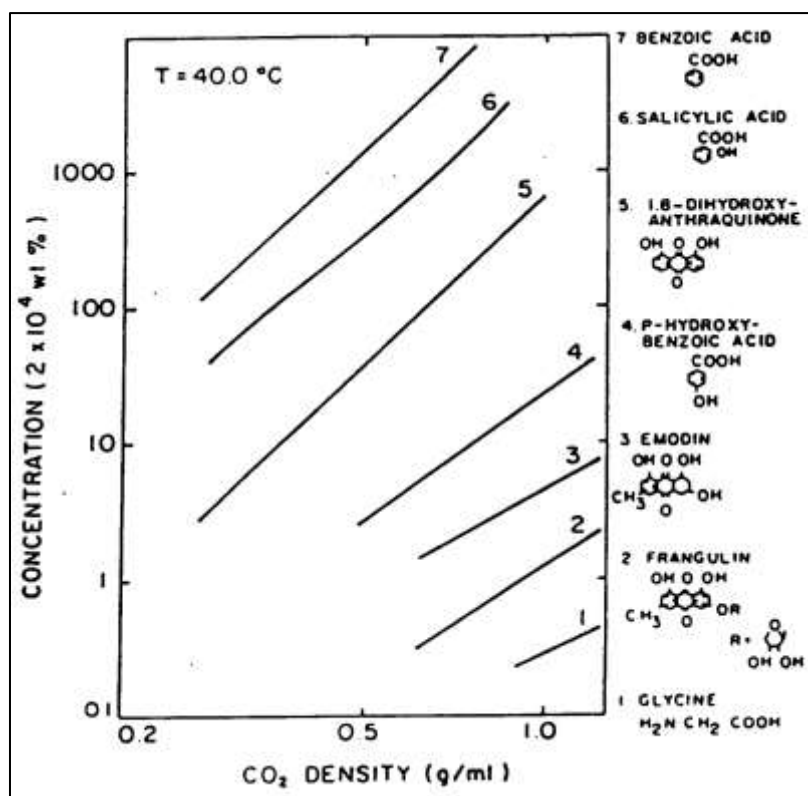
Πίνακας 4-Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα Υ.Ε.

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Χαμηλές θερμοκρασίες	Υψηλές πιέσεις
Πτητικοί διαλύτες	Εύφλεκτοι διαλύτες
Μικρή κατανάλωση ενέργειας	Μεγάλο πάγιο κόστος
Εκλεκτικότητα	Εμπειρισμός στην επιλογή διαλυτών και συνδιαλυτών
Ατοξικότητα διαλυτών	Ασυνεχής λειτουργία

2.2.2.6. Εκλεκτικότητα – Συνδιαλύτες

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των Υ.Ρ. είναι η εκλεκτικότητα που παρουσιάζουν, δηλαδή η διαφορετική διαλυτική ικανότητά τους για διάφορες ουσίες.

Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται η διαλυτότητα διαφόρων οργανικών ουσιών σε υπερκρίσιμο CO₂. Είναι φανερό ότι από ένα μίγμα βενζοϊκού και π-υδροξυβενζοϊκού οξέος, το υπερκρίσιμο CO₂ προτιμά να διαλύει το βενζοϊκό οξύ σε συγκεντρώσεις χίλιες φορές μεγαλύτερες από εκείνες του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Συνεπώς, η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη είναι πολύ σημαντική για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό ενός μίγματος με Υ.Ε. και η πρόρρησή της με θερμοδυναμικά μοντέλα είναι αρκετά δύσκολη και συχνά αναποτελεσματική, καθιστώντας έτσι απαραίτητη τη διεξαγωγή πειραματικών μετρήσεων.



Σχήμα 1 Διαλυτότητα διαφόρων οργανικών ουσιών σε υπερκρίσιμο CO₂

Μεγαλύτερη ακόμη αύξηση της διαλυτότητας μίας ουσίας σε κάποιο Υ.Ρ. είναι δυνατόν να επιτευχθεί με τη χρήση συνδιαλυτών. Πρόκειται συνήθως για πτητικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους, που προστίθενται στο Υ.Ρ. σε μικρές ποσότητες (μέχρι 5% mole). Η δράση τους έγκειται στην έντονη αλληλεπίδραση που εμφανίζουν με τα μόρια της διαλυμένης ουσίας και έχουν σαν αποτέλεσμα τη χρήση μικρότερης ποσότητας διαλύτη, συνεπώς και λιγότερης ενέργειας, με αποτέλεσμα η διεργασία της Υ.Ε^[59] να γίνεται περισσότερο ελκυστική. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της υδροκινόνης, της οποίας η διαλυτότητα στο καθαρό CO₂ στους 308 K είναι της τάξης του 10⁻⁶ με 10⁻⁵ ^[66]. Με προσθήκη μόλις 2% κατά mole τριβουτυλικού εστέρα του φωσφορικού οξέος (TBP), η διαλυτότητα της υδροκινόνης φθάνει το 10⁻³ ^[67].

2.2.3. Υδροαπόσταξη (Hydrodistillation)

Η παραλαβή των αιθέριων (πτητικών) ουσιών που περιέχονται σε φυτικούς ιστούς χρειάζεται ειδικές προφυλάξεις και επιτυγχάνεται με τους εξής τρόπους:

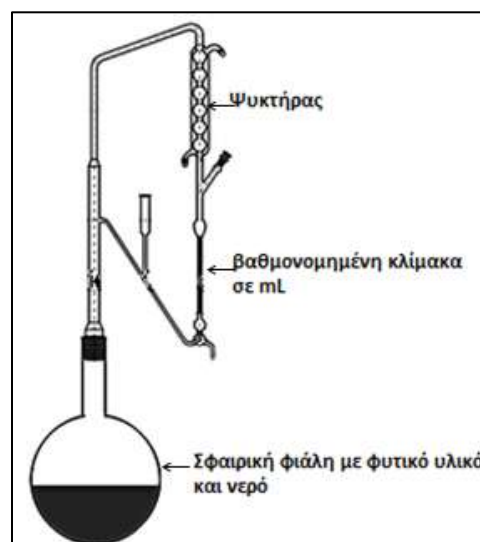
- Απόσταξη με υδρατμούς (Steam Distillation, SD)
- Μικρό απόσταξη με Υδρατμούς Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη (Micro Steam Distillation Extraction, MSDE)
- Απομόνωση από το χώρο πάνω από το φυτό (Head Space, HD)
- Απόσταξη με κενό (Vacuum Head Space Distillation, VHSD)
- Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (Supercritical Liquids extraction)

Οι κλασικές μέθοδοι απομόνωσης των πτητικών συστατικών, που είναι υπεύθυνα για το άρωμα ενός φυτού, βασίζονται κυρίως στην εκχύλιση με διαλύτη και στην απόσταξη με υδρατμούς. Βασικό μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι, πολλές φορές, η δημιουργία συστατικών που δεν αντιπροσωπεύουν το πραγματικό άρωμα του φυτού. Ευαίσθητες ενώσεις μπορεί να υποβαθμιστούν ή να καταστραφούν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της απομόνωσης.^[68]

2.2.3.1. Μέθοδος Υδροαπόσταξης (CLEVENGER)

Η υδροαπόσταξη είναι η πιο κοινή μέθοδος για την παραλαβή των πτητικών ελαίων. Η μέθοδος περιγράφεται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία(2005)^[69]. Η μέθοδος περιλαμβάνει χρήση συσκευής τύπου Clevenger (Εικόνα 15), κάνοντας χρήση νερού για το βρασμό του υλικού. Τα πτητικά υλικά παρασύρονται στους ατμούς και στη συνέχεια συγκεντρώνονται στις σωληνώσεις της συσκευής όπου και κρυσταλώνουν για να απομακρυνθούν σαν τελικό προϊόν. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου έχει αποτελέσει αμφιλεγόμενο σημείο για τους ερευνητές καθώς δεν είναι βέβαιο αν η θέρμανση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καταστρέφει τις επιθυμητές ουσίες. Η μέθοδος απαιτεί μεγάλες ποσότητες υλικού και αρκετό χρόνο για την εκχύλιση (περίπου 3 ώρες). Σαν συνέπεια η κατανάλωση της ενέργειας είναι αρκετά υψηλή^[70].

Η μέθοδος υδροαπόσταξης Clevenger περιλαμβάνει την εξής πορεία: Οι δημιουργούμενοι από τη θέρμανση υδρατμοί συμπαρασύρουν τα πτητικά συστατικά του δείγματος στον ψυκτήρα, όπου συμπυκνώνονται και καταλήγουν στο σωλήνα του κύριου μέρους της συσκευής Clevenger σχηματίζοντας διπλή στιβάδα (πάνω στιβάδα: αιθέριο έλαιο, κάτω στιβάδα: υδατική φάση). Μέρος της υποκείμενης υδατικής φάσης επιστρέφει στη σφαιρική φιάλη που περιέχει το φυτικό υλικό, ενώ παράλληλα παράγεται νέα ποσότητα ατμών. Η όλη διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να ολοκληρωθεί η συλλογή του αιθέριου ελαίου. Μετά το τέλος της αποστάξεως το έλαιο αφήνεται να ψυχθεί, ενώ ο όγκος του μετριέται στη διαβαθμισμένη περιοχή της παγίδας. Το ποσό του αιθέριου ελαίου εκφράζεται σε mL/100g φυτικού υλικού. Εντός της σφαιρικής φιάλης παραμένει εν τέλει το αποσπασμένο φυτικό υλικό και το υδατικό εκχύλισμα, ενώ στα προϊόντα της απόσταξης είναι το αιθέριο έλαιο και η υποκειμενική σε μορφή γαλακτώματος, υδατική φάση, η οποία όμως πλέον περιέχει και μέρος των συστατικών του αιθέριου ελαίου που καλείται υδρόλυμα^[68].



Εικόνα 15 Συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger

Όπως προαναφέρθηκε, η υδροαπόσταξη συγκαταλέγεται στις κύριες μεθόδους ανάκτησης αιθέριων ελαίων από φυτικά υλικά και αποτελεί την πιο κοινή προσέγγιση για εξαγωγή ελαίων από ιαματικά βότανα και φυτά^[71]. Ωστόσο, προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος εκχύλισης και, ενδεχομένως, να βελτιωθεί η απόδοση της, με στόχο την ενίσχυση της ποιότητας των εκχυλισμάτων και τη μείωση του κόστους λειτουργίας, νέες προσεγγίσεις, όπως η υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (ΜΑΕ), εκχύλιση με χρήση ρευστών σε υπερκρίσιμες συνθήκες και εκχύλιση με υπερήχους βρίσκονται υπό συνεχή έρευνα^{[72],[73]}.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

3.1. Εισαγωγή

Ως αντιοξειδωτική μπορεί να οριστεί οποιαδήποτε ουσία που όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τη συγκέντρωση του ενός υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος^[74].

Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών ως απενεργοποιητές ελεύθερων ριζών και των υδροξυλιωμένων ελεύθερων ριζών, είναι να εμποδίσει στα συστατικά του κυττάρου την καταστροφή που προκύπτει ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων με ελεύθερες ρίζες. Πρόσφατα, σημαντικός αριθμός στοιχείων έχει δείξει ότι οι ελεύθερες ρίζες έχουν κεντρικό ρόλο ως συντελεστές στο γήρας και σε εκφυλιστικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η φθορά του ανοσοποιητικού συστήματος και οι εγκεφαλικές δυσλειτουργίες^{[74];[75]}. Ευτυχώς, η δημιουργία ελεύθερων ριζών ελέγχεται φυσικά από πολλές ευεργετικές ενώσεις, τα αντιοξειδωτικά. Όταν η διαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών είναι μειωμένη, αυτή η καταστροφή μπορεί να συσσωρευτεί και να επιφέρει αποτελέσματα οξειδωτικού stress. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την δυνατότητα να σταθεροποιήσουν ή να απενεργοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες πριν αυτές επιτεθούν σε κύτταρα και βιολογικούς στόχους. Έτσι είναι κρίσιμα για την διατήρηση της ιδανικής υγείας του κυττάρου και του οργανισμού^[76].

Παρά το γεγονός ότι πολλές ουσίες έχουν μελετηθεί για την αντιοξειδωτική τους δράση in vitro, η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο τους και η σημασία τους για τον ανθρώπινο οργανισμό, αποτελεί έργο εξαιρετικά δυσχερές. Απαιτείται η κατανόηση των μηχανισμών, με τους οποίους βλάπτονται οι ιστοί από τις ελεύθερες ρίζες, καθώς και της αλληλουχίας των αντιδράσεων, με τις οποίες οι τελευταίες σχηματίζονται in vivo^[77].

3.2. Χαρακτηριστικά των αντιοξειδωτικών

Η χημική έννοια του όρου "αντιοξειδωτικό" αναφέρεται στην τάση ενός μορίου για απόδοση ενός ηλεκτρονίου (e-) προς έναν οξειδωτικό παράγοντα – συνήθως ελεύθερη ρίζα με αποτέλεσμα την προφύλαξη άλλων μορίων, τα οποία θα ήταν πιθανοί στόχοι αυτού του παράγοντα^[78]. Προκειμένου μια ένωση π.χ. φαινόλη να χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτικό, πρέπει να έχει δύο ιδιότητες:

- i. όταν είναι παρούσα σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα, να μπορεί να καθυστερήσει ή να αποτρέψει την αυτοοξείδωση ή την προκληθείσα από ελεύθερες ρίζες οξείδωση και
- ii. η ελεύθερη ρίζα που σχηματίζεται μετά τη δράση της πρέπει να είναι σταθερή (μέσω ενδομοριακού υδρογονικού δεσμού) σε περαιτέρω οξείδωση^[79].

Ακόμη, ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να ανταγωνίζεται αποτελεσματικά με το υπόστρωμα για την ενεργή διάμεση ουσία και να επαναγεννάται γρήγορα από το βιολογικό σύστημα ώστε να έχει πρόσβαση στην ενεργή διάμεση ουσία στο μικροπεριβάλλον. Το αντιοξειδωτικό πρέπει να βρίσκεται στον ίδιο χώρο με το προς οξείδωση υπόστρωμα^[80].

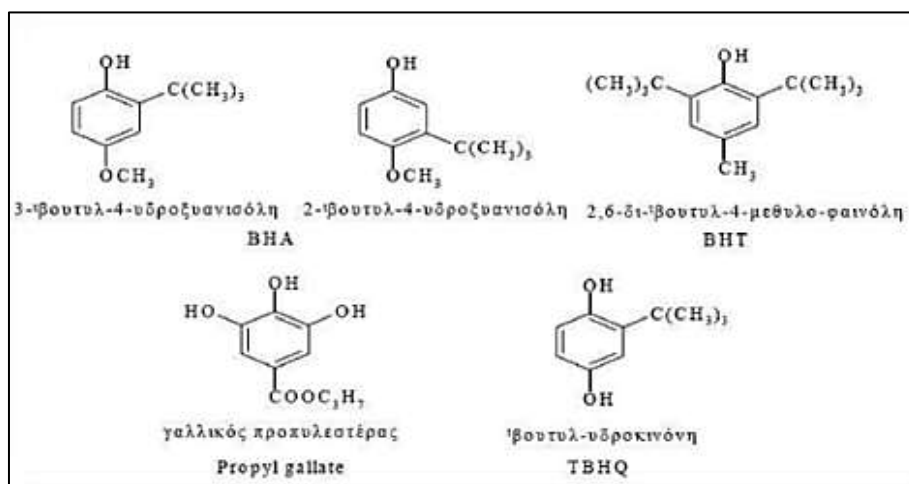
Τα αντιοξειδωτικά, αποτελούν ενώσεις, οι οποίες μπορούν να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίσουν την οξείδωση λιπών, ελαίων, όπως επίσης και τροφίμων που περιέχουν λιπαρές ύλες, αναστέλλοντας τις αντιδράσεις έναρξης και διάδοσης της αυτοοξείδωσης. Σε αυτά περιλαμβάνονται **α) τα φυσικά αντιοξειδωτικά**, τα οποία είναι κυρίως ενώσεις φυτικής προέλευσης και **β) τα συνθετικά αντιοξειδωτικά**. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον υπάρχει για τα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα οποία ενδέχεται να αντικαταστήσουν τα συνθετικά διότι ορισμένα από τα τελευταία έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για καρκινογένεση^[81].

3.3. Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Αποτελούν ενώσεις φαινολικής κυρίως δομής και χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα λιπαρών τροφίμων, ώστε να αποτρέψουν ή να επιβραδύνουν την οξείδωση τους. Η ανώτατη επιτρεπόμενη συγκέντρωση των συνθετικών αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα είναι 0,02%.

Τα σπουδαιότερα από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι (Εικόνα 16)^[77]:

1. βουτυλο-υδρόξυ-ανισόλη ή **BHA**, μίγμα δύο ισομερών της 2-τριτ.-βούτυλο-4-μεθοξυφαινόλης και 3-τριτ.-βούτυλο-4-μεθοξυφαινόλης
2. το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο ή **BHT**, δηλ. 2,6-δι-τριτ.-βουτυλο- παρακρεσόλη
3. εστέρες του γαλλικού οξέος όπως ο προπυλικός ή **PG**, ο οκτυλικός και δωδεκυλικός
4. η τριτοταγής βουτυλοϋδροκινόνη **TBHQ**



Εικόνα 16 Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Τα δύο τελευταία χρησιμοποιούνται επίσης στην παρασκευή προϊόντων αρτοποιίας. Οι εστέρες του γαλλικού οξέος είναι ευαίσθητοι στη θέρμανση και για το λόγο αυτό η προσθήκη τους σε λιπαρή ύλη που προορίζεται για τηγάνισμα δεν είναι αποτελεσματική^[82]. Η σειρά της αντιοξειδωτικής δράσης των ανωτέρω συνθετικών αντιοξειδωτικών είναι: **TBHQ>PG>BHT>BHA**, σε όλες τις συνθήκες αποθήκευσης των ελαίων. Τα τελευταία χρόνια, όπως προαναφέρθηκε, διατυπώθηκαν επιφυλάξεις σε ότι αφορά τη χρήση των συνθετικών αντιοξειδωτικών, αφού ορισμένα από αυτά όπως το BHT και η TBHQ σχετίζονται με τη πρόκληση διαφόρων μορφών καρκίνου σε πειραματόζωα.

3.4. Φυσικά αντιοξειδωτικά

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι ουσίες φυτικής προέλευσης με αντιοξειδωτική δράση. Η αποτελεσματικότητα των φυσικών αντιοξειδωτικών εξαρτάται κυρίως από τα φυτά από τα οποία προέρχονται και από τον τρόπο παραλαβής τους. Παραλαμβάνονται λοιπόν είτε σε μορφή αιθερίου ελαίου ή ως εκχυλίσματα (extracts). Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων τα οποία παραλαμβάνονται από τα φυτά, επηρεάζεται σημαντικά από:

- *Τις συνθήκες εκχύλισης που εφαρμόζονται στην παραλαβή τους και*
- *Την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή τους.*

Εκτός των αρκετά γνωστών φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως βιταμίνες A, C και E, υπάρχουν και τα λιγότερο γνωστά: πολυφαινόλες, σελήνιο, φλαβονοειδή και λυκοπένιο. Οι κυριότερες διατροφικές πηγές των τελευταίων αντιοξειδωτικών είναι:

- ✓ **Βιταμίνη A:** απαντάται στο αυγό, το βούτυρο, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το συκώτι και τα ιχθυέλαια
- ✓ **β-καροτένιο:** απαντάται στα φρούτα, κυρίως τα εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, μανταρίνια, κίτρα) και τα λαχανικά, ιδιαίτερα τα κίτρινα και πορτοκαλί (καρότα, πιπεριές)
- ✓ **Βιταμίνη C:** απαντάται στα φρούτα, κυρίως τα εσπεριδοειδή, τα φραγκοστάφυλα, τις φράουλες, τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά και τα κραμβοειδή (σπανάκι, μπρόκολο)
- ✓ **Βιταμίνη E (τοκοφερόλη):** απαντάται στα φυτικά έλαια, κυρίως στο ελαιόλαδο
- ✓ **Σελήνιο:** απαντάται στο κρέας, το συκώτι, τα θαλασσινά
- ✓ **Φλαβονοειδή:** ισχυρή ομάδα αντιοξειδωτικών που περιέχονται στα φρούτα και τα λαχανικά. Αντιπροσωπευτικά είναι οι κατεχίνες (τσάι, κρασί), η κερσετίνη (μπρόκολα, σταφύλι), η ροτίνη (μήλα), η απιγενίνη (σέλινο) και οι θειοφλαβίνες (τσάι).
- ✓ **Λυκοπένιο:** κόκκινη χρωστική ουσία, η οποία ανήκει στην κατηγορία των καροτενοειδών, βρίσκεται στα φρούτα και στα λαχανικά (κυρίως ντομάτες).
- ✓ **Πολυφαινόλες:** ουσίες που περιέχονται σε ελιά και ελαιόλαδο, έχουν αρκετά καλή αντιοξειδωτική δράση και προστατεύουν από καρκινογενέσεις, αντιπροσωπευτικές είναι η προβιταμίνη A και η βιταμίνη E.

Είναι όμως γενικά αποδεκτό ότι τα αρωματικά φυτά, αποτελούν τις κυριότερες πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών ^[83].

Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά

Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελεύθερων ριζών παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες.

Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται φαινολικές ενώσεις όπως BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), TBHQ (δι-τριπ.-βούτυλο-υδροκινόνη), PG (προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), τοκοφερόλες, καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ κ.ά.

Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά

Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως αντιοξειδωτικά με την ευρύτερη έννοια του όρου. Τα δευτεροταγή αντιοξειδωτικά μπορεί να δρουν ως δεσμευτές οξυγόνου, δηλαδή αντιδρούν με το οξυγόνο και ελαττώνουν τη συγκέντρωση του σε ένα κλειστό σύστημα. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται το ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του καθώς και το θειώδες οξύ και τα άλατά του αλλά και τα καροτενοειδή. Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των δευτερογενών αντιοξειδωτικών είναι η δέσμευση μετάλλων τα οποία με μεταφορά ηλεκτρονίου δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται οξέα ή παράγωγά τους που σχηματίζουν χημικές ενώσεις όπως EDTA, κιτρικό οξύ, φυτικό οξύ, λεκιθίνη.

Ενώσεις με ποικίλη αντιοξειδωτική δράση

Μια κατηγορία ενώσεων με ποικίλη αντιοξειδωτική δράση είναι τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή αποτελούν φαινολικά συστατικά των φυτών. Έχει αναφερθεί ότι εμποδίζουν την υπεροξειδωση των λιπών, δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και το ενεργό οξυγόνο, δεσμεύουν ιόντα σιδήρου και απενεργοποιούν την λιποξυγενάση.

Άλλοι παρεμποδιστές οξείδωσης λιπιδίων

Υπάρχουν ορισμένα ένζυμα που απομακρύνουν τα ενεργά είδη οξυγόνου κι έτσι παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιπιδίων. Εδώ ανήκουν η δισμουτάση σουπεροξειδίου, η υπεροξειδάση γλουταθειόνης, η οξειδάση γλυκόζης και η καταλάση. Μια άλλη κατηγορία παρεμποδιστών είναι η μεθυλοσιλικόνη και οι στερόλες με αιθυλιδενική πλευρική αλυσίδα οι οποίες εμποδίζουν τον οξειδωτικό πολυμερισμό σε θερμαινόμενα έλαια. Εδώ εντάσσονται τα πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο και η Δ5- αβεναστερόλη – κιτροσταδιενόλη.

Τέλος, υπάρχουν αντιοξειδωτικά με πολλαπλή ή μη πλήρως γνωστή δράση που παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιπιδίων όπως είναι τα φωσφολιπίδια και τα προϊόντα των αντιδράσεων Maillard^[84].

3.5. Οξειδωτικά: Ελεύθερες Ρίζες

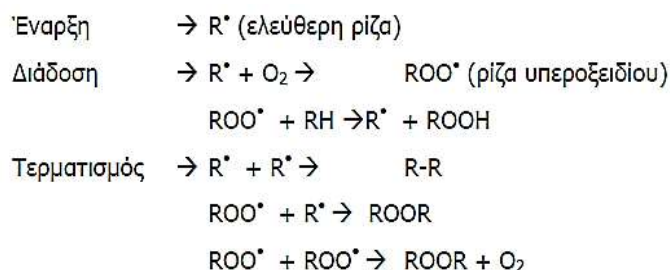
Ο όρος ελεύθερη ρίζα αντιπροσωπεύει ένα άτομο ή ένα μόριο το οποίο έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, τα οποία βρίσκονται μόνα τους στο εξωτερικό τροχιακό. Η ανισοροπία των ηλεκτρονίων στα τροχιακά έχει ως αποτέλεσμα, στις περισσότερες περιπτώσεις, την υψηλή δραστικότητα των ελευθέρων ριζών^[85]. Μία ποικιλία ελευθέρων ριζών σχηματίζεται καθημερινά στον ανθρώπινο οργανισμό, από αιτίες όπως υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, έκθεση σε ουσίες όπως το όζον, η αιθαλομίχλη, χημικά και φάρμακα, καθώς και κατά τη διάρκεια φυσιολογικών λειτουργιών. Τέτοιες ρίζες είναι:

- ✓ Η ρίζα του υπερωξειδίου ($O-O^{\bullet}$)
- ✓ Υπεροξειδίου του υδρογόνου ($H-O-O-H$)
- ✓ Ρίζα υδροξυλίου ($O^{\bullet}-H$)
- ✓ Υδρο-υπεροξειδικές ρίζες ($H-O-O^{\bullet}$)
- ✓ Λιποειδικές ρίζες με κεντρικό άτομο τον άνθρακα (L^{\bullet})
- ✓ Υπεροξειδικές λιποειδικές ρίζες (LOO^{\bullet})
- ✓ Υπεροξείδια των λιπιδίων ($LOOH$)
- ✓ Αλκοξείδια των λιποειδών (LO^{\bullet})
- ✓ Μονήρες μοριακό οξυγόνο ($1O_2$)^[85]

3.5.1. Βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες

Αντιδράσεις σχηματισμού ελευθέρων ριζών

Η αυτοξειδωση είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση με το οξυγόνο, η οποία προχωρά με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Έχει τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό, που περιγράφονται από τις παρακάτω αντιδράσεις^[86]:



Αρχικά σχηματίζεται μία ρίζα υπεροξειδίου, η οποία ανάγεται με την αντίστοιχη δισμουτάση προς υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το τελευταίο μπορεί να απομακρυνθεί με τη δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Αυτοί οι αμυντικοί μηχανισμοί του σώματος όμως, δεν επαρκούν γιατί παρουσία ιόντων μετάλλων (σιδήρου, μαγγανίου) η ρίζα του υπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρούν προς σχηματισμό ριζών υδροξυλίου.

Οι ρίζες αυτές είναι εξαιρετικά δραστικές και αφαιρούν υδρογόνα από το πλησιέστερο διαθέσιμο μόριο λιπιδίου, πρωτεΐνης ή νουκλεϊνικού οξέος. Το αρχικό αυτό στάδιο εξελίσσεται σε μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση, που μπορεί να προκαλέσει τη βλάβη στο κύτταρο. **Σε αυτό ακριβώς το σημείο, θεωρεί η επιστημονική κοινότητα ότι βρίσκει εφαρμογή η παρουσία των αντιοξειδωτικών, όπως είναι η βιταμίνη Ε.**

Πιο συγκεκριμένα οι ουσίες αυτές, δρουν ως αποσβέστες (quenchers) ριζών αφού μπορούν να αποτρέψουν τον σχηματισμό νέων αλυσίδων υπεροξειδωσης, πράγμα το οποίο δεν επιτυγχάνεται από την υπεροξειδάση (η οποία απομακρύνει μόνο τα υπεροξείδια). Ανάλογα προς τη βιταμίνη Ε πιστεύεται ότι δρα και το β-καροτένιο, καθώς και η βιταμίνη C, η οποία δρα έμμεσα ως αντιοξειδωτικό σε συνέργεια με την τοκοφερόλη (την οποία αναγεννά επαναφέροντας υδρογόνα).^[68]

Οι ελεύθερες ρίζες και οι ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου αντιδρούν με μόρια DNA, πρωτεΐνες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ερυθρά αιμοσφαίρια, αποσπώντας ηλεκτρόνια, αλλοιώνοντας τις δομές των μορίων αυτών.

Έτσι, οι ελεύθερες ρίζες ενοχοποιούνται για δεκάδες ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις όπως η **αθηροσκλήρυνση, πρόωρη αποικοδόμηση πρωτεϊνών, αιμόλυση** ακόμη και **ο καρκίνος**^[85]. Ακόμη, τα προϊόντα της οξειδωσης είναι υπεύθυνα για αρκετές ασθένειες όπως **καρδιοπάθειες, καταρράκτης, νευροπάθειες και ενζυμικές ασθένειες**. Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να διευκολύνουν τη διαδικασία της **γήρανσης**^[87]. Επομένως, η αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες απαιτεί την υψηλή πρόσληψη διαιτητικών αντιοξειδωτικών^{[88]; [89]}.

3.6. Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών

Η οξείδωση μπορεί να ενεργοποιηθεί από έναν σημαντικό αριθμό χημικών και φυσικών φαινομένων και να εξελίσσεται πάνω σε κατάλληλο υπόστρωμα μέχρι κάποιος αμυντικός μηχανισμός (αντιοξειδωτικό) να μπλοκάρει την όλη διαδικασία. Τα υποστρώματα-στόχος είναι συνήθως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), φωσφορολιπίδια, χοληστερόλη και DNA. Η οξειδωτική αποσύνθεση των λιπιδίων αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες αλλοίωσης των τροφίμων και της οξειδωτικής μετατροπής της LDL. Η οξείδωση των λιπαρών υλών όπως είδαμε λαμβάνει χώρα με τη μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης, η οποία διαχωρίζεται σε τρία στάδια: έναρξη (initiation), διάδοση (propagation) και τερματισμός (termination). Η προστατευτική δράση των αντιοξειδωτικών εφαρμόζεται σε πολλά στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης και με διάφορους τρόπους. Έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δύο κύριες κατηγορίες: σε παρεμποδιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης ή πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά (chain-breaking or primary antioxidants) και σε προστατευτικά ή δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά (preventive or secondary antioxidants)^[90]. Τα δευτερεύοντα απλώς καθυστερούν τον ρυθμό της οξείδωσης. Τα πρωτεύοντα καθυστερούν ή παρεμποδίζουν το στάδιο έναρξης, αντιδρώντας με τη ρίζα (L·) ή παρεμποδίζουν το στάδιο διάδοσης αντιδρώντας με τις υπεροξειδικές (LOO·) και αλκοξυλ-ρίζες (LO·). Παράλληλα, σχηματίζεται ελεύθερη αντιοξειδωτική ρίζα (A·), που δεν έχει την ικανότητα να αρχίσει και να προάγει νέα αλυσιδωτή αντίδραση, απλά μπορεί να αντιδράσει με τις ρίζες και να δώσει υπερόξυαντιοξειδωτικά συστατικά.

3.7. Αντιοξειδωτική δράση και ασθένειες

Αντιοξειδωτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων

Διάφορες ιδιότητες, και κυρίως το δυναμικό αναγωγής ενός ηλεκτρονίου των ενεργών μορφών οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών επιτρέπουν την εκτίμηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων που μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάμεσα στις ενεργές μορφές οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών. Από αυτά τα δεδομένα, η βιταμίνη E φαίνεται να έχει το υψηλότερο δυναμικό αναγωγής (και επομένως είναι περισσότερο πρόθυμη να δωρίσει ηλεκτρόνια) ακολουθούμενη με φθίνουσα σειρά από τη βιταμίνη C, την ουβοκινόλη και τη γλουταθειόνη^[91]. Πολλές μελέτες δείχνουν ξεκάθαρα το σημαντικό ρόλο των αντιοξειδωτικών θρεπτικών συστατικών στην πρόληψη των ασθενειών^[85]. Επιδημιολογικές μελέτες προτείνουν ότι η υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, τα οποία είναι πλούσια σε βιταμίνη C και καροτενοειδή καθώς και σε άλλα θρεπτικά συστατικά, σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο έναντι κάποιων τύπων καρκίνων και των καρδιακών νοσημάτων. Ακόμη, υψηλές προσλήψεις βιταμίνης E σχετίζονται με χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων σύμφωνα με εκτεταμένες μελέτες στις οποίες εξετάστηκαν μεγάλες ομάδες ανδρών και γυναικών^[85].

Αντιοξειδωτική δράση έναντι της καρκινογένεσης

Σχεδόν όλοι οι τύποι καρκίνου του ανθρώπου, περιλαμβάνουν τις αρχικές επιδράσεις γονιδιοτοξικών καρκινογόνων^[92]. Αντίθετα, οι παράγοντες που προωθούν την καρκινογένεση δεν προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA, αλλά αυξάνουν το ρυθμό αντιγραφής του και άρα την ταχύτητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η καρκινογένεση μπορεί να μειωθεί με αποφυγή του σχηματισμού καρκινογόνων, με μείωση της μεταβολικής δραστηριότητάς τους ή με αύξηση της «αποτοξίνωσης» από αυτά^[88].

Τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά των φυσικών φυτικών τροφίμων, ειδικά των φρούτων και των λαχανικών, έχουν χημειοπροστατευτική δράση έναντι της καρκινογένεσης. Τα μόρια αυτά προστατεύουν το DNA καταστρέφοντας τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, πολλές από αυτές τις ουσίες «μπλοκάρουν» συγκεκριμένες καρκινογενετικές οδούς^[93]. Έτσι, οι πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν την καρκινογένεση επηρεάζοντας τα μοριακά γεγονότα των σταδίων έναρξης, προώθησης και εξέλιξης. Οι ισοφλαβόνες και οι λιγνάνες μπορούν να επηρεάσουν το σχηματισμό όγκου επιδρώντας σε οιστρογόνο-εξαρτώμενες δραστηριότητες^[94]. Τα αντιοξειδωτικά έχουν κυτταροστατική και κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα, καθώς δεσμεύονται σε πρωτεϊνικές κινάσες και τροποποιούν τη δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στις διαδικασίες τύπου «καταρράκτη» μεταγωγής του σήματος^[95].

3.8. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν επιτυγχάνεται άμεσα, αλλά με μέτρηση της επίδρασης των αντιοξειδωτικών συστατικών πάνω στον έλεγχο της οξείδωσης^[90]. Η αντιοξειδωτική δράση ενός μόνο συστατικού του φυτικού εκχυλίσματος είναι αδύνατο να προσδιοριστεί, λόγω της πολυπλοκότητας της σύστασης του εκχυλίσματος, καθώς και της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των συστατικών^[96]. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αλλά καμία επίσημη μέθοδος προσδιορισμού, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η σύγκριση και η αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων. Επομένως, εξαιτίας της πολυπλοκότητας των συστημάτων, έχει επιβληθεί η χρήση πολλών διαφορετικών μεθόδων μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας^{[90];[96]}. Η αντιοξειδωτική δράση των συστατικών επηρεάζεται σημαντικά από^{[82];[90]}:

- τη μέθοδο προσδιορισμού,
- τον χημικό τους τύπο,
- τις συνθήκες εκχύλισης που εφαρμόζονται κατά την παραλαβή των εκχυλισμάτων
- την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε
- την πολικότητα του υποστρώματος (τρόφιμα ή σύστημα λιπιδίων) που χρησιμοποιήθηκε^[97]
- και τη συγκέντρωση του δείγματος

3.8.1. Μέθοδοι προσδιορισμού

Υπάρχουν μέθοδοι που περιλαμβάνουν ένα διακριτό στάδιο οξείδωσης, πάνω στο οποίο γίνεται ακολούθως η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης, ανάλογα με την εξέλιξη της οξείδωσης, όπως για παράδειγμα η οξείδωση του λινολεϊκού οξέος, ακολουθείται από προσδιορισμό της σύζευξης διενίου. Σε αυτές ανήκουν και οι μέθοδοι που παρεμποδίζουν την παρουσία ελεύθερων ριζών (free radical-trapping methods). Σε άλλες μεθόδους προσδιορίζεται η ικανότητα των αντιοξειδωτικών να περιορίζουν την οξείδωση των λιπαρών συστατικών (lipid oxidation)^[96].

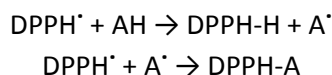
Λαμβάνοντας υπόψη, ότι τα χαρακτηριστικά στοιχεία μίας οξείδωσης είναι το υπόστρωμα, το οξειδωτικό μέσο, ο εκκινητής, καθώς και τα ενδιάμεσα και τα τελικά προϊόντα, η μέτρηση καθενός από αυτά τα χαρακτηριστικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης^[90]. Σχετικά με τις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, κατά τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, οι μέθοδοι χωρίζονται σε:

- Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer based assays, ET)
- Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer based assays, HAT).

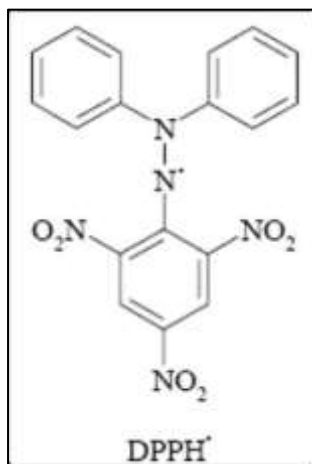
Οι ET μέθοδοι μετρούν την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αλλάζει χρώμα, καθώς ανάγεται στην αντίδραση με το οξειδωτικό. Οι HAT μέθοδοι εξετάζουν την κινητική των αντιδράσεων και οι συγκεντρώσεις απορρέουν από τις κινητικές καμπύλες ^[98]. Επειδή, τα εκχυλίσματα φυτών περιέχουν τόσο λιπόφιλα, όσο και υδρόφιλα συστατικά, η μέθοδος που χρησιμοποιείται επιδρά στην μετρούμενη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος ET- μεθόδων, η οποία χρησιμοποιείται και στην παρούσα μελέτη είναι αυτή του DPPH.

3.8.1.1. Μέθοδος μέτρησης της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH')

Το DPPH' (Εικόνα 17) είναι μία σταθερή ρίζα, η οποία παρουσιάζει μία έντονη απορρόφηση στα 515 nm στο φάσμα του ορατού. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αντιδρά με την ρίζα του DPPH α) δίνοντάς του ένα υδρογόνο, ή β) με το να δεσμεύεται πάνω σε αυτήν:



Έτσι, παρακολουθώντας την απορρόφηση στα 515 nm, μπορούμε να παρακολουθήσουμε την καταστροφή της ρίζας DPPH'.

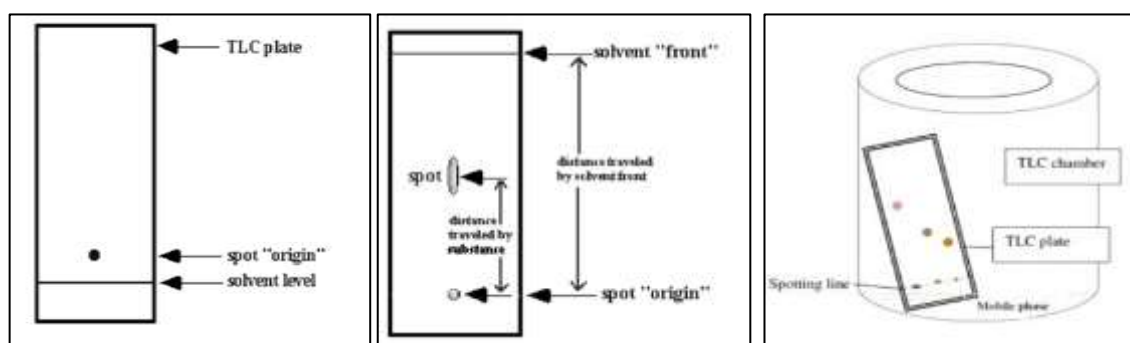


Εικόνα 17 Ρίζα DPPH

Ως μέτρο σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, χρησιμοποιείται το EC50, το οποίο περιγράφεται ως η ποσότητα του αντιοξειδωτικού που είναι απαραίτητη για την μείωση στο 50% της αρχικής συγκέντρωσης του DPPH^{[90];[96]}. Επίσης, παρεμφερές κριτήριο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας αποτελεί και το χρονικό διάστημα (TEC50), το οποίο απαιτείται για να φτάσει σε σταθερή κατάσταση το EC50. Οι επιδράσεις του συνδυασμού των δύο παραμέτρων, που αναφέρθηκαν, βρίσκουν έκφραση σε μία νέα παράμετρο, την αντιοξειδωτική δραστηριότητα ^[90].

3.8.1.2.Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας(TLC)

Μια πρώτη ποιοτική ένδειξη της αντιοξειδωτικής ικανότητας μπορεί να ληφθεί μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Σε αυτή τη χρωματογραφική τεχνική χρησιμοποιούνται γυάλινες ή αλουμιένιες πλάκες επιστρωμένες με μια λεπτή στοιβάδα στατικής φάσης. Η στατική φάση συνήθως είναι γέλη πυριτίου ή λιγότερο συχνά οξείδιο αργιλίου, κυτταρίνη κτλ. Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2cm (Εικόνα 18).



Εικόνα 18 Τεχνική TLC

Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου (Εικόνα 18) στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Οι διαλύτες πρέπει να έχουν τοποθετηθεί εντός του θαλάμου τουλάχιστον 10min πριν την τοποθέτηση της πλάκας ώστε να έχει κορεσθεί ο υπερκείμενος χώρος από τους ατμούς των διαλυτών. Ακολούθως, ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων (περίπου 10-20min, ανάλογα με το ύψος της πλάκας) μέχρι το μέτωπό του να φτάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας.

Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται σε ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων (Εικόνα 18). Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 ή 356nm). Από το χρώμα των κηλίδων στο ορατό και την απορρόφηση στο υπεριώδες μπορεί να εξαχθούν συμπεράσματα για την κατηγορία των ουσιών που παρατηρούμε (φλαβονοειδές, αλκαλοειδές, σάκχαρο κτλ).

Στη συνέχεια, η πλάκα ψεκάζεται με διάλυμα DPPH και αναλόγως την αντιοξειδωτική δράση του υπό εξέταση δείγματος παρατηρείται ο ανάλογος αποχρωματισμός του DPPH (όσο πιο έντονα τα αντιοξειδωτικά τόσο πιο έντονος και ο αποχρωματισμός)^[99].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

4.1. Αέρια χρωματογραφία(GC)

Ο γενικός όρος χρωματογραφία (Chromatography) αναφέρεται σε ένα πλήθος μεθόδων ανάλυσης και τεχνικών διαχωρισμού, που βασίζονται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινητής φάσης που μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και μιας στατικής φάσης που μπορεί να είναι στερεή ή υγρή.

Η χρωματογραφία είναι ένα πολύτιμο εργαλείο, επειδή μπορεί να κάνει ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών σε μίγματα ακόμη και όταν τα φυσικά χαρακτηριστικά τους διαφέρουν ελάχιστα. Εκτός όμως από αναλυτικές μέθοδοι οι χρωματογραφικές τεχνικές είναι και τεχνικές διαχωρισμού και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθαρισμό δειγμάτων, ή την απομόνωση τελικών προϊόντων μεγάλης αξίας όπως φαρμακευτικά και βιολογικά προϊόντα. Η χρωματογραφία προσφέρει μόνο μια πληροφορία χρήσιμη για τον ποιοτικό προσδιορισμό της προς ανάλυση ουσίας: τον χρόνο ανάσχεσης, και συνεπώς μειονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων. Σε περίπτωση όμως που η ταυτότητα των συστατικών είναι γνωστή, μπορεί να γίνει αναγνώριση με βάση τον χρόνο ανάσχεσης και μόνον, ενός πολύ μεγάλου αριθμού ουσιών. Η ταυτοποίηση των συστατικών με την αέρια χρωματογραφία μπορεί να γίνει με βάση: το χρόνο ανάσχεσης, τη μέθοδο εμβολιασμού ή τον δείκτη Kovats I. Οι χρωματογραφικές τεχνικές εκτός από την διαχωριστική τους ικανότητα προσφέρονται και για ποσοτική ανάλυση και στο λόγο αυτό οφείλεται και η μεγάλη εξάπλωσή τους. Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη σύγκριση είτε του ύψους είτε του εμβαδού των κορυφών των συστατικών του δείγματος, με το ύψος ή το εμβαδόν των κορυφών των πρότυπων ουσιών.

Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή σε πολλές βιομηχανίες για την ανάλυση πρώτων υλών ενδιαμέσων και τελικών προϊόντων. Ανάλυση πετροχημικών, περιβαλλοντικές αναλύσεις, αναλύσεις τροφίμων και αρωμάτων, εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων στα φυσικά νερά και στα φρούτα, εφαρμογές στην κλινική χημεία, στην φαρμακευτική, ιατρική, εγκληματολογία είναι ορισμένες χαρακτηριστικές εφαρμογές της αερίου χρωματογραφίας.

4.2. Φασματομετρία μάζας(MS)

Η φασματομετρία μάζας είναι ένα αναλυτικό εργαλείο απαραίτητο για τη διερεύνηση της δομής των οργανικών ενώσεων. Βασίζεται στην παραγωγή ιόντων κατά τον ιονισμό του μορίου και τον διαχωρισμό τους βάσει του λόγου m/z , όπου m η μάζα του ιόντος και z το ηλεκτρικό φορτίο του. Η φασματομετρία μάζας μπορεί να προσδιορίσει ουσίες με μοριακά βάρη έως 4000. Χρησιμοποιείται για την ποιοτική ανάλυση αερίων υγρών και υπο ειδικές συνθήκες στερεών, αλλά και για την κινητική και τους μηχανισμούς διερεύνησης μονομοριακών αντιδράσεων αποσύνθεσης. Επίσης χρησιμοποιείται για την μέτρηση αλλαγών στις κατανομές ισοτόπων μέσω της οποίας γίνονται γεωχρονολογικές μελέτες.

Η μέθοδος βασίζεται στην παραγωγή μοριακών ιόντων ή θραυσμάτων, συνήθως με βομβαρδισμό του δείγματος από δέσμη ηλεκτρονίων και στη συνέχεια διαχωρισμό των ιόντων με βάση το λόγο της μάζας τους ως προς το φορτίο m/z . Τα ιόντα αυτά περιέχουν περίσσεια ενέργειας και θραύονται στη συνέχεια σε ιόντα μικρότερου μεγέθους.

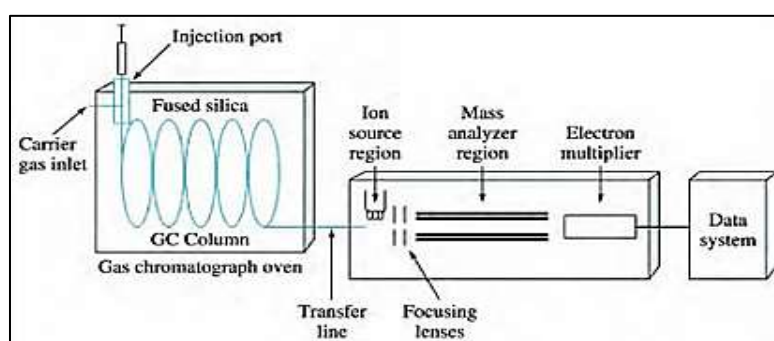
Όλη αυτή η θραυσματοποίηση δημιουργείται μέσω σχάσης ή αντιδράσεων ανασύνταξης παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τη δομή του αρχικού μορίου. Μετά την επιτάχυνσή τους από κάποιο ηλεκτρικό πεδίο, τα ιόντα εισέρχονται στον αναλυτή μαζών όπου και γίνεται ο διαχωρισμός με βάση τον λόγο m/z . Στη συνέχεια, τα ιόντα διαφορετικών μαζών καταγράφονται από τον ανιχνευτή. Το όλο σύστημα βρίσκεται υπό υψηλό κενό για αποφυγή διαμοριακών συγκρούσεων και η επεξεργασία των σημάτων του ανιχνευτή με ηλεκτρονικό υπολογιστή παράγει το φάσμα μάζας. Το φάσμα μάζας οφείλει το όνομά του στην ομοιότητα που είχαν τα φάσματα μάζας που παράγονταν σε φωτογραφικές πλάκες με τα αντίστοιχα φάσματα των οπτικών φασματομέτρων της ίδιας εποχής, αν και η φασματομετρία μάζας δεν είναι οπτική μέθοδος. Τα σύγχρονα φασματομέτρα έχουν τη δυνατότητα για παρακολούθηση των συνολικών ιόντων ανά πάσα στιγμή (total ion monitoring, TIM) καθώς και την παρακολούθηση ενός ή περισσοτέρων ιόντων (single ion monitoring, SIM).

4.3.ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΤΕΧΝΙΚΗ (GC-MS)

Για την καλύτερη ταυτοποίηση των διαχωρισθέντων ουσιών οι υγροί και αέριοι χρωματογράφοι συνδέονται με φασματομέτρα μάζας σε μία ενιαία διάταξη, δημιουργώντας τις συνδυασμένες τεχνικές LC-MS, GC-MS. Το φασματομέτρο μάζας έχει τη θέση ενός εκλεκτικού ανιχνευτή, που ανιχνεύει συνεχώς την έξοδο της χρωματογραφικής στήλης. Στις συνδυασμένες διατάξεις είναι απαραίτητοι οι Η/Υ για τον έλεγχο των παραμέτρων των οργάνων, εφοδιασμένοι με μνήμη για την αποθήκευση των δεδομένων που μπορούν να εμφανιστούν ως φάσματα και ως χρωματογραφήματα. Το πλεονεκτήμα της μεθόδου GC-MS είναι:

- ✓ Συνδυασμός διαχωριστικής ικανότητας των χρωματογραφικών μεθόδων με την ικανότητα ταυτοποίησης της φασματομετρίας μάζας
- ✓ Ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για το δείγμα
- ✓ Καλύτερη λύση για πολλά πολύπλοκα αναλυτικά προβλήματα

Η συνδυασμένη αυτή τεχνική χρησιμοποιείται σήμερα ευρύτατα. Η ροή από την τριχοειδή στήλη στον αέριο χρωματογράφο είναι αρκετά χαμηλή ώστε να εξασφαλίσει την πτώση πίεσης που προϋποθέτει το φασματομέτρο μάζας ($<10^{-3}$ Pa). Έτσι η έξοδος της τριχοειδούς στήλης συνδέεται απ' ευθείας στο χώρο ιονισμού του MS. Από τα τέλη του '70 άρχισαν να κατασκευάζονται φασματομέτρα μάζας για να χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά ως ανιχνευτές στον αέριο χρωματογράφο. Τα όργανα αυτά χρησιμοποιούν τετράπολα φίλτρα μαζών, έχουν μικρό κόστος, εύκολη συντήρηση και χρήση. Άλλοι απλοί ανιχνευτές για σύνδεση με GC είναι οι παγίδες ιόντων.^[100]



Εικόνα 19 Διάγραμμα ενός τυπικού τετράπολου GCMS

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

i. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας πειραματικής μελέτης είναι η παραγωγή εκχυλισμάτων με τη χρήση κλασικών αλλά και καινοτόμων τεχνικών εκχύλισης από τα φύλλα του φυτού *Pistacia lentiscus* var *chia* (Μαστίχα Χίου) και η εξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων για την ικανότητα τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες. Επίσης, ο προσδιορισμός της σύστασης των εκχυλισμάτων και των διαφορών που μπορούν να παρουσιαστούν σε αυτή ανάλογα με την μέθοδο εκχύλισης. Ακόμη έγινε καταγραφή της επίδρασης της ξήρανσης των φύλλων σε παραμέτρους όπως η απόδοση των εκχυλίσεων, η αντιοξειδωτική δράση αλλά και η σύσταση των εκχυλισμάτων. Για την επίτευξη του σκοπού της εργασίας έγιναν:

- Εκχυλίσεις των φύλλων του φυτού τόσο με συμβατικές όσο και με καινοτόμες, φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους
- Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων και σύγκριση των αποτελεσμάτων για εξαγωγή συμπερασμάτων
- Τέλος, προσδιορισμός των συστατικών των εκχυλισμάτων ανάλογα με τη μέθοδο της εκχύλισης

Όπως ήδη έχει αναφερθεί το φυτό χρησιμοποιείται επί σειρά ετών στη λαϊκή ιατρική με ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες. Για το συγκεκριμένο είδος όμως δεν έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες γύρω από την αντιοξειδωτική δράση αλλά και τη σύσταση των εκχυλισμάτων από τα φύλλα του.

ii. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Τα δείγματα (φρέσκα άκοπα φύλλα από τη νήσο Χίο) συλλέχθηκαν και έφτασαν στο εργαστήριο μας τους πρώτους μήνες του 2013 οπότε τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη στους -30°C. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ξήρανση των φύλλων με κατάψυξη και στη συνέχεια κόψιμο και κοσκίνισμα τους. Έγινε υπολογισμός των κινητικών ξήρανσης και μετρήθηκαν η αρχική και η τελική υγρασία των δειγμάτων. Ακολούθησαν εκχυλίσεις σε φρέσκα κομμένα και ξερά κομμένα δείγματα. Αναλυτικά, όλα τα δείγματα εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Soxhlet για χρονικό διάστημα που προσδιορίστηκε μετά από δοκιμαστικές εκχυλίσεις. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν οργανικοί διαλύτες (εξάνιο, αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας) αλλά και νερό. Επίσης, όλα τα δείγματα (φρέσκα και ξερά) εκχυλίστηκαν με υπερήχους με διαλύτες την αιθανόλη και το νερό. Επιπλέον και τα φρέσκα και τα ξερά φύλλα εκχυλίστηκαν με μικροκύματα με διαλυτή το νερό. Τα φύλλα (φρέσκα και ξερά) εκχυλίστηκαν με CO₂ σε υπερκρίσιμες συνθήκες, για διαφορετικές συνθήκες πίεσης. Ακόμη, έγινε παραλαβή του αιθέριου ελαίου από τα φύλλα με υδροαπόσταξη (συσσκευή Clevenger) για ολόκληρα φρέσκα φύλλα. Τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν, μελετήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση ποιοτικά με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) και ποσοτικά με τη μέθοδο μέτρησης της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH). Τέλος, έγινε προσδιορισμός της σύστασης των εκχυλισμάτων της εκχύλισης Soxhlet (με διαλυτή το εξάνιο και τον οξικό αιθυλεστέρα) αλλά και των παραληφθέντων αιθέριων ελαίων με την συσκευή Clevenger με ανάλυση GC-MS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΞΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΦΥΛΛΩΝ

5.1. ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΕ ΚΑΤΑΨΥΞΗ

5.1.1. Εξοπλισμός-Υλικά

Τα πειράματα της ξήρανσης με κατάψυξη πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και χρησιμοποιήθηκαν:

- Συσκευή ξήρανσης με κατάψυξη (Leybold-Heraeus GT 2A, Köln, Germany) του εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών
- Μονάδα ξήρανσης υπό κενό – Φούρνος κενού (Sanyo Gallenkamp PLC, Leicester, England)
- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Φούρνος αέρα (Thermawatt TG30)

Τα φύλλα που χρησιμοποιήσαμε παρέμειναν τουλάχιστον δύο εικοσιτετράωρα σε καταψύκτη στους -30°C. Για τη μέτρηση της αρχικής και τελικής υγρασίας των φύλλων χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα φύλλα που δεν είχαν υποστεί καμία επεξεργασία αλλά και φύλλα που είχαν υποστεί ξήρανση υπό κατάψυξη και είχαν κοπεί και κοσκινιστεί κατάλληλα. Για τον προσδιορισμό των σταθερών της ξήρανσης χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα φύλλα.

5.1.2. Διαδικασία – Αποτελέσματα

5.1.2.1. Μέτρηση αρχικής και τελικής υγρασίας

Η υγρασία των φύλλων μετρήθηκε ζυγίζοντας το αρχικό και το τελικό βάρος των δειγμάτων, πριν την είσοδό τους και μετά την παραμονή τους σε φούρνο κενού (Sanyo Gallenkamp PLC, Leicester, England) όπου η θερμοκρασία παρέμεινε στους 70±0,2 °C, μέχρι σταθερού βάρους για δύο εικοσιτετράωρα (AOAC, 1980). Ως **αρχική υγρασία** θεωρήθηκε η υγρασία που περιείχαν τα δείγματα φρέσκα, ολόκληρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ ως **τελική υγρασία**, αυτή που περιείχαν μετά την ξήρανση υπό κατάψυξη και την κοπή τους.

Το ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας επί υγρής βάσης (kg νερού/kg νωπού στερεού) υπολογίστηκε από τη διαφορά βάρους των δειγμάτων πριν και μετά την ξήρανση σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Υγρασία} = \frac{W_{\text{αρχ}} - W}{W_{\text{αρχ}}}$$

Σύμφωνα με τα παραπάνω προέκυψε:

Φρέσκα ολόκληρα φύλλα: 49,6 ± 1,31% kg νερού / kg νωπού στερεού (αρχική υγρασία)

Ξερά κομμένα φύλλα: 2,7 ± 0,27% kg νερού / kg νωπού στερεού (τελική υγρασία)

5.1.2.2. Ξήρανση υπό κατάψυξη

Προζυγισμένη ποσότητα φύλλων παρέμεινε στην κατάψυξη στους -30°C για δυο εικοσιτετράωρα τουλάχιστον. Οι κατάλληλοι περιέκτες με τα φύλλα τοποθετήθηκαν στα ράφια της συσκευής της ξήρανσης με κατάψυξη. Ο ξηραντήρας αποτελείται από το θάλαμο κενού ο οποίος είναι εφοδιασμένος με ράφια, το σύστημα δημιουργίας κενού, το σύστημα θέρμανσης και το σύστημα συμπίκνωσης των υδρατμών (Εικόνα 20).

Η εφαρμογή κενού ήταν άμεση(3mbar) και ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τα δείγματα απομακρύνονταν από τον ξηραντήρα, ζυγίζονταν ώστε να καταγραφεί το βάρος τους στο συγκεκριμένο χρόνο και επανατοποθετούνταν στον ξηραντήρα. Αρχικά έγινε καταγραφή του καθαρού βάρους των φύλλων, αλλά και του συνολικού βάρους μαζί με τους κατάλληλους περιέκτες. Έτσι σε κάθε μέτρηση ζυγίζαμε το συνολικό βάρος του δοχείου και καταγράφαμε την απώλεια υγρασίας συνολικά. Η διαδικασία έγινε για τρεις επαναλήψεις.



Εικόνα 20 Συσκευή ξήρανσης υπό κατάψυξη (Leybold-Heraeus GT 2A).

Από τη μεταβολή του βάρους των προϊόντων υπολογίστηκε το νερό που εξατμίστηκε και συνεπώς η μεταβολή υγρασίας του κάθε δείγματος. Από τις επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν υπολογίστηκε η μέση μεταβολή υγρασίας επί ξηρής βάσης (kg νερού/kg ξηρού στερεού) κατά τη διάρκεια της ξήρανσης για κάθε δείγμα με βάση τον τύπο:

$$X = \frac{W_{αρχ} - W}{W_{τελ}}$$

Όπου X : ποσοστό υγρασίας επί ξηρής βάσης

$W_{αρχ}$: Αρχικό βάρος δείγματος

W : Βάρος δείγματος σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή

$W_{τελ}$: Τελικό βάρος ξηρού δείγματος

Με δεδομένη την υγρασία ισορροπίας μετά το πέρας της ξήρανσης X_e (kg νερού / kg ξ.στ.) και το ποσοστό αρχικής υγρασίας X_o (kg νερού / kg ξ.στ.), υπολογίστηκε η μεταβολή της θεωρητικής υγρασίας $X_{θεωρ}$, με βάση τον τύπο:

$$X_{θεωρητικό} = X_e + (X_o - X_e) \cdot e^{-kt}$$

Όπου $X_{θεωρ}$: θεωρητικό ποσοστό υγρασίας

X_e : ποσοστό υγρασίας ισορροπίας μετά το πέρας της ξήρανσης

X_o : ποσοστό αρχικής υγρασίας

k : σταθερά ξήρανσης

Η ξηρή μάζα ($m_{ξ}$) βρέθηκε το 50,4% της αρχικής συνολικής μάζας των φύλλων, εφόσον η υγρασία μετρήθηκε ίση με 49,6%. Η υγρασία του στερεού υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$X_{\sigma\tau\epsilon\rho\epsilon\upsilon\acute{o}} = \frac{m_i - m_{\xi}}{m_{\xi}}$$

Με τη χρήση της εντολής solver του excel προέκυψε η σταθερά της ξήρανσης (k) για το δείγμα. Σύμφωνα με τα παραπάνω η σταθερά της ξήρανσης προέκυψε ίση με $0,009042\text{min}^{-1}$.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5 Υπολογισμός σταθεράς ξήρανσης

$X_{\sigma\tau\epsilon\rho\epsilon\upsilon\acute{o}}$	STDEV	$X_{\theta\epsilon\omega\rho\eta\tau\iota\kappa\acute{o}}$	ΔX^2
0,9841	0,00%	0,9841	0,00E+00
0,9054	0,57%	0,9227	2,97E-04
0,8685	0,55%	0,8665	4,07E-06
0,8317	0,61%	0,8152	2,74E-04
0,7895	0,77%	0,7683	4,47E-04
0,7523	0,97%	0,7255	7,19E-04
0,7149	1,23%	0,6864	8,14E-04
0,6440	1,67%	0,6180	6,74E-04
0,5769	2,22%	0,5610	2,53E-04
0,5163	2,70%	0,5133	8,65E-06
0,4377	3,05%	0,4562	3,45E-04
0,3697	3,15%	0,4127	1,85E-03
0,2731	3,13%	0,3543	6,59E-03

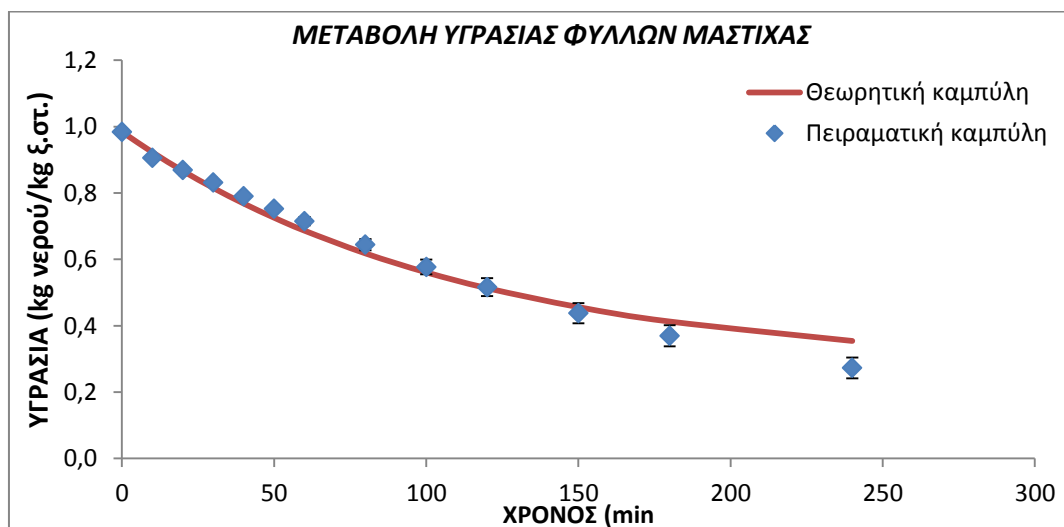
Απ' όπου:

$$K = 0,009042 \text{ min}^{-1}$$

$$X_0 = 0,9841 \text{ kg νερού / kg ξηρού στερεού}$$

$$X_e = 0,2730 \text{ kg νερού / kg ξηρού στερεού}$$

Παρακάτω παρουσιάζονται και η καμπύλη μεταβολής της υγρασίας επί ξηρής βάσης συναρτήσει του χρόνου, καθώς και η καμπύλη θεωρητικής υγρασίας από την οποία προέκυψε η σταθερά της ξήρανσης k .



Διάγραμμα 1 Μεταβολή υγρασίας φύλλα μαστίχας

Παρατηρούμε ότι η υγρασία των φύλλων μειώνεται με την πάροδο του χρόνου όπως ήταν αναμενόμενο. Η μεταβολή της υγρασίας είναι αρχικά έντονη, καθώς η κλίση της καμπύλης φαίνεται μεγαλύτερη και μετά τα 100 λεπτά φαίνεται να μειώνεται και να οδηγείτε σε πλατό.

Η θεωρητική καμπύλη ξήρανσης που προσαρμόστηκε για το δείγμα αποδεικνύει ότι οι ξηράνσεις ακολουθούν κινητική πρώτης τάξης. Όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά ξήρανσης ενός δείγματος τόσο ταχύτερη είναι η ξήρανση του.

Ακόμη η μέθοδος της ξήρανσης με κατάψυξη είναι εξαιρετικά αποδοτική, καθώς η υγρασία των φύλλων μειώθηκε σε ποσοστό 55%. Η αποδοτικότητα αυτή της μεθόδου την καθιστά κατάλληλη σαν μέθοδο προεπεξεργασίας των φύλλων, καθώς εκτός από τη μείωση του βάρους τους πετυχαίνετε και η προστασία τους από την ανάπτυξη διαφόρων βακτηρίων και μούχλας, λόγω της υπάρχουσας υγρασίας, αυξάνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής του υλικού.

5.2.ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ

Διαλύτες εκχύλισης

Είναι προφανές, ότι καθοριστικός παράγοντας στην διαδικασία της εκχύλισης είναι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης. Ένας κατάλληλος διαλύτης θα πρέπει να διαλύει, αν είναι δυνατόν εκλεκτικά την οργανική ουσία που πρόκειται να εκχυλιστεί, να μην αντιδρά με αυτήν, να απομακρύνεται εύκολα, να μην είναι εύφλεκτος ή τοξικός. Τα δύο τελευταία κριτήρια παρόλο που είναι επιθυμητά δεν είναι πάντα εύκολο να ικανοποιηθούν και οι εργασίες της εκχύλισης θα πρέπει να γίνονται με την μεγαλύτερη δυνατή προσοχή. Ανάλογα με το είδος και την φυσικοχημική κατάσταση του ακατέργαστου υλικού από όπου θα γίνει η εκχύλιση διακρίνονται δύο κύριες κατηγορίες διαλυτών, οι υδατικοί και οι οργανικοί διαλύτες.

- a. **Υδατικοί διαλύτες.** Οι διαλύτες αυτοί (νερό, αραιά διαλύματα ανόργανων οξέων και βάσεων) χρησιμοποιούνται για την παραλαβή από μια οργανική μη αναμίξιμη με το νερό φάση πολικών ενώσεων, όπως οξέων και βάσεων υπό ιονική μορφή αλλά και άλλων ιονικών ή ιδιαίτερα πολικών ενώσεων. Η χρήση τους θα εξεταστεί στον διαχωρισμό μίγματος όξινων, βασικών και ουδετέρων συστατικών.
- b. **Διαλύτες οργανικοί.** Οι διαλύτες αυτοί είναι οι κοινοί μη αναμίξιμοι με το νερό οργανικοί διαλύτες (αιθέρας, χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο, εξάνιο, κλπ) οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την παραλαβή ουδετέρων οργανικών ουσιών από υδατικά διαλύματα ή αιωρήματα. Είναι οι κατεξοχήν οργανικοί διαλύτες εκχύλισης, δεδομένου ότι και οι παραπάνω αναφερόμενοι υδατικοί διαλύτες είναι κατά βάση βοηθητικοί διαλύτες με την έννοια ότι χρησιμοποιούνται στους χημικούς διαχωρισμούς μέσω της εκχύλισης των όξινων και βασικών από τα ουδέτερα συστατικά των μιγμάτων. Και σ' αυτές τις περιπτώσεις η τελική πράξη της εκχύλισης αφορά παραλαβή των οργανικών συστατικών που γίνεται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη.

Στον πίνακα 6 δίνονται μερικοί από τους πιο κοινούς διαλύτες εκχύλισης με μερικές από τις χαρακτηριστικές τους ιδιότητες.^[101]

Πίνακας 6 Κοινοί διαλύτες εκχύλισης

Είδος διαλύτη	Σημείο ζέσεως(°C)	Πυκνότητα (g/ml)	Τοξικότητα	Χρήσεις
Εξάνιο	68,7	0,65	+	Διαλύτης κυρίως για μη πολικές ενώσεις. Ακατάλληλος για πολικές.
Αιθέρας	34,6	0,71	+++	Πολύ καλός διαλύτης για γενικές χρήσεις. Διαλύει μέχρι 1.5% νερό. Ιδιαίτερα κατάλληλος για εκχυλίσεις ενώσεων που περιέχουν οξυγόνο.
Χλωροφόρμιο	61,7	1,48	+++	Τοξικός διαλύτης ,με πολύ μεγάλη διαλυτική ικανότητα. Ξηραίνεται εύκολα, η χρήση του όμως αποφεύγεται. Έχει την τάση να σχηματίζει γαλακτώματα
Οξικός αιθυλεστέρας	77,1	0,89	+	Καλός διαλύτης για πολικές ενώσεις. Μειονέκτημα ότι συγκρατεί αρκετό νερό
Αιθανόλη	78,4	0,79	+	Συνήθης πολικός διαλύτης για εκχύλιση συστατικών τροφίμων.
Νερό	100	1	--	Πολικός διαλύτης

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες **το νερό, η αιθανόλη, ο οξικός αιθυλεστέρας και το εξάνιο** με στόχο την εκχύλιση όλων των ενώσεων που περιέχονται στα φύλλα της Μαστίχας. Αναλυτικά, η χρήση του νερού αποσκοπεί στην απομόνωση ιδιαίτερα πολικών ενώσεων, η χρήση του εξανίου για τη διάλυση μη πολικών ενώσεων ενώ η χρήση του οξικού αιθυλεστέρα για πολικές ενώσεις. Ακόμη, οι διαλύτες αυτοί είναι διαφορετικοί ως προς πολλές ιδιότητες τους. Το νερό αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα πράσινου διαλύτη. Ακολουθεί η αιθανόλη η οποία χρησιμοποιείται για την απομόνωση συστατικών για παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων, αρωμάτων, τροφίμων και καλλυντικών. Το εξάνιο είναι συνήθης εργαστηριακός διαλύτης, ο οποίος σιγά σιγά αντικαθίσταται από πράσινους διαλύτες. Ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται ευρέως καθώς μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί, λόγω του χαμηλού σημείου ζέσης και της πτητικότητας του.

5.2.1. Εκχύλιση Soxhlet με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας

5.2.1.1. Υλικά – Εξοπλισμός

Για την εκχύλιση των φύλλων με τη μέθοδο Soxhlet χρησιμοποιήθηκαν φύλλα ξερά (μέσης κοκκομετρίας 435 μ m) αλλά και φρέσκα (μέσης κοκκομετρίας 1,06mm) τα οποία είχαν κοπεί κατάλληλα.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια του εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών (ΣΑΔ):

- *Εξάνιο*
- *Οξικός αιθυλεστέρας*
- *Αιθανόλη*
- *Απιονισμένο νερό*

Για τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκε η πειραματική διάταξη Soxhlet του εργαστηρίου ΣΑΔ (Εικόνα 21), ενώ η απομάκρυνση των οργανικών διαλυτών από τα εκχυλίσματα έγινε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.



Εικόνα 21 Συσκευή Soxhlet εργαστηρίου

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση των οργανικών διαλυτών είναι :

- Περιτροφικός εξατμιστήρας (Rotary evaporator) (Εικόνα 22)
- Αντλία υψηλού κενού

Τέλος, η απομάκρυνση του νερού από τα υδατικά εκχυλίσματα έγινε στο εργαστήριο ΣΑΔ με ξήρανση υπό κατάψυξη για 24 ώρες, μετά από σαρανταοκτάωρη κατάψυξη των εκχυλισμάτων στους -30°C.

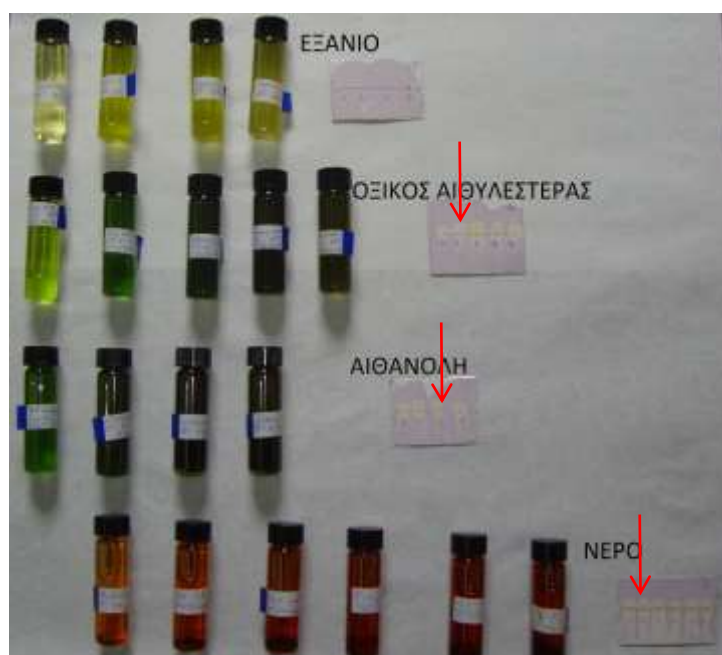


Εικόνα 22 Περιτροφικός εξατμιστήρας (Rotary evaporator)

5.2.1.2. Συνθήκες εκχύλισης-Διαδικασία

Μετά από μια σειρά δοκιμαστικών εκχυλίσεων που πραγματοποιήθηκαν με όλους τους διαλύτες και σε συνδυασμό με τον ποιοτικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων που πήραμε, οι τελικές εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν ως τον τρίτο σιφωνισμό (με διαφορετικό συνολικό χρόνο εκχύλισης για κάθε διαλύτη).

Στις δοκιμαστικές εκχυλίσεις έγινε δειγματοληψία του εκχυλίσματος μετά από κάθε σιφωνισμό (Εικόνα 23) και με την ποιοτική μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας παρατηρήθηκε ότι για τους διαλύτες: οξικός αιθυλεστέρας, αιθανόλη και νερό η ποιοτική ένδειξη ήταν ικανοποιητική μετά από **τρεις σιφωνισμούς**. Το εξάνιο δεν έδειξε καμία αντιοξειδωτική δράση. Χρησιμοποιήθηκαν τελικά όλοι οι διαλύτες για σύγκριση των αποδόσεων των εκχυλίσεων.

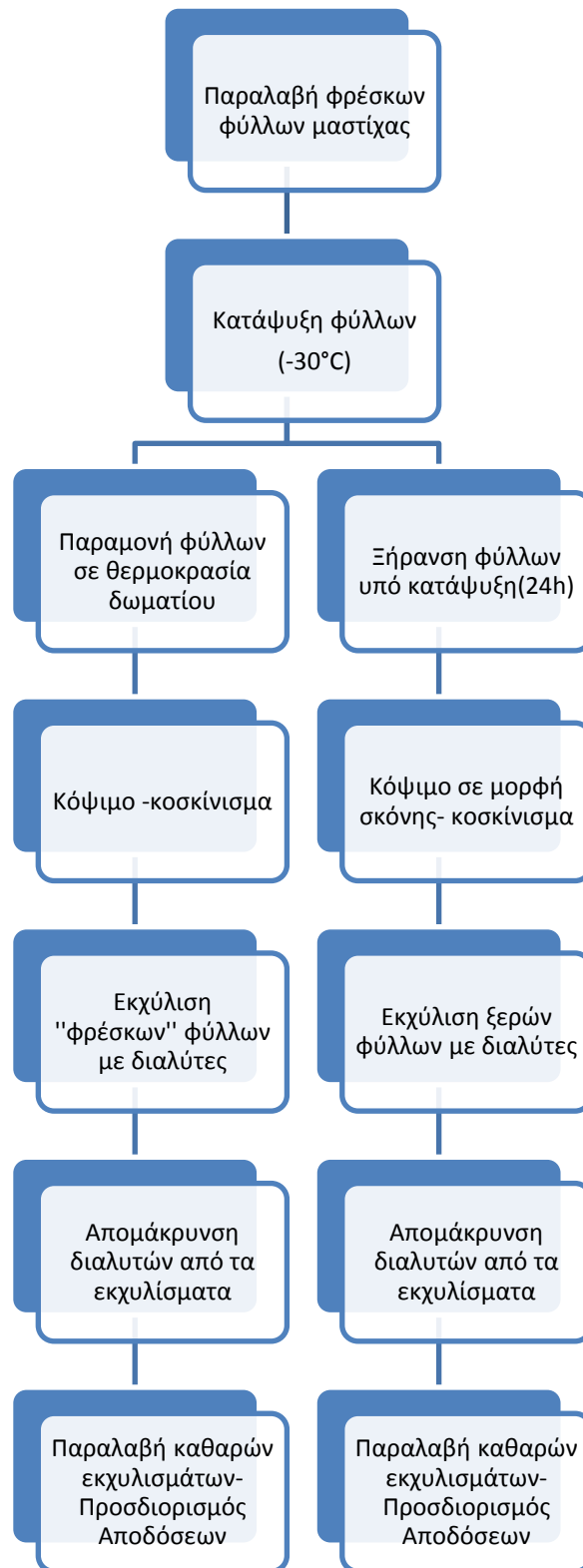


Εικόνα 23 Δείγματα δοκιμαστικών εκχυλίσεων Soxhlet

Αναλυτικά, δημιουργήθηκαν φάκελοι από διηθητικό χαρτί σε κατάλληλες διαστάσεις ώστε γεμάτοι με την πρώτη ύλη να χωρούν στη δακτυλήθρα. Στη συνέχεια συμπληρώσαμε με διαλύτη μέχρι να γίνει αναρρόφηση και σιφωνισμός. Όταν το υγρό περάσει στη σφαιρική φιάλη ξεκινά ο βρασμός στο μανδύα. Έτσι οι ατμοί του υγρού περνούν από τις σωληνώσεις και μόλις συναντήσουν το συμπυκνωτήρα πέφτουν σταγόνα-σταγόνα πίσω στη δακτυλήθρα και τη γεμίζουν μέχρι τον επόμενο σιφωνισμό (Εικόνα 21).

Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν στα φρέσκα κομμένα φύλλα με χρήση 100ml διαλύτη και περίπου 20 gr φύλλων, ενώ στα ξερά κοσκινισμένα φύλλα με 120ml διαλύτη και περίπου 25gr πρώτης ύλης.

Σχηματικά έχουμε:



Σχήμα 2-Διάγραμμα ροής Διαδικασίας εκχύλισης φρέσκων και ξερών φύλλων

5.2.1.3.Αποτελέσματα –Αποδόσεις εκχυλίσεων Soxhlet

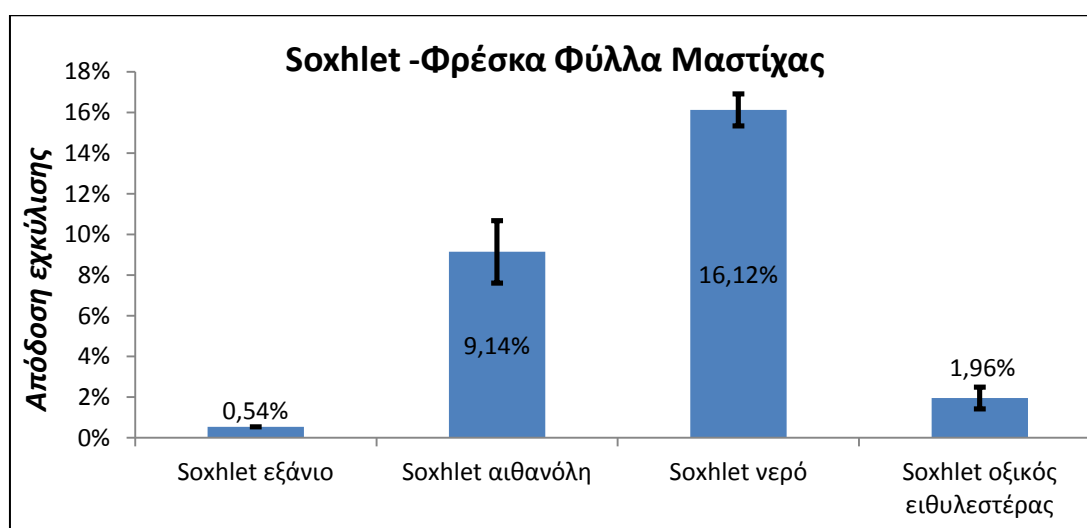
Οι εκχυλίσεις επαναλήφθηκαν δυο φορές με σκοπό τον προσδιορισμό του σφάλματος των αποδόσεων τους.

ΦΡΕΣΚΑ ΦΥΛΛΑ

Αρχικά θα παρουσιαστούν οι αποδόσεις για τα φρέσκα φύλλα ανάλογα με το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά.

Πίνακας 7 Αποδόσεις εκχυλίσεων Soxhlet για τα φρέσκα φύλλα

Διαλύτης	Ποσότητα α' ύλης(gr)	Ποσότητα εκχυλίματος(gr)	Απόδοση %
εξάνιο	20,07	0,11	0,54
οξικός αιθυλεστέρας	20,48	0,40	1,96±0,53
αιθανόλη	20,13	1,84	9,14±1,54
νερό	20,89	3,37	16,12±0,78



Διάγραμμα 2 Σύγκριση αποδόσεων εκχύλισης Soxhlet για τα φρέσκα φύλλα

Από τον πίνακα 8 και το διάγραμμα 2 φαίνεται ότι την καλύτερη απόδοση για τα φρέσκα φύλλα παρουσίασε η εκχύλιση με το νερό(16,12%).Ακολουθούν η αιθανόλη (9,14%) και ο οξικός αιθυλεστέρας(1,96%). Το εξάνιο είχε τη μικρότερη απόδοση (0,54%) και όπως θα αναφερθεί και αργότερα καμία αντιοξειδωτική δράση, επιβεβαιώνοντας και την ποιοτική μέτρηση με TLC.

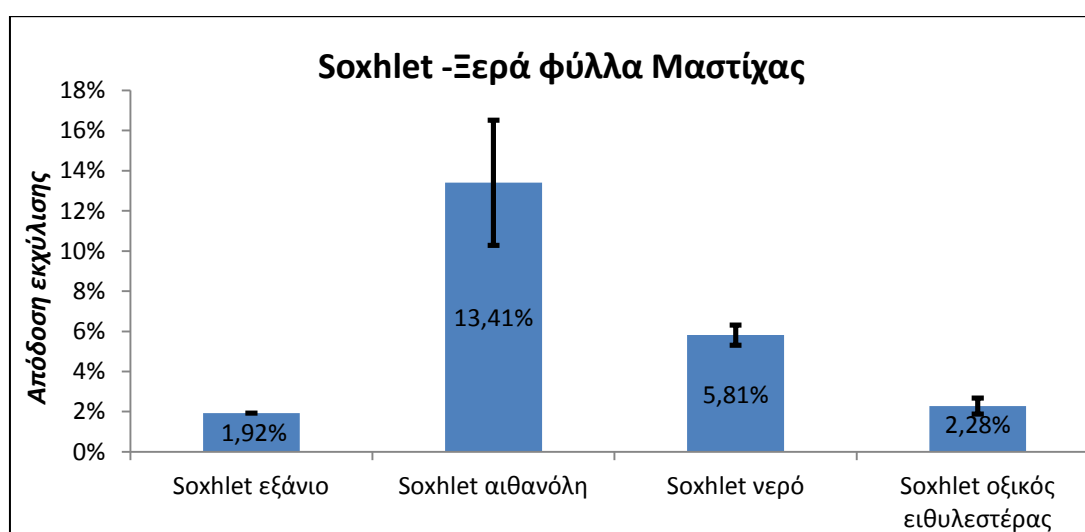
Ακόμη μπορούμε να συμπεράνουμε ότι όσο αυξάνεται η πολικότητα των διαλυτών τόσο αυξάνεται και η απόδοση των εκχυλίσεων εφόσον πολικοί διαλύτες συγκρατούν πολικά συστατικά ενώ μη πολικοί διαλύτες συστατικά ελαφρύτερα.

ΞΕΡΑ ΦΥΛΛΑ

Αντίστοιχα θα παρουσιαστούν και οι αποδόσεις για τα ξερά φύλλα ανάλογα με το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε.

Πίνακας 8 Αποδόσεις εκχυλίσεων Soxhlet για τα ξερά φύλλα

Διαλύτης	Ποσότητα α' ύλης(gr)	Ποσότητα εκχυλίματος(gr)	Απόδοση %
εξάνιο	25,06	0,48	1,92
οξικός αιθυλεστέρας	25,28	0,58	2,28±0,40
αιθανόλη	25,02	3,36	13,41±3,12
νερό	25,49	1,48	5,81±0,50



Διάγραμμα 3 Σύγκριση αποδόσεων εκχύλισης Soxhlet για τα ξερά φύλλα

Από τον πίνακα 9 και το Διάγραμμα 3 φαίνεται ότι την καλύτερη απόδοση για τα ξερά φύλλα παρουσίασε η εκχύλιση με την αιθανόλη(13,41%).Ακολουθούν το νερό (5,81%) και ο οξικός αιθυλεστέρας(2,28%). Το εξάνιο είχε και πάλι τη μικρότερη απόδοση (1,92%) και όπως θα αναφερθεί και αργότερα καμία αντιοξειδωτική δράση, επιβεβαιώνοντας και την ποιοτική μέτρηση με TLC όπως και στα φρέσκα φύλλα.

Και πάλι η απόδοση είναι μεγαλύτερη για πιο πολικούς διαλύτες οι οποίοι απομακρύνουν πολικά μόρια. Μη πολικοί διαλύτες (εξάνιο) έχουν μικρές αποδόσεις καθώς απομακρύνουν μη πολικά μόρια.

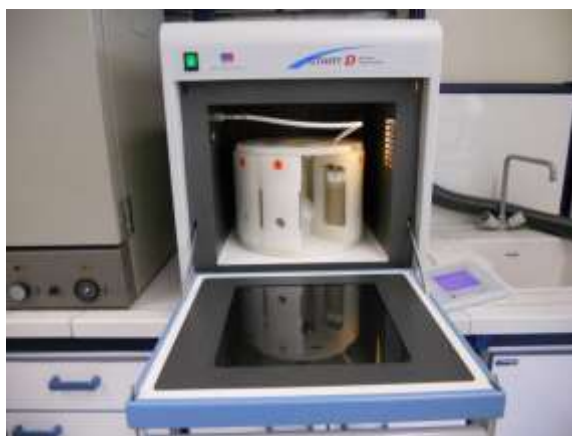
5.2.2. Εκχύλιση με μικροκύματα

5.2.2.1. Υλικά – Εξοπλισμός

Για τις εκχυλίσεις με μικροκύματα χρησιμοποιήθηκαν φύλλα ξερά (μέσης κοκκομετρίας 435 μ m) αλλά και φρέσκα (μέσης κοκκομετρίας 1,06mm) τα οποία είχαν κοπεί κατάλληλα. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.

Τα πειράματα των εκχυλίσεων με μικροκύματα πραγματοποιήθηκαν στο Οριζόντιο εργαστήριο του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, ενώ η απομάκρυνση του νερού από τα εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε με ξήρανση με κατάψυξη στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι:

- Microwave (Digestion System, Start D, Milestone)(Εικόνα 24)
- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Μονάδα ξήρανσης με κατάψυξη (Leybold – Heraeus GT 2A, Koln, Germany)



Εικόνα 24 Πειραματική διάταξη (Digestion System, Start D, Milestone)

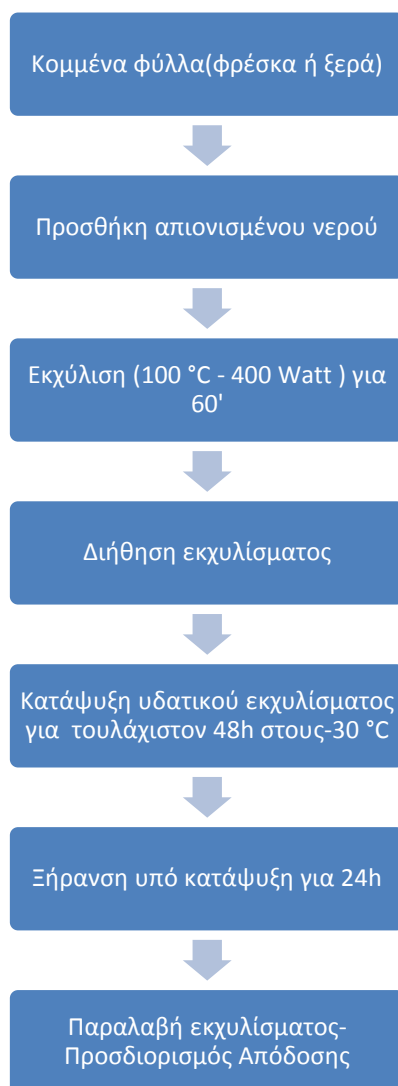
5.2.2.2. Συνθήκες εκχύλισης-Διαδικασία

Ζυγίστηκαν περίπου 0,6gr κομμένων φρέσκων αλλά και ξερών φύλλων τα οποία τοποθετήθηκαν με 12 ml απιονισμένου νερού στα ειδικά δοχεία εκχύλισης του επιστημονικού φούρνου μικροκυμάτων. Οι εκχυλίσεις έγιναν σε τρεις επαναλήψεις. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση (οι συνθήκες επιλέχθηκαν μέσω σύγκρισης με συνθήκες από τη βιβλιογραφία^[2]) στους 100 °C και σε ισχύ 400 Watt με συνολική διάρκεια 60λεπτά. Η διάρκεια αυτή χωριζόταν σε τρία στάδια:

1. Θέρμανση 10min μέχρι να φτάσει στους 100 °C
2. Διατήρηση στους 100 °C για 40 min
3. Εξαερισμός ώστε τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 min

Μετά το πέρας της εκχύλισης τα δείγματα διηθήθηκαν και το υδατικό εκχύλισμα τοποθετήθηκε σε περιέκτες στην κατάψυξη στους -30 °C για τουλάχιστον 48h. Ακολούθησε ξήρανση υπό κατάψυξη για 24 h, για την παραλαβή του καθαρού εκχυλίσματος, χωρίς να υπάρχει αλλοίωση των συστατικών του.

Το διάγραμμα ροής της διαδικασίας είναι:



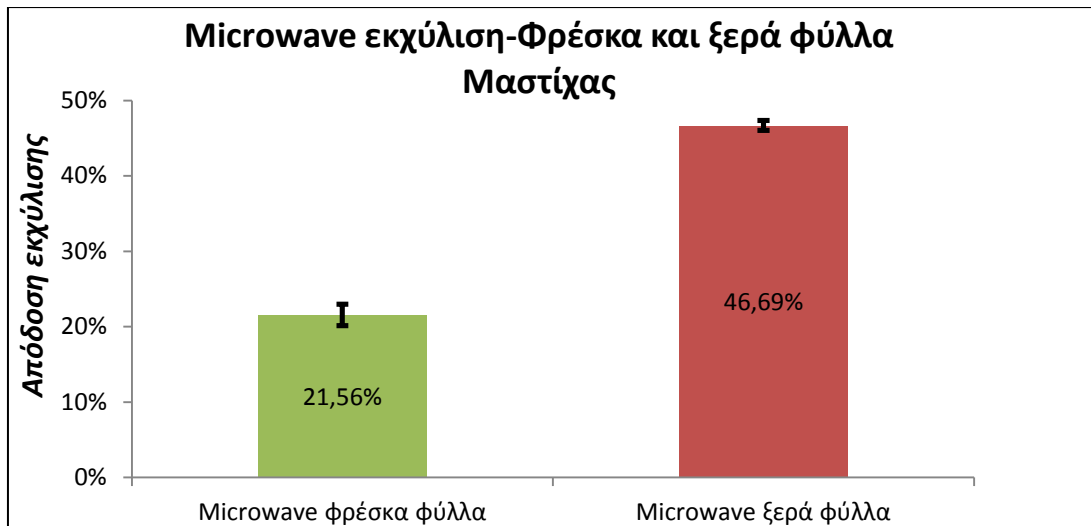
Σχήμα 3 Διάγραμμα ροής Διαδικασίας εκχύλισης με Μικροκύματα φρέσκων και ξερών φύλλων

5.2.2.3.Αποτελέσματα εκχυλίσεων με μικροκύματα

Ακολουθούν αναλυτικά οι ποσότητες των φύλλων, των εκχυλισμάτων αλλά και οι αποδόσεις για τα φρέσκα και τα ξερά φύλλα αντίστοιχα.

Πίνακας 9 Αποδόσεις εκχυλίσεων με μικροκύματα για τα φρέσκα και τα ξερά φύλλα

	Ποσότητα α' ύλης(gr)	Ποσότητα εκχυλίσματος(gr)	Απόδοση%
ΦΡΕΣΚΑ ΦΥΛΛΑ	0,609	0,131	21,56±1,44
ΞΕΡΑ ΦΥΛΛΑ	0,606	0,283	46,69±0,67



Διάγραμμα 4 Αποδόσεις εκχυλίσεων με μικροκύματα για τα φρέσκα και τα ξερά φύλλα

Παρατηρούμε ότι η απόδοση της εκχύλισης των ξερών φύλλων(46,69%) είναι σχεδόν δυο φορές μεγαλύτερη από την απόδοση εκχυλίσεων των φρέσκων φύλλων(21,56%). Φαίνεται πως ποσότητα ξερών φύλλων περιέχει διπλάσια συστατικά από την ίδια ποσότητα φρέσκων φύλλων.

Στην εκχύλιση με μικροκύματα το δείγμα θερμαίνεται με τη βοήθεια μικροκυμάτων σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας και πίεσης προκαλώντας έτσι εκχύλιση της προσδιοριζόμενης ένωσης στο διαλύτη. Η θέρμανση ξεκινά από το δείγμα αφού το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους, όπου η θερμότητα μεταδίδεται από την θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα. Επίσης, ο κλειστός περιέκτης επιτρέπει την άνοδο της θερμοκρασίας του διαλύτη πέρα από το σημείο ζέσεως του με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου εκχύλισης και ταυτόχρονα την αύξηση της απόδοσης^[45].

Για την εκχύλιση με μικροκύματα όπως ήδη αναφέρθηκε ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το νερό. Η μέθοδος αυτή καταστρέφει τους κυτταρικούς ιστούς του φυτού, απομακρύνοντας τις ουσίες καθώς το νερό με την αύξηση της θερμοκρασίας “σκάει” τα τοιχώματα. Το νερό σαν πολικός διαλύτης απομακρύνει πολικά μόρια, όπως τανίνες και σάκχαρα. Στην εκχύλιση των φρέσκων φύλλων μάλιστα μπορεί η περιεχόμενη υγρασία τους να λειτουργεί και σαν συνδιαλύτης και όταν βράζει σπάει την υφή των φύλλων απελευθερώνοντας περισσότερες ουσίες. Οι αποδόσεις της διαδικασίας είναι ιδιαίτερα υψηλές καθώς το νερό απομάκρυνε τις πιο βαριές ενώσεις. Θα ήταν σκόπιμη η χρήση κάποιου συνδιαλύτη (πχ αιθανόλη) για βελτιστοποίηση της διαδικασίας, ώστε να έχουμε απομόνωση των λιγότερων σακχάρων.

Όπως θα αναφερθεί και στο επόμενο κεφάλαιο αυτό επιβεβαιώνεται και από την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων με μικροκύματα. Η δράση των εκχυλισμάτων ήταν από τις υψηλότερες (με χαμηλότερες τιμές του IC₅₀) επιβεβαιώνοντας τα παραπάνω, καθώς η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται κυρίως στις τανίνες (πολυφαινόλες).

5.2.3.Εκχυλίση με υπερήχους

5.2.3.1. Υλικά -Εξοπλισμός

Για τις εκχυλίσεις με υπερήχους χρησιμοποιήθηκαν φύλλα ξερά (μέσης κοκκομετρίας 435 μ m) αλλά και φρέσκα (μέσης κοκκομετρίας 1,06mm) τα οποία είχαν κοπεί κατάλληλα. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό και αιθανόλη.

Τα πειράματα των εκχυλίσεων με υπερήχους και για τους δύο διαλύτες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, όπου έγινε και η απομάκρυνση της αιθανόλης από τα εκχυλίσματα. Για την απομάκρυνση του νερού από τα εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε ξήρανση με κατάψυξη στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών.

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι:

- Λουτρό υπερήχων (Εικόνα 25)
- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Κεραμικό χωνί για διήθηση υπό κενό
- Μονάδα ξήρανσης με κατάψυξη (Leybold – Heraeus GT 2A, Koln, Germany)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotary evaporator)
- Αντλία εξάτμισης

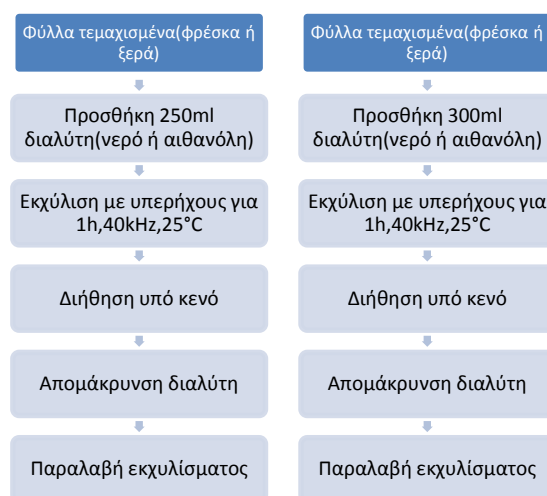


Εικόνα 25 Λουτρό υπερήχων

5.2.3.2.Συνθήκες εκχύλισης-Διαδικασία

Ζυγίστηκαν περίπου 22gr πρώτης ύλης (φρέσκων ή ξερών φύλλων), τα οποία τοποθετήθηκαν με διαλύτη (250 ή 300ml) σε κατάλληλες φιάλες. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν στο λουτρό των υπερήχων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 60min στα 40kHz. Τα πειράματα έγιναν σε δυο επαναλήψεις. Μετά το πέρας της εκχύλισης έγινε απομάκρυνση των διαλυτών: για τα εκχυλίσματα της αιθανόλης έγινε εξάτμιση με περιστροφικό εξατμιστήρα, ενώ το νερό απομακρύνθηκε από τα δείγματα με ξήρανση με κατάψυξη για 24h.

Σχηματικά έχουμε:



Σχήμα 4 Διάγραμμα ροής εκχυλίσεων με υπερήχους

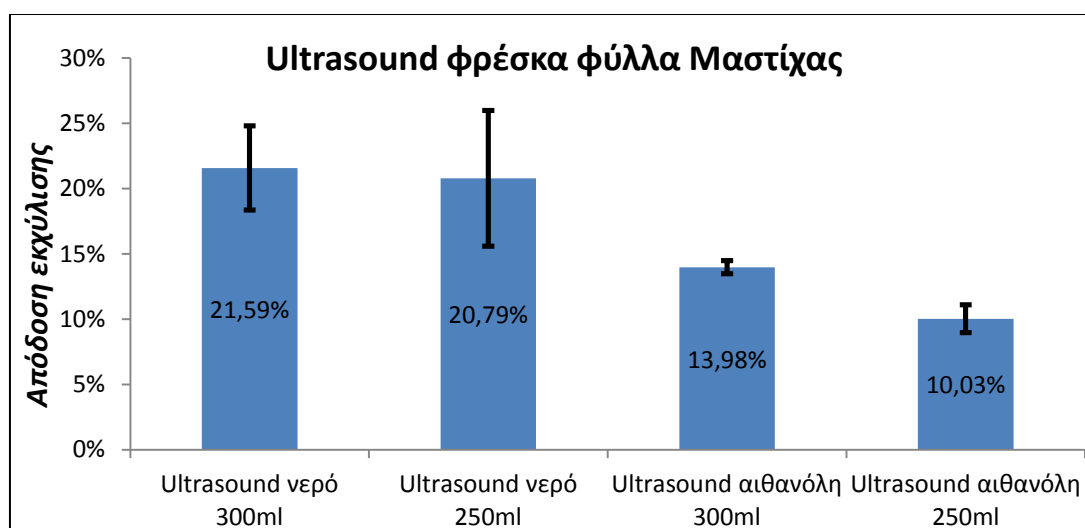
5.2.3.3.Αποτελέσματα εκχυλίσεων με υπερήχους

Ακολουθούν πίνακες με συγκεντρωτικά τα στοιχεία των εκχυλίσεων (ποσότητες ά ύλης ποσότητες διαλύτη, εκχυλίσματος) αλλά και με τις αποδόσεις κάθε εκχύλισης, για τα φρέσκα και για ξερά φύλλα:

ΦΡΕΣΚΑ ΦΥΛΛΑ

Πίνακας 10 Αποδόσεις εκχύλισεων με υπερήχους για φρέσκα φύλλα

Διαλύτης	Ποσότητα διαλύτη (ml)	Ποσότητα α' ύλης (gr)	Ποσότητα εκχυλίσματος (gr)	Απόδοση%
νερό	300	22,21	4,29	21,59±3,22
νερό	250	22,10	3,66	20,79±5,20
αιθανόλη	300	22,20	2,20	13,98±0,50
αιθανόλη	250	22,14	2,21	10,03±1,06



Διάγραμμα 5 Αποδόσεις εκχύλισης φρέσκων φύλλων με υπερήχους

Από τον πίνακα 11 και το Διάγραμμα 5 φαίνεται ότι η απόδοση των εκχυλίσεων αλλάζει με την προσθήκη 50 ml επιπλέον από τον κάθε διαλύτη. Συγκεκριμένα η απόδοση της εκχύλισης με 250ml νερό είναι 20,79% και με την προσθήκη 50ml αυξήθηκε κατά 0,8%, φτάνοντας 21,59%. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαμε και για την αιθανόλη. Για 250 ml αιθανόλης η απόδοση βρέθηκε 10,03% ενώ για τα 300ml διαλύτη η απόδοση αυξήθηκε κατά 3,95% φθάνοντας το 13,98%. Συνεπώς, η χρήση παραπάνω διαλύτη φαίνεται πως δεν έχει καταλυτική σημασία για την εκχύλιση, η οποία είναι εξίσου αποδοτική ακόμη και για μικρότερες ποσότητες. Είναι βέβαιο όμως πως η μέθοδος μπορεί να βελτιστοποιηθεί ως προς τις μεταβλητές της, για παράδειγμα ποσότητα διαλύτη –ποσότητα πρώτης ύλης, αλλά και χρόνο εκχύλισης.

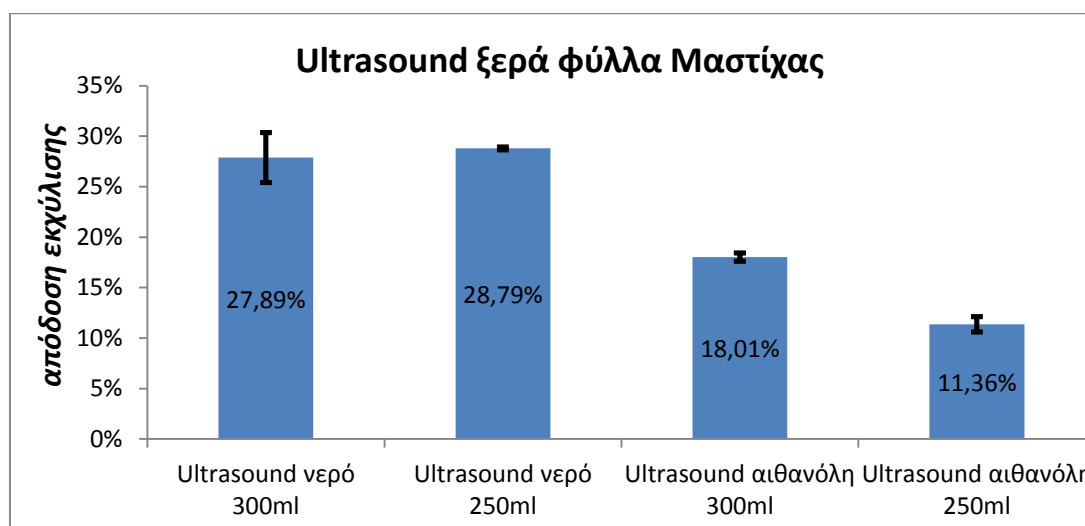
Το νερό σαν διαλύτης επιφέρει και πάλι μεγάλες αποδόσεις στην εκχύλιση, συγκρίσιμες με αυτές των μικροκυμάτων. Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι στην εκχύλιση με υπερήχους το νερό λειτουργεί και πάλι σαν συνδιαλύτης, παρασύροντας με πιο ήπιο τρόπο τα συστατικά

διαμέσου των ινών του φύλλου. Από την άλλη μεριά στην εκχύλιση με μικροκύματα το νερό φαίνεται να σπάει τις κυτταρικές δομές του φύλλου, απομακρύνοντας ακόμη περισσότερα συστατικά.

ΞΕΡΑ ΦΥΛΛΑ

Πίνακας 11 Αποδόσεις εκχύλισων με υπερήχους για ξερά φύλλα

Διαλύτης	Ποσότητα διαλύτη (ml)	Ποσότητα α' ύλης (gr)	Ποσότητα εκχυλίσματος (gr)	Απόδοση%
νερό	300	22,23	6,20	27,89±2,47
νερό	250	22,18	6,39	28,79±0,15
αιθανόλη	300	22,15	3,99	18,01±0,41
αιθανόλη	250	22,17	2,52	11,36±0,77



Διάγραμμα 6 Αποδόσεις εκχύλισης ξερών φύλλων με υπερήχους

Για τα ξερά φύλλα προκύπτουν διαφορετικά αποτελέσματα σε σχέση με τα αποτελέσματα που είχαμε για τα φρέσκα φύλλα. Εδώ η απόδοση της εκχύλισης με το νερό είναι κατά 0,9% μεγαλύτερη για 250ml διαλύτη (28,79%), ενώ για 300ml νερού η απόδοση βρέθηκε 27,89%. Με μικρότερη ποσότητα διαλύτη είχαμε εξίσου υψηλές αποδόσεις. Λαμβάνοντας υπόψιν μας και τα σφάλματα (παρουσιάζονται στον πίνακα 12) μπορούμε να συμπεράνουμε πως στην περίπτωση των ξερών φύλλων μας συμφέρει λιγότερο νερό.

Για την αιθανόλη όμως η απόδοση φαίνεται να επηρεάζεται με την προσθήκη παραπάνω διαλύτη, καθώς με 50ml επιπλέον είχαμε αύξηση 6,65%. Η απόδοση για 250ml διαλύτη είναι 11,36% ενώ για 300ml βρέθηκε 18,01%. Και για τα ξερά φύλλα μπορεί να γίνει βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης ως προς τις ίδιες παραμέτρους με τα φρέσκα: ποσότητα διαλύτη-ποσότητα πρώτης ύλης, αλλά και χρόνο εκχύλισης ως προς την απόδοση.

Συνολικά οι αποδόσεις που είχαμε για τα φρέσκα φύλλα είναι αρκετά ικανοποιητικές και συγκρίσιμες με την μέθοδο των μικροκυμάτων. Για τα ξερά φύλλα όμως η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα παρουσίασε πολύ καλύτερες αποδόσεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι στα

φρέσκα φύλλα περιέχεται μεγάλη ποσότητα υγρασίας (σχεδόν 50%w/w) η οποία και δεν έχει αφαιρεθεί από τους υπολογισμούς μας.

Αξιοσημείωτο είναι τέλος, ότι στην σύγκριση της μεθόδου με μικροκύματα παρατηρήθηκε διπλασιασμός της απόδοσης από τα φρέσκα στα ξερά φύλλα, ενώ για τη μέθοδο των υπερήχων με διαλύτη το νερό η διαφορά είναι μικρότερη (περίπου 9%). Αυτό αποδεικνύει πως η μέθοδος των υπερήχων είναι πιο ήπια μέθοδος και καταλληλότερη για προεπεξεργασία φυτών, ενώ η μέθοδος με μικροκύματα “διαλύει” τελείως τους ιστούς των φύλλων.

5.2.4.Υπερκρίσιμη Εκχύλιση

5.2.4.1. Υλικά – Εξοπλισμός

Για την υπερκρίσιμη εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν φύλλα ξερά (μέσης κοκκομετρίας 435 μ m). Έγινε επίσης δοκιμαστική εκχύλιση φρέσκων φύλλων (μέσης κοκκομετρίας 1,06mm). Διαλύτης είναι το CO₂ σε υπερκρίσιμες συνθήκες.

Μονάδα Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην πιλοτική μονάδα υπερκρίσιμης εκχύλισης που διαθέτει το εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς της σχολής Χημικών Μηχανικών. Η μονάδα αυτή σχεδιάστηκε έτσι ώστε να είναι δυνατή η μελέτη της διεργασίας της υπερκρίσιμης εκχύλισης σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών. Μπορούν να ελεγχθούν τόσο στερεές, όσο και υγρές ουσίες σε διεργασία διαλείποντος έργου. Το προϊόν συλλέγεται σε δύο υψηλής απόδοσης διαχωριστές σε σειρά που λειτουργούν σε διαφορετική πίεση και θερμοκρασία ώστε να είναι δυνατή η κλασμάτωση του εκχυλίσματος.



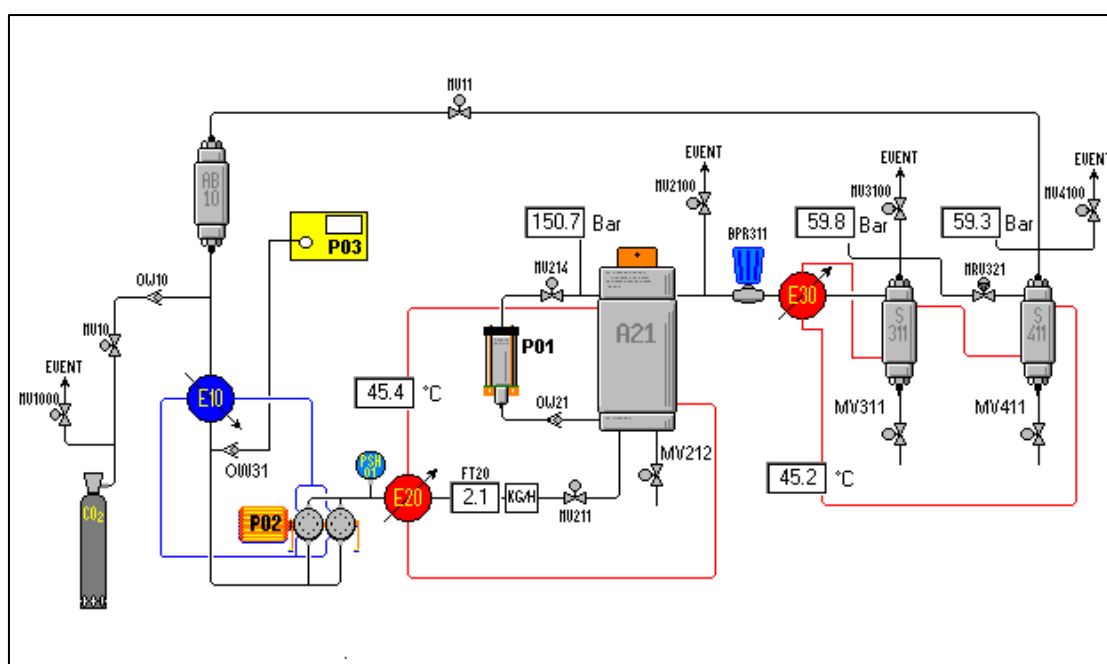
Εικόνα 26 Πιλοτική μονάδα Υ.Ε. εργαστηρίου Θερμοδυναμικής και Φαινομένων μεταφοράς

Τεχνικά χαρακτηριστικά

Πίνακας 12 Τεχνικά χαρακτηριστικά και προδιαγραφές συσκευής

Μέγιστη πίεση λειτουργίας	300 bar
Μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας	70 °C
Δυνατότητα ροής διαλύτη	0.5-9 kg/h
Όγκος εκχυλιστήρα	400 ml
Όγκος διαχωριστών	18 ml
Υλικά κατασκευής	316 L ανοξείδωτος χάλυβας PTFE

Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής της πιλοτικής μονάδας Υ.Ε. που διαθέτει το εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων μεταφοράς της σχολής μας.



Σχήμα 5 Διάγραμμα ροής πιλοτικής μονάδας Υ.Ε.

Κωδικός	Κωδικός		
P01	Αντλία ανακυκλοφορίας	A21	Εκχυλιστήρας
P02	Αντλία CO ₂	S311, S411	Διαχωριστές
P03	Αντλία συνδιαλύτη	AB10	Φίλτρο
E10	Συμπυκνωτήρας CO ₂	MV _i	Βαλβίδες
E20, E30	Θερμαντήρας	OW _i	Back pressure valves
PSH01	Ρυθμιστής πίεσης (300 bar)		Ρυθμιστές πίεσης:
		MRV321	διαχωριστών
		BPR311	εκχυλιστήρα

Περιγραφή της διεργασίας

Το δοχείο της εκχύλισης είναι ειδικά σχεδιασμένο ώστε να είναι δυνατή η ταχεία φόρτωση και εκφόρτωση της προς εκχύλιση ουσίας. Η ύπαρξη μιας πνευματικής αντλίας κάνει δυνατή την ανακυκλοφορία του διαλύτη στον εκχυλιστήρα, ενώ μια αντλία με έμβολο επιτρέπει την είσοδο συνδιαλύτη στο σύστημα. Οι πληροφορίες που θα προκύψουν από τη μελέτη μιας διεργασίας με τη συσκευή αυτή, είναι απαραίτητες για τη μελέτη σκοπιμότητας της διεργασίας αυτής και τα αποτελέσματα μπορούν άμεσα να χρησιμοποιηθούν σε υπολογισμούς κλιμάκωσης μεγέθους. Το υγρό CO₂ της φιάλης αφού περάσει από το συμπυκνωτήρα οδηγείται στην αντλία συμπίεσης του CO₂ (P02). Αν χρησιμοποιείται συνδιαλύτης, αυτός εισέρχεται στο σύστημα με την αντλία P03. Το συμπιεσμένο CO₂ αφού περάσει από το θερμαντήρα E20 οδηγείται στον εκχυλιστήρα με την επιθυμητή πίεση. Αν επιθυμείται ο κορεσμός του CO₂ στην προς εκχύλιση ουσία, αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της αντλίας ανακυκλοφορίας P01. Το CO₂ μαζί με την εκχυλισμένη ουσία αφού θερμανθεί με τον εναλλάκτη E30, εκτονώνεται στους δύο διαχωριστές σε πιέσεις που καθορίζονται από το χρήστη. Μετά την εκτόνωση, το CO₂ είτε ελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα, είτε ανακυκλώνεται στο σύστημα αφού όμως πρώτα περάσει από φίλτρο ενεργού άνθρακα για παρακράτηση ουσιών που τυχόν δεν έχουν πέσει κατά την εκτόνωση^[59].

5.2.4.2. Συνθήκες εκχύλισης-Διαδικασία

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε ποσότητα κομμένων **φρέσκων** φύλλων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε υπερκρίσιμη εκχύλιση σε κομμένα φύλλα τα οποία είχαν υποστεί **ξηρανση με κατάψυξη**. Στα ξερά φύλλα δοκιμάστηκαν εκχυλίσεις σε διαφορετικές πιέσεις. Αναλυτικά :

ΦΡΕΣΚΑ ΦΥΛΛΑ

Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 50gr φρέσκων φύλλων τα οποία κόψαμε και κοσκινίσαμε (μέσης κοκκομετρίας 1,06mm). Η ποσότητα αυτή εισήχθη για εκχύλιση στη συσκευή Υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί. Ο σχεδιασμός του πειράματος και η επιλογή των συνθηκών, έγιναν εμπειρικά (λόγω ελλιπούς βιβλιογραφίας στην οικογένεια του είδους):

Πίνακας 13 Συνθήκες Υ.Ε. φρέσκων φύλλων

<i>Υ.Ε. φρέσκων φύλλων</i>		
	Θερμοκρασία(°C)	Πίεση(bar)
Εκχυλιστήρας	45	100
Διαχωριστήρας 1	0-3	80
Διαχωριστήρας 2	0-3	30

Το δοχείο εκχύλισης ζυγίστηκε συνολικά μαζί με την πρώτη ύλη πριν την έναρξη της εκχύλισης. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η εκχύλιση διακοπτόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα και το δοχείο ζυγιζόταν ώστε να καταγραφεί η απώλεια βάρους. Σε καθαρούς περιέκτες συλλέξαμε τα εκχυλίσματα κάθε σταδίου ,για κάθε διαχωριστήρα ξεχωριστά. Η διάρκεια της εκχύλισης του πειράματος ήταν 410min και η ροή επιλέχθηκε 1,5kg/h.

ΞΕΡΑ ΦΥΛΛΑ

Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 50gr ξερά φύλλα (μέσης κοκκομετρίας 435 μ m). Η ποσότητα αυτή εισήχθη για εκχύλιση στη συσκευή Υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί. Δοκιμάστηκαν τρεις συνθήκες: ίδια ροή(1,5 kg/h) με διαφορετικές πιέσεις(100-250 bar) και ίδια πίεση (100bar) αλλά διαφορετική ροή (1,5 και 3kg/h). Ο σχεδιασμός του πειράματος και η επιλογή των συνθηκών και για τα ξερά φύλλα, έγιναν εμπειρικά (λόγω ελλιπούς βιβλιογραφίας στην οικογένεια του είδους):

Πίνακας 14 Συνθήκες Υ.Ε. για ξερά φύλλα

Υ.Ε. Ξερών φύλλων						
ΠΕΙΡΑΜΑ	Α		Β		Γ	
Ροή CO ₂ (kg/h)	1,5		1,5		3	
	T (°C)	P (bar)	T (°C)	P(bar)	T(°C)	P(bar)
Εκχυλιστήρας	45	100	45	250	45	100
Διαχωριστήρας 1	10	80	10	80	10	80
Διαχωριστήρας 2	10	30	10	30	10	30

Σημείωση: Η θερμοκρασία στους διαχωριστήρες ήταν αρκετά χαμηλή (0-3°C)στην εκχύλιση φρέσκων φύλλων με συνέπεια κατά τη δειγματοληψία να υπάρχει δυσκολία καθώς ξηρός πάγος έφραζε τις σωληνώσεις. Έτσι στα πειράματα των ξερών φύλλων ανεβάσαμε τη θερμοκρασία των διαχωριστήρων ώστε να αποφευχθεί αυτό.

Το δοχείο εκχύλισης ζυγίστηκε συνολικά μαζί με την πρώτη ύλη πριν την έναρξη της εκχύλισης. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η εκχύλιση διακοπτόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα και το δοχείο ζυγιζόταν ώστε να καταγραφεί η απώλεια βάρους. Σε καθαρούς περιέκτες συλλέξαμε τα εκχυλίσματα κάθε σταδίου ,για κάθε διαχωριστήρα ξεχωριστά.

5.2.4.3.Αποτελέσματα υπερκρίσιμης εκχύλισης

ΦΡΕΣΚΑ ΦΥΛΛΑ

Η εκχύλιση των φρέσκων κομμένων φύλλων πραγματοποιήθηκε για περίπου επτά ώρες, με ενδιάμεσες δειγματοληψίες και διακοπές της εκχύλισης .Αρχικά τρέξαμε το πείραμα για μισή ώρα, σταματήσαμε και ζυγίσαμε τον εκχυλιστήρα ώστε να καταγράψουμε την απώλεια βάρους. Στη συνέχεια σε τακτά χρονικά διαστήματα όπως φαίνονται στον πίνακα 14 διακόπταμε την εκχύλιση και ζυγίζαμε το δοχείο εκχύλισης ώστε να υπολογίσουμε την απώλεια βάρους (η αρχική ποσότητα φύλλων που βάλαμε ήταν 50,34 gr).Η απόδοση της εκχύλισης για το πείραμα 1 υπολογίζεται:

$$\text{Απόδοση} = \frac{\text{απώλεια βάρους}}{\text{αρχικό βάρος ά ύλης}} = \frac{\text{αρχικό συνολικό βάρος} - \text{τελικό συνολικό βάρος}}{\text{αρχικό βάρος α ύλης}} = 22,3\%$$

Πίνακας 15 Μετρήσεις Υ.Ε. Φρέσκα φύλλα

Χρόνος (min)	Συνολικό βάρος (gr)	Απώλεια βάρους (gr)	Απώλεια βάρους%
0	959,8	0	0,0
30	958,93	0,87	1,7
110	956,89	2,91	5,8
170	954,9	4,9	9,7
350	950,53	9,27	18,4
410	948,58	11,22	22,3

Ακολουθεί η καμπύλη της εκχύλισης:



Διάγραμμα 7 Καμπύλη Υ.Ε. για φρέσκα φύλλα

Από το Διάγραμμα 7 φαίνεται ότι η σχέση της απώλειας βάρους με το χρόνο είναι γραμμική, θεωρητικά λοιπόν αν η εκχύλιση δε διακοπτόταν θα παίρναμε συνεχώς ποσότητα μέχρι η απώλεια βάρους να σταθεροποιηθεί. Άμεσα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι θα ήταν σκόπιμο να γίνει επανάληψη της εκχύλισης αυτής σε διαφορετικές συνθήκες πίεσης και ροής, αλλά και για περισσότερη ώρα μέχρι να ολοκληρωθεί η εκχύλιση.

ΞΕΡΑ ΦΥΛΛΑ

ΠΕΙΡΑΜΑ Α

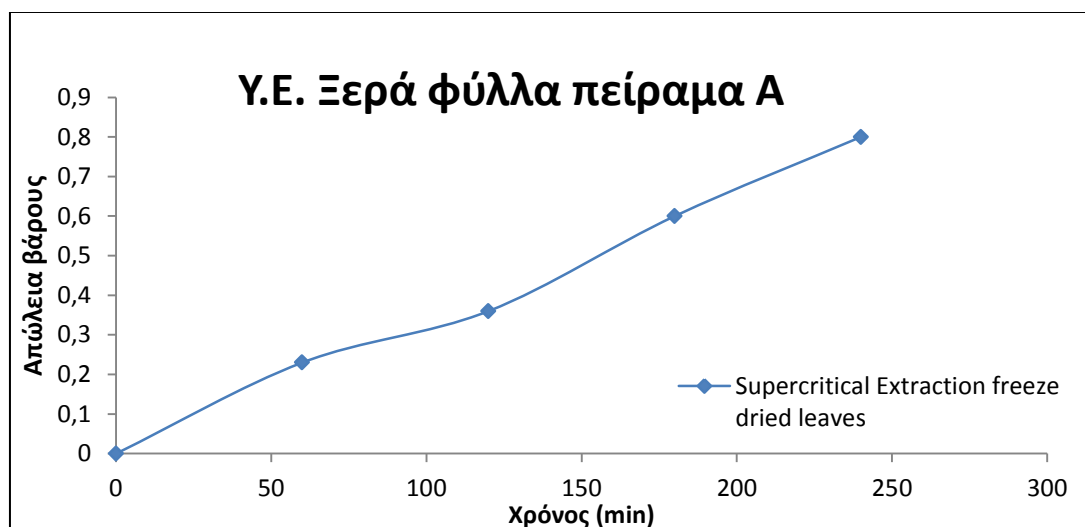
Τα φύλλα τοποθετήθηκαν στο δοχείο εκχύλισης (η αρχική ποσότητα φύλλων που βάλαμε ήταν 50,13gr) και αρχικά το δοχείο ζυγίστηκε συνολικά. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για περίπου τέσσερις ώρες, με ενδιάμεσες δειγματοληψίες και διακοπές της εκχύλισης. Στον πίνακα 17 φαίνεται η απώλεια βάρους σε σχέση με το χρόνο της εκχύλισης. Η απόδοση της εκχύλισης για το πείραμα Α υπολογίζεται:

$$\text{Απόδοση} = \frac{\text{απώλεια βάρους}}{\text{αρχικό βάρος ά ύλης}} = \frac{\text{αρχικό συνολικό βάρος} - \text{τελικό συνολικό βάρος}}{\text{αρχικό βάρος α ύλης}} = 1,6\%$$

Πίνακας 16 Υ.Ε. ξερά φύλλα-πείραμα Α

Χρόνος (min)	Συνολικό βάρος (gr)	Απώλεια βάρους (gr)	Απώλεια βάρους%
0	1079,26	0	0,0
60	1079,03	0,23	0,5
120	1078,9	0,36	0,7
180	1078,66	0,6	1,2
240	1078,46	0,8	1,6

Ακολουθεί και η καμπύλη ξήρανσης:



Διάγραμμα 8 καμπύλη ξήρανσης πείραμα Α

Από το διάγραμμα 8 φαίνεται ότι η εκχύλιση δεν έχει ολοκληρωθεί καθώς η καμπύλη ανεβαίνει σχεδόν γραμμικά. Η απόδοση όπως ήταν αναμενόμενο κυμαίνεται σε τιμές χαμηλότερες από την απόδοση των φρέσκων φύλλων, σε τιμές συγκρίσιμες όμως με τη βιβλιογραφία (0,25% απόδοση σε αιθέριο έλαιο με Υ.Ε. για φύλλα από τη Σαρδηνία).

ΠΕΙΡΑΜΑ Β

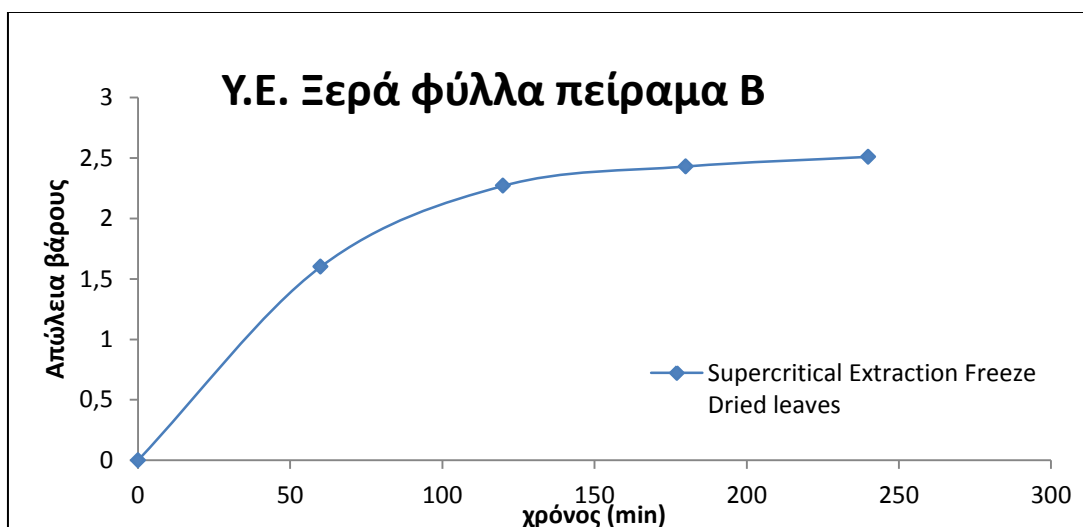
Τα φύλλα τοποθετήθηκαν στο δοχείο εκχύλισης (η αρχική ποσότητα φύλλων που βάλαμε ήταν 50,41gr) και αρχικά το δοχείο ζυγίστηκε συνολικά. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για περίπου τέσσερις ώρες, με ενδιάμεσες δειγματοληψίες και διακοπές της εκχύλισης. Στον πίνακα 17 φαίνεται η απώλεια βάρους σε σχέση με το χρόνο της εκχύλισης. Η απόδοση της εκχύλισης για το πείραμα Β υπολογίζεται:

$$\text{Απόδοση} = \frac{\text{απώλεια βάρους}}{\text{αρχικό βάρος α ύλης}} = \frac{\text{αρχικό συνολικό βάρος} - \text{τελικό συνολικό βάρος}}{\text{αρχικό βάρος α ύλης}} = 5\%$$

Πίνακας 17 Ξερά φύλλα πείραμα Β

Χρόνος (min)	Συνολικό βάρος (gr)	Απώλεια βάρους (gr)	Απώλεια βάρους%
0	1088,02	0	0,0
60	1086,42	1,6	3,2
120	1085,75	2,27	4,5
180	1085,59	2,43	4,8
240	1085,51	2,51	5,0

Ακολουθεί και η καμπύλη ξήρανσης:



Διάγραμμα 9 καμπύλη ξήρανσης πείραμα Β

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 17 η απόδοση της εκχύλισης είναι περίπου τρεις φορές μεγαλύτερη με αύξηση της πίεσης στα 250bar(2,5 φορές). Από το διάγραμμα 9 ακόμη μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η εκχύλιση ολοκληρώθηκε εφόσον η καμπύλη φτάνει σε πλατό.

ΠΕΙΡΑΜΑ Γ

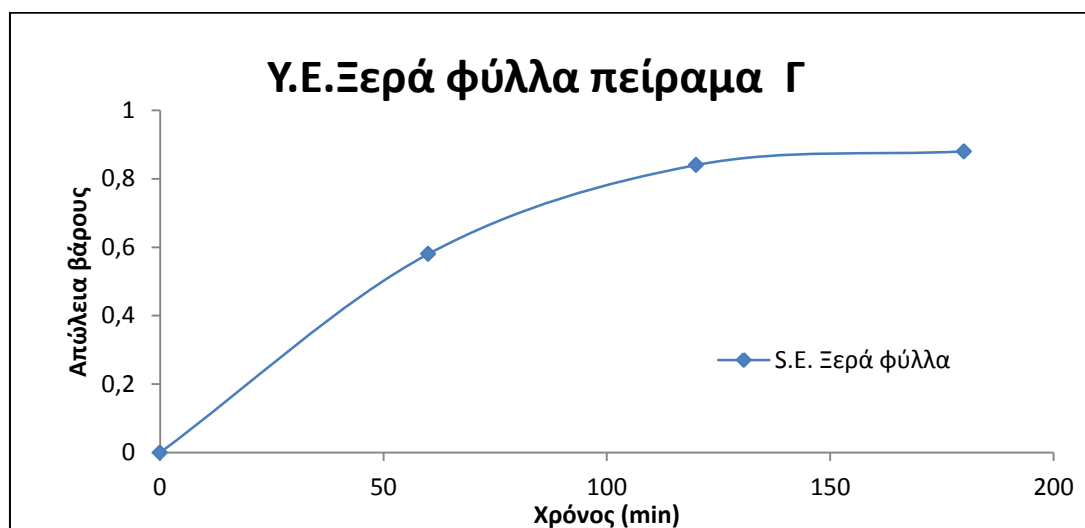
Τα φύλλα τοποθετήθηκαν στο δοχείο εκχύλισης (η αρχική ποσότητα φύλλων που βάλαμε ήταν 50,55gr) και αρχικά το δοχείο ζυγίστηκε συνολικά. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για περίπου τρεις ώρες, με ενδιάμεσες δειγματοληψίες και διακοπές της εκχύλισης. Στον πίνακα 18 φαίνεται η απώλεια βάρους σε σχέση με το χρόνο της εκχύλισης. Η απόδοση της εκχύλισης για το πείραμα Γ υπολογίζεται:

$$\text{Απόδοση} = \frac{\text{απώλεια βάρους}}{\text{αρχικό βάρος ά ύλης}} = \frac{\text{αρχικό συνολικό βάρος} - \text{τελικό συνολικό βάρος}}{\text{αρχικό βάρος α ύλης}} = 1,7\%$$

Πίνακας 18 Ξερά φύλλα πείραμα Γ

Χρόνος (min)	Συνολικό βάρος (gr)	Απώλεια βάρους (gr)	Απώλεια βάρους%
0	1059,68	0	0,0
60	1059,10	0,58	1,1
120	1058,84	0,84	1,7
180	1058,80	0,88	1,7

Ακολουθεί και η καμπύλη ξήρανσης:



Διάγραμμα 10 Υ.Ε. Ξερά φύλλα πείραμα Γ

Στην εκχύλιση αυτή (πείραμα Γ) παρατηρούμε ότι η απόδοση είναι λίγο μικρότερη από το πείραμα Α. Ουσιαστικά στο πείραμα Α είχαμε ακριβώς τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης με το πείραμα Γ, αλλά τη μισή ροή. Ο διπλασιασμός της ροής δεν επέφερε σπουδαία αλλαγή στην τιμή της απόδοσης. Όπως φαίνεται όμως από το Διάγραμμα 10, με το διπλασιασμό της ροής η εκχύλιση ολοκληρώθηκε και η καμπύλη έφτασε σε πλατό. Ακόμη μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η απόδοση έφτασε στο 1,7% (σε πλατό) σε 3 ώρες πειράματος. Η αντίστοιχη απόδοση (1,6%) του πειράματος Α χρειάστηκε 4 ώρες πειράματος. Η αύξηση της ροής επέφερε την ίδια απόδοση μία ώρα νωρίτερα.

Συγκριτικά με το πείραμα Β, όπου έχουμε διαφορετικές συνθήκες πίεσης και ροής σαν πρώτο συμπέρασμα μπορούμε να πούμε ότι η αύξηση της πίεσης οδηγεί σε μεγιστοποίηση της απόδοσης, ακόμη και στη χαμηλότερη ροή. Σε μεγαλύτερη πίεση, στις τρεις ώρες πειράματος είχαμε απόδοση 4,8%, σχεδόν τριπλάσια από την απόδοση που είχαμε για 100bar για τρεις ώρες. Φαίνεται πως η πίεση επηρεάζει την απόδοση, ακόμη και αν η ροή είναι μεγαλύτερη στο πείραμα Γ.

Και για τα ξερά φύλλα επομένως θεωρείτε σκόπιμο να γίνει βελτιστοποίηση των συνθηκών της εκχύλισης, για διάφορες τιμές πίεσης, ροής, θερμοκρασίας αλλά και για χρήση συνδιαλύτη.

5.2.5.Υδροαπόσταξη(CLEVENGER)

5.2.5.1. Υλικά – Εξοπλισμός

Για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου από τα φύλλα χρησιμοποιήθηκε η συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger. Χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα νωπά φύλλα, τα οποία αποθηκεύονταν σε κατάψυξη στους -30°C και πριν τη χρήση αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Η απόσταξη έγινε με χρήση απιονισμένου νερού. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα νωπά φύλλα καθώς αυτά δεν είχαν υποστεί κάποια επεξεργασία, κάνοντας ευκολότερη την παραλαβή του αιθέριου ελαίου.

Τα πειράματα της απόσταξης με υδρατμούς (Clevenger) των φύλλων της Μαστίχας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, ενώ τη συσκευή παρέιχε το εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς.

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι:

- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger (Εικόνα 27)



Εικόνα 27 αριστερά: Συσκευή Clevenger, δεξιά: Μέτρηση αιθερίου ελαίου στη συσκευή

5.2.5.2.Διαδικασία Υδροαπόσταξης-Αποτελέσματα

Ζυγίστηκαν περίπου 50 gr φρέσκων φύλλων μαστίχας, τα οποία τοποθετήθηκαν με 500 ml απιονισμένου νερού σε σφαιρική φιάλη η οποία συνδέθηκε με τη συσκευή Clevenger όπως φαίνεται στην Εικόνα 27. Η απόσταξη διήρκησε 4 h. Η απόσταξη έγινε δύο φορές κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Το αιθέριο έλαιο συλλέχθηκε με πιπέτα από τη συσκευή καθώς αποτελούσε ξεχωριστή φάση από αυτό. Πριν συλλέξουμε το έλαιο καταγράψαμε την ένδειξη της συσκευής για την ποσότητα του (Εικόνα 27). Και στις δυο επαναλήψεις πήραμε 0,06ml ελαίου. Συνεπώς η απόδοση της υδροαπόσταξης είναι ίση με 0,06 ml/100gr ή 0,12%ml ελαίου/gr.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

6.1. Ποιοτικός προσδιορισμός TLC

6.1.1. Υλικά

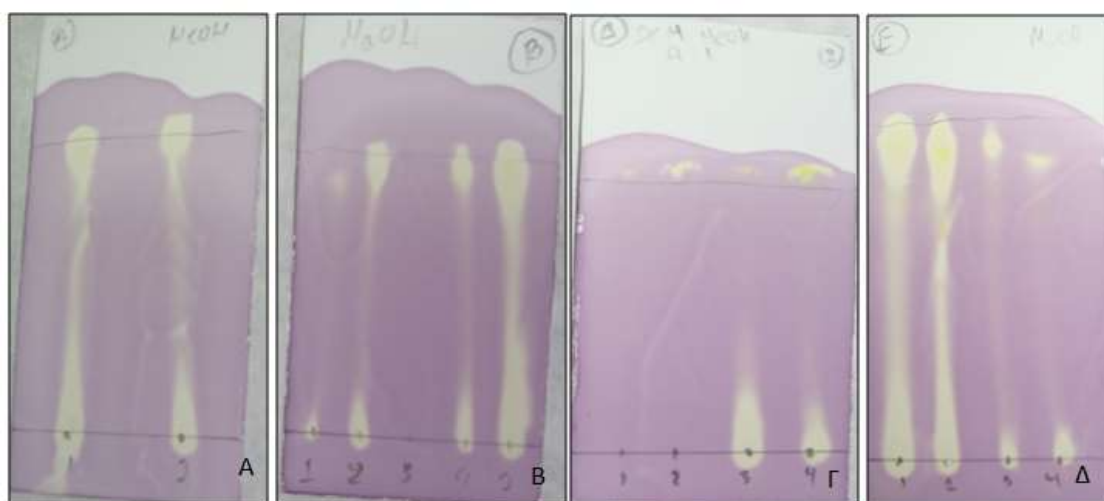
Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο TLC εξετάστηκαν όλα τα εκχυλίσματα που είχαν παραχθεί με τις πέντε διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης που μελετήθηκαν παραπάνω διαλυμένα σε μεθανόλη. Στο θάλαμο ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής διαλύτες:

- Διχλωρομεθάνιο για τα εκχυλίσματα του εξανίου
- Μεθανόλη για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα

Για την ποιοτική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων έγινε ψεκασμός με διάλυμα μεθανόλης – DPPH συγκέντρωσης 0,3 mg/ml. Η ταχύτητα με την οποία η κηλίδα αποκτά κίτρινο χρώμα (αποχρωματισμός DPPH) αποτελεί ένδειξη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.

6.1.2. Διαδικασία προσδιορισμού με τη μέθοδο TLC

Τα διαλύματα των υπό εξέταση δειγμάτων τοποθετήθηκαν υπό τη μορφή κηλίδων στην αρχή της ειδικής πλάκας (silica) σε απόσταση περίπου 1 cm μεταξύ τους. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετήθηκε όρθια εντός του αεροστεγούς θαλάμου με 10 ml του κατάλληλου διαλύτη. Ο διαλύτης αφέθηκε να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων έως ότου το μέτωπό του φθάσει περίπου 2 cm πριν το τέλος της πλάκας. Η πλάκα στη συνέχεια αποσύρθηκε από το θάλαμο και αφέθηκε να στεγνώσει. Η παρατήρηση των κηλίδων έγινε σε θάλαμο υπεριώδους φωτός (UV) και στη συνέχεια η πλάκα ψεκάστηκε με το διάλυμα μεθανόλης - DPPH και παρατηρήθηκε ο αποχρωματισμός. Ακολουθούν εικόνες από τις χρωματογραφίες τις οποίες λάβαμε:



Εικόνα 28 **A:** Χρωματογραφία A, 1: Soxhlet ξερά φύλλα+νερό, 2: Soxhlet φρέσκα φύλλα+νερό, **B:** Χρωμ. B, 1: Microwave φρέσκα φύλλα, 2: Ultrasound φρέσκα φύλλα+νερό, 3: HD, 4: Microwave ξερά φύλλα, 5: Ultrasound ξερά φύλλα +νερό, **Γ:** Χρωμ. Δ, 1: Soxhlet φρέσκα+εξάνιο, 2: Soxhlet ξερά+εξάνιο, 3: Soxhlet φρέσκα+οξικός, 4: Soxhlet ξερά+οξικός, **Δ:** Χρωμ. E, 1: Soxhlet φρέσκα+αιθανόλη, 2: Soxhlet ξερά+αιθανόλη, 3: Ultrasound φρέσκα+αιθανόλη, 4: Ultrasound ξερά+αιθανόλη

6.1.3. Αποτελέσματα

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε μορφή πίνακα για τα εκχυλίσματα της κάθε μεθόδου, τα οποία έγιναν σύμφωνα με την παρατήρηση των παραπάνω χρωματογραφιών (Εικόνα28: Α-Δ). Στον συγκεντρωτικό πίνακα που ακολουθεί, ο πολύ έντονος αποχρωματισμός του DRPH αντιστοιχεί σε έντονη δράση, ο ελάχιστος αποχρωματισμός σε ελάχιστη δράση ενώ η ενδιάμεση κατάσταση σε μέτρια αντιοξειδωτική δράση.

Πίνακας 19 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα TLC

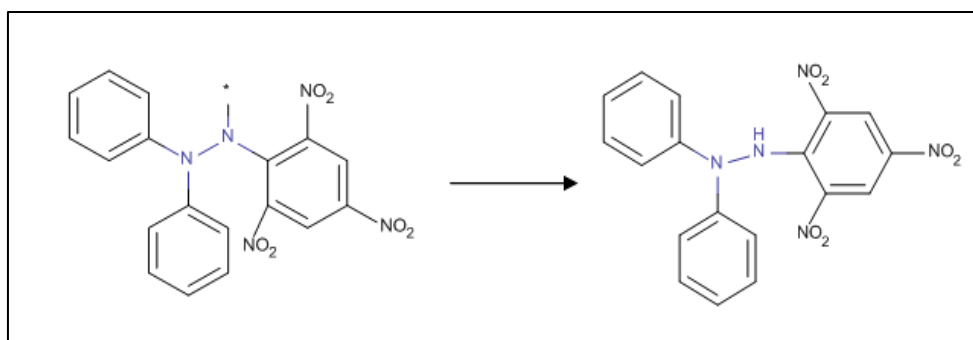
Κωδικός	Δείγμα	Διαλύτης	Έντονη δράση	Μέτρια δράση	Ελάχιστη δράση
ABSOX9	Εκχύλιση Soxhlet σε ξερά φύλλα	Νερό	✓		
ABSOX5	Εκχύλιση Soxhlet σε φρέσκα φύλλα	Νερό	✓		
ABSOX6	Εκχύλιση Soxhlet σε φρέσκα φύλλα	Εξάνιο			✓
ABSOX3	Εκχύλιση Soxhlet σε ξερά φύλλα	Εξάνιο			✓
ABSOX8	Εκχύλιση Soxhlet σε φρέσκα φύλλα	Οξικός αιθυλεστέρας		✓	
ABSOX4	Εκχύλιση Soxhlet σε ξερά φύλλα	Οξικός αιθυλεστέρας		✓	
ABSOX7	Εκχύλιση Soxhlet σε φρέσκα φύλλα	Αιθανόλη	✓		
ABSOX2	Εκχύλιση Soxhlet σε ξερά φύλλα	Αιθανόλη	✓		
Micro-fresh	Εκχύλιση Microwave σε φρέσκα φύλλα	Νερό		✓	
Micro-F.D.	Εκχύλιση Microwave σε ξερά φύλλα	Νερό		✓	
ABUlt1,2	Ultrasound σε φρέσκα φύλλα	Νερό		✓	
ABUlt5,6	Ultrasound σε ξερά φύλλα	Νερό	✓		
ABUlt3,4	Ultrasound σε φρέσκα φύλλα	Αιθανόλη		✓	
ABUlt7,8	Ultrasound σε ξερά φύλλα	Αιθανόλη			✓
Clevenger HD	Υδροαπόσταξη φρέσκων ολόκληρων φύλλων	Νερό			✓
Supercritical extraction	Υπερκρίσιμη εκχύλιση φρέσκων φύλλων	CO ₂			✓
Supercritical extraction	Υπερκρίσιμη εκχύλιση ξερών φύλλων	CO ₂			✓

Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι για τη μέθοδο Soxhlet αναμένουμε τα καλύτερα ποσοτικά αποτελέσματα στα υδατικά εκχυλίσματα και στα εκχυλίσματα της αιθανόλης. Για τη μέθοδο εκχύλισης με Υπερήχους καλύτερη ποσοτική αντιοξειδωτική δράση αναμένεται για τα υδατικά εκχυλίσματα των ξερών φύλλων. Τέλος, η εκχύλιση με μικροκύματα θα πρέπει να έχει την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση για τα ξερά φύλλα.

6.2. Ποσοτικός προσδιορισμός DPPH

6.2.1. Αρχή της μεθόδου

Ο έλεγχος των παραπάνω εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση έγινε με τη μέθοδο του DPPH όπως προτείνεται από τους Lee S.K. et al., (1998)^[102]. Η 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) αποτελεί μία ρίζα η οποία έχει την τάση να ανάγεται προς 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine. Το DPPH περιέχει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο εξαιτίας του οποίου παρουσιάζει έντονη απορρόφηση στα 516 nm με έντονο ιώδες χρώμα. Η δέσμευση αυτού του ηλεκτρονίου έχει σαν αποτέλεσμα τον άμεσο αποχρωματισμό του διαλύματος και συνεπώς την ελάττωση της απορρόφησής του. Επομένως, το ποσοστό της ρίζας που δεν ανάγεται μπορεί να μετρηθεί εύκολα με τη χρήση ενός φωτόμετρου UV-Vis και με την κατασκευή μιας καμπύλης αναφοράς μπορεί να γίνει εύκολα ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.



Εικόνα 29 Αναγωγή της ρίζας 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl προς 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine.

6.2.2. Διαδικασία

Αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήσαμε είναι η εξής:

Παρασκευή διαλυμάτων

Ζυγίζονται με ακρίβεια 12,4 mg αντιδραστηρίου DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθενται 100 mL αιθυλική αλκοόλη. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης (διάλυμα DPPH).

Από τα προς μελέτη εκχυλίσματα (αιθανολικά, υδατικά, οξικού αιθυλεστέρα και εξανίου) παρασκευάζονται για κάθε ένα, διαλύματα 3 mL με τελική συγκέντρωση 10 mg/mL σε DMSO (dimethylsulfoxide). Στη συνέχεια για κάθε ένα από αυτά τα δείγματα γίνονται διαδοχικές αραιώσεις κατά 2, 4, 8, 16 και 32 φορές.

Σε 1.9 mL αιθανολικού διαλύματος DPPH προστίθενται 100 μ L δείγματος. Παρασκευάζεται τυφλό δείγμα με 1.9 mL αιθανολικού διαλύματος DPPH και 100 μ L DMSO. Όλα τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.

Κατόπιν μετράται η απορρόφησή τους (A_{Δ}) και η απορρόφηση του τυφλού (A_{τ}) σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στα 517 nm. Η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης (% μείωση), η οποία είναι αποτέλεσμα της παρουσίας αντιοξειδωτικών ουσιών και αντικατοπτρίζει τη μείωση της ποσότητας της ελεύθερης ρίζας, υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{ Μείωση Απορρόφησης} = \frac{A_{\tau} - A_{\Delta}}{A_{\tau}} * 100$$

Το ποσοστό αυτό αντιστοιχεί στο ποσοστό της ελεύθερης ρίζας DPPH που ανάχθηκε, για μια τελική συγκέντρωση δείγματος ($C_{\Delta\tau}$), που είναι η συγκέντρωση του μείγματος που προκύπτει μετά την ανάμειξη των δύο διαλυμάτων.

Με βάση τις τιμές που προκύπτουν από το ποσοστό μείωσης της ρίζας, κατασκευάζονται, για κάθε εκχύλισμα, καμπύλες αναφοράς. Στη συνέχεια από τις καμπύλες αυτές υπολογίζεται η τιμή του IC_{50} που αντιστοιχεί στην τελική συγκέντρωση του δείγματος με την οποία αναστέλλεται το 50% της ρίζα DPPH. Ο υπολογισμός αυτός γίνεται γραφικά και οι καμπύλες βρίσκονται στο παράρτημα της εργασίας.

6.2.3.Αποτελέσματα

Όλα τα εκχυλίσματα που λάβαμε με τις παραπάνω τεχνικές επεβλήθησαν στο παραπάνω test, και τα αποτελέσματα που λάβαμε συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες:

ΦΡΕΣΚΑ ΦΥΛΛΑ

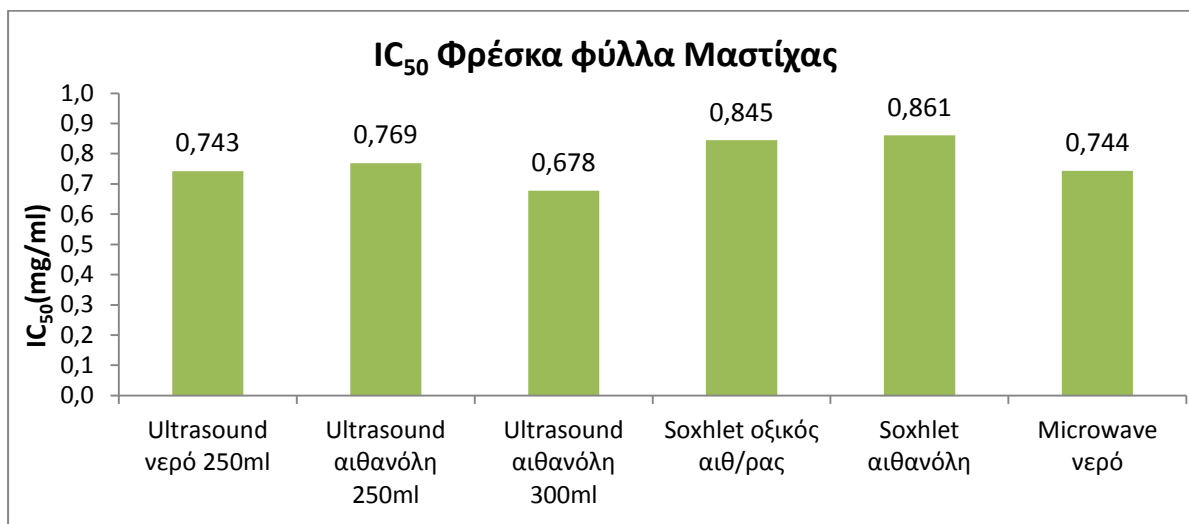
Πίνακας 20 Αποτελέσματα IC_{50} για τα εκχυλίσματα φρέσκων φύλλων

Κωδικός Δείγματος	Μέθοδος εκχύλισης	IC_{50} (mg/ml)
Ultrasound 1	Εκχύλιση με υπερήχους με νερό(250ml)	0,743
Ultrasound 4R	Εκχύλιση με υπερήχους με αιθανόλη (250ml)	0,769
Ultrasound 3R	Εκχύλιση με υπερήχους με αιθανόλη (300ml)	0,678
Soxhlet 8	Soxhlet εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα	0,845
Soxhlet 7	Soxhlet εκχύλιση με αιθανόλη	0,861
Microwave Fresh leaves	Εκχύλιση με μικροκύματα	0,744

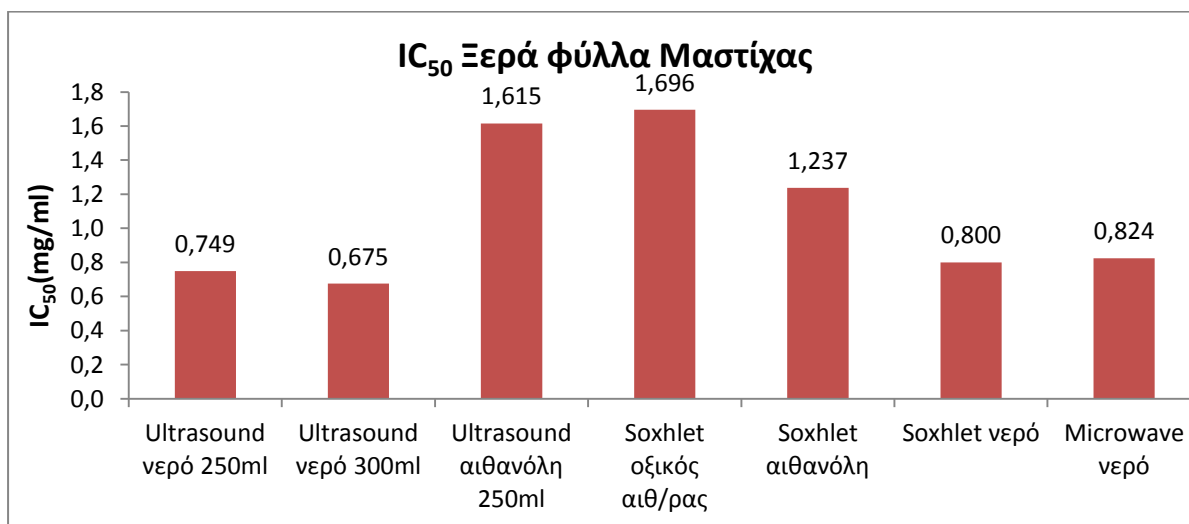
ΞΕΡΑ ΦΥΛΛΑ

Πίνακας 21 Αποτελέσματα IC_{50} για τα εκχυλίσματα των ξερών φύλλων

Κωδικός Δείγματος	Μέθοδος εκχύλισης	IC_{50} (mg/ml)
Ultrasound6R	Εκχύλιση με υπερήχους με νερό(250ml)	0,749
Ultrasound5R	Εκχύλιση με υπερήχους με νερό(300ml))	0,675
Ultrasound 8	Εκχύλιση με υπερήχους με αιθανόλη (250ml)	1,615
Soxhlet 4	Soxhlet εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα	1,696
Soxhlet 2	Soxhlet εκχύλιση με αιθανόλη	1,237
Soxhlet9R	Soxhlet εκχύλιση με νερό	0,800
Microwave F.D.	Εκχύλιση με μικροκύματα	0,824



Διάγραμμα 11 IC₅₀ φρέσκα φύλλα Μαστίχας



Διάγραμμα 12 IC₅₀ ξερά φύλλα Μαστίχας

Από τον παραπάνω πίνακα και το διάγραμμα προκύπτουν τα εξής για τα **φρέσκα φύλλα**:

- ✓ Τα φύλλα που εκχυλίστηκαν με υπέρηχους έχουν συντελεστές IC₅₀ αρκετά χαμηλούς σε σχέση με τα εκχυλίσματα στο σύνολο τους και συγκεκριμένα το υδατικό εκχύλισμα έχει IC₅₀ 0,743(mg/ml) ενώ το αντίστοιχα εκχύλισμα αιθανόλης έχει IC₅₀ 0,769(mg/ml). Αξιοσημείωτη είναι όμως η μείωση του δείκτη για το εκχύλισμα αιθανόλης σε μεγαλύτερη αραιώση (στα 300ml), φαίνεται πως μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης οδήγησε στην εκχύλιση περισσότερων αντιοξειδωτικών ουσιών από τα φρέσκα φύλλα.
- ✓ Τα φύλλα που εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Soxhlet είχαν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση με διαλύτη τον οξικό αιθυλεστέρα, καθώς το εκχύλισμα αυτό έχει IC₅₀ 0,845(mg/ml) ενώ το εκχύλισμα της αιθανόλης έχει IC₅₀ 0,861(mg/ml). Το εκχύλισμα με διαλύτη το εξάνιο δεν είχε καμία αντιοξειδωτική δράση.

- ✓ Τα εκχυλίσματα που λάβαμε με μικροκύματα είχαν ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση και το IC₅₀ υπολογίστηκε ίσο με 0,744(mg/ml).
- ✓ Συνολικά τον χαμηλότερο δείκτη IC₅₀ ,συνεπώς την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει το εκχύλισμα των υπερήχων με διαλύτη την αιθανόλη(300ml). Ακολουθούν το υδατικό εκχύλισμα υπερήχων και το υδατικό εκχύλισμα της εκχύλισης με μικροκύματα.

Ανάλογες παρατηρήσεις προκύπτουν από τον πίνακα και το διάγραμμα για τα **ξερά φύλλα**:

- ✓ Για τη μέθοδο υπερήχων είχαμε την καλύτερη δράση, άρα το χαμηλότερο δείκτη για τα υδατικά εκχυλίσματα. Για την εκχύλιση με 300ml νερού ο δείκτης IC₅₀ βρέθηκε 0,675(mg/ml), ενώ το εκχύλισμα με 250ml έχει IC₅₀ 0,749(mg/ml). Και πάλι η χρήση περισσότερου διαλύτη φαίνεται να επιδρά θετικά στην αντιοξειδωτική δράση. Το εκχύλισμα της αιθανόλης είχε συγκριτικά τη δεύτερη χαμηλότερη δράση με IC₅₀ 1,615(mg/ml).
- ✓ Για την εκχύλιση με τη μέθοδο Soxhlet τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση είχε το υδατικό εκχύλισμα με IC₅₀ 0,800(mg/ml). Τα εκχυλίσματα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα είχαν αυξημένους δείκτες (IC₅₀ 1,237 και 1,696(mg/ml) αντίστοιχα).
- ✓ Το εκχύλισμα με μικροκύματα είχε μέτρια δράση με IC₅₀ 0,824(mg/ml)
- ✓ Συνολικά την καλύτερη δράση είχε το υδατικό εκχύλισμα με υπερήχους και 300ml διαλύτη, ακολουθούν το υδατικό εκχύλισμα με 250ml διαλύτη και το υδατικό εκχύλισμα της μεθόδου Soxhlet. Ακόμη μέτρια δράση είχε και το υδατικό εκχύλισμα μικροκυμάτων. Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το νερό αποτελεί τον καλύτερο διαλύτη για τα φύλλα που είχαν υποστεί ξήρανση με κατάψυξη.

Η μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους αποτελεί μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο όχι μόνο ως προς την απόδοση της όπως είδαμε παραπάνω, αλλά και ως προς την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων της. Πολύ θετικό αποτέλεσμα αποτελεί η αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων που συνεπάγεται τη σύνδεση της μεθόδου με τον πλέον πράσινο διαλύτη-το νερό. Αξιόλογα αποτελέσματα είδαμε και για τα εκχυλίσματα της μεθόδου με μικροκύματα. Και αυτή η μέθοδος είχε εξαιρετικά υψηλές αποδόσεις αλλά και καλή αντιοξειδωτική δράση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΝΑΛΥΣΗ GCMS

7.1. Εξοπλισμός- Διαδικασία

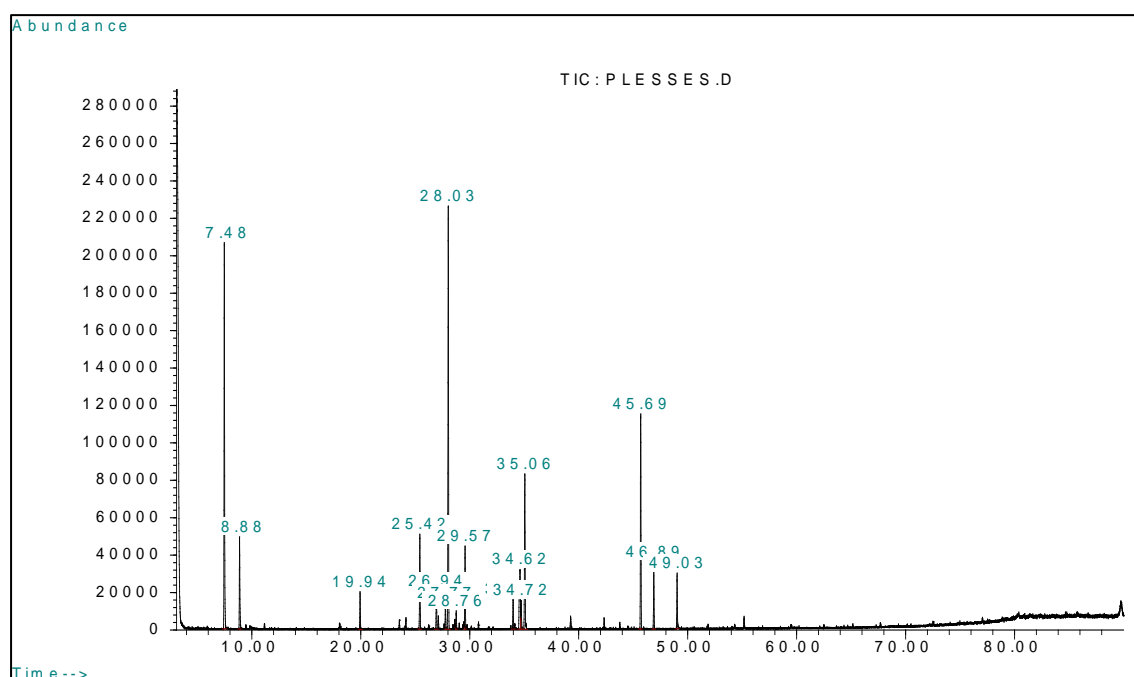
Η ανάλυση έγινε στη φαρμακευτική σχολή Αθηνών (τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών προϊόντων). Η χημική σύνθεση των εκχυλισμάτων αναλύθηκε με χρήση της τεχνικής αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Η ταυτοποίηση των συστατικών βασίστηκε στη σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με εκείνα της βιβλιοθήκης Wiley275. Το φασματόμετρο μάζας που χρησιμοποιείται για την ανάλυση GC-MS είναι ένα Hewlett-Packard (HP)5973. Είναι ένας επιλεκτικός ανιχνευτής μάζας στη λειτουργία ιονισμού EI(70 eV), διασυνδεδεμένος με ένα HP 6890 αέριο χρωματογράφο εξοπλισμένο με τριχοειδή στήλη HP-5 MS(30m x 0,25mm, πάχος φιλμ 0,25 μm). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται ήταν: από 60 ° C (για 5 λεπτά) στους 280 °C, με ρυθμό 3 °C / λεπτό, με θερμοκρασία έγχυσης 200 ° C. Ο ρυθμός ροής του φέροντος αερίου (ήλιο) ήταν 0,8 ml / λεπτό.^[103]

7.2. Αποτελέσματα ανά μέθοδο

Με την ανάλυση των εκχυλισμάτων, στόχος μας ήταν η καταγραφή των συστατικών που περιέχονται αρχικά στο αιθέριο έλαιο που παραλάβαμε από τα φύλλα της Μαστίχας Χίου και έπειτα η εξαγωγή συμπερασμάτων για τις ουσίες που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση τους, λαμβάνοντας υπόψιν μας και τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των φύλλων. Έτσι ακολουθούν παρακάτω τα χρωματογραφήματα που λάβαμε για το καθαρό αιθέριο έλαιο με υδροαπόσταξη. Ακόμη έγινε ανάλυση στα εκχυλίσματα εξανίου και οξικού αιθυλεστέρα με τη μέθοδο Soxhlet.

Στο παράρτημα υπάρχουν αναλυτικοί πίνακες όπως προέκυψαν από την σύγκριση με τη βιβλιοθήκη για όλα τα εκχυλίσματα που αναλύθηκαν.

7.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΜΕ ΥΔΡΟΑΠΟΣΤΑΞΗ



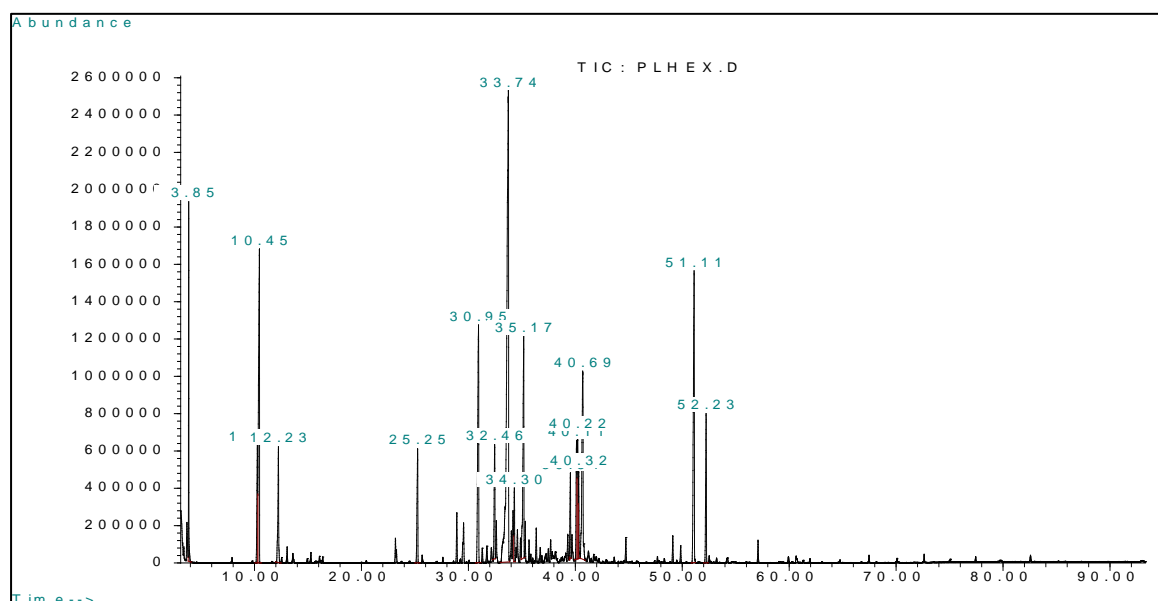
Σχήμα 6 Ανάλυση αιθέριου ελαίου, παραλαβή με υδροαπόσταξη

Η ανάλυση του αιθέριου ελαίου που παραλάβαμε με υδροαπόσταξη έδειξε σημαντικά συστατικά. Ανάμεσα στα συστατικά βρέθηκαν: **Μυρκένιο** σε ποσοστό 19,5%, **Λιμονένιο** σε ποσοστό 4,84%, **trans-καρνοφυλλένιο** σε ποσοστό 5,03%, **α-καρνοφυλλένιο** σε ποσοστό 1,91% **Γερμακρένιο-δ** σε ποσοστό 24,78%, **α-μυρολένιο** σε ποσοστό 0,88%, **δ-καδινένιο** σε ποσοστό 4,46%, **α-Κοπαένιο** σε ποσοστό 1,57% και **α-καδινόλη** σε ποσοστό 9,53%.

Μπορούμε να παρατηρήσουμε την ύπαρξη μονοτερπενίων όπως:

- ✓ το Μυρκένιο, χαρακτηριστικό συστατικό αιθέριων ελαίων φυτών όπως το θυμάρι, ο μαϊντανός, κ.α.^[105]
- ✓ το Λιμονένιο, το οποίο χρησιμοποιείται σαν διαλύτης σε προϊόντα καθαρισμού αλλά αποτελεί και κοινό συστατικό σε καλλυντικά προϊόντα. Είναι το κύριο συστατικό στο οποίο οφείλουν τη μυρωδιά τους τα εσπεριδοειδή, συνεπώς χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή τροφίμων και φαρμάκων (αρωματική ύλη για την κάλυψη της πικρής γεύσης των αλκαλοειδών και αρωματικό στην αρωματοποιία). Αποτελεί επίσης φυσικό εντομοκτόνο.^[106]
- ✓ το trans-καρνοφυλλένιο, σημαντικό συστατικό αιθέριων ελαίων από διάφορα είδη φυτών, το οποίο κατέχει πληθώρα φαρμακευτικών δράσεων (αντιφλεγμονώδη, κ.α.)^[107]
- ✓ το α-κοπαένιο, ελαιώδεις υγρός υδρογονάνθρακας που βρίσκεται σε μια σειρά φυτικών αιθέριων ελαίων.^[108]

ΥΔΡΟΑΠΟΣΤΑΞΗ ΦΥΛΛΩΝ –ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΜΕ ΕΞΑΝΙΟ



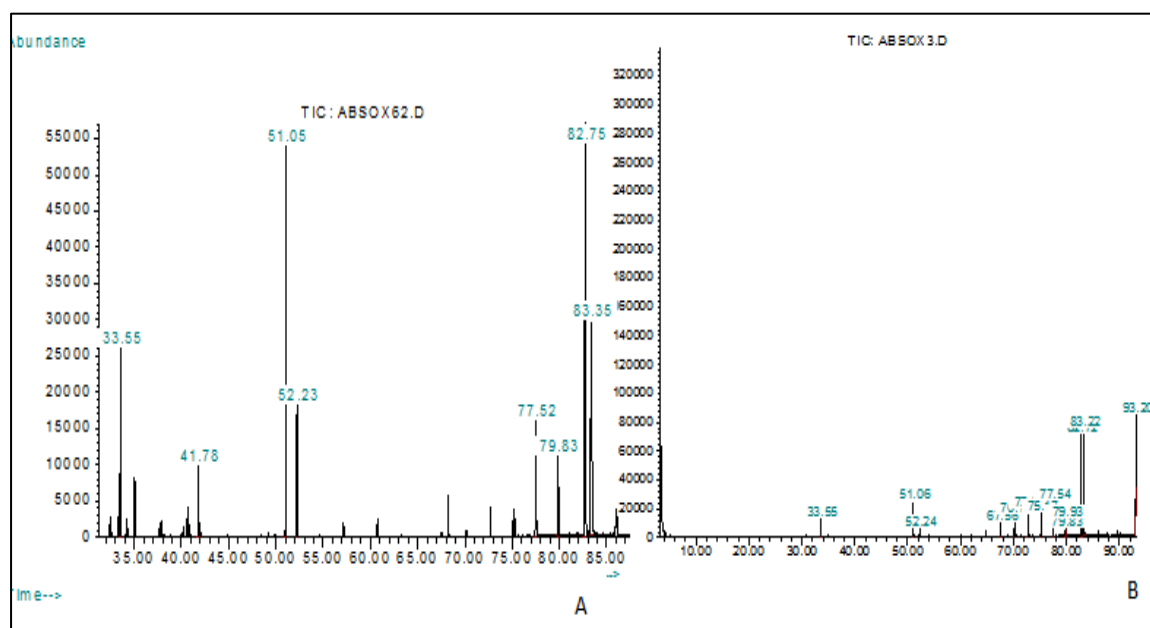
Σχήμα 7 Ανάλυση αιθέριου ελαίου-παραλαβή με εξάνιο

Μετά την παραλαβή του αιθέριου ελαίου με υδροαπόσταξη, έγινε παραλαβή της φάσης του και με διαλύτη το εξάνιο με απλή ανάμιξη. Σε αυτή την περίπτωση η ανάλυση του δείγματος με GCMS έδειξε ανάμεσα στα συστατικά: **Μυρκένιο** σε ποσοστό 11,3%, **Λιμονένιο** σε ποσοστό 2,51%, **β-καρνοφυλλένιο** σε ποσοστό 6,49%, **α-καρνοφυλλένιο** σε ποσοστό 2,62% **Γερμακρένιο-δ** σε ποσοστό 24,61%, **α-μυρολένιο** σε ποσοστό 1,38%, **δ-καδινένιο** σε ποσοστό 6,07%, **α-Κοπαένιο** σε ποσοστό 0,89% και **δ-καδινόλη** σε ποσοστό 2,68%.

Ακόμη βρέθηκαν αρωματοδενδρίνη, α - αμορφίνη, γ -καδινένιο, γερμακρένιο- β , κ.α. παρατηρούμε ότι οι συστάσεις των ουσιών που βρέθηκαν διαφοροποιούνται σε πολλές περιπτώσεις. Αξιόλογο όμως είναι ότι με χρήση εξανίου, ενός μη πολικού διαλύτη έχουμε παραλαβή ακόμη περισσότερων πτητικών συστατικών που στο καθαρό έλαιο δεν φάνηκαν.

7.2.2. ΜΕΘΟΔΟΣ SOXHLET-ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

ΕΚΧΥΛΙΣΗ SOXHLET ΜΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΕΞΑΝΙΟ



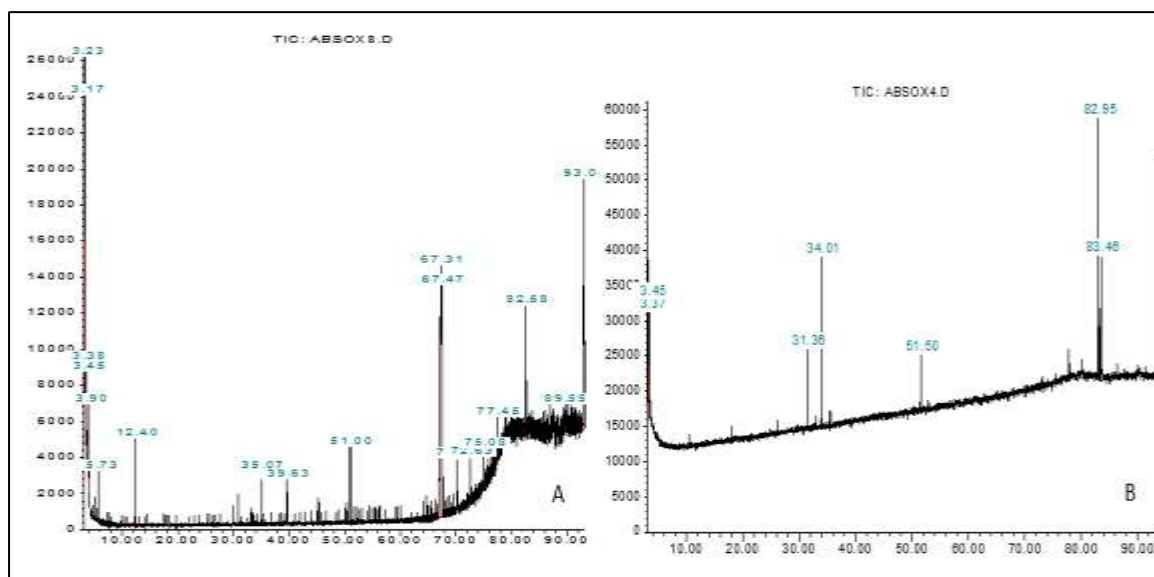
Σχήμα 8 Εκχύλιση Soxhlet με διαλύτη εξάνιο ,A: Φρέσκα φύλλα ,B: ξερά φύλλα

Όπως ήδη αναφέραμε η εκχύλιση Soxhlet με διαλύτη το εξάνιο παρουσίασε πολύ μικρές αποδόσεις, συγκεκριμένα η απόδοση για τα φρέσκα φύλλα δεν ξεπέρασε το 0,54% ενώ για τα ξερά το 1,92%. Ακόμη, τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση. Η ανάλυση GCMS όμως έδειξε πληθώρα συστατικών και για τα δύο είδη φύλλων, επιβεβαιώνοντας ότι τα εκχυλίσματα εξανίου είναι πλούσια σε άπολα πτητικά συστατικά που συναντώνται και στο αιθέριο έλαιο που λάβαμε με υδροαπόσταξη.

Για τα ξερά φύλλα (σχήμα 8B) βρέθηκαν: **Γερμακρένιο- δ** σε ποσοστό 2,32% και **Βιταμίνη E** σε ποσοστό 24,29%. Για τα φρέσκα φύλλα (σχήμα 8A), ανάμεσα στα συστατικά βρέθηκαν:

trans-καρυοφυλλένιο σε ποσοστό 2,03%, **Γερμακρένιο- δ** σε ποσοστό 6,45%, **α -αμορφίνη** σε ποσοστό 0,43%, **β - Γουαΐνη** σε ποσοστό 3,04% αλλά και **βιταμίνη E** σε ποσοστό 16,99%. Στα φρέσκα φύλλα είχαμε περισσότερα συστατικά, όμοια με συστατικά που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία για αιθέριο έλαιο φύλλων Μαστίχας από άλλες περιοχές^[104]. Σε αντίθεση, στα ξερά φύλλα είχαμε μεγαλύτερο ποσοστό βιταμίνης E.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ SOXHLET ΜΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΟΞΙΚΟ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ



Σχήμα 9 Εκχύλιση Soxhlet με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα, Α: Φρέσκα φύλλα, Β: ξερά φύλλα

Όπως φαίνεται από τα χρωματογραφήματα αλλά και από τους πίνακες 42-43 του παραρτήματος, για την ίδια μέθοδο εκχύλισης και τον ίδιο διαλύτη έχουμε σημαντικές διαφορές στα συστατικά που βρέθηκαν στα εκχυλίσματα των ξερών φύλλων, με αυτά των φρέσκων. Αν και στα ξερά φύλλα είχαμε λιγότερο από δέκα συστατικά, ανάμεσα τους υπάρχουν χαρακτηριστικά συστατικά για το άρωμα της Μαστίχας. Βρέθηκε **Γερμακρένιο-δ** σε ποσοστό 17,4%, **trans-καρνοφυλλένιο** σε ποσοστό 7,82% αλλά και **Βιταμίνη Ε** σε ποσοστό 23,91%, χαρακτηριστική για την αντιοξειδωτική δράση της. Αντίθετα, το εκχύλισμα των φρέσκων φύλλων είχε περισσότερα από τα διπλά συστατικά. Φαίνεται όμως πως δεν περιέχει καμία χαρακτηριστική ένωση, ούτε αρωματική αλλά ούτε σχετική με την αντιοξειδωτική δράση των φύλλων. Στα φρέσκα φύλλα είχαμε σε μεγαλύτερο ποσοστό Ναφθαλένιο (35,39%).

Ακόμη στο παράρτημα υπάρχουν τα χρωματογραφήματα για τη μέθοδο των υπερήχων με διαλύτη την αιθανόλη. Η εκχύλιση με υπερήχους με διαλύτη την αιθανόλη είχε ικανοποιητικά μεγάλες αποδόσεις για τα φρέσκα φύλλα (πάνω από 10%) και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων αυτών βρέθηκε καλύτερη από όλα τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν, για χρήση 300ml αιθανόλης (IC_{50} 0,678mg/ml). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης GCMS δείχνουν χαρακτηριστικές ενώσεις όπως **trans-καρνοφυλλένιο** σε ποσοστό 1,59%, **α-κοπαένιο** σε ποσοστό 0,63% και **Βιταμίνη Ε** σε ποσοστό 4,59%. Η αιθανόλη βέβαια είναι πολικός διαλύτης, είναι λοιπόν αναμενόμενο τα συστατικά που παραλάβαμε να είναι πιο πολικές ενώσεις και όχι τόσο πτητικά συστατικά.

Τέλος, στο παράρτημα υπάρχουν τα χρωματογραφήματα που λάβαμε από την εξέταση των δειγμάτων που λάβαμε μετά τον καθαρισμό της διάταξης της υπερκρίσιμης εκχύλισης με αιθανόλη. Για τα φρέσκα φύλλα τα οποία παρουσίασαν και τη μεγαλύτερη απόδοση συγκριτικά από όλες τις μεθόδους βρέθηκε **Βιταμίνη Ε** σε ποσοστό 74,24%, ενώ στα ξερά είχαμε ακόμη **Γερμακρένιο-δ**. Μπορούμε αμέσως να συμπεράνουμε ότι η αιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επόμενα βήματα της μελέτης σαν συνδιαλύτης στην εκχύλιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8.1.ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΕ ΚΑΤΑΨΥΞΗ

Η αποδοτικότητα της ξήρανσης υπό κατάψυξη έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 2.1.3, σελίδα 19. Τα φύλλα παρόλη την επεξεργασία στην οποία τα υποβάλλαμε έδειξαν αξιοσημείωτες αποδόσεις στις εκχυλίσσεις τους, αλλά και ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση για την εκχύλιση με υπερήχους αλλά και με μικροκύματα. Η κινητική της ξήρανσης αυτής έδειξε ότι η μεταβολή της υγρασίας είναι έντονη στην αρχή και στη συνέχεια ελαττώνεται έως ότου φτάσει σε πλατό. Η θεωρητική καμπύλη ξήρανσης που προσαρμόστηκε μας δείχνει ότι η ξήρανση ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Όπως φαίνεται όμως στο Διάγραμμα 1,σελίδα 54 μετά τα 150 λεπτά ξήρανσης υπάρχουν αποκλίσεις της πειραματικής από τη θεωρητική καμπύλη. Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το θεωρητικό μοντέλο για τις δεδομένες τιμές υγρασίας και χρόνου ακολουθείται μέχρι αυτό το χρονικό σημείο. Μετά από αυτή τη χρονική στιγμή, θα μπορούσε να γίνει χρήση κάποιου πολυπλοκότερου μοντέλου.

Στο εργαστήριο (Σχεδιασμού και ανάλυσης διεργασιών) έχουν γίνει ξηράνσεις ποικίλων φυτών για μελέτη ιδιοτήτων τους. Πρόσφατα (Μάρτιος 2012) έγινε ξήρανση με κατάψυξη φύλλων υποφαούς υποείδους *rhamnoides* από περιοχές της Σιβηρίας. Η ξήρανση τους έγινε ακριβώς με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για τα φύλλα του σχίνου της Μαστίχας^[109]. Η σύγκριση αυτή έδειξε ότι η κινητική της ξήρανσης των φύλλων αυτών είναι όμοια με την κινητική για τα φύλλα του σχίνου της Μαστίχας. Μάλιστα, αυτό επιβεβαιώνεται και από τη σταθερά της ξήρανσης η οποία είχε την ίδια τιμή για τα δύο είδη και όπως φαίνεται στον πίνακα 22 η τελική υγρασία που επιτεύχθηκε είναι κάτω από 3%, ξεπερνώντας έτσι το κατώτερο όριο για προστασία του δείγματος από διάφορες αλλοιώσεις. Ακόμη τα δείγματα δεν παρουσίασαν εμφανείς αλλαγές στη δομή τους. Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι η μέθοδος ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες που αναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία, όμως απαιτεί την προεπεξεργασία των φύλλων (κατάψυξη), ενώ το κόστος του εξοπλισμού και η ενέργεια που καταναλώνεται αποτελούν σημαντικές παραμέτρους.

Πίνακας 22 Σύγκριση σταθερών για ξήρανση με κατάψυξη φύλλων μαστίχας και φύλλων υποφαούς

	Μαστίχα Χίου	Ιπποφάες Σιβηρίας
$K (min^{-1})$	0,0090	0,0090
$X_e (kg \text{ νερού} / kg \text{ ξ. στ.})$	0,2731	0,0369
$X_o (kg \text{ νερού} / kg \text{ ξ. στ.})$	0,9841	1,8315
Τελική υγρασία (kg νερού/kg v.στ.)	2,7%	3,5%

8.2.ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ ΕΚΧΥΛΙΣΕΩΝ

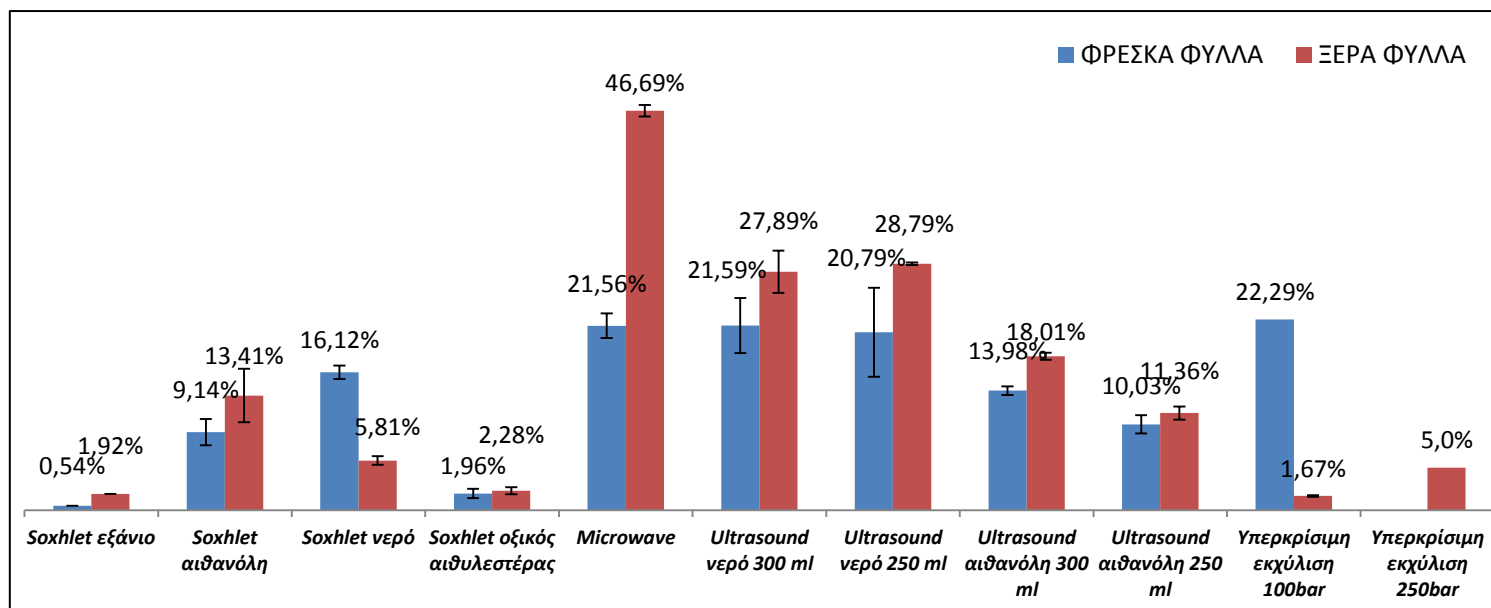
Συνολικά, μπορούμε να πούμε ότι οι αποδόσεις που καταγράφηκαν για τις μεθόδους ήταν αρκετά υψηλές. Από τις μεθόδους ξεχώρισαν η εκχύλιση με μικροκύματα και η Υπερκρίσιμη εκχύλιση, αποδεικνύοντας όσα αναφέρονται και στη βιβλιογραφία για τις μεθόδους αυτές.

Αναλυτικά:

- ✓ Για την εκχύλιση με τη μέθοδο Soxhlet, η απόδοση των φρέσκων φύλλων ήταν υψηλότερη όταν διαλύτης είναι το νερό, ενώ για τα ξερά καταγράψαμε καλύτερη απόδοση για διαλύτη την αιθανόλη.

- ✓ Για την εκχύλιση με μικροκύματα είχαμε τη μεγαλύτερη απόδοση για τα ξερά φύλλα.
- ✓ Στην εκχύλιση με υπερήχους οι μεγαλύτερες αποδόσεις μετρήθηκαν για τα υδατικά εκχυλίσματα.
- ✓ Τέλος, η Υπερκρίσιμη εκχύλιση είχε την καλύτερη απόδοση από όλες τις μεθόδους για τα φρέσκα φύλλα. Τα ξερά φύλλα βέβαια είχαν αποδόσεις συγκρίσιμες (και μεγαλύτερες από αυτές που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί όλες οι αποδόσεις μετρήθηκαν κατά βάρος, ενώ η αρχική υγρασία των φύλλων ήταν σχεδόν 50%.



Διάγραμμα 13 Αποδόσεις εκχυλίσεων για όλες τις μεθόδους

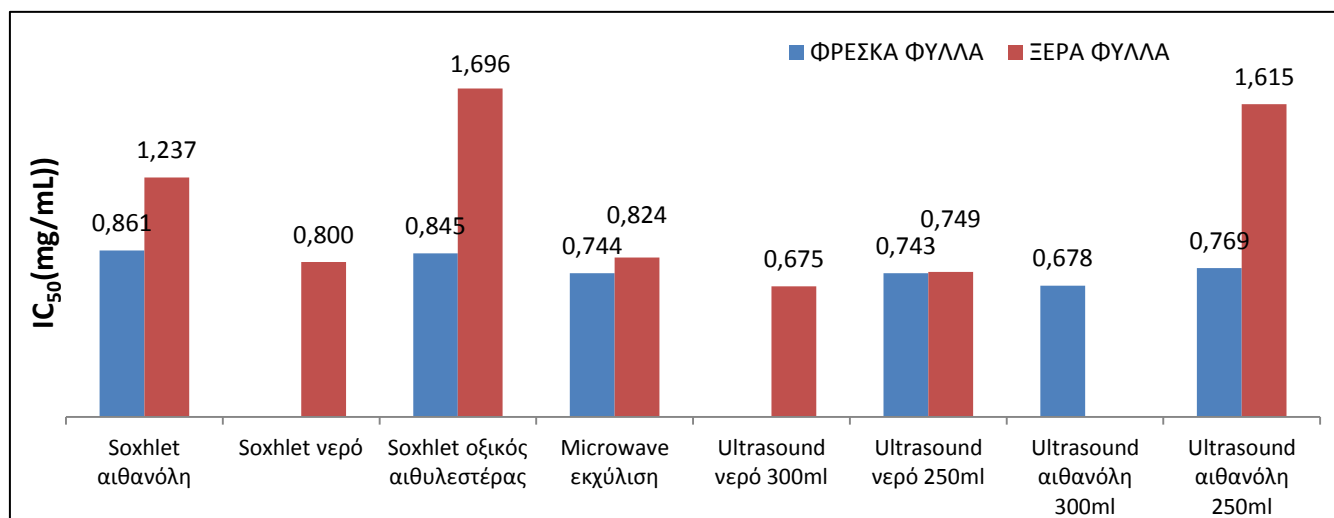
8.3.ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Ζητούμενο της εργασίας αποτελεί η διερεύνηση της συσχέτισης της μεθόδου εκχύλισης με την αντιοξειδωτική δράση που είχαν τα εκχυλίσματα των φύλλων. Συγκεκριμένα υπολογίστηκε ο δείκτης IC₅₀ για τα εκχυλίσματα μας.

Τα εκχυλίσματα με άπολους διαλύτες (εξάνιο και CO₂) καθώς και το αιθέριο έλαιο δεν είχαν αντιοξειδωτική δράση, καθώς ήταν πλούσια σε πτητικά συστατικά, χαρακτηριστικά για το είδος. Αντίθετα, όπως ήδη αναφέρθηκε οι πιο πολικοί διαλύτες που χρησιμοποιήσαμε (το νερό και η αιθανόλη) είχαν μεγάλες αποδόσεις καθώς απομάκρυναν τα πιο βαριά- πολικά συστατικά, όπως σάκχαρα και τανίνες. Για να θεωρηθεί ότι έχουμε το καλύτερο εκχύλισμα ως προς την αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή αναλογία σε αυτά. Οι τανίνες, οι οποίες σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση μπορεί σε μεγάλες ποσότητες να επιδράσουν αντίθετα σε αυτή (προκαλώντας οξειδωτικό στρες). Ακόμη, τα σάκχαρα μπορεί να παρεμποδίσουν τη δράση αν υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες. Επομένως θεωρείτε σκόπιμη η μελέτη της καλύτερης αναλογίας διαλύτη (ή μίγματος διαλυτών) ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη αναλογία σε τανίνες και σάκχαρα.

Αναλυτικά οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν:

- ✓ Για τη μέθοδο Soxhlet, τα υδατικά εκχυλίσματα είχαν το μικρότερο IC₅₀.
- ✓ Για τη μέθοδο εκχύλισης με μικροκύματα με διαλύτη το νερό, είχαμε χαμηλές τιμές IC₅₀ και καλύτερη δράση είχαν τα φρέσκα φύλλα.
- ✓ Για την εκχύλιση με υπερήχους, σημαντική είναι η μείωση στους δείκτες IC₅₀ με προσθήκη επιπλέον διαλύτη στην εκχύλιση. Μάλιστα τα ξερά φύλλα με διαλύτη το νερό (300ml) είχαν την καλύτερη δράση από όλα τα εκχυλίσματα μας. Ακολουθεί με μικρή διαφορά το εκχύλισμα της αιθανόλης(300ml) για φρέσκα φύλλα.



Διάγραμμα 14 δράση εκχυλισμάτων ανά μέθοδο εκχύλισης

8.4.ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΑΝΑ ΜΕΘΟΔΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Όπως είδαμε αναλυτικά, η σύσταση και η περιεκτικότητα σε συστατικά διαφέρει από μέθοδο σε μέθοδο. Μάλιστα, είχαμε διαφορές και ανάμεσα στα φρέσκα και τα ξερά φύλλα για την ίδια ακριβώς μέθοδο και τον ίδιο ακριβώς διαλύτη.

- ✓ Τα συστατικά του αιθέριου ελαίου που παραλάβαμε από τα φρέσκα φύλλα με υδροαπόσταξη είναι χαρακτηριστικά του είδους και όπως αναφέρθηκε σημαντικά πτητικά συστατικά που σχετίζονται με το άρωμα του. Η ανάμιξη του ελαίου με εξάνιο επέφερε αλλαγές στη σύσταση των συστατικών, αλλά και την εμφάνιση νέων πτητικών συστατικών.
- ✓ Τα εκχυλίσματα του εξανίου ήταν πλούσια σε πτητικές ενώσεις, κάποιες από τις οποίες είναι κοινές με αυτές του ελαίου. Η ανάλυση των εκχυλισμάτων αυτών αποτέλεσε τεκμηρίωση και για την χαμηλή αντιοξειδωτική δράση τους.
- ✓ Για την υπερκρίσιμη εκχύλιση, σκόπιμο θεωρείται μετά την ανάλυση των δειγμάτων του “καθαρισμού” με αιθανόλη, να χρησιμοποιηθεί η αιθανόλη σαν συνδιαλύτης, ενώ για τα καθαρά εκχυλίσματα μας θα πρέπει να γίνει ανάλυση με HPLC.
- ✓ Όμοια, και για τα υδατικά και εκχυλίσματα αιθανόλης των μικροκυμάτων και των υπερήχων θα πρέπει να γίνει ανάλυση HPLC για να έχουμε μια ξεκάθαρη εικόνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.ΕΠΙΛΟΓΟΣ

9.1.ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια πρώτη μελέτη του φυτού *Pistacia lentiscus var chia*. Η μελέτη αυτή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για νέα, βαθύτερη έρευνα και συγκεκριμένα μελλοντικοί στόχοι αποτελούν:

- ✓ Η ξήρανση των φύλλων με διαφορετικές μεθόδους, όπως ξήρανση σε ρεύμα αέρα και επιταχυνόμενη ηλιακή ξήρανση για σύγκριση της κινητικής των επιμέρους ξηράσεων
- ✓ Εκχύλιση των φύλλων υπό διαφορετικές συνθήκες για βελτιστοποίηση τους. Συγκεκριμένα για την εκχύλιση Soxhlet μπορεί να γίνει προσδιορισμός της κατάλληλης ποσότητας για κάθε διαλύτη ώστε να έχουμε μέγιστη ποσότητα και μέγιστη αντιοξειδωτική δράση. Ανάλογα μπορούμε να εργαστούμε και για την εκχύλιση με υπερήχους, για την οποία είχαμε ήδη κάποια πρώτα αποτελέσματα με την προσθήκη περισσότερου διαλύτη
- ✓ Για την εκχύλιση με μικροκύματα σε επόμενη φάση μπορεί να γίνει εκχύλιση με ταυτόχρονη απομάκρυνση του διαλύτη με τη συσκευή που διαθέτει το εργαστήριο Σχεδιασμού και ανάλυσης διεργασιών
- ✓ Για την Υπερκρίσιμη εκχύλιση προτείνεται η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου εκχύλισης, μέσω της επιλογής καλύτερων συνθηκών εκχύλισης στο SFE για περαιτέρω μείωση του χρόνου εκχύλισης (συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης).
- ✓ Ακόμη σκόπιμο θα ήταν να μελετηθεί η χρήση κάποιου συνδιαλύτη, π.χ. αιθανόλης για μείωση του χρόνου εκχύλισης και αύξηση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε πολικές ουσίες
- ✓ Σκόπιμο θα ήταν να γίνει προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου των εκχυλισμάτων που παραλάβαμε
- ✓ Θα μπορούσε να μελετηθεί η ποιότητα των εκχυλισμάτων για φύλλα που θα συλλεχθούν σε διαφορετική περίοδο συλλογής (για παράδειγμα άνοιξη)
- ✓ Τέλος, μπορεί να γίνει χρήση της μεθόδου HPLC για ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων και προσδιορισμό των πολικών συστατικών τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] **K. Vilku, R. Mawson, L. Simons, and D. Bates**, "Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 9, pp. 161-169, 4// 2008.
- [2] **C. Rodríguez-Pérez, R. Quirantes-Piné, N. Amessis-Ouchemoukh, K. Madani, A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutierrez**, "A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from Pistacia lentiscus leaves," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 77, pp. 167-174, 2013.
- [3] **M. Shop**. Available: <http://www.mastishop.com/default.php?pname=mastiha&la=1>
- [4] **E. Britannica**. Available: <http://www.britannica.com/>
- [5] **Ε. Σοφιανού**, "Η "κοσμοπολίτισσα" μαστίχα Χίου," 13 Ιουνίου 2009.
- [6] **R. S. Iauk L, Rapisarda A, Franco S, Nicolosi VM** " In vitro antimicrobial activity of Pistacia lentiscus L. extracts: Preliminary report. *J. Chemother.* 8 (3): 207-209.," 1996.
- [7] **D. Palevitch and Z. Yaniv**, "Medicinal Plants of the Holy Land. Modan Publishing House, Tel Aviv, Israel. In Ljubuncic et al. (eds) The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of Pistacia lentiscus in experimental liver disease. ," *J. Ethnopharmacol* pp. 198–204., 2000.
- [8] **R. Y. Bentley and H. Trimen**, "Medicinal plants. In Gardeli et al. (eds) Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. ," *Food Chem.* pp. 1-11., 1980.
- [9] **L. Bonsignore, F. Cottiglia, and G. Loy**, "Antibacterial activity of Pistacia lentiscus aerial parts.," *Fitoterapia*. LXIX (6): 537-538., 1998.
- [10] **C. C. Tassou and G. J. E. Nychas**, "Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (Pistacia lentiscus var.chia) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. ," *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 411-420., 1995.
- [11] **S. C. Kordali, A.; Zengin, H.; Duru, M. E.** , "Antifungal activities of the leaves of three Pistacia species grown in Turkey. *Fitoterapia* 2003, 74, 164-167.," 2003.
- [12] **P. Magiatis, E. Melliou, A.-L. Skaltsounis, I. B. Chinou, and S. Mitaku**, "Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Pistacia lentiscus var. chia," *Planta Med*, vol. 65, pp. 749-752, // 04.01.2007 1999.
- [13] **M. C. Baratto, M. Tattini, C. Galardi, P. Pinelli, A. Romani, F. Visioli, et al.**, "Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from Pistacia lentiscus leaves. *Free Rad. Res.* 37(4): 405- 412.," 2003.
- [14] **C. Gardeli, V. Papageorgiou, A. Mallouchos, K. Theodosis, and M. Komaitis**, "Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem.* pp. 1-11.," 2007.
- [15] **A. Abdelwahed, I. Bouhlef, I. Skandrani, K. Valenti, M. Kadri, P. Guiraud, et al.**, "Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4, 6-pentagalloylglucose from Pistacia lentiscus Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions* 165: 1–13.," 2007.
- [16] **K. V. Balan, J. Prince, Z. Han, K. Dimas, M. Cladaras, G. H. Wyche, et al.**, "Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from Pistacia lentiscus L. var. chia. *PhytoMed* 14: 263–272.," 2007.
- [17] **A. Delazar, R. G. Reid, and S. D. Sarker**, "GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of Pistacia atlantica var. Mutica. *Chem. Nat. Compd.* 40 (1): 24-27.," 2004.
- [18] **Ζ. Μαρουλής, Ι. Ζιώμας, and Μ. Κροκίδα**. 2011. <http://www.chemeng.ntua.gr/courses/trbio/files/KEF9%20%20Drying.pdf>, 2012
- [19] **Ε. Σ. Α. ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**, "Εργαστηριακός Οδηγός, Μηχανική Φυσικών Διεργασιών 1&2," ed: ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ, ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ, 2010.

- [20] **Π. Ταούκης and Β. Ωραιοπούλου**, ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΑΡΑΔΟΣΕΙΣ.: ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΕΜΠ2009.
- [21] **Π. Μαύρος**, http://www.eng.auth.gr/~chemtech/foititika/fd/mavros/ch12_liofiliosi_a4.pdf
- [22] **G. V. Barbosa-Canovas and H. Vega-Mercado**, Dehydration of Foods. New York, USA: International Thomson Publishing (ITP), 1996.
- [23] **L. G. Marques and J. T. Freire**, "Analysis of freeze-drying of tropical fruits," *Drying Technology: An International Journal*, vol. 23, pp. 2169 - 2184, 2005.
- [24] **Y. Wang, M. Zhang, and A. S. Mujumdar**, "Trends in processing technologies for dried aquatic products," *Drying Technology*, vol. 29, pp. 382-394, 2012/12/11 2011.
- [25] **M. K. Krokida, V. T. Karathanos, and Z. B. Maroulis**, "Effect of freeze-drying conditions on shrinkage and porosity of dehydrated agricultural products," *Journal of Food Engineering*, vol. 35, pp. 369-380, 1998.
- [26] **Y. H. Roos**, *Phase Transitions in Foods*, 1st ed. London, UK: Academic Press, 1995.
- [27] **G. R. Huber**, "Twin-Screw Extruders," in *Extruders in Food Applications*, P. T. P. Co., Ed., ed Lancaster, 2000.
- [28] **Μ. Κροκίδα**, "Επίδραση της μεθόδου ξήρανσης στις ιδιότητες των αφυδατωμένων προϊόντων," *Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα*, 1999.
- [29] **C. Ratti**, "Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review," *Journal of Food Engineering*, vol. 49, pp. 311-319, 2001.
- [30] **V. P. Oikonomopoulou, M. K. Krokida, and V. T. Karathanos**, "Structural properties of freeze-dried rice," *Journal of Food Engineering*, vol. 107, pp. 326-333, 2011.
- [31] **X. Duan, M. Zhang, A. S. Mujumdar, and R. Wang**, "Trends in microwave-assisted freeze drying of foods," *Drying Technology*, vol. 28, pp. 444-453, 2012/07/24 2010.
- [32] **Ε. Μπακέα and Κ. Ευσταθίου**, ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΥΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, 2008.
- [33] "F. Soxhlet, *Dinglers' Polyt.* 232 461.," 1879.
- [34] L. d. C. M. D. and P.-C. F., "Soxhlet extraction: Past and present panacea," *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, pp. 2383-2389, 4/16/ 2010.
- [35] U. E. M. 8100, "US Government Printing Office, Washington, DC, USA.," 1986.
- [36] U. E. M. 3540, "US Government Printing Office, Washington, DC, USA.," 1995.
- [37] A. M. 963.15, "Association of Official Analytical Chemists, USA.," 1990.
- [38] B. P. British Standard, 8 pp., 1991.
- [39] I. O. f. S. ISO 659-1988 (E), 1988.
- [40] W. G. Jennings, "J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 2 221.," 1979.
- [41] **J. L. Bernal, M. J. Nozal, and J. J. Jiménez**, "Chromatographia 34 468.," 1992.
- [42] **M. Nilsson**, "In Focus 11 20.," 1988.
- [43] **M. D. Luque de Castro and F. Priego-Capote**, "Analytical Applications of Ultrasound " Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [44] **J. L. Luque García and M. D. Luque de Castro**, "J. Chromatogr. A 1034 237.," 2004.
- [45] T. S. Ballard, P. Mallikarjunan, K. Zhou, and S. O'Keefe, "Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins," *Food Chemistry*, vol. 120, pp. 1185-1192, 6/15/ 2010.
- [46] **E. Nkhili, V. Tomao, H. El Hajji, E.-S. El Boustani**, F. Chemat, and O. Dangles, "Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols," *Phytochemical Analysis*, vol. 20, pp. 408-415, 2009.
- [47] **M. E. Lucchesi, F. Chemat, and J. Smadja**, "Solvent free microwave extraction of essential oils from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation.," *J Chromatogr A* 1043: 323-327., 2004.
- [48] **J. Y. Hao, W. Han, S. D. Huang, B. Y. Xue, and X. Deng**, "Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. ," *Sep Purif Technol* 28: 191-196., 2002.
- [49] **A. Gulati, R. Rawat, B. Singh, and S. D. Ravindranath**, "Application of microwave energy in the manufacture of enhanced-quality green tea. ," *J Agric Food Chem* 51: 4764-4768., 2003.

- [50] **T. Sultana, G. Stecher, R. Mayer, L. Trojer, M. N. Qureshi, G. Abel, et al.**, "Quality assessment and quantitative analysis of flavonoids from tea samples of different origins by HPLC-DAD-ESI-MS.," *J Agric Food Chem* 56: 3444–3453., 2008.
- [51] **L. Vidal, C. E. Domini, N. Grane, E. Psillakis, and A. Canals**, "Microwave-assisted headspace single-drop microextraction of chlorobenzenes from water samples. *Anal Chim Acta* 592: 9–15., 2007.
- [52] **A. A. Craveiro, F. J. A. Matos, and J. W. Alencar**, "Microwave oven extraction of an essential oil.," *Flavour and Fragrance Journal* 4: 43–44., 1989.
- [53] **G. J. Collin, D. Lord, J. Allaire, and Gagnon**, "Parfums, Cosmet., Aromes, 97, 105 (1991)."
- [54] <http://www.chemist.gr>. Available: <http://www.chemist.gr/2011/01/4606/>
- [55] **D. Knorr**, "Impact of non-thermal processing on plant metabolites. *Journal of Food Engineering*, 56, 131–134., 2003.
- [56] **R. Zhang, Y. Xu, and Y. Shi**, "The extracting technology of flavonoids compounds. *Food and Machinery*, 1, 21–22., 2003.
- [57] **M. Vinatoru**, "An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303–313., 2001.
- [58] **J. Jian-Bing, L. Xiang-hong, C. Mei-qiang, and X. Zhi-chao**, "Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound.," *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 455–462., 2006.
- [59] **E. Βουτσάς and K. Μαγουλάς**, ΕΙΔΙΚΑ ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ: ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ, 2003.
- [60] **Χ. Περάκης**, "Διερεύνηση της επίδρασης των δεσμών υδρογόνου στη διαλυτότητα οργανικών ουσιών σε Υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα παρουσία συνδιαλυτών.," Διδακτορική Διατριβή, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινόμενα Μεταφοράς., Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2007.
- [61] **Λούλη. Β.**, "Ανάπτυξη της τεχνικής της Υπερκρίσιμης εκχύλισης και εφαρμογές της στην ανάκτηση φυσικών προϊόντων.," Διδακτορική Διατριβή, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2004.
- [62] **Zosel K.** Process for recovering caffeine. (1974) US Patent 3, 619.
- [63] **K. Zosel**, "Process for recovering caffeine. US Patent 3, 806, 619.," 1974.
- [64] **O. Vitzthum and P. Hubert**, "Method for the manufacture of caffeine free black tea.," US Patent 4,167,589., 1979.
- [65] **I. K. Irina**, "New methods for the screening of antioxidants in three Sideritis species. Wageningen University. Thesis.," 2007.
- [66] **P. Coutisikos, K. Magoulas, and D. Tassios**, "Solubilities of Phenols in Supercritical Carbon Dioxide.," *J. Chem. Eng. Data*, 40, 953-958., 1995.
- [67] **R. M. Lemert and K. P. Johnston**, "Chemical Complexing Agents for Enhanced Solubilities in Supercritical Fluid Carbon Dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 30, 1222-1231.," 1991.
- [68] **Σ. ΣΑΜΨΩΝ**, "ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΡΟΥΤΩΝ ΚΑΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ," ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ, ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ, 2012.
- [69] **G. ÖZEK, F. DEMIRCI, T. ÖZEK, N. TABANCA, E. WEDGE D., S. I. KHAN, et al.**, "Gas chromatographic - mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm. and evaluation for biological activity.," *Journal of Chromatography A*, 1217: 741 - 748 2010.
- [70] **D. ATOFANI, M.-M. ZAMFIRACHE, A.-R. ANDRO, I. BOZ, M. COISIN, and C. PĂDURARIU**, "IMPROVED TECHNIQUES FOR OBTAINING VOLATILE OILS CONCERNING THEIR QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYSIS FROM LAMIACEAE TAXONS," 2010.
- [71] **F. Sáez, and e. Stahl-Biskup**, "Essential oil polymorphism in the genus *Thymus*, In: *Thyme: The genus Thymus* (eds. e. Stahl-Biskup and F. Sáez), 124-143. Taylor and Francis, London and New York.," 2002.

- [72]**C. a. Kaufmann**, "Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction," 2002.
- [73]**L. Wang and C. L. Weller**, "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends Food Sci Technol 17: 300–312.," 2006.
- [74]**I. S. Young and J. V. Woodside**, "Antioxidants in health and disease. ," Journal of Clinical Pathology, 54, 176 –186, 2001.
- [75]**B. N. Ames, M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen**, "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90, 7915 – 7922," 1990.
- [76]**C. Swanson**, "Vegetables, Fruits, and Cancer Risk: The Role of Phytochemicals. ," In W. R. Bidlack, S. T. Omaye, M. S. Meskin, & D. Jahmer (Eds.), Phytochemicals: A New Paradigm (pp. 1–12). Lancaster, PA: Technomic Publishing., 1998.
- [77]**Δ. Μπόσκου**, "Χημεία τροφίμων, Ε' έκδοση. Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Γαρταγάνη.," 2004.
- [78]**Δ. Γαλάρης and Π. Δούλιας**, Βιολογικά αντιοξειδωτικά. Χημικά Χρονικά. 2: 49 -50, 2001.
- [79]**J. A. Vinson, J. Hao, X. Su, and Z. L.**, "Phenol Antioxidant Quantity And Quality In Foods: Vegetables. ," J.Agric. Food Chem. 46, 3630-3634, 1998.
- [80]**D. C. Boskou**, "Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. ," Nutr. Reviews 56(11): 317-333, 1999.
- [81]**W. Zheng and W. S.Y.**, "Antioxidant activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. ," Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 49, Pages 5165-5170, 2001.
- [82]**K. A. Κυριτσάκης**, "Ελαιόλαδο Συμβατικό και Βιολογικό, Βρώσιμη Ελιά και Πάστα Ελιάς, Θεσσαλονίκη," 2007.
- [83]**B. Biljana, M.-D. Neda, S. Natasa, and A. Goran**, "Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils. ," Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 54, Pages 1822-1828, 2006.
- [84]Ξ. Α., "Συσχέτιση διατροφικής πρόσληψης αντιοξειδωτικών με δείκτες θρόμβωσης, φλεγμονής και λιπιδαιμικού προφίλ ανδρών και γυναικών από τη μελέτη ΑΤΤΙΚΗ," ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 2006.
- [85]**J. L. Groff and S. S. Gropper**, "Advanced Nutrition and Human Metabolism. Wadsworth Thompson Learning.," 2000.
- [86]**D. Boskou**, "OLIVE OIL: Chemistry and Technology. USA; AOCS Press. 71 - 75," 1996.
- [87]**A. L. Matala, A. Zampelas, V. Stavrinis, and W. I.**, "The Mediterranean Diet: Constituents and Health promotion. USA, CRC Press. 59 - 60," 2001.
- [88]**H. J. Weisburger**, "Prevention of cancer and other chronic diseases worldwide based on sound mechanisms. ," BioFactors (Oxford, England). 12 (1 - 4): 73 - 81, 2000.
- [89]**L. M. Hung, J. K. Chen, R. S. Lee, H. C. Liang, and S. M.J.**, "Beneficial effects of astringinin, a resveratrol analogue, on the ischemia and reperfusion damage in rat heart. ," Free Radical Biology & Medicine. 30 (8): 877 - 883, 2001.
- [90]**M. Antolovich, D. Paul, Prenzler, E. Patsalides, S. Mc Donald, and R. Kevin**, "Methods for testing antioxidant activity. ," The Analyst, Volume 127, Pages 183 – 198, 2002.
- [91]**G. Buettner**, "The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. ," Arch Biochemistry Biophys. 300:535-34, 1993.
- [92]**H. J. Weisburger, R. J. Hosey, E. Larios, B. Pittman, E. Zang, Y. Hara, et al.**, "Investigation of Commercial MitoLife as an Antioxidant and Antimutagen. ," Nutrition. 17: 322 - 325, 2001.
- [93]**M. Abdulla and P. Gruber**, "Role of diet modification in cancer prevention. ," BioFactors (Oxford, England). 12 (1–4): 45 - 51, 2000.
- [94]**C. S. Yang, J. M. Landau, M. T. Huang, and N. H. L.**, "Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. ," Annual Reviews of Nutrition. 21: 381 - 406, 2001.
- [95]**M. Colic and K. Pavelic**, "Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. ," J Mol Med. 78: 333 – 336, 2000.

- [96] **E. Naciye, A. Guler, and A. Erol**, "Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol.," *Food Chemistry*, Volume 110, Pages 76– 82, 2008.
- [97] **K. Miura, H. Kikuzaki, and N. Nakatani**, "Antioxidant Activity of Chemical Components from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Measured by the Oil Stability Index Method.," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 50, Pages 1845-1851, 2002.
- [98] **D. Huang, O. Boxin, and L. Ronald**, "The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. ," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 53, Pages 1841-1856, 2005.
- [99] **D. Vessela, Kancheva, V. Petya, Boranova, T. Jordan, Nechev, et al.**, "Structure–activity relationships of new 4-hydroxy bis-coumarins as radical scavengers and chain-breaking antioxidants. ," *Biochimie*, Volume 92, Issue 9, Pages 1138-1146, 2010.
- [100] **Π. Αθηνά**, "ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ," ed ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ: ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ.
- [101] **Ε. Ο. Χημείας. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ 'ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ-Ι'**. Available: http://www.chem.auth.gr/content/organic_lab/CHEM/EXTRACT.pdf
- [102] **Γ. Παπαευσταθίου**, "Εφαρμογή 'πράσινων' τεχνολογιών φυλικών προς το περιβάλλον για την παραγωγή εκχυλισμάτων απο το φυτό *Sideritis raeseri* ssp. *attica*," Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Φαρμακευτική Σχολή Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων
- [103] **N. Aligiannis, E. Kalpoutzakis, I. B. Chinou, S. Mitakou, E. Gikas, and A. Tzarbopoulos**, "Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Five Taxa of *Sideritis* from Greece," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, pp. 811-815, 2001/02/01 2001.
- [104] **R. Congiu, D. Falconieri, B. Marongiu, A. Piras, and S. Porcedda**, "Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO₂," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 17, pp. 239-244, 2002.
- [105] **A. Orav, T. Kailas, and A. Jegorova**, "Composition of the essential oil of dill, celery, and parsley from Estonia/Eestis kasvatatud tilli, selleri ja peterselli eeterliku oli koostis.," *Estonian Academy Publishers*, 2003.
- [106] **U. S. E. P. Agency**. (September 1994). Available: <http://www.epa.gov>
- [107] **L. Pinho-da-Silva, P. V. Mendes-Maia, T. M. Teófilo, R. Barbosa, V. M. Ceccatto, A. N. Coelho-de-Souza, et al.**, "trans-Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Causes Tracheal Smooth Muscle Relaxation through Blockade of Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels," *Molecules*, vol. 17, pp. 11965-11977, 2012.
- [108] **V. H. Kapadia, B. A. Nagasampagi, V. G. Naik, and S. Dev**, "Structure of mustakone and copaene," *Tetrahedron Letters*, vol. 4, pp. 1933-1939, // 1963.
- [109] **K. Kyriakopoulou, A. Pappa, M. Krokida, A. Detsi, and P. Kefalas**, "Effects of Drying and Extraction Methods on the Quality and Antioxidant Activity of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Berries and Leaves," *Drying Technology*, vol. 31, pp. 1063-1076, 2013/07/04 2013.

11.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IC₅₀- ΠΙΝΑΚΕΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ-ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

11.2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ SOXHLET

Πίνακας 24 μέθοδος Soxhlet εκχύλιση φρέσκα φύλλα αιθανόλη

Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση(mg/mL)
<i>Blank</i>	1,8754667			
Soxhlet7 C1	0,1515667	91,92	0,0028	4
Soxhlet7 C2	0,2188000	88,33	0,0409	2
Soxhlet7 C3	0,8051667	57,07	0,0223	1
Soxhlet7 C4	1,2844667	31,51	0,0194	0,5
Soxhlet7 C5	1,5526333	17,21	0,0260	0,25
Soxhlet7 C6	1,6952667	9,61	0,0117	0,125
IC50	0,861			

Πίνακας 25 μέθοδος Soxhlet εκχύλιση ξερά φύλλα αιθανόλη

Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
<i>Blank</i>	1,9216667			
Soxhlet2 C1	0,1639000	91,47	0,0020	4
Soxhlet2 C2	0,4121333	78,55	0,0186	2
Soxhlet2 C3	1,0971667	42,91	0,0131	1
Soxhlet2 C4	1,4847667	22,74	0,0405	0,5
Soxhlet2 C5	1,7439667	9,25	0,0168	0,25
Soxhlet2 C6	1,7874000	6,99	0,0067	0,125
IC50	1,237			

Πίνακας 26 μέθοδος Soxhlet εκχύλιση φρέσκα φύλλα οξικός αιθυλεστέρας

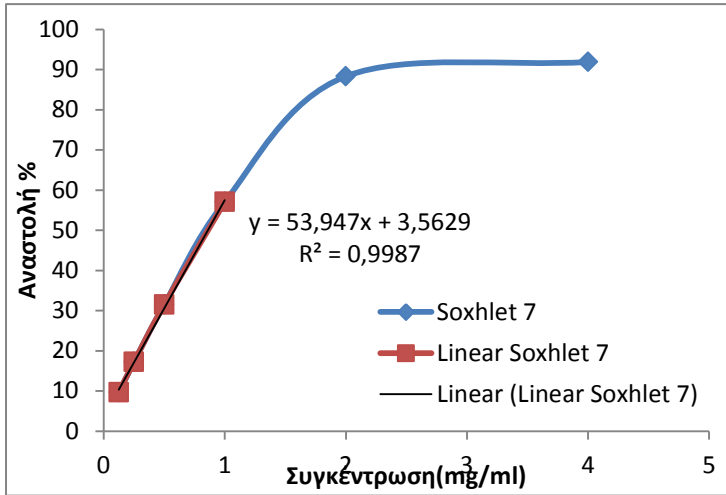
Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
<i>Blank</i>	1,8754667			
Soxhlet8 C1	0,1546333	91,75	0,0012	4
Soxhlet8 C2	0,1844000	90,17	0,0206	2
Soxhlet8 C3	0,7933000	57,70	0,0563	1
Soxhlet8 C4	1,2472000	33,50	0,0073	0,5
Soxhlet8 C5	1,5762000	15,96	0,0130	0,25
Soxhlet8 C6	1,6606667	11,45	0,0347	0,125
IC50	0,845			

Πίνακας 27 μέθοδος Soxhlet εκχύλισμα ξερά οξικός αιθυλεστέρας

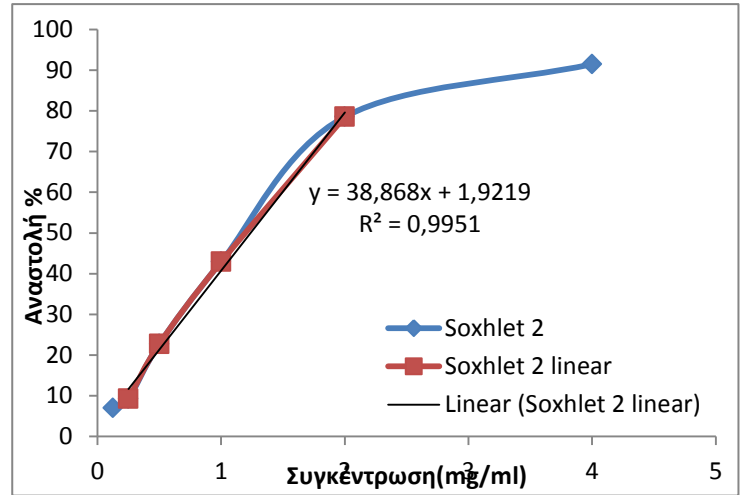
Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,8857667			
Soxhlet4 C1	0,2110000	88,81	0,0108	4
Soxhlet4 C2	0,8042667	57,35	0,0564	2
Soxhlet4 C3	1,2574333	33,32	0,0376	1
Soxhlet4 C4	1,5812667	16,15	0,0258	0,5
Soxhlet4 C5	1,7364000	7,92	0,0210	0,25
Soxhlet4 C6	1,7512000	7,14	0,1254	0,125
IC50	1,696			

Πίνακας 28 μέθοδος Soxhlet εκχύλισμα ξερά νερό

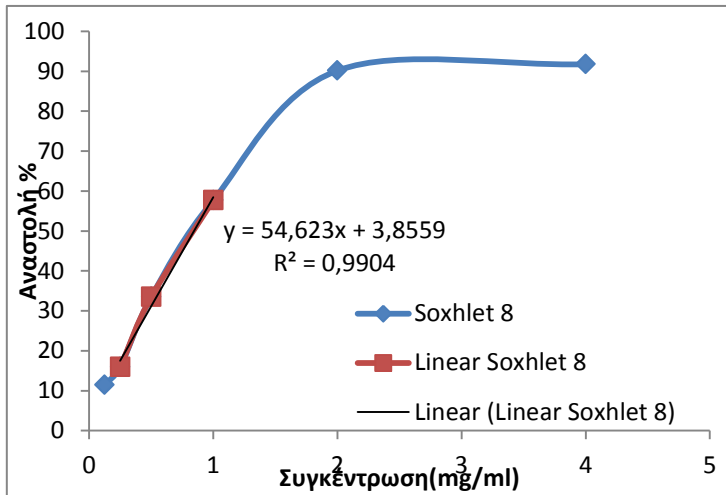
Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,8754667			
Soxhlet9R C1	0,1894333	89,90	0,0027	4
Soxhlet9R C2	0,2123333	88,68	0,0136	2
Soxhlet9R C3	0,7298333	61,09	0,0272	1
Soxhlet9R C4	1,2461333	33,56	0,0299	0,5
Soxhlet9R C5	1,5188000	19,02	0,0209	0,25
Soxhlet9R C6	1,5940667	15,00	0,1442	0,125
IC50	0,800			



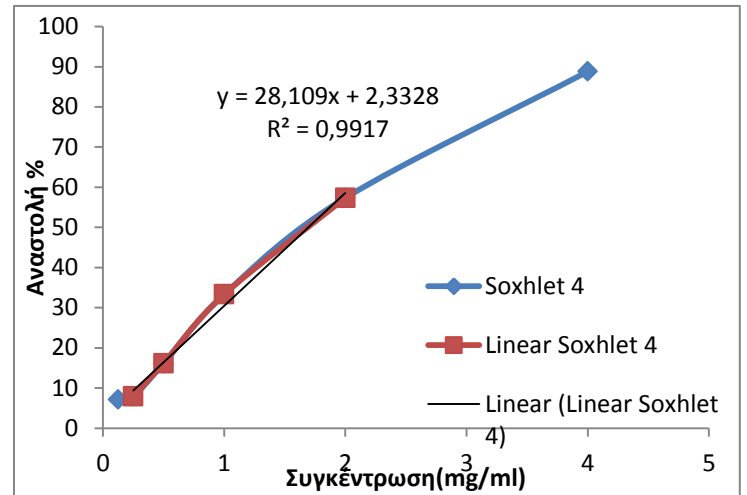
Διάγραμμα 17 Soxhlet φρέσκα φύλλα αιθανόλη



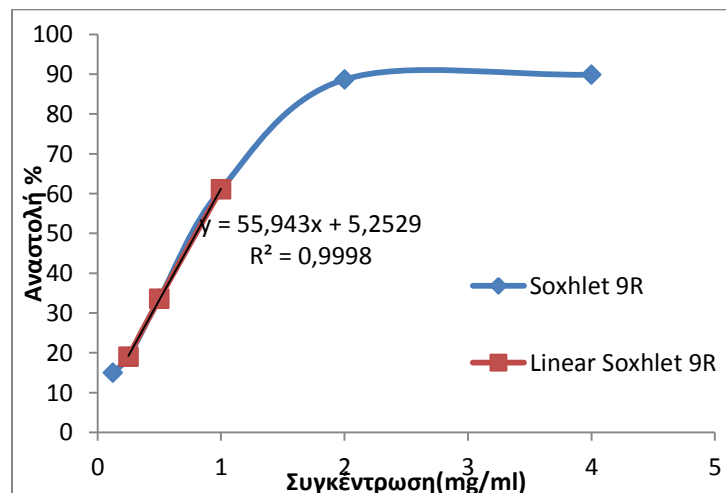
Διάγραμμα 18 Soxhlet ξερά φύλλα αιθανόλη



Διάγραμμα 16 Soxhlet φρέσκα φύλλα οξικός αιθυλεστέρας



Διάγραμμα 15 Soxhlet ξερά φύλλα οξικός αιθυλεστέρας



Διάγραμμα 19 Soxhlet ξερά φύλλα νερό

11.2.2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ULTRASOUND

Πίνακας 29 μέθοδος ultrasound ξερά φύλλα 300ml νερό

Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,8754667			
Ultrasound5R C1	0,1893333	89,90	0,0132	4
Ultrasound5R C2	0,1726333	90,80	0,0149	2
Ultrasound5R C3	0,5673333	69,75	0,0755	1
Ultrasound5R C4	1,0958333	41,57	0,0180	0,5
Ultrasound5R C5	1,4461667	22,89	0,0247	0,25
Ultrasound5R C6	1,6459667	12,24	0,0421	0,125
IC50	0,675			

Πίνακας 30 μέθοδος ultrasound φρέσκα φύλλα 250ml νερό

Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,9216667			
Ult1,2 C1	0,1551333	91,93	0,0082	4
Ult1,2 C2	0,1779000	90,74	0,0081	2
Ult1,2C3	0,6783000	64,70	0,0056	1
Ult1,2C4	1,1845333	38,36	0,0025	0,5
Ult1,2C5	1,5558667	19,04	0,0096	0,25
Ult1,2C6	1,7658000	8,11	0,0044	0,125
IC50	0,743			

Πίνακας 31 μέθοδος ultrasound ξερά φύλλα 250ml νερό

Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,8754667			
Ultrasound6R C1	0,1773667	90,54	0,1774	4
Ultrasound6R C2	0,1955000	89,58	0,1955	2
Ultrasound6RC3	0,6763000	63,94	0,6763	1
Ultrasound6RC4	1,1760333	37,29	1,1760	0,5
Ultrasound6RC5	1,5005667	19,99	1,5006	0,25
Ultrasound6R C6	1,5993000	14,73	1,5993	0,125
IC50	0,749			

Πίνακας 32 μέθοδος ultrasound φρέσκα φύλλα αιθανόλη 300ml

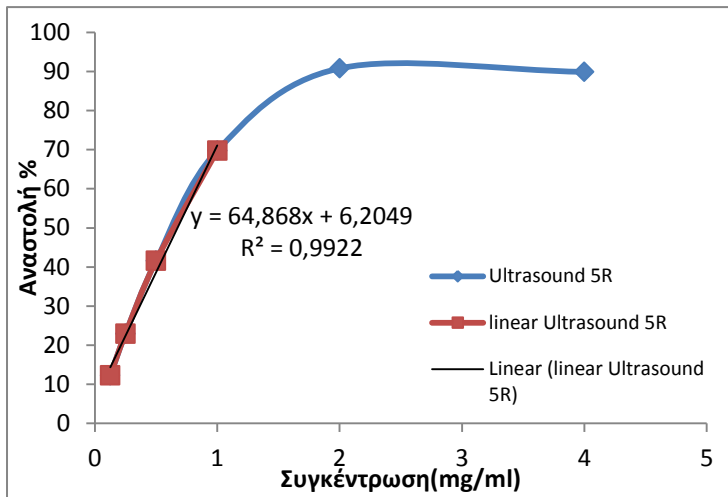
Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,9395333			
Ultrasound3R C1	0,1319667	93,20	0,0038	4
Ultrasound3R C2	0,1461333	92,47	0,0027	2
Ultrasound3R C3	0,6126667	68,41	0,0237	1
Ultrasound3R C4	1,1273000	41,88	0,0398	0,5
Ultrasound3R C5	1,4706333	24,18	0,0254	0,25
Ultrasound3R C6	1,6553000	14,65	0,0308	0,125
IC50	0,678			

Πίνακας 33 μέθοδος ultrasound φρέσκα φύλλα αιθανόλη 250ml

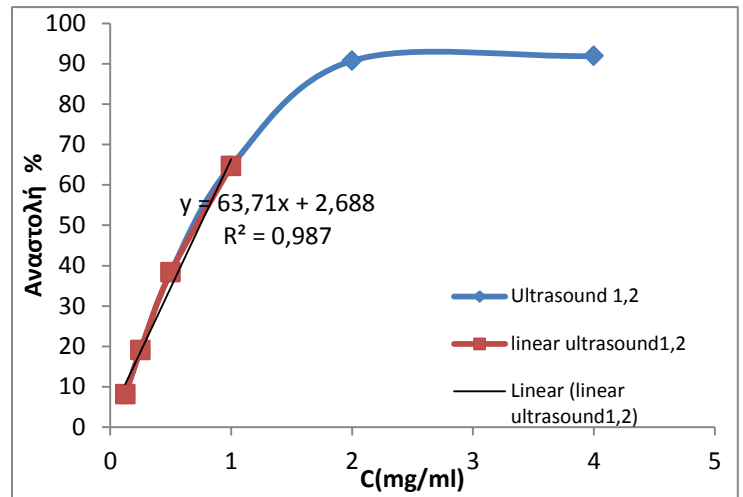
Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,9395333			
Ultrasound4R C1	0,1621667	91,64	0,0386	4
Ultrasound4R C2	0,2534333	86,93	0,0562	2
Ultrasound4R C3	0,7428333	61,70	0,0605	1
Ultrasound4R C4	1,2194333	37,13	0,0407	0,5
Ultrasound4R C5	1,5084333	22,23	0,0185	0,25
Ultrasound4R C6	1,6564667	14,59	0,0136	0,125
IC50	0,769			

Πίνακας 34 μέθοδος ultrasound ξερά φύλλα αιθανόλη 250ml

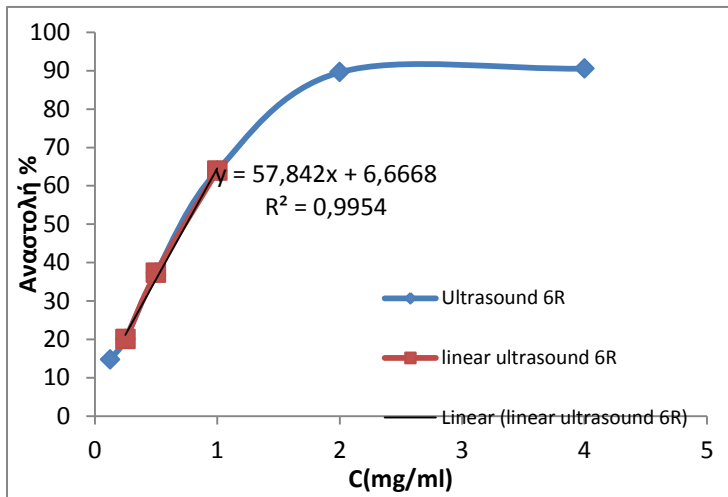
Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,9395333			
Ultrasound8 C1	0,2997333	84,55	0,0429	4
Ultrasound8 C2	0,9676667	50,11	0,0234	2
Ultrasound8 C3	1,3161333	32,14	0,0774	1
Ultrasound8 C4	1,5870333	18,17	0,0324	0,5
Ultrasound8 C5	1,7381000	10,39	0,0384	0,25
Ultrasound8 C6	1,7663333	8,93	0,0285	0,125
IC50	1,615			



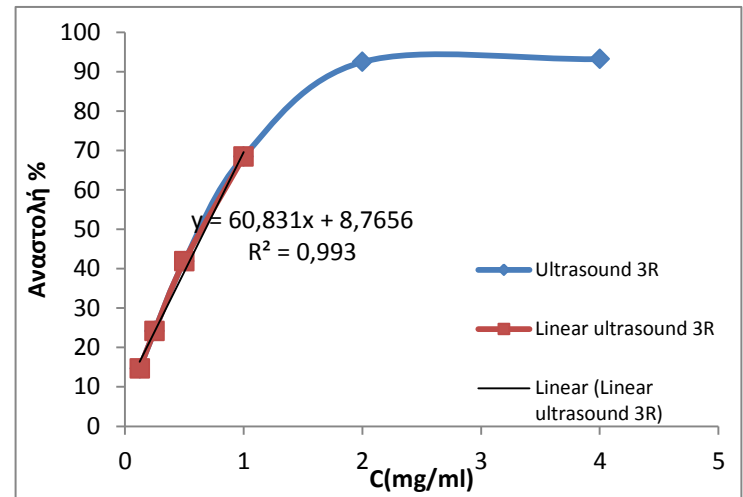
Διάγραμμα 25 Ultrasound ξερά νερό 300ml



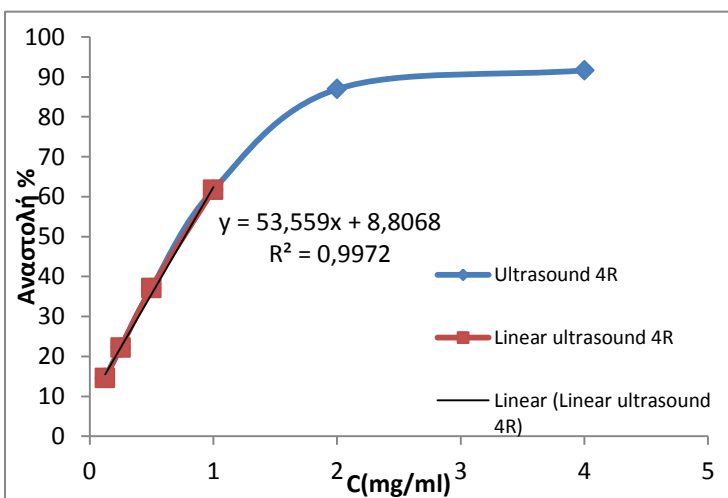
Διάγραμμα 24 Ultrasound φρέσκα νερό 250ml



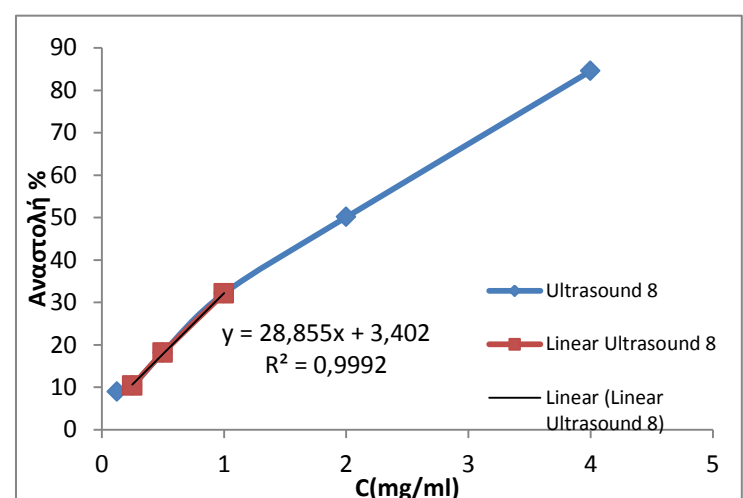
Διάγραμμα 21 Ultrasound ξερά νερό 250ml



Διάγραμμα 20 Ultrasound αιθανόλη φρέσκα 300ml



Διάγραμμα 23 Ultrasound αιθανόλη φρέσκα 250ml



Διάγραμμα 22 Ultrasound αιθανόλη ξερά 250ml

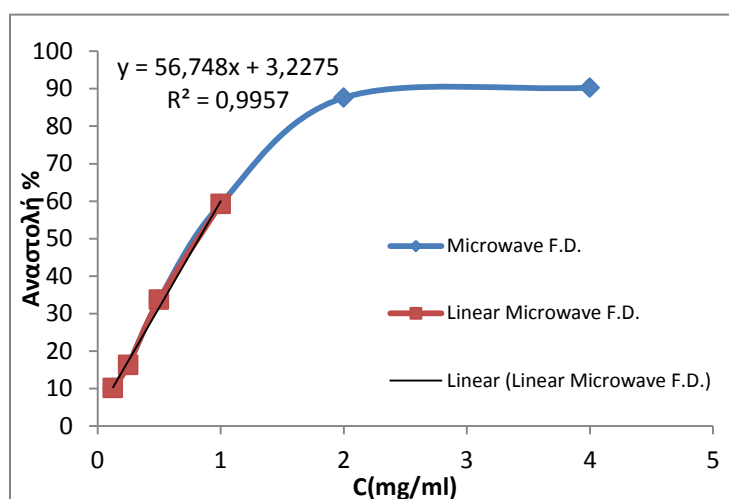
11.2.3. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MICROWAVE

Πίνακας 35 μέθοδος microwave ξερά φύλλα

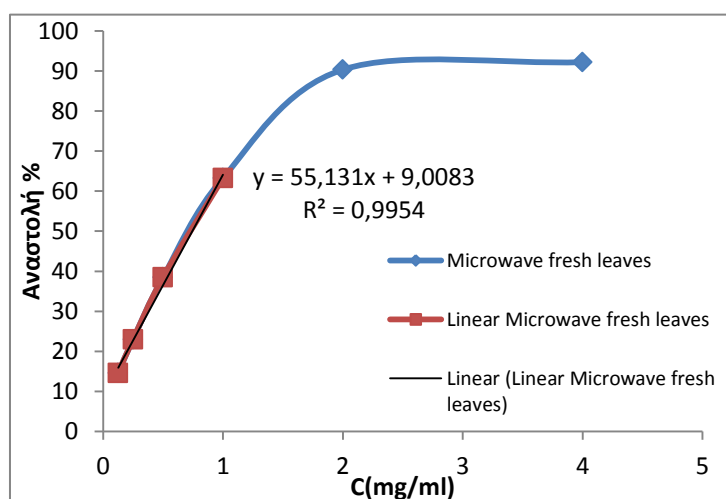
Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,8857667			
Microwave F.D. C1	0,1831667	90,29	0,0183	4
Microwave F.D. C2	0,2336333	87,61	0,0526	2
Microwave F.D. C3	0,7686000	59,24	0,0717	1
Microwave F.D. C4	1,2503333	33,70	0,0267	0,5
Microwave F.D. C5	1,5790000	16,27	0,0271	0,25
Microwave F.D. C6	1,6951667	10,11	0,0433	0,125
IC50	0,824			

Πίνακας 36 μέθοδος microwave φρέσκα φύλλα

Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,9395333			
Microwave Fresh C1	0,1513000	92,20	0,0171	4
Microwave Fresh C2	0,1874667	90,33	0,0069	2
Microwave Fresh C3	0,7124000	63,27	0,0316	1
Microwave Fresh C4	1,1923000	38,53	0,0331	0,5
Microwave Fresh C5	1,4931000	23,02	0,0187	0,25
Microwave Fresh C6	1,6565667	14,59	0,0266	0,125
IC50	0,744			



Διάγραμμα 27 μέθοδος microwave ξερά φύλλα

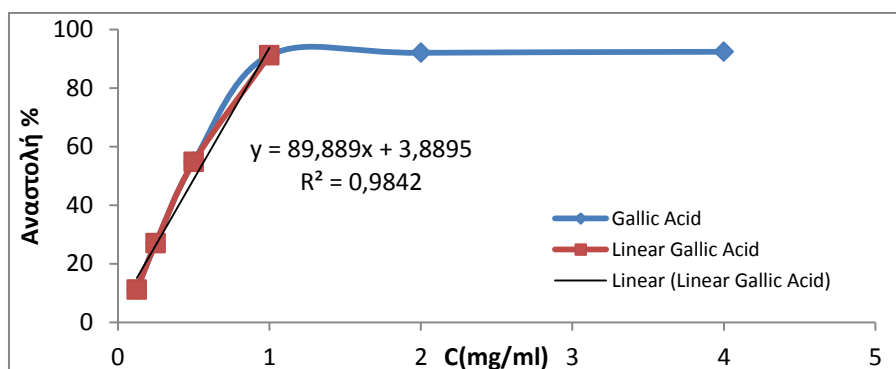


Διάγραμμα 26 μέθοδος microwave φρέσκα φύλλα

11.2.4. ΚΑΜΠΥΛΗ ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Πίνακας 37 Μετρήσεις γαλλικού οξέος

Κωδικός δείγματος	Average ABS	Αναστολή %	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)
Blank	1,8857667			
<i>Gallic Acid C1</i>	0,1440333	92,36	0,0012	4
<i>Gallic Acid C2</i>	0,1505333	92,02	0,0026	2
<i>Gallic Acid C3</i>	0,1671000	91,14	0,0055	1
<i>Gallic Acid C4</i>	0,8526333	54,79	0,0430	0,5
<i>Gallic Acid C5</i>	1,3769000	26,98	0,0242	0,25
<i>Gallic Acid C6</i>	1,6747333	11,19	0,0274	0,125
IC50	0,513			



Διάγραμμα 28 Καμπύλη γαλλικού οξέος

11.3. ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ GCMS

ΥΔΡΟΑΠΟΣΤΑΞΗ

Πίνακας 38 συστατικά αιθέριου ελαίου

Αιθέριο έλαιο				
Peak #	RT	Area%	Compound	%
1	7,48	19,5	MYRCENE	96
2	8,88	4,84	LIMONENE	99
3	19,94	1,75	2-UNDECANONE	91
4	25,42	5,03	trans-Caryophyllene	99
5	26,94	1,91	α - caryophyllene	98
6	28,03	24,78	GERMACRENE-δ	99
7	28,76	0,88	α- Muurolene	95
8	29,57	4,46	δ-cadinene (armoise-Maroc)	99
9	33,98	1,6	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)	90
10	34,61	5,75	γ -Cadinene	86
11	34,73	1,57	α-COPAENE	89
12	35,06	9,53	α-cadinol	56
13	45,69	11,99	(6E,8E,10E)-2,6,11,15-Tetramethyl-2,6,8,10,14-hexadecapentaene	64
14	46,89	3,62	(E,E)-7,11,15-Trimethyl-3-methylen (E,E)-7,11,15-Tri Methyl-3-methylene-hexadeca-1,6,10,14-tetraene(β -Springene)	53

ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΜΕ ΕΞΑΝΙΟ

Πίνακας 39 αιθέριο έλαιο ανάμιξη με εξάνιο

Αιθέριο έλαιο παραλαβή με εξάνιο				
Peak #	RT	Area%	Compound	%
1	3,85	4,16	Octane	91
2	10,45	11,30	MYRCENE	96
3	12,23	2,51	LIMONENE	99
4	13,05	0,28	trans-beta-Ocimene	94
5	23,19	0,25	Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	91
6	25,25	2,48	2-Undecanone	97
7	28,92	0,89	α-COPAENE	99
8	29,55	1,05	β-ELEMENE	99
9	30,95	6,49	β-CARYOPHYLLENE	99
10	31,73	0,38	Isoamyl benzoate	80
11	32,15	0,35	δ-Cadinene	60
12	32,46	2,62	α- caryophyllene	98
13	32,62	0,86	AROMADENDRENE	99
14	33,74	24,61	GERMACRENE-δ	99
15	34,18	1,09	Calarene	98
16	34,3	1,38	α-Muurolene	93
17	34,46	0,26	δ-CADINENE	99
18	34,59	0,73	(E,E)-α-farnesene	98
19	34,88	0,46	α-amorphene	99
20	35,17	6,07	δ-cadinene (armoise-Maroc)	99
21	35,32	0,73	epizonaren	97
22	35,67	0,35	Naphthalene	98
23	36,35	0,68	γ-Cadinene	92
24	36,73	0,32	Germacrene β	97
25	37,48	0,32	AROMADENDRENE	84
26	37,69	0,37	Cyclohexane	60
27	39,3	0,55	Fonelol	50
28	39,54	1,78	Naphthalene, 1,2,3,4,6,8a-hexahydro-1-isopropyl-4,7-dimethyl-	93
29	39,69	0,64	γ-Eudesmol	98
30	40,12	2,68	δ-Cadinene	93
31	40,23	2,95	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene	95
32	40,31	1,6	δ-Cadinol	99
33	40,69	6,66	T-Muurolol	93
34	44,73	0,51	Benzyl benzoate	97
35	49,12	0,45	trans-β-Farnesene	53
36	51,11	7,87	(6E,8E,10E)-2,6,11,15-Tetramethyl-2,6,8,10,14-hexadecapentaene	68
37	52,23	2,92	(Z)-β-Farnesene	70

ΕΞΑΝΙΟ soxhlet

Πίνακας 40 Φρέσκα φύλλα Soxhlet με εξάνιο

ABSOX62 ΦΡΕΣΚΑ ΦΥΛΛΑ εξάνιο				
Peak #	RT	Area%	Compound	%
1	30,88	2,03	trans-Caryophyllene	90
2	32,44	0,46	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (45
3	33,55	6,45	GERMACRENE-D	98
4	34,2	0,43	.alpha.-amorphene	53
5	35,03	3,04	.beta.-Guaiene	60
6	40,64	0,69	Alloaromadendrene	35
7	51,05	11,88	3-Cyclohexene-1-methanol, .alph	50
8	52,23	3,77	NEROLIDOL	58
9	68,24	1,3	1,2-Benzenedicarboxylic acid,	83
10	72,7	0,9	Heptacosane	59
11	75,14	0,91	Docosane	45
12	75,35	0,6	Bicyclo(10.3.0)pentadec-1(12)-en-1	83
13	77,52	4,02	Nonacosane	94
14	79,83	4,96	1-EICOSANOL	90
15	82,75	33,07	Hentriacontane	93
16	83,35	16,99	Vitamin E	91
17	86,04	2,05	Tritetracontane	56
18	90,09	1,93	Tetratetracontane	50

Πίνακας 41 Ξερά φύλλα Soxhlet με εξάνιο

ABSOX3 ΞΕΡΑ ΦΥΛΛΑ εξάνιο				
Peak #	RT	Area%	Compound	%
1	33,55	2,32	GERMACRENE-δ	93
2	51,06	5,07	(6E,10E)-2,6,12,15-TETRAMETHYLHEXA	72
5	67,57	1,77	Hexatriacontane	72
6	70,18	2,44	N-nonadecane	83
7	72,72	3,62	Heptacosane	86
8	75,17	3,3	Dotriacontane	83
10	77,54	4,37	Hexatriacontane	90
11	79,83	0,91	1-Dotriacontanol	59
12	79,93	2,56	Pentatriacontane	64
13	82,72	20,41	Hexatriacontane (91
14	83,22	24,29	Vitamin E	97
15	86,05	1,37	Dotriacontane	47
16	93,2	23,27	Taraxasterol	93

Οξικός αιθυλεστέρας soxhlet

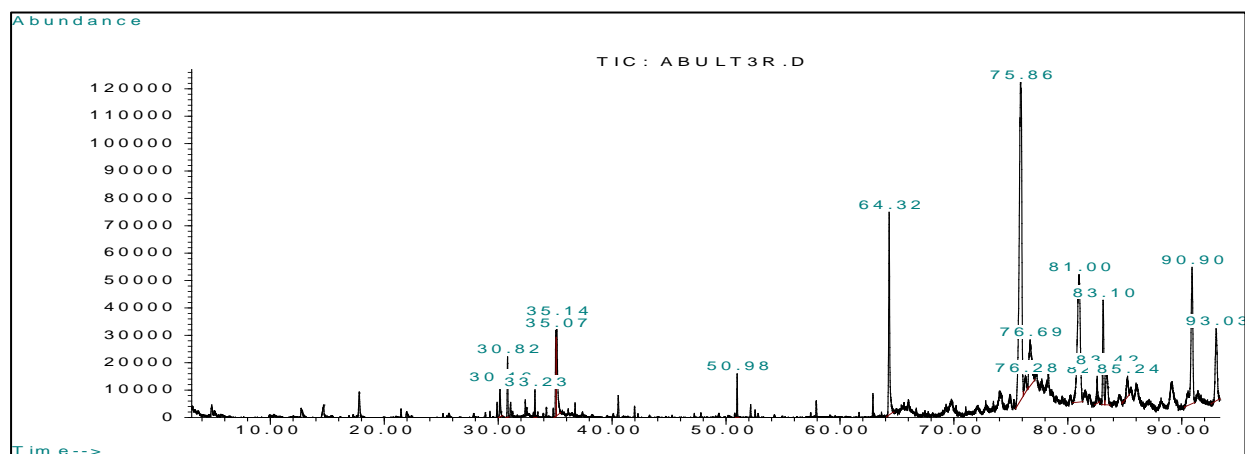
Πίνακας 42 Φρέσκα φύλλα Soxhlet με οξικό αιθυλεστέρα

ABSOX8-ΦΡΕΣΚΑ ΦΥΛΛΑ οξικός αιθυλεστέρας				
Peak #	RT	Area%	Compound	%
1	3,17-3,45	3,94	Acetic acid, ethyl ester	
2	3,23	2,56	Acetic acid, 1-methylpropyl ester	
3	3,9	1,75	1-Propoxyxypentane	12
4	5,73	1,06	p-Xylene	83
5	12,4-35,07	3,59	Eucalyptol	90
6	51	1,92	γ-cis-sesquicyclogeraniol	59
7	67,31	35,39	Naphthalene	38
8	67,47	11,71	Octacosane	10
9	70,1	1,28	monoethylated pentadecyl alcohol	38
10	72,63	1,66	propyloxetane	23
11	77,45	2,56	Gibberellic acid	59
12	82,56	6,45	Tranlylcypromine	43
13	93,04	23,44	Cyclotrisiloxane, hexamethyl	46

Πίνακας 43 Ξερά φύλλα Soxhlet με οξικό αιθυλεστέρα

ABSOX4 ΞΕΡΑ ΦΥΛΛΑ οξικός αιθυλεστέρας				
Peak #	RT	Area %	Compound	%
1	3,38	3,8	3-pentanone 2-methyl	53
2	3,44	5,31	Acetic acid, 1-methylpropyl ester	78
3	31,37	7,82	trans-Caryophyllene	58
4	34,02	17,4	GERMACRENE-δ	98
5	51,49	4,14	(6E,8E,10E)-2,6,11,15-Tetramethyl-2,6,8,10,14-hexadecapentaene	58
6	82,95	37,62	Heptacosane	91
7	83,45	23,91	Vitamin E	87

ΜΕΘΟΔΟΣ ULTRASOUND ΑΙΘΑΝΟΛΗ

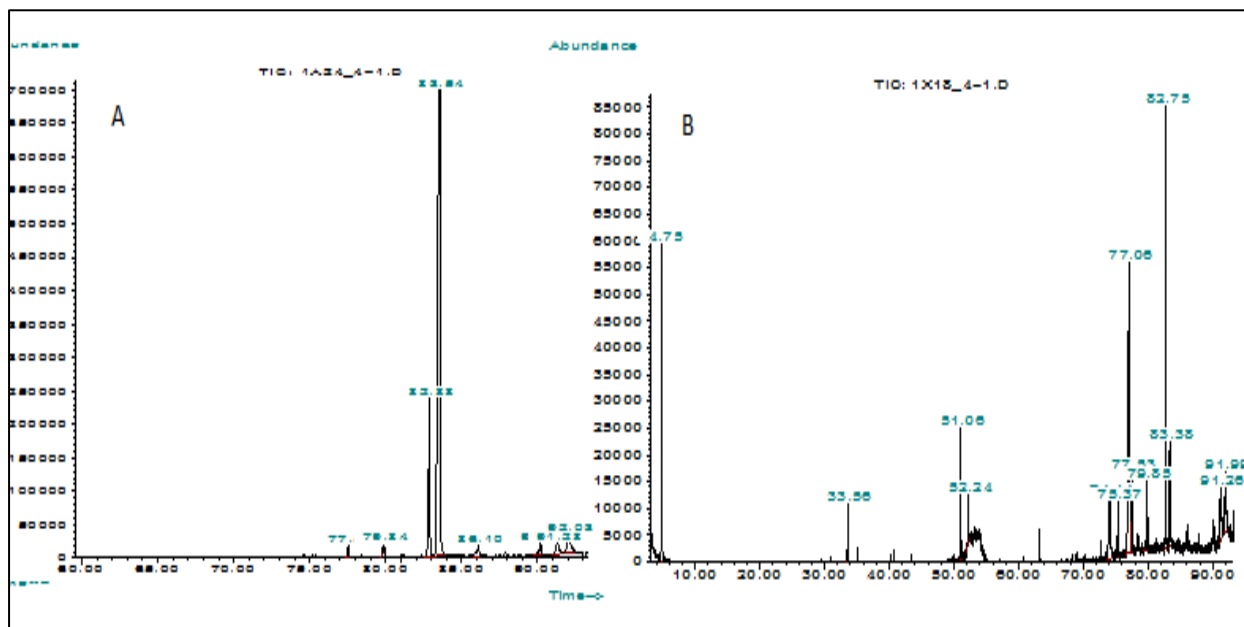


Σχήμα 10 φρέσκα φύλλα αιθανόλη μέθοδος ultrasound

Πίνακας 44 φρέσκα φύλλα αιθανόλη μέθοδος ultrasound

ABULT3 ΦΡΕΣΚΑ ΦΥΛΛΑ με αιθανόλη				
Peak #	RT	Area%	Compound	%
1	30,16	1,11	7-Ethyltetraphene	72
2	30,82	1,59	trans-Caryophyllene	83
3	33,22	0,63	α-Copaene	76
4	35,07	2,37	Methyl 6-O-acetyl-2,3,4-tri-O-ethyl-α-d-galactopyranoside	32
5	35,14	4,84	(1α,1α,2β,7β,7α)-1a,2,7,7a-Tetrahydro-2,7-epoxy-1H-cyclopropa[b]naphthalene-1-carbaldehyde	32
6	50,98	1,02	β-Springene	64
7	64,32	8,47	N,N-Dimethylsulfamoyl chloride	22
8	75,86	32,96	28-Norolean-17-en-3-one	99
9	76,69	4,88	Tetramethyldiethoxydisiloxane	38
10	81	15,07	2'-anilino-5'-bromo-2-carbomethoxybenzophenone	78
11	82,58	1,16	Octadecane, 1-chloro	43
12	83,1	4,59	Vitamin E	91
13	83,42	2,61	1-(N-ethyl-N-(2-benzothiazolyl)carbamoyl)-2-(N-ethyl-N-(2-benzothiazolyl)amino)ethane	52
14	85,24	1,35	Chalcone	14
15	90,9	10,56	28-Norolean-17-en-3-one	99
16	93,03	5,33	Jasminol	59

ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΛΛΩΝ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ



Σχήμα 11 Α: Φρέσκα φύλλα, Β: ξερά φύλλα

Πίνακας 45 SFE Φρέσκα φύλλα καθαρισμός με αιθανόλη

SE Fresh (A24)				
Peak #	RT	Area%	Compound	%
1	77.54	0.81	Tetratriacontane	87
2	79.83	0.86	1-Docosene	70
3	79.93	0.52	Eicosane	94
4	82.87	13.24	Heptacosane	99
5	83.54	74.24	Vitamin E	97
6	86.10	1.34	Tetratriacontane	80
7	87.88	0.51	1-Methylcyclooctene	30
8	90.20	2.04	Eicosane	93
9	91.28	2.16	β -Amyrene	90
10	92.03	4.28	Cycloartenol	97

SE Dried(18)				
Peak #	RT	Area%	Compound	%
1	4.75	8.38	Diacetone alcohol	83
2	33.55	1.3	GERMACRENE-D	97
3	51.06	3.24	Nerolidol	43
4	52.24	1.76	(S)-4,4-Dimethyl-2-(4-methyl-3-cyclohexen-1-yl)-1,5-hexadiene	55
5	63.26	0.71	trans-3-Methyl-4-octanolide	36
6	74.14	8.28	Ethanol	62
7	75.37	1.51	Lycopersen	80
8	77.06	29.37	Benzene, 1-methoxy-2,3,5-trimethyl	89
9	77.53	4.74	Tetratriacontane	47
10	79.85	2.19	α -Octadecene	59
11	79.93	0.87	Octadecane	50
12	82.75	16.72	Eicosane	98
13	83.37	6.11	Vitamin E	86
14	90.16	2.5	Eicosane, 7-hexyl-	43
15	91.26	5.31	28-Norolean-17-en-3-one	35