



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών (IV)

Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

**Μελέτη της διεργασίας εκχύλισης για την ανάκτηση
βιοδραστικών συστατικών λυγαριάς και αξιολόγηση της
αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΣΤΑΜΑΤΙΝΑΣ ΜΗΤΡΟΥ**

Επιβλέπων καθηγητής
Πέτρος Ταούκης

Αθήνα

Φεβρουάριος 2017

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Ο υπεύθυνος καθηγητής ήταν ο κος. Πέτρος Ταούκης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά, τον επιβλέποντα καθηγητή μου κο. Π. Ταούκη, για την ανάθεση του θέματος, καθώς επίσης και για την επιστημονική του καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ από καρδιάς την κ. Ε. Γώγου και τον κ. Δ. Τσιμογιάννη, για το ενδιαφέρον τους, τη βοήθεια και την άριστη συνεργασία μας. Η συμβολή τους ήταν καθοριστική στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Ένα θερμό ευχαριστώ ακόμη, σε ολόκληρο το προσωπικό του εργαστηρίου, που με τη φιλική τους στάση έκαναν την παραμονή μου σε αυτό μια ευχάριστη και δημιουργική εμπειρία.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια και τους δικούς μου ανθρώπους, που με στήριξαν με την αγάπη τους και μου έδιναν διαρκώς δύναμη ώστε να υλοποιήσω τους στόχους μου.

Περίληψη

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της διεργασίας της εκχύλισης για την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών του φυτού *Vitex Agnus Castus* (λυγαριά), που ανήκει στην οικογένεια *Verbenaceae*, και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.

Στα πλαίσια του πειραματικού σχεδιασμού, κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθούν τόσο οι καρποί όσο και τα φύλλα/άνθη του φυτού. Οι διεργασίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η υδρο-ατμοαπόσταξη με σκοπό την παραλαβή των πτητικών βιοδραστικών συστατικών που συνιστούν το αιθέριο έλαιο, και η συμβατική εκχύλιση *Soxhlet* για την ανάκτηση κυρίως των φαινολικών βιοδραστικών συστατικών. Όσον αφορά την υδρο-ατμοαπόσταξη, η ποσότητα του αιθέριου ελαίου που προέκυψε και στις δύο περιπτώσεις ήταν χαμηλή· 0,07 mL /100 g στους καρπούς και 0,12 mL/100 g στα φύλλα/άνθη. Η σύσταση του αιθέριου ελαίου και του ανθόνερου προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας GC-MS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το βασικότερο συστατικό του αιθέριου ελαίου των καρπών είναι το β-φαρνεσένιο σε ποσοστό 22,92 %, επί των συνολικών συστατικών του ελαίου, με αμέσως επόμενο συστατικό το *trans*-καρυοφυλλένιο , σε ποσοστό 19,54 %. Όσον αφορά το ανθόνερο των καρπών, τα δύο κυριότερα βιοδραστικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ήταν η 1,8-κινεόλη σε ποσοστό 71% και το 2-*p*-κυμένιο σε αντίστοιχο ποσοστό 20,5%. Συνεχίζοντας με τα φύλλα/άνθη, το βασικότερο συστατικό του αιθέριου ελαίου είναι το *trans*-καρυοφυλλένιο σε ποσοστό 32,00 %, επί των συνολικών συστατικών του ελαίου, ενώ ακολουθεί το δικυκλογερμακρένιο σε ποσοστό 17,55 %. Αναφορικά με το ανθόνερο των φύλλων/ανθών, τα δύο κυριότερα βιοδραστικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ήταν πάλι η 1,8-κινεόλη και το 2-*p*-κυμένιο, αυτή τη φορά σε ποσοστά σε 54,04% και 14,51% αντίστοιχα, ενώ στην προκειμένη περίπτωση ταυτοποιήθηκαν και δύο επιπλέον βιοδραστικά συστατικά: η (+)-*P*-μενθ-1-εν-4-όλη σε ποσοστό 11,63% και η (R)-(+)- α -τερπινεόλη σε 7,34% αντίστοιχα.

Στο δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε η δυνατότητα ανάκτησης των πολυφαινολών από την αποσμημένη φυτόμαζα με διεργασίες εκχύλισης. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις σε ξηρά και κονιοποιημένα δείγματα του απεσταγμένου φυτού (καρποί και φύλλα/άνθη), χρησιμοποιώντας διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: οξικός αιθυλεστέρας, αιθανόλη και νερό, ώστε να απομονωθούν τα άπολα, τα λιγότερο πολικά και τα πολικά βιοδραστικά συστατικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων των καρπών

λυγαριάς, μεγαλύτερη απόδοση βρέθηκε κατά την εκχύλιση με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα, και ίση με 11,9 % w/w ξ.β (σε ξηρή βάση), ενώ παραπλήσια απόδοση σε ποσοστό 11,52% εμφάνισε η εκχύλιση με νερό. Τελευταία σε απόδοση έρχεται η εκχύλιση με αιθανόλη με ποσοστό 4,8% w/w ξ.β. φυτού. Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των αντίστοιχων εκχυλισμάτων των καρπών, το αιθανολικό εκχύλισμα, παρά τη χαμηλότερη απόδοση, εμφάνισε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, με βάση την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (τιμή $EC_{50}=851$ g ξηρού εκχυλίσματος/kg DPPH). Ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα με τιμή $EC_{50}=1251$ g ξηρού εκχυλίσματος/kg DPPH και τέλος το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα, το οποίο παρά τη μεγάλη απόδοση της διεργασίας, έδειξε πολύ μικρή ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών ($EC_{50}=9194$ g ξηρού εκχυλίσματος/kg DPPH). Στην περίπτωση των φύλλων/ανθών του φυτού, τα αποτελέσματα διαφέρουν συγκριτικά με τους καρπούς με την εκχύλιση με αιθανόλη να εμφανίζει τη μεγαλύτερη απόδοση σε ποσοστό 15,7% w/w σε ξηρή βάση φυτού, ενώ ακολουθούν η εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και τέλος με νερό με αποδόσεις 9,4% και 7,2 w/w ξ.β., αντίστοιχα. Όσον αφορά το αντιοξειδωτικό προφίλ των εκχυλισμάτων των φύλλων/ανθών λυγαριάς είναι παρόμοιο με αυτό των καρπών. Πιο συγκεκριμένα, το αιθανολικό εκχύλισμα παραμένει το πιο αντιοξειδωτικά ισχυρό με εμφανίζει τιμή $EC_{50}=446$ g ξηρού εκχυλίσματος/kg DPPH, ενώ ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα με $EC_{50}=1004$ g ξηρού εκχυλίσματος/kg DPPH, και τέλος το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα με $EC_{50}=2211$ g ξηρού εκχυλίσματος/kg DPPH. Αξίζει να τονιστεί πως και τα τρία εκχυλίσματα των φύλλων εμφανίζουν μικρότερες τιμές EC_{50} συγκριτικά με τα αντίστοιχα των καρπών, γεγονός που αποδεικνύει πως τα φύλλα περιείχαν δραστικότερα αντιοξειδωτικά συστατικά. Τα παραπάνω πειράματα απέδειξαν πως πέραν του αιθέριου ελαίου, είναι εφικτή η επιπλέον αξιοποίηση του φυτού *Vitex Agnus Castus*, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε αποδόσεις ανάκτησης αντιοξειδωτικών ουσιών έως και 28,22 % στην περίπτωση των καρπών και 32,3 % στα φύλλα/άνθη αντίστοιχα.

Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς το φαινολικό περιεχόμενό τους, το οποίο υπολογίστηκε με τη μέθοδο *Folin-Ciocalteu*, και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε 5 ισοδύναμα ppm γαλλικού οξέος (GAE). Με βάση τα αποτελέσματα των καρπών, το υδατικό εκχύλισμα εμφανίζει το μεγαλύτερο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο με συγκέντρωση 11163 ppm, ενώ ακολουθεί το αιθανολικό με 7032 ppm και τελευταίο το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα (4112 ppm). Στο σημείο αυτό αξίζει να επισημανθεί πως ενώ το υδατικό εκχύλισμα περιέχει

μεγαλύτερη ποσότητα φαινολών συγκριτικά με το αιθανολικό, το δεύτερο περιέχει πιο ισχυρά αντιοξειδωτικές φαινόλες, όπως προαναφέρθηκε. Συνεχίζοντας με τα αποτελέσματα των φύλλων/ανθών, τα εκχυλίσματα κατά σειρά μειούμενου συνολικού φαινολικού περιεχομένου είναι το υδατικό, το αιθανολικό και το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα με συγκεντρώσεις 23631 ppm, 15614 ppm και 8863 ppm, αντίστοιχα. Σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των καρπών, το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο και για τα τρία εκχυλίσματα είναι σημαντικά μεγαλύτερο στην περίπτωση των φύλλων/ανθών. Αν ληφθεί υπόψη και το αντιοξειδωτικό προφίλ που αναλύθηκε παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα των φύλλων εμφανίζουν ποσοτικά περισσότερα αλλά και δραστικότερα αντιοξειδωτικά συστατικά.

Τέλος, το αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών (το οποίο κρίθηκε ως αυτό με την πιο έντονη αντιοξειδωτική δράση) χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό εμπορικά διαθέσιμου γαλακτώματος καλλυντικής χρήσης με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του χρόνου και της θερμοκρασίας αποθήκευσης στην αντιοξειδωτική δράση του εμπλουτισμένου γαλακτώματος με φυσικά αντιοξειδωτικά λυγαριάς (συγκέντρωσης 2,5% w/w ξηρού εκχυλίσματος). Τα εμπλουτισμένα γαλακτώματα αποθηκεύτηκαν σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας 25, 35 και 45°C για χρονικό διάστημα 7 μηνών. Η αντιοξειδωτική δράση των εμπλουτισμένων γαλακτωμάτων προσδιορίστηκε σε δειγματοληψίες ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η αντιοξειδωτική δράση βρέθηκε ότι υποβαθμίζεται με αύξηση του χρόνου αποθήκευσης το οποίο πιθανόν οφείλεται σε αντιδράσεις οξείδωσης της λιπαρής φάσης του γαλακτώματος. Επιπλέον, προέκυψε πως οι αντιδράσεις υποβάθμισης της αντιοξειδωτικής δράσης λαμβάνουν χώρα με μεγαλύτερο ρυθμό σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες αποθήκευσης, με τη μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης να ακολουθεί κινητική 1^{ης} τάξης με ενέργεια ενεργοποίησης 40,8 kJ/mol με ρυθμό μείωσης, k , 0,002 days⁻¹ στους 25°C.

Study of the extraction process and antioxidant activity of *Vitex Agnus Castus* bioactive compounds

Stamatina Mitrou, Diploma Thesis

National Technical University of Athens, School of Chemical Engineering, Laboratory of Food Chemistry and Technology

Abstract

The objective of the work was to study the extraction process of *Vitex Agnus Castus* (*Verbenaceae* family) for the recovery of bioactive compounds and the evaluation of their antioxidant activity.

The experimental design included the extraction of both fruits and leaves of the selected plant. The process of hydro distillation was used to extract volatile compounds comprising the essential oil of the plant. *Soxhlet* extraction was used for the recovery of the phenolic compounds. The yield of essential oil extraction for fruits and leaves was found to be 0,07 mL/100 g and 0,12 mL/100 g, respectively. Gas chromatography- mass spectrometry (GC-MS) was used to identify the key volatile compounds found in the essential oil. According to the results, the main compound of the fruits essential oil was beta-farnesene with a percentage of 22,9 %, whereas the second most abundant volatile was trans-caryophyllene (19,5 %). As far as the fruits hydrosol fraction is concerned, the two main compounds identified were 1,8-cyreneol and 2-p-cymene with percentages of 71,0% and 20,5% respectively. The main volatile components of the leaves essential oil were trans-caryophyllene (32,0%) and bicyclogermacrene (17,6 %). The two main volatiles identified in the hydrosol were 1,8-cyreneol and 2-p-cymene with percentages 54,04% and 14,51% respectively.

The recovery of the phenolic compounds was examined with solvent extraction of the plant after the hydro-distillation process. Solvent extraction was carried out on dry and grounded samples of hydro distilled plant (fruits and leaves/flowers), using different solvents with increased polarity; ethyl acetate, ethanol and water. According to the results solvent extraction of *Vitex Agnus Castus* fruits with the highest yield 11,9 % w/w d.w. was achieved when using ethyl acetate, the second highest yield (11,5% w/w d.w) was achieved when using water as solvent. While, ethanol extraction showed the smallest extraction yield of 4,8% w/w

d.w. Despite the low extraction yield, ethanol extract showed the highest antioxidant activity (expressed as the ability of scavenging the free radical DPPH) with a EC_{50} value of 851 g dried extract/kg DPPH. Antioxidant activity of water and ethyl acetate extracts showed lower antioxidant activity with EC_{50} values of 1251 and 9194 g dried extract /kg DPPH, respectively. In the case of leaves solvent extraction, ethanol showed the highest yield (15,7% w/w d.w.), ethyl acetate extraction and water extraction received a yield of 9,4 and 7,2% w/w d.w., respectively. Ethanol extract had the highest antioxidant activity (EC_{50} =446 g dried extract/kg DPPH). Whereas, water and ethyl acetate extracts was found to have EC_{50} values of 1004 and 2211 g dried extract/kg DPPH, respectively. When comparing fruits and leaves extracts, leaves showed lower EC_{50} values thus leaves were found to contain more active antioxidant compounds. Taking into accounts the overall extraction yield numbers *Vitex Agnus Castus* can be considered a plant rich in antioxidants with recovery yields up to 28,2 and 32,3 % in the case of fruits and leaves, respectively.

Phenolic content of the recovered extracts was estimated according to *Folin-Ciocalteu* method; results were expressed in equivalents of galic acid (GAE, ppm). Water extract was found to have the highest total phenolic content with a concentration of 11163 ppm, while ethanol and ethyl acetate extract phenolic content was 7032 and 4112 ppm, respectively. Water extract was found to be the richest in polyphenols in comparison with the ethanol extract, whereas ethanol extract was among the most abundant in antioxidant compounds (polyphenols). Leaves extracts can be listed, by decreasing total phenolic content, as water extract>ethanol extract>ethyl acetate extract with concentrations of 23631, 15614 and 8863 ppm, respectively.

Vitex Agnus Castus ethanol leaves extract, found to have the highest antioxidant activity, was used for the enrichment of commercially available cosmetic base emulsion. Cosmetic base emulsion samples were enriched with the extract in a final concentration of 2,5% w/w and stored in three constant temperature incubators; 25, 35 and 45°C for seven months. The antioxidant activity of the samples was defined at predetermined time intervals. Antioxidant activity was found to decrease with increasing storage temperature and time due to oxidative reaction phenomena in the emulsion oil phase. Antioxidant activity decrease was found to follow 1st order kinetics with an activation energy (E_a) of 40,8 kJ/mol and a reference rate of decrease (k_{ref}) equal to 0,002 days⁻¹ at the reference storage temperature of 25°C.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1. Βιοδραστικά συστατικά και λυγαριά.....	5
1.1 Γενικά για τα βιοδραστικά συστατικά.....	5
1.1.1 Ελεύθερες ρίζες και Αντιοξειδωτικά συστατικά	6
1.1.2 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης	13
1.2 Λυγαριά: <i>Vitex Agnus Castus</i>	17
1.2.1 Γενικά για τη λυγαριά.....	17
1.2.2 Βιοδραστικά συστατικά λυγαριάς.....	18
1.2.3 Δράση των συστατικών λυγαριάς στον ανθρώπινο οργανισμό	21
1.3 Σύνοψη.....	25
Κεφάλαιο 2. Φυσικές Διεργασίες Διαχωρισμού.....	27
2.1. Γενικά.....	27
2.2 Απόσταξη	28
2.3 Εκχύλιση.....	32
Κεφάλαιο 3. Υλικά, Συσκευές και Μέθοδοι.....	43
3.1 Υλικά.....	43
3.2 Συσκευές.....	43
3.3 Μέθοδοι – Διεργασίες	44
3.3.1 Συλλογή.....	44
3.3.2 Άλεση – Κοκκομετρία	44
3.3.3 Υδρο-ατμοαπόσταξη	45
3.3.4 Ξήρανση	46
3.3.5 Εκχύλιση Soxhlet	47
3.3.6 Μέθοδος DPPH.....	48
3.3.7 Μέθοδος Folin – Ciocalteu	49
3.3.8 Μέθοδος HPLC-DAD	50
3.3.9 Μέθοδος GC-MS.....	51
3.3.10 Ενσωμάτωση εκχυλίσματος λυγαριάς σε γαλάκτωμα (καλλυντικό προϊόν).....	51

Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα και Συζήτηση	53
4.1 Απόσταξη	53
4.1.1 Καρπός	53
4.1.2 Φύλλα/Άνθη	57
4.2 Εκχύλιση	62
4.2.1 Καρπός	62
4.2.2 Φύλλα/Άνθη	76
4.3 Ενσωμάτωση σε φορέα-γαλάκτωμα-Μελέτη υποβάθμισης αντιοξειδωτικής δράσης σε επιταχυνόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες αποθήκευσης	92
Κεφαλαίο 5. Συμπεράσματα-Προτάσεις	97
Παράρτημα	107

Εισαγωγή

Ξεκινώντας από τον Ιπποκράτη και την ολιστική προσέγγιση της ιατρικής και φτάνοντας μέχρι τις σύγχρονες φαρμακευτικές ανακαλύψεις και τις διατροφικές τάσεις, αναγνωρισμένος είναι ο ρόλος των αρωματικών φυτών και βοτάνων. Ονομάζονται εναλλακτικά και «φαρμακευτικά» φυτά, γεγονός που μαρτυρά τη δράση τους. Η χρήση βοτάνων ως φαρμάκων έχει τις ρίζες της βαθιά στο παρελθόν και συνεχίζει μέχρι σήμερα. Δεν είναι λίγες οι φαρμακοβιομηχανίες που προσπαθούν να αντικαταστήσουν τα παυσίπονα με πιο φυσικά κατευναστικά συστατικά όπως για παράδειγμα αυτά που περιέχει η βαλεριάνα. Σαφώς δεν υπάρχει πρόθεση τα βότανα να αντικαταστήσουν την παρουσία του γιατρού ή τη φαρμακευτική αγωγή όπου κρίνεται αναγκαία, αλλά να αποτελέσουν απλώς έναν τρόπο αντιμετώπισης σε ήπιες διαταραχές ή να δράσουν συνεπικουρικά με τα φάρμακα. Πέραν της φαρμακοβιομηχανίας, τα αρωματικά φυτά και τα προϊόντα τους όπως τα εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια αξιοποιούνται και στην παραγωγή φυσικών καλλυντικών προϊόντων και σαν βιοδραστικά συστατικά λειτουργικών τροφίμων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε το φυτό *Vitex Agnus Castus* γνωστό στην Ελλάδα με την ονομασία λυγαριά με σκοπό την ανάκτηση των βιοδραστικών του συστατικών και την αξιολόγηση των εκχυλισμάτων του ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση. Ένας από τους βασικούς λόγους που επιλέχθηκε το συγκεκριμένο φυτό είναι ότι φύεται σε πολλά μέρη του ελλαδικού χώρου χωρίς όμως να έχει πραγματοποιηθεί μια συστηματική αξιοποίησή του. Θεωρείται να είναι ένα φυτό «ανεξερευνήτο» σε σύγκριση με τα πιο κοινά ελληνικά βότανα, όπως η ρίγανη, το θυμάρι, το τσάι κ.α. Η χρήση του είναι πολύ διαδεδομένη στη Γερμανία και τις γειτονικές χώρες και το γεγονός ότι καλλιεργείται εντατικά εκεί ενώ στη χώρα μας βρίσκεται σε μεγάλες εκτάσεις ανεκμετάλλευτο αποτέλεσε έναυσμα και πρόκληση για την μελέτη και την αξιοποίησή του.

Ως βιοενεργά ή βιοδραστικά φυσικά συστατικά ορίζονται εκείνα που απαντούν σ' ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, καλλυντικών, συμπληρωμάτων διατροφής φυτικής ή ζωικής προέλευσης ή/και υποπροϊόντων τους, και τα οποία έχουν ευεργετικές δράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Ως παραδείγματα μπορούν να αναφερθούν οι βιταμίνες, οι πολυφαινόλες, τα λιπίδια (π.χ. πολυακόρεστα λιπαρά οξέα), οι πρωτεΐνες και πεπτίδια, οι πολυ- και oligo-σακχαρίτες, οι προβιοτικές καλλιέργειες μικροοργανισμών, κ.α.. Τα βιοδραστικά συστατικά από διάφορα

φυτικά υλικά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των πολλαπλών βιολογικών τους δράσεων (αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινογόνος, αντιμεταλλαξιγόνο, υποχοληστερολαιμική, υπογλυκαιμική, κ.α.). Η συνεχώς αυξανόμενη απαίτηση των καταναλωτών για «λειτουργικά» προϊόντα τροφίμων, καλλυντικών και συμπληρωμάτων διατροφής αποκτά ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον την τελευταία δεκαετία και έχει οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα στη δημιουργία νέων τεχνολογιών όπως μέθοδοι εκχύλισης-απομόνωσης βιοδραστικών συστατικών, τεχνικές μικροενθυλάκωσης.

Σύμφωνα με διεθνείς επιστημονικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, το φυτό *Vitex Agnus Castus* αποτελεί πηγή βιοδραστικών συστατικών όπως πολυφαινόλες και ενδορφίνες οι οποίες παρουσιάζουν δραστηριότητες με ορμονορυθμιστικό χαρακτήρα, καθώς συμβάλλουν στη σταθεροποίηση των επιπέδων της προγεστερόνης και της προλακτίνης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον κατευνασμό πολλών συμπτωμάτων που συνοδεύουν διάφορες γυναικολογικές παθήσεις. Ειδικότερα, η κατανάλωση σκευασμάτων λυγαριάς αναφέρεται πως συνεισφέρει στην αντιμετώπιση της κατάθλιψης και της συναισθηματικής έντασης που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης, των μασταλγείων που πλήττουν ένα μεγάλο τμήμα του γυναικείου πληθυσμού, καθώς και στη σταθεροποίηση της έμμηνου ρύσης σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. (A.R. Carmichael, 2008; Hajirahimkhan et al., 2013; Hoberg et al., 1999; Arentz et al., 2014)

Επιπρόσθετα, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού έχει αναφερθεί ότι συστατικά της λυγαριάς εμφανίζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε προϊόντα όπως τρόφιμα και καλλυντικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ενσωμάτωση φυτοενδορφινών λυγαριάς σε προϊόντα καλλυντικών, η οποία αποτέλεσε και έμπνευση για την ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης σε καλλυντικό γαλάκτωμα, με σκοπό την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής του δράσης με την πάροδο του χρόνου και την επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης. Πέραν όμως της καλλυντικής βιομηχανίας, η χρήση του φυτού *Vitex Agnus Castus* είναι διαδεδομένη και στη φαρμακοβιομηχανία, καθώς αρκετές γνωστές φαρμακευτικές εταιρίες έχουν παρασκευάσει

γυναικεία συμπληρώματα διατροφής με βάση βιοδραστικά συστατικά του *Vitex Agnus Castus*.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, διαφαίνεται καθαρά η ανάγκη μελέτης και εξερεύνησης των δυνατοτήτων που μπορεί να προσφέρει το εν λόγω βότανο εγχώριας παραγωγής. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε μια πρώτη προσπάθεια προσδιορισμού της δομής των βιοδραστικών συστατικών του φυτού εστιάζοντας κυρίως στην αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του. Παράλληλα, διερευνήθηκε η πρακτική εφαρμογή των παραχθέντων εκχυλισμάτων για την παρασκευή καλλυντικού προϊόντος, αξιολογώντας τη δυνατότητα ενσωμάτωσης των εκχυλισμάτων σε κατάλληλους φορείς-γαλακτώματα. Γι' αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση του πλουσιότερου σε αντιοξειδωτικά συστατικά εκχυλίσματος σε γαλάκτωμα-φορέα, το οποίο στη συνέχεια αποθηκεύτηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Κατά την αποθήκευση και σε τακτά χρονικά διαστήματα, προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση.

Σαφώς μια πλήρης και εμπειριστατωμένη έρευνα δεν περιορίζεται στα στενά πλαίσια μιας διπλωματικής εργασίας, αλλά θέτει τις βάσεις για περαιτέρω μελλοντική διερεύνηση του θέματος και προσέγγισή του από νέες επιστημονικές οπτικές.

Κεφάλαιο 1. Βιοδραστικά συστατικά και λυγαριά

1.1 Γενικά για τα βιοδραστικά συστατικά

Ως βιοδραστικά ή βιοενεργά συστατικά ορίζονται εκείνα τα συστατικά φυτικής, ζωικής ή θαλάσσιας προέλευσης για τα οποία υπάρχουν επαρκώς τεκμηριωμένα επιστημονικά δεδομένα ότι μπορούν να επιτελέσουν μια συγκεκριμένη λειτουργία εντός του οργανισμού. Αναλυτικότερα πρόκειται για ουσίες που περιέχονται σε διάφορα τρόφιμα ή φυτά και συμβάλλουν είτε στην πρόληψη εμφάνισης ασθενειών είτε στην ευεξία και την καλύτερη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Τέτοιου είδους ουσίες είναι βιταμίνες, λιπαρά οξέα, πολυφαινόλες, ταννίνες κ.α. οι οποίες μεταξύ άλλων ευεργετικών δράσεων εμφανίζουν και πλούσια αντιοξειδωτική δράση (*Biesalski et al.*, 2009).

Αναγνωρίζοντας την όλο και αυξανόμενη ανάγκη για αξιοποίηση τέτοιων συστατικών τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται εντατικές μελέτες που αφορούν στην απομόνωση, τον χαρακτηρισμό και την ενσωμάτωση τους σε διάφορα προϊόντα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ανάπτυξης προϊόντων πλούσιων σε βιοενεργά συστατικά αποτελούν τα λεγόμενα «λειτουργικά τρόφιμα». Με το συγκεκριμένο όρο αναφέρονται τα τρόφιμα τα οποία έχουν αναγνωρισμένη διατροφική αξία, είναι ευεργετικά για την υγεία και καταναλώνονται πέρα από τη βασική διατροφή (ορισμός σύμφωνα με *International Food Information Council*). Ωστόσο η αξιοποίηση βιοδραστικών συστατικών δεν περιορίζεται μόνο στον τομέα των τροφίμων και της διατροφής αλλά επεκτείνεται και σε άλλους τομείς με πλούσιες εφαρμογές όπως σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα και συμπληρώματα διατροφής.

Εστιάζοντας κυρίως στα βιοδραστικά συστατικά φυτικής προέλευσης, κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν ορισμένα παραδείγματα που τεκμηριώνουν την παραπάνω άποψη και αφορούν φυτά παρόμοιας δομής και σύστασης με το είδος *Vitex Agnus Castus* που μελετάται στην παρούσα εργασία. Σύμφωνα λοιπόν με μελέτη των *Choudhary et al.* (2015), τα αιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *Vitex negundo* Linn. και *Vitex trifolia* Linn. της οικογένειας *Verbenaceae* αποδείχτηκε πως περιέχουν πληθώρα βιοδραστικών συστατικών όπως φλαβόνες, κασιτίνη, αγνουσίδη, βιταμίνη C, φθαλικό οξύ, ιριδοειδείς γλυκοζίτες κ.α. Με βάση τα πειράματα και τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στην εν λόγω έρευνα, αποδείχτηκε πως τα αιθανολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν σημαντική αντιφλεγμονώδη,

αντιοξειδωτική και αναλγητική δράση ειδικότερα όσον αφορά την αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Μάλιστα, το βιοδραστικό συστατικό αγνουσίδη, που εντοπίστηκε σε μεγάλο ποσοστό στο αιθανολικό εκχύλισμα του *Vitex negundo Linn.*, μείωσε αισθητά τα επίπεδα αυξανόμενων κυτταροκινών. Οι κυτταροκίνες είναι μικρομοριακές πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται σε έξαρση όταν ο οργανισμός νοσεί και συμβάλλουν στην επίτευξη της ομοιόστασης και τη βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Βούλγαρη, 2003). Η ενδεχόμενη φαρμακευτική δράση του συγκεκριμένου φυτού επιβεβαιώνεται και από μία επιπλέον μελέτη των *Khan et al.*, (2013). Στην προκειμένη έρευνα πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την αξιολόγηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους και κυτοτοξικής δράσης των εκχυλισμάτων του φλοιού του φυτού *Vitex negundo*. Ως διαλύτες για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν εξάνιο, μεθανόλη και νερό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, τα εκχυλίσματα εμφάνισαν σημαντικό φαινολικό περιεχόμενο με το υδατικό να περιέχει τις πιο δραστικές φαινόλες και κατ' επέκταση να εμφανίζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ διαπιστώθηκε επίσης και ήπια έως μέτρια αντιμικροβιακή δράση. Το σημαντικότερο ωστόσο εύρημα, αποτέλεσε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να σταθεροποιούν μεμβράνες κυττάρων, με αποτέλεσμα την ομαλή λειτουργία τους. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να αποτελέσει ελπιδοφόρα εξέλιξη για την αντιμετώπιση παθήσεων που σχετίζονται με τον εκφυλισμό των κυττάρων όπως οι νευρολογικές και ο καρκίνος.

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω και αναλογιζόμενοι την πιθανή βιοδραστικότητά τους, τα φυτά χρήζουν περαιτέρω έρευνας, ώστε να διερευνηθεί η ενσωμάτωση τους στη σύγχρονη φαρμακευτική και την αντιμετώπιση ασθενειών. Στα πλαίσια αυτής της θεώρησης, παρακάτω μελετάται συστηματικά το φυτό *Vitex Agnus Castus*, γνωστό στη χώρα μας με την ονομασία λυγαριά, ως προς τα αντιοξειδωτικά συστατικά, τους τρόπους ανάκτησής τους και τις μεθόδους μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης.

1.1.1 Ελεύθερες ρίζες και Αντιοξειδωτικά συστατικά

Με τον όρο ελεύθερη ρίζα αναφέρεται ένα άτομο ή ομάδα ατόμων που κατέχει ένα μονήρες (ασύζευκτο) ηλεκτρόνιο, το οποίο δε συμμετέχει στο σχηματισμό χημικών δεσμών (*Morrison*

& Boyd, 1998). Ακριβώς λόγω του συγκεκριμένου ηλεκτρονίου οι ελεύθερες ρίζες εμφανίζουν μεγάλη δραστικότητα, καθώς μπορούν εξίσου εύκολα να δώσουν αλλά και να προσλάβουν ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να συμπεριφερθούν τόσο ως οξειδωτικά όσο και ως αναγωγικά και να συμμετέχουν εύκολα σε πλήθος χημικών αντιδράσεων. Περίσσεια ελεύθερων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό προκαλεί οξειδωτικές και άλλες μεταβολικές εντάσεις, καθώς αυτές επιτίθενται στα κύτταρα προσβάλλοντας τόσο την κυτταρική μεμβράνη που περιβάλλει την ενδοκυττάρια ζωή όσο και το νουκλεϊκό γενετικό υλικό RNA και DNA του πυρήνα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση βλαβών σχετικών με την κυτταρική δυσλειτουργία και την εμφάνιση εκφυλιστικών ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα η παρουσία ελευθέρων ριζών έχει συνδεθεί με ασθένειες όπως καρδιακές παθήσεις, διαβήτης, η νόσος *Alzheimer*, η νόσος *Parkinson* καθώς και κάποια είδη καρκίνου, ενώ παράλληλα έχουν ενοχοποιηθεί και για πρόωρη γήρανση του δέρματος. Η σύνδεση των ελευθέρων ριζών με την πρόωρη γήρανση και τη νόσο *Parkinson*, επιβεβαιώνεται και από τη σχετική μελέτη των *Kumar et al.*, (2012). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας, ασθενείς με νόσο *Parkinson* καθώς και άτομα μεγάλης ηλικίας εμφάνισαν έως και 50% αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων συγκριτικά με υγιή άτομα νεαρής ηλικίας.

Οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες που ευθύνονται για την πρόκληση νόσων είναι τα παράγωγα του οξυγόνου και ειδικότερα το σουπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\cdot -}$), η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), τα οποία συμμετέχουν και συνεισφέρουν σε αντιδράσεις οξείδωσης. Ειδικότερα οι ρίζες υδροξυλίου αντιδρούν με εξαιρετική ταχύτητα με οποιοδήποτε τύπο μορίου εντός του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, αμινοξέων, σακχάρων και νουκλεοτιδίων. Ως συνεργιστικοί παράγοντες στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών αναγνωρίζονται η θερμοκρασία, η υπεριώδης ακτινοβολία, η ρύπανση του αέρα και οι εσωτερικές τοξίνες όπως ο καπνός του τσιγάρου (*Gordon et al.*, 2001; Βαλαβανίδης, 2004; *Halliwel et al.*, 1990). Στον αντίποδα των ελευθέρων ριζών βρίσκονται οι διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες. Ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι η συμβολή στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών και κατ' επέκταση στην εξουδετέρωσή τους και την προστασία του οργανισμού από τυχόν βλάβες που αυτές προκαλούν. Ειδικότερα, αναστέλλουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το O_2 σε οργανικά μόρια, σταθεροποιούν τις

ελεύθερες ρίζες και τερματίζουν τις αντιδράσεις τους (Παπαγεωργίου, 2005; Halliwell et al., 1990).

Αναλυτικότερα για τον μηχανισμό δράσης των αντιοξειδωτικών, τα αντιοξειδωτικά (AH) δίνουν άτομα υδρογόνου:

A) σε υπεροξειδικές ρίζες (LOO[·]) υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες δρώντας ως ηλεκτρονιοδότες διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών σύμφωνα με την αντίδραση:



B) σε λιπιδικές ρίζες (L[·]) υπό συνθήκες περιορισμένης διάθεσης οξυγόνου δρώντας ως ηλεκτρονιοδέκτες διάσπασης αλυσίδας με βάση την αντίδραση:



Υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες η πρώτη αντίδραση είναι επικρατέστερη στα βιολογικά συστήματα λόγω της εξαιρετικά γρήγορης αντίδρασης της ρίζας L[·] με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας (Frankel & Meyer, 2000).

Στα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά συγκαταλέγονται οι ακόλουθες ενώσεις:

A) Ένζυμα

Παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, δρουν στο εσωτερικό των κυττάρων και καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες κατά τη διάρκεια του σχηματισμού τους. Τα πιο γνωστά από αυτά είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση, η υπεροξειδάση και το υπεροξειδίο της γλουταθειόνης. Συγκεκριμένα η καταλάση ήταν το πρώτο ένζυμο που χαρακτηρίστηκε ως αντιοξειδωτικό και καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου προς νερό και οξυγόνο ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$), ενώ η υπεροξειδική δισμουτάση εξουδετερώνει το σουπεροξειδικό ανιόν σχηματίζοντας H_2O_2 και O_2 και η ανακάλυψη της θεωρήθηκε μία από τις σημαντικότερες στον τομέα των ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Halliwell et al., 1990; Βαλαβανίδης, 2004).

B) Βιταμίνη E και C

Η βιταμίνη E αποτελεί το βασικότερο λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Αντιδρά εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες των λιπαρών οξέων και ενώ οξειδώνεται η ίδια, αποτρέπει την οξείδωση των λιπιδίων που έχει σαν αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών στους ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, αδρανοποιεί τις οξυγονούχες ρίζες προσφέροντάς τους το υδρογόνο της ομάδας του φαινολικού υδροξυλίου (-OH). Στη συνέχεια, η οξειδωμένη της μορφή δεν παραμένει έτσι αλλά ανάγεται παρέχοντας μια κινόνη ή επανασηματίζει την τοκοφερόλη με τη βοήθεια της βιταμίνης C και της γλουταθειόνης. Η δέσμευση των ριζών από την τοκοφερόλη τερματίζει την αλυσιδωτή αντίδραση και προστατεύει τα γεινιάζοντα λιποειδή από την οξείδωση (Engin et al., 2009). Όσον αφορά τη βιταμίνη C, δρα τόσο σε συνδυασμό με τη βιταμίνη E όσο και μόνη της, ανάγοντας μεταβατικά μέταλλα (Cu^{2+} , Fe^{3+}), τα οποία μπορεί να προκαλέσουν κυτταρική βλάβη μέσω της παραγωγής δραστικών μορφών και ελεύθερων ριζών οξυγόνου. (Traber et al., 2011)

Γ) Καροτενοειδή και ιδιαιτέρως το β – καροτένιο

Πρόκειται για μια ομάδα φυσικών χρωστικών που περιλαμβάνει περισσότερες από 600 ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές προσδίδουν το κίτρινο, το πορτοκαλί και το κόκκινο χρώμα σε πολλά φρούτα και λαχανικά. Πολλά καροτενοειδή είναι πρόδρομες ενώσεις της βιταμίνης A ή της ρετινόλης (Olson et al., 1995; Britton et al., 1995). Τα καροτενοειδή και ιδιαιτέρως το **β – καροτένιο** είναι οι ισχυρότεροι απενεργοποιητές του μονήρους οξυγόνου (O_2) ενώ παράλληλα αντιδρούν και καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου που παράγονται κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Hirayama et al., 1994; Di Mascio et al., 1989; Krinsky, 1994). Συγκεκριμένα το λυκοπένιο που απαντάται σε μεγάλες ποσότητες στην τομάτα καθώς και το β- καροτένιο έχει αποδειχτεί πως εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση έναντι των ελευθέρων ριζών που προκαλούν καρδιακές και οφθαλμολογικές παθήσεις όπως η φωτοευαισθησία, σύμφωνα με μελέτη των Fiedor et al., (2014).

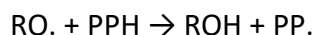
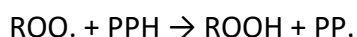
Δ) Πολυφαινόλες (Φαινολικά οξέα, Φλαβονοειδή, Στιλβένια, Λιγνάνες)

Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών με πλούσια και πολύπλευρη αντιοξειδωτική δράση και περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα, τα

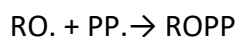
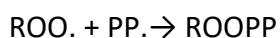
φλαβονοειδή, τα στυλβένια και τις λιγνάνες (Παπαγεωργίου, 2005). Ουσιαστικά πρόκειται για μια ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα OH σε βενζολικό δακτύλιο (Manach et al., 2004).

Δ1) Φαινολικά οξέα:

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν τη δεύτερη πιο διαδεδομένη κατηγορία των φαινολικών ενώσεων, τα οποία ανευρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα (Manach et al., 2004). Στην τάξη αυτή ανήκουν τα υδροξυ-παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, τα παράγωγα του φαινυλοξικού οξέος και τα παράγωγα του κινναμωνικού οξέος. Κυριότερος αντιπρόσωπος των παραγώγων αυτών είναι το καφεϊκό οξύ, που βρίσκεται στον καφέ εστεροποιημένο με την 5-OH του κινικού οξέος και ονομάζεται χλωρογενικό οξύ (Παπαγεωργίου, 2005). Ευρέως διαδεδομένα φαινολικά οξέα είναι επίσης και το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ και το σιναπτικό οξύ (Manach et al., 2004). Όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση, τα φαινολικά οξέα λειτουργούν τόσο ως ουσίες που τερματίζουν τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και όσο και σαν χηλικοποιητές μεταλλικών ιόντων καταλύοντας την υπεροξειδάση των λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα, τα φαινολικά αντιοξειδωτικά (PPH) εμπλέκονται στην οξειδωση των λιπιδίων και άλλων μορίων με το να δίνουν ταχύτητα ένα άτομο υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες (ROO., RO.) όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις:



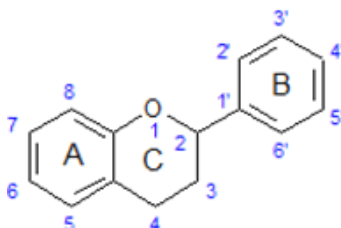
Επιπλέον, τα ενδιάμεσα της φαινόξυ-ρίζας είναι σχετικά σταθερά και συνεπώς δεν μπορεί εύκολα να ξεκινήσει μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση. Τα ενδιάμεσα της φαινόξυ-ρίζας δρουν επίσης ως οι ουσίες που τερματίζουν τον πολλαπλασιασμό των ριζών αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



(Shahidi et al.,1992)

Δ2) Φλαβονοειδή:

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη των φαινολικών ενώσεων (Manach et al., 2004). Οι ενώσεις αυτές περιέχουν φαινολικά υδροξύλια συνδεδεμένα στους δακτύλιους A, B και C όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

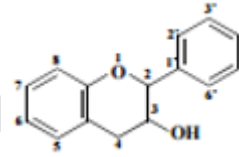
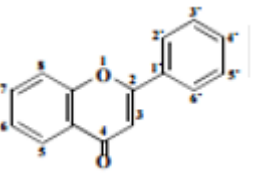
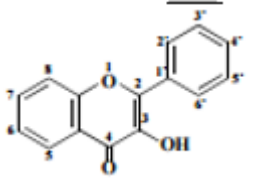
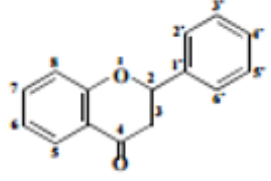
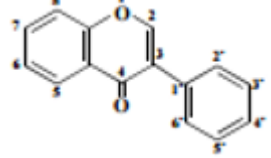


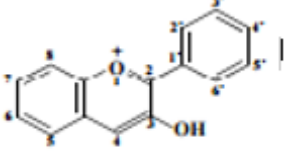
Εικ. 1. Βασική δομή ανθρακικού σκελετού φλαβονοειδών. (Παπαγεωργίου, 2005)

Η τάξη των φλαβονοειδών αποτελείται από τις παρακάτω οικογένειες: φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβανόνες, ανθοκυανίνες και προανθοκυανιδίνες που διαφέρουν κυρίως στον ετεροκυκλικό C-δακτύλιο (Heim et al., 2002). Όλες οι οικογένειες των φλαβονοειδών προέρχονται από ένα κοινό βιοσυνθετικό δρόμο. Επιπλέον μετατροπές γίνονται σε διάφορα στάδια με αποτέλεσμα μεταβολές στην έκταση της υδροξυλίωσης, της μεθυλίωσης, το διμερισμό και τη γλυκοσυλίωση. Όσον αφορά τις φλαβονόλες, αντιπροσωπεύονται κυρίως από την καμφερόλη, την κερκετίνη, τη μυρικετίνη και τη φισετίνη. Η κερκετίνη είναι η κυριότερη φλαβονόλη στην ανθρώπινη διατροφή και βρίσκεται σε πολλά φρούτα, λαχανικά και ποτά και ιδιαίτερα στα κρεμμύδια (Hertog et al., 1992) και στον καφέ (Hertog et al., 1993). Συνεχίζοντας με τις φλαβανόνες αντιπροσωπεύονται κατά κύριο λόγο από τις ουσίες ναρινγενίνη, ταξοφολίνη και εσπεριδίνη και βασικότερη πηγή τους είναι τα εσπεριδοειδή και ιδίως τα πορτοκάλια (Tomas-Barberan et al., 2000; Rousseff et al., 1987). Στις ισοφλαβόνες ο B δακτύλιος εντοπίζεται στην 3 θέση του C δακτυλίου. Αντιπροσωπεύονται από την δαϊδζεΐνη τη γενιστεΐνη και εντοπίζονται κυρίως στη σόγια (Reinii et al., 1996). Οι συγκεκριμένες ενώσεις έχουν εγείρει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς έχουν ιδιότητες οιστρογόνων και σύμφωνα με μελέτη των Tapiero et al., (2002), συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού και της οστεοπόρωσης. Τέλος, οι ανθοκυανιδίνες είναι οι κόκκινες, μπλε και βιολετί χρωστικές των φρούτων. Οι προανθοκυανιδίνες συγκεκριμένα αποτελούνται από μονομέρη και ολιγομερή

της φλαβανόλης. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα διάφορα είδη φλαβονοειδών, οπιο γνωστές ουσίες σε κάθε κατηγορία και οι βασικότερες διατροφικές πηγές άντλησής τους. (Heim et al., 2002)

Πίνακας 1. Δομή Φλαβονοειδών

Γενική δομή	Φλαβονοειδές	Πηγή
<p>Φλαβανόλες (Κατεχίνες)</p> 	<p>(+) – Κατεχίνη (-) – Επικατεχίνη 3-Γαλλουόλο-επικατεχίνη</p>	<p>Τσάι Τσάι Κόκκινο κρασί</p>
<p>Φλαβόνες</p> 	<p>Χρυσίνη Απιγενίνη Λουτεονίνη 4',7-διγλυκοσίδιο- λουτεονίνη</p>	<p>Φρούτα Σέλινο Κόκκινο πιπέρι Κόκκινο πιπέρι</p>
<p>Φλαβονόλες</p> 	<p>Καμφερόλη Κερκετίνη Μυρικετίνη Ταμαριζετίνη Ισοραμετίνη</p>	<p>Μαύρο τσάι Μπρόκολα Κρεμμύδια Καφές</p>
<p>Διυδροφλαβόνες (Φλαβανόνες)</p> 	<p>Ναρινγενίνη Ναρινγίνη Ταξιφολίνη Εσπεριδίνη</p>	<p>Κίτρα Κίτρα Κίτρα Πορτοκάλια</p>
<p>Ισοφλαβόνες</p> 	<p>Γενιστίνη Γενιστεΐνη Δαιδζίνη Δαιδζεΐνη</p>	<p>Σόγια Σόγια Σόγια Σόγια</p>

<p>Ανθοκυανιδίνες</p> 	<p>Απιγενιδίνη Κυανιδίνη Καμπφερόλη Δελφινιδίνη Μαλβιδίνη Πελαργονιδίνη</p>	<p>Φρούτα με έντονα χρώμα Κεράσια Φράουλες Βατόμουρα</p>
---	---	--

Τα φλαβονοειδή είναι μεταξύ των πιο ισχυρών φυσικών αντιοξειδωτικών επειδή έχουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω δομικά στοιχεία τα οποία εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική δράση.

1. Μία ο-διαφαινολική ομάδα στο δακτύλιο Β, η οποία προσφέρει υψηλή σταθερότητα στο σχηματισμό ριζών και συμμετέχει στον εκτοπισμό των ηλεκτρονίων
2. Έναν 2-3 διπλό δεσμό σε συζυγία με την 4-οξοδράση στον C δακτύλιο, υπεύθυνο για τον εκτοπισμό ηλεκτρονίων από τον Β δακτύλιο
3. Υδροξυλάσες στις θέσεις 3 και 5 μαζί με την 4-οξοδράση στους Α και C δακτύλιους για μέγιστη δυνατότητα δέσμευσης των ριζών (Ratty *et al.*, 1988).

Δ3) Στιλβένια και Λιγνάνες:

Όσον αφορά τα στιλβένια και τις λιγνάνες, δεν είναι ευρέως διαδεδομένα στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Απαντώνται σε μικροποσότητες στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου, ωστόσο εμφανίζουν πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων όπως αντιοξειδωτικές και ανταγωνιστικές δράσεις ως προς τα οιστρογόνα (Manach *et al.*, 2004).

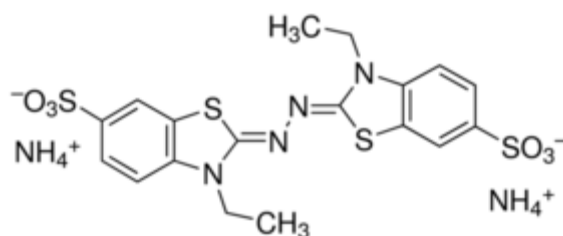
1.1.2 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Ο σημαντικός ρόλος των αντιοξειδωτικών στην αποτροπή σημαντικών χρόνιων ασθενειών οδήγησε στην ανάγκη εύρεσης μεθόδων για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων ουσιών. Η βασική αρχή που ακολουθείται στις μεθόδους που αναπτύχθηκαν είναι κοινή και σχετικά απλή. Αρχικά, στο διάλυμα που εμπεριέχει το αντιοξειδωτικό προστίθεται μία άλλη ουσία που παράγει ελεύθερες ρίζες. Κατόπιν εξετάζεται ο χρόνος που θα

μεσολαβήσει μέχρι να επιτευχθεί οξείδωση του διαλύματος. Όσο μεγαλύτερο είναι αυτό το διάστημα, τόσο ισχυρότερο είναι το αντιοξειδωτικό, καθώς σε αυτό οφείλεται η υστέρηση. Στη συνέχεια παρατίθενται ορισμένες από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης μίας ουσίας.

A) Μέθοδος TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

Η μέθοδος TEAC προτάθηκε το 1993 και βασίζεται στην ικανότητα του αντιοξειδωτικού να καταστρέφει ανιόντα της ρίζας ABTS⁻ σε σύγκριση με την αντίστοιχη δράση μιας ποσότητας Trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E) ορισμένης συγκέντρωσης. Η αντιοξειδωτική δράση γίνεται ορατή με αποχρωματισμό του διαλύματος ενώ η κινητική της αντίδρασης παρακολουθείται με φωτομέτρηση στα 734 nm (Zhu *et al.*, 1994; Sugihara *et al.*, 1999; Sahu *et al.*, 1997). Η δραστηριότητα κάθε ουσίας έναντι του ABTS⁺ εκφράζεται με τα ισοδύναμα TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), δηλαδή τη συγκέντρωση σε mM διαλύματος Trolox (συνθετικό ανάλογο της βιταμίνης E) που αντιστοιχεί στην ίδια δράση με διάλυμα 1 mM της ουσίας (Antolovich *et al.*, 2002).



Εικ. 2. Δομή του μορίου ABTS

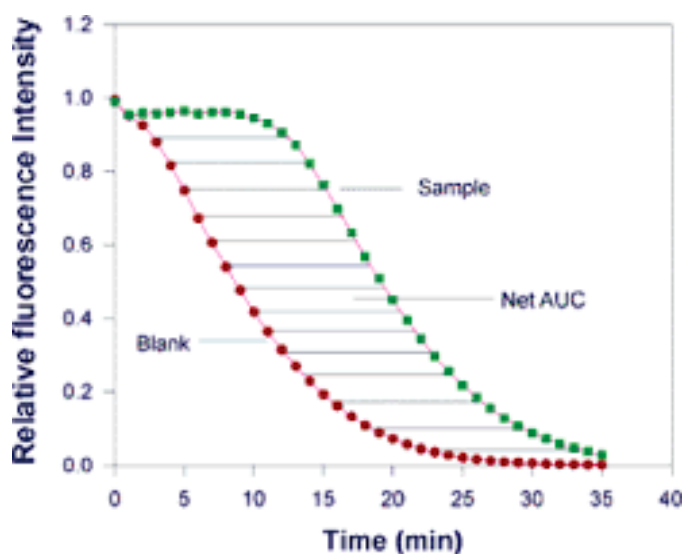
B) Μέθοδος *Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP)*

Η μέθοδος *Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP)* προτάθηκε από τον Wayner και αποτελεί την πιο παλιά και χρησιμοποιημένη μέθοδο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης. Η βασική της αρχή είναι η ικανότητα της αζώνωσης ABAP να παράγει ελεύθερες ρίζες καθώς αποσυντίθεται. Οι ρίζες αυτές είναι αρκετά δραστικές ώστε να αποσπάζουν ένα υδρογόνο ξεκινώντας έτσι μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσης.

Στη μέθοδο αυτή ο χρόνος υστέρησης προσδιορίζεται από το ρυθμό κατανάλωσης του οξυγόνου που υπάρχει διαλυμένο στο διάλυμα, ενώ η σύγκριση γίνεται με μια γνωστή ποσότητα *Trolox* (Galey, 1997). Βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν ο μεγάλος χρόνος που απαιτείται για να γίνει μια μέτρηση και η υψηλή συγκέντρωση πλάσματος που απαιτείται για να προκύψει ένας κατάλληλος για προσδιορισμούς χρόνος υστέρησης, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης (Ueda et al., 2002). Στην πραγματικότητα, οι τιμές TRAP για κάποιο αντιοξειδωτικό αυξάνονται με την αύξηση της συγκέντρωσης αντί να παραμένουν σταθερές. Έως τώρα για την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου ζητήματος χρησιμοποιήθηκε η προσθήκη λινολεϊκού οξέος στο μίγμα, αλλά το μόνο που επιτεύχθηκε ενδεχομένως ήταν η δημιουργία μιας ακόμα πηγής συστηματικού σφάλματος (Ismail et al., 2001).

Γ) Μέθοδος *Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC)*

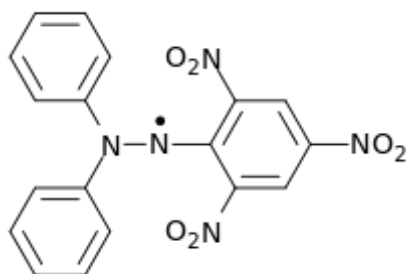
Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στη μεταβολή που επέρχεται σε ένα φθορίζον δείγμα εξαιτίας της παρουσίας ελευθέρων ριζών. Πιο συγκεκριμένα η ύπαρξη ελευθέρων ριζών μεταβάλλει την ένταση του φθορισμού, ενώ στον αντίποδα η ύπαρξη αντιοξειδωτικού συμβάλλει στην προστασία της φθορίζουσας ουσίας. Πραγματοποιείται συσχέτιση της έντασης φθορισμού με την πάροδο του χρόνου και έπειτα από μαθηματική ολοκλήρωση υπολογίζεται το εμβαδόν της μέτρησης με το τυφλό (*AUC Area Under the Curve*) και το αντίστοιχο εμβαδόν με το αντιοξειδωτικό. Η διαφορά των δύο αυτών εμβαδών παρουσιάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα της προς μελέτη ουσίας. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι παρέχει ακριβέστερο ποσοτικό προσδιορισμό συγκριτικά με τις υπόλοιπες λόγω των εμβαδών. (Bors et al., 1995)



Εικ. 3. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με υπολογισμό του εμβαδού κάτω από την καμπύλη (*net Area Under the Curve*).

Δ) Μέθοδος DPPH

Η εν λόγω μέθοδος αναγωγής της ρίζας DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρύλοϋδράζυλο) αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες για τον προσδιορισμό της εκκαθάρισης των ελευθέρων ριζών από τα διάφορα αντιοξειδωτικά, καθώς παρέχει ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα με μια απλή και μη χρονοβόρα διαδικασία. Το διάλυμα που περιέχει την ελεύθερη ρίζα DPPH έχει ένα χαρακτηριστικό σκούρο μωβ χρώμα και απορροφά στα 515 nm. Η παρουσία αντιοξειδωτικής ουσίας στο διάλυμα το αποχρωματίζει ενώ παράλληλα μειώνει την απορρόφηση. Συνεπώς όσο περισσότερο μειώνεται η απορρόφηση τόσο πιο ισχυρό είναι το αντιοξειδωτικό που εξετάζεται. Τα αποτελέσματα εκφράζονται συνήθως σε ισοδύναμα Trolox (mmol αντιοξειδωτικού/ L διαλύματος) (Wayner *et al.*, 1985; Ghiselli *et al.*, 2000).



Εικ. 4. Ελεύθερη ρίζα DPPH.

Όλες οι μέθοδοι που προαναφέρθηκαν χρησιμοποιούνται ευρέως για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης ουσιών, δηλαδή κατά πόσο το φαινολικό περιεχόμενο ενός δείγματος είναι δραστικό ως προς τη δέσμευση και την καταστολή των ελευθέρων ριζών. Ωστόσο σημασία πρέπει να δοθεί και στον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, κάτι που πραγματοποιείται κατά κόρον με τη μέθοδο **Folin-Ciocalteu** (Waterhouse, 2005). Πρόκειται για μία φωτομετρική τεχνική που βασίζεται σε μια οξειδοαναγωγική αντίδραση, κατά την οποία τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται ενώ το αντιδραστήριο FC ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το κυανό διάλυμα που προκύπτει απορροφά στα 750 nm και η απορρόφηση αυτή είναι ανάλογη του συνολικού φαινολικού περιεχομένου. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 (Balentine et al., 1997). Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με την παρούσα μέθοδο εκφράζονται συνήθως σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Σουφλερός, 1997).

1.2 Λυγαριά: *Vitex Agnus Castus*

1.2.1 Γενικά για τη λυγαριά

Με τον όρο *Vitex Agnus Castus* είναι γνωστό το θαμνώδες φυτό που αποτελεί μέλος της οικογένειας *Verbenaceae* και προέρχεται από τη Μεσόγειο και την Ασία. Η λατινική ονομασία *agnus* προέρχεται από την ελληνική λέξη αγνός, καθώς το φυτό θεωρείται αναφροδισιακό και ηρεμιστικό (Odenthal, 1998). Στην ελληνική περιφέρεια το φυτό είναι ευρέως γνωστό με την ονομασία «λυγαριά».

Πρόκειται για έναν ευλύγιστο φυλλοβόλο θάμνο (εξ' ου και η ελληνική ονομασία «λυγαριά»), ο οποίος φύεται σε παραθαλάσσιες και παραποτάμιες περιοχές και το ύψος του φτάνει συνήθως τα τρία μέτρα. Τα φύλλα της λυγαριάς είναι λογχοειδή και ανά πέντε ενωμένα με τον κεντρικό βλαστό. Τα άνθη της ποικίλουν στα χρώματα λιλιά, ροζ, λευκό (με τα πρώτα να είναι πιο διαδεδομένα στην ελληνική ύπαιθρο) και έχουν χαρακτηριστική, ωραία οσμή (Tutin et al., 1972). Η περίοδος ανθοφορίας ξεκινάει τον Ιούνιο και ολοκληρώνεται τον Σεπτέμβριο, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί η περίοδος καρποφορίας μέχρι και τον Νοέμβριο. Ο καρπός της λυγαριάς είναι αρωματική δρύπη και μέσα στη φύλλα της υπάρχουν μικρά κουκούτσια που μοιάζουν με κόκκους πιπεριού και αξιοποιούνται σε

φαρμακευτικές εφαρμογές. Γενικά είναι ανθεκτικό είδος τόσο σε υψηλές όσο και χαμηλές θερμοκρασίες (Draxler *et. al.*, 2004; Lovászik, 1996).



Εικ. 5. Άνθη *Vitex Agnus Castus*



Εικ. 6. Καρπός *Vitex Agnus Castus*

Κάνοντας μια γρήγορη ιστορική αναδρομή, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η λυγαριά αποτελεί φυτό γνωστό για τον φαρμακευτικό του χαρακτήρα από την αρχαιότητα. Πιο συγκεκριμένα ο Ιπποκράτης σε ιατρικά του δοκίμια αναφέρει πως το έχει χρησιμοποιήσει σε τραύματα, φλεγμονές και οιδήματα, γεγονός που μαρτυρά την αντιμικροβιακή του δράση. Επιπρόσθετα έγινε χρήση του και ως εμμηναγωγό καθώς και στην αποβολή του πλακούντα μετά τον τοκετό. Η χρήση του συνεχίστηκε και κατά τα ρωμαϊκά χρόνια, όπου το αξιοποιούσαν για να αυξάνουν τη γαλακτόρροια στις νέες μητέρες και να περιορίζουν τις αιμορραγίες μετά τις γέννες (Ohyama *et al.*, 2003; Roemheld-Hamm, 2005; Webster *et al.*, 2006). Φτάνοντας μέχρι τη σημερινή εποχή η χρήση του φυτού συνεχίζεται εντατικά κυρίως στη Γερμανία και τις γύρω χώρες με την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής για γυναίκες. Αλλά και στον ελληνικό χώρο η λυγαριά κερδίζει έδαφος καθώς γίνεται χρήση της στην καλλυντική βιομηχανία. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν την έγερση του διεθνούς επιστημονικού ενδιαφέροντος πάνω στο συγκεκριμένο φυτό και τα βιοδραστικά του χαρακτηριστικά.

1.2.2 Βιοδραστικά συστατικά λυγαριάς

Η λυγαριά έχει χαρακτηριστεί από πολλούς ως το «γυναικείο βότανο» εξαιτίας των ευεργετικών δράσεων που επιφέρει η χρήση της στον γυναικείο οργανισμό. Προτού γίνει αναφορά στις συγκεκριμένες δράσεις κρίνεται σκόπιμο να δοθεί το προφίλ του φυτού ως προς τα βιοδραστικά συστατικά που περιέχει. Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες που έχουν

διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια, έχει επισημανθεί πως η λυγαριά είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά όπως φλαβονοειδή και ιριδοειδείς γλυκοσίδες, καθώς και τερπενοειδή (ιδιαίτέρως καρτενοειδή).

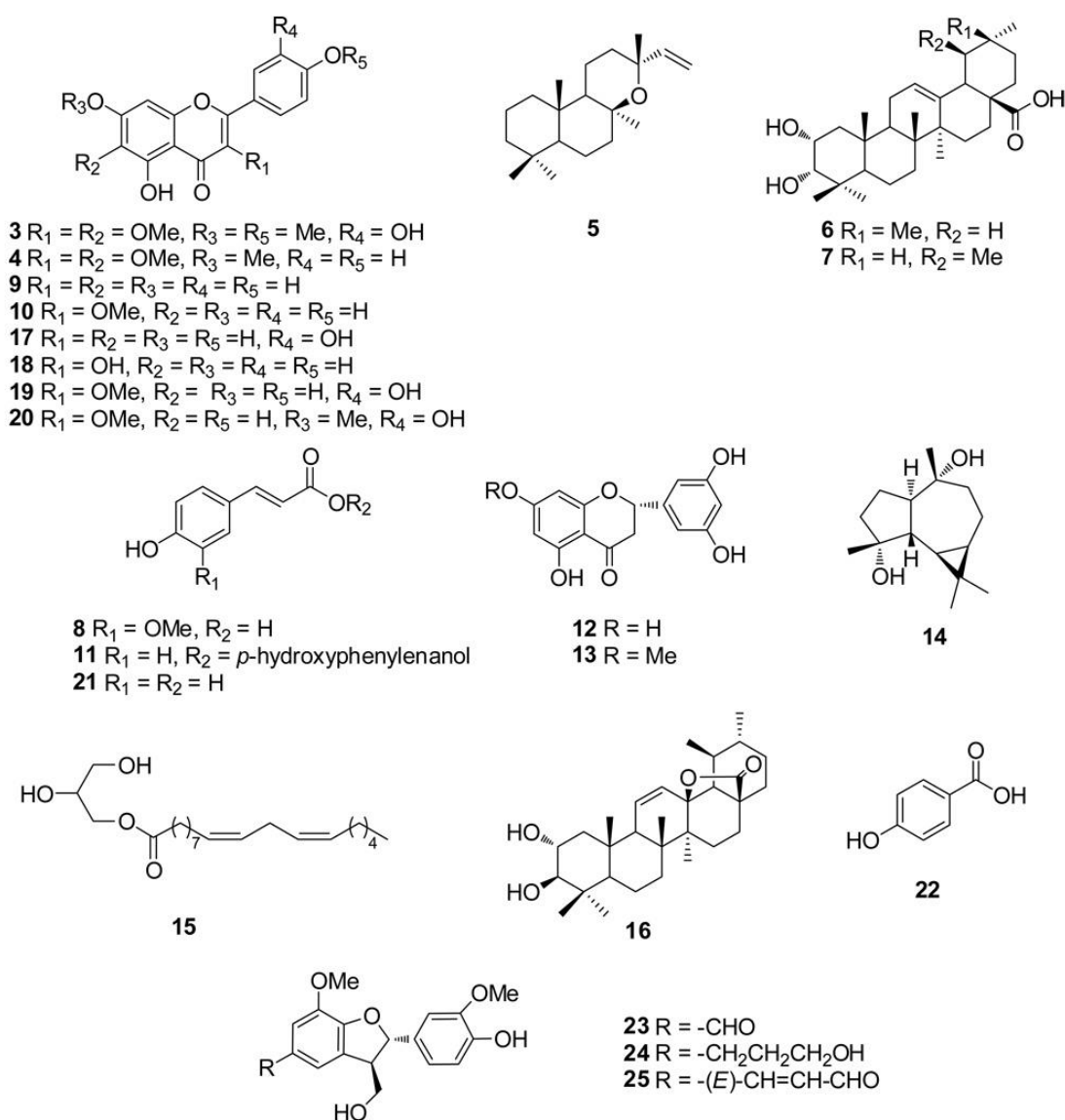
(α) Συστατικά αιθέριου ελαίου

Σύμφωνα με μελέτη των *Duygus et al.*, (2014), το αιθέριο έλαιο λυγαριάς περιέχει σε μεγάλο ποσοστό συστατικά όπως **1,8-κινεόλη, σαβινένιο, p-πινένιο, β-φαρνεσένιο και trans-καρφοφυλλένιο**. Πέραν των συγκεκριμένων συστατικών, σύμφωνα με τους *Khalilzadeh et al.*, (2015), το αιθέριο έλαιο των φύλλων *Vitex Agnus Castus* είναι πλούσιο σε ουσίες όπως **σαβινένιο, R-(+)-λιμονένιο, οξείδιο του καρφοφυλλενίου, β-φαρνεσένιο, και ευγενόλη**. Οι περισσότερες ουσίες που προαναφέρθηκαν ανήκουν στην κατηγορία των τερπενοειδών. Πρόκειται για ένα σύνολο οργανικών ουσιών που απαντώνται στα φυτά και τα αιθέρια έλαια που προκύπτουν από αυτά. Είναι γνωστά και με την ονομασία ισοπρενοειδή καθώς αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες C_5H_8 . Διακρίνονται σε μονοτερπένια (10 άτομα C), διτερπένια (20 άτομα C), τριτερπένια κ.ο.κ. Μάλιστα στην κατηγορία των τετρατερπενίων συγκαταλέγονται και τα καρτενοειδή που έχουν αναφερθεί παραπάνω. Σύμφωνα με τους *Chen et al.*, (2011), ένα από τα πιο χαρακτηριστικά καρτενοειδή που απαντώνται στο αιθέριο έλαιο λυγαριάς είναι η **λουτεΐνη**. Επιπλέον, σύμφωνα με τους *GÖKBULUT et al.*, (2010), στο αιθέριο έλαιο του φυτού *Vitex Agnus Castus* ταυτοποιείται ένα ακόμα σημαντικό βιοδραστικό συστατικό, η **βιτεξίνη**, η οποία ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και απαντάται στα διάφορα είδη της φυτικής οικογένειας *Vitex*.

(β) Φαινολικά συστατικά

Σύμφωνα με μελέτη των *Mari et al.*, (2012), στο αιθανολικό εκχύλισμα των καρπών λυγαριάς ταυτοποιήθηκαν οι ουσίες **αγνουσίδα, αουκοβίνη και καστισίνη**, οι οποίες συγκαταλέγονται στην κατηγορία των ιριδοειδών. Οι συγκεκριμένες ουσίες αποτελούν δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες που εξαιτίας της πολύπλευρης δράσης τους που θα αναλυθεί στη συνέχεια έχουν βρει εφαρμογή στη φυτοθεραπευτική και την κλασική ιατρική. Η ύπαρξη φαινολικών συστατικών στη λυγαριά επιβεβαιώνεται και από τη σχετική μελέτη των *Chen et*

al., (2011). Στη συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις των καρπών με υδατικά διαλύματα μεθανόλης και τα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων που προέκυψαν ταυτοποιήθηκαν με τις μεθόδους *NMR* και *MS*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα μεθανολικά εκχυλίσματα εμπεριείχαν 10 ενώσεις της οικογένειας των φλαβονοειδών, 5 τερπενοειδή, 4 νεολιγάνες (φυσικά προϊόντα που χαρακτηρίζονται από την ένωση 2 μονάδων C_6C_3), 4 φαινολικά συστατικά καθώς και μία γλυκοσίδη. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα 23 βιοδραστικά συστατικά όπως ταυτοποιήθηκαν μέσω των μεθόδων *NMR* και *MS*.



Εικ. 7. Ταυτοποιημένα βιοδραστικά συστατικά καρπού *Vitex Agnus Castus*

Επιπρόσθετα, στη συγκεκριμένη μελέτη επιβεβαιώθηκε και η παρουσία των φλαβονών **απιγενίνη** και **3-μέθυλ-καμφερόλη** στα μεθανολικά εκχυλίσματα των καρπών. Μία επιπλέον σχετική έρευνα είναι αυτή των *Hajirahimkhan et al.*, (2013), η οποία επιβεβαιώνει την παρουσία των φλαβονοειδών **απιγενίνη** και **πανδουλετίνη**, καθώς και του ιριδοειδούς **αγνουσίδη** στο μεθανολικό εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.

(γ) Τερπενοειδή

Σύμφωνα με τους *Hoberg et al.*, (1999), βιοδραστικά συστατικά όπως η **βιτεξилаκτόνη** και το **ροτουνδιφουράνιο** εντοπίστηκαν στο εκχύλισμα εξανίου των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*. Η ύπαρξη του συστατικού ροτουνδιφουράνιο επιβεβαιώνεται και στο μεθανολικό εκχύλισμα των καρπών του φυτού σύμφωνα με τους *Hajirahimkhan et al.*, (2013). Επιπρόσθετα, με βάση τη μελέτη που πραγματοποίησε ο *A.R. Carmichael*, (2008), στα εκχυλίσματα του καρπού *Vitex Agnus Castus* εντοπίζεται μια ομάδα ενώσεων που καλούνται **κλεροδιαδιενόλες** και ανήκουν στην κατηγορία των διτερπενίων.

1.2.3 Δράση των συστατικών λυγαριάς στον ανθρώπινο οργανισμό

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, τόσο τα εκχυλίσματα όσο και το αιθέριο έλαιο του φυτού *Vitex Agnus Castus* εμπεριέχουν πληθώρα βιοδραστικών συστατικών που αποδίδουν σε αυτό πολύπλευρη θεραπευτική δράση.

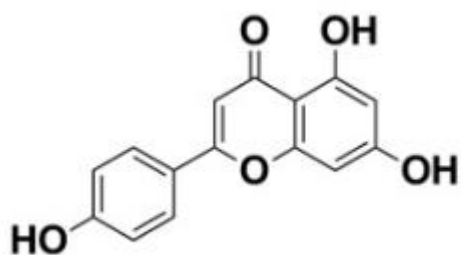
(α) Βιοδραστικά συστατικά αιθέριου ελαίου

Ξεκινώντας από τα βιοδραστικά συστατικά που απαντώνται στο αιθέριο έλαιο της λυγαριάς, με βάση τη σχετική μελέτη των *Khalilzadeh et al.*, (2015), διαπιστώθηκε πως το αιθέριο έλαιο των φύλλων *Vitex Agnus Castus* παρουσιάζει ισχυρή **αναλγητική δράση**. Αναλυτικότερα, στο παρόν πείραμα, τα εξεταζόμενα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε διάφορα μοντέλα πόνου ενώ σε κάποια από αυτά είχε προηγουμένως χορηγηθεί σκεύασμα με αιθέριο έλαιο *vitex*. Παρατηρήθηκε πως τα πειραματόζωα στα οποία είχε χορηγηθεί το αιθέριο έλαιο εμφάνισαν καλύτερη προσαρμογή στα μοντέλα πόνου, γεγονός που υποδεικνύει την αναλγητική δράση που αποδίδουν τα επιμέρους βιοδραστικά συστατικά στο αιθέριο έλαιο. Επιπλέον, σύμφωνα με τους *GÖKBULUT et al.*, (2010) αλλά και τους *Chen et al.*, (2011), τα βιοδραστικά συστατικά

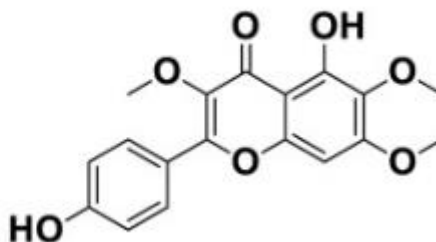
λουτεΐνη και βιτεξίνη παρουσιάζουν πλούσια **αντιοξειδωτική** και **κυτοτοξική** δράση έναντι καρκινικών κυττάρων. Ειδικότερα για την αντικαρκινική δράση της βιτεξίνης, έχουν τοποθετηθεί με σχετική μελέτη και οι Zhou et al., (2009), στα αποτελέσματα της οποίας αποδεικνύεται η ικανότητα της βιτεξίνης να συμβάλλει στην καταστροφή καρκινικών κυττάρων του μαστού και του προστάτη. Τέλος, σύμφωνα με σχετική μελέτη των Ghannadi et al., (2012), το βιοδραστικό συστατικό οξείδιο του καρυοφυλλενίου, που εντοπίστηκε σε σημαντική ποσότητα στο έλαιο, εμφάνισε **αντιμικροβιακή δράση** επί των μικροοργανισμών *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*, εφάμιλλη φαρμακευτικών χημικών ουσιών όπως οι χλωραμφελικόλη και αμοξιλίνη.

(β) Φαινολικά συστατικά

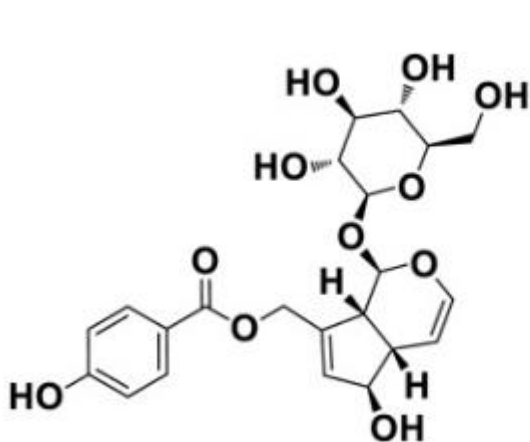
Σύμφωνα με τη μελέτη των Chen et al., (2011), που προαναφέρθηκε, τα βιοδραστικά συστατικά απιγενίνη, 3-μέθυλ-καμφερόλη, λουτεΐνη και κασιτίνη που ταυτοποιήθηκαν στα μεθανολικά εκχυλίσματα των καρπών, αποδείχτηκαν ασθενή **προσδέματα με οποιοειδείς υποδοχείς του εγκεφάλου**, που επιφέρουν ανακούφιση από τον πόνο και χαλάρωση. Ειδικότερα όσον αφορά την κασιτίνη, με βάση σχετική μελέτη των Mesaik et al., (2009), εμφανίζεται να παρουσιάζει επίσης τόσο **κυτοτοξική/αντικαρκινική** δράση όσο και ρυθμιστικό χαρακτήρα επί του ανοσοποιητικού συστήματος. Εξ' άλλου, σημαντική έχει αποδειχτεί η δράση της λυγαριάς και κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης. Η συγκεκριμένη περίοδος στη ζωή των γυναικών πολύ συχνά συνοδεύεται από ενοχλητικά συμπτώματα όπως αυξομειώσεις του βάρους, αυπνίες, απότομες αλλαγές της θερμοκρασίας, οξυθυμία, κατάθλιψη κ.α. Βασική αιτία των παραπάνω είναι η σημαντική μείωση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης που παρατηρείται στη διάρκεια της κλιμακτηρίου. Σύμφωνα με μελέτη των Hajirahimkhan et al., (2013), τα συστατικά απιγενίνη και πανδουλετίνη του φυτού *Vitex Agnus Castus* έχουν την ικανότητα να προσδέονται στους εξειδικευμένους υποδοχείς παραγωγής οιστρογόνων, ενώ τα συστατικά ροτουνδιφουράνιο και αγνουσίδη στους αντίστοιχους υποδοχείς παραγωγής προγεστερόνης. Κατ' αυτόν τον τρόπο ευνοείται η αύξηση των επιπέδων των οιστρογόνων και της προγεστερόνης με αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας ζωής κατά την εμμηνόπαυση. Η δομή των τεσσάρων αυτών συστατικών που παρουσιάζουν τόσο ενδιαφέρουσα δράση φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



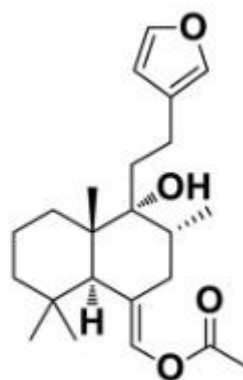
Εικ. 8. Απιγενίνη



Εικ. 9. Πανδουλετίνη



Εικ. 10. Αγνουσίδη



Εικ. 11. Ροτουνδιφουράνιο

(γ) Τερπενοειδή

Η συγκεκριμένη κατηγορία βιοδραστικών συστατικών έχει αποδειχτεί μέσω σειράς επιστημονικών μελετών πως παρουσιάζει ορμονορυθμιστική δράση. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με μελέτη των *Hoberg et al.*, (1999), βιοδραστικά συστατικά όπως η βιτεξилаκτόνη και το ροτουνδιφουράνιο, τα οποία ταυτοποιήθηκαν στους καρπούς της λυγαριάς, έχουν την ιδιότητα να λειτουργούν ως **D2- ντοπαμινεργικοί υποδοχείς** και να επιδρούν στον αδένα της υπόφυσης και ειδικότερα στην παραγωγή προγεστερόνης. Η προγεστερόνη ανήκει σε μια ομάδα στεροειδών ορμονών και απαντάται στον γυναικείο οργανισμό παίζοντας καθοριστικό ρόλο στον έμμηνο κύκλο και τα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης. Διαταραχή των επιπέδων προγεστερόνης στο γυναικείο οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε πολλά προβλήματα όπως διαταραχές της έμμηνου ρήσης, πρόωρες γεννήσεις ή αποβολές και

καρκίνο του μαστού. Η ευεργετική επίδραση της λυγαριάς διαφαίνεται και στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Με βάση τη σχετική έρευνα των *Arentz et al.*, (2014), διαπιστώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στη δράση που επιφέρουν τα συστατικά του φυτού *Vitex Agnus Castus* και η φαρμακευτική ουσία βρωμοκρυπτίνη που χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακοβιομηχανία για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων του εν λόγω συνδρόμου. Συντοίς άλλους, υπάρχουν ενδείξεις πως τα βιοδραστικά συστατικά της λυγαριάς συμβάλλουν στη ρύθμιση μιας επιπλέον γυναικείας ορμόνης, της προλακτίνης. Η προλακτίνη αποτελεί την ορμόνη που ευθύνεται για την παραγωγή γάλακτος κατά την εγκυμοσύνη και το θηλασμό, ενώ σε περίπτωση έντονου στρες παρατηρείται υπερβολική έκκρισή της με αποτέλεσμα τις μασταλγείες. Με βάση τη μελέτη που πραγματοποίησε ο *A.R. Carmichael*, (2008), οι κλεροδιαδιενόλες που εντοπίστηκαν στα εκχυλίσματα του καρπού *Vitex Agnus Castus* εμφανίζουν θεραπευτικό χαρακτήρα στην αντιμετώπιση της υπερπρολακτινεμίας και κατ' επέκταση των μασταλγιών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη, οι εν λόγω ουσίες προσδένονται στον DA2 πρωτεϊνικό υποδοχέα, ο οποίος αποδεδειγμένα καταστέλλει την παραγωγή προλακτίνης. Μάλιστα, η ντομαμινεργετική ικανότητα των κλεροδιαδιενολών αναφέρεται πως είναι ισάξια της ίδιας της ντοπαμίνης.

Πέραν όμως της ορμονορυθμιστικής του δράσης, το συγκεκριμένο φυτό κατέχει ένα σύνολο εξίσου σημαντικών θεραπευτικών ιδιοτήτων. Χαρακτηριστικά αναφέρονται ορισμένες όπως αναλγητικές, ηρεμιστικές, αντιοξειδωτικές, αντιμυκητιακές, ισχυρά αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές κ.α. Μία εξίσου ενδιαφέρουσα μελέτη που αφορά το μεθανολικό εκχύλισμα τόσο των καρπών όσο και των φύλλων του φυτού *Vitex Agnus Castus* είναι αυτή των *Svecová et al.*, (2013). Στην προκειμένη περίπτωση εξετάζεται η αντιμυκητιακή δράση με τα αποτελέσματα να δείχνουν πως τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα παρουσίασαν ισχυρή αντιμυκητιακή δράση έναντι του μικροοργανισμού *Pythium Ultimum* σε δείγματα τομάτας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον επιδεικνύεται και στον τομέα της αντιοξειδωτικής δράσης, η οποία έχει επιβεβαιωθεί τόσο στο αιθέριο έλαιο όσο και στα διάφορα εκχυλίσματα του φυτού, με βάση αποτελέσματα μελετών των *Sarikurkcu et al.*, (2009), αλλά και του *Rashed*, (2013). Και στις δύο περιπτώσεις επιβεβαιώνεται η ύπαρξη αντιοξειδωτικών βιοδραστικών συστατικών όπως φαινόλες, τερπένια, καροτενοειδή κ.α. , με τη σημαντική διαφορά ότι στην πρώτη

μελέτη εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο υδατικό και μεθανολικό εκχύλισμα, ενώ στη δεύτερη στο αντίστοιχο εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα.

1.3 Σύνοψη

Έπειτα από όσα αναφέρθηκαν, γίνεται σαφής ο θεραπευτικός ρόλος της λυγαριάς στην πάροδο των ετών και το ενδιαφέρον για περαιτέρω έρευνα. Οι μελέτες που έχουν δημοσιευθεί σχετικά με το συγκεκριμένο φυτό και τα βιοδραστικά συστατικά του είναι περιορισμένες συγκριτικά με τις πιθανές δυνατότητες χρήσης του. Η αποδοτική και καινοτόμος αξιοποίηση της λυγαριάς σε βιομηχανίες όπως αυτή των φαρμάκων, των φυσικών καλλυντικών και των λειτουργικών τροφίμων αποτελεί ένα ενδιαφέρον αντικείμενο έρευνας και μελέτης από την επιστημονική κοινότητα αλλά και από βιομηχανίες με καινοτόμο προσανατολισμό.

Κεφάλαιο 2. Φυσικές Διεργασίες Διαχωρισμού

2.1. Γενικά

Με τον όρο φυσικές διεργασίες αναφέρονται όλες εκείνες οι μέθοδοι που αποσκοπούν στο διαχωρισμό και την παραλαβή διαφορετικών συστατικών που ανήκουν σε ένα μίγμα με φυσικό τρόπο, δηλαδή απουσία χημικής αντίδρασης. Οι φυσικές διεργασίες διαχωρισμού χρησιμοποιούνται ευρύτατα εδώ και πολλά χρόνια καθώς έχουν το πλεονέκτημα ότι τα συστατικά που διαχωρίζονται λαμβάνονται αυτούσια, χωρίς να έχουν συμμετάσχει σε κάποια ανεπιθύμητη χημική αντίδραση. Στους φυσικούς διαχωρισμούς πραγματοποιείται μεταφορά μάζας μεταξύ διαφορετικών φάσεων. Ανάλογα με το είδος αυτής της μεταφοράς προκύπτει και διαφορετική μέθοδος διαχωρισμού.

Οι κυριότερες φυσικές μέθοδοι είναι:

- Εξάτμιση → Πραγματοποιείται μεταφορά διαλύτη από διάλυμα στην ατμώδη φάση
- Ξήρανση → Πραγματοποιείται μεταφορά υγρασίας από στερεό στην αέρια φάση
- Απόσταξη → Πραγματοποιείται μεταφορά πτητικού συστατικού από υγρή στην ατμώδη φάση
- Απορρόφηση αερίων → Πραγματοποιείται μεταφορά αερίου συστατικού από την αέρια στην υγρή φάση
- Εκχύλιση Υγρών (*Extraction*) → Πραγματοποιείται μεταφορά υγρού συστατικού από υγρή φάση σε άλλη υγρή φάση (αναμίξιμη ή ελαφρώς αναμίξιμη με την πρώτη) στην οποία εμφανίζει μεγαλύτερη διαλυτότητα
- Εκχύλιση Στερεών (*Leaching*) → Πραγματοποιείται μεταφορά στερεού συστατικού από αδρανή στερεά φάση στην υγρή φάση
- Κρυστάλλωση → Πραγματοποιείται μεταφορά ιόντων ή μορίων από διάλυμα σε στερεό

Δυναμικό για το φυσικό διαχωρισμό αποτελεί σε κάθε περίπτωση μια χαρακτηριστική ιδιότητα του συστήματος που τον καθιστά εφικτό. Για παράδειγμα η διεργασία της απόσταξης στηρίζεται στη σχετική πτητικότητα των συστατικών ενός μίγματος υγρών. Η εκχύλιση υγρών βασίζεται στην εκλεκτική διαλυτότητα ενός υγρού προς διάλυση σε έναν

συγκεκριμένο διαλύτη κατά πολύ μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με τα υπόλοιπα συστατικά ενός υγρού μίγματος (Κροκίδα, 2013).

Όσον αφορά τα αρωματικά φυτά και βότανα οι δύο συνηθέστερες διεργασίες φυσικού διαχωρισμού των συστατικών του είναι η απόσταξη και η εκχύλιση. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά οι συγκεκριμένες μέθοδοι.

2.2 Απόσταξη

Η απόσταξη όπως προαναφέρθηκε αποτελεί φυσική διεργασία διαχωρισμού κατά την οποία υπάρχει επαφή μιας υγρής και μιας ατμώδους φάσης. Τα πτητικά συστατικά μεταπηδούν στην αέρια φάση ενώ τα λιγότερο πτητικά παραμένουν στην υγρή φάση και κατ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους. Ειδικότερα στην περίπτωση αρωματικών φυτών και βοτάνων η απόσταξη χρησιμοποιείται κατά κόρον για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου και των βιοδραστικών συστατικών που το απαρτίζουν. Η διεργασία της απόσταξης δεν είναι καινούρια αλλά χρησιμοποιείται από αρχαιοτάτων χρόνων, κυρίως στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών. Με την ανάπτυξη της ιατρικής και της επιστήμης ο κλάδος της αρωματοθεραπείας άρχισε να κερδίζει έδαφος και η διεργασία της απόσταξης επεκτάθηκε και στα διάφορα φυτά και βότανα. Με την πάροδο των ετών η τεχνολογία και ο εξοπλισμός έχει αριστοποιηθεί, ωστόσο η γενική αρχή της μεθόδου παραμένει η ίδια.

Υπάρχουν τρεις παραλλαγές της μεθόδου αναλόγως την πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται. Πρόκειται για την απόσταξη με ατμό (ατμοαπόσταξη), την απόσταξη με νερό και ατμό (υδροατμοαπόσταξη) και την απόσταξη με νερό (υδροαπόσταξη). Και οι τρεις παραλλαγές βασίζονται στην ίδια βασική τεχνική που είναι η παραγωγή ατμού μέσω της θέρμανσης ενός μίγματος της πρώτης ύλης και νερού. Κάθε μία από αυτές ωστόσο ενδείκνυται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Προτού όμως αναφερθούν τα κριτήρια με τα οποία επιλέγεται η κάθε μέθοδος, κρίνεται αναγκαία η αναλυτική περιγραφή της γενικότερης διαδικασίας της απόσταξης.

Αρχικά το μίγμα του αρωματικού φυτού και του νερού, το οποίο έχει τοποθετηθεί σε ανοξείδωτο μεταλλικό άμβυκα, θερμαίνεται έως ότου πραγματοποιηθεί βρασμός και παραγωγή ατμού. Ο παραγόμενος ατμός είναι ικανός να προκαλέσει θραύση στις ίνες του

φυτού και να απελευθερώσει το σύνολο των πτητικών συστατικών που εμπεριέχονται σε αυτό. Τα συστατικά αυτά με τη μορφή αιθέριου ελαίου συμπαρασύρονται λόγω των υδρατμών έξω από τον άμβυκα και εν συνεχεία ψύχονται και συμπυκνώνονται δημιουργώντας ένα διφασικό μίγμα. Η μία φάση αυτού του μίγματος είναι το αιθέριο έλαιο και η άλλη νερό με μικρή ποσότητα ελαίου διαλυμένο σε αυτό. Η δεύτερη φάση καλείται ανθόνερο (hydrosol) και εξαιτίας μικρότερης πυκνότητας η φάση του αιθέριου ελαίου βρίσκεται πάνω από αυτή του ανθόνερου. Σύμφωνα με την παραπάνω περιγραφή γίνεται αντιληπτό ότι μια αποστακτική διάταξη πρέπει να αποτελείται από τα ακόλουθα αναγκαία όργανα:

- **Πηγή θέρμανσης** του μίγματος της πρώτης ύλης
- **Μεταλλική δεξαμενή νερού** (άμβυκας), στην οποία προστίθεται ποσότητα απιονισμένου νερού ανάλογα με την χωρητικότητά του καθώς και το υλικό προς απόσταξη
- **Συμπυκνωτής**, ο οποίος συγκεντρώνει τον ατμό με τα συστατικά που έχει συμπαρασύρει και τον ψύχει συνήθως μέσω σωληνώσεων από τις οποίες διέρχεται κρύο νερό.
- **Συλλέκτης**, στον οποίο συλλέγεται το μίγμα ελαίου και ανθόνερου. Στη συνέχεια και εφόσον έχουν δημιουργηθεί οι δύο διακριτές φάσεις, παραλαμβάνεται η κάθε μία χωριστά και αξιοποιείται αναλόγως.

Η διαδικασία της απόσταξης διαχωρίζει κατά κύριο λόγο τα πτητικά και αρωματικά συστατικά των φυτών από τα λιγότερα πτητικά, επομένως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως προκατεργασία σε υλικά που χρειάζονται απόσπηση πριν υποβληθούν σε κάποια άλλη χημική ή φυσική διεργασία. Κάτι τέτοιο πραγματοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία, όπου προηγήθηκε υδροατμοαπόσταξη με στόχο την παραλαβή των πτητικών συστατικών και ακολούθησε συμβατική εκχύλιση για την ανάκτηση και των υπόλοιπων βιοδραστικών συστατικών του φυτού. Επίσης αξίζει να επισημανθεί ότι το υλικό που θα υποστεί απόσταξη καλό θα ήταν να έχει υποστεί ξήρανση πρώτα σε ήπιες συνθήκες. Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να μειώνει την ποσότητα ελαίου στο φυτό αλλά επιτρέπει την αύξηση της απόδοσης καθώς αυξάνεται η ποσότητα του υλικού που μπορεί να εισαχθεί στη δεξαμενή προς απόσταξη. Παρακάτω παρατίθενται δύο εικόνες, η μία εκ των οποίων αναπαριστά την πιο απλή αποστακτική διάταξη που μπορεί να υπάρξει ενώ η άλλη τον αντίστοιχο εξοπλισμό σε

βιομηχανική κλίμακα. Προφανώς στη δεύτερη περίπτωση ο εξοπλισμός γίνεται αρκετά πιο σύνθετος.



Εικ. 12. Απλή αποστακτική διάταξη



Εικ. 13. Βιομηχανική αποστακτική διάταξη

Όσον αφορά τα διαφορετικά είδη απόσταξης, η απλούστερη μεταξύ των τριών είναι η απόσταξη με νερό. Στην περίπτωση αυτή το φυτό τοποθετείται απευθείας μέσα στο νερό που θα υποστεί βρασμό. Το συγκεκριμένο είδος απόσταξης προτιμάται σε ξυλώδη φυτά, ωστόσο το αιθέριο έλαιο που θα προκύψει είναι μικρό σε ποσότητα και υποβαθμισμένης ποιότητας λόγω αποσύνθεσης διαφόρων συστατικών. Αντιθέτως σε πιο θαμνώδη φυτά, όπως στην προκειμένη περίπτωση η λυγαριά, η βιβλιογραφία προτείνει την απόσταξη με νερό και ατμό. Εδώ τοποθετείται ένα πλέγμα πάνω από το νερό που βράζει, πάνω στο οποίο απλώνεται το υλικό προς απόσταξη. Οι υδρατμοί του νερού διαπερνούν τη μάζα του φυτού συμπαρασύροντας τα πτητικά του συστατικά. Χρειάζεται προσοχή ώστε το υλικό να μην πακτωθεί πάνω στο πλέγμα και εμποδίσει τους υδρατμούς να το διαπεράσουν, με αποτέλεσμα να αποτύχει η διαδικασία της απόσταξης. Σε αυτή την περίπτωση το φυτικό υλικό έρχεται σε επαφή μόνο με τον ατμό, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η καταστροφή (αποσύνθεση) συστατικών του αιθέριου ελαίου όπως συμβαίνει στην υδροαπόσταξη. Τέλος η απόσταξη με ατμό βασίζεται στη χρήση ατμογεννήτριας, η οποία παράγει τον απαραίτητο

ατμό και στη συνέχεια τον τροφοδοτεί κάτω από το φυτικό υλικό. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι το παραγόμενο αιθέριο έλαιο υπερτερεί τόσο σε ποσότητα όσο και σε ποιότητα σε σχέση με τις δύο πρώτες μεθόδους. Είναι κατάλληλη για όλα τα αρωματικά φυτά εκτός από άνθη και κονιοποιημένα υλικά. Προφανώς το κόστος της ξεπερνάει αυτό των προηγούμενων δύο μεθόδων. (Tandon, 2016)

Στη συνέχεια κρίνεται αναγκαίο να γίνει μια αναφορά στα δύο προϊόντα της διεργασίας της απόσταξης που είναι το αιθέριο έλαιο και το ανθόνερο. Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα καταναλωτικών αγαθών, όπως τρόφιμα και αναψυκτικά, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα, αρώματα, απορρυπαντικά, σαπούνια και εντομοαπωθητικά. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος παραλαβής των αιθέριων ελαίων είναι η απόσταξη, ωστόσο η ολοένα και μεγαλύτερη παγκόσμια παραγωγή και κατανάλωσή τους, οδήγησε στην έρευνα και την καθιέρωση επιπλέον διεργασιών και τεχνολογιών που θα μπορούσαν να βελτιστοποιήσουν ποιοτικά και ποσοτικά την παραλαβή τους. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η διεργασία της διαβροχής που χρησιμοποιείται συνεργιστικά με την απόσταξη όταν η απόδοση της δεύτερης είναι χαμηλή. Τα αιθέρια έλαια μπορούν να προέλθουν από την απόσταξη οποιουδήποτε τμήματος των αρωματικών φυτών, συμπεριλαμβανομένων ακόμα και των ριζών τους. Είναι εξαιρετικά πτητικά και πυκνά καθώς περιέχουν συστατικά του φυτού από το οποίο έχουν προέλθει σε υψηλή συγκέντρωση. Γι' αυτό το λόγο δεν ενδείκνυται η απευθείας χρήση και επαφή τους με το δέρμα, αν' αυτού προτείνεται να αναμιγνύονται με άλλα «έλαια-βάσεις» όπως ονομάζονται (λόγου χάρη το αμυγδαλέλαιο), τα οποία επιτρέπουν την άμεση επαφή με το δέρμα χωρίς την εκδήλωση ερεθισμών και παράλληλα αξιοποιώντας όλες τις ευεργετικές ιδιότητες του αιθέριου ελαίου. Τα κυριότερα συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι υδρογονάνθρακες, εστέρες, τερπένια, λακτόνες, φαινόλες, αλδεΐδες, οξέα, αλκοόλες και κετόνες. Μεταξύ αυτών, τα υδρογονωμένα (αλκοόλες, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες, λακτόνες και φαινόλες) αποτελούν τα βασικότερα πτητικά συστατικά που προσδίδουν στο έλαιο τη χαρακτηριστική, έντονη οσμή και είναι πιο σταθερά όσον αφορά την οξειδωση και την αλλοίωση. Αντιθέτως, άκορεστα συστατικά όπως τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια (15 άτομα C) έχουν την τάση να οξειδώνονται ή/και να αλλοιώνονται παρουσία φωτός και αέρα, και ως εκ τούτου, η φύλαξη των αιθέριων ελαίων προτείνεται να γίνεται σε σκουρόχρωμους, αεροστεγώς κλεισμένους περιέκτες.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι μία άλλη μέθοδος παραλαβής αιθέριων ελαίων που κερδίζει συνεχώς έδαφος έναντι της κλασσικής απόσταξης είναι η εκχύλιση, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη σύγχρονη βιομηχανία αρωματοποιίας. Στην προκειμένη περίπτωση, χρησιμοποιούνται πτητικοί διαλύτες όπως πετρελαϊκός αιθέρας και εξάνιο. Τα βασικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου, συγκριτικά με την απόσταξη, είναι η διατήρηση της θερμοκρασίας (συνήθως 50° C) κατά τη διάρκεια της διεργασίας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα έλαια που έχουν προέλθει από εκχύλιση να έχουν πιο φυσική οσμή σε σχέση με αυτά που έχουν προέλθει από απόσταξη, τα οποία ενδεχομένως να έχουν υποστεί χημικές μεταβολές λόγω υψηλών θερμοκρασιών. Ωστόσο, η διαδικασία της εκχύλισης παρουσιάζει μεγαλύτερο κόστος συγκριτικά με την απόσταξη και αυτός είναι ο λόγος που δεν είναι τόσο διαδεδομένη. (Tandon, 2008)

Αναφορικά με το δεύτερο προϊόν της απόσταξης, το ανθόνερο, πρέπει να επισημανθεί ότι εμπεριέχει όλα τα υδατοδιαλυτά αρωματικά συστατικά του φυτού που υπέστη απόσταξη. Γι' αυτό το λόγο εμφανίζει χαρακτηριστική οσμή, λιγότερο έντονη ωστόσο από αυτή του αιθέριου ελαίου. Η βασική τους διαφορά είναι ότι το ανθόνερο δεν είναι τόσο συμπυκνωμένο όσο το έλαιο με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η άμεση επαφή του με το δέρμα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για καλλωπιστικούς σκοπούς, καθώς εμφανίζει τονωτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες για το δέρμα, ενώ βρίσκει εφαρμογή και στον τομέα των τροφίμων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το ροδόνερο (Catty, 2001; Price et al., 2004).

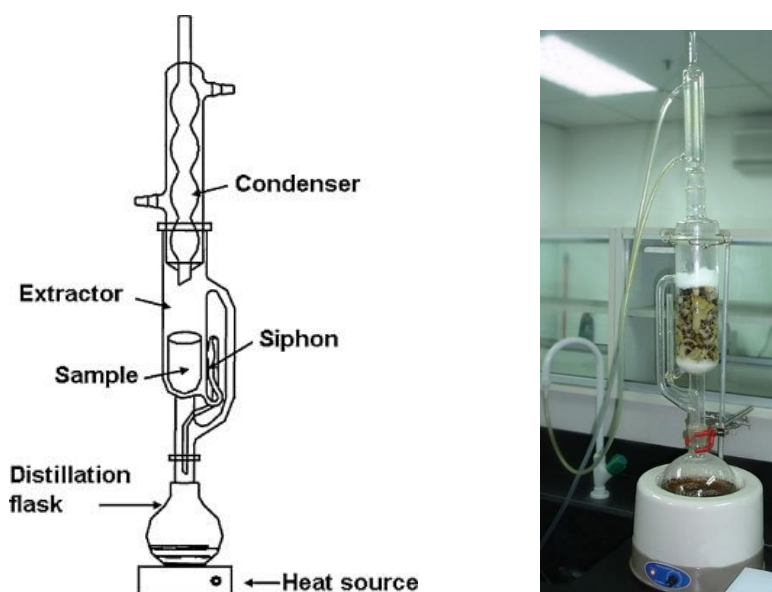
2.3 Εκχύλιση

Η εκχύλιση αποτελεί μια από τις αρχαιότερες και απλούστερες διεργασίες φυσικού διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκαν από τον άνθρωπο. Από την παρασκευή ενός απλού αφεψήματος (τσάι, καφές κ.α.) μέχρι την παραλαβή ενός αρώματος ή μιας χρήσιμης ουσίας από κάποιο φυτό, η διεργασία της εκχύλισης καλύπτει ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών και μη αναγκών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μεταφορά του επιθυμητού συστατικού από την φυτική πρώτη ύλη στην υδατική φάση χρησιμοποιώντας συνήθως θερμό νερό ή κάποιον άλλο κατάλληλο διαλύτη. Με άλλα λόγια με την τεχνική της εκχύλισης η απομόνωση μιας ουσίας από ένα μίγμα γίνεται μέσω της στενής του επαφής με ένα διαλυτικό μέσο, το οποίο τη διαλύει εκλεκτικά. Ο διαλύτης επιλέγεται με κριτήριο την πολικότητα των συστατικών του

φυτού που καλούνται να απομονωθούν. Προφανώς ένας πολικός διαλύτης όπως το νερό θα συλλέξει συστατικά παρόμοιας πολικότητας. Στην περίπτωση που το ζητούμενο είναι να γίνει το «βιοδραστικό προφίλ» του φυτού και στόχος είναι η συλλογή και η ταυτοποίηση όσο το δυνατόν περισσότερων συστατικών, πραγματοποιούνται διαδοχικές εκχυλίσεις με διαλύτες κλιμακούμενης πολικότητας. Αν η πρώτη ύλη βρίσκεται στην υγρή φάση πρόκειται για εκχύλιση «υγρού – υγρού» όπως ονομάζεται και αντίστοιχα όταν βρίσκεται στη στερεή φάση αναφέρεται ως εκχύλιση «στερεού – υγρού» (Κροκίδα, 2013). Όσον αφορά την εκχύλιση φυτών, η πρώτη ύλη είναι συνήθως αποξηραμένο και αποσμημένο στερεό, το οποίο συνήθως έχει υποστεί απόσταξη προηγουμένως ώστε να παραληφθούν τα πτητικά του συστατικά. Ο αποδοτικότερος τρόπος εκχύλισης στερεών πραγματοποιείται με τη μέθοδο *Soxhlet*.

▪ **Εκχύλιση Soxhlet**

Η εκχύλιση *Soxhlet* στηρίζεται στην βασική ιδέα της μεθόδου και διαθέτει αρκετά απλά εξοπλισμό και διάταξη. Το φυτικό υλικό προς εκχύλιση τοποθετείται σε ειδική χάρτινη φύσιγγα. Η φύσιγγα αυτή τοποθετείται με η σειρά της στον εκχυλιστήρα *Soxhlet*, ο οποίος γεμίζεται με τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη ενώ στην άκρη του προσαρμόζεται και μια σφαιρική φιάλη με πρόσθετη ποσότητα διαλύτη. Ο διαλύτης της σφαιρικής φιάλης θερμαίνεται και ζέει με αποτέλεσμα οι ατμοί του να διέρχονται πλευρικά από τον εκχυλιστήρα στον οποίο βρίσκεται το φυτικό υλικό και να οδηγούνται σε έναν ψυκτήρα όπου ψύχονται και επαναρρέουν εντός του εκχυλιστήρα και της φύσιγγας. Μόλις ο χώρος εντός του εκχυλιστήρα πληρωθεί με διαλύτη μέχρι ένα ορισμένο ύψος, πραγματοποιείται σιφωνισμός και ο διαλύτης, που εν τω μεταξύ έχει συμπαρασύρει ορισμένα συστατικά, επιστρέφει στη σφαιρική φιάλη. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται κυκλικά και κατ' αυτόν τον τρόπο το διάλυμα που βρίσκεται εντός της σφαιρικής φιάλης εμπλουτίζεται διαρκώς με συστατικά του φυτικού υλικού. Η μέθοδος *Soxhlet* θεωρείται αρκετά αποτελεσματική καθώς επιτυγχάνει την παραλαβή ακόμα και ελάχιστα διαλυτών ουσιών. Μετά το πέρας της εκχύλισης ο διαλύτης μπορεί να εξατμιστεί και να ληφθούν τα φυτικά συστατικά αυτούσια για περαιτέρω ταυτοποίηση και μελέτη.



Εικ. 14. Και Εικ. 15. Εκχυλιστήρες Soxhlet

Βασικά μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου αποτελούν η μεγάλη διάρκεια εκχύλισης αλλά και η χρήση μεγάλων ποσοτήτων διαλύτη που είναι δύσκολο να ανακτηθούν μετά. Πέρα όμως από το γεγονός ότι δεν είναι οικονομικά και ενεργειακά συμφέρουσα, η εκχύλιση Soxhlet εμφανίζει ένα ακόμα βασικό αρνητικό. Εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών ζέσης ορισμένων διαλυτών, οι θερμοκρασίες που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της εκχύλισης είναι καταστροφικές για ορισμένα θερμοευαίσθητα συστατικά του φυτού με αποτέλεσμα να αλλοιώνονται και να είναι αδύνατη η παραλαβή τους. Η ανάγκη για ενεργειακά πιο συμφέρουσες, αποδοτικές και μη καταστροφικές μεθόδους εκχύλισης οδήγησε στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών όπως η εκχύλιση με μικροκύματα και υπερήχους (Luque de Castro et al., 1998).

▪ Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Μια σύγχρονη τεχνική στον τομέα της εκχύλισης αποτελεί η χρήση μικροκυμάτων. Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα που αντιστοιχούν σε συχνότητες μεταξύ 0,3-300 GHz. Μεταδίδονται ως κύματα και μπορούν να διεισδύουν σε βιοϋλικά και να αλληλοεπιδρούν με τα πολικά μόρια όπως είναι το νερό, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο

θερμότητα. Κατά συνέπεια, μπορούν να θερμάνουν ένα ολόκληρο υλικό, εισχωρώντας ταυτόχρονα βαθύτερα σε αυτό. Η εκχύλιση με μικροκύματα (*Microwave-assisted extraction*, MAE) προσφέρει μια γρήγορη μεταφορά ενέργειας στον όγκο του διαλύτη και του φυτού, η οποία συντελεί στην ομοιόμορφη θέρμανσή τους. Το νερό που βρίσκεται στο εσωτερικό του φυτού απορροφά την ενέργεια των μικροκυμάτων, και έτσι προκαλείται εσωτερική υπερθέρμανση η οποία συντελεί στην κυτταρική διάσπαση. Με αυτόν τον τρόπο, διευκολύνεται η ανάκτηση των επιμέρους συστατικών από τη μήτρα του φυτού (*Kaufmann et al.*, 2001).

▪ **Εκχύλιση υποβοηθούμενη από την εφαρμογή υπερήχων**

Η χρήση των υπερήχων έχει σημαντική επίδραση σε πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία. Με τη χρήση τους, οι διάφορες διεργασίες μπορεί να ολοκληρωθούν σε ελάχιστο χρόνο με υψηλή επαναληψιμότητα, μειώνοντας το κόστος επεξεργασίας και δίνοντας υψηλότερη απόδοση, επιλεκτικότητα, καθαρότητα και βελτιωμένη ποιότητα του τελικού προϊόντος. Είναι επίσης μέθοδος φιλική προς το περιβάλλον, καθώς απαιτείται ελάχιστη ενέργεια και χρόνος σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους. Οι υπέρηχοι έχουν εφαρμοσθεί αποτελεσματικά σε διάφορες διεργασίες στη βιομηχανία τροφίμων, όπως κατάψυξη, ξήρανση, βαφή, λεύκανση, αποστείρωση και εκχύλιση. Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση τους περιλαμβάνουν αποτελεσματικότερη ανάμιξη, ταχύτερη μεταφορά μάζας, μειωμένη θερμοκρασία εκχύλισης, εκλεκτική εκχύλιση, μικρό μέγεθος εξοπλισμού και αυξημένη παραγωγή (*Chemat et al.*, 2011).

Στην εκχύλιση με υπερήχους, η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 14 kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται τα φαινόμενα διείδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται τα φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης. Η αποτελεσματικότερη εκχύλιση με χρήση υπερήχων σχετίζεται με το φαινόμενο που καλείται ακουστική σπηλαιώση, δηλαδή δημιουργία κενών εντός του μέσου (φυσαλίδες σπηλαιώσης). Αυτές οι φυσαλίδες αυξάνονται κατά τη διάρκεια των φάσεων της αραιώσης, ενώ το μέγεθός τους μειώνεται κατά τη διάρκεια της φάσης της συμπίεσης. Όταν το μέγεθός

τους φθάσει στο κρίσιμο σημείο, ώστε να καταρρεύσουν κατά τη διάρκεια ενός κύκλου συμπίεσης, αυτές απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες ενέργειας. Όταν οι φυσαλίδες καταρρέουν επάνω στην επιφάνεια ενός στερεού υλικού, η υψηλή πίεση και θερμοκρασία που απελευθερώνονται παράγουν μικροπίδακες, οι οποίοι κατευθύνονται προς τη στερεή επιφάνεια, με αποτέλεσμα την εξαγωγή των φυτικών ενώσεων από διάφορα μίγματα. (Luque-García et al., 2003)

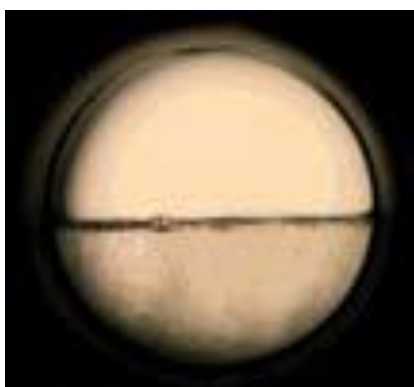
▪ **Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά**

Τα τελευταία χρόνια έχει επεκταθεί αλματωδώς η χρήση της εκχύλισης με υπερκρίσιμα ρευστά για την ανάκτηση διαφόρων οργανικών ουσιών από υγρές και στερεές μήτρες. Οι αλλαγές στους περιβαλλοντικούς κανονισμούς σε συνδιασμό με την ανάγκη για αποδοτικότερες διεργασίες εκχύλισης οδήγησαν στην εξερεύνηση των ιδιοτήτων εναλλακτικών διαλυτών, οι οποίοι θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες. Προτού γίνει ανάλυση της διεργασίας της υπερκρίσιμης εκχύλισης και των βασικών παραμέτρων που τη διέπουν, κρίνεται σκόπιμο να αναλυθούν τόσο οι λόγοι που οδήγησαν στην ανάγκη αντικατάστασης των οργανικών διαλυτών όσο και οι ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών που τα καθιστούν εξαιρετικά αποδοτικούς και φιλικούς προς το περιβάλλον διαλύτες.

Οι οργανικοί διαλύτες προέρχονται από μη βιώσιμες πηγές ενέργειας, απαιτούν μεγάλη ενέργεια διαχωρισμού από τα τελικά προϊόντα και αρκετά συχνά δημιουργούν διαποτισμένα απ' αυτούς τοξικά και διαβρωτικά υποπροϊόντα. Επιπρόσθετα, παρουσιάζουν υψηλό οικονομικό και ενεργειακό κόστος κατά την ανακύκλωσή τους, ενώ δεν υπάρχει δυνατότητα επιλεκτικότητας στα προϊόντα με ρύθμιση των συνθηκών διεργασίας. Τέλος, η διαρκής και αλόγιστη χρήση τους, αποτελεί τη κυριότερη πηγή δημιουργίας πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) στην ατμόσφαιρα.

Με τον όρο υπερκρίσιμα ρευστά καλούνται εκείνα τα αέρια των οποίων οι τιμές θερμοκρασίας και πίεσης υπερβαίνουν ταυτόχρονα τις αντίστοιχες κρίσιμες τιμές. Κάθε υπερκρίσιμο ρευστό βρίσκεται σε μία μοναδική ενιαία φάση, που παρουσιάζει χαρακτηριστικά μεταξύ αυτών των αερίων και αυτών των υγρών. Στην περίπτωση της

διεργασίας της εκχύλισης, το υπερκρίσιμο ρευστό που χρησιμοποιείται κατά κόρον είναι το διοξείδιο του άνθρακα. Οι λόγοι που το καθιστούν ιδανικό είναι η ευκολία του να φτάσει στις κρίσιμες συνθήκες του, το γεγονός ότι είναι ανέξοδο, μη τοξικό, μη τοξικό, άφλεκτο, και εύκολα μπορεί κάποιος να το συλλέξει σε μεγάλη καθαρότητα. Πιο συγκεκριμένα, εάν υγρό διοξείδιο του άνθρακα θερμανθεί ισοβαρώς υπό πίεση μεγαλύτερη της κρίσιμης, διαστέλλεται και μεταπίπτει στην υπερκρίσιμη κατάσταση ή αλλιώς σε μία κατάσταση τύπου «πυκνού αερίου», χωρίς όμως να συμβεί αλλαγή φάσης. Στην υπερκρίσιμη περιοχή του διοξειδίου του άνθρακα μπορούν επομένως να επιτευχθούν ενδιάμεσες επιλεκτικές τιμές πυκνότητας που δεν είναι διαθέσιμες στις υποκρίσιμες συνθήκες, γεγονός που αποτελεί το μυστικό της επιτυχίας των εκχυλίσεων με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται αναλυτικά η διαδικασία δημιουργίας υπερκρίσιμης κατάστασης του διοξειδίου του άνθρακα που λαμβάνει χώρα μέσα σε θάλαμο – αντιδραστήρα πολύ υψηλών πιέσεων.



Εικ. 16. Αρχικά διακρίνονται οι δύο ξεχωριστές φάσεις του διοξειδίου του άνθρακα, η αέρια και η υγρή. Ο μηνίσκος διακρίνεται καθαρά στη διεπιφάνεια.



Εικ. 17. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία, υπό σταθερή πίεση, μεγαλύτερη της κρίσιμης τιμής, ο μηνίσκος αρχίζει σταδιακά να εξαφανίζεται.



Εικ. 18. Αυξάνοντας περαιτέρω τη θερμοκρασία, οι πυκνότητες του αερίου και του υγρού τείνουν να εξομοιωθούν. Ο μηνίσκος εξασθενεί αν και παραμένει ορατός.



Εικ. 19. Με την επίτευξη υπερκρίσιμων συνθηκών, οι δύο ξεχωριστές φάσεις δεν υπάρχουν πλέον. Υπάρχει ενιαία φάση, ομογενής, με ιδιότητες αερίου και υγρού ταυτόχρονα.

Όπως προαναφέρθηκε, η επιτυχία της εκχύλισης εξαρτάται άμεσα από τις ιδιότητες που αποκτά το ρευστό στην υπερκρίσιμη αυτή κατάσταση, οι οποίες εξαρτώνται άμεσα από την ευελιξία της μεταβλητότητας που αποκτά η πυκνότητα του ρευστού στις συνθήκες αυτές. Το υπερκρίσιμο ρευστό παρουσιάζει μία διακύμανση στην πυκνότητα από 100 έως 1000 Kg/m³ (0.1 έως 1 g/mL), με αντίστοιχη διακύμανση στη διαλυτική του ικανότητα και επιλεκτικότητα, με μέτριες αλλαγές της θερμοκρασίας και της πίεσης. Η διαλυτότητα μίας ουσίας στο υπερκρίσιμο ρευστό τείνει να αυξηθεί με αύξηση της πυκνότητας του ρευστού, υπό σταθερή θερμοκρασία. Το μέγιστο της διαλυτικής ικανότητας πλησιάζει περίπου αυτή ενός υγρού διαλύτη, χωρίς βέβαια να ταυτίζεται με αυτή. Λειτουργικά αυτό που επιτυγχάνεται με τη χρήση υπερκρίσιμου ρευστού είναι μία προσομοίωση υγρού, χρησιμοποιώντας όμως ένα αέριο. Παρόλο μάλιστα, που το υπερκρίσιμο ρευστό δεν μπορεί ποτέ να παρουσιάσει μία μέγιστη ικανότητα διαλυτότητας αντίστοιχη με αυτή ενός υγρού διαλύτη, εντούτοις το παρουσιάζει μία πληθώρα άλλων πλεονεκτημάτων που δεν απαντώνται στους συμβατικούς υγρούς διαλύτες. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι οι ταχύτητες διάχυσής τους είναι τουλάχιστον μία έως δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερες, των αντιστοίχων των υγρών, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται με μεγάλη ταχύτητα η εκχύλιση των επιθυμητών ουσιών από τις στερεές μήτρες. Επίσης τα ιζώδη τους είναι σχεδόν τόσο χαμηλά όσο των αερίων και αυτό τους εξασφαλίζει βελτιωμένα χαρακτηριστικά ροής. Η δε επιφανειακή τάση τους

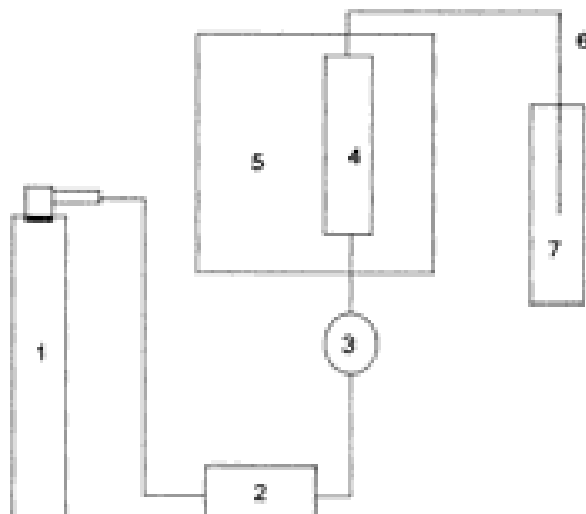
ουσιαστικά είναι μηδενική, λόγω μη ύπαρξης διεπιφάνειας μεταξύ υγρής και αέριας φάσης. Οι ιδιότητες αυτές τους επιτρέπουν να διαπερνούν εύκολα οποιαδήποτε στερεή δομή με μικροπόρους. Τέλος η υψηλή πτητικότητα των υπερκρίσιμων ρευστών υπό κανονικές συνθήκες, επιτρέπει τον εύκολο διαχωρισμό τους από τα εκχυλίσματα, με απλή μείωση της πίεσης του συστήματος μετά την εκχύλιση.

Εκείνο που καθορίζει ουσιαστικά το ποσοστό εκτέλεσης μίας εκχύλισης, είναι οι περιορισμοί στη μεταφορά μάζας. Επειδή το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα παρουσιάζει ταχύτητα διάχυσης μία τάξη μεγέθους υψηλότερη από την αντίστοιχη των υγρών, και ιξώδες μία τάξη μεγέθους χαμηλότερο από το αντίστοιχο των υγρών, είναι φανερό ότι προσφέρει πολύ καλύτερα χαρακτηριστικά μεταφοράς μάζας συγκριτικά με τους συμβατικούς υγρούς διαλύτες. Ποσοτικά οι εκχυλίσεις με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα περατώνονται γενικά σε 10 – 60 λεπτά, ενώ στις εκχυλίσεις με υγρούς διαλύτες απαιτούνται αρκετές ώρες έως ημέρες.

Η εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα εννοιολογικά είναι απλή στην εκτέλεσή της. Χρησιμοποιείται μία αντλία που τροφοδοτεί έναν θάλαμο εκχύλισης (αντιδραστήρα εκχύλισης), με διοξείδιο του άνθρακα μίας καθορισμένης τιμής πίεσης. Ο θάλαμος εκχύλισης θερμαίνεται μέσω κάποιου θερμαντήρα, σε θερμοκρασία υψηλότερη της κρίσιμης θερμοκρασίας του διοξειδίου του άνθρακα. Κατά την διάρκεια της εκχύλισης οι επιθυμητές ουσίες αποχωρίζονται από το κύριο σώμα της μήτρας και διαλυτοποιούνται μέσα στο υπερκρίσιμο ρευστό. Εν συνεχεία, το διάλυμα επιθυμητών ουσιών-υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα διοχετεύεται μέσω ενός μειωτή πίεσης προς ένα δοχείο συλλογής (διαχωριστής), το οποίο βρίσκεται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, όπου και συλλέγεται το επιθυμητό εκχύλισμα. Το διοξείδιο του άνθρακα μπορεί έπειτα να ψυχθεί, να επανασυμπιεσθεί και να ανακυκλωθεί, ή να εκτονωθεί στην ατμόσφαιρα. Όσα προαναφέρθηκαν αναπαρίστανται στο ακόλουθο θεμελιώδες διάγραμμα ενός συστήματος εκχύλισης με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα όπου δίνονται τα μέρη μιας τέτοιας διάταξης:

1. Φιάλη υγρού διοξειδίου του άνθρακα σε συνθήκες πίεσης 50 bar και θερμοκρασίας -15°C
2. Αντλία
3. Μείκτης

4. Θάλαμος εκχύλισης-αντιδραστήρας. Σε συνήθεις εκχυλίσεις η επικρατούσα πίεση στον θάλαμο κυμαίνεται από 74 bar έως 350 bar, ενώ φτάνει για ειδικές εκχυλίσεις φυτικών ελαίων μέχρι και 800 bar
5. Περιοχή θέρμανσης
6. Μειωτής πίεσης
7. Δοχείο συλλογής-διαχωριστής



Εικ. 20. Θεμελιώδες διάγραμμα τυπικού συστήματος εκχύλισης με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα.

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, η χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα στη διεργασία της εκχύλισης εξασφαλίζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως μικρός χρόνος εκχύλισης, μεγάλη απόδοση ανακτώμενων βιοδραστικών συστατικών χωρίς παραπροϊόντα, δυνατότητα ανακύκλωσης του χρησιμοποιούμενου διαλύτη, χαμηλότερο λειτουργικό κόστος διεργασίας και αμελητέα περιβαλλοντική επιβάρυνση. Ο λόγος για τον οποίο δεν έχει εδραιωθεί ακόμα στη βιομηχανία και χρησιμοποιείται κυρίως σε εργαστηριακή κλίμακα είναι το κόστος του εξοπλισμού που υπερβαίνει αρκετά αυτό του κλασσικού που χρησιμοποιείται στη συμβατική εκχύλιση. (Κωτσοβός, 2008)

Στην περίπτωση του φυτού *Vitex Agnus Castus*, η εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα έχει εφαρμοστεί σε εργαστηριακή κλίμακα με εξαιρετικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη σχετική μελέτη των *Cossuta et al.* (2008). Στην εν λόγω έρευνα εφαρμόστηκε η μέθοδος της υπερκρίσιμης εκχύλισης με διοξείδιο του άνθρακα σε συνθήκες πίεσης 450 bar και θερμοκρασίας 45 ± 5 °C. Υπό αυτές τις συνθήκες διαπιστώθηκε ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών ροτουνδιφουράνιο, β-σιτοστερόλη,

β- αμυρίνη και κασιισίνη σε ποσοστά 16,6%, 17,3%, 9,9%, 42,4% αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες αποδόσεις των συγκεκριμένων βιοδραστικών συστατικών με τη μέθοδο της συμβατικής εκχύλισης με αιθανόλη ήταν 4,7 %, 4,9 %, 3,4 % και 12,4 %. Είναι φανερό επομένως πως η υπερκρίσιμη εκχύλιση παρέχει τη δυνατότητα ανάκτησης των βιοδραστικών συστατικών με πολύ μεγαλύτερη απόδοση συγκριτικά με τη συμβατική εκχύλιση. Πέραν αυτού όμως, η συγκεκριμένη διεργασία μπορεί να εφαρμοστεί εναλλακτικά της υδροατμοαπόσταξης για την παραλαβή των πτητικών βιοδραστικών συστατικών του φυτού. Μία σχετική μελέτη που επιβεβαιώνει τον παραπάνω ισχυρισμό είναι αυτή των *Marongiu et al.* (2010). Στη συγκεκριμένη εργαστηριακή έρευνα εξετάστηκαν δείγματα καρπών και φύλλων του φυτού *Vitex Agnus Castus* που προέρχονται από τη Σαρδινία και υπέστησαν τόσο υπερκρίσιμη εκχύλιση με διοξείδιο του άνθρακα όσο και υδροατμοαπόσταξη με σκοπό την ανάκτηση των πτητικών βιοδραστικών συστατικών τους. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα φύλλα, με τη μέθοδο της υπερκρίσιμης εκχύλισης πραγματοποιήθηκε ανάκτηση των παρακάτω συστατικών: δικυκλογερμακρένιο (13,6%), 1,8-κινεόλη (11,2%), σαβινένιο (10,0%), β- φαρνεσένιο (9,2%), α- πινένιο (3,8%) και καρυοφυλλένιο (3,5%). Τα αντίστοιχα ποσοστά ανάκτησης με τη μέθοδο της υδροατμοαπόσταξης ήταν: δικυκλογερμακρένιο (16,2%), 1,8-κινεόλη (8,1%), σαβινένιο (5,6%), β- φαρνεσένιο (10,1%), α- πινένιο (2,5%) και καρυοφυλλένιο (5,0%). Αντίστοιχα για τους καρπούς, ανακτήθηκαν τα βιοδραστικά συστατικά: β- φαρνεσένιο (16,9%), δικυκλογερμακρένιο (15,7%), 1,8-κινεόλη (9,1%), σαβινένιο (4,2%), α- πινένιο (3,6%), φελλανδρένιο (2,3%) και καρυοφυλλένιο (2,3%) σε ποσοστά σχεδόν παραπλήσια με τα αυτά της υδροατμοαπόσταξης. Όπως γίνεται λοιπόν αντιληπτό, η υπερκρίσιμη εκχύλιση με διοξείδιο του άνθρακα μπορεί εύκολα να αντικαταστήσει τη μέθοδο της υδροατμοαπόσταξης για την ανάκτηση των πτητικών βιοδραστικών συστατικών των φυτών, καθώς χαρακτηρίζεται από παραπλήσιες και πολλές φορές καλύτερες αποδόσεις ενώ ο χρόνος της διεργασίας είναι σαφώς μικρότερος συγκριτικά με την υδροατμοαπόσταξη.

▪ **Εκχύλιση σε συνθήκες υπερυψηλής πίεσης (ΥΠ)**

Η εφαρμογή της επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση στην εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φυσικά υλικά είναι μια νέα τεχνική εκχύλισης η οποία μόλις πρόσφατα

άρχιζε να μελετάται σε ερευνητικό επίπεδο. Η συγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης πραγματοποιείται σε συνθήκες υψηλής πίεσης στο εύρος 100-600 MPa σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση <60 °C. Ένα από τα πλεονεκτήματα είναι η δυνατότητα χρήσης μικρότερων όγκων διαλυτών και μικρότερου χρόνου διεργασίας σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης ενώ ταυτόχρονα εξασφαλίζονται ικανοποιητικές αποδόσεις εκχύλισης. Η πίεση θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες στην εκχύλιση με υπερυψηλή πίεση και συνδέεται άμεσα με τη διαλυτότητα των βιοδραστικών συστατικών. Στην εκχύλιση με υπερυψηλή πίεση οι ρυθμοί μεταφοράς μάζας των βιοδραστικών συστατικών από την πρώτη ύλη προς το διαλύτη αυξάνονται, επιβεβαιώνοντας τη θεωρία ότι η εκχύλιση με υπερυψηλή πίεση ευνοεί τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας που οδηγούν σε ενισχυμένους ρυθμούς μεταφοράς μάζας λόγω μεταβολών του συντελεστή διάχυσης (Στρατή, 2014). Οι μεταβολές του συντελεστή διάχυσης αποδίδονται κυρίως στις μεταβολές πίεσης που προκαλούνται στη φυτική κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητά τους και να διευκολύνεται με αυτό τον τρόπο, η διείσδυση του διαλύτη εκχύλισης μέσα στα κύτταρα του φυτικού υλικού. Η τεχνική της υπερυψηλής πίεσης σε διεργασίες εκχύλισης έχει μελετηθεί στην εκχύλιση των ανθοκυανινών από σταφύλια (Corrales et al., 2008) στην εκχύλιση κατεχινών και πολυφαινολών από φύλλα πράσινου τσαγιού (Xi et al., 2011), στην εκχύλιση φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων από το περικάρπιο του φρούτου *Litchi chinensis* (Prasad et al., 2009). Τα βασικά πλεονεκτήματα της εκχύλισης με υπερυψηλή πίεση είναι ο σύντομος χρόνος εκχύλισης, οι υψηλές αποδόσεις, η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, η παρουσία ελάχιστων προσμίξεων στο διαλύτη εκχύλισης και η διατήρηση της δραστηριότητας και της δομής των βιοενεργών συστατικών. Επιπλέον η εκχύλιση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου, με μόνη αύξηση της θερμοκρασίας αυτήν που προκύπτει από την συμπίεση (Στρατή, 2014).

Κεφάλαιο 3. Υλικά, Συσκευές και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

- Καρπός λυγαριάς
- Φύλλα και άνθη λυγαριάς θειοπρωτικής προέλευσης
- Καλλυντικό γαλάκτωμα-βάση «Wild Rose», Korres Natural Products
- Απιονισμένο νερό
- Οξικός αιθυλεστέρας
- Αιθανόλη C₂H₅OH (Ελληνικά οινοπνεύματα και αποστάγματα, Ethyl alcohol 96GL)
- Μεθανόλη
- Αντιδραστήριο 2,2,- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, Steimheim, Germany)
- Αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany)
- Αντιδραστήριο ανθρακικού νατρίου (Mallinckrodt, St. Louis, Missouri)
- Διαλύτης DMSO

3.2 Συσκευές

- Πιλοτικής κλίμακας συσκευή υδρο-ατμοαπόσταξης αποτελούμενη από χάλκινο καζάνι 17 L (Χαλκός, Θεσσαλονίκη)
- Συστοιχία συσκευών Soxhlet, με εκχυλιστήρες όγκου 200 mL και σφαιρικές φιάλες συλλογής των εκχυλισμάτων όγκου 500 mL
- Περιστροφικός συμπυκνωτής (Büchi RE; Büchi Laboratories Technik AG, Flawil, Switzerland)
- Ψηφιακό φασματοφωτόμετρο U- 2900 UV/VIS spectrophotometer 200 V (HITACHI 2J1-0003, Tokyo, Japan)
- Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (HPLC), ο οποίος αποτελούνταν από αντλία βαθμωτής έκλουσης, HP 1100 και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιωδίων (Diode Array Detector, DAD) (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), συνδεδεμένα με στήλη Hypersil C18 column ODS 5μm, 250x 4.6mm (MZ Analysentechnik, Mainz, Germany)
- Συσκευή GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry) HP 6890, η οποία είναι συζευγμένη με έναν εκλεκτικό ανιχνευτή μάζας HP 5973 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των συστατικών ήταν η MS HP-5 (30 m x 320 μm x 0,25 μm, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)

3.3 Μέθοδοι – Διεργασίες

Όλες οι μέθοδοι-διεργασίες που περιγράφονται παρακάτω εφαρμόστηκαν τόσο για τον καρπό όσο και τα φύλλα και τα άνθη του φυτού *Vitex Agnus Castus*.

3.3.1 Συλλογή

Οι καρποί της λυγαριάς παραλήφθηκαν από το εμπόριο ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΚΑΙ ΣΙΑ ΟΕ ως αποξηραμένοι καρποί. Τα φύλλα και τα άνθη συλλέχθηκαν στην περιοχή της Θεσπρωτίας και οδηγήθηκαν σε ξήρανση σε συνθήκες περιβάλλοντος.

3.3.2 Άλεση – Κοκκομετρία

Στην περίπτωση των καρπών η άλεση πραγματοποιήθηκε με χειροκίνητο οικιακό μύλο καθώς ήταν εξαιρετικά σκληροί για να επιτευχθεί με κάποιο άλλο μέσο. Τα φύλλα και τα άνθη αντίθετα αλέστηκαν χρησιμοποιώντας οικιακό blender. Όσον αφορά την κοκκομετρία και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν μεταλλικά κόσκινα διαμέτρου πόρων 1 mm, 630 μm, 400 μm, 200 μm και 100 μm, ενώ στην περίπτωση των φύλλων και των ανθών χρησιμοποιήθηκαν και τρία επιπλέον κόσκινα με διάμετρο πόρων 500 μm, 315 μm και 90 μm. Η ανάλυση κοκκομετρίας των αλεσμένων δίνεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Κοκκομετρία καρπού λυγαριάς

Αρχικό βάρος λειτριβημένων καρπών λυγαριάς: 100 g	
Διάμετρος πόρων	Βάρος κλάσματος (g)
1 mm	32,21
630 μm	50,1
400 μm	12,77
200 μm	4,24
100 μm	0,06
Απώλειες κατά την κοσκίνηση και τη ζύγιση: 0,62 g	

Αντίστοιχα για την κοκκομετρία των φύλλων και των ανθών προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Πίνακας 3: Κοκκομετρία φύλλων/ανθών λυγαριάς

Αρχικό βάρος λειτριβημένων φύλλων και ανθών λυγαριάς: 100 g	
Διάμετρος πόρων	Βάρος κλάσματος (g)
1 mm	7,60
630 μm	76,27
500 μm	2,74
400 μm	4,33
315 μm	4,07
200 μm	2,50
100 μm	1,08
90 μm	0,76
Απώλειες κατά την κοσκίνηση και τη ζύγιση: 0,95 g	

3.3.3 Υδρο-ατμοαπόσταξη

Για τη διεργασία της υδρο-ατμοαπόσταξης χρησιμοποιήθηκε πιλοτικής κλίμακας συσκευή αποτελούμενη από χάλκινο άμβυκα, στον οποίο προστέθηκαν 2 L απιονισμένου νερού. Σε ειδικό διάτρητο πλέγμα που ενσωματώθηκε στον άμβυκα τοποθετήθηκε η αποξηραμένη φυτόμαζα ώστε να μην έρχεται σε επαφή με το νερό. Συγκεκριμένα στην περίπτωση των καρπών ζυγίστηκαν 414,74 g ενώ αντίστοιχα για τα φύλλα και τα άνθη 1 kg που τοποθετήθηκε σε δύο πλέγματα, ώστε το υλικό να μην είναι πακτωμένο και να επιτρέπει τη διέλευση του ατμού. Η θέρμανση του νερού πραγματοποιήθηκε με φλόγα LPG και η συνολική διεργασία της υδρο-ατμοαπόσταξης διήρκησε σχεδόν 16 ώρες. Κατά τη διάρκεια της, οι υδρατμοί που προκύπτουν από το βρασμό έρχονται σε επαφή με τη φυτόμαζα και

παρασύρουν το σύνολο των αρωματικών βιοδραστικών συστατικών που συνιστούν το αιθέριο έλαιο. Εξαιτίας του διαφορετικού ειδικού βάρους που έχουν το αιθέριο έλαιο και το νερό, παρατηρείται διαχωρισμός τους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δυο διακριτών φάσεων εντός του βαθμονομημένου συλλέκτη. Το αιθέριο έλαιο ως πιο «ελαφρύ» αποτελεί την ανώτερη φάση. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα καταγράφονταν ο όγκος του αιθέριου ελαίου και ο όγκος του ανθόνερου. Ωστόσο επειδή η ποσότητα του πρώτου ήταν μικρή τόσο στην περίπτωση των καρπών όσο και των φύλλων/ανθών, ήταν αδύνατη η μελέτη της κινητικής της απόσταξης. Πιο συγκεκριμένα παραλήφθηκαν 0,07 mL αιθέριου ελαίου/100 g καρπών και αντίστοιχα 0,12 mL αιθέριο έλαιο/100 g φύλλων/ανθών. Το έλαιο φυλάχτηκε σε γυάλινο περιέκτη και τα συστατικά του ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο GC-MS. Ως κριτήριο ολοκλήρωσης της υδρο-ατμοαπόσταξης θεωρήθηκε η μη εμφανής συσσώρευση αιθέριου ελαίου σε χρονικό διάστημα 20 min. Μετά το πέρας της διεργασίας, πέρα από το αιθέριο έλαιο, παραλήφθηκαν και ογκομετρήθηκαν το ανθόνερο αλλά και παραλήφθηκαν το πρωτογενές εκχύλισμα των υδατοδιαλυτών ενώσεων στον πυθμένα του άμβυκα.



Εικ. 21. Συσκευή απόσταξης Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

3.3.4 Ξήρανση

Η ξήρανση πραγματοποιήθηκε τόσο για τον καρπό όσο και για τα φύλλα/άνθη σε φούρνο με αέρα στους 40° C για διάστημα μίας ημέρας (*overnight* ξήρανση). Παράλληλα με την ξήρανση πραγματοποιήθηκε και προσδιορισμός υγρασίας του ξηρού υλικού. Τα αποτελέσματα για τους καρπούς και τα φύλλα που προέκυψαν δίνονται στους δύο πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα ξήρανσης και προσδιορισμός υγρασίας καρπού λυγαριάς

Αρχικό νωπό δείγμα	5,09 g
Δείγμα μετά από ξήρανση	4,65 g
% Υγρασία ξηρού δείγματος	8,64

Πίνακας 5: Αποτελέσματα ξήρανσης και προσδιορισμός υγρασίας φύλλων/ανθών λυγαριάς

Αρχικό νωπό δείγμα	5,03
Δείγμα μετά από ξήρανση	4,57
% Υγρασία ξηρού δείγματος	9,14

3.3.5 Εκχύλιση Soxhlet

Μετά την ξήρανση το απεσταγμένο φυτικό υλικό υπέστη περетаίρω άλεση και κοσκίνηση με κόσκινο 0,5 mm για να ακολουθήσει συμβατική εκχύλιση Soxhlet με διαλύτες κλιμακούμενης πολικότητας. Το υδατικό εκχύλισμα είχε ήδη παραληφθεί από τον άμβυκα, μετά την ολοκλήρωση της υδρο-ατμοαπόσταξης. Στην περίπτωση των καρπών συλλέχθηκαν 2590 mL υδατικού εκχυλίσματος και στην περίπτωση των φύλλων/ανθών 1760 mL αντίστοιχα. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 39,4 g απεσταγμένου και αποξηραμένου καρπού και 32,8 g φύλλων/ανθών, τα οποία τοποθετήθηκαν σε φύσιγγα πεπιεσμένου χαρτιού και εκχυλίστηκαν διαδοχικά με οξικό αιθυλεστέρα και αιθανόλη (410 mL). Κατ' αυτόν τον τρόπο πραγματοποιήθηκε παραλαβή τόσο των υδατοδιαλυτών βιοδραστικών συστατικών μέσω του υδατικού εκχυλίσματος, όσο και των συστατικών μεσαίας πολικότητας (αιθανολικό εκχύλισμα) αλλά και των άπολων (εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα). Στην περίπτωση των φύλλων μάλιστα ζυγίστηκαν επιπλέον 15,1 g υλικού, τα οποία υπέστησαν εκχύλιση με νερό μέχρις πλήρους εκφυλίσεως του υλικού, με στόχο όχι τόσο την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών, αλλά κυρίως τον προσδιορισμό της απόδοσης της εκχύλισης. Η διάρκεια της κάθε εκχύλισης ήταν περίπου οκτώ έως δέκα ώρες σε συνθήκες ήπιου βρασμού του εκάστοτε διαλύτη. Κριτήριο ολοκλήρωσης της διεργασίας αποτελούσε η απουσία χρώματος εντός του εκχυλιστήρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο διαλύτης έχει παραλάβει όλα τα συμβατά με αυτόν βιοδραστικά συστατικά. Το χρώμα του εκχυλισμάτων που παραλήφθηκαν με τη μέθοδο Soxhlet ήταν έντονο πράσινο στην περίπτωση του οξικού αιθυλεστέρα και της

αιθανόλης λόγω της παρουσίας χλωροφύλλης και φαινολών. Αντίθετα, στην περίπτωση της εκφυλιστικής εκχύλισης με νερό ήταν σκούρο καφέ, καθώς λόγω υψηλής θερμοκρασίας ο διαλύτης είχε συμπαρασύρει και ουσίες διαφορετικής πολικότητας που στην πορεία εμφανίστηκαν ως ίζημα. Μετά το πέρας της κάθε εκχύλισης, η φύσιγγα εξαγόταν από τον εκχυλιστήρα και οδηγούνταν προς ξήρανση για μία ημέρα σε συνθήκες περιβάλλοντος. Έπειτα από την ξήρανση, η εκχύλιση επαναλαμβανόταν στην ίδια φυτόμαζα με τον μεγαλύτερης πολικότητας διαλύτη. Με το πέρας της κάθε εκχύλισης, το εκχύλισμα συλλεγόταν σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL και αραιωνόταν με τον αντίστοιχο διαλύτη ως τη χαραγή.

3.3.6 Μέθοδος DPPH

Βασική προϋπόθεση της συγκεκριμένης μεθόδου *Brand-Williams et al.* (1995) είναι όλα τα σκεύη που χρησιμοποιούνται να έχουν διαβραχεί προηγουμένως με μεθανόλη, καθώς είναι ο μόνος διαλύτης που μπορεί να διαλύσει την εξαιρετικά δυσδιάλυτη σκόνη του αντιδραστήριου DPPH. Αρχικά ζυγίζονται 0,0025 g από το αντιδραστήριο DPPH χρησιμοποιώντας αλουμινόχαρτο σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια μεταγγίζονται σε ογκομετρική φιάλη 100 mL, η οποία συμπληρώνεται ως τη χαραγή με μεθανόλη. Το διάλυμα ανακινείται καλά μέχρις ότου το αντιδραστήριο να διαλυθεί πλήρως και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος. Προτού πραγματοποιηθεί το επίσημο πείραμα DPPH για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της ουσίας που μελετάται, κρίνεται απαραίτητο να γίνουν ορισμένα δοκιμαστικά πειράματα δοκιμάζοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις της προς ανάλυση ουσίας ώστε να βρεθεί η κατάλληλη που να εμπίπτει στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης DPPH. Συνήθως δοκιμάζονται αραιώσεις της τάξης του 2-60 % v/v, αναλόγως και τις βιβλιογραφικές αναφορές. Αφού παρασκευαστούν οι επιλεχθείσες αραιώσεις σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, λαμβάνονται 3,9 mL διαλύματος DPPH με σιφώνιο μέτρησης των 5 mL και μεταγγίζονται σε γυάλινα δοκιμαστικά σωληνάκια, στα οποία κατόπιν προστίθενται 100 μ L δείγματος με χρήση πιπέτας 500 μ L. Παρασκευάζονται διπλά δείγματα για κάθε συγκέντρωση για μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα, ενώ ταυτόχρονα παρασκευάζεται και ένα «τυφλό» δείγμα που περιέχει 3,9 mL διαλύματος DPPH και 100 μ L μεθανόλης. Τα σωληνάκια πωματίζονται, ανακινούνται στο

Vortex και φυλάσσονται σε σκοτεινό μέρος καθώς τα δείγματα είναι φωτοευαίσθητα. Η επώαση για τα δοκιμαστικά πειράματα διαρκεί περίπου μία ώρα και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 515 nm παρέχοντας έτσι μία πρώτη εικόνα για την κατάλληλη αραιώση. Ο μηδενισμός του φωτόμετρου γίνεται με καθαρή μεθανόλη και συνήθως επιλέγεται η δοκιμαστική συγκέντρωση με απορρόφηση σχεδόν μισή από την αντίστοιχη του τυφλού δείγματος. Αφού επιλεγθεί και παρασκευαστεί η σωστή συγκέντρωση δείγματος C1, πραγματοποιούνται άλλες τρεις διαδοχικές αραιώσεις σε αυτή: 0,1C1, 0,3C1 και 0,7C1. Για κάθε ένα από τα δείγματα των παραπάνω αραιώσεων, συμπεριλαμβανομένης και της αρχικής συγκέντρωσης C1 ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με τα δοκιμαστικά πειράματα. Η μοναδική αλλαγή είναι ότι στο επίσημο πείραμα η διάρκεια επώασης είναι περίπου τρεις ώρες, διάστημα κατάλληλο για τις περισσότερες ουσίες. Όσον αφορά τα πειράματα DPPH που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα καλλυντικής κρέμας εμπλουτισμένης με εκχύλισμα λυγαριάς, χρησιμοποιήθηκε *DMSO* για τη διάλυση της κρέμας και την περαιτέρω διεξαγωγή του πειράματος. Αναλυτικότερα ζυγίστηκε 1 g εμπλουτισμένης κρέμας και αραιώθηκε με *DMSO* σε ογκομετρική φιάλη 10 mL. Το διάλυμα ανακινήθηκε στο *Vortex* και στη συνέχεια υπέστη διήθηση με μικροφίλτρο, προτού ληφθούν τα απαραίτητα 100 μL δείγματος για τη διεξαγωγή του πειράματος.

3.3.7 Μέθοδος Folin – Ciocalteu

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *Folin – Ciocalteu* σύμφωνα με τον *Waterhouse* (2005). Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα Na_2CO_3 . Σε ποτήρι ζέσης προστίθενται 200 g άνυδρου Na_2CO_3 και 800 mL απιονισμένου νερού. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού υπό ανάδευση και στη συνέχεια αφήνεται να ψυχθεί. Ακολουθεί διήθηση και μετάγγιση του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη 1 L, η οποία συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό ως τη χαραγή. Στη συνέχεια το δείγμα προς ανάλυση αραιώνεται στο 1/5 της αρχικής συγκέντρωσης και όλα τα επόμενα στάδια πραγματοποιούνται με το αραιωμένο δείγμα. Αν το αρχικό δείγμα είναι υδατικό εκχύλισμα ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την αραιώση είναι νερό, ενώ σε κάθε άλλη περίπτωση χρησιμοποιείται μεθανόλη. Για τη μέτρηση του συνολικού φαινολικού φορτίου προστίθενται σε δοκιμαστικά σωληνάκια 100μL από το αραιωμένο δείγμα, 7,9 mL απιονισμένο νερό και 500 μL αντιδραστηρίου *Folin – Ciocalteu*. Παρασκευάζονται δύο

δοκιμαστικά σωληνάκια για κάθε δείγμα για μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα, καθώς και ένα «τυφλό» στο οποίο αντί των 100 µL δείγματος προστίθενται 100 µL απιονισμένου νερού. Ακολουθεί ανάδευση στο *Vortex* και οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται σε ηρεμία για 30 s - 8 min. Κατόπιν προστίθενται 1500 µL διαλύματος Na₂CO₃ και τα δείγματα αναδεύονται και πάλι. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 40° C για 30 min. Τέλος πραγματοποιείται φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης στα 765 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE), μέσω της κατασκευής καμπύλης αναφοράς. Αναλυτικότερα, παρασκευάζεται διάλυμα γαλλικού οξέος (stock διάλυμα) συγκέντρωσης 5000 ppm και αραιώνεται με απιονισμένο νερό.

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL, προστίθενται 1, 2, 3, 5 και 10 mL από το stock διάλυμα γαλλικού οξέος και στη συνέχεια ακολουθεί αραιώση με νερό. Κατ' αυτόν τον τρόπο, προκύπτουν τα διαλύματα με συγκεντρώσεις 50, 100, 150, 250, 500 mg/ L γαλλικό οξύ, εύρος αποτελεσματικό για την ανάλυση.

3.3.8 Μέθοδος HPLC-DAD

Η χρωματογραφική μέθοδος HPLC-DAD χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό του φαινολικού προφίλ του φυτού *Vitex Agnus Castus* και την παραλαβή των χρωματογραφημάτων. Η ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων διεξήχθη σε σύστημα χρωματογραφίας *Varian 212-LC*, σε συνδυασμό με ένα φασματόμετρο μάζας παγίδας ιόντων εξοπλισμένο με μια μεσοεπιφάνεια ηλεκτροψεκασμού και έναν ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Το σύστημα ελέγχου και η ανάκτηση δεδομένων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό *Varian Workstation (Varian Inc., Palo Alto, California)*. Τα δείγματα αφού διηθήθηκαν (0.45 µm, φίλτρα σύριγγας *PVDF, Teknokroma*, Βαρκελώνη, Ισπανία) ενσωματώθηκαν σε μία στήλη ανάστροφης φάσης *Hypersil C18 (ODS 5 µm, 250 x 4.6 mm, MZ Analysentechnik, Mainz, Germany)*. Η αρχική σύνθεση της κινητής φάσης ήταν 90 % A και 10 % B. Με γραμμικές κλίσεις η σύνθεση άλλαξε σε 71 % A και 29 % B σε διάστημα 35 min, ενώ σε διάστημα 70 min η σύνθεση μετατράπηκε σε 0 % A και 100 % B. Ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε σε 0,4 mL/min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 µL και η ανίχνευση DAD πραγματοποιήθηκε στα 280 nm για τις φλαβονόνες και τις

φλαβόνες, και στα 360 nm για τις φλαβονόλες και τις φλαβόνες. Η ποσοτικοποίηση των επιμέρους ενώσεων βασίστηκε σε καμπύλες αναφοράς που έχουν κατασκευαστεί για χαρακτηριστικές ουσίες κάθε κατηγορίας, στα προαναφερθέντα μήκη κύματος.

3.3.9 Μέθοδος GC-MS

Η χρωματογραφική μέθοδος GC-MS χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των βιοδραστικών συστατικών του αιθέριου ελαίου που παραλήφθηκε τόσο από τους καρπούς όσο και από τα φύλλα/άνθη του φυτού *Vitex Agnus Castus*. Πριν την έναρξη της ανάλυσης το αιθέριο έλαιο αραιώθηκε σε εξάνιο με αναλογία 2μL ελαίου σε ογκομετρική 10 mL. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ενός συστήματος GC HP 6890, συζευγμένο με έναν εκλεκτικό ανιχνευτή μάζας HP 5973 (*Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA*). Τα συστατικά των μιγμάτων διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας στήλη MS HP-5 (30 m x 320 μm x 0,25 μm, *Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA*). Η θερμοκρασία του κλιβάνου ξεκίνησε στους 50° C και αυξήθηκε στους 100° C, με ρυθμό 10° C/min, και στη συνέχεια έφτασε τους 220° C με ρυθμό 15° C/min. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο με μέση ταχύτητα ροής 1 mL/min. Σε κάθε ανάλυση σαρώθηκε το εύρος 40-400, και η ταυτοποίηση των ουσιών βασίστηκε στη σύγκριση με τα δεδομένα των βιβλιοθηκών φασμάτων μαζών NIST και Wiley.



Εικ. 22. Σύστημα αέριας χρωματογραφίας GC HP 6890

3.3.10 Ενσωμάτωση εκχυλίσματος λυγαριάς σε γαλάκτωμα (καλλυντικό προϊόν)

Έπειτα από μέτρηση του συνολικού φαινολικού φορτίου και της αντιοξειδωτικής δράσης, επιλέχθηκε το αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών ως το πιο πλούσιο σε δραστικές

φαινόλες με αντιοξειδωτικό χαρακτήρα. Ακολούθησε ενσωμάτωση του εκχυλίσματος σε φορέα-γαλάκτωμα με στόχο τη μελέτη της επίδρασης παραγόντων όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία στην αντιοξειδωτική δράση που προσέδωσε το εκχύλισμα σε καλλυντικό προϊόν. Ως φορέας-γαλάκτωμα χρησιμοποιήθηκε μια εμπορικά διαθέσιμη ενυδατική βάση (*Wild Rose, KORRES NATURAL PRODUCTS, Greece*). Λόγω της φύσης του εκχυλίσματος η ενσωμάτωση δεν ήταν δυνατό να γίνει με απλή ανάμιξη και ανάδευση και ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκε πολυαιθυλενογλυκόλη (*PEG*) ως φορέας προ-ενσωμάτωσης του εκχυλίσματος. Αρχικά αναμείχθηκαν 600 mL αιθανολικού εκχυλίσματος με 31 g *PEG*. Το τελικό διάλυμα υπέστη εξάτμιση μέχρι ξηρού με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύτη. Το μίγμα *PEG* και βιοδραστικών συστατικών που δέσμευσε ο διαλύτης παραλήφθηκε από τα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης του περιστροφικού εξατμιστήρα και αναμείχθηκε με 159,6 g γαλακτώματος-φορέα. Ακολούθησε έντονη ανάδευση-ανάμιξη σε εργαστηριακό blender ώστε να επιτευχθεί πλήρης ανάμιξη και ενσωμάτωση του εκχυλίσματος προς παραγωγή μιας καλλυντικής κρέμας εμπλουτισμένη με εκχύλισμα βιοδραστικών ουσιών λυγαριάς. Προέκυψαν 183 g εμπλουτισμένης κρέμας, συγκέντρωσης 2,5% w/w ξηρού εκχυλίσματος, τα οποία μοιράστηκαν σε γυάλινους περιέκτες των 40 g. Τα δείγματα μοιράστηκαν σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας: 25° C, 35° C, 45° C και 0° C αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις DPPH για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των κρεμών και την επίδραση που έχουν σε αυτή η θερμοκρασία και ο χρόνος αποθήκευσης σε δειγματοληψίες ανά χρονικό διάστημα του 1,5 μήνα.



Εικ. 23. Καλλυντική κρέμα εμπλουτισμένη με αιθανολικό εκχύλισμα λυγαριάς.

Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Απόσταξη

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα που αφορούν στη διεργασία της απόσταξης τόσο των καρπών όσο και των φύλλων/ανθών. Η ποσότητα του αιθέριου ελαίου που προέκυψε και στις δύο περιπτώσεις ήταν μικρή (0,07 mL /100 g καρπών και 0,12 mL/100 g φύλλων/ανθών) και δεν επέτρεπε τον προσδιορισμό της κινητικής της διεργασίας της απόσταξης. Συνεπώς πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτική ανάλυση του αιθέριου ελαίου αλλά και του ανθόνερου με τη μέθοδο GC-MS.

4.1.1 Καρπός

Πραγματοποιήθηκαν τρεις αναλύσεις για το αιθέριο έλαιο και δύο για το ανθόνερο με στόχο μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα. Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με δεδομένα από τις βιβλιοθήκες φάσματος μάζας NIST και Wiley. Οι χρόνοι έκλουσης μετασχηματίστηκαν στους αντίστοιχους δείκτες ανάσχεσης (RI), αναλύοντας ένα πρότυπο μίγμα αλκανίων C7-C30 και εφαρμόζοντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$RI = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{t_r(\text{compound}) - t_r(n)}{t_r(N) - t_r(n)} \right]$$

(Εξίσωση 1)

Όπου,

RI: ο δείκτης ανάσχεσης Kovats,

n: ο αριθμός ατόμων άνθρακα που υπάρχουν στο μικρότερο n-αλκάνιο,

N: ο αριθμός των ατόμων άνθρακα που υπάρχουν στο μεγαλύτερο n-αλκάνιο,

tr: ο χρόνος έκλουσης

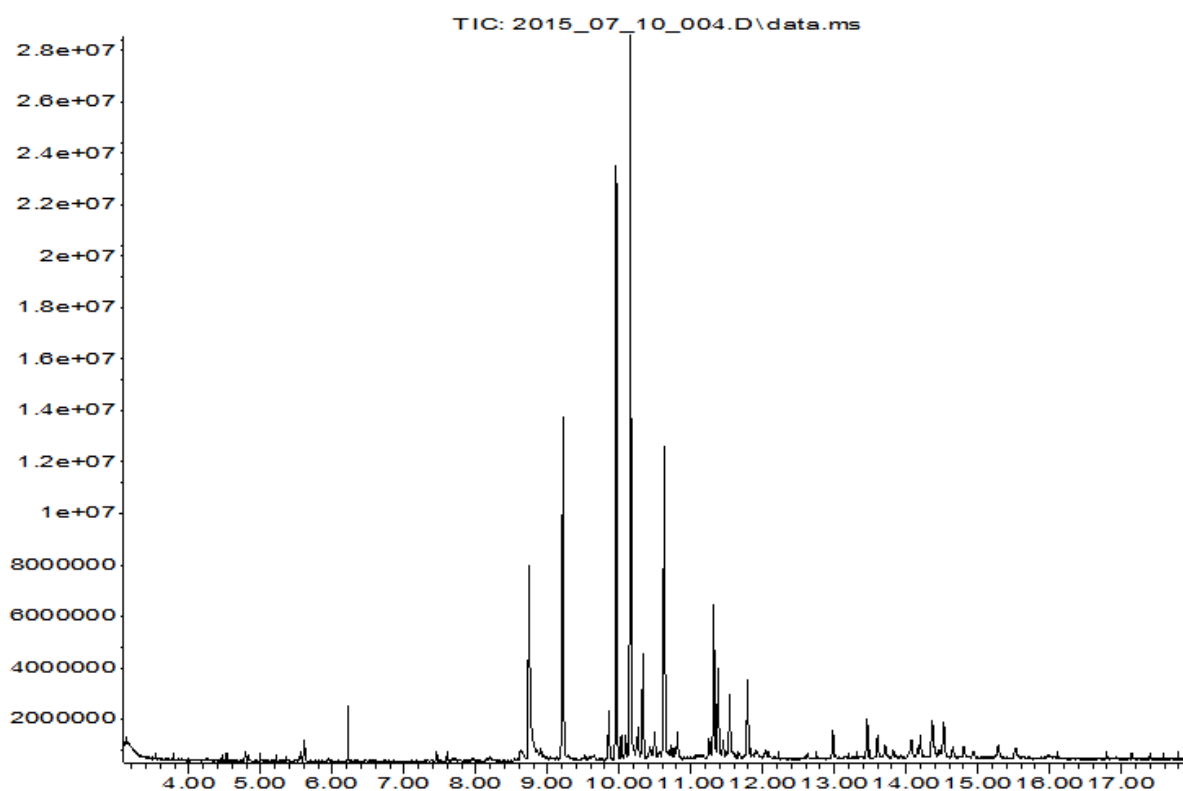
Στη συνέχεια ακολουθεί ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου και του ανθόνερου, καθώς και ένας πίνακας που παρουσιάζει τα βιοδραστικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν, τους δείκτες ανάσχεσης (Retention Index, RI) καθώς και τη σύσταση του αιθέριου ελαίου και του ανθόνερου στις επιμέρους ουσίες, με βάση τις ποσοστιαίες

επιφάνειες των κορυφών. Ο δείκτης RI που απεικονίζεται στον πίνακα αποτελεί τη μέση τιμή των επιμέρους δεικτών και αντίστοιχα ο δείκτης sd (standard deviation), δείχνει την απόκλιση ανάμεσα στα RI που προέκυψαν από κάθε ανάλυση. Όσον αφορά την % σύσταση του αιθέριου ελαίου σε κάθε μια από τις ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν, προέκυψε με βάση τον παρακάτω τύπο.

$$\% \text{ Σύσταση αιθέριου ελαίου} = \left(\frac{\text{εμβαδόν ουσίας}}{\text{ολικό εμβαδόν}} \right) * 100 \quad (\text{Εξίσωση 2})$$

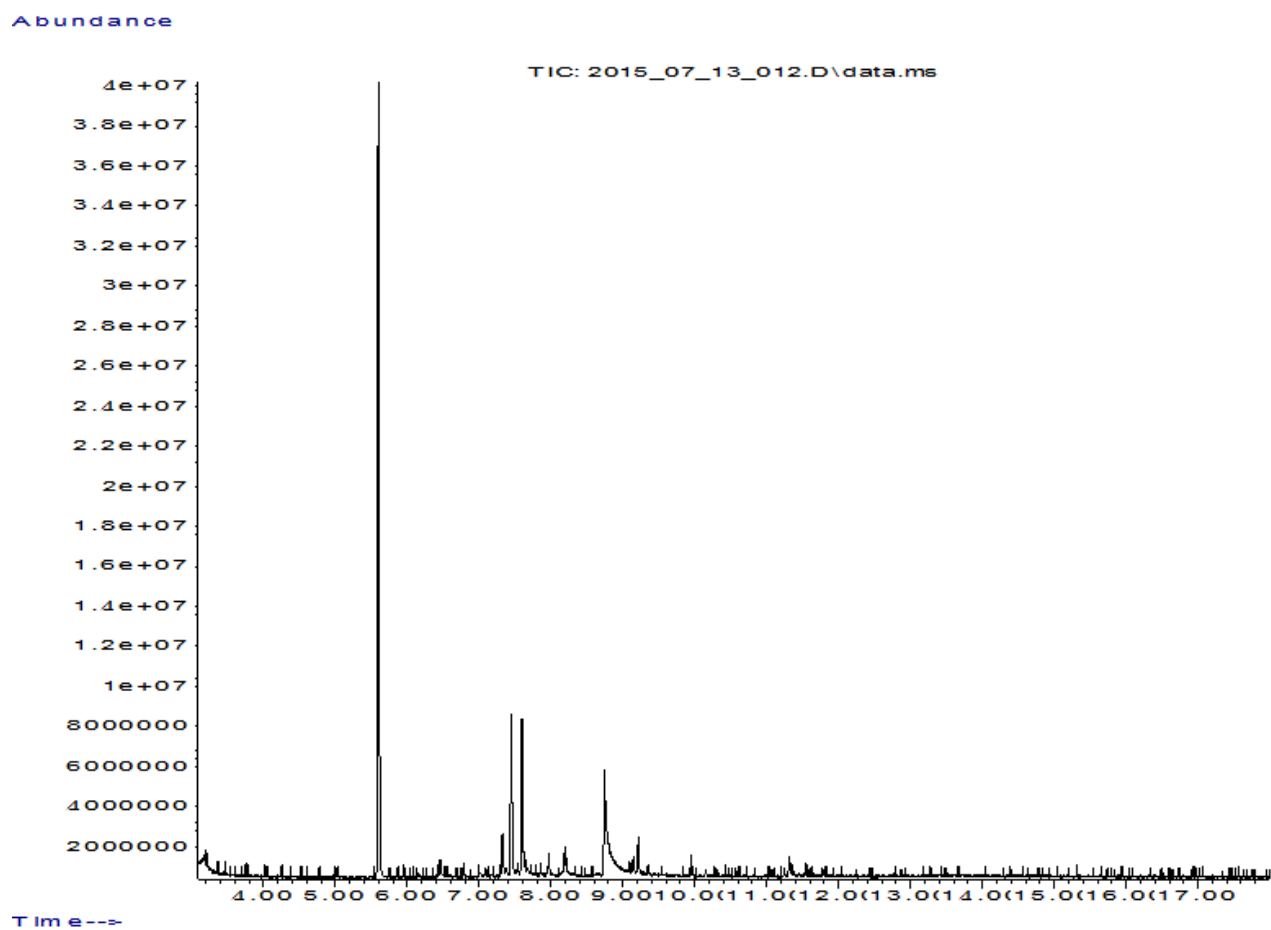
Το ολικό εμβαδόν υπολογίζεται με πρόσθεση των επιμέρους εμβαδών των ουσιών που προκύπτουν κατά την ανάλυση και εκφράζει τη συνολική σύσταση του αιθέριου ελαίου.

Abundance



Time-->

Εικ. 24. Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου καρπών λυγαριάς (GC-MS)



Εικ. 25. Χρωματογράφημα ανθόνερου καρπών λυγαριάς (GC-MS)

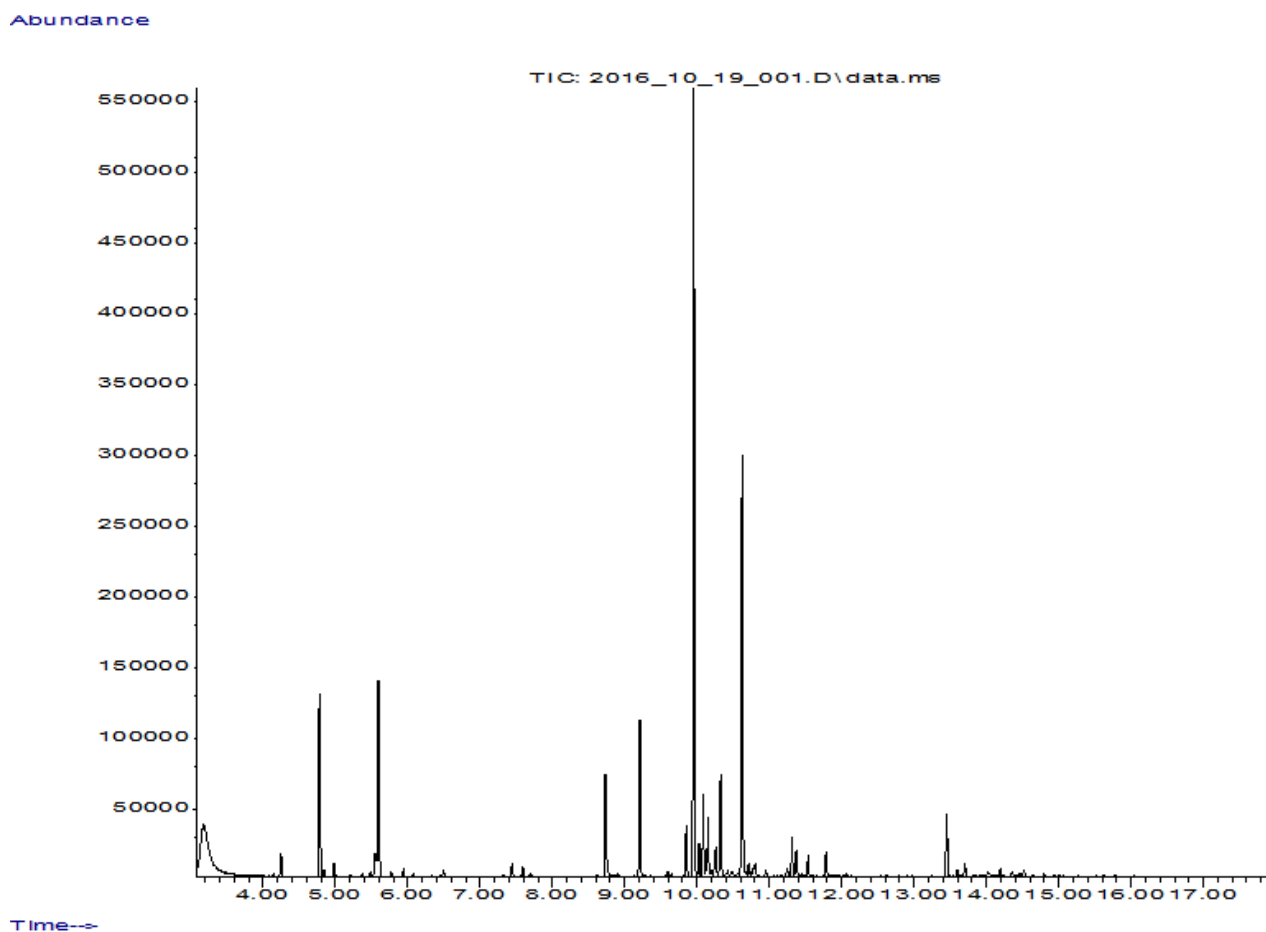
Πίνακας 6. Ταυτοποιημένα βιοδραστικά συστατικά αιθέριου ελαίου και ανθόνερο από καρπούς λυγαριάς (GC-MS).

	Συστατικό	Αιθέριο Έλαιο		Ανθόνερο
		R.I.	% σύσταση	% σύσταση
1	β-φαρνεσένιο	1459,4 ± 0,1	22,92 ± 0,04	0,6 ± 0,1
2	trans-καρυφυλλένιο	1436,9 ± 0,0	19,54 ± 0,21	0,6 ± 0,6
3	δικυκλογερμακρένιο	1514,3 ± 0,1	11,58 ± 0,02	0,2 ± 0,0
4	R(+)- λεμονένιο	1355,9 ± 0,1	11,49 ± 0,21	2,8 ± 0,0
5	2-p-κυμένιο	1305,9 ± 0,1	10,43 ± 0,05	20,5 ± 1,3
6	σπαθουλενόλη	1599,0 ± 0,1	5,48 ± 0,12	2,0 ± 0,1
7	αλλοαρωμαδενοδρένιο	1479,3 ± 0,1	3,60 ± 0,04	0,2 ± 0,1
8	οξίδιο του καρυφυλλενίου	1606,7 ± 0,2	3,28 ± 0,06	0,3 ± 0,1
9	γ-καδινένιο	1659,9 ± 0,2	3,17 ± 0,22	0,6 ± 0,3
10	γ- γουργουνένιο	1627,6 ± 0,2	2,29 ± 0,03	0,5 ± 0,1
11	α-γουργουνένιο	1425,3 ± 0,1	1,78 ± 0,03	0,1 ± 0,1
12	(-)-γερμακρένιο D	1498,2 ± 0,0	0,97 ± 0,04	0,2 ± 0,0
13	α-χουμουλένιο	1471,7 ± 0,2	0,93 ± 0,04	0,2 ± 0,1
14	(+)-β-φουνεμπρένιο	1451,8 ± 0,1	0,90 ± 0,02	0,1 ± 0,0
15	1,8-κινεόλη	1037,2 ± 0,0	0,82 ± 0,04	71,0 ± 0,9
16	α-περγαμοντένιο	1445,2 ± 0,1	0,81 ± 0,02	0,1 ± 0,0

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, τα συστατικά **β-φαρνεσένιο** και **trans-καρυφυλλένιο** υπερισχύουν έναντι των υπολοίπων, με ποσοστά 22,92% και 19,54% αντίστοιχα επί του ολικού αιθέριου ελαίου. Ως δευτερεύοντα συστατικά χαρακτηρίζονται το **δικυκλογερμακρένιο** (11,58%), **R(+)- λεμονένιο** (11,49%) και **2-p-κυμένιο** (10,43%), ενώ τα υπόλοιπα συστατικά βρίσκονται σε ίχνη. Οι παραπάνω πέντε ουσίες αποτελούν το 75,96 % της ολικής επιφάνειας των κορυφών. Όσον αφορά το ανθόνερο, τα δύο κυριότερα βιοδραστικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ήταν η **1,8-κινεόλη** σε ποσοστό 71% και το **2-p-κυμένιο** σε αντίστοιχο ποσοστό 20,5%.

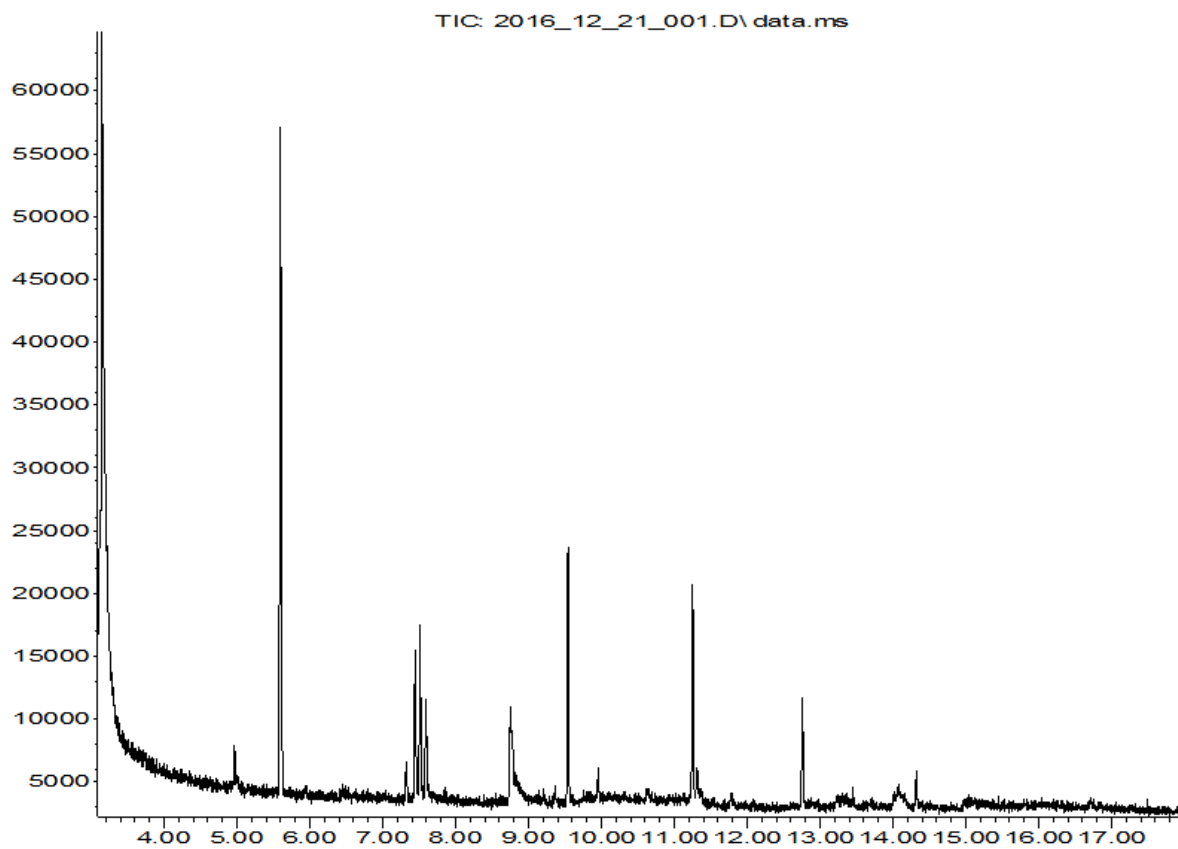
4.1.2 Φύλλα/Ανθη

Στην περίπτωση των φύλλων/ανθών πραγματοποιήθηκαν δύο αναλύσεις τόσο για το αιθέριο έλαιο όσο και για το ανθόνερο με στόχο μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα, ενώ για την ταυτοποίηση των βιοδραστικών συστατικών ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτή των καρπών. Παρακάτω παρατίθενται τα χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα του αιθέριου ελαίου και του ανθόνερου, καθώς και ένας συνοπτικός πίνακας με τα αντίστοιχα ταυτοποιημένα βιοδραστικά συστατικά, τους δείκτες ανάσχεσης (RI) και τη σύσταση του αιθέριου ελαίου και του ανθόνερου στις επιμέρους ουσίες, με βάση τις ποσοστιαίες επιφάνειες των κορυφών.



Εικ. 26. Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου φύλλων/ανθών λυγαριάς (GC-MS)

Abundance



Εικ. 27. Χρωματογράφημα ανθόνερου φύλλων/ανθών λυγαριάς (GC-MS)

Πίνακας 7. Ταυτοποιημένα βιοδραστικά συστατικά αιθέριου ελαίου και ανθόνερο από φύλλα/άνθη λυγαριάς (GC-MS).

	Συστατικό	Αιθέριο έλαιο		Ανθόνερο
		R.I.	% σύσταση	% σύσταση
1	trans-καρυοφυλλένιο	1436,5 ± 0,2	32,00 ± 0,80	1,13
2	δικυκλογερμακρένιο	1514,0 ± 0,0	17,55 ± 0,75	0,38 ± 0,33
3	1,8-κινεόλη	1036,2 ± 0,2	9,02 ± 0,12	54,04 ± 8,85
4	(+)-σαβινένιο	975,3 ± 0,0	7,84 ± 0,49	0,24 ± 0,04
5	(R)-(+)-λιμονένιο	1355,5 ± 0,1	6,27 ± 0,02	0,41 ± 0,16
6	αλλοαρωμαδενδρένιο	1479,0 ± 0,0	4,17 ± 0,13	0,30 ± 0,08
7	2-p-κυμένιο	1305,6 ± 0,7	4,10 ± 1,32	14,51
8	(+)-β-φουνεμπρένιο	1451,6 ± 0,2	3,17 ± 0,07	0,13 ± 0,02
9	β-φαρνεσένιο	1459,0 ± 0,2	2,61 ± 0,05	0,07 ± 0,02
10	α-γουργουνένιο	1424,8 ± 0,2	2,19 ± 0,05	0,18 ± 0,13
11	σπαθουλενόλη	1598,4 ± 0,2	1,56 ± 0,06	1,57 ± 0,73
12	α-χουμουλένιο	1471,3 ± 0,0	1,42 ± 0,08	0,17 ± 0,12
13	α-περγαμοντένιο	1445,0 ± 0,2	1,30 ± 0,02	0,31 ± 0,10
14	αρωμαδενδρένιο	1659,6 ± 0,0	1,18 ± 0,05	0,88
15	οξειδίο του καρυοφυλλενίου	1606,4 ± 0,0	1,16 ± 0,08	0,28 ± 0,10
16	α-πινένιο	935,8 ± 0,0	0,99 ± 0,06	0,21 ± 0,02
17	γ-γουργουνένιο	1627,3 ± 0,2	0,83 ± 0,03	0,21 ± 0,13
18	β-μυρκένιο	989,9 ± 0,0	0,63 ± 0,04	3,27
19	(+)-P-μενθ-1-εν-4-όλη	1184,6 ± 0,0	0,60 ± 0,04	11,63 ± 1,51
20	(R)-(+)-α-τερπινεόλη	1196,5 ± 0,0	0,46 ± 0,03	7,34 ± 0,09
21	γ-τερπινένιο	1062,3 ± 0,0	0,38 ± 0,02	0,24 ± 0,03
22	παλουστρόλη	1590,3 ± 0,0	0,33 ± 0,02	12,29 ± 2,08
23	β-cis-οκιμένιο	1049,4 ± 0,0	0,24 ± 0,01	0,11 ± 0,01

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 7, τα συστατικά **trans-καρυοφυλλένιο** και **δικυκλογερμακρένιο** υπερισχύουν έναντι των υπολοίπων, με ποσοστά 32,00% και 17,55% αντίστοιχα επί του ολικού αιθέριου ελαίου. Ως δευτερεύοντα συστατικά χαρακτηρίζονται η **1,8-κινεόλη** (9,02%), το **(+)-σαβινένιο** (7,84%) και το **R-(+)- λεμονένιο** (6,27%), ενώ τα υπόλοιπα συστατικά βρίσκονται σε ίχνη. Οι προαναφερθείσες ουσίες συνιστούν το 72,68 % της ολικής επιφάνειας των κορυφών. Όσον αφορά το ανθόνερο, τα βιοδραστικά συστατικά **1,8-κινεόλη** και **2-p-κυμένιο** ταυτοποιήθηκαν σε ποσοστό 54,04% και 14,51% αντίστοιχα, ακολουθούν σε μικρότερα ποσοστά τα συστατικά **(+)-P-μενθ-1-εν-4-όλη** (11,63%) και **(R)-(+)-α-τερπινεόλη** (7,34%), ενώ τα υπόλοιπα συστατικά εντοπίζονται σε ίχνη.

Σχολιασμός και σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ καρπών και φύλλων/ανθών:

• Αιθέριο έλαιο:

Η ποιοτική σύσταση του αιθέριου ελαίου των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus* είναι παρόμοια με αυτή του αιθέριου ελαίου των φύλλων/ανθών του. Πιο συγκεκριμένα, το βιοδραστικό συστατικό που υπερισχύει και στα δύο είναι το **trans-καρυοφυλλένιο** με ποσοστό 19,54% στους καρπούς και 32,00% στα φύλλα/άνθη. Στο αιθέριο έλαιο του καρπού εντοπίζεται σε υψηλό ποσοστό (22,92%) το συστατικό **β-φαρνεσένιο**, ενώ στο αντίστοιχο των φύλλων/ανθών το **δικυκλογερμακρένιο** (17,55%). Σε ελαφρώς χαμηλότερο ποσοστό (11,58%) εμφανίζεται το β-φαρνεσένιο και στο αιθέριο έλαιο των φύλλων/ανθών, ενώ το ίδιο ισχύει και για το **R(+)- λεμονένιο** (6,27%) που στον καρπό εντοπίστηκε σε ποσοστό 11,49%. Όσον αφορά το βιοδραστικό συστατικό **2-p-κυμένιο**, εντοπίστηκε και στα δύο αιθέρια έλαια με ποσοτική ωστόσο διαφορά: 10,43% στους καρπούς και 4,10% στα φύλλα/άνθη. Βασική διαφορά στη σύσταση των δύο αιθέριων ελαίων αποτελεί το συστατικό **1,8-κινεόλη**, το οποίο εντοπίζεται σε ίχνη στους καρπούς αλλά σε σημαντικό ποσοστό (9,02%) στα φύλλα/άνθη. Επιπρόσθετα, συστατικά όπως **(+)-σαβινένιο**, **β-μυρκένιο**, **(+)-P-μενθ-1-εν-4-όλη**, **(R)-(+)-α-τερπινεόλη**, **γ-τερπινένιο**, **παλουστρόλη** και **β-cis-οκιμένιο**, αν και σε ίχνη, εντοπίζονται μόνο στο αιθέριο έλαιο των φύλλων/ανθών. Κατά αντιστοιχία, τα συστατικά **γ-καδινένιο** και **α-περγαμοντένιο**, επίσης σε ίχνη, εντοπίζονται μόνο στο αιθέριο έλαιο των καρπών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις που

πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της εν λόγω διπλωματικής εργασίας συμφωνούν κατά πολύ με αυτά αντίστοιχων επιστημονικών μελετών. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τους *Stojkovic' et al.*, (2011), τα βιοδραστικά συστατικά α-πινένιο, σαβινένιο, β-μυρκένιο, ρ-κυμένιο, γ-τερπινένιο και 1,8-κινεόλη εντοπίζονται σε υψηλά ποσοστά τόσο στο αιθέριο έλαιο του καρπού όσο και στο αντίστοιχο των φύλλων/ανθών. Πέραν αυτών, κοινά βιοδραστικά συστατικά και στις δύο μελέτες αποτελούν τα (+)-P-μενθ-1-εν-4-όλη, (R)-(+)-α-τερπινεόλη, παλουστρόλη, β-cis-οκιμένιο, γ-καδινένιο και α-περγαμοντένιο. Ωστόσο, τα trans-καρνοφυλλένιο και β-φαρνεσένιο εντοπίζονται σε πολύ χαμηλό ποσοστό στη μελέτη των *Stojkovic' et al.*, (2011), σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, όπου συνιστούν μεγάλο μέρος του αιθέριου ελαίου. Μία ακόμα σχετική μελέτη που αφορά τη σύσταση του αιθέριου ελαίου των καρπών και των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus* είναι αυτή των *Marongiu, et al.*, (2010). Με βάση τα αποτελέσματα της συγκεκριμένη μελέτης τόσο το αιθέριο έλαιο των καρπών όσο και των φύλλων/ανθών εμφανίζει σχεδόν πανομοιότυπη σύσταση με αυτή που προέκυψε στην παρούσα διπλωματική, με τα βιοδραστικά συστατικά δικυκλογερακρένιο, 1,8-κινεόλη, καρνοφυλλένιο, α-πινένιο, φαρνεσένιο, σαβινένιο και β-μυρκένιο να εντοπίζονται σε μεγάλα ποσοστά. Τέλος, η ποιοτική σύσταση του αιθέριου ελαίου των καρπών και των φύλλων/ανθών της λυγαριάς, όπως προέκυψε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής έρευνας, επιβεβαιώνεται και από τις μελέτες της *Lucks*, (2003), αλλά και των *Duymus, et al.*, (2014). Η μόνη διαφορά που εντοπίζεται είναι στην ποσοτική σύσταση των αιθέριων ελαίων στα εκάστοτε βιοδραστικά συστατικά, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στον τόπο ή/και την εποχή συγκομιδής του φυτικού υλικού.

• Ανθόνερο:

Όσον αφορά το ανθόνερο, και στις δύο περιπτώσεις τα δύο κυριότερα βιοδραστικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ήταν η **1,8-κινεόλη** και το **2-p-κυμένιο**, με μοναδική διαφορά ότι στο ανθόνερο των καρπών εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό. Επίσης στο ανθόνερο των φύλλων εντοπίστηκαν και δύο ουσίες: η **(+)-P-μενθ-1-εν-4-όλη** και η **(R)-(+)-α-τερπινεόλη**, οι οποίες δεν εντοπίστηκαν στο αντίστοιχο των καρπών.

4.2 Εκχύλιση

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, για το φυτό *Vitex Agnus Castus* χρησιμοποιήθηκε η συμβατική εκχύλιση *Soxhlet*. Σύμφωνα με τη μελέτη περί αντιοξειδωτικής δράσης της λυγαριάς των *Sarikurkcu et al.*, (2009), πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με τους διαλύτες εξάνιο, διχλωρομεθάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και νερό με τη σειρά που αναφέρονται, ξεκινώντας με την παραλαβή των εντελώς άπολων συστατικών και καταλήγοντας στα εξαιρετικά πολικά. Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και στην έρευνα των *Hoberg et al.*, (1999), όπου πραγματοποιήθηκαν 2 εκχυλίσεις με εξάνιο ως άπολο διαλύτη και μεθανόλη ως περισσότερο πολικό. Στην παρούσα εργασία λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα σχετικών μελετών που έχουν διεξαχθεί, επιλέχθηκαν ως διαλύτες ο οξικός αιθυλεστέρας, η αιθανόλη και το νερό. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν οι εν λόγω διαλύτες είναι ότι διότι καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος πολικότητας ξεκινώντας από τα άπολα συστατικά που θα συλλέξει ο οξικός αιθυλεστέρας και καταλήγοντας στα εξαιρετικά πολικά που θα συμπαρασύρει το νερό. Επίσης πρόκειται για ήπιους διαλύτες που δεν θα αλλοίωναν το βιοδραστικό φυτό του προφίλ, ενώ εμφανίζουν πολλές ομοιότητες και με τους αντίστοιχους που έχουν χρησιμοποιηθεί ως τώρα στη βιβλιογραφία.

Η διεργασία της εκχύλισης μελετήθηκε τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Η ποιοτική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο HPLC-DAD όπου έγινε ταυτοποίηση των βιοδραστικών συστατικών κάθε εκχυλίσματος ενώ ελήφθησαν και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Η απόδοση της διεργασίας ποσοτικοποιήθηκε μέσω του στερεού υπολείμματος σε κάθε εκχύλιση ενώ η αντιοξειδωτική δράση μετρήθηκε με τη μέθοδο DPPH. Τέλος προσδιορίστηκε ποσοτικά και το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο *Folin – Ciocalteu*.

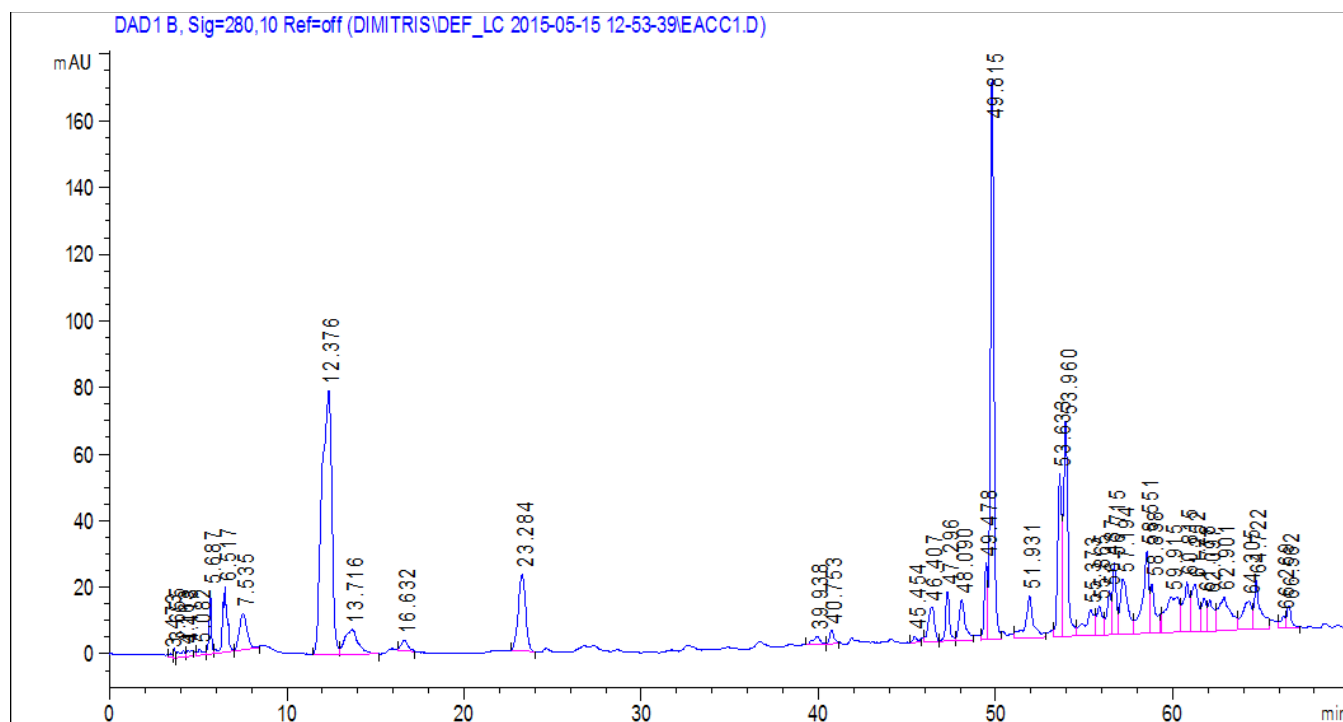
4.2.1 Καρπός

Ξεκινώντας από την ποιοτική ανάλυση, αρχικά παρατίθενται δύο χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα στα 280 nm και 360 nm αντίστοιχα για το εκάστοτε εκχύλιση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια ταυτοποίησης των βιοδραστικών συστατικών που εμπεριέχονται στα διάφορα εκχυλίσματα, λαμβάνοντας υπόψιν τα βιβλιογραφικά φασματοσκοπικά δεδομένα πρότυπων ενώσεων και συγκρίνοντας τους χρόνους έκλουσής τους με τους αντίστοιχους που σημειώθηκαν στις παρούσες αναλύσεις. Πραγματοποιήθηκαν

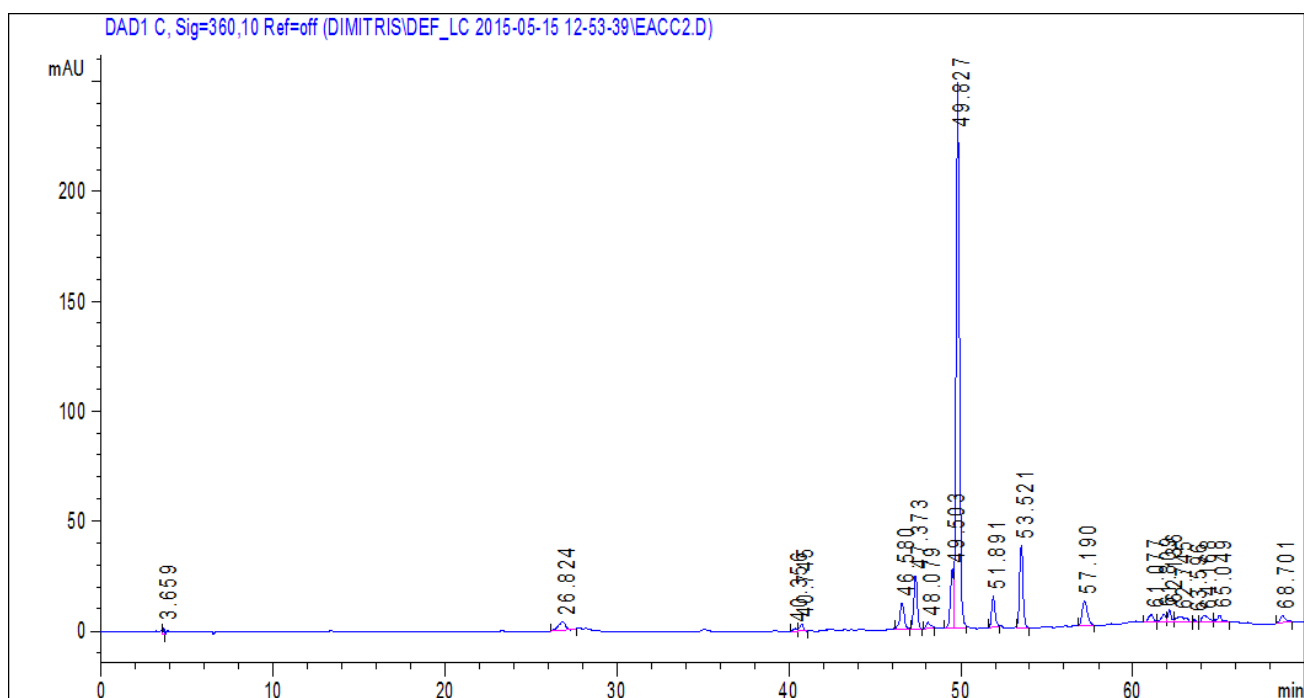
διπλές αναλύσεις για κάθε εκχύλιμα με στόχο μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα.

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν:

Για το εκχύλιμα του οξικού αιθυλεστέρα παραλήφθηκαν τα ακόλουθα χρωματογραφήματα.



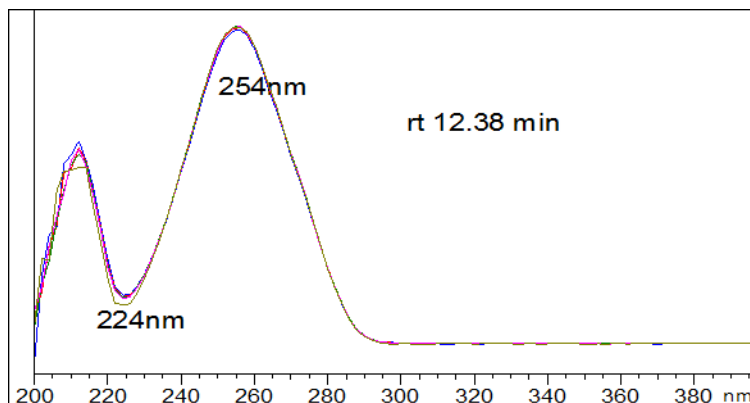
Εικ. 28. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος οξικού αιθέρα καρπών λυγαριάς στα 280 nm(HPLC-DAD)



Εικ. 29. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος οξικού αιθέρα καρπών λυγαριάς στα 360 nm(HPLC-DAD)

Όπως παρατηρείται, στο χρωματογράφημα των 280 nm εντοπίζονται δύο κύριες κορυφές με χρόνους έκλουσης 12,376 min και 49,815 min αντίστοιχα. Η δεύτερη μάλιστα αποτελεί και τη βασική κορυφή στο χρωματογράφημα των 360 nm. Όσον αφορά τις ουσίες με χρόνους 53,663 min και 53,960 min στα 280 nm, παρατηρείται συνέκλωσή τους, με αποτέλεσμα οι δύο κορυφές να αλληλοεπικαλύπτονται και να μην επιτρέπεται η ταυτοποίηση των ουσιών. Στο αντίστοιχο χρωματογράφημα των 360 nm, δεν εμφανίζεται κάποια κορυφή στους συγκεκριμένους χρόνους. Όσον αφορά τις κύριες κορυφές στα 12,376 min και 49,815 min, τα φάσματα τους παρατίθενται παρακάτω και εμφανίζουν υψηλή καθαρότητα που μας επιτρέπει την ταυτοποίηση των αντίστοιχων ουσιών.

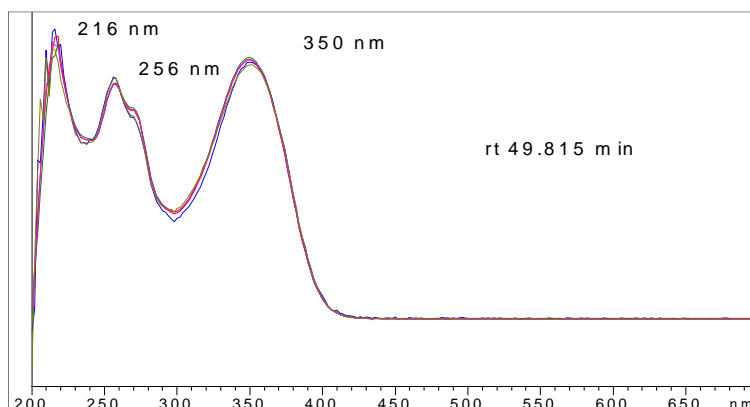
- **p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (PHBA)- χρόνος έκλουσης: 12,376 min**



Εικ. 30. Φάσμα PHBA εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα καρπών *Vitex Agnus Castus* (HPLC-DAD)

Σύμφωνα με σχετική μελέτη των *Shah et al.*, (2013), η συγκεκριμένη ουσία ταυτοποιείται ως p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (PHBA) και εντοπίζεται στα περισσότερα φυτά του είδους *Vitex*. Η συγκεκριμένη ουσία χρησιμοποιείται ευρέως στη χημική βιομηχανία ως βασικό συστατικό παρασκευής υγρών κρυστάλλων. Ειδικότερα στη βιομηχανία καλλυντικών και φαρμάκων, χρησιμοποιείται για την παραγωγή συντηρητικών γνωστών ως parabens (*Yu et al.*, 2016).

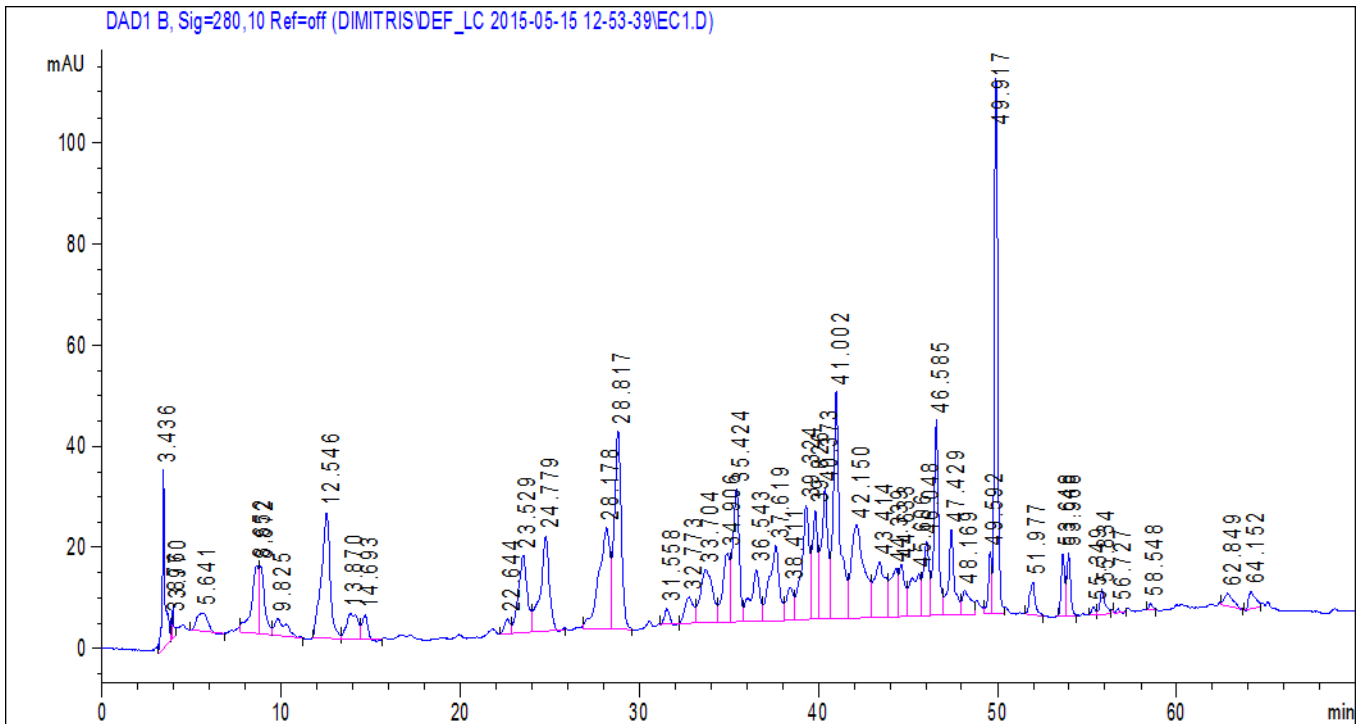
- **Κασισίνη- χρόνος έκλουσης: 49,815 min**



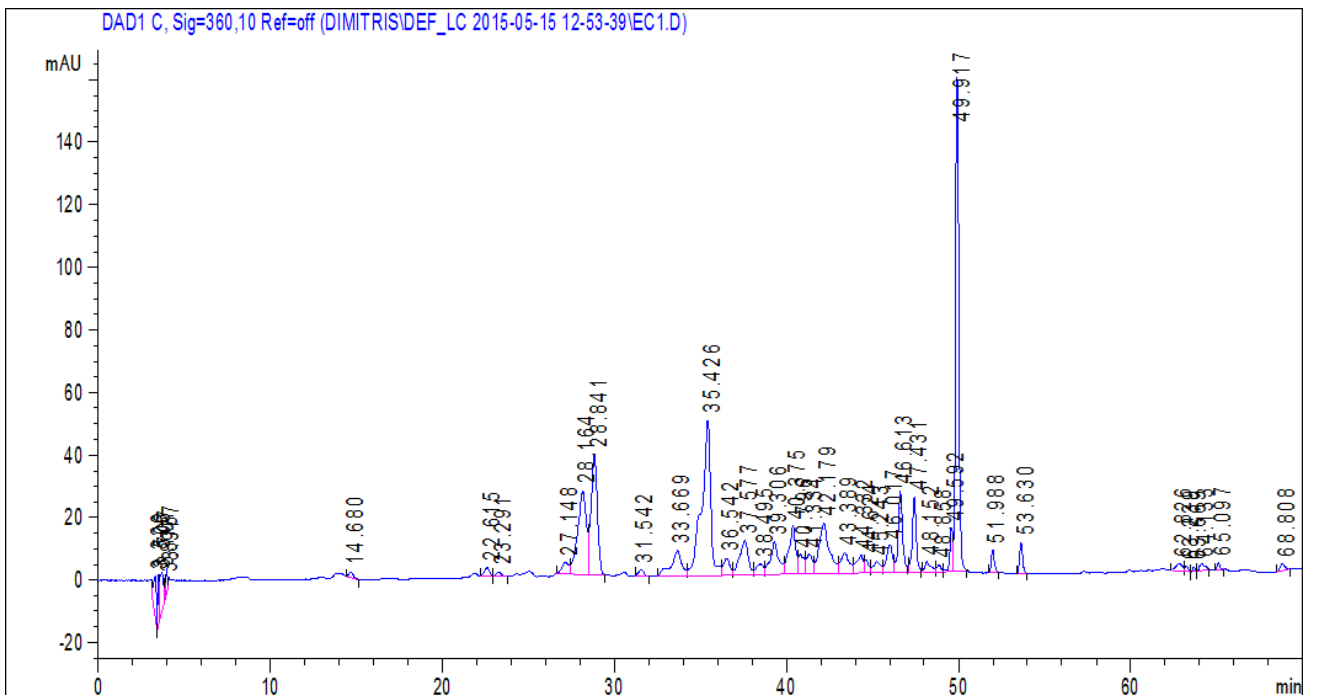
Εικ. 31. Φάσμα κασισίνης εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα καρπών *Vitex Agnus Castus* (HPLC-DAD)

Με βάση φασματοσκοπικά βιβλιογραφικά δεδομένα (*Webster, 2008*), το παραπάνω συστατικό ταυτοποιείται ως η αντικαρκινική ουσία κασισίνη. Η παρουσία κασισίνης στο αιθανολικό εκχύλισμα καρπών λυγαριάς επιβεβαιώνεται και από τους *Mari et al.*, (2012).

Συνεχίζοντας με το αιθανολικό εκχύλισμα:



Εικ. 32. Χρωματογράφημα αιθανολικού εκχυλίσματος καρπών λυγαριάς στα 280 nm(HPLC-DAD)

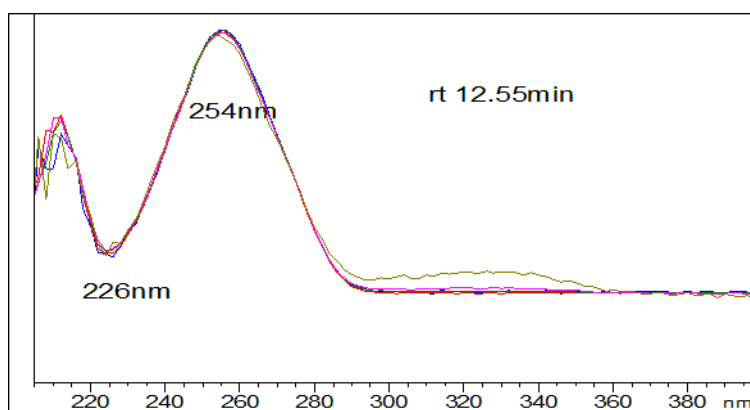


Εικ. 33. Χρωματογράφημα αιθανολικού εκχυλίσματος καρπών λυγαριάς στα 360 nm(HPLC-DAD)

Τα χρωματογραφήματα του αιθανολικού εκχυλίσματος εμφανίζονται πιο πλούσια συγκριτικά με αυτά του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα. Παρατηρούνται περισσότερες κύριες κορυφές, ωστόσο εμφανίζονται σε αρκετές περιπτώσεις και συνεκλούσεις ουσιών. Οι ουσίες που ταυτοποιήθηκαν εμφανίζουν χρόνους έκλουσης 12,546 min, 24,779 min και 49,917 min αντίστοιχα, και τα φάσματά τους παρατίθενται παρακάτω. Οι υπόλοιπες κύριες κορυφές, όπως για παράδειγμα αυτές με χρόνους έκλουσης 28,817 min, 35,426 min και 41,002 min, δεν εμφάνισαν καθαρά φάσματα που να επιτρέπουν τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την ταυτοποίησή τους.

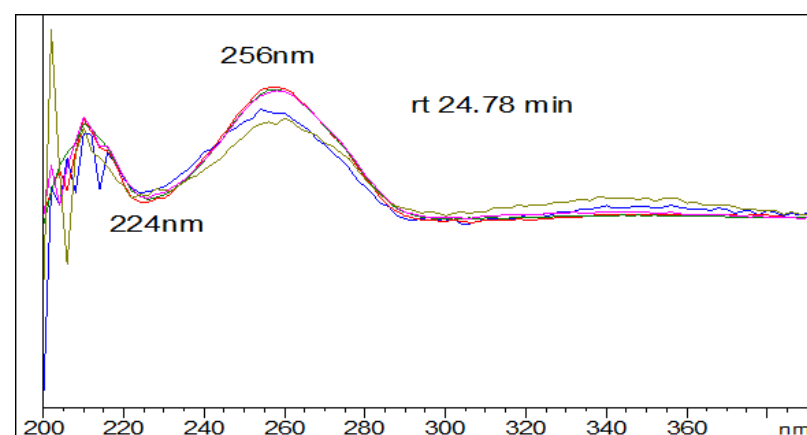
Όσον αφορά τα φάσματα των ουσιών που ταυτοποιήθηκαν:

- **p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (PHBA)- χρόνος έκλουσης: 12,546 min**



Εικ. 34. Φάσμα PHBA αιθανολικού εκχυλίσματος καρπών Vitex Agnus Castus (HPLC-DAD)

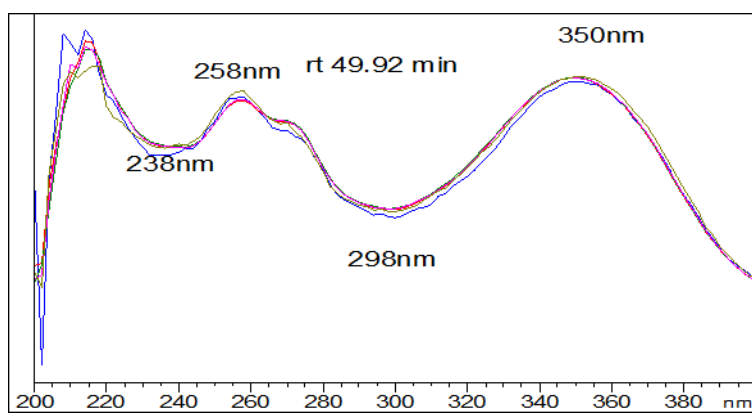
- **Αγνουσίδη- χρόνος έκλουσης: 24,779 min**



Εικ. 35. Φάσμα αγνουσίδης αιθανολικού εκχυλίσματος καρπών Vitex Agnus Castus (HPLC-DAD)

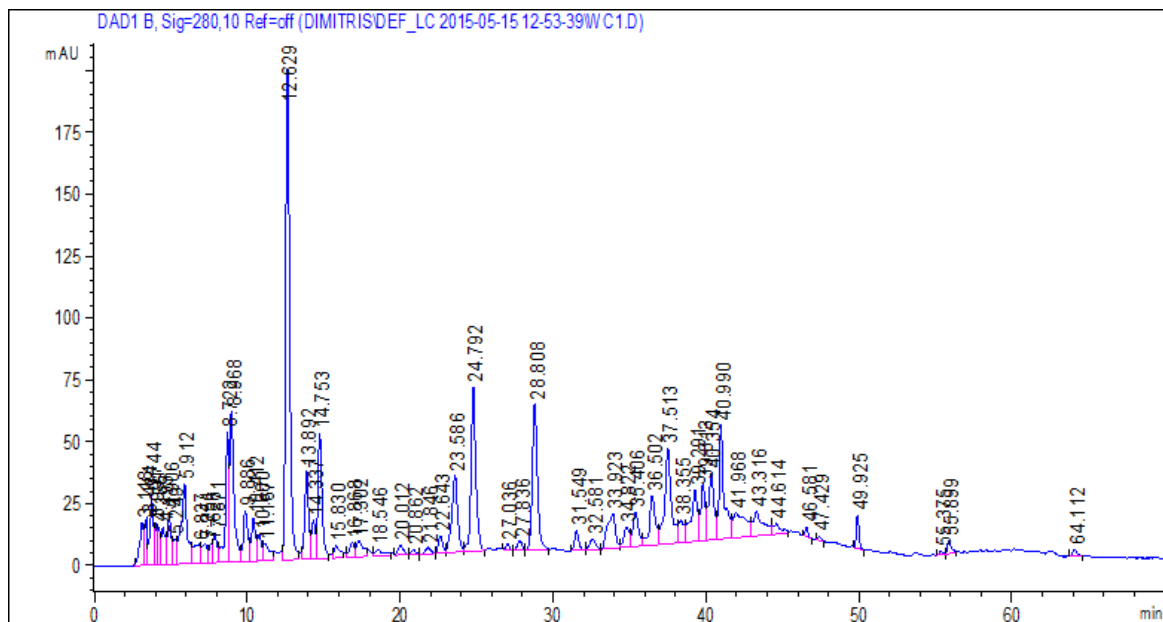
Με βάση τους *Shah et al.*, (2013), η παραπάνω ουσία ταυτοποιείται ως αγνουσίδη. Η συγκεκριμένη ουσία ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων και πιο συγκεκριμένα των ιριδοειδών και η δράση της, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ορμονορυθμιστική. Η ύπαρξη της αιθανολικό εκχύλιμα *Vitex Agnus Castus*, επιβεβαιώνεται και από σχετικές μελέτες των *Mari et al.*, (2012) και των *Hajirahimkhan et al.*, (2014) αντίστοιχα.

- **Καστιίνη- χρόνος έκλυσης: 49,917 min**

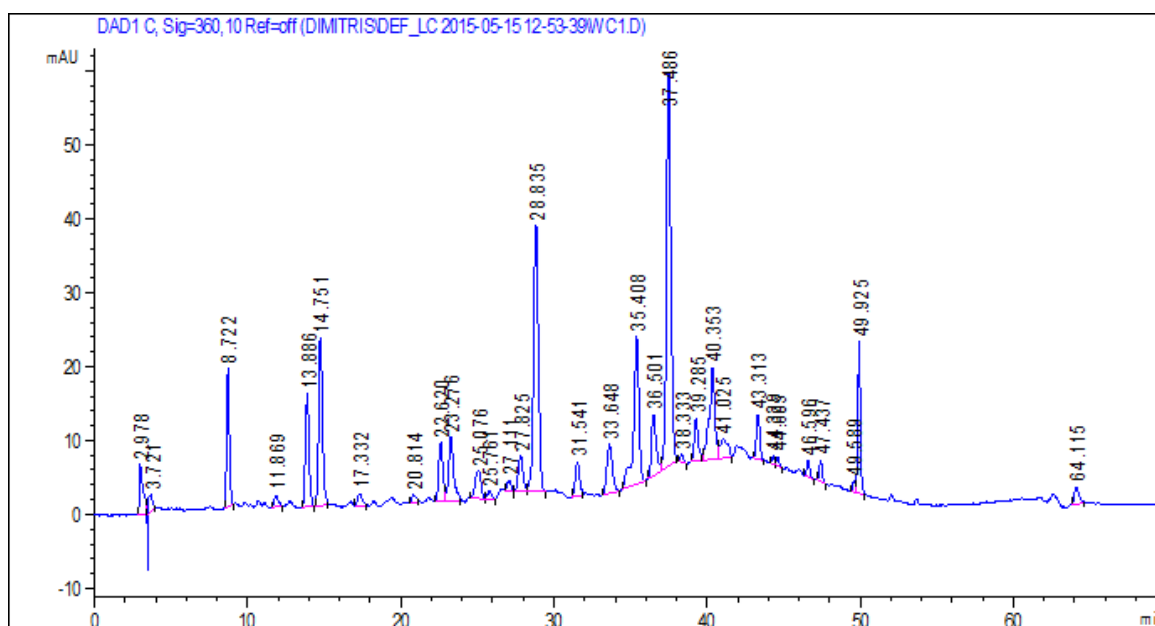


Εικ. 36. Φάσμα καστιίνης αιθανολικού εκχυλίσματος καρπών *Vitex Agnus Castus* (HPLC-DAD)

Τέλος για το υδατικό εκχύλιμα των καρπών:



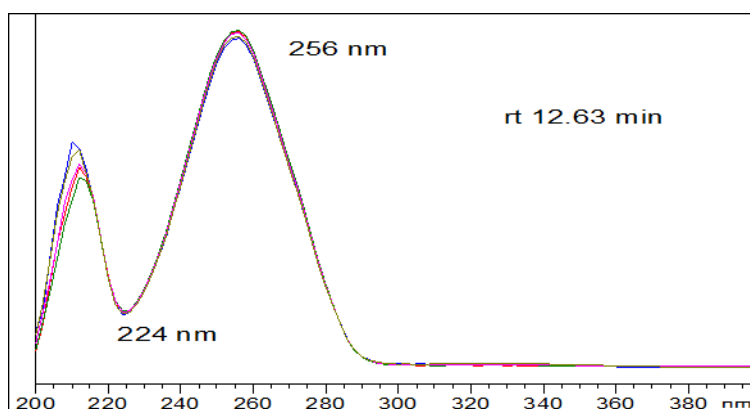
Εικ. 37. Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καρπών λυγαριάς στα 280 nm (HPLC-DAD)



Εικ. 38. Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καρπών λυγαριάς στα 360 nm(HPLC-DAD)

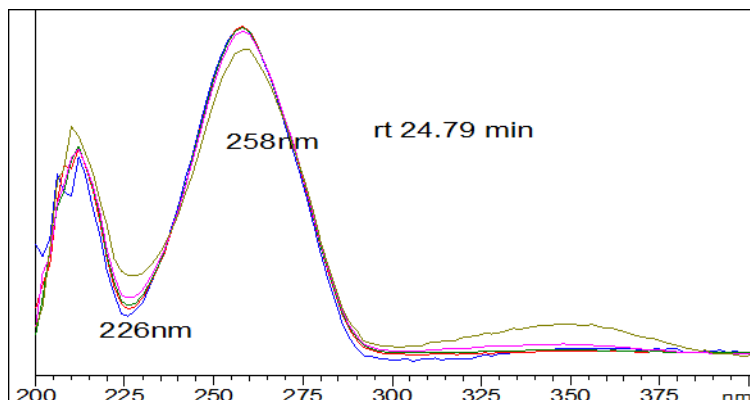
Στο χρωματογράφημα των 280 nm του υδατικού εκχυλίσματος, οι κύριες κορυφές εντοπίζονται σε χρόνους έκλουσης 12,629 min, 23,586 min, 24,792 min και 28,808 min. Αντίστοιχα στο χρωματογράφημα των 360 nm, οι βασικές κορυφές παρατηρούνται στους χρόνους έκλουσης 8,722 min, 13,886 min, 14,751 min, 28,835 min, 35,408 min, 37,486 min και 49,925 min. Από αυτές, τα φάσματα με τη μεγαλύτερη καθαρότητα που παρέχουν τη δυνατότητα ταυτοποίησης είναι τα ακόλουθα:

- **p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (PHBA)- χρόνος έκλουσης: 12,629 min**



Εικ. 39. Φάσμα PHBA υδατικού εκχυλίσματος καρπών Vitex Agnus Castus (HPLC-DAD)

- μεθυλ-ρ-υδροξυβενζοϊκός εστέρας (methyl paraben)-χρόνος έκλουσης: 24,792 min



Εικ. 40. Φάσμα methyl paraben υδατικού εκχυλίσματος καρπών Vitex Agnus Castus (HPLC-DAD)

Η ουσία μεθυλ-ρ-υδροξυβενζοϊκός εστέρας (methyl paraben) χρησιμοποιείται ιδιαίτερα ως συντηρητικό σε πολλά καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα, αλλά και σε αρκετά τρόφιμα. Έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί ισχυρό αντιμικροβιακό παράγοντα (Malamed, 2003), ενώ η μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση σε καλλυντικά προϊόντα ανέρχεται σε 1% (Elder, 1984).

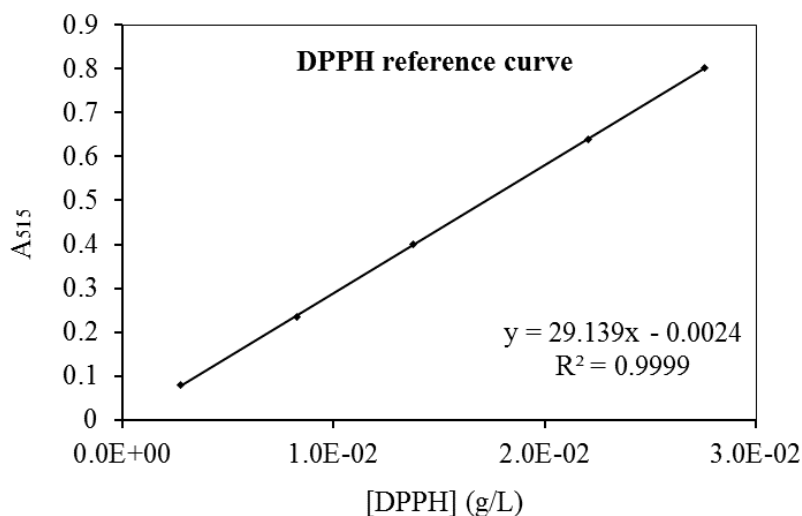
Προχωρώντας στην ποσοτική ανάλυση, υπολογίστηκε η % απόδοση της εκχύλισης σε ξηρή βάση φυτού. Σε προζυγισμένα φυαλίδια ζύγισης μεταφέρθηκαν με σιφώνιο πληρώσεως 5 mL εκχυλίσματος. Ακολουθούσε εξάτμιση του διαλύτη με άζωτο και τοποθέτηση των φυαλιδίων σε φούρνο στους 100° C για μία ημέρα. Στη συνέχεια τα φυαλίδια, μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα για μισή ώρα και ζυγίστηκαν. Πραγματοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις για κάθε εκχύλιμα για μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα. Με βάση τις μέσες τιμές που προέκυψαν, υπολογίστηκε η περιεκτικότητα κάθε εκχυλίσματος σε στερεά συστατικά (g/L), καθώς και η % κατά βάρος απόδοση του φυτού στις συγκεκριμένες εκχυλίσσιμες ενώσεις. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 8. Ποσοστιαία απόδοση (%) σε ξηρή βάση εκχυλισμάτων καρπού λυγαριάς

Εκχύλισμα	Στερεό υπόλειμμα (g)	Όγκος εκχυλίσματος (mL)	Στερεό υπόλειμμα (g/L)	% απόδοση σε ξηρή βάση φυτού
Οξικός αιθυλεστέρας	0,0429	2590	8,57	11,9
Αιθανόλη	0,0172	500	3,43	4,8
Νερό	0,0928	500	18,55	11,52

Σύμφωνα με τα παραπάνω, αποδοτικότερη είναι η εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (11,9 % απόδοση σε ξηρή βάση φυτού) ενώ παραπλήσια απόδοση εμφανίζει και η αντίστοιχη εκχύλιση με νερό (11,52 %). Το αιθανολικό εκχύλισμα εμφανίζει το μικρότερο στερεό υπόλειμμα, υποδεικνύοντας πως η εκχύλιση με αιθανόλη είναι η λιγότερο αποδοτική (4,8 % απόδοση σε ξηρή βάση φυτού). Παρατηρώντας τις αποδόσεις του Πίνακα 8 αθροιστικά, υπολογίζεται ότι πραγματοποιήθηκε ανάκτηση συστατικών σε ποσοστό 28,22% της αρχικής μάζας του φυτού. Λαμβάνοντας υπόψη και τα συστατικά που ανακτήθηκαν από το αιθέριο έλαιο, το συνολικό ποσοστό ανάκτησης λαμβάνει ακόμα μεγαλύτερη τιμή.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, κατασκευάστηκε η καμπύλη εναπομείναντος DPPH για καθένα από τα τρία εκχυλίσματα, σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς που παρατίθεται παρακάτω.



Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς DPPH

Το % ποσοστό DPPH που απομένει υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\% \text{ εναπομείνον DPPH} = 100 * (1 - A_{ref} - A_s * A_{100\%}) \quad (\text{Εξίσωση 3})$$

Όπου,

A_{ref} : η απορρόφηση (515 nm) του τυφλού διαλύματος DPPH μετά από 5 h,

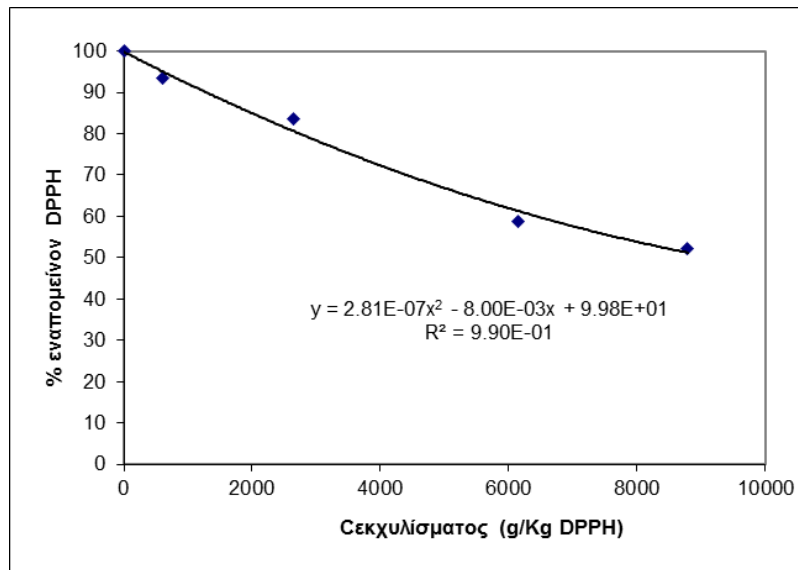
A_s : η απορρόφηση του DPPH μετά την αντίδραση με το εκάστοτε εκχύλισμα (μετά από 5 h) και

$A_{100\%}$: η θεωρητική απορρόφηση του διαλύματος DPPH 60.2 μM σε μεθανόλη, όπως καθορίζεται από την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς.

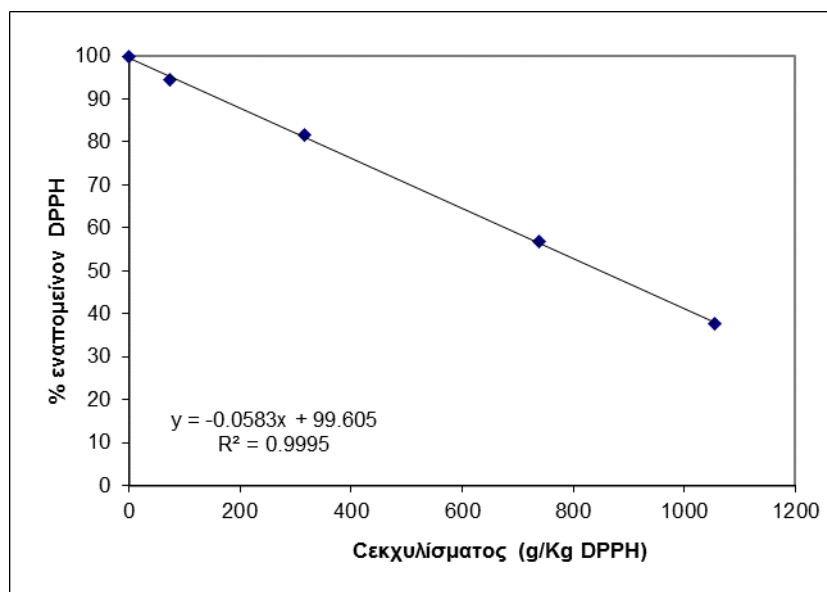
Κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος εκφράστηκε ως g στερεού υπολείμματος/kg DPPH και παραστάθηκε γραφικά έναντι του αντίστοιχου ποσοστού του αδέσμευτου DPPH. Η ικανότητα δέσμευσης ριζών από τα εκχυλίσματα ποσοτικοποιήθηκε μέσω της παραμέτρου EC_{50} . Πρόκειται για μια παράμετρο που ονομάζεται «αποτελεσματική συγκέντρωση» και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που απαιτείται για να προκληθεί 50%

απώλεια της δραστικότητας του DPPH (χρώμα). Όσο μικρότερη τιμή έχει το EC_{50} τόσο υψηλότερη είναι η μετρούμενη αντιοξειδωτική δράση.

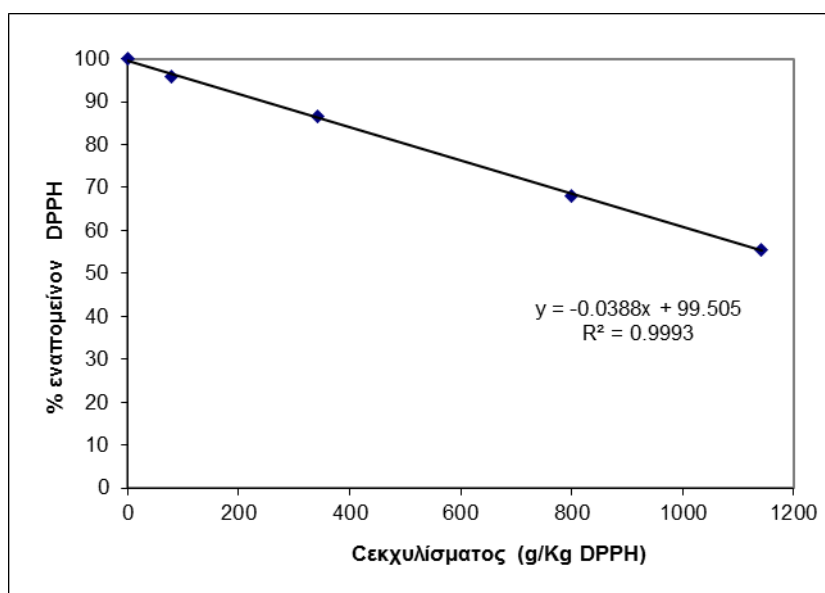
Ακολουθούν οι καμπύλες DPPH για τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα, αιθανόλης και νερού αντίστοιχα, καθώς και ένας συγκεντρωτικός πίνακας με τις τιμές της παραμέτρου EC_{50} για καθένα από αυτά.



Διάγραμμα 2. Καμπύλη εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των καρπών λυγαριάς.



Διάγραμμα 3. Καμπύλη εναπομείναντος DPPH για το αιθανολικό εκχύλισμα των καρπών λυγαριάς.



Διάγραμμα 4. Καμπύλη αναπομείνου DPPH για το υδατικό εκχύλισμα των καρπών λυγαριάς

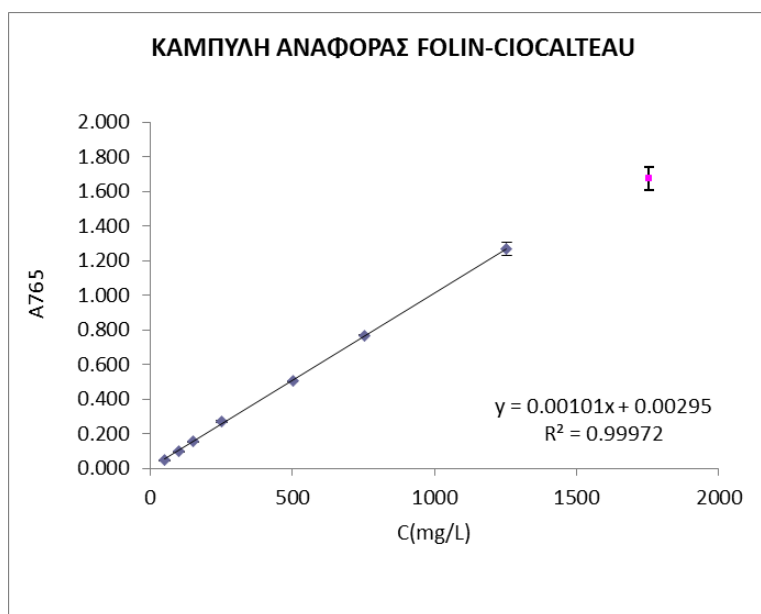
Πίνακας 9. EC₅₀ εκχυλισμάτων καρπού λυγαριάς

Εκχύλισμα	EC ₅₀ (g εκχυλίσματος/kg DPPH)
Οξικός αιθυλεστέρας	9194
Αιθανόλη	851
Νερό	1276

Όπως γίνεται αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα, το αιθανολικό εκχύλισμα έχει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση διότι εμφανίζει τη μικρότερη τιμή EC₅₀ (851 g εκχυλίσματος/kg DPPH). Παραπλήσια δραστηριότητα εμφανίζει και το υδατικό εκχύλισμα με τιμή EC₅₀ ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτή του αιθανολικού (1276 g εκχυλίσματος/kg DPPH). Όσον αφορά το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα, παρόλο που η αντίστοιχη εκχύλιση είχε τη μεγαλύτερη απόδοση, είναι το λιγότερο δραστικό με τιμή EC₅₀ εμφανώς μεγαλύτερη από τις άλλες δύο (9194 g εκχυλίσματος/kg DPPH). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν εν μέρη με αυτά που προέκυψαν από τη μελέτη των *Sarikurcu et al.*, (2009), όσον αφορά την

αντιοξειδωτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος που είναι εμφανώς μεγαλύτερη σε σχέση με το αντίστοιχο του οξικού αιθυλεστέρα. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι αντί για μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε εκεί, στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση αιθανόλης, το εκχύλισμα της οποίας εμφάνισε μάλιστα μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με το υδατικό εκχύλισμα.

Όσον αφορά το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου *Folin – Ciocalteu* σύμφωνα με την παρακάτω καμπύλη αναφοράς.



Διάγραμμα 5. Καμπύλη αναφοράς *Folin – Ciocalteu*

Στον ακόλουθο πίνακα φαίνεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο για τα τρία εκχυλίσματα του καρπού, εκφρασμένο ως συγκέντρωση επί ξηρής βάσης φυτού.

Πίνακας 10. Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων καρπού λυγαριάς

Εκχύλισμα	Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο επί ξηρής βάσης φυτού (ppm)
Οξικός αιθυλεστέρας	4112
Αιθανόλη	7032
Νερό	11163

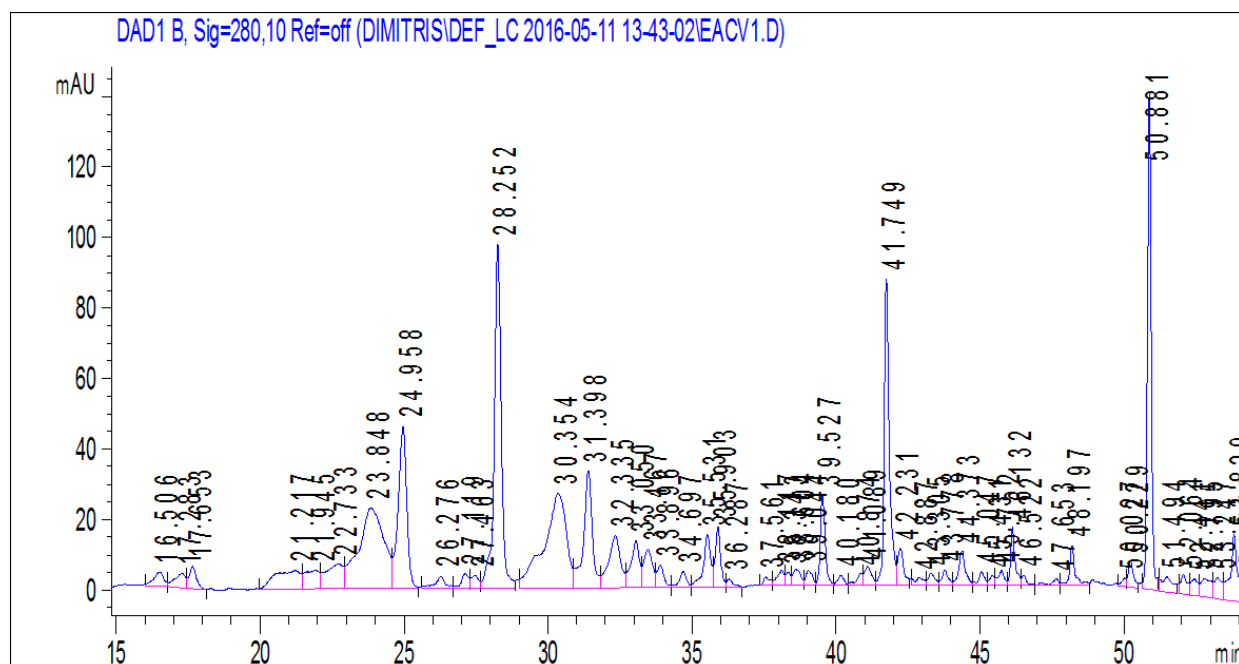
Όπως φαίνεται, το υδατικό εκχύλισμα εμφανίζει το μεγαλύτερο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (11163 ppm), ενώ ακολουθεί το αιθανολικό (7032 ppm) και τέλος το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα (4112 ppm). Στο σημείο αυτό αξίζει να επισημανθεί πως ενώ το υδατικό εκχύλισμα περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα φαινολών συγκριτικά με το αιθανολικό, το δεύτερο περιέχει πιο ισχυρά αντιοξειδωτικές φαινόλες.

4.2.2 Φύλλα/Ανθη

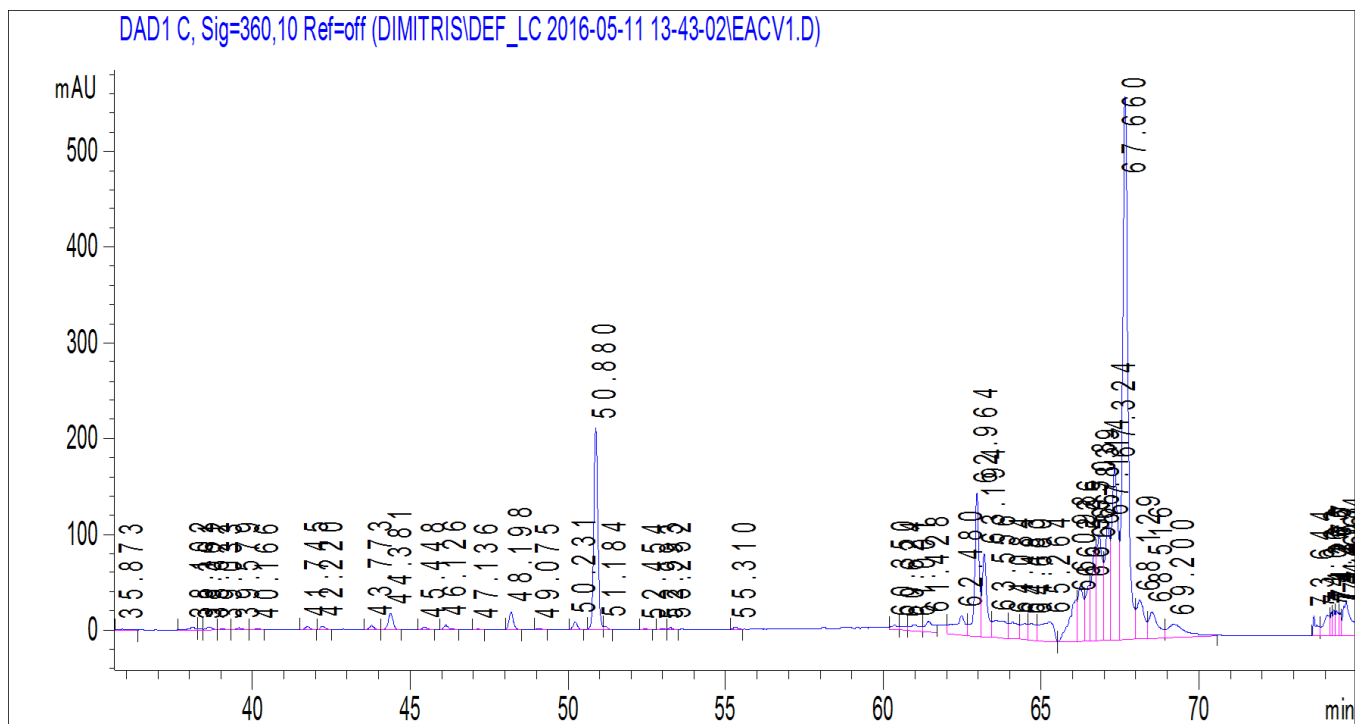
Στην περίπτωση των φύλλων/ανθών η διεργασία της εκχύλισης μελετήθηκε επίσης τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, ενώ ακολουθήθηκαν οι ίδιες μέθοδοι και διαδικασίες όπως στους καρπούς. Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω.

- Ποιοτική ανάλυση

Εκχύλισμα Οξικού αιθυλεστέρα:



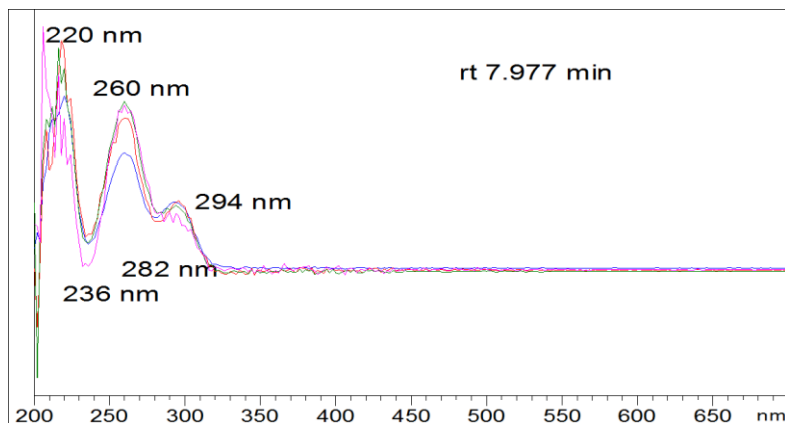
Εικ. 41. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος οξικού αιθέρα φύλλων/ανθών λυγαριάς στα 280 nm (HPLC-DAD)



Εικ. 42. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος οξικού αιθέρα φύλλων/ανθών λυγαριάς στα 360 nm (HPLC-DAD)

Όπως παρατηρείται παραπάνω, στο χρωματογράφημα των 280 nm εντοπίζονται τέσσερις κύριες κορυφές σε χρόνους έκλουσης 24,958 min, 28,252 min, 41,749 min και 50,881 min. Η τελευταία κορυφή εμφανίζεται και στο χρωματογράφημα των 360 nm μαζί με μία ακόμα κύρια στα 67,660 min. Όσον αφορά τις ουσίες που ταυτοποιήθηκαν, τα φάσμα τους παρατίθενται παρακάτω:

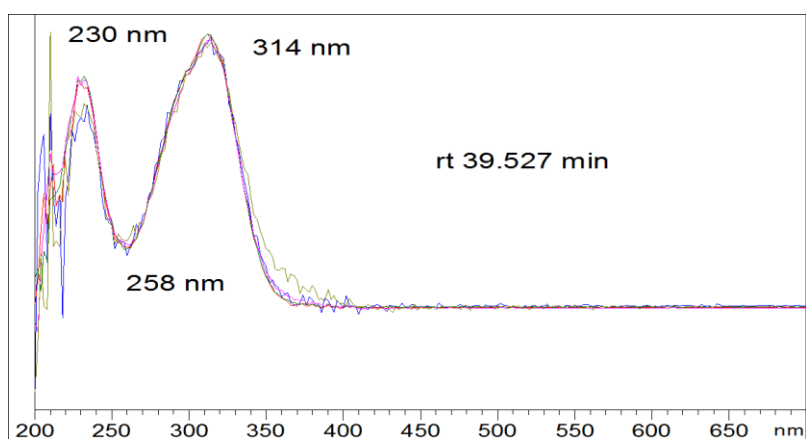
- **Πρωτοκατεχουϊκό οξύ - χρόνος έκλουσης: 7,977 min**



Εικ. 43. Φάσμα πρωτοκατεχουϊκό οξύ εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα φύλλων/ανθών Vitex Agnus Castus (HPLC-DAD)

Σύμφωνα με τον Szumilo (2005), η συγκεκριμένη ουσία που ταυτοποιήθηκε αποτελεί ένα φυσικό φαινολικό συστατικό που απαντάται σε πολλά «φαρμακευτικά» φυτά και μπορεί να αποτελέσει προστατευτικό παράγοντα έναντι καρδιακών παθήσεων και νεοπλασιών. Η δράση του εν λόγω συστατικού είναι κυρίως αντιοξειδωτική, καθώς συμμετέχει τόσο στην παρεμπόδιση δημιουργίας ελεύθερων ριζών, όσο και στη δέσμευση και την καταστροφή αυτών.

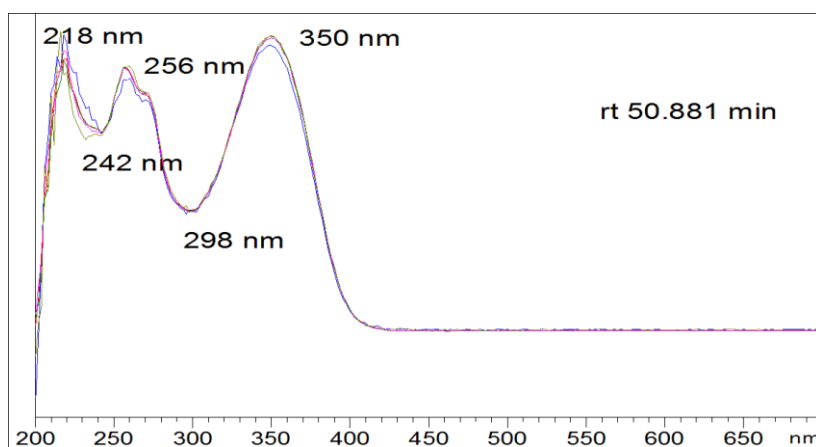
- **Βενζοϊκό οξύ- χρόνος έκλουσης: 39,527 min**



Εικ. 44. Φάσμα βενζοϊκού οξέος εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα φύλλων/ανθών Vitex Agnus Castus (HPLC-DAD)

Το βενζοϊκό οξύ και τα παράγωγα του αποτελούν σημαντικά δομικά στοιχεία πολλών φυσικών προϊόντων και ως εκ τούτου έχουν πολύπλευρο ρόλο στο μεταβολισμό των φυτών. Χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά και ενισχυτικά γεύσης σε τρόφιμα, ενώ έχει αποδειχθεί πως έχουν και αναλγητικές, αντισηπτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Qualley *et al.*, 2012).

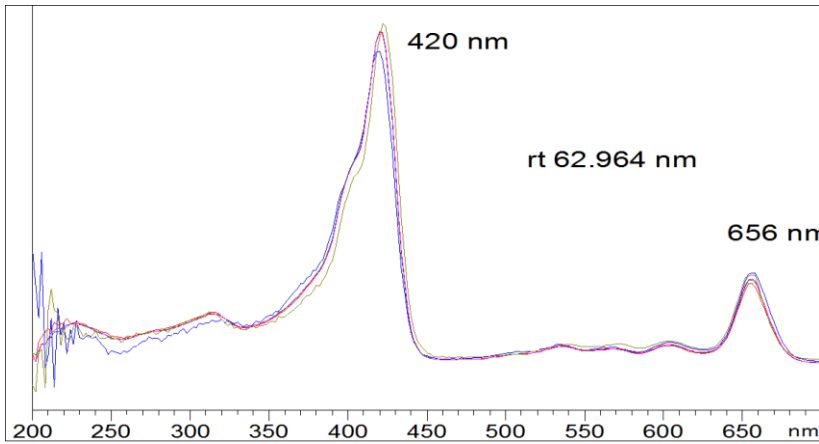
- **Οριεντίνη-χρόνος έκλουσης: 50,881 min**



Εικ. 45. Φάσμα οριεντίνης εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα φύλλων/ανθών *Vitex Agnus Castus* (HPLC-DAD)

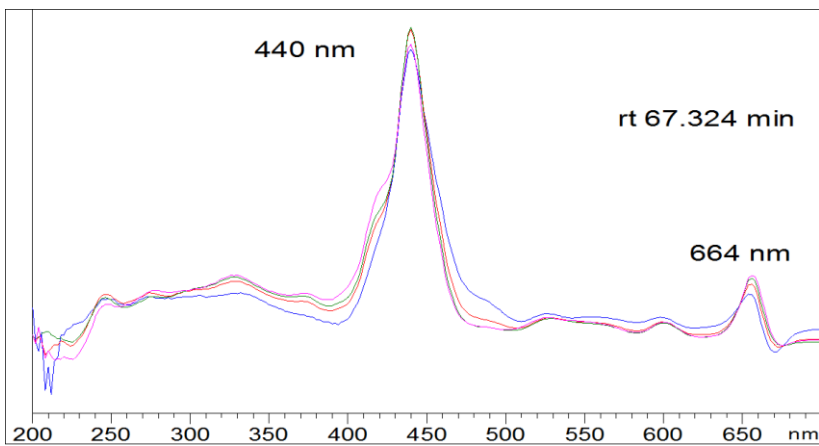
Η οριεντίνη ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και ως τώρα έχει απομονωθεί από πλήθος φυτών. Σύμφωνα με μελέτη των *Lam et al.*, (2016), εμφανίζει αντιοξειδωτική, αντιγηραντική και αντιφλεγμονώδη δράση. Επιπρόσθετα, λειτουργεί προστατευτικά έναντι τόσο καρδιακών και νευρολογικών παθήσεων, όσο και της ραδιενεργής ακτινοβολίας, με πολλά υποσχόμενα θεραπευτικά αποτελέσματα στην ιατρική.

- **Χλωροφύλλη- χρόνος έκλουσης: 62,964 min**



Εικ. 46. Φάσμα χλωροφύλλης εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα φύλλων/ανθών Vitex Agnus Castus (HPLC-DAD)

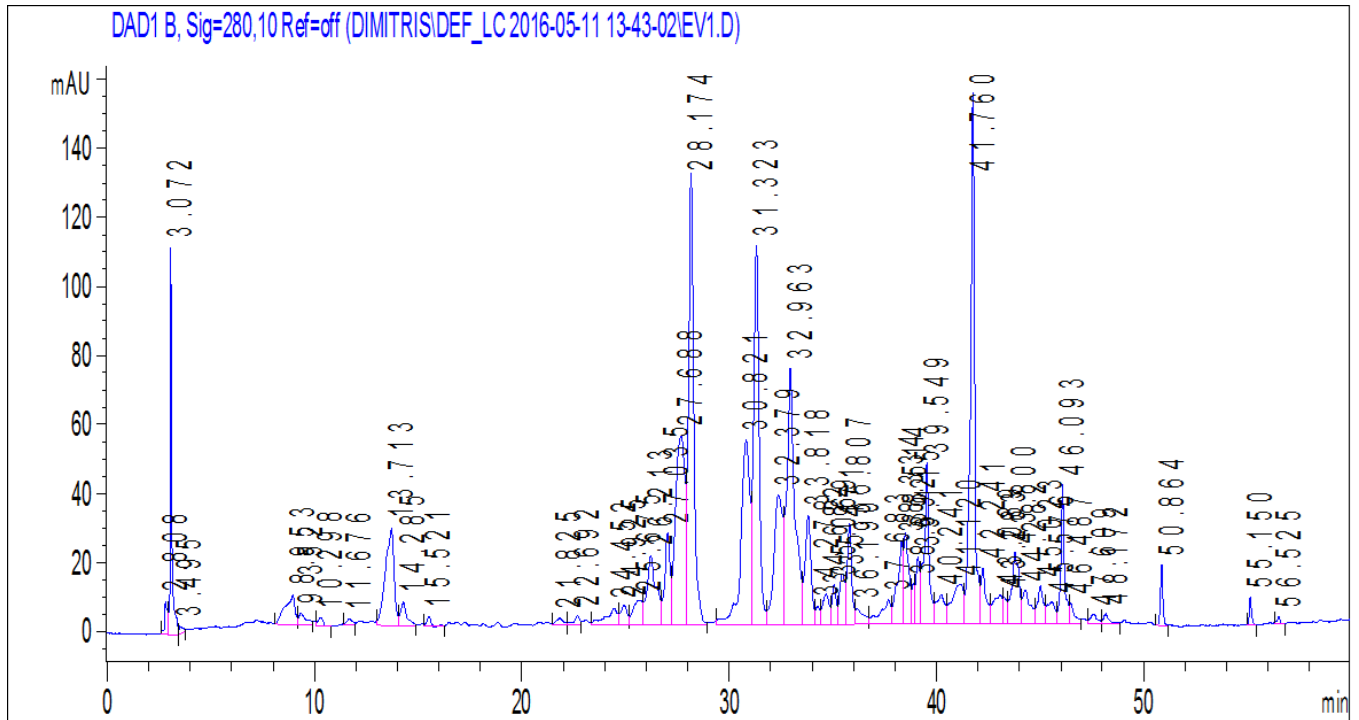
- **Χλωροφύλλη- χρόνος έκλουσης: 67,324 min**



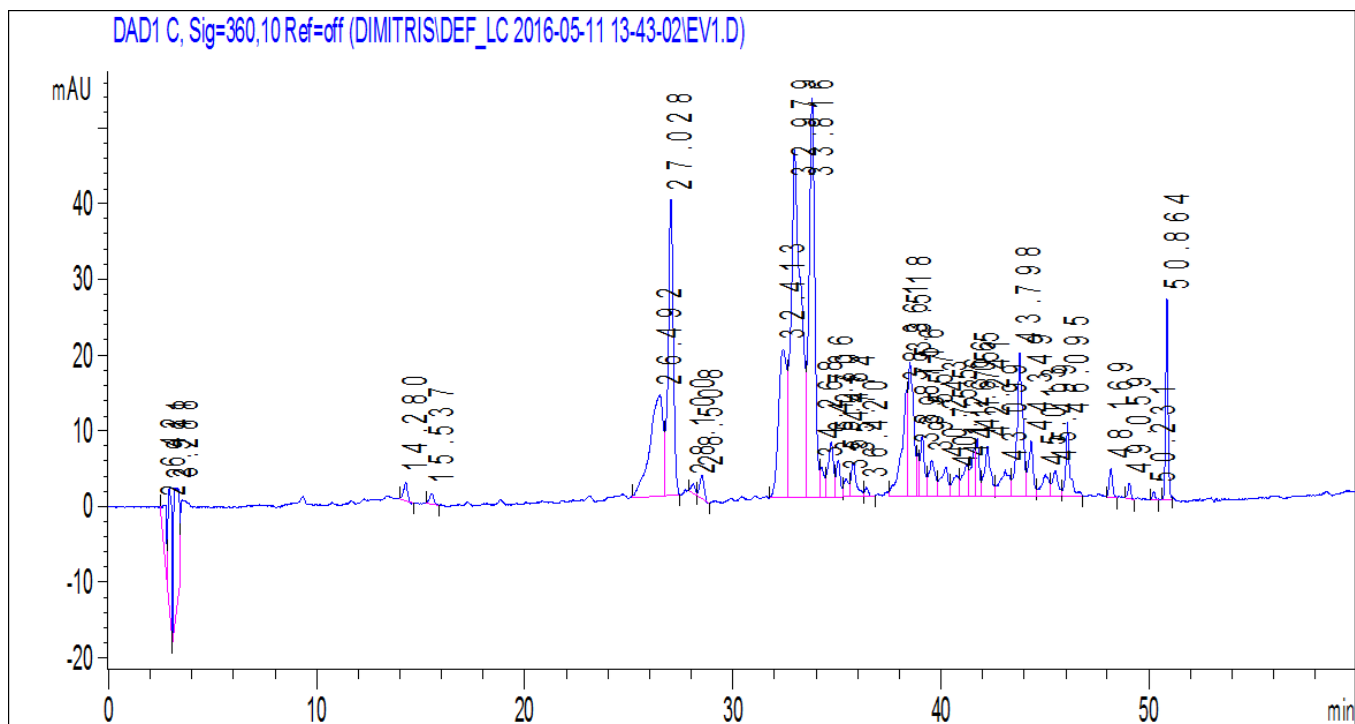
Εικ. 47. Φάσμα χλωροφύλλης εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα φύλλων/ανθών Vitex Agnus Castus (HPLC-DAD)

Οι χλωροφύλλες αποτελούν άπολες χρωστικές ενώσεις που απαντώνται σε όλα τα φυτά, προσδίδουν το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα στα φύλλα και είναι υπεύθυνες για τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

Αιθανολικό εκχύλισμα:



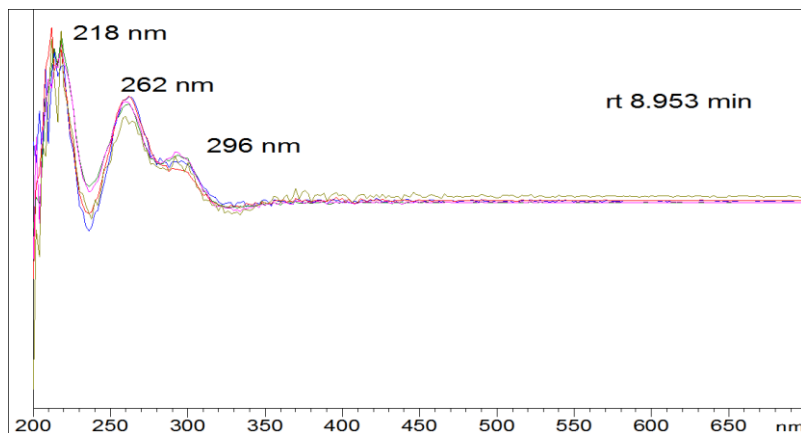
Εικ. 48. Χρωματογράφημα αιθανολικού εκχυλίσματος οξικού φύλλων/ανθών λυγαριάς στα 280 nm(HPLC-DAD)



Εικ. 49. Χρωματογράφημα αιθανολικού εκχυλίσματος οξικού φύλλων/ανθών λυγαριάς στα 360 nm(HPLC-DAD)

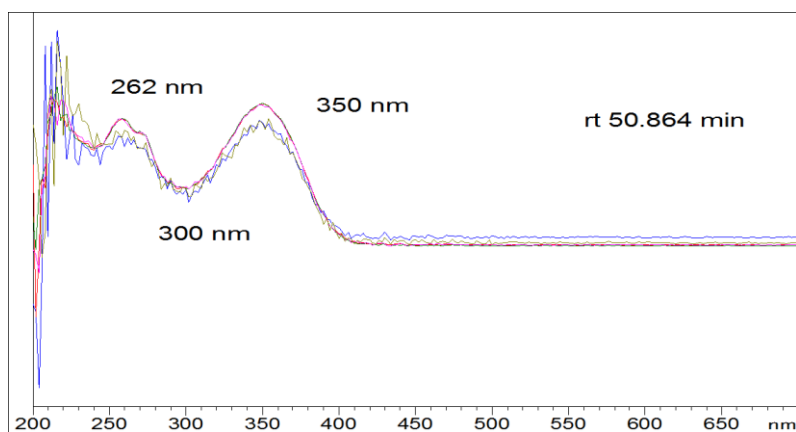
Όπως παρατηρείται και από τα δύο χρωματογραφήματα, το αιθανολικό εκχύλισμα είναι πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά. Πιο συγκεκριμένα στα 280 nm εντοπίζονται πέντε κύριες κορυφές σε χρόνους έκλουσης 3,072 min, 28,174 min, 31,323 min, 32,963 min και 50,881 min. Αντίστοιχα στα 360 nm εντοπίζονται τέσσερις κύριες κορυφές σε χρόνους έκλουσης 27,028 min, 32,979 min, 33,816 min και 50,864 min. Αναφορικά με τις ουσίες που ταυτοποιήθηκαν, τα φάσματα τους παρατίθενται παρακάτω:

- **Πρωτοκατεχουϊκό οξύ -χρόνος έκλουσης: 8,953 min**



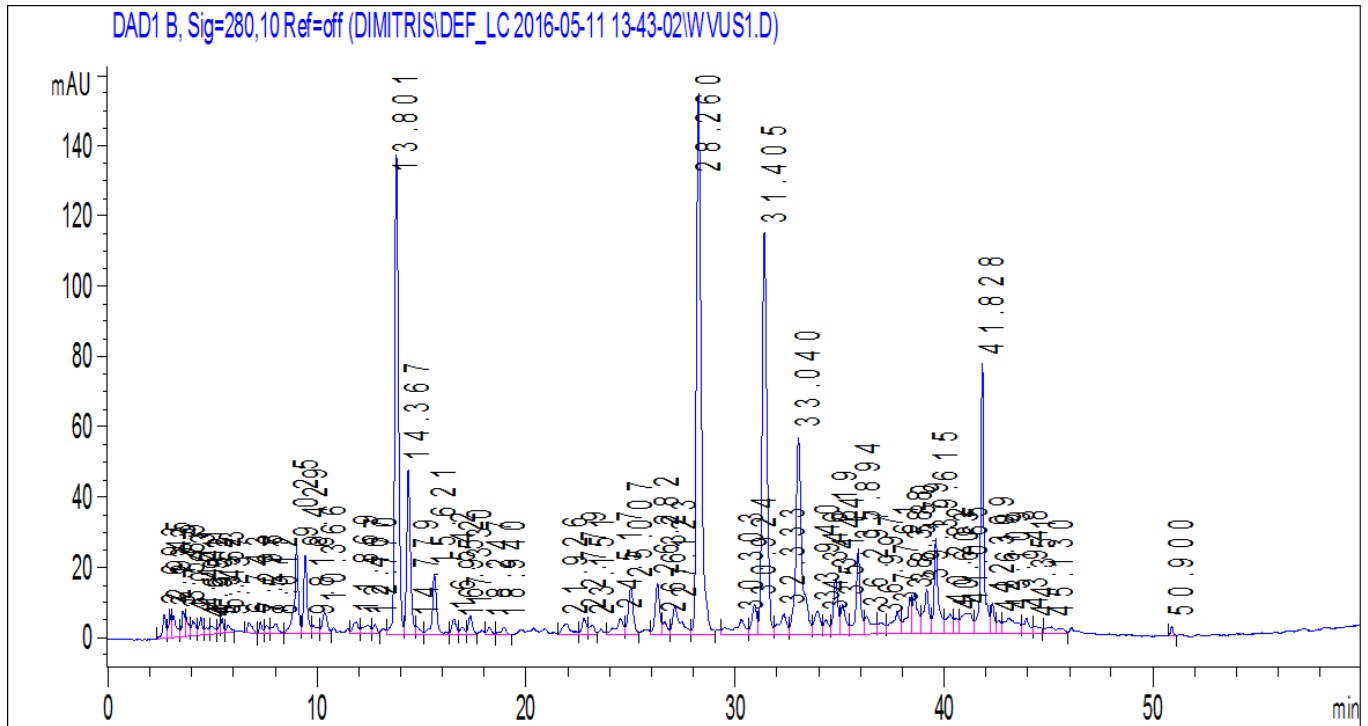
Εικ. 50. Φάσμα πρωτοκατεχουϊκό οξύ αιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων/ανθών *Vitex Agnus Castus* (HPLC-DAD)

- **Οριεντίνη-χρόνος έκλουσης: 50,864 min**

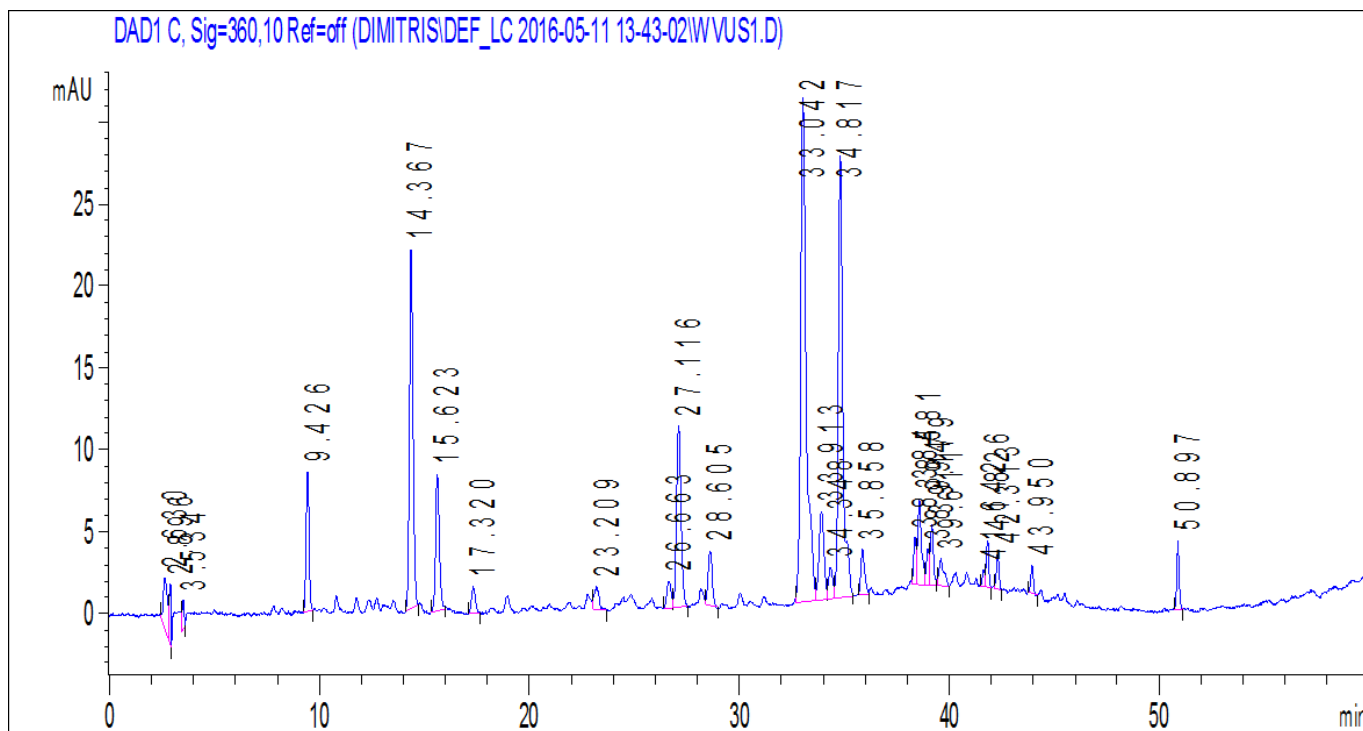


Εικ. 51. Φάσμα οριεντίνης αιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων/ανθών *Vitex Agnus Castus* (HPLC-DAD)

Υδατικό εκχύλισμα:



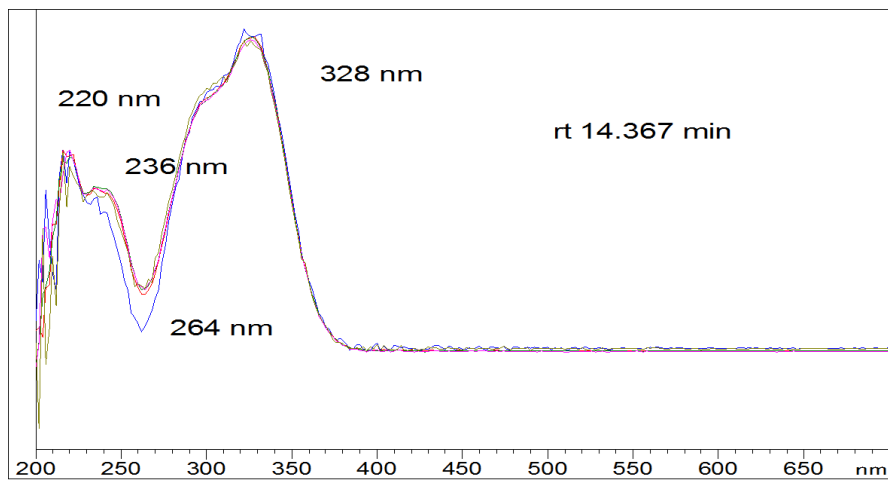
Εικ. 52. Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος οξικού φύλλων/ανθών λυγαριάς στα 280 nm(HPLC-DAD)



Εικ. 53. Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος οξικού φύλλων/ανθών λυγαριάς στα 360 nm(HPLC-DAD)

Όσον αφορά τα χρωματογραφήματα του υδατικού εκχυλίσματος, στα 280 nm εντοπίζονται έξι κύριες κορυφές σε χρόνους έκλουσης 13,801 min, 14,367 min, 28,260 min, 31,405 min, 33,040 min και 41,828 min. Αντίστοιχα στα 360 nm παρατηρούνται πέντε ακόμα κύριες κορυφές σε χρόνους έκλουσης 9,426 min, 15,623 min, 21,116 min, 34,817 min και 50,864 min. Στο εν λόγω εκχύλισμα, η μοναδική ουσία που ταυτοποιήθηκε είναι το καφεϊκό οξύ. Το φάσμα της παρατίθεται παρακάτω:

- Καφεϊκό οξύ- χρόνος έκλουσης: 14,367 min



Εικ. 54. Φάσμα καφεϊκού οξέος υδατικού εκχυλίσματος φύλλων/ανθών *Vitex Agnus Castus* (HPLC-DAD)

Το καφεϊκό οξύ ανήκει στην κατηγορία των πολυφαινολών και εμφανίζεται ευρέως στους φυτικούς ιστούς, αλλά και στον καφέ, τα μήλα και τα μούρα. Σύμφωνα με τις μελέτες των *Huang et al.*, (1992) και του *Greenwald*, (2004), έχει αποδειχτεί πως εμφανίζει αντικαρκινική δράση, ενώ με βάση τους *Sanchez-Moreno et al.*, (2000) παρουσιάζει επίσης αντιοξειδωτική και αντιβακτηριδιακή δράση και συμβάλει στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης και άλλων καρδιακών νόσων.

Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί πως έγινε παραλαβή και άλλων φασμάτων με υψηλή καθαρότητα. Ωστόσο οι βιβλιογραφικές αναφορές ήταν περιορισμένες και δεν επέτρεπαν την ταυτοποίηση των αντίστοιχων ουσιών με ασφάλεια. Στα πλαίσια μεταγενέστερης έρευνας που θα μπορούσε να ακολουθήσει μετά τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, προτείνεται η χρήση κάποιας αναλυτικής μεθόδου όπως η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων που αφορούν την ταυτοποίηση των συγκεκριμένων ουσιών. Όλα τα φάσματα ουσιών που παραλήφθηκαν και από τα τρία εκχυλίσματα των καρπών και των φύλλων/ανθών, παρατίθενται στο Παράρτημα.

- Ποσοτική ανάλυση

Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα στερεά υπολείμματα και η % κατά βάρος απόδοση του φυτού σε εκχυλίσιμες ενώσεις.

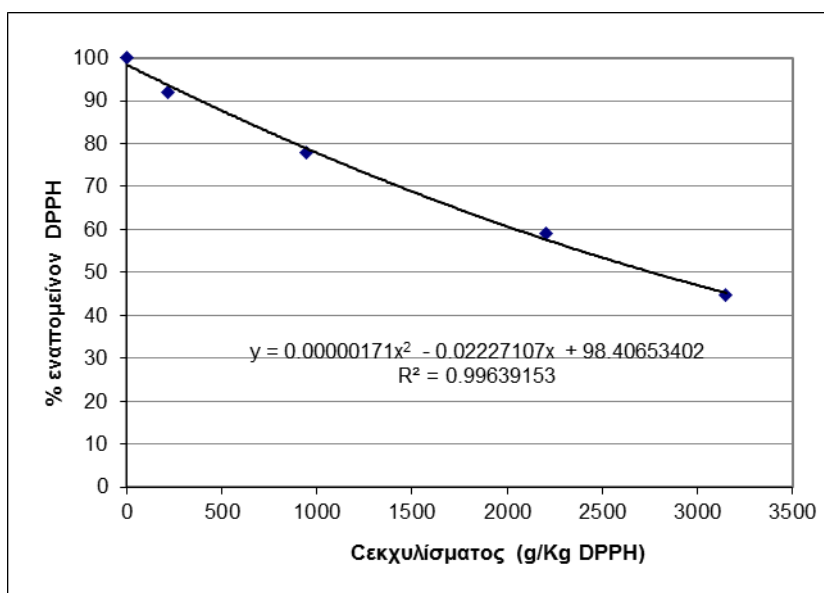
Πίνακας 11. Ποσοστιαία (%) απόδοση σε ξηρή βάση εκχυλισμάτων φύλλων/ανθών λυγαριάς

Εκχύλισμα	Στερεό υπόλειμμα (g)	Όγκος εκχυλίματος (mL)	Στερεό υπόλειμμα (g/L)	% απόδοση σε ξηρή βάση φυτού
Οξικός αιθυλεστέρας	0,0307	500	6,14	9,4
Αιθανόλη	0,0259	1000	5,17	15,7
Νερό	0,1827	1760	36,54	7,2
Υδατικό Soxhlet	0,3628	100	72,55	48,1

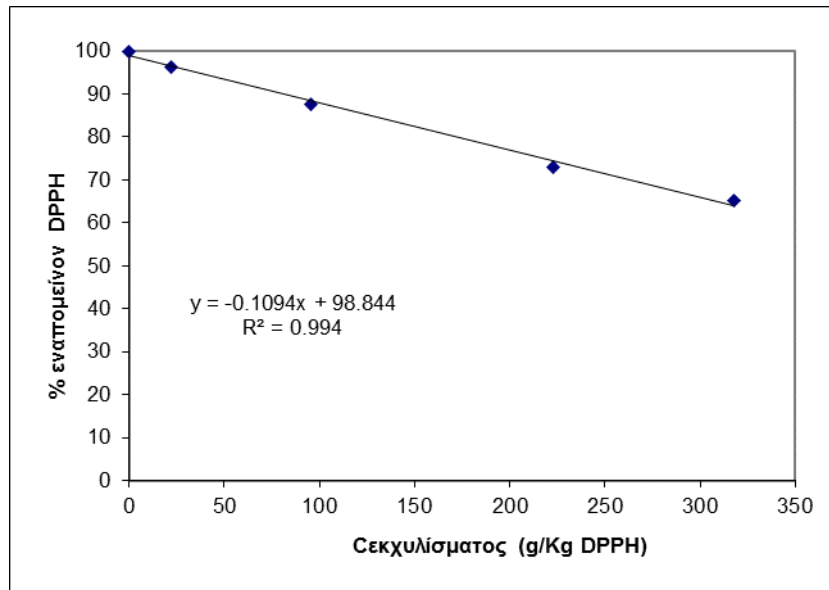
Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η εκφυλιστική εκχύλιση Soxhlet με νερό εμφανίζει τη μεγαλύτερη % απόδοση. Κάτι τέτοιο προφανώς είναι αναμενόμενο, διότι το συγκεκριμένο εκχύλισμα δεν περιέχει μόνο υδατοδιαλυτά συστατικά, αλλά και άλλα που κατάφερε ο διαλύτης να συμπαρασύρει λόγω υψηλής θερμοκρασίας εκχύλισης. Με τη συγκεκριμένη εκχύλιση επιτεύχθηκε ανάκτηση του 48,1% της αρχικής φυτικής μάζας, ωστόσο τα συστατικά που παραλήφθηκαν δεν εμφανίζουν την ίδια πολικότητα και η αντιοξειδωτική δράση ενός σημαντικού ποσοστού αυτών έχει υποβαθμιστεί. Ανάμεσα στις υπόλοιπες τρεις, η εκχύλιση με αιθανόλη αποτελεί την πιο αποδοτική (15,7% απόδοση σε ξηρή βάση φυτού). Ακολουθεί η εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (9,4%) και με μικρή διαφορά η αντίστοιχη με νερό (7,2%). Αντιθέτως, στην περίπτωση του καρπού μεγαλύτερη απόδοση εμφάνισε η εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, κατόπιν με νερό, ενώ λιγότερο αποδοτικός σαν διαλύτης εμφανίζεται η αιθανόλη. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως οι καρποί της λυγαριάς εμπεριέχουν περισσότερα άπολα βιοδραστικά συστατικά ενώ τα φύλλα/άνθη συστατικά μεσαίας

πολικότητας, αντίστοιχης αυτής που εμφανίζει η αιθανόλη. Το συνολικό ποσοστό βιοδραστικών συστατικών στα φύλλα/άνθη που ανακτήθηκαν μέσω της διεργασίας της εκχύλισης είναι το 47,85% της αρχικής μάζας του φυτού. Γίνεται πλέον σαφές πώς η εκχύλιση των φύλλων/ανθών ήταν πιο αποδοτική από την αντίστοιχη των καρπών.

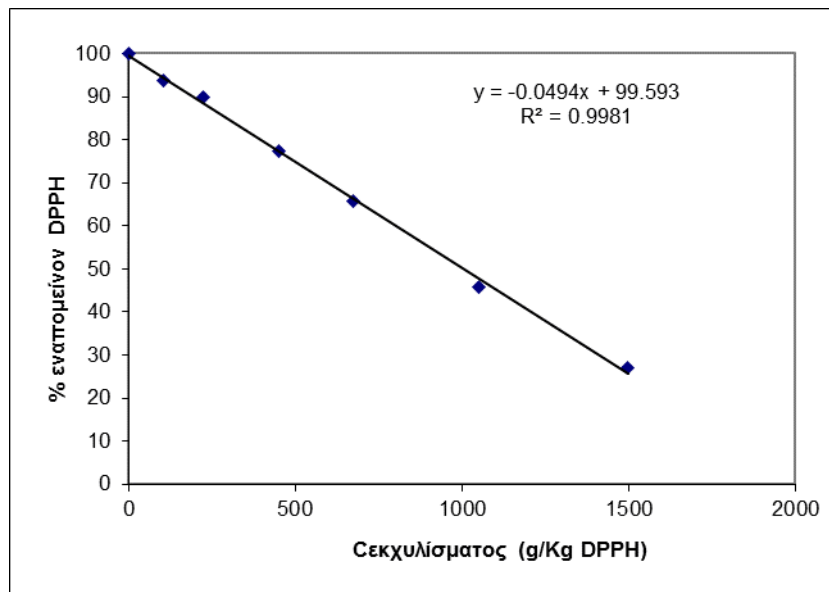
Προχωρώντας στη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, ακολουθούν οι τρεις καμπύλες DPPH και ένας συγκεντρωτικός πίνακας με τις τιμές της παραμέτρου EC₅₀. Ως καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ίδια που είχε χρησιμοποιηθεί και στα αντίστοιχα πειράματα του καρπού.



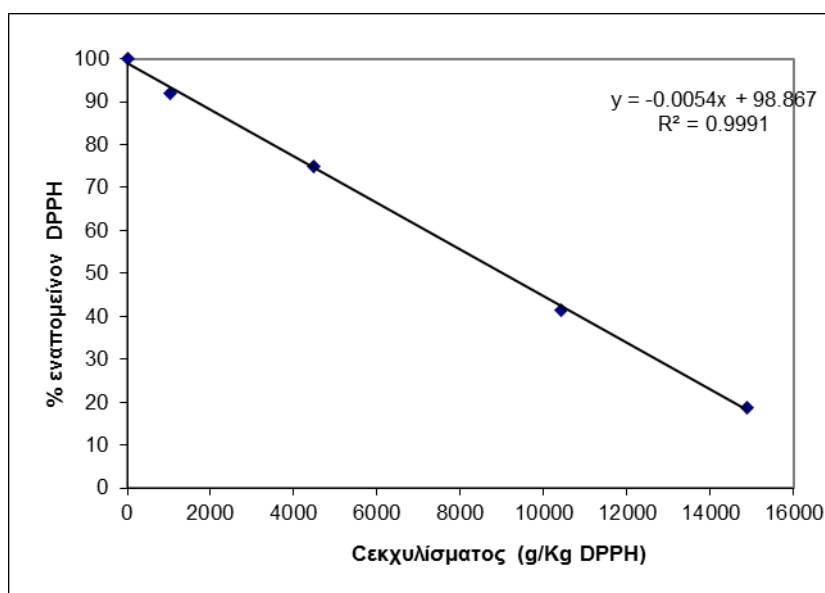
Διάγραμμα 6. Καμπύλη εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των φύλλων/ανθών λυγαριάς



Διάγραμμα 7. Καμπύλη εναπομείναντος DPPH για το αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών λυγαριάς



Διάγραμμα 8. Καμπύλη εναπομείναντος DPPH για το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών λυγαριάς



Διάγραμμα 9. Καμπύλη εναπομείναντος DPPH για το υδατικό εκχύλισμα *Soxhlet* των φύλλων/ανθών λυγαριάς

Πίνακας 12. EC₅₀ εκχυλισμάτων φύλλων/ανθών λυγαριάς

Εκχύλισμα	EC ₅₀ (g εκχυλίσματος /kg DPPH)
Οξικός αιθυλεστέρας	2211
Αιθανόλη	446
Νερό	1004
Υδατικό <i>Soxhlet</i>	9049

Το αντιοξειδωτικό προφίλ των εκχυλισμάτων των φύλλων λυγαριάς είναι παρόμοιο με αυτό των καρπών. Το αιθανολικό εκχύλισμα εμφανίζει τη μικρότερη τιμή EC₅₀ (446 g εκχυλίσματος /kg DPPH), υποδεικνύοντας πως είναι το πιο δραστικό. Ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα (EC₅₀= 1004 g εκχυλίσματος /kg DPPH), ενώ το λιγότερο δραστικό είναι αυτό του οξικού αιθυλεστέρα (EC₅₀= 2211 g εκχυλίσματος /kg DPPH). Στο σημείο αυτό οφείλει να τονιστεί πως και τα τρία εκχυλίσματα των φύλλων εμφανίζουν μικρότερες τιμές EC₅₀ συγκριτικά με τα αντίστοιχα των καρπών, γεγονός που αποδεικνύει πως τα φύλλα περιείχαν δραστικότερα αντιοξειδωτικά συστατικά. Επίσης, όσον αφορά το υδατικό εκχύλισμα *Soxhlet*, η τιμή της

παραμέτρου EC_{50} είναι εξαιρετικά μεγάλη με αποτέλεσμα η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος να είναι αμελητέα. Κάτι τέτοιο ήταν αναμενόμενο καθώς η εκχύλιση, όπως προαναφέρθηκε, ήταν εκφυλιστική και μπορεί να μην παραλήφθηκαν περισσότερα βιοδραστικά συστατικά, ωστόσο δεν εμφάνιζαν κάποια αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Τέλος αναφορικά με το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, χρησιμοποιήθηκε η ίδια καμπύλη αναφοράς με αυτή των καρπών για τη μέθοδο *Folin – Ciocalteu* και τα αποτελέσματα έπεται από τη φωτομέτρηση και την επεξεργασία είναι τα ακόλουθα:

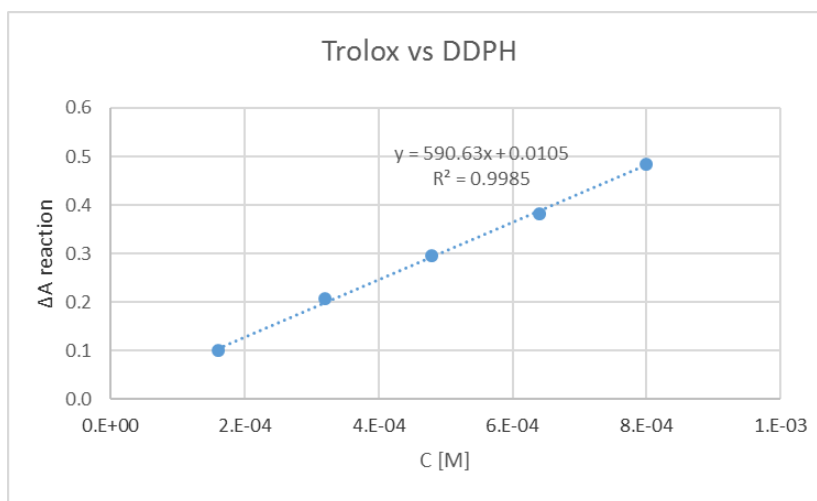
Πίνακας 13. Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων φύλλων/ανθών λυγαριάς

Εκχύλισμα	Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο επί ξηρής βάσης φυτού (ppm)
Οξικός αιθυλεστέρας	8863
Αιθανόλη	15614
Νερό	23631
Υδατικό <i>Soxhlet</i>	22179

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα εκχυλίσματα κατά σειρά μειούμενου συνολικού φαινολικού περιεχομένου είναι το υδατικό, το υδατικό *Soxhlet*, το αιθανολικό και το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα. Σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των καρπών, το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο και για τα τρία εκχυλίσματα είναι σημαντικά μεγαλύτερο στην περίπτωση των φύλλων/ανθών. Αν ληφθεί υπόψιν και το αντιοξειδωτικό προφίλ που αναλύθηκε παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα των φύλλων εμφανίζουν ποσοτικά περισσότερα αλλά και δραστικότερα αντιοξειδωτικά συστατικά, καθιστώντας τη διαδικασία ανάκτησης βιοδραστικών συστατικών από τα φύλλα πιο επιτυχημένη σε σχέση με την ανάκτηση τους από τους καρπούς. Μια εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί σχετικώς, είναι το γεγονός ότι ο καρπός ήταν αρκετά σκληρός και δεν ήταν εφικτή η πλήρης λειοτρίβηση του. Ενδεχομένως λοιπόν, αρκετά βιοδραστικά συστατικά να έμειναν «παγιδευμένα» στο εσωτερικό του καρπού με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ανακτηθούν με τις μεθόδους της απόσταξης και της εκχύλισης.

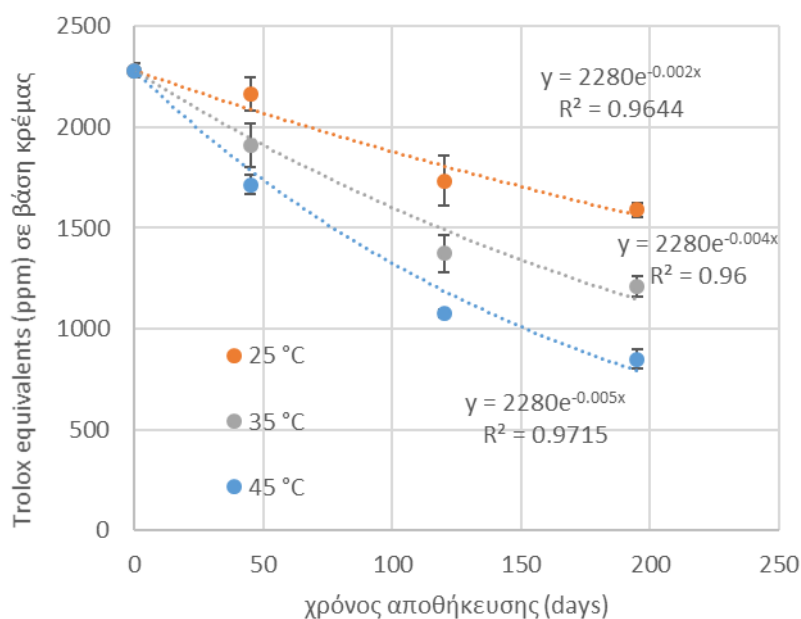
4.3 Ενσωμάτωση σε φορέα-γαλάκτωμα-Μελέτη υποβάθμισης αντιοξειδωτικής δράσης σε επιταχυνόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες αποθήκευσης

Το αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών κρίθηκε ως το πιο δραστικό όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση και ενσωματώθηκε στο φορέα-γαλάκτωμα «Wild Rose», KORRES NATURAL PRODUCTS. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στις θερμοκρασίες 25° C, 35° C και 45° C. Σε τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία έτσι ώστε να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική δράση και να αξιολογηθεί η επίδραση χρόνου και θερμοκρασίας αποθήκευσης της αντιοξειδωτικής δράσης των εμπλουτισμένων γαλακτωμάτων. Τα αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης εκφράστηκαν σε ισοδύναμα Trolox (ppm) σύμφωνα με την ακόλουθη καμπύλη αναφοράς.



Διάγραμμα 10. Καμπύλη αναφοράς Trolox - DPPH

Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα που απεικονίζει την επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στην αντιοξειδωτική δράση σε θερμοκρασίες αποθήκευσης από 25 έως 45°C.



Διάγραμμα 11. Επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στην αντιοξειδωτική δράση καλλυντικής κρέμας εμπλουτισμένη με εκχύλισμα βιοδραστικών συστατικών λυγαριάς σε θερμοκρασιακές συνθήκες των 25, 35 και 45°C.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η αντιοξειδωτική δράση υποβαθμίζεται με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης. Η υποβάθμιση της αντιοξειδωτικής δράσης με το χρόνο αποθήκευσης αποδίδεται σε αντιδράσεις οξείδωσης της λιπαρής φάσης του γαλακτώματος. Αναλυτικότερα, με την πάροδο του χρόνου τα λιπαρά οξέα που συνιστούν την ελαιώδη φάση του γαλακτώματος τείνουν να οξειδωθούν, με αποτέλεσμα οι αντιοξειδωτικές ουσίες να αναλαμβάνουν την προστασία από την οξείδωση και να υποβαθμίζονται οι ίδιες (McClements, 1999). Επιπλέον, από το Διάγραμμα 11 προκύπτει ότι οι αντιδράσεις υποβάθμισης της αντιοξειδωτικής δράσης λαμβάνουν χώρα με μεγαλύτερο ρυθμό σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες αποθήκευσης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο καθώς οι υψηλές θερμοκρασίες επιταχύνουν τις αντιδράσεις οξείδωσης με αποτέλεσμα τη μείωση των αντιοξειδωτικών που εμπεριέχονται στο εκάστοτε προϊόν (Pokorný, 1986).

Όπως απεικονίζεται στο Διάγραμμα 11 η μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης βρέθηκε να ακολουθεί κινητική 1^{ης} τάξης από όπου και προσδιορίστηκε ο ρυθμός μείωσης της

αντιοξειδωτικής δράσης (εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox). Οι τιμές του ρυθμού μείωσης της αντιοξειδωτικής δράσης στο θερμοκρασιακό εύρος αποθήκευσης των προϊόντων 25-45°C δίνονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 14. Τιμές του ρυθμού μείωσης της αντιοξειδωτικής δράσης στο θερμοκρασιακό εύρος αποθήκευσης των προϊόντων 25-45°C

Θερμοκρασία αποθήκευσης (°C)	Ρυθμός μείωσης αντιοξειδωτικής δράσης k (days ⁻¹)
25	0.00193 ± 0.00012
35	0.00353 ± 0.00018
45	0.00543 ± 0.00034

Η επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στο ρυθμό μείωσης της αντιοξειδωτικής δράσης στο θερμοκρασιακό εύρος αποθήκευσης των προϊόντων 25-45°C βρέθηκε ότι ακολουθεί το μαθηματικό μοντέλο Arrhenius:

$$k = k_{ref} \cdot \exp \left[\frac{E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (\text{Εξίσωση 4})$$

ή εναλλακτικά:

$$\ln k = \ln k_{ref} - \left(\frac{E_a}{R} \right) * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad (\text{Εξίσωση 5})$$

Όπου,

k: σταθερά της αντίδρασης

k₀: παράγων συχνότητας ή συντελεστής συγκρούσεων

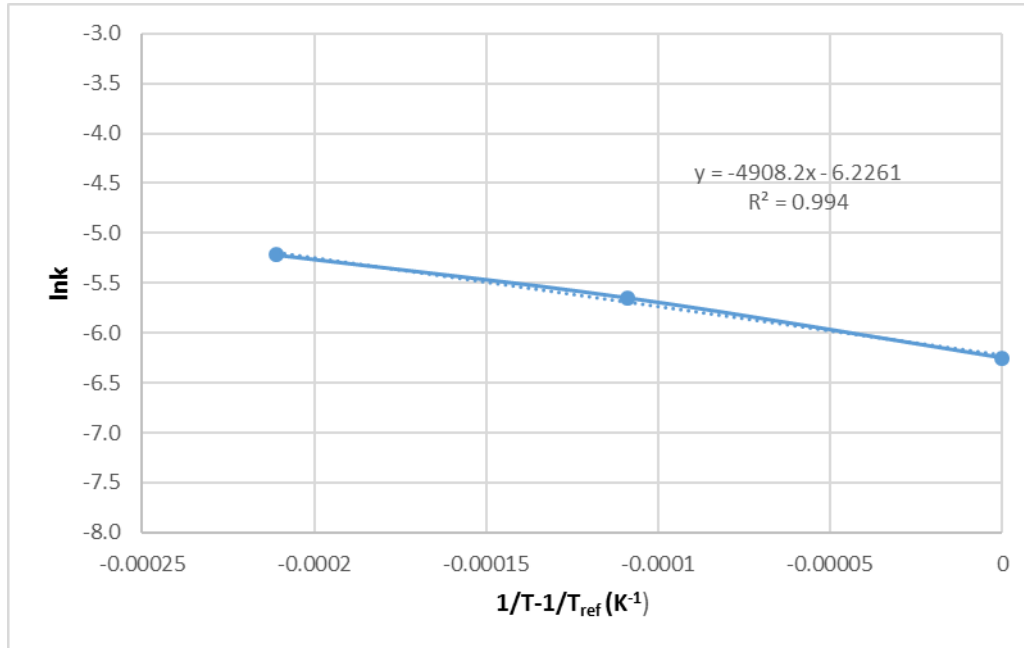
E_a: ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης (J/mol)

R: 8,314 J/mol·K (1,987 cal/mol·K)

T: απόλυτη θερμοκρασία, K (K=°C +273,15)

Από τη σχέση (5) προκύπτει ότι αν παρασταθούν διάφορες σταθερές αντιδράσεων (k) που αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες T, τότε θα προκύψει μία ευθεία με τεταγμένη

$\ln k$ και τετμημένη $1/T$. Από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων προκύπτει η ενέργεια ενεργοποίησης E_a . Λαμβάνοντας ως θερμοκρασία αναφοράς τους $25\text{ }^\circ\text{C}$ και ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία με k αυτά που προέκυψαν για κάθε θερμοκρασία ($25, 35, 45\text{ }^\circ\text{C}$) από το Διάγραμμα 11, προκύπτει η ακόλουθη γραφική παράσταση:



Διάγραμμα 12. Εύρεση κινητικών παραμέτρων *Arrhenius*

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, προέκυψαν οι κινητικές παράμετροι της εξίσωσης *Arrhenius* δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 15. Κινητικές παράμετροι *Arrhenius*

E_a (kJ/mol)	40,8
k_{ref} (days ⁻¹)	0,002
T_{ref} (°C)	25

Η διάρκεια ζωής αποτελεί εξαιρετικά χρήσιμη παράμετρο για τη βιομηχανία, καθώς βάσει αυτής προγραμματίζεται η παραγωγή και η διάθεση των προϊόντων. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως για την πρόβλεψη του χρόνου ζωής ενός αποθηκευμένου προϊόντος είναι η **μέθοδος των επιταχυνόμενων δοκιμών (accelerated storage stability test)**. Με άλλα λόγια, το προϊόν αποθηκεύεται σε θερμοκρασίες ανώτερες της συνήθους θερμοκρασίας αποθήκευσης και σε κάθε μία από αυτές μετράται το επιθυμητό μέγεθος που αποτελεί κριτήριο υποβάθμισης. Ανάλογη διαδικασία ακολουθήθηκε και στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, εστιάζοντας στην αντιοξειδωτική δράση της καλλυντικής κρέμας. Η μοντελοποίηση που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης *Arrhenius* παρέχει τη δυνατότητα της πρόβλεψης της αντιοξειδωτικής δράσης σε χρονικό ορίζοντα που ξεπερνάει τα όρια της παρούσας έρευνας, δίνοντας κατ' αυτό τον τρόπο μια ολοκληρωμένη εικόνα για το προϊόν και τη δράση του.

Κεφαλαίο 5. Συμπεράσματα-Προτάσεις

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, η λυγαριά (*Vitex Agnus Castus*) αποτελεί πλούσια πηγή βιοδραστικών συστατικών, ως επί το πλείστον φαινολών, ιριδοειδών και τερπενοειδών, με σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

Η διαδικασία της απόσταξης οδήγησε στην παραλαβή του αιθέριου ελαίου και του ανθόνερου τόσο από καρπούς όσο και από φύλλα/άνθη του φυτού. Το αιθέριο έλαιο και το ανθόνερο μελετήθηκαν ποιοτικά ως προς τη σύστασή τους και ταυτοποιήθηκαν συστατικά όπως η 1,8-κινεόλη, το trans-καρυοφυλλένιο, το β-φαρνεσένιο και το 2-p-κυμένιο. Όσον αφορά τη διεργασία της εκχύλισης που ακολούθησε, τα τρία εκχυλίσματα με διαλύτες οξικό αιθυλεστέρα, αιθανόλη και νερό, μελετήθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά ως προς τα βιοδραστικά συστατικά τους, τις αποδόσεις της εκχύλισης, την αντιοξειδωτική δράση και το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Όσον αφορά τα βιοδραστικά συστατικά, βρέθηκαν να εμπεριέχουν ουσίες όπως η καστισίνη και η αγνουσίδη, των οποίων η ορμονορυθμιστική δράση έχει τεκμηριωθεί από εμπειριστατωμένες μελέτες. Άλλα σημαντικά συστατικά που εντοπίστηκαν είναι το καφεϊκό οξύ, το βενζοϊκό οξύ, καθώς και παράγωγά του, τα οποία λειτουργούν ως φυσικά συντηρητικά (parabens). Συνεχίζοντας με τις αποδόσεις της εκχύλισης, τα φύλλα/άνθη παρουσίασαν μεγαλύτερες συγκριτικά με τους καρπούς, κάτι που ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι η παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών που βρίσκονταν στο εσωτερικό του καρπού ήταν εξαιρετικά δύσκολη λόγω της σκληρής δομής του. Επίσης από τα εκχυλίσματα των φύλλων αποδοτικότερο κρίθηκε το αιθανολικό, ενώ στους καρπούς το αντίστοιχο του οξικού αιθυλεστέρα. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει πως τα φύλλα εμπεριέχουν περισσότερα πολικά συστατικά, ενώ οι καρποί κυρίως άπολα. Στη συνέχεια εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων με το αιθανολικό εκχύλισμα να εμφανίζεται ως το πιο αντιοξειδωτικά ισχυρό τόσο στους καρπούς όσο και στα φύλλα. Ως προς το φαινολικό περιεχόμενο, και στις δύο περιπτώσεις, πρώτο έρχεται το υδατικό εκχύλισμα και κατόπιν το αιθανολικό και το αντίστοιχο του οξικού αιθυλεστέρα. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό πως το μεν υδατικό εκχύλισμα εμπεριέχει περισσότερες φαινόλες, το δε αιθανολικό εμπεριέχει τις πιο ισχυρές ως προς την αντιοξειδωτική δράση.

Προχωρώντας στα αποτελέσματα της ενσωμάτωσης του αιθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων λυγαριάς σε φορέα-γαλάκτωμα καλλυντικής χρήσης, προέκυψε πως ο χρόνος και η

αυξανόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης υποβαθμίζουν την αντιοξειδωτική δράση που προσέδωσε το εκχύλισμα στο προϊόν. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο καθώς με την πάροδο του χρόνου και την αύξηση της θερμοκρασίας ενισχύονται οι αντιδράσεις οξείδωσης της λιπαρής φάσης του γαλακτώματος, με αποτέλεσμα να αναλαμβάνουν δράση οι αντιοξειδωτικές ουσίες και ως εκ τούτου να υποβαθμίζονται. Μάλιστα, αποδείχθηκε πως ο ρυθμός υποβάθμισης των αντιοξειδωτικών λυγαριάς που εμπεριέχονται στο καλλυντικό γαλάκτωμα ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης και περιγράφεται πολύ ικανοποιητικά από την εξίσωση *Arrhenius*.

Με βάση όσα προαναφέρθηκαν, γίνεται σαφές πως η λυγαριά παρέχει ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών σε τομείς όπως τα τρόφιμα, τα καλλυντικά και τα φάρμακα με λαμπρές προοπτικές μελλοντικής εξέλιξης. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση της σε συμπληρώματα διατροφής για γυναίκες είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη εδώ και χρόνια στη φαρμακευτική αγορά. Ωστόσο, εξαιτίας της αντιμυκητιακής/αντιμικροβιακής δράσης του αιθέριου ελαίου και των φυσικών συντηρητικών που εμπεριέχονται στα εκχυλίσματα της, θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων ως μια εναλλακτική και πιο φυσική πρόταση συντηρητικού. Επιπρόσθετα, η αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική της δράση μπορεί να αποδειχθεί εξαιρετικά ενδιαφέρουσα για την καλλυντική βιομηχανία, λαμβάνοντας υπόψη την πληθώρα καλλυντικών προϊόντων που στοχεύουν στην προστασία του δέρματος από τις ελεύθερες ρίζες και τη γήρανση. Σαφώς το πεδίο έρευνας είναι ευρύτατο και το φυτό έχει μελετηθεί σε πολύ περιορισμένη έκταση, συγκριτικά με τις δυνητικές του ικανότητες. Μια ενδιαφέρουσα πρόταση για περεταίρω έρευνα πέρα από τα πλαίσια της εν λόγω διπλωματικής εργασίας, είναι η ταυτοποίηση των βιοδραστικών συστατικών των διαφόρων εκχυλισμάτων με κάποια αναλυτική μέθοδο όπως η LC-MS. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσε να επιτευχθεί μία ξεκάθαρη εικόνα για το βιοδραστικό προφίλ του φυτού και κατ' επέκταση για τη δράση του. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να γίνει μία προσπάθεια βελτιστοποίησης της διεργασίας της εκχύλισης χρησιμοποιώντας μεθόδους όπως τα μικροκύματα, οι υπέρηχοι και το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Κατ' αυτόν τον τρόπο, θα μπορούσαν να εξερευνηθούν οι δυνατότητες ανάκτησης όσο το δυνατόν περισσότερων βιοδραστικών συστατικών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.

6. Βιβλιογραφία

- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2000). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, *127*, 183-198.
- Arentz, S., Abbott, J. A., Smith, C. A., & Bensoussan, A. (2014). Herbal medicine for the management of polycystic ovary syndrome (PCOS) and associated oligo/amenorrhoea and hyperandrogenism; a review of the laboratory evidence for effects with corroborative clinical findings. *BMC Complement Altern Med*, *14*, 511.
- Balentine, D., Wiseman, S., & Bouwens, L. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *37*(8), 693-704.
- Biesalski, H.-K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Muller, M., Schrenk, D., . . . Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. (A. Laviano, Ed.) *Nutrition, The International Journal of Applied and Basic Nutritional Sciences*, *25*(11-12), 1202-1205.
- Bors, W., Michel, C., & Schikora, S. (1995). Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med*, *19*(1), 45-52.
- Brand-Williams, W., Culevier, M., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm .Wiss. u.-Technol*, *28*, 25-30.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*, *28*, 25-30.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, *9*, 1551-1558.
- Carmichael, A. (2008). Can Vitex Agnus Castus be Used for the Treatment of Mastalgia? What is the Current Evidence? *Evid Based Complement Alternat Med*, *5*(3), 247-250.
- Catty, S. (2001). *Hydrosols: The Next Aromatherapy*. Rochester: Healing Arts Press.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason Sonochem*, *18*(4), 813-835.
- Chen, S.-N., Friesen, J. B., Webster, D., Nikolic, D., van Breemen, R. B., Wang, Z. J., . . . Pauli, G. F. (2011). Phytoconstituents from Vitex agnus-castus fruits. *Fitoterapia*, *82*(4), 528-533.
- Choudhary, M., Kumar, V., Malhotra, H., & Singh, S. (2015). Medicinal plants with potential anti-arthritic activity. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, *4*(2), 147-179.
- Corrales, M., Toepfle, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonic, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *9*, 85-91.
- Cossuta, D., Simándi, B., Vági, E., Hohmann, J., Prechl, A., Lemberkovic, É., . . . Keve, T. (2008). Supercritical fluid extraction of Vitex agnus castus fruit. *The Journal of Supercritical Fluids*, *47*, 188-194.

- Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274, 532-538.
- Draxler, L., Novak, J., Göhler, I., Abel, G., & Franz, C. (2004). Cultivation of *Vitex agnus castus*—a comparison of different accessions. *Zeitschrift für Arznei und Gewürzpflanzen*, 9, 113-117.
- Duymus, H., Akalin Ciftci, G., Ulusoylar Yildirimci, S., Demirci, B., & Kırimer, N. (2014). The cytotoxic activity of *Vitex agnus castus* L. essential oils and their biochemical mechanisms. *Industrial Crops and Products*, 55, 33-42.
- Elder, R. (1984). Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. *J Am Coll Toxicol*, 3, 147-209.
- Engin, K. N., & Nusret, K. (2009). Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Molecular Vision*, 15, 855-860.
- Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients*, 6(2), 466-488.
- Frankel, E., & Meyer, A. (2000). *The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants*. (Vol. 80). J. Sci. Food Agric.
- Galey, J. (1997). Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Adv Pharmacol*, 38, 167-203.
- Ghannadi, A., Bagherinejad, M., Abedi, D., Jalali, M., Absalan, B., & Sadeghi, N. (2012). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargonium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L. *Iran J Microbiol.*, 4, 171-176.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11), 1106-1114.
- GÖKBULUT, A., ÖZHAN, O., KARACAOĞLU, M., & ŞARER, E. (2010). Radical Scavenging Activity and Vitexin Content of *Vitex agnus-castus* Leaves and Fruits. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 35, 85-91.
- Gordon, M. (2001). *Measuring antioxidant activity. Antioxidants in food. Practical applications*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd And CRC Pres LLC.
- Hajirahimkhan, A., Dietz, B. M., & Bolton, J. L. (2013). Botanical modulation of menopausal symptoms: Mechanisms of action? *Planta Med.*, 79(7), 538-553.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Heim, K., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Hertog, M., Hollman, P., & Katan, M. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and nine fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2379-2383.
- Hertog, M., Hollman, P., & Van de Putte, B. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wine and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1242-1246.

- Hirayama, O., Nakamura, K., Hamada, S., & Kobayasi, Y. (1994). Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids*, 29, 149-150.
- Hoberg, E., Orjala, J., Meier, B., & Sticher, O. (1999). Diterpenoids from the fruits of *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry*, 52, 1555-1558.
- Huang, M. T., & Ferraro, T. (1992). Phenolic-compounds in food and cancer prevention. *ACS Symp. Ser.*, 507, 8-34.
- Ismail, N., & Alam, M. (2001). A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia*, 72(6), 676-679.
- Kaufmann, B., Christen, P., & Veuthey, J. (2001). Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides. *Phytochem Anal.*, 12(5), 327-331.
- Khalilzadeh, E., Saiah, G. V., Hasannejad, H., Ghaderi, A., Ghaderi, S., Hamidian, G., . . . Zangisheh, M. (2015). Antinociceptive effects, acute toxicity and chemical composition of *Vitex agnus-castus* essential oil. *Avicenna J Phytomed.*, 5(3), 218–230.
- Khalilzadeh, E., Saiah, G. V., Hasannejad, H., Ghaderi, A., Ghaderi, S., Hamidian, G., . . . Zangisheh, M. (2015). Antinociceptive effects, acute toxicity and chemical composition of *Vitex agnus-castus* essential oil. *Avicenna J Phytomed.*, 5(3), 218–230.
- Khan, M. S., Syeed, S. H., Uddin, M. H., Akter, L., Ullah, M. A., Jahan, S., & Rashid, M. H. (2013). Screening and evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, thrombolytic and membrane stabilizing properties of the methanolic extract and solvent-solvent partitioning effect of *Vitex negundo* Bark. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(5), 393–400.
- Krinsky, N. (1994). The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1003-1010.
- Kumar, H., Lim, H.-w., More, E., Kim, B.-w., Kim, I. S., & Choi, D.-k. (2012). The Role of Free Radicals in the Aging Brain and Parkinson's Disease: Convergence and Parallelism. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 10478-10504.
- Lam, K. Y., Kiong Ling, A. P., Koh, R. Y., Wong, Y. P., & Say, Y. H. (2016). A Review on Medicinal Properties of Orientin. *Adv. Pharmacol. Sci.*, 2016, 4104595.
- Lovászik, S. (1996). The importance of *Vitex agnus castus* L. in phytotherapy. *Fitoterapia*, 4, 132-146.
- Lucks, B. C. (2003). *Vitex agnus castus* essential oil and menopausal balance: a research update. *Complementary Therapies in Nursing and Midwifery*, 8, 148-154.
- Luque de Castro, M., & García-Ayuso, L. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1-10.
- Luque-García, J., & Luque de Castro, M. (2003). Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends Analyt Chem*, 22, 41-47.
- Malamed, S. (2003). Allergy and toxic reactions to local anesthetics. *Dent Today*, 22(4), 114-116, 118-121.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr*, 79(5), 727-747.

- Mari, A., Montoro, P., Pizza, C., & Piacente, S. (2012). Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of chemical markers and principal component analysis of *Vitex agnus-castus* L. fruits (Verbenaceae) and derived food supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 224-230.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Goncalves, M., Salgueiro, L., . . . Lai, R. (2010). Extraction, separation and isolation of volatiles from *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) wild species of Sardinia, Italy, by supercritical CO₂. *Nat Prod Res.*, 24(6), 569-579.
- McClements, D. J. (1999). Molecular interactions, Colloidal interactions, Interfacial properties and their characterization, Emulsion stability, Emulsion Rheology. In D. J. McClements, *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. London, New York, Boca Raton, Washington: CRC Press.
- Mesaik, A. M., Shaikh, A., Murad, S., & Choudhary, M. I. (2009). Isolation and Immunomodulatory Properties of a Flavonoid, Casticin from *Vitex agnus-castus*. *Phytotherapy Research*, 23(11), 1516 - 1520.
- Morrison, R., & Boyd, R. (1988). *Organic Chemistry* (4th ed.). New York: Allyn & Bacon.
- Odenthal, K. P. (1998). *Vitex agnus castus* L.,—Traditional Drug and Actual Indications. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 12, S160–S161.
- Ohyama, K., Akaike, T., Hirobe, C., & Yamakawa, T. (2003). Cytotoxicity and apoptotic inducibility of *Vitex agnus castus* fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 10-18.
- Olson, J., & Krinsky, N. (1995). Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiological modulators. *FASEB Journal*, 9, 1547-1550.
- Pokorný, J. (1986). Addition of antioxidants for food stabilization to control oxidative rancidity. *Czech Journal*, 4, 299-307.
- Prasad, K., Yang, E., Yi, C., Zhao, M., & Jiang, Y. (2009). Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 155-159.
- Price, L., & Price, S. (2004). *Understanding Hydrolats: The Specific Hydrosols for Aromatherapy : a Guide for Health Professionals*. London: Churchill Livingstone.
- Qualley, A. V., Widhalm, J. R., Adebesein, F., Kish, C. M., & Dudareva, N. (2012). Completion of the core β -oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109(40), 16383-16388.
- Rashed, K. N. (2013). Antioxidant activity of different extracts of *Vitex agnus-castus* (L.) and phytochemical profile. *Research in Pharmacy*, 3(6), 1-5.
- Ratty, A., & Das, N. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: structure activity relationship. *Biohem. Med. Metab. Biol*, 39, 69-79.
- Reinii, K., & Block, G. (1996). Phytoestrogen content of food: a compendium of literature values. *Nutr. Cancer Int. J*, 26, 123-128.

- Roemheld-Hamm, B. (2005). Chasteberry. *American Family Physician*, 72, 821–824.
- Rousseff, R., Martin, S., & Youtsey, C. (1987). Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 1027-1030.
- Sahu, S., & Gray, G. (1997). Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food Chem Toxicol.*, 35, 443-447.
- Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenol. *Nutr. Res.*, 20, 941-953.
- Sarikurku, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., & Mete, E. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2479–2483.
- Shah, S., Dhanani, T., & Kumar, S. (2013). Validated HPLC method for identification and quantification of p-hydroxy benzoic acid and agnuside in *Vitex negundo* and *Vitex trifolia*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(6), 500-508.
- Shahidi, F., Janitha, P., & Wanasundara, P. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67-103.
- Stojkovic, D., Sokovic, M., Glamocilija, J., Dzamic, A., C'iric, A., Ristic, M., & Grubišic, D. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. *Food Chemistry*, 128, 1017-1022.
- Sugihara, N., Arakawa, T., Ohnishi, M., & Furuno, K. (1999). Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radic Biol Med.*, 27, 1313-1323.
- Svecová, E., Proietti, S., Caruso, C., Colla, G., & Crinò, P. (2013). Antifungal activity of *Vitex agnus-castus* extract against *Pythium ultimum* in tomato. *Crop Protection*, 43, 223-230.
- Szumilo, J. (2005). Protocatechuic acid in cancer prevention. *Postepy Hig Med Dosw*, 59, 608-615.
- Tandon, S. (2008). Distillation Technology for Essential Oils. In S. S. Handa, S. P. Khanuja, G. Longo, & D. D. Rakesh, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* (pp. 115-119). Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre.
- Tandon, S. (2016). Hydro - distillation and steam distillation from aromatic plants. Chemical Engineering Division. CIMAP, Lucknow. 1-34. (<https://www.morningmystbotanics.com/wp-content/uploads/df4316.pdf>)
- Tapiero, H., Ba, G., & Tew, K. (2002). Estrogens and environmental estrogens. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(1), 1-9.
- Tomas-Barberan, F., & Clifford, M. (2000). Flavanones, Chalcones, and dihydrochalcones-nature, occurrence, and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1073-1080.
- Traber, M., & Stevens, J. (2011). Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 1000–1013.

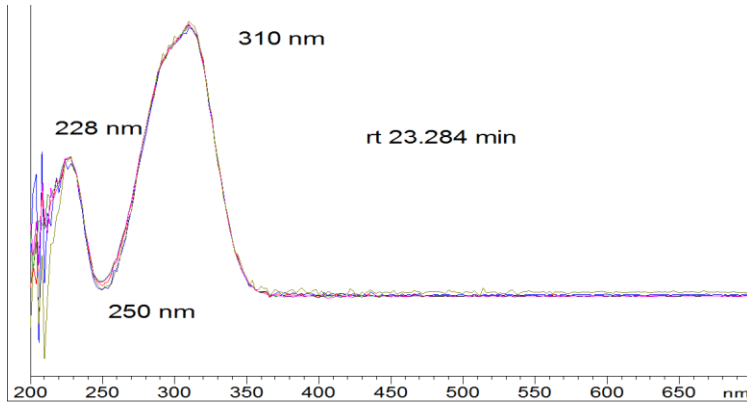
- Tutin, T., Heywood, V. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M., & Webb., D. (1972). *Flora Europaea* (Vol. 3). Cambridge: Cambridge University Press.
- Ueda, S., Nakamura, H., Masutani, H., Sasada, T., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., & Yodoi, J. (2002). Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. *Mol Immunol.*, 38(10), 781-791.
- Waterhouse, A. (2005). Determination of total phenolics. In R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, . . . P. Sporns, *Handbook of Food Analytical Chemistry* (pp. 463-471). Hoboken: John Wiley & Sons.
- Wayner, D., Burton, G., Ingold, K., & Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett.*, 187(1), 33-37.
- Webster, D. E. (2008). *Botanical, chemical, genetic, and pharmacological studies of Vitex agnus-castus L.* Chicago: Proquest, Umi Dissertation Publishing.
- Webster, D., Lu, J., Chen, S.-N., Fransworth, N., & Wang, Z. J. (2006). Activation of the μ -opiate receptor by *Vitex agnus castus* methanol extracts: implication for its use in PMS. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 216-221.
- Xi, J., Shen, D., Li, Y., & Zhang, R. (2011). Micromechanism of ultrahigh pressure extraction of active ingredients from green tea leaves. *Food Control*, 22, 1473-1476.
- Yu, S., Plan, M. R., Winter, G., & Krömer, J. O. (2016). Metabolic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for the Production of para-Hydroxy Benzoic Acid. *Front Bioeng Biotechnol.*, 4, 90.
- Zhou, Y., Liu, Y., Cao, J., Zeng, G., Shen, C., Li, Y., . . . Shi, Y. (2009). Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. *Clinical Cancer Research*, 15, 5161–5169.
- Zhu, B., Ezell, E., & Liehr, J. (1994). Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *J Biol Chem.*, 269(1), 292-299.
- Βαλαβανίδης, Α. (2004). *Ελεύθερες Ρίζες Και Μηχανισμοί Καρκινογένεσης*. Αθήνα: BHTA MEDICAL ARTS.
- Βούλγαρη, Π. Β. (2003). Οι κυτταροκίνες και οι υποδοχείς τους. In Π. Β. Βούλγαρη, & Α. Α. Δρόσος (Ed.), *Σημειώσεις Ανοσολογίας* (pp. 124-141). Ιωάννινα: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Κροκίδα, Μ. (2013). Σημειώσεις μαθήματος, «Μηχανική Φυσικών Διεργασιών II. Εισαγωγή - Διεργασίες Διαχωρισμού στη Χημική Μηχανική». Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Αθήνα. 1-19. (<https://chemeng-ntua.gr/viewtopic.php?t=2047>)
- Κωτσοβός, Γ. Μ. (2008). Εφαρμογή της Τεχνολογίας της Πράσινης Χημείας στα σχολικά εργαστήρια. Κατασκευή πιλοτικής διάταξης μικροεκχύλισης με διαλύτη υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Διπλωματική εργασία. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Θεσσαλονίκη.
- Παπαγεωργίου, Γ. (2005). *Βιοχημειοελευθέρωνριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξειδάση*. Θεσσαλονίκη: University Studio Press.

Σουφλερός, Ε. (1997). Κεφ. 18 Μέθοδοι Ανάλυσης. In Ε. Σουφλερός, *Οίνος και Αποστάγματα* (pp. 116-119). Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.

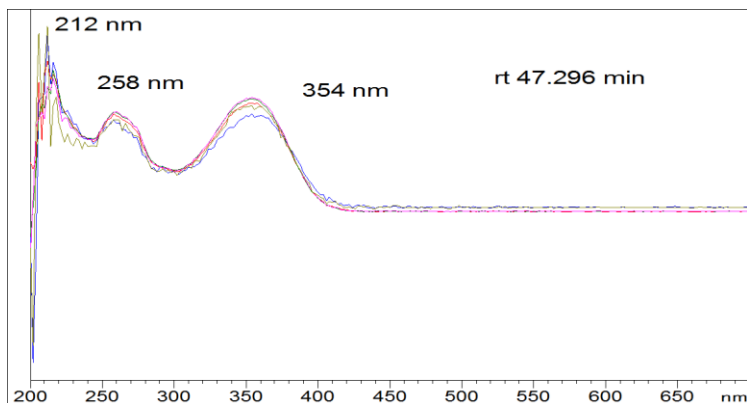
Στρατή Ε.Φ. 2014. Μελέτη μεθόδων παραλαβής καρτενοειδών από παραπροϊόντα τομάτας. Διδακτορική διατριβή. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα.

Παράρτημα

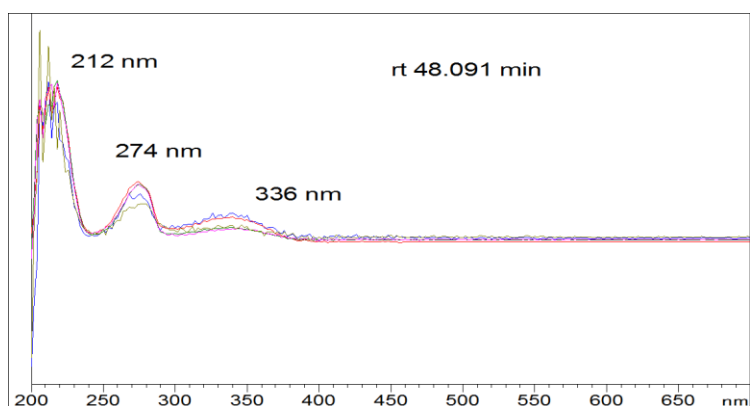
Στο εν λόγω παράρτημα παρατίθενται όλα τα φάσματα που ελήφθησαν κατά την ποιοτική ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC-DAD) των εκχυλισμάτων των καρπών και των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



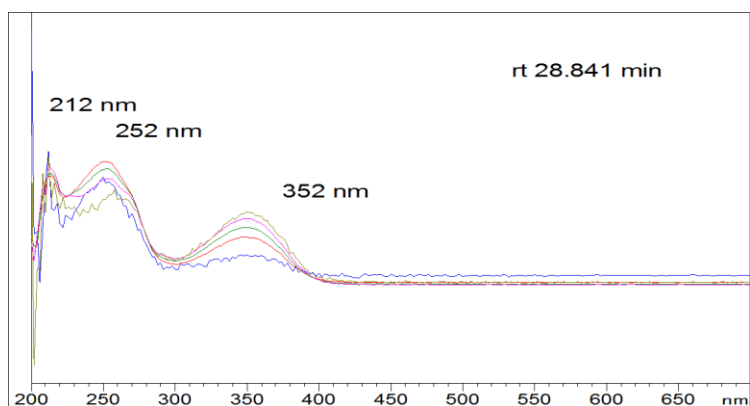
Εικ Π1. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 23.284 min στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



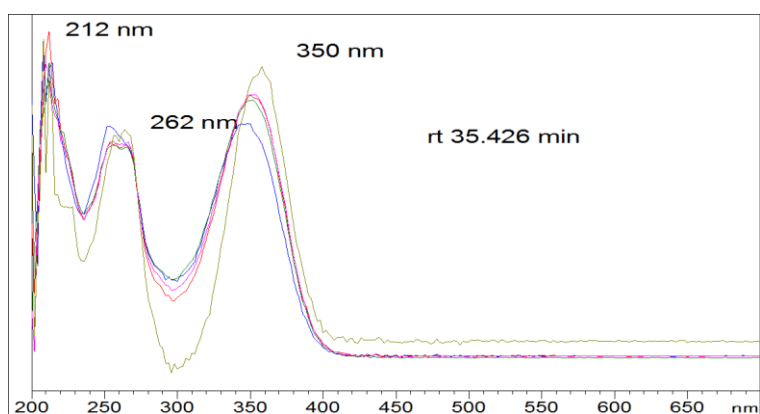
Εικ Π2. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 47,296 min στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



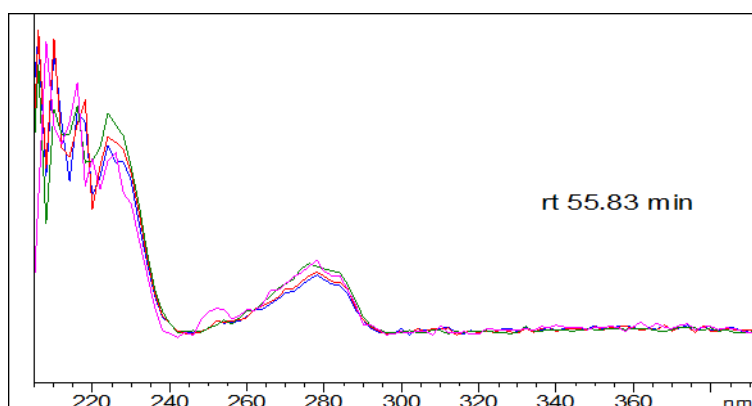
Εικ Π3. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 48,091 min στο εκχύλιμα του οξικού αιθυλεστέρα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



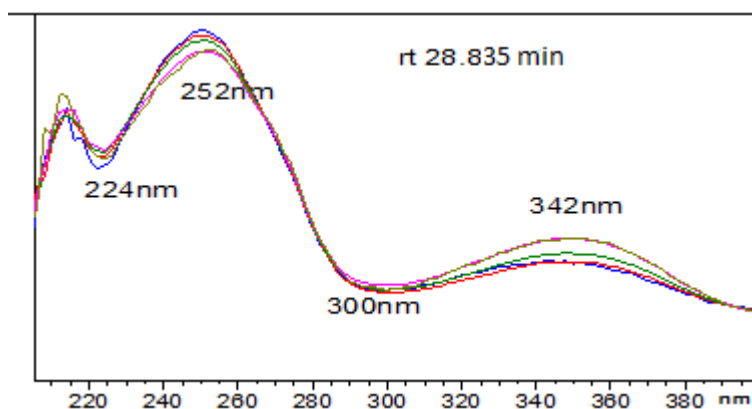
Εικ Π4. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 28,841 min στο αιθανολικό εκχύλιμα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



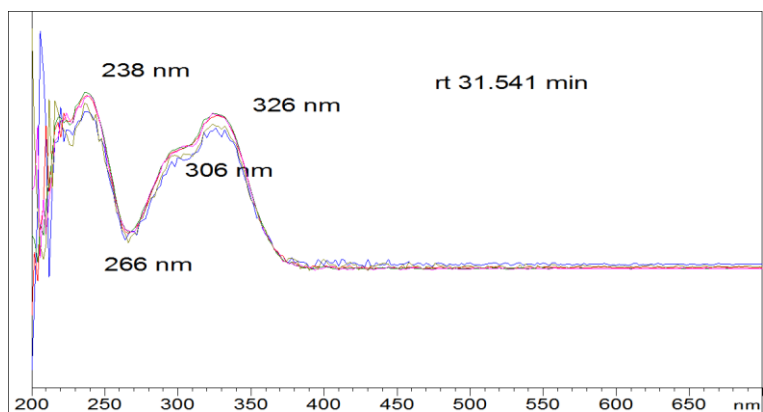
Εικ Π5. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 35,426 min στο αιθανολικό εκχύλιμα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



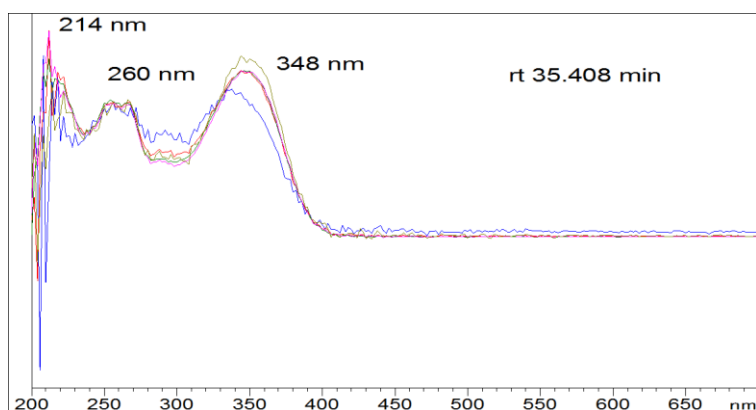
Εικ Π6. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 55,834 min στο αιθανολικό εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



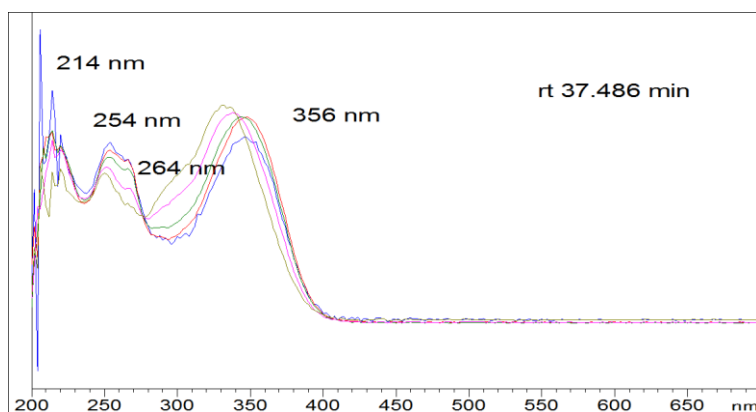
Εικ Π7. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 28,835 min στο υδατικό εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



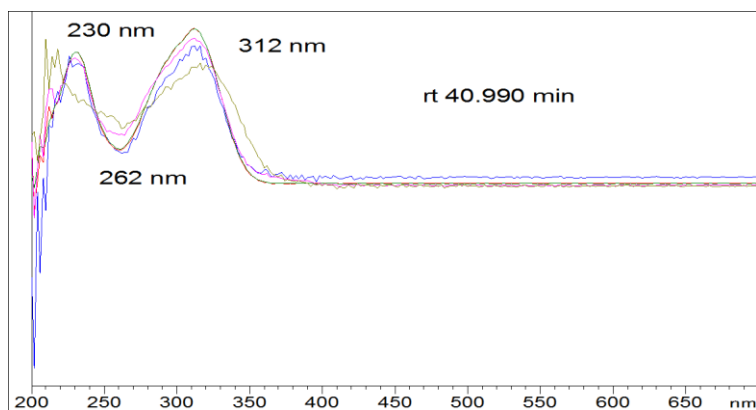
Εικ Π8. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 31,541 min στο υδατικό εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



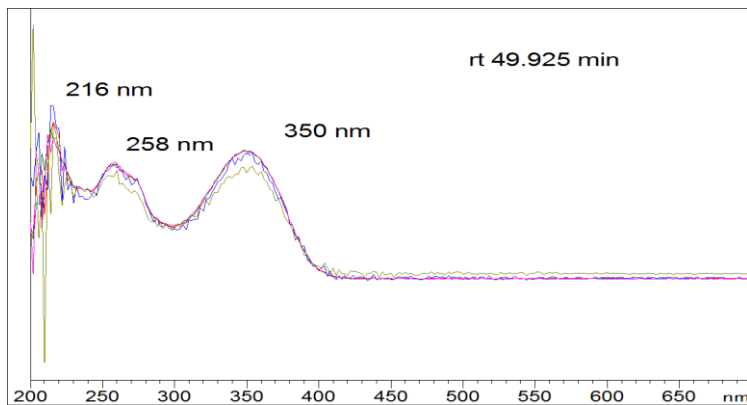
Εικ Π9. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 35,408 min στο υδατικό εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



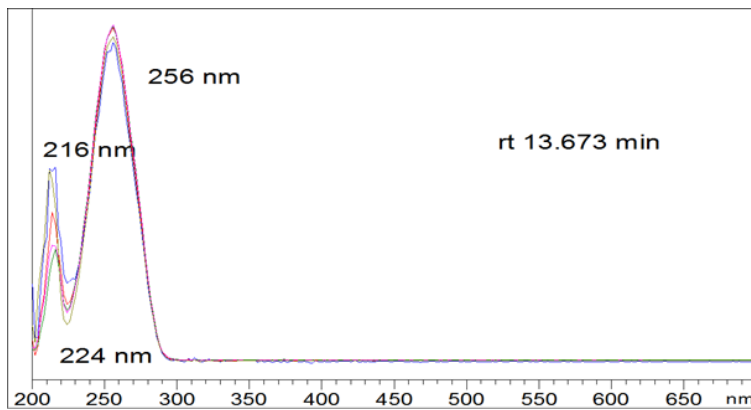
Εικ Π10. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 37,486 min στο υδατικό εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



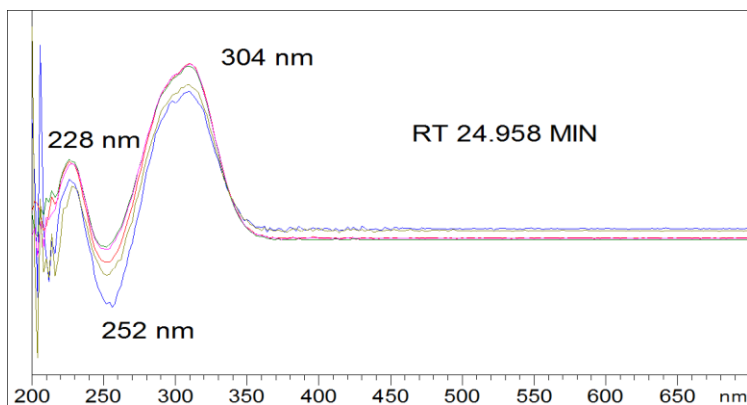
Εικ Π11. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 40,990 min στο υδατικό εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



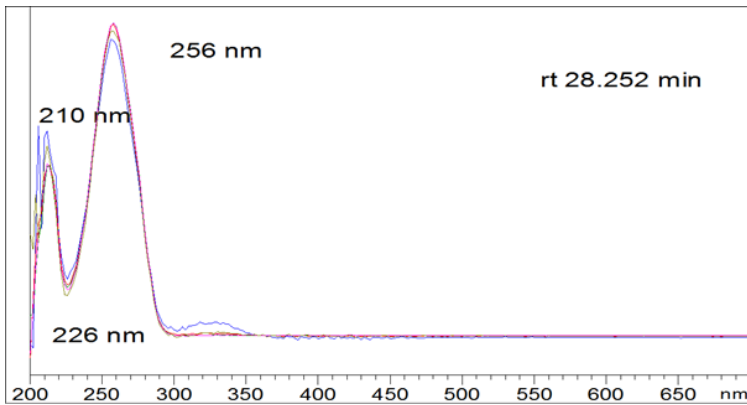
Εικ Π12. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 49,925 min στο υδατικό εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



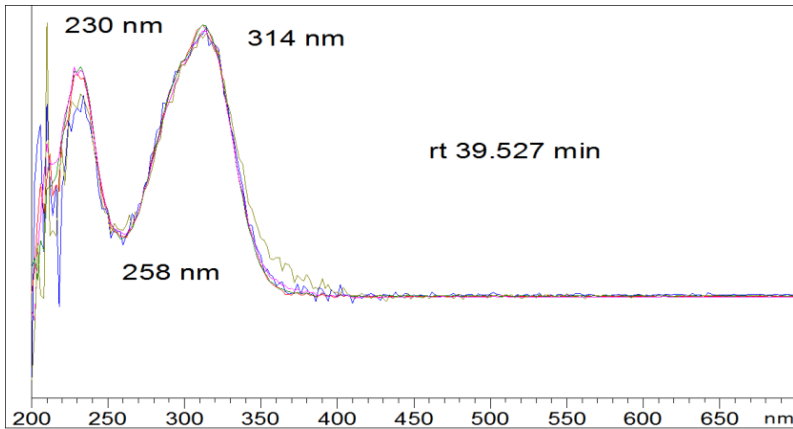
Εικ Π13. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 13,673 min στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



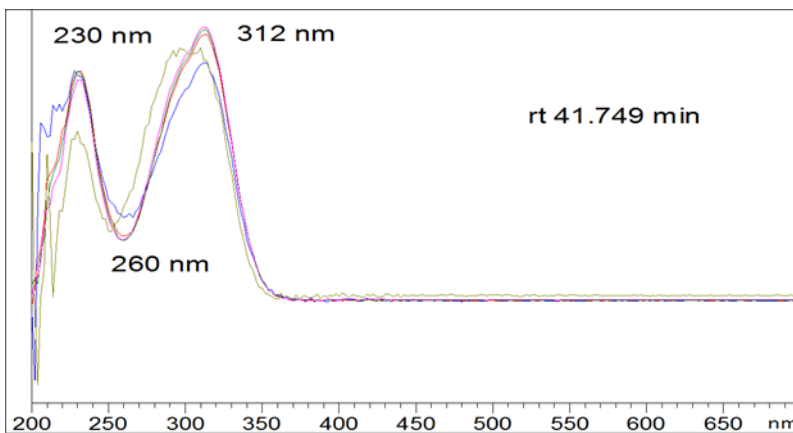
Εικ Π14. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 24,958 min στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



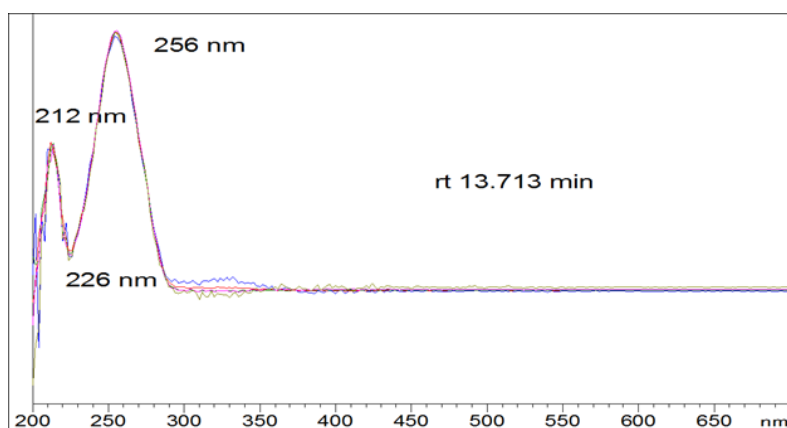
Εικ Π15. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 28,252 min στο εκχύλιμα του οξικού αιθυλεστέρα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



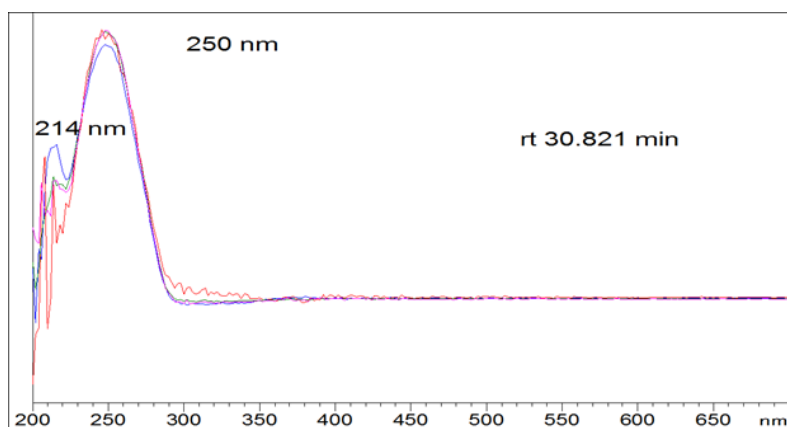
Εικ Π16. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 39,527 min στο εκχύλιμα του οξικού αιθυλεστέρα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



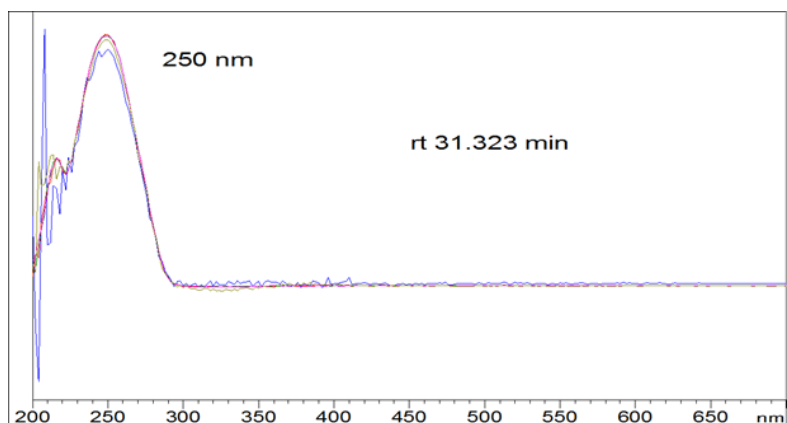
Εικ Π17. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 41,749 min στο εκχύλιμα του οξικού αιθυλεστέρα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



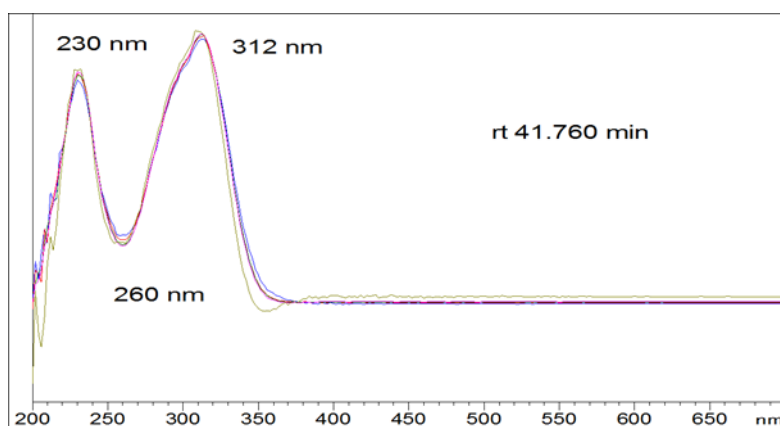
Εικ Π18. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 13,713 min στο αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



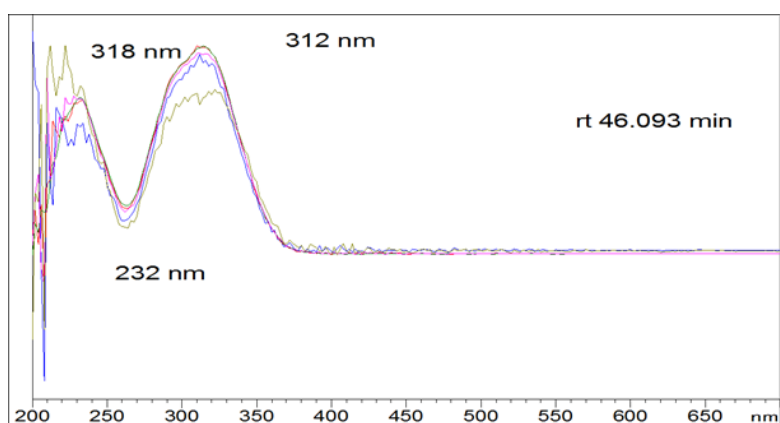
Εικ Π19. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 30,821 min στο αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



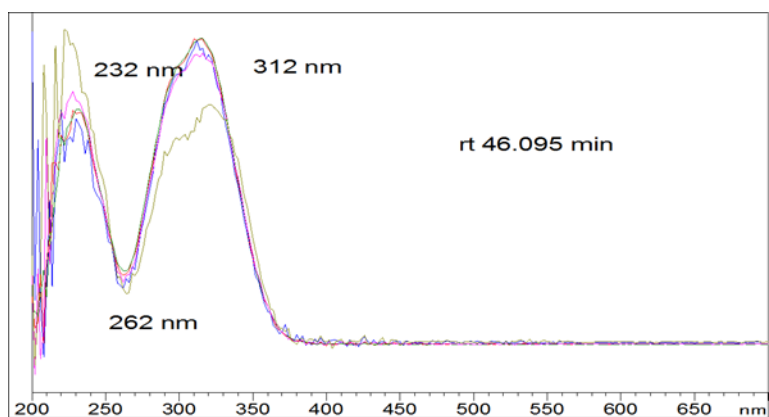
Εικ Π20. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 31,823 min στο αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



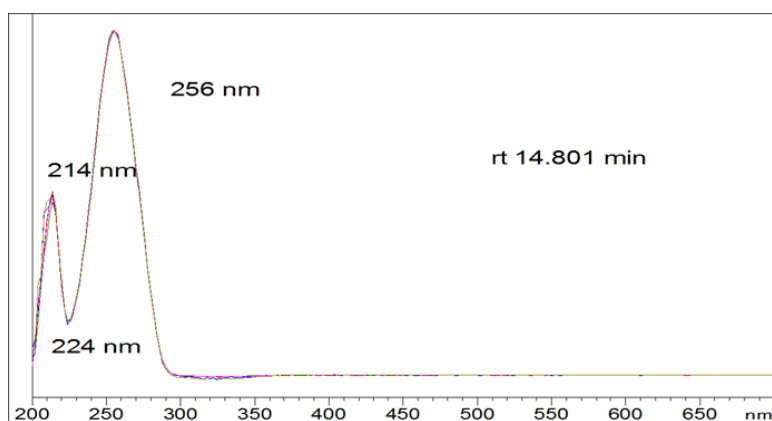
Εικ Π21. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 41,760 min στο αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



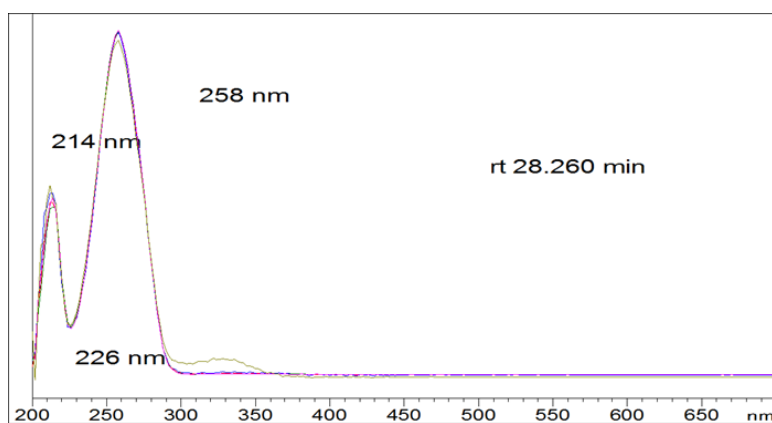
Εικ Π22. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 46,093 min στο αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



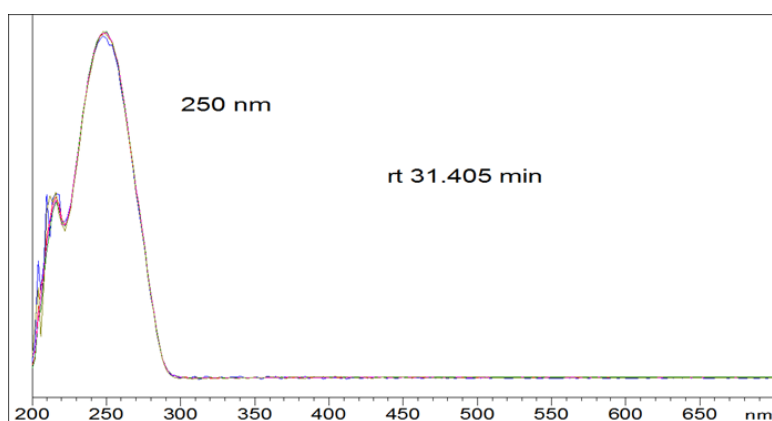
Εικ Π23. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 46,095 min στο αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



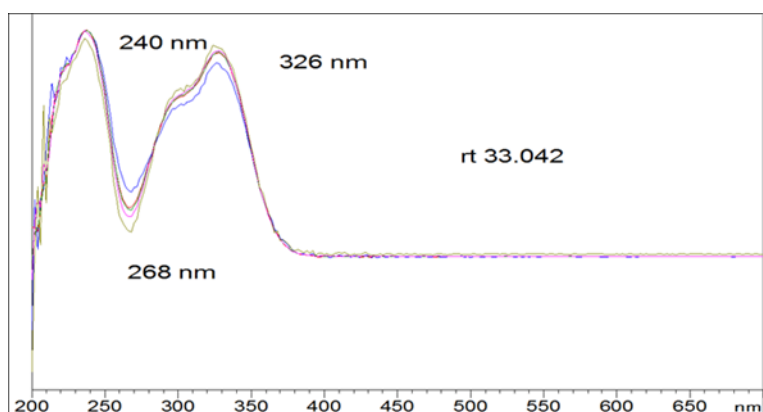
Εικ Π24. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 14,801 min στο υδατικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



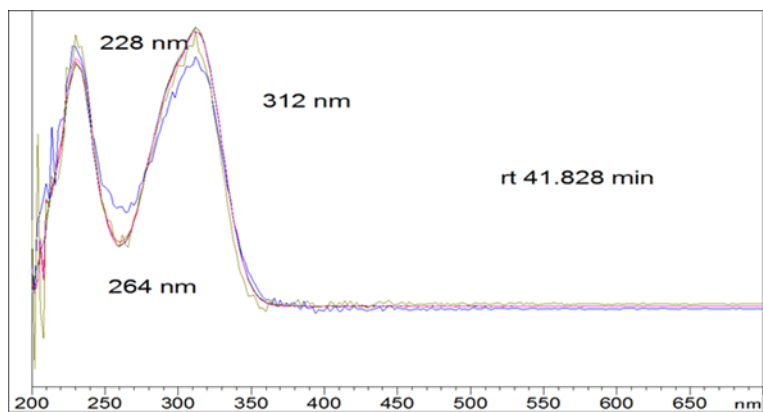
Εικ Π25. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 28,260 min στο υδατικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



Εικ Π26. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 31,405 min στο υδατικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



Εικ Π27. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 33,042 min στο υδατικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.



Εικ Π28. Φάσμα ουσίας με χρόνο έκλουσης 41,828 min στο υδατικό εκχύλισμα των φύλλων/ανθών του φυτού *Vitex Agnus Castus*.